

N°d'ordre 2884

THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE BORDEAUX I

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES

par **Pierre LABADIE**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENT

DETERMINATION DES STEROIDES HORMONAUX DANS L'ENVIRONNEMENT : DEVELOPPEMENTS ANALYTIQUES ET APPLICATIONS

Soutenue le 19 novembre 2004

Après avis de :

Mme GRENIER-LOUSTALOT, Directeur de recherche CNRS, Vernaison

Rapporteurs

Mme Jocelyne PELLERIN, Professeur, ISMER, Rimouski

Devant la Commission d'examen formée de :

M Alain BOUDOU, Professeur, Université Bordeaux I

Président

Mme Hélène BUDZINSKI, Directeur de recherche CNRS, Bordeaux

Directeur de thèse

M Thierry BURGEOT, Chercheur, IFREMER, Nantes

Examineur

Mme GRENIER-LOUSTALOT, Directeur de recherche CNRS, Vernaison

Rapporteur

M François LEBOULENGER, Professeur, Université du Havre

Examineur

Mme Jocelyne PELLERIN, Professeur, ISMER, Rimouski

Rapporteur

2004

AVANT-PROPOS

Je souhaiterais remercier les personnes ayant participé de près ou de loin à la bonne réalisation de ce travail de thèse, entrepris au Laboratoire de Physico- & Toxicochimie des Systèmes Naturels (LPTC).

Je remercie Mesdames Marie-Florence Grenier-Loustalot, Directeur de recherche au CNRS, et Jocelyne Pellerin, Professeur à l'ISMER de Rimouski, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Mes remerciements s'adressent également à Messieurs Alain Boudou, Professeur à l'Université Bordeaux I, Thierry Burgeot, chercheur à l'IFREMER, et François Leboulanger, Professeur à l'Université du Havre, pour leur participation à mon jury de thèse.

Je remercie M Philippe Garrigues, Directeur de Recherche au CNRS, de m'avoir accueilli dans le laboratoire dont il assume la direction.

Je remercie tout particulièrement Mme Hélène Budzinski, Directeur de Recherche au CNRS, qui a assuré la direction de ces travaux de thèse. Elle a su me faire confiance et m'aider à développer le sens critique et la rigueur indispensables à tout travail scientifique, tout en me procurant d'excellentes conditions matérielles. Je lui suis également reconnaissant de m'avoir donné l'opportunité de participer à de nombreux congrès et missions, évènements marquants dans une vie de thésard.

Merci à Cinta PORTE, Directeur de Recherche au CSIC, et à Ramon Lavado pour leur accueil lors de mon séjour dans leur équipe à Barcelone.

Merci à Olivier Geffard, chargé de recherche au CEMAGREF, pour la patience inouïe dont il a su faire preuve lors de nos discussions passionnées sur la reproduction des moules du bassin d'Arcachon.

Merci à Mesdames Karyn Le Ménach, Jacqueline Bellocq et Sylvie Augagneur pour l'aide et les conseils qu'elles m'ont apportés tout au long de ces travaux.

Merci aussi aux nombreux étudiants côtoyés pendant ces trois années passées au LPTC.

Merci enfin à ma famille pour son soutien moral et financier pendant ces longues années d'études, à la famille PERRAUDIN pour son soutien moral et merci enfin à Emilie pour son soutien sans faille.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	VIII
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES	X
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. LA PROBLEMATIQUE DES PERTURBATIONS ENDOCRINIENNES	6
2. ENDOCRINOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ LES POISSONS ET LES MOLLUSQUES	7
2.1. Poissons	7
2.1.1. Axe hypothalamo-hypophyso-gonadiques	7
2.1.2 Biosynthèse des stéroïdes hormonaux	8
2.1.3. Modes d'action.....	11
2.1.4. Rôle des stéroïdes hormonaux dans la fonction de reproduction	13
2.2. Mollusques bivalves	15
2.2.1. Neurosécrétion	15
2.2.2. Stéroïdes endogènes : présence, biosynthèse et rôle physiologique	16
3. MODES D'ACTION DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS	17
3.1. Interaction directe avec les récepteurs hormonaux	17
3.1.1. Action antagoniste	17
3.1.2 Action agoniste	18
3.2. Interaction indirecte avec le système endocrinien	18
3.2.1. Concentration des récepteurs hormonaux	18
3.2.2. Biosynthèse et métabolisme des stéroïdes hormonaux.....	18
4. LES PHENOMENES DE PERTURBATION ENDOCRINIENNE DANS LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES	19
4.1. Principaux effets observés chez les organismes aquatiques	20
4.1.1. Poissons	20
4.1.2. Mollusques bivalves	22
4.2. Composés incriminés	23
4.2.1 Métaux et composés organométalliques	24
4.2.2. Pesticides et herbicides	25
4.2.3. Polychlorobiphényles.....	27
4.2.4. Hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	28
4.2.5. Polychlorodibenzodioxines et polychlorodibenzofuranes.....	29
4.2.6. Phtalates.....	30
4.2.7. Bisphénol A.....	31
4.2.8. Alkylphénols polyéthoxylates et alkylphénols.....	32
4.2.10. Stéroïdes hormonaux	36
4.2.10.1. Stéroïdes naturels	36
4.2.10.2 Stéroïdes synthétiques	38
4.2.11. Importance des hormones stéroïdiennes dans les phénomènes de féminisation observés chez les poissons.	40
5. BUTS DE L'ETUDE	42

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES.....	45
1. COMPOSES ETUDIES	46
1.1. Hormones naturelles	46
1.2. Hormones naturelles et synthétiques considérées comme contaminants potentiels des systèmes aquatiques	47
2. ORGANISMES : PRELEVEMENTS ET EXPOSITIONS	47
2.1. Flets	47
2.2. Moules	49
2.3. Turbots	50
2.3.1. Individus utilisés	50
2.3.2. Expositions en milieu contrôlé	50
3. SITES D'ECHANTILLONNAGE D'EAU	51
3.1. Estuaire de Seine	51
3.2. Jalle d'Eysines	52
4. QUANTIFICATION DES STEROÏDES PAR CG-SM ET CL-SM	53
4.1. Etalonnage interne	53
4.2. CG-SM	54
4.2.1. Dérivation	54
4.2.2. Conditions d'analyse	54
4.3. CL-SM	58
4.4. Choix de la méthode d'analyse	60
5. PROTOCOLES DE PREPARATION DES ECHANTILLONS	62
5.1. Dosage des formes libres	62
5.1.1. Plasma	62
5.1.2. Bile	63
5.1.3. Eaux de surface et effluents	64
5.1.4. Matrices solides	65
5.2. Fractionnement formes libres / formes conjuguées	66
5.3. Limites de détection	68
6. VALIDATION DES PROCEDURES D'EXTRACTION ET DE QUANTIFICATION	70
6.1. Echantillons fortifiés	70
6.1.1. Matrices modèles	70
6.1.2 Matrices biologiques	72
6.1.3. Eaux de surface, effluents de STEP et sédiment	73
6.2. Matrices certifiées	74
CHAPITRE 3	75
<i>Publication n°1 : Development of an analytical procedure for the determination of selected estrogens and progestagens in water samples. Application : study of the Seine river estuary</i>	76
<i>Publication n°2 : Determination of steroid hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (nearby Bordeaux, France)</i>	91
CHAPITRE 4	111
<i>Publication n°3 : Comparison of radioimmunoassay and gas chromatography/mass spectrometry for the measurements of testosterone and 17β-estradiol in fish plasma</i>	112

<i>Publication n°4</i> : Alteration of steroid hormone metabolism in juvenile turbot (<i>Psetta maxima</i>) exposed to nonylphenol, bisphenol A, BDE 47, diallylphthalate, oil and oil in combination with an alkylphenol industrial mixture	122
<i>Publication n°5</i> : Short term exposure to waterborne 17 α -ethynylestradiol disrupts steroid hormone metabolism in juvenile turbot (<i>Psetta maxima</i>)	142

CHAPITRE 5 169

5.1. VARIATIONS SAISONNIERES DU PROFIL HORMONAL CHEZ LE FLET (<i>Platichthys flesus</i>)	170
5.1.1. Introduction	170
5.1.2. Stéroïdes endogènes	171
5.1.3. Stéroïdes exogènes	174
5.1.4. Conclusions	175
5.2. VARIATIONS SAISONNIERES DU PROFIL HORMONAL CHEZ LA MOULE (<i>Mytilus sp.</i>)	175
5.2.1. Variations saisonnières des taux endogènes de stéroïdes et de deux paramètres physiologiques (taux de lipides et indice de condition).	175
5.2.2. Conclusions	178

CHAPITRE 6 : SYNTHESE 179

CONCLUSION GENERALE 201

BIBLIOGRAPHIE 205

ANNEXES 223

LISTE DES ABREVIATIONS

A :	4-androstene-3,17-dione (androsténedione)
CG-SM :	chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
CL-SM :	chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse
11-cT :	17 β -hydroxy-4-androstène-11,17-dione (11-cétotestostérone)
DHA :	androstan-3,17-dione (5-dihydroandrosténedione)
DHEA :	3 β -hydroxy-5-androstèn-17-one (déhydroépiandrostérone)
DHP :	17,20 β -dihydroxy-4-prégnen-3-one (17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogestérone)
DHT :	17 β -hydroxy-5 α -androstan-3-one (5-dihydrotestostérone)
DN :	4-estrén-17 α -éthynyl-18-homo-17 β -ol-3-one(-) (lévonorgestrel)
E1 :	3-hydroxy-1,3,5(10)-estratriène-17-one (œstrone)
E2 :	1,3,5,(10)-estratriène-3,17 β -diol (17 β - œstradiol)
E3 :	1,3,5,(10)-estratriène-3,16,17 β -triol (œstriol)
EE2 :	17 α -éthynyl-1,3,5,(10)-estratriène-3,17 β -diol (17 α -éthynylœstradiol)
GtH :	gonadotropine
3 β HSD :	3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
11HSD :	11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase
17HSD :	17-hydroxystéroïde déshydrogénase
20 α / β HSD :	20-hydroxystéroïde déshydrogénase
17,20L :	17,20-lyase
MeEE2 :	17 α -éthynyl-3-méthoxy-1,3,5,(10)-estratriène-3,17 β -diol (mestranol)
MSTFA :	N-méthyl-N(triméthylsilyl)trifluoroacétamide
NR :	19-nor-17 α -éthynyl-17 β -hydroxy-4-androstèn-3-one (noréthindrone)
11 β OH :	11 β -hydroxylase
16OH :	16 α -hydroxylase
17OH :	17 α -hydroxylase

OHPg : 17-hydroxy-4-prégnéne-3,20-dione (17 α -hydroxyprogestérone)
OHPn : 3 β ,17-dihydroxy-5-prégnén-20-one (17 α -hydroxyprégnénolone)
P450ccl : desmolase (enzyme catalysant la coupure de la chaîne latérale du cholestérol)
Pg : 4-prégnéne-3,20-dione (progestérone)
Pn : 3 β -hydroxy-5-prégnén-20-one (pregnénone)
5 α Re : 5 α -réductase
STEP : station d'épuration
T : 17 β -hydroxy-4-androstèn-3-one (testostérone)

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

Tableau 1.1. Principaux stéroïdes hormonaux présents chez les poissons.	10
Tableau 1.2. Excrétion des œstrogènes chez l'homme ($\mu\text{g}/\text{jour}$) (Turan, 1995).	36
Tableau 1.3. Comparaison du pouvoir œstrogénique de différentes xénohormones sur le médaka mâle (<i>Oryzias latipes</i>) – effet observé : ovo-testis chez au moins un individu. CMEO : Concentration Minimale entraînant un Effet Observable ; CMNEO : Concentration Minimale N'entraînant pas d'Effet Observable (Metcalfe et al., 2001).	42

CHAPITRE 2

Tableau 2.1. Stéroïdes hormonaux étudiés en tant qu'hormones endogènes.	46
Tableau 2.2. Hormones naturelles et synthétiques considérées comme contaminants potentiels des systèmes aquatiques.	47
Tableau 2.3. Détails des campagnes d'échantillonnage entreprises en 2002 sur l'estuaire de Seine. * : source : Ministère de l'écologie et du développement durable.	51
Tableau 2.4. Ions utilisés pour l'analyse par CG-SM.	55
Tableau 2.5. Quantification des stéroïdes en fonction de la quantité injectée (résultats exprimés en pourcentage de la quantité théorique (moyenne \pm écart type, $n=3$)).	58
Tableau 2.6. Ions utilisés pour la quantification par CL-SM.	59
Tableau 2.7. Limites de détection des stéroïdes (pg) en mode sélection d'ions (analyse en CG SM et en CL-SM).	61
Tableau 2.8. Rendement moyen de déconjugaison (%) déterminé pour deux formes conjuguées du 17β œstradiol (entre parenthèses : coefficient de variation de reproductibilité (%), $n=9$). E2-S : 17β œstradiol-3-sulphate; E2-G: 17β -œstradiol-17-glucuronide.	64

Tableau 2.9. Récupération moyenne des stéroïdes lors du fractionnement des formes libres et des formes conjuguées sur Oasis HLB (entre parenthèses : coefficient de variation de reproductibilité (%), n=9). Détermination réalisée sur des échantillons de tampon acétate pH 5,0 (5 mL) supplémentés en stéroïdes (50 ng). nd : non détecté. **68**

Tableau 2.10. Limites de détection calculées pour les analytes dans des extraits des différentes matrices étudiées (ng.g⁻¹ pour les matrices biologiques et le sédiment, ng.L⁻¹ pour les eaux et les effluents de STEP). Prise d'essai : 1 g de plasma, 0,1 g de bile, 0,5 g de gonades, 0,5 g de glandes digestives de moule, 1 L d'eau de surface, 1 L d'effluent de STEP ou 1 g de sédiment. nd : non déterminé. **69**

Tableau 2.11. Rendement moyen d'extraction des stéroïdes sur différents types de cartouches d'extraction solide/liquide. Echantillons fortifiés avec 50 ng de chaque analyte. (nd : non déterminé). * : 1 mL d'eau Milli-Q ; ♦ : 1 mL d'acétate d'éthyle/méthanol (80 :20, v/v) ; ♢ : 1 L d'eau Milli-Q. C18, EnviChrom-P et NH₂ : entre parenthèses, coefficient de variation de reproductibilité (%) (n=9). Env+ et Oasis HLB : moyenne±écart-type (n=3). **71**

Tableau 2.12. Rendement global « extraction+purification » dans différentes matrices biologiques fortifiées avec 50 ng de chaque analyte (moyenne ± écart-type (n= 3)). nd : non déterminé. * : résultats correspondant aux formes libres (sauf E2-S). ♦ : comprend l'étape d'extraction assistée par micro-ondes. **72**

Tableau 2.13. Rendement global « extraction+purification » (moyenne ± écart-type, n=3) sur des échantillons d'eau de surface, d'effluent de STEP et de sédiment fortifiés avec 50 ng de chaque analyte. nd : non déterminé. * : Oasis HLB+NH₂ (protocole permettant le fractionnement entre formes libres et formes conjuguées); ♦ : extraction assistée par micro-ondes suivie d'une purification sur EnviChrom-P+NH₂. **73**

Tableau 2.14. Rendement global « extraction ENV+, purification NH₂», pour un effluent de STEP fortifié avec 20 ng de chaque analyte. **74**

Tableau 2.15. Comparaison entre les concentrations en progestérone et en 17β-œstradiol obtenues sur 3 réplicats et les valeurs fournies par le BCR pour 3 matrices certifiées (plasma humain : BCR 347, 577 et 578). **74**

CHAPITRE 3

Publication n°1

Table 1. Target analytes (N : natural; S : synthetic) **79**

Table 2. Ions used for identification and quantification of the analytes **80**

Table 3. Comparison of the recovery percentages obtained for the analysis (mean value±standard deviation, n=3) of Milli-Ω water samples (1L) spiked at 50 ng.L⁻¹ for each compound and extracted on three different sorbents. **83**

Table 4. Comparison of the recovery percentages obtained for the analysis (recovery±standard deviation, n=3) of MilliΩ water samples of different volumes (2-4 L) spiked at 50 ng.L⁻¹ for each compound and extracted on Env+ and Oasis HLB sorbents. **84**

Table 5. Effect of various preservation treatments on the stability of sex steroids in the dissolved phase of WWTP effluent (results are expressed as mean percentage of the initial concentration ± standard deviation (n=3)). **85**

Table 6. Occurrence of selected sex steroids in surface water and WWTP effluent samples from the Seine river estuary. When C>limit of detection, results are presented as the mean value(standard deviation (n=3). Otherwise, < X means < limit of detection and "*" means > limit of quantification. **87**

Publication n°2

Table 1. Steroid concentrations (ng.L⁻¹) in the effluent of the Eysines STP. Results above the quantification limits are expressed as mean values ± standard deviations (n=3, except in July, n=1) and <X means < detection limit (ng.L⁻¹). nd: not determined because of matrix interference. **100**

CHAPITRE 4

Publication n°3:

Table 1. Mean recoveries of T and E2 from spiked flounder plasma samples (50 ng.g⁻¹), determined using GC/MS. Results are expressed as mean values standard deviation (n=3, except for C18, n=6). **116**

Publication n°4:

Table 1. Ions used for identification and quantification of the analytes by GC/MS. *: molecular ion. **129**

Table 2. Recovery of steroids in spiked matrices (50-150 ng.g⁻¹, depending on the compound). Results are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Plasma: C18 + NH₂; Bile: C18 + NH₂ (without the conjugate cleavage step); gonads: microwave assisted extraction followed by EnviChrom-P + NH₂. **130**

Publication n°5:

Table 1. Fractionation procedure: recoveries of analytes from Oasis HLB cartridges (5 mL-Milli-Q water spiked with 50 ng of each analyte). Results are expressed as mean values (between brackets: relative standard deviation of reproductibility, n=9). **151**

Table 2. Recoveries of analytes from spiked fish samples (plasma (1 g), bile (0.1 g) and ovary (0.5 g) spiked with 50 ng of each steroid), purified with Oasis HLB and NH₂ cartridges. Results are expressed as mean±standard deviation, n=3). nd: not determined. **151**

Table 3. Effect of EE2 on the gonadosomatic index (GSI) of male and female juvenile turbot (n≥12). C : control; SC: solvent control; 3.5 : EE2 3.5 ng.L⁻¹; 75 : EE2 75 ng.L⁻¹. **155**

CHAPITRE 5

Tableau 5.1. Variations saisonnières du profil hormonal dans le plasma de flet mâles (moyenne ± écart-type, n=3) et rapport androgènes/œstrogènes (R). (nd : non déterminé). **172**

Tableau 5.2. Variations saisonnières du profil hormonal dans les testicules de flet mâles (moyenne ± écart-type, n=3) et rapport androgènes/œstrogènes (R). **172**

Tableau 5.3. Variations saisonnières du profil hormonal dans le plasma de flet femelles (moyenne ± écart-type, n=3) et rapport androgènes/œstrogènes (R). (nd : non déterminé). **173**

Tableau 5.4. Variations saisonnières du profil hormonal dans les ovaires de flet femelles (moyenne ± écart-type, n=3) et rapport androgènes/œstrogènes (R). **173**

CHAPITRE 6

Tableau 6.1. Rendement moyen de fractionnement des formes libres et des formes conjuguées sur Oasis HLB (entre parenthèses : coefficient de variation de reproductibilité (%), n=9), déterminés sur des échantillons d'eau supplémentés en stéroïdes (50 ng). nd : non détecté. **183**

Tableau 6.2. Influence de la nature de la phase adsorbante sur le volume de fuite pour des échantillons d'eau osmosée fortifiés à 50 ng.L⁻¹ par analyte (pourcentage moyen de récupération ± écart-type, n=3). **186**

Tableau 6.3. Concentration des stéroïdes hormonaux dans différents échantillons d'eau et d'effluents de STEP prélevés à différents points kilométriques (PK) dans l'estuaire de la Seine (moyenne ± écart-type, n=3). < X : < limite de détection ; * : > limite de quantification. **187**

Tableau 6.4. Niveaux de stéroïdes hormonaux dans l'effluent de la STEP d'Eysines (ng.L⁻¹; moyenne ± écart-type). nd : non déterminé (interférence matricielle) ; <X : < limite de détection. **189**

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

Figure 1.1. Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique chez les poissons.	8
Figure 1.2. Biosynthèse des stéroïdes hormonaux chez les poissons.	9
Figure 1.3. Exemples de stéroïdes conjugués.	11
Figure 1.4. Mécanisme moléculaire de l'action de l'action d'un œstrogène sur un récepteur	12
Figure 1.5. Phénomènes d'intersexualité dans un testicule de gardon (<i>Rutilus rutilus</i>)	21
Figure 1.6. Structures de pesticides considérés comme perturbateurs endocriniens.	25
Figure 1.7. Structure générique des polychlorobiphényles.	27
Figure 1.8. Structures de trois HAP possédant une activité antioestrogénique.	29
Figure 1.9. Structure des PCDD et des PCDF.	29
Figure 1.10. Structure de deux phtalates courants.	30
Figure 1.11. Formule semi-développée du bisphénol A.	31
Figure 1.12. Structure des alkylphénols polyéthoxylates, des alkylphénols et des alkylphénols carboxylates.	32
Figure 1.13. Structures de quelques phytoœstrogènes.	34
Figure 1.14. Structure du β sitostérol.	35
Figure 1.15. Structures des principaux stéroïdes de synthèse employés dans les traitements œstroprogestatifs.	39
Figure 1.16. Métabolisme de la noréthindrone (d'après Larrea et al., 1977). Voie 1 : formation de 5 α -dihydronoréthindrone ; voie 2 : formation de 3 β -5 α -tétrahydronoréthindrone.	39

CHAPITRE 2

Figure 2.1. Localisation du site de prélèvement des flets dans l'estuaire de Seine.	48
Figure 2.2. Localisation du site de prélèvement des flets dans le Finistère : estuaire du Ster à Lesconil (source : www.viamichelin.com).	48

Figure 2.3. Site de prélèvement de <i>Mytilus sp.</i> (Source : Ifremer Arcachon).	49
Figure 2.4. Points d'échantillonnage d'eau sur l'estuaire de Seine.	51
Figure 2.5. Jalle d'Eysines : sites de prélèvement (1 : site référence ; 2 : rejet ; 3 à 7 : points en aval du rejet).	52
Figure 2.6. Stéroïdes deutérés utilisés comme étalons internes pour la quantification des stéroïdes natifs.	53
Figure 2.7. Réaction de silylation d'une fonction hydroxyle par le MSTFA	54
Figure 2.8. Chromatogramme obtenu par CG-SM pour un mélange étalon de stéroïdes naturels silylés (3-10 µg.g ⁻¹ suivant l'analyte ; mode sélection d'ions). 1 : DHEA; 2 : DHA; 3 : DHT; 4 : E1; 5 : A; 6 : E2, E2-d4, T et T-d3; 7 : 11-cT; 8 : Pn; 9: E3; 10: Pg; 11: OHPg; 12: DHP; 13: OHPn.	56
Figure 2.9. Exemple de chromatogramme obtenu par CG-SM pour un mélange étalon de stéroïdes naturels et synthétiques silylés (3-10 µg.g ⁻¹ suivant l'analyte ; mode sélection d'ions). 1 : E1; 2 : T-d3, E2 et E2-d4; 3 : MeEE2; 4 : No; 5 : EE2 et EE2-d4; 6 : DN; 7: E3; 8: Pg.	56
Figure 2.10. Droites de réponse du 17β-œstradiol (E2) et de la testostérone (T) (analyse CG-SM en mode sélection d'ions).	57
Figure 2.11. Chromatogramme d'un mélange d'androgènes et de progestagènes naturels obtenu par CL-SM en mode sélection d'ions (environ 10 µg.g ⁻¹). 1 : 11-cT; 2 : A; 3 : T; 4 : OHPg, OHPn et DHP; 5 : Pg; 6 : Pn.	59
Figure 2.12. Chromatogramme d'un mélange d'œstrogènes obtenu par CL SM en mode sélection d'ions (environ 10 µg.g ⁻¹ pour chaque analyte). 1 : E3 ; 2 : E2 ; 3 : E1 ; 4 : EE2.	60
Figure 2.13. Chromatogramme d'un mélange de progestagènes synthétiques obtenu par CL SM en mode sélection d'ions (environ 10 µg.g ⁻¹ pour chaque analyte). 1 : DN; 2 : No.	60
Figure 2.14. Extinction de signal observée lors de l'analyse par CL-SM d'un extrait d'effluent de STEP (1L d'effluent de la STEP d'Eysines extrait sur Oasis HLB et purifié sur NH ₂).	61
Figure 2.15. Représentation schématique de la procédure de traitement des échantillons.	62

Figure 2.16. Fractionnement sur Oasis HLB des formes libres et des formes conjuguées présentes au sein d'un même échantillon (F1 : fraction conjuguée ; F2 : fraction libre). **66**

CHAPITRE 3

Publication n°1 :

Figure 1. GC/MS chromatogram resulting from the analysis of estrone (ion $m/z = 414$) in treated sewage (Tancarville, September 2002). **88**

Publication n°2 :

Figure 1. Sampling stations along the Jalle d'Eysines River **95**

Figure 2. Schematic analytical procedure for the analysis of unconjugated and conjugated steroids (river water and STP effluent). **96**

Figure 3. Dissolved boron concentrations ($\mu\text{g.L}^{-1}$) measured in the Jalle d'Eysines River. Results are expressed as mean value and the error bars correspond to the standard deviation ($n=5$). **102**

Figure 4. Mean concentration of estrone along the Jalle d'Eysines River (July 2003, September 2003 and February 2004). The error bars represent the standard deviation of the mean ($n=3$). **104**

Figure 5. Mean concentration of 17β -estradiol (E2) and estriol (E3) along the Jalle d'Eysines River (September 2003). The error bars represent the standard deviation of the mean ($n=3$). **106**

CHAPITRE 4

Publication n°3 :

Figure 1. Schematic analytical strategy for the comparative analysis of T and E2 in fish plasma using RIA, GC/MS and solid phase extraction. **115**

Figure 2. Comparative determination of testosterone in fish plasma samples by GC/MS or RIA. Results are expressed as mean values (GC/MS, $n=3$; RIA, $n=2$) and error bars correspond to the 95% interval of confidence (GC/MS only) F_i : flounder number i ; RT: rainbow trout. *: $\text{C}_{18}+\text{NH}_2$ plasma extract analysed by GC/MS. **118**

Figure 3. RIA calibration curves obtained with estradiol standard solutions prepared in methanol (solid line, crosses) and in DCM (dash line, circles). **118**

Figure 4. Comparative determination of estradiol in fish plasma samples by GC/MS or RIA. Results are expressed as mean values (GC/MS, n=3; RIA, n=2) and error bars correspond to the 95% interval of confidence (GC/MS only). Fi : flounder number i; RT: rainbow trout. *: concentration multiplied by a factor 5 for the sake of clarity. **120**

Publication n°4 :

Figure 1. Levels of androgens and estrogens in plasma (*top*), testes (*centre*) and bile (*bottom*) of male turbot. Results are expressed as mean value and the error bars represent the 95% confidence interval of the mean (n=3; when no bars are plotted, only one single analysis was carried out). C1 : control 1; NP : p-nonylphenol; NSO: North Sea Oil; NSO+AP: North Sea Oil + alkylphenols; C2: control 2; BA: bisphenol A; DAP: diallylphthalate; BDE 47: tetrabromodiphenyl ether 47. **132**

Figure 2. Levels of androgens and estrogens in plasma (*top*) and ovaries (*bottom*) of female turbot. Results are expressed as mean value and the error bars represent the 95% confidence interval of the mean (n=3). nd: not detected. *: not determined (no available sample). C1 : control 1; NP : p-nonylphenol; NSO: North Sea Oil; NSO+AP: North Sea Oil + alkylphenols; C2: control 2; BA: bisphenol A; DAP: diallylphthalate; BDE 47: tetrabromodiphenyl ether 47. **133**

Figure 3. Androgen/estrogen ratio (R) in plasma (*top*), gonads (*centre*) and bile (*bottom*) of juvenile turbot. Results are expressed as mean value and the error bars represent the 95% confidence interval of the mean (when no bars are plotted, only one single analysis was carried out). C1 : control 1; NP : p-nonylphenol; NSO: North Sea Oil; NSO+AP: North Sea Oil + alkylphenols; C2: control 2; BA: bisphenol A; DAP: diallylphthalate; BDE 47: tetrabromodiphenyl ether 47. **135**

Publication n°5 :

Figure 1. Schematic analytical procedure for the analysis of unconjugated and conjugated steroids from fish samples. **149**

Figure 2. Concentration of 17 α -ethynylestradiol in plasma (A) and bile (B) of juvenile turbot. Results are expressed as mean values and the error bars correspond to the 95 % intervals of confidence (n=3). **154**

Figure 3. Effect of EE2 on androgen profiles in plasma (*top*), testes (*middle*) and bile (*bottom*) of male turbot. Results are expressed as mean values and the error bars correspond to the 95 % intervals of confidence of the mean (n=3). C : control ; SC: solvent control; 3.5 : EE2 3.5 ng.L⁻¹; 75 : EE2 75 ng.L⁻¹. T : testosterone; A : androstenedione; 11-kT: 11-ketotestosterone. **156**

Figure 4. Effect of EE2 on estrogen profiles in plasma (*top*), testes (*middle*) and bile (*bottom*) of male turbot. Results are expressed as means (ng.g-1) and the error bars correspond to the 95 % intervals of confidence of the means (n=3). C : control; SC: solvent control; 3.5 : EE2 3.5 ng.L⁻¹; 75 : EE2 75 ng.L⁻¹. E1: estrone; E2: estradiol; E3: estriol. **157**

Figure 5. Effect of EE2 on androgen profiles in plasma (*top*) and bile (*bottom*) of female turbot. Results are expressed as mean values and the error bars correspond to the 95 % intervals of confidence of the mean (n=3). C : control ; SC: solvent control; 3.5 : EE2 3.5 ng.L⁻¹; 75 : EE2 75 ng.L⁻¹. T : testosterone; A : androstenedione; 11-kT: 11-ketotestosterone. **158**

Figure 6. Effect of EE2 on estrogen profiles in plasma (*top*), testes (*middle*) and bile (*bottom*) of female turbot. Results are expressed as means (ng.g-1) and the error bars correspond to the 95 % intervals of confidence of the means (n=3). C : control; SC: solvent control; 3.5 : EE2 3.5 ng.L⁻¹; 75 : EE2 75 ng.L⁻¹. E1: estrone; E2: estradiol; E3: estriol. **159**

Figure 7. Effect of EE2 on the androgens to estrogens ratio (R) in plasma (*top*), gonads (*middle*) and bile (*bottom*) of juvenile turbot. Results are expressed as means and the error bars correspond to the 95 % intervals of confidence of the means (n=3). C : control; SC : solvent control; 3.5 : EE2 3.5 ng.L⁻¹; 75 : EE2 75 ng.L⁻¹. For plasma and gonads, R corresponds to the free fraction, whereas for bile it corresponds to the conjugated fraction. **162**

CHAPITRE 5

Figure 5.1. Variations saisonnières des taux moyens de progestérone (Pg) et de pregnénolone (Pn) dans la glande digestive d'individus de *Mytilus sp.* provenant de jetée de la Chapelle à Arcachon (en haut, individus mâles ; en bas, individus femelles). Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type sur la moyenne (n=3). **176**

Figure 5.2. Variations du « taux de lipide » chez *Mytilus sp.* (prélèvement à la Jetée de la Chapelle, Arcachon ; 1 mesure sur un pool de 5 individus entiers). * : pic de progestérone. **177**

Figure 5.3. Indices de conditions moyens des individus *Mytilus sp.* prélevés à la jetée de la Chapelle (les barres d'erreur représentent l'écart-type, n = 15). **178**

CHAPITRE 6

Figure 6.1. Représentation schématique de la procédure de traitement des échantillons

181

Figure 6.2. Validation de l'analyse quantitative du 17 β -œstradiol (E2) et de la progestérone (Pg) au moyen d'échantillons de sérum humain certifiés (BCR 577 et 578 : E2 ; BCR 347 : Pg). Résultats expérimentaux : moyenne \pm écart-type (n=3).

182

Figure 6.3. RIA : droites d'étalonnage externes obtenues avec des solutions étalons de 17 β -œstradiol préparées dans le dichlorométhane (DCM) et dans le méthanol (MeOH). B/Bo : pourcentage d'occupation des sites de la phase greffée (anticorps).

185

Figure 6.4. Variations saisonnières du gradient de concentration en œstrone en aval du rejet de la STEP d'Eysines. Comparaison de la concentration mesurée (moyenne \pm écart-type, n=3) et de la concentration corrigée par rapport à la dilution.

190

Figure 6.5. Impact de différents contaminants sur le rapport androgènes/œstrogènes (R) dans le plasma et les gonades de turbots juvéniles. NP : 4-nonylphénol ; BisA : bisphénol A ; EE2 3,5 : éthynylœstradiol 3,5 ng.L⁻¹ ; EE2 75 : éthynylœstradiol 75 ng.L⁻¹. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

192

Figure 6.6. Synthèse de la 11-cétotestostérone (11-cT) à partir de l'androsténone (A) (d'après Lokman et al., 2002). Abréviations : A : androsténone ; T : testostérone ; 11 β -OHA : 11 β -hydroxyandrosténone ; 11 β -OHT : 11 β hydroxytestostérone ; 11-cA : 11 cétoandrosténone ; 11-cT : 11 cétotestostérone.

194

Figure 6.7. Effet du 17 α -éthynylœstradiol sur les niveaux moyens d'androgènes plasmatiques (libres et conjugués) chez le turbot mâle juvénile. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95% (n=3). Androsténone et 11-cétotestostérone détectées seulement dans la fraction libre.

195

Figure 6.8. Chromatogramme d'un extrait de gonades de flet (individus femelles prélevés en juin 2003 sur le site de Lesconil). Agrandissement : présence d'œstrone (E1) et de 17 β -œstradiol (E2).

196

Figure 6.9. Variations saisonnières des taux moyens de progestérone (Pg) et de prégnénone (Pn) dans la glande digestive de moules *Mytilus* sp, provenant de la jetée de la Chapelle, Arcachon (moyenne \pm écart-type).

198

INTRODUCTION

Industrialisation et utilisation d'un nombre croissant de produits chimiques ou pharmaceutiques dans la vie quotidienne sont responsables de la dissémination dans l'environnement de substances variées. Les effets à court terme de ces composés – dits xénobiotiques, substances étrangères à un organisme donné – sont généralement assez bien connus, grâce à la réalisation d'études toxicologiques. Les effets à long terme sont, en revanche, relativement méconnus et n'ont été que progressivement mis en évidence par des études épidémiologiques (cancer professionnels...) ou des accidents (tératogénèse...) (Pillière, 2002).

Les effets de certains composés sur l'appareil sexuel humain ont été observés depuis assez longtemps : baisse de la production spermatique et cancer du testicule chez l'homme, élévation de la fréquence du cancer du sein chez la femme et augmentation de l'endométriose (Pillière, 2002). Ce sont cependant des résultats concernant des anomalies de la reproduction dans des populations de mollusques et de poissons qui ont soulevé le problème des effets à long terme susceptibles de perturber les systèmes de régulation hormonale (ou système endocrinien). Ces systèmes régulent les divers équilibres nécessaires au bon fonctionnement des équilibres biologiques nécessaires à la vie. Ils sont constitués d'organes communiquant entre eux par le biais de messagers chimiques, les hormones. Certains xénobiotiques possèdent la faculté d'altérer la synthèse, le stockage, le transport (dans l'organisme), le métabolisme, l'action ou l'élimination des hormones naturelles : il s'agit des perturbateurs endocriniens, ou xénohormones.

Les milieux aquatiques sont souvent le réceptacle ultime de nombreuses substances d'origine anthropique et sont ainsi particulièrement exposés aux contaminants en général, et aux xénohormones en particulier. Il n'est donc pas étonnant de constater que les exemples de perturbation hormonale les mieux documentés concernent principalement les écosystèmes aquatiques. Deux exemples emblématiques des phénomènes de perturbation endocrinienne en milieu aquatique sont la découverte de gardons présentant d'importantes malformations des testicules dans certaines rivières britanniques impactées par des rejets de station d'épuration, (Jobling et al., 1998) et celle de gastéropodes marins masculinisés après exposition chronique à un biocide, le tributylétain (revue par Sumpter, 2001). Bien que des phénomènes de masculinisation aient été décrits, les effets majoritairement observés sont de type « œstrogénique » et affectent le plus souvent les individus mâles; ils correspondent

à une féminisation plus ou moins avancée des organismes affectés, et sont attribués à l'exposition à des composés qualifiés de xénoœstrogènes. Malformations testiculaires, perturbations de la gamétogenèse, synthèse par des individus mâles de protéines spécifiques des individus femelles et altération de la biosynthèse et du métabolisme des hormones endogènes constituent les principaux troubles décrits.

Les stéroïdes hormonaux – testostérone, 17β -œstradiol, progestérone...– jouent un rôle crucial dans les phénomènes de perturbation endocrinienne. Ces composés sont, en effet, présents naturellement chez de nombreux organismes aquatiques; ils sont alors considérés comme des hormones endogènes et ont une fonction centrale dans le cycle sexuel de ces organismes. L'étude des modifications de leur synthèse et de leur métabolisme suite à une exposition à certains xénobiotiques peut ainsi apporter des éléments de réponse pour la compréhension des mécanismes sous-jacents aux phénomènes de perturbation endocrinienne.

Les hormones stéroïdiennes peuvent cependant être également considérées comme des contaminants des écosystèmes aquatiques. Ces composés, issus du métabolisme hormonal humain et excrétés via l'urine et les excréments, sont introduits dans les milieux aquatiques essentiellement via les stations d'épuration. A ces substances naturelles, se rajoutent des hormones stéroïdiennes synthétiques utilisées en santé humaine (contraception, traitement de la ménopause...) qui sont également excrétés via l'urine et les excréments et peuvent ainsi être introduites dans les systèmes aquatiques. Ces composés sont alors des perturbateurs endocriniens en puissance et plusieurs études ont montré que le caractère œstrogénique de certains milieux aquatiques était largement imputable à la présence d'œstrogènes naturels et synthétiques (Desbrow et al., 1998 ; Körner et al., 2001 ; Aerni et al., 2004).

Dans ce contexte, le but de ces travaux était de développer des procédures permettant l'analyse des stéroïdes hormonaux – naturels et synthétiques – dans diverses matrices (eau, sédiment, échantillons biologiques...) pour les appliquer ensuite à différentes problématiques environnementales.

La présentation des travaux s'articule selon la structure détaillée ci-après. Le **chapitre 1** présente une synthèse des connaissances actuelles sur la problématique des perturbations endocriniennes et des perturbateurs endocriniens. Les sites d'études, les animaux utilisés ainsi que les méthodes analytiques développées pour l'analyse des stéroïdes hormonaux sont présentées et détaillées dans le **chapitre 2** (matériels et méthodes). Les chapitres suivants (3 et 4) comprennent les articles – soumis – portant sur les résultats obtenus dans le cadre de ces travaux de thèse. Le **chapitre 3**, traitant de la présence des hormones

stéroïdiennes dans certains estuaires et cours d'eau français, est constitué de deux publications. La première (n°1) présente les premiers développements analytiques réalisés pour l'étude des stéroïdes hormonaux en milieu estuarien, ainsi que l'application de ces procédures à l'évaluation de la présence de ces substances dans l'estuaire de Seine. La seconde publication (n°2) concerne la biogéochimie des œstrogènes dans la Jalle d'Eysines, affluent de la Garonne contaminé par des effluents de station d'épuration. Le **chapitre 4** concerne l'étude des stéroïdes en tant qu'hormones endogènes chez les poissons. L'article n°3 propose une étude comparative des performances de la CG/SM et d'une méthode radioimmunologique pour le dosage de la testostérone et du 17- β œstradiol dans le plasma de poisson. Les publications n°4 et 5 traitent de l'impact de différents contaminants sur la stéroïdogenèse chez le turbot juvénile (*Psetta maxima*), contaminants de type industriel dans le cas de l'article n°2 et 17 α -éthynylœstradiol (œstrogène synthétique employé dans les traitements contraceptifs) dans le cas de l'article n°3. Le **chapitre 5** présente les suivis des profils hormonaux au cours d'un cycle sexuel annuel chez la moule *Mytilus sp.* et le flet *Platichthys flesus*, deux organismes sentinelles couramment employés en écotoxicologie. Dans le cas du flet, des individus ont été prélevés dans un estuaire contaminé (Seine) et dans un estuaire « propre » (Ster), afin d'évaluer l'impact potentiel de la pollution sur le profil hormonal de ce poisson. Le **chapitre 6**, quant à lui, est une synthèse des principaux résultats obtenus dans le cadre de ces travaux.

CHAPITRE 1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce chapitre présente les connaissances actuelles concernant la problématique des perturbations endocriniennes et plus particulièrement le rôle des stéroïdes hormonaux dans ces processus. Après une présentation générale du système endocrinien des poissons et des mollusques bivalves, le mode d'action des perturbateurs endocriniens et la nature des composés incriminés sont détaillés.

1. LA PROBLEMATIQUE DES PERTURBATIONS ENDOCRINIENNES

Chez les organismes vivants multicellulaires, le système endocrinien régule diverses fonctions, tels le contrôle du développement, de la croissance et de la reproduction, ou l'homéostasie (régulation, entre autres paramètres, des niveaux de calcium ou de glucose dans le sang). Ce système est constitué d'un ensemble de glandes sécrétant des messagers chimiques, les hormones, actifs à très faible concentration (de l'ordre du ng.mL^{-1}). Ces dernières sont transportées via le flux sanguin, libres ou associées à des protéines de transport, vers les différents organes cibles. Elles sont ensuite capables de se lier à des récepteurs, intra ou extracellulaires, la spécificité de cette liaison étant basée sur une affinité stérique et chimique entre hormone et récepteur. Les récepteurs ainsi activés transmettent ensuite un signal dont la résultante peut être, par exemple, l'activation de la transcription d'un gène menant à la synthèse d'une protéine. Les différents types d'hormones synthétisées par les organismes vivants peuvent être classés en quatre grandes familles:

- les dérivés d'acides aminés, telle l'adrénaline.
- les dérivés d'acides gras, type prostaglandine.
- les stéroïdes, dérivés du cholestérol.
- les hormones de type protéique, constituées d'un enchaînement de plusieurs dizaines ou centaines d'acides aminés, telles les gonadotropines.

Différents systèmes de contrôle et de rétrocontrôle permettent à un organisme de réagir de manière souple et rapide à d'éventuelles modifications de son équilibre hormonal, suite à des pressions internes ou externes. Plusieurs axes de contrôle structurent ainsi le système endocrinien des vertébrés : l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien, l'axe hypothalamo-hypophyso-adénophysaire et l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique, ce dernier étant fortement impliqué dans les phénomènes de reproduction.

Depuis une vingtaine d'années, de nombreux travaux de recherche ont démontré la capacité de certains composés chimiques présents dans l'environnement, d'origine anthropique ou naturels, à altérer le fonctionnement du système endocrinien chez l'homme ainsi que chez les animaux, notamment aquatiques (Metzler, 2002; Mendes, 2002). De tels composés sont qualifiés de perturbateurs endocriniens et ont fait l'objet d'une définition précise de la part de la Commission Européenne lors de la Weybridge Conference (1996) :

« Un perturbateur endocrinien est une substance exogène qui altère la santé d'un organisme intact ou de sa progéniture, suite à des changements de la fonction endocrine ».

Cette définition implique que les perturbateurs endocriniens sont susceptibles d'agir à différents niveaux : biosynthèse et métabolisme des hormones, production des récepteurs, interaction hormone-récepteur, etc. En outre, Crisp et al. (1998) ont postulé que les

perturbations endocriniennes ne constituaient pas nécessairement en elles-mêmes un effet néfaste pour un organisme, mais qu'elles constituaient plutôt un mécanisme d'action susceptible d'avoir des conséquences néfastes, tels des troubles de la reproduction et du développement ou le développement de cancers.

Signe de l'importance accordée par les autorités publiques aux phénomènes de perturbation endocrinienne, divers programmes de recherche nationaux ou internationaux ont permis l'étude à grande échelle de la présence de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques et de leurs effets sur différents organismes. On peut ainsi citer, au niveau européen, les programmes COMPREHEND (Community programme of research on endocrine disrupters and environmental hormones, <http://europa.eu.int/comm/research/endocrine/pdf/env4-ct98-0798.pdf>), EDMAR (Endocrine disruption in the Marine Environment, Mathiessen et al., 2002) et LOES (traduction française de l'acronyme : Présence et effets des composés œstrogéniques dans les milieux aquatiques ; rapport final : Vethaak et al., 2002). Ces trois programmes ont permis de mettre en évidence la présence de composés œstrogéniques dans différents milieux aquatiques (eaux douces pour COMPREHEND, estuaires britanniques pour EDMAR, eaux douces et milieu côtier néerlandais pour LOES) ainsi que des effets œstrogéniques chez plusieurs espèces de poissons, tel le flet (*Platichthys flesus*) (pour une illustration de ce type d'effets, cf. § 4.1). En outre, l'Union Européenne a adopté en 2000 la directive 2000/60/CE, dite directive-cadre eau, établissant un cadre d'action communautaire dans le domaine de la politique de l'eau. Cette directive établit une liste de 32 substances prioritaires, 11 d'entre elles étant considérées comme perturbateurs endocriniens.

2. ENDOCRINOLOGIE DE LA REPRODUCTION CHEZ LES POISSONS ET LES MOLLUSQUES

Poissons et mollusques ont été les principaux organismes étudiés dans le cadre de ces travaux de thèse. Ce paragraphe vise à présenter succinctement les systèmes endocriniens de ces différents organismes, en détaillant plus particulièrement leur implication dans la fonction de reproduction.

2.1. Poissons

2.1.1. Axe hypothalamo-hypophysio-gonadiques

Chez les poissons, la plupart des fonctions de reproduction, de la gamétogenèse au comportement sexuel, sont régulées par l'axe hypothalamo-hypophysio-gonadique dont une

représentation schématique est donnée figure 1.1. Les stimuli sensoriels (photopériode, température, facteurs alimentaires ou sociaux) reçus au niveau cérébral modulent la production de neurohormones et de neurotransmetteurs par l'hypothalamus, glande située à la base du cerveau et à proximité de l'hypophyse (Redding et Patino, 1993). Produites par l'hypothalamus, gonadolibérines et dopamine contrôlent ainsi la sécrétion de gonadotropines (GtH, types I et II) par l'hypophyse. Ces dernières stimulent ensuite la gamétogenèse et la stéroïdogénèse par les organes sexuels (testicules ou ovaires suivant le sexe). En retour, les hormones stéroïdiennes exercent un contrôle rétroactif sur le cerveau, l'hypothalamus, l'hypophyse et les gonades elles-mêmes (Redding et Patino, 1993).

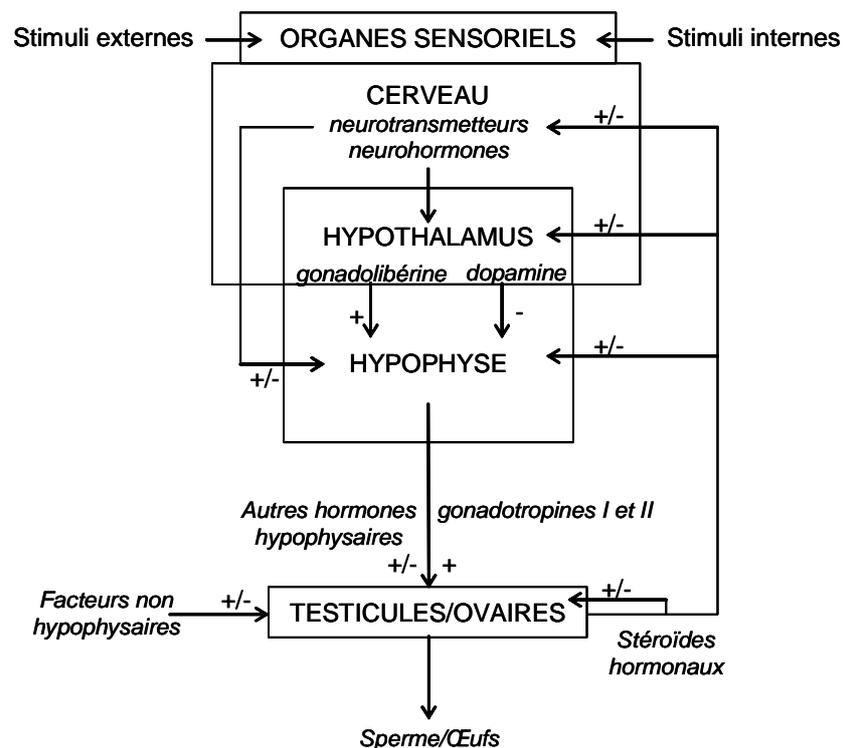


Figure 1.1. Représentation schématique de l'axe hypothalamo-hypophysaire-gonadique chez les poissons (d'après Redding et Patino, 1993).

2.1.2 Biosynthèse des stéroïdes hormonaux

Une série complexe d'enzymes est responsable de la biosynthèse des stéroïdes hormonaux chez les poissons. Au niveau des gonades, des gènes spécifiques impliqués dans la stéroïdogénèse sont exprimés dans les cellules somatiques – cellules supportant et régulant le développement des cellules germinales – ce qui entraîne la production de ces hormones à partir du cholestérol (Lintelmann et al., 2003). Les gonades sont ainsi le principal organe de synthèse des hormones stéroïdiennes (cellules de Leydig dans les testicules, granulosa et thèque interne des follicules dans les ovaires), bien qu'une fraction

non négligeable de la stéroïdogénèse se déroule dans d'autres tissus (foie, reins, cerveau...).

La cascade enzymatique menant à la production de ces composés est illustrée par la figure 1.2. La plupart des réactions portées sur ce diagramme sont irréversibles ; les réactions réversibles dépendent de la disponibilité des cofacteurs (ex : rapport NADP/NADPH) (Steimer, 2002).

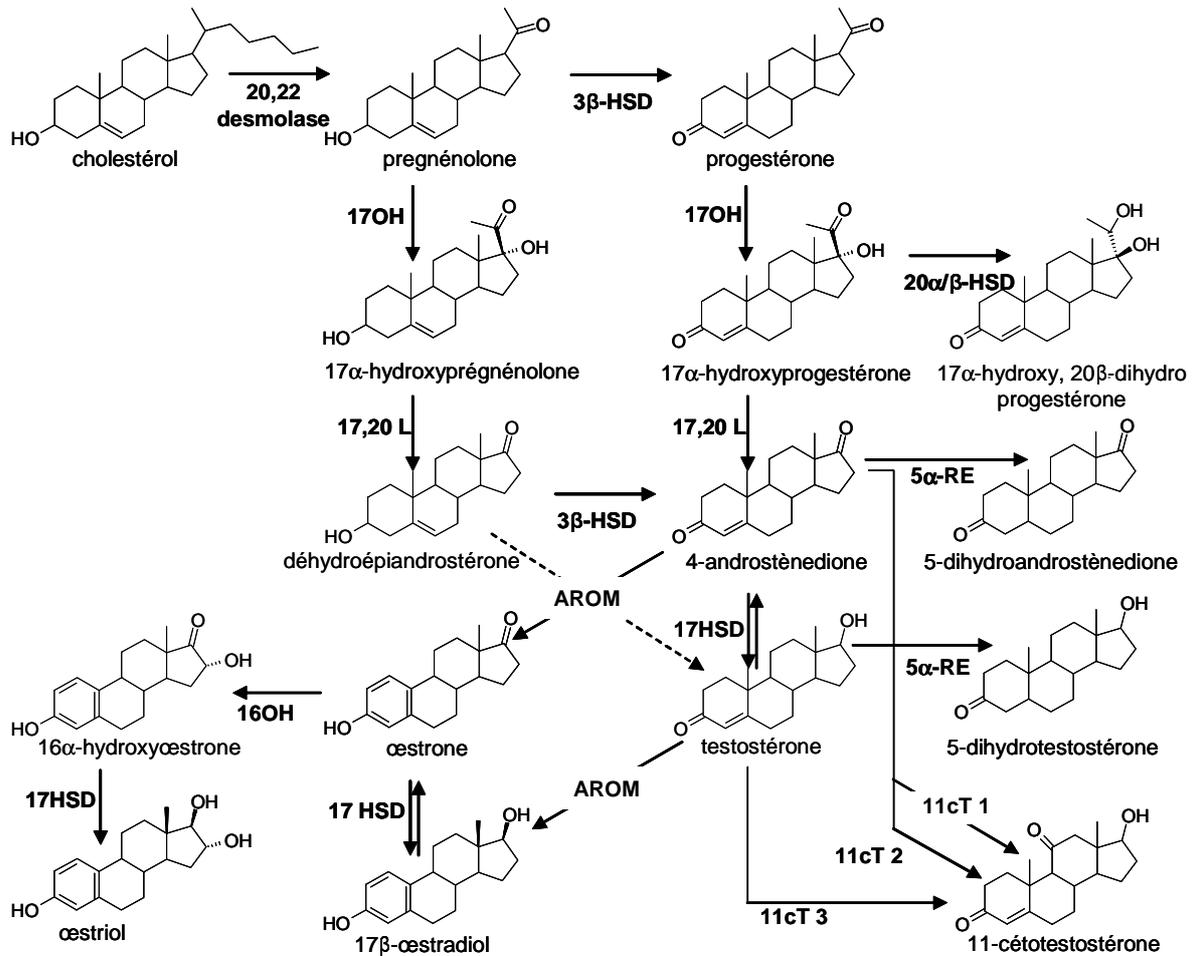


Figure 1.2. Biosynthèse des stéroïdes hormonaux chez les poissons.

Abréviations : 20,22 desmolase : enzyme catalysant la coupure de la chaîne latérale du cholestérol ; 3βHSD: 3β-hydroxystéroïde déshydrogénase; 17OH: 17α-hydroxylase; 17,20L: 17,20-lyase; 20α/βHSD : 20-hydroxystéroïde déshydrogénase ; 5αRe : 5α-réductase ; AROM: aromatisation ; 17HSD: 17-hydroxystéroïde déshydrogénase; 11βOH: 11β-hydroxylase; 11HSD: 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase ; 16OH: 16α-hydroxylase. 11cT1 : 11β-hydroxylase, 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase et 17-hydroxystéroïde déshydrogénase (dans cet ordre); 11cT2 : 11β-hydroxylase, 17-hydroxystéroïde déshydrogénase et 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase (dans cet ordre); 11cT3 : 11β-hydroxylase et 11β-hydroxystéroïde déshydrogénase (dans cet ordre).

Les stéroïdes sexuels peuvent être répartis en trois classes, en fonction de leur nombre d'atomes de carbone : progestagènes (C21), androgènes (C19) et œstrogènes (C18) (tableau 1.1).

Nom usuel	Nom systématique	N° CAS	abréviation
Œstrogènes (C18)			
17β-œstradiol	1,3,5,(10)-estratriène-3,17β-diol	50-28-2	E2
œstrone	3-hydroxy-1,3,5(10)-estratriène-17-one	53-16-7	E1
œstriol	1,3,5,(10)-estratriène-3,16,17β-triol	50-27-1	E3
Androgènes (C19)			
androstènedione	4-androstène-3,17-dione	63-05-8	A
testostérone	17β-hydroxy-4-androstène-3-one	58-22-0	T
5-dihydrotestostérone	17β-hydroxy-5α-androstane-3-one	521-18-6	DHT
5-dihydroandrostènedione	androstane-3,17-dione	846-46-8	DHA
déhydroépiandrostérone	3β-hydroxy-5-androstène-17-one	53-43-0	DHEA
11-cétotestostérone	17β-hydroxy-4-androstène-11,17-dione	564-35-2	11-cT
Progestagènes (C21)			
progestérone	4-prégnène-3,20-dione	57-83-0	Pg
pregnénolone	3β-hydroxy-5- prégnène-20-one	145-13-1	Pn
17α-hydroxypregnénolone	3β,17-dihydroxy-5-prégnène-20-one	387-79-1	OHPn
17α-hydroxyprogestérone	17-hydroxy-4-prégnène-3,20-dione	200-699-4	OHPg
17α-hydroxy, 20β-dihydroprogestérone	17,20β-dihydroxy-4-prégnène-3-one	1662-06-2	DHP

Tableau 1.1. Principaux stéroïdes hormonaux présents chez les poissons.

L'étape initiale de la stéroïdogénèse est la formation de la prégnénolone, résultant de la coupure de la chaîne latérale du cholestérol ; catalysée par l'enzyme 20,22 desmolase, cette réaction est placée sous contrôle hypophysaire (Steimer, 2002).

La formation de testostérone à partir de la prégnénolone peut se dérouler selon deux voies de synthèse. La première (Δ^4) passe par la progestérone, la 17α-hydroxyprogestérone et l'androstènedione, tandis que la seconde (Δ^5) passe par d'autres intermédiaires : la 17α-hydroxypregnénolone, la déhydroépiandrostérone, et le (Δ^5) androstènediol (non représenté sur la figure 1.2). La testostérone peut être réduite en dihydrotestostérone, androgène puissant, par les microsomes des tissus cibles (Devlin et Nagahama, 2002) via l'action de la

5 α -réductase. Chez les poissons, cependant, la 11-cétotestostérone est souvent l'androgène majoritaire, du moins chez les individus mâles (Borg, 1994).

La formation des œstrogènes à partir des androgènes (17 β -œstradiol à partir de testostérone et œstrone à partir d'androstènedione) est catalysée par le complexe enzymatique 19-hydroxylase-aromatase, souvent appelé aromatase. Le 17 β -œstradiol est le principal œstrogène chez les poissons ; il est considéré comme étant le principal responsable de l'induction et du maintien du développement ovarien (Devlin et Nagahama, 2002).

Androgènes et œstrogènes sécrétés par les gonades sont ensuite véhiculés par le flux sanguin. Ils sont alors majoritairement associés à une protéine de transport spécifique (notée SHBG en anglais : Steroid Hormone Binding Globulin), alors qu'une faible fraction est associée à l'albumine. Moins de 2 % des stéroïdes plasmatiques circulent libres, sous leur forme effectrice (Lintelmann et al., 2003). On pourra noter que la progestérone circule associée à une protéine différente, la globuline transcortine.

Le métabolisme des stéroïdes se déroule essentiellement dans le foie. Dans les tissus hépatiques, les stéroïdes, plutôt lipophiles (K_{ow} 2,5-3,5), sont conjugués avec une molécule d'acide glucuronique ou d'acide sulfurique (figure 1,3). Ceci permet d'augmenter leur polarité et donc leur hydrosolubilité en vue de leur excrétion via l'urine. Une faible fraction des stéroïdes conjugués peut entrer dans la circulation entérohépatique (via la bile), subir une déconjugaison dans le système intestinal et repasser ensuite dans le flux sanguin.

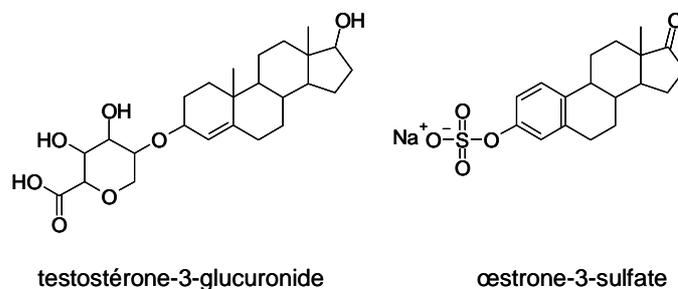


Figure 1.3. Exemples de formes conjuguées de la testostérone.

2.1.3. Modes d'action

Le premier mode d'action des stéroïdes hormonaux est le mode « non génomique » (Steimer, 2002). Ce mode d'action correspond aux effets à court terme (de l'ordre de la seconde à quelques minutes) comme la modulation de l'activité électrique des cellules nerveuses ou l'interaction avec le récepteur à l'acide γ -aminobutyrique (GTABAA). Certains

de ces effets non génomiques font intervenir des récepteurs situés sur la membrane cellulaire (Luconi et al., 2002).

Le second mode d'action des stéroïdes hormonaux est le mode « génomique » (Steimer, 2002). Ces hormones ont, en effet, la capacité de moduler, au sein des tissus cibles, la transcription de gènes spécifiques entraînant, par exemple, la synthèse de protéines ou bien l'inhibition de cette synthèse. La figure 1.4 (Mueller, 2004) apporte une illustration de ce processus dans le cadre de l'interaction entre un œstrogène et un récepteur aux œstrogènes, mais ce schéma type peut être généralisé aux autres classes de stéroïdes hormonaux. Plusieurs types de récepteurs sont ainsi rencontrés chez les poissons, tels les récepteurs aux androgènes AR1 et AR2 (Sperry et Thomas, 2000), les récepteurs aux œstrogènes ER α et ER β (Devlin et Nagahama, 2002) et un récepteur aux progestagènes (Baker et al., 2004).

Après dissociation du complexe stéroïde-protéine de transport, les stéroïdes peuvent facilement diffuser à travers les membranes cellulaires, grâce à leur caractère lipophile. Des récepteurs spécifiques aux stéroïdes sont situés au sein du noyau cellulaire ; inactifs, ces récepteurs sont associés à différents types de protéines (Hsp90 sur la figure 1.4). Les stéroïdes sont capables de dissocier ce type de complexe afin de former un nouveau complexe avec le récepteur, modifiant ainsi la conformation du récepteur et provoquant son activation ou son blocage. Dans le cas d'une activation, on assiste à la dimérisation du récepteur, suivie de la fixation du complexe hormone-récepteur sur l'élément de réponse aux œstrogènes du promoteur du gène cible. La transcription de ce gène mène ensuite à la production d'ARN messager et à la synthèse d'une protéine constituant la réponse finale de ce mécanisme moléculaire.

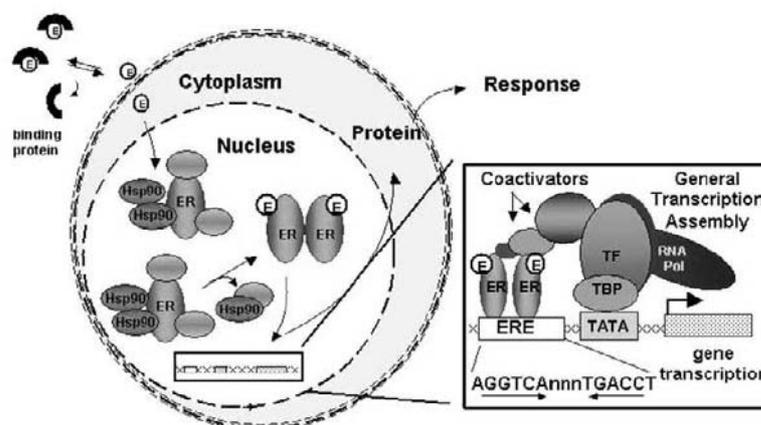


Figure 1.4. Mécanisme moléculaire de l'action d'un œstrogène sur un récepteur (Mueller, 2004). E : œstrogène ; ER : récepteur aux œstrogènes ; Hsp90 : protéine liée à un récepteur inactif ; TF : facteur de transcription ; RNA Pol : ARN polymérase.

2.1.4. Rôle des stéroïdes hormonaux dans la fonction de reproduction

Androgènes et œstrogènes jouent un rôle critique dans la différenciation sexuelle des poissons (Devlin et Nagahama, 2002 ; Piferrer, 2001), c'est-à-dire le développement de types distincts de gonades (testicules ou ovaires). Le contrôle endocrinien de la différenciation sexuelle implique des interactions complexes entre cerveau et gonade, au moyen de gonadotropines produites par l'hypophyse et de stéroïdes hormonaux produits par le cerveau et la gonade. Les hormones stéroïdiennes ne sont, a priori, pas à l'origine du processus de différenciation, mais elles y participent activement lorsqu'il est enclenché (Baroiller et al., 1999). Ces hormones ont une action locale, directe, sur le développement des cellules germinales mais elles agissent également sur d'autres types de cellules et d'autres organes impliqués dans ce processus. En outre, le rapport androgènes/œstrogènes semble être un facteur déterminant dans la différenciation de la gonade vers l'un ou l'autre phénotype sexuel (Baroiller et al., 1999).

Egalement placée sous contrôle hormonal, la puberté correspond chez les poissons au premier cycle de reproduction. Initiée par le démarrage de la spermatogenèse chez les mâles et par celui du développement ovarien chez les femelles, elle est effective lors de la spermiation chez les mâles et de l'ovulation chez les femelles. Chez les téléostéens, la puberté est ainsi placée sous contrôle direct des gonadotropines et des stéroïdes hormonaux (Okuzawa, 2002).

L'ovogenèse, formation des cellules reproductrices femelles, se déroule dans l'ovaire. Ce processus comprend plusieurs phases : multiplication des cellules germinales, apparition des ovocytes primaires, croissance de ces derniers (liée à la vitellogenèse) et maturation (Redding et Patino, 1993). La vitellogenèse est un processus faisant partie intégrante de l'ovogenèse ; elle inclut la synthèse de vitellogénines et l'incorporation de dérivés de ces protéines au sein des ovocytes en cours de croissance. Les vitellogénines sont ainsi les principaux précurseurs des protéines du jaune d'œuf, les vitellines, qui constituent une réserve d'énergie pour le développement des embryons d'organismes ovipares (Marin et Matozzo, 2004). Chez les poissons, ces glycophospholipoprotéines sont synthétisées au niveau du foie des individus femelles. La production de ce type de protéines est placée sous le contrôle de différentes hormones mais les œstrogènes, et notamment le 17β -œstradiol, ont un rôle prépondérant dans ce processus (Sumpter et Jobling, 1995). Chez de nombreuses espèces de poissons, les taux plasmatiques de vitellogénine augmentent régulièrement durant la maturation des individus femelles, parallèlement à l'élévation des niveaux de 17β -œstradiol. Ainsi chez le flet (*Platichthys flesus*), la concentration de vitellogénine passe de 150 à 1300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ entre les mois de juillet et janvier (période de ponte) tandis que la concentration de 17β -œstradiol passe de moins de 10 pg.mL^{-1} à 1,5 ng.mL^{-1} (Gallien-Landriau, 2003). Une forte concentration en vitellogénine est requise pour le

développement des ovaires (contenant des milliers d'ovocytes), sachant que ceux-ci peuvent représenter jusqu'à 10% de la masse corporelle des flets femelles avant la ponte (Gallien-Landriau, 2003). Inversement, la vitellogénine n'est normalement pas détectée chez les poissons mâles, probablement en raison de la faiblesse des niveaux de 17β -œstradiol plasmatiques pas assez élevés pour induire l'expression des gènes responsables de la synthèse de cette protéine.

La maturation des ovocytes est également placée sous le contrôle des hormones stéroïdiennes. Ainsi, chez de nombreuses espèces de poissons téléostéens, la gonadotropine GtH 2 induit la production d'un métabolite de la progestérone, la $17,20\beta$ -dihydroxy-4-prégnène-3-one (17α -hydroxy, 20β -dihydroprogestérone) (Redding et Patino, 1993). Ce dernier stéroïde est responsable de la maturation finale des ovocytes chez de nombreuses espèces de poissons, parmi lesquelles *Coregonus clupeaformis* (Rinchar et al., 2001) et *Oncorhynchus mykiss* (Scott et al., 1983).

Chez les individus mâles, la spermatogenèse correspond à la formation des cellules sexuelles mâles et se déroule dans les testicules. Ce processus se déroule en trois temps : prolifération mitotique des spermatogonies, méiose des spermatocytes et spermiogenèse, qui structure les spermatides en spermatozoïdes flagellés (Schulz et Miura, 2002). Deux gonadotropines, la GtH1 et la GtH2, ainsi que deux stéroïdes, la 11-cétotestostérone et la testostérone stimulent ce processus via les récepteurs des cellules somatiques testiculaires (Schulz et Miura, 2002). L'augmentation des taux plasmatiques de GtH1 est le signal déclenchant la prolifération des spermatogonies et la synthèse de 11-cétotestostérone, via un accroissement de la quantité de cholestérol acheminé jusqu'aux mitochondries des cellules de Leydig (Weltzien et al., 2004). Généralement, cet androgène, majoritaire chez de nombreux téléostéens, est le stéroïde ayant l'effet le plus puissant sur la spermatogenèse, peut-être par l'intermédiaire de métabolites comme la 5α -cétotestostérone (obtenue par action de la 5α -réductase) (Borg, 1994). Etape finale de la maturation des gamètes, la spermiation est induite essentiellement par la $17,20\beta$ -dihydroxy-4-prégnène-3-one.

Androgènes et œstrogènes sont donc étroitement liés au cycle reproductif des individus matures. La production gonadique de ces hormones ainsi que leurs niveaux plasmatiques présentent d'importantes variations saisonnières, observées chez de nombreuses espèces de poissons parmi lesquelles la perche eurasienne (*Perca fluviatilis* ; Sulisty et al., 2000), le thon rouge (*Thunnus thynnus* ; Susca et al., 2001), le thon albacore (*Thunnus albacares*; Stéquert et al., 2001), la truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*; Scott et al., 1983) et le flet européen (*Platichthys flesus* ; Gallien-Landriau, 2003). On observe généralement une augmentation des niveaux des principaux androgènes (testostérone et 11-cétotestostérone) et œstrogènes (17β -œstradiol) dans les semaines précédant la ponte, ainsi qu'une

augmentation de ceux des métabolites de la progestérone (17α -hydroxyprégnénolone et 17α -hydroxy, 20β -dihydroprogestérone) dans les jours précédant la ponte. Ces variations sont généralement bien corrélées avec l'augmentation de l'indice gonado-somatique, qui traduit le développement des gonades durant la gamétogenèse.

2.2. Mollusques bivalves

Le fonctionnement du système endocrinien des mollusques est relativement méconnu par rapport à celui des vertébrés. Ce paragraphe a pour but d'exposer brièvement quelques aspects de l'endocrinologie des mollusques bivalves et notamment de celle de la moule *Mytilus edulis*.

La plupart des mollusques bivalves marins sont des espèces pionnières dont la reproduction obéit à une stratégie de type « r », avec un cycle de développement court et un fort potentiel de reproduction (Lubet et Mathieu, 1999). Dans le bassin d'Arcachon (site de prélèvement des moules *Mytilus edulis* étudiées dans ce travail), la maturation des gamètes débute vers le mois d'octobre et la principale période de ponte intervient au printemps, vers le mois d'avril (Lubet, 1959). Maturation et émission des gamètes peuvent être déclenchées par l'action de stimuli externes provoquant un stress temporaire. Des changements brusques des facteurs environnementaux (thermiques, mécaniques, ioniques) sont ainsi employés en éclosérie pour provoquer la ponte de géniteurs et obtenir des gamètes (Lubet et Mathieu, 1999). La régulation de la gamétogenèse demeure cependant assez mal connue : elle serait sous la dépendance de substances gonadotropes de nature peptidique produites par des ganglions cérébroïdes (neurosecrétion) et de stéroïdes d'origine gonadique (Lubet et Mathieu, 1999).

2.2.1. Neurosecrétion

Le système nerveux central des mytilidés est principalement constitué de ganglions cérébroïdaux, viscéraux et pédieux. Ce système nerveux diffus possède la capacité de sécréter des neurohormones, notamment de nature peptidique. Les cycles de neurosecrétion ont été étudiés chez les Mytilidés ; Lubet (1959) a mis en évidence une corrélation significative entre les étapes du cycle de reproduction et l'activité des cellules neurosecrétrices chez *Mytilus edulis*. L'activité de certaines cellules des ganglions cérébroïdes (cellules dites piriformes) augmente de manière significative lors de la maturation sexuelle et l'ablation de certains ganglions nerveux (cérébroïdes ou viscéraux) peut inhiber la ponte chez *Mytilus edulis* (Lubet, 1959).

2.2.2. Stéroïdes endogènes : présence, biosynthèse et rôle physiologique

La présence de stéroïdes endogènes a été observée chez plusieurs espèces de mollusques. Ainsi, Reis-Henriques et al. (1990a et 1990b) ont détecté, par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse, la présence d'androgènes (testostérone, 5 α -dihydrotestostérone et androstènedione), d'œstrogènes (17 β -œstradiol et œstrone) et de progestérone dans la gonade de *Mytilus edulis* ; Devier (2003) a également observé la présence de progestérone et de prégnénolone chez ce même bivalve. Siah et al. (2002) ont mis en évidence la présence de progestérone dans la gonade du clam *Mya arenaria* (chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse pour l'identification, méthode immunosélective pour la quantification). Matsumoto et al. (1997) ont détecté deux œstrogènes (17 β -œstradiol et œstrone) dans les gonades de *Crassostrea gigas* et *Patinopecten yessoensis*.

Au moyen de tests *in vitro*, différentes équipes ont mis en évidence la présence chez les bivalves de systèmes enzymatiques impliqués dans la stéroïdogénèse. De Longcamp et al. (1974), à partir de précurseurs radioactifs, ont prouvé la présence chez la moule *Mytilus edulis* des enzymes suivantes : 3-hydroxystéroïde déshydrogénase (3-HSD), 17-hydroxystéroïde déshydrogénase (17-HSD), C17-20 lyase et 5 α -réductase. Matsumoto et al. (1997) ont également observé une activité 17 β HSD et 3 β HSD dans les ovaires de *Patinopecten yessoensis*, ainsi qu'une apparente modulation de cette activité au cours du cycle sexuel de ce bivalve. Le Curieux-Belfond et al. (2001) ont détecté ce même type d'activité ainsi qu'une faible activité aromatasase chez l'huître *Crassostrea gigas*. Enfin, Morcillo et al. (1999) ont mis en évidence cette même activité aromatasase dans la fraction microsomale de la glande digestive de *Mytilus edulis*.

Le rôle des stéroïdes hormonaux dans le cycle sexuel des mollusques bivalves est relativement peu documenté. Reis-Henriques et al. (1990b) ont étudié les variations saisonnières des niveaux de progestérone chez *Mytilus edulis*, au cours d'un cycle sexuel annuel. Ces auteurs ont mesuré des taux de progestérone similaires chez les individus mâles et femelles ; ils ont également observé une apparente corrélation entre concentration en progestérone et gamétogénèse. En employant la même technique analytique, Devier (2003) a, de manière similaire, observé une élévation des niveaux de prégnénolone et de progestérone chez *Mytilus* sp. au printemps, principale période de ponte de ce bivalve sur le site considéré (Bassin d'Arcachon). Matsumoto et al. (1997) ont constaté des variations du niveau ovarien de 17 β -œstradiol chez *Patinopecten yessoensis*, en fonction de la maturité sexuelle des individus étudiés. Les activités enzymatiques permettant la synthèse des œstrogènes (17HSD et aromatasase) étaient plus élevées chez les individus en cours de maturation que chez ceux ayant déjà pondu. Siah et al. (2002) ont établi un lien

(synchronisme) entre la production de progestérone et l'indice gonado-somatique chez *Mya arenaria* ; ils ont également montré l'importance du rôle de la progestérone dans la maturation des gamètes chez ce bivalve. En outre, Stefano et al. (2003) ont récemment suggéré que le 17β -œstradiol était capable de stimuler la production d'oxyde nitrique par les ganglions pédieux de *Mytilus edulis*. Ceci suggère une possible implication de ce stéroïde dans la reproduction chez la moule, puisque les ganglions nerveux ont un rôle central dans la ponte (Lubet, 1959).

3. MODES D'ACTION DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS

De nombreux contaminants de l'environnement, qualifiés de xénohormones, ont démontré leur capacité à interférer avec le système endocrinien de nombreux organismes aquatiques dont les poissons et certains mollusques. L'objet des paragraphes suivants est de présenter succinctement les différents modes d'action des xénobiotiques sur le système endocrinien de ces différents organismes.

3.1. Interaction directe avec les récepteurs hormonaux

3.1.1. Action antagoniste

Certains xénobiotiques agissent sur les récepteurs hormonaux selon un mode antagoniste : capables de se fixer sur un récepteur donné, ils bloquent ou diminuent la réponse induite par une hormone endogène car le site ne peut être activé de manière normale.

Deux types d'inhibition peuvent être observés (Lintelmann et al., 2003):

- inhibition compétitive, lorsque xénobiotique et hormone endogène sont en compétition pour le même site actif d'un récepteur nucléaire.
- inhibition non compétitive, lorsque le xénobiotique se lie au récepteur ou au complexe hormone-récepteur, mais sans affecter directement le site actif du récepteur.

Parmi les xénobiotiques antagonistes, on trouve les herbicides linuron et vinclozolin et leurs métabolites (récepteurs aux androgènes) ainsi que le tamoxifène (récepteurs aux œstrogènes) (Lintelmann et al., 2003 ; Mueller, 2004).

3.1.2 Action agoniste

Un xénobiotique « agoniste » est un composé chimique capable d'entrer en compétition avec une hormone endogène pour se fixer à un récepteur (par exemple de type androgénique ou œstrogénique) et l'activer, entraînant alors des effets similaires à ceux induits par la fixation d'une hormone endogène. On parle, dans ce cas, d'effet mimétique et le pouvoir d'un xénobiotique agoniste dépend à la fois de son affinité pour le récepteur et de sa capacité à induire une réponse. La plupart des xénobiotiques agonistes induisent des réponses plus faibles que les hormones endogènes, même s'il existe des contre-exemples (cas du 17 α -éthynylœstradiol) (Lister et Van der Kraak, 2001). On notera enfin que la plupart des « xénoœstrogènes » (alkylphénols, bisphénol A...) agissent de manière agoniste sur les récepteurs aux œstrogènes (Lintelmann et al., 2003).

Pour ces deux types d'interaction xénobiotique-récepteur, il est intéressant de noter que la concentration en xénobiotique joue souvent un rôle important. En effet, les concentrations des hormones endogènes sont relativement faibles (de l'ordre du ng.mL⁻¹ dans le plasma). Dès lors, si un xénobiotique est présent à concentration élevée dans un organisme, une perturbation peut-être induite même si l'affinité du xénobiotique pour le récepteur est nettement plus faible que celle d'une hormone endogène.

3.2. Interaction indirecte avec le système endocrinien

3.2.1. Concentration des récepteurs hormonaux

En perturbant les interactions entre récepteur et ligand endogène, certains xénobiotiques sont capables d'agir indirectement sur les taux de récepteurs nucléaires (Lintelmann et al., 2003). Ce phénomène peut augmenter la vitesse de dégradation des stéroïdes hormonaux, modifier l'activité d'enzymes impliquées dans la stéroïdogenèse ou inhiber l'expression de gènes sous contrôle hormonal.

3.2.2. Biosynthèse et métabolisme des stéroïdes hormonaux

La biosynthèse des hormones stéroïdiennes fait intervenir de nombreuses enzymes appartenant à la famille du cytochrome P450. De nombreuses enzymes de cette famille sont également impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques, d'où la possibilité que ces derniers puissent inhiber ou activer certaines enzymes catalysant la biosynthèse hormonale. Les activités aromatasase, P450ccl, 16-hydroxylase et 17-hydroxystéroïde déshydrogénase

peuvent ainsi être perturbées chez différentes espèces de poissons et de mollusques suite à une exposition à des xénobiotiques (Arukwe et al., 1997; Le Curieux-Belfond et al., 2001; McMaster et al., 1995; McMaster et al., 1996; Monteiro et al., 2000a; Morcillo et al., 1999 ; Scholz et Gutzeit, 2000; Solé et al., 2000a). De même, l'activité glucuronyl-transférase, impliquée dans la conjugaison des stéroïdes avec l'acide glucuronique, peut être modulée par l'exposition à des xénobiotiques (Martín et al., 2004). En outre, le transport et la biodisponibilité des hormones peuvent être également être affectés par des contaminants. Les xénobiotiques lipophiles sont, en effet, susceptibles d'entrer en compétition avec les hormones endogènes pour la fixation sur les protéines de transport (albumine et protéines spécifiques aux stéroïdes hormonaux), ce qui a pour effet d'élever les concentrations en hormones libres, effectrices (Gale et al., 2004 ; Lintemann et al., 2003).

4. LES PHENOMENES DE PERTURBATION ENDOCRINIENNE DANS LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES

Les systèmes aquatiques sont le réceptacle ultime de nombreux composés chimiques émis dans l'environnement de manière naturelle ou par le biais d'activités anthropiques. Indépendamment de leur mode d'émission (atmosphérique, via des lixiviats de décharges ou des rejets de stations d'épuration (STEP)...), les composés en question ou leur produits de dégradation entrent dans les systèmes aquatiques lors de leur cycle biogéochimique. Dès lors, il n'est pas étonnant de constater que les exemples de perturbation endocrinienne chez la faune sauvage les mieux documentés concernent des organismes aquatiques et leurs prédateurs (revue par Sumpter, 2001). L'exemple emblématique est celui du phénomène d'imposex chez des gastéropodes marins (*Nucella lapillus* et *Ilyanassa obsoleta*, par exemple) causé par un biocide, le tributylétain ; cet exemple sera détaillé plus loin (§ 4.2.1). On peut également citer l'exemple de l'altération de la fertilité chez des alligators de Floride (*Alligator mississippiensis*) exposés à un pesticide organochloré (le difocol) ou celui des troubles de la reproduction chez plusieurs espèces d'oiseaux marins, imputés là encore à des composés organochlorés.

Les paragraphes suivants visent à présenter brièvement les principaux effets observés *in situ* chez les organismes aquatiques – et plus spécifiquement ceux observés chez les poissons et les mollusques – ainsi que les composés mis en cause dans ces perturbations.

4.1. Principaux effets observés chez les organismes aquatiques

4.1.1. Poissons

Dans les études de perturbation endocrinienne, l'induction de la production de vitellogénine chez des poissons mâles est l'un des biomarqueurs les plus couramment utilisés (Sumpter et Jobling, 1995 ; Marin et Matozzo, 2004). De nombreuses études ont montré que des poissons mâles vivant dans des milieux impactés par des rejets de stations d'épuration domestiques ou industrielles présentaient des taux plasmatiques de vitellogénine élevés, alors que cette protéine est normalement synthétisée uniquement par les individus femelles. Ces études, démontrant la présence de composés œstrogénomimétiques dans les milieux continentaux, estuariens et marins, concernent le gardon (*Rutilus rutilus* ; Jobling et al., 1998 et 2002 ; Minier et al., 2000a), la carpe commune (*Cyprinus carpio* ; Solé et al., 2000a), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss* ; Larsson et al., 1999), le flet (*Platichthys flesus* ; Lye et al., 1997 ; Gallien-Landriau, 2003 ; Minier et al., 2000b ; Kleinkauf et al., 2004) ainsi que diverses espèces de poissons plats (*Pleuronectes yokohamae* ; Hashimoto et al., 2000 ; *Pleuronectes bilineatus* ; Johnson et al., 1998). Petrovic et al. (2002) et Jobling et al. (1998) ont mis en évidence une corrélation positive entre l'augmentation des taux plasmatiques de vitellogénine et la concentration en effluent dans les cours d'eau étudiés. L'induction de la synthèse de la protéine zona radiata (permettant la formation de l'enveloppe vitelline des œufs) est également parfois observée sur certains sites (Robinson et al., 2003).

Des perturbations du développement testiculaire ont été observées chez des poissons capturés dans des milieux contaminés par les activités anthropiques, notamment industrielles. Parmi les effets observés, on peut citer des retards de maturation (Jobling et al. 2002), une production réduite de gamètes (Jobling et al., 2002) ou une atrophie des testicules (diminution de l'indice gonado-somatique ; Harries et al., 1997). Des phénomènes d'intersexualité (ou ovotestis, figure 1.5) ont en outre été observés dans des sites fortement impactés. Ces études concernent les milieux dulçaquicoles (Jobling et al., 2002 ; Minier 2000b) ainsi que les milieux estuariens et marins (Lye et al., 1997 ; Gallien-Landriau, 2003 ; Mathiessen et al., 1998 ; Minier et al., 2000b). Jobling et al. (1998) ont observé que le taux d'intersexualité chez les gardons (compris entre 4 et 100% selon la rivière) était clairement associé à une élévation du taux de vitellogénine plasmatique. Ceci tend à suggérer que ces deux phénomènes ont une même cause : l'exposition aux xénoœstrogènes présents dans les effluents des stations d'épuration.

Bien que la plupart des études des troubles de la reproduction concernent les individus mâles, quelques travaux montrent également que les femelles peuvent également être

affectées : maturation précoce, inhibition ou retard du développement (revue par Orlando et Guillette, 2001).

Des altérations biochimiques ont été mises en évidence, souvent sur les mêmes sites où des inductions de vitellogénine ou des phénomènes d'intersexualité ont été observés. Des perturbations de la stéroïdogénèse ont été décrites chez des poissons vivant en aval de rejets d'effluent de station d'épuration et de papeterie, ou de lixiviats de décharge. Dans le premier cas, on assiste plutôt à une dépression des niveaux d'androgènes (testostérone et 11-cétotestostérone) et à une augmentation des niveaux d'oestrogènes (17 β -œstradiol essentiellement) (Folmar et al. 1996 ; Solé et al., 2003a et 2003b ; Martín et al., 2004). Dans le cas des effluents de papeterie et des lixiviats, on observe plutôt une réduction générale des niveaux de stéroïdes (Van den Heuvel et al., 2002 ; McMaster et al. 1995 ; Noaksson et al., 2003 ; Noaksson et al., 2004). L'activité des enzymes de phase II (conjugaison des stéroïdes et des xénobiotiques) peut également être affectée par ce type de contamination. Martín et al. (2004) ont relevé une augmentation de l'activité de conjugaison du 17 β -œstradiol chez des carpes mâles (*Cyprinus carpio*) exposées *in situ* à un mélange de composés alkylphénoliques, tandis que Lavado et al. (2003) ont observé une diminution de la conjugaison de la testostérone et du 17 β -œstradiol chez des carpes mâles prélevées dans une zone agricole (présence d'alkylphénols et de pesticides).

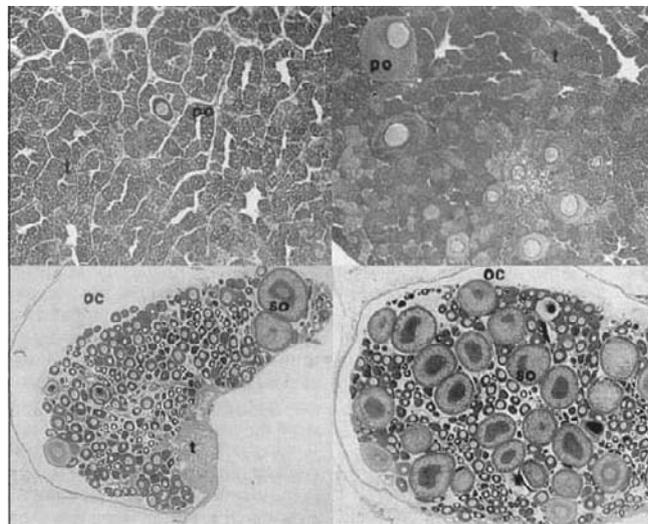


Figure 1.5 : Phénomène d'intersexualité dans un testicule de gardon (*Rutilus rutilus*) exposés à des effluents de station d'épuration (Jobling et al., 1998). Différents degrés d'intersexualité sont illustrés par ces clichés, depuis un stade peu avancé (tissus spermatogéniques (t) contenant quelques ovocytes primaires (po)) jusqu'à des stades très avancés (présence de tissus contenant de nombreux ovocytes primaires et secondaires, voire d'une cavité ovarienne (oc)).

Alors que dans les milieux impactés par les effluents de station d'épuration – domestiques ou industrielles – on observe généralement des effets dits de « féminisation », on observe plutôt, dans le cas des effluents de papeterie, des phénomènes dits de « masculinisation » (revue par Pait et Nelson, 2002). La gambusie (*Gambusia affinis*), qui présente un important dimorphisme sexuel, a souvent été utilisée pour l'étude du caractère masculinisant de ces effluents. Chez cette espèce, les caractères sexuels secondaires, notamment la morphologie de la nageoire anale, sont en effet régulés par les androgènes.

On pourra également retenir que les individus juvéniles sont particulièrement vulnérables à l'action des xénohormones (Gimeno et al., 1997 ; Rodgers-Gray et al., 2001), les effets de ces dernières sur la structure des gonades pouvant être irréversibles. Si la détermination du sexe est le plus souvent placée sous contrôle génétique (Arcand-Hoy, 1998 ; Devlin et Nagahama, 2002), des facteurs externes comme la température, le comportement social ou l'exposition à des hormones exogènes, peuvent influencer sur la différenciation sexuelle (développement gonadiques des juvéniles). Il est ainsi possible, dans le cadre d'activités aquacoles par exemple, d'exposer volontairement des individus juvéniles à des concentrations élevées de stéroïdes, de l'ordre de la centaine de $\mu\text{g.L}^{-1}$, pour inverser leur phénotype sexuel. La 17α -méthyltestostérone peut être employée pour masculiniser une population, tandis que des œstrogènes tels que le 17β -œstradiol ou le 17α -éthynylœstradiol sont utilisés afin d'obtenir une féminisation (Devlin et Nagahama, 2002).

4.1.2. Mollusques bivalves

D'une manière générale, les phénomènes de perturbation endocrinienne chez les invertébrés ont été relativement peu documentés. Ceci est particulièrement valable pour les mollusques bivalves, même si quelques travaux récents ont commencé à combler cette lacune.

Plusieurs études ont été réalisées sur le clam *Mya arenaria* dans l'estuaire du Saint Laurent (Québec, Canada). Des perturbations du métabolisme de la progestérone (Siah et al., 2003) et un retard dans la gamétogenèse (Gauthier-Clerc et al., 2002 ; Siah et al., 2003) ont été observés chez des individus prélevés dans certains sites impactés par des activités anthropiques et contaminés par le tributylétain (Siah et al., 2003). Gagné et al. (2003) ont mis en évidence un phénomène de masculinisation chez ce bivalve avec, pour certains sites également contaminés par le tributylétain, un abaissement de la proportion de femelles au sein de la population, une altération du métabolisme gonadique du 17β -œstradiol et un faible taux d'occupation des récepteurs aux œstrogènes.

Morcillo et al. (1999) ont également observé une perturbation (*in vitro*) du métabolisme du 17β -œstradiol (chute de l'activité aromatasase) chez *Mytilus edulis*, sans que les niveaux

endogènes de stéroïdes libres soient affectés. Les individus présentant des activités enzymatiques réduites provenaient de sites contaminés par des composés organostanniques.

Enfin, des troubles de la vitellogenèse ont été constatés chez deux espèces de moules d'eau douce (*Elliptio coplanata* et *Dreissena polymorpha*) exposées à des effluents de station d'épuration (Gagné et al., 2001 ; Quinn et al., 2004). Les individus exposés à ce type de pollution présentaient, dans le cas des mâles, une induction de la production de vitellogénine et, dans le cas des femelles, une augmentation des taux plasmatiques de ce même type de protéine.

4.2. Composés incriminés

Certains contaminants environnementaux, tels les pesticides, les biocides et les herbicides, peuvent être introduits de manière intentionnelle. La grande majorité des contaminants est cependant introduite de manière non intentionnelle au cours de leur fabrication, de leur utilisation ou de leur recyclage. Certains composés biologiquement actifs, sont même présents naturellement dans l'environnement, comme les isoflavones contenues dans le soja.

Le devenir d'une substance chimique, une fois présente dans l'environnement, est influencé par différents facteurs (Lintelmann et al., 2003) :

- distribution entre les différents compartiments environnementaux (air, eau, sol/sédiment et organismes biologiques).
- dégradation et transfert entre les compartiments et sous compartiments.

Plusieurs paramètres physico-chimiques permettent de mieux comprendre et prévoir le devenir d'une substance dans les écosystèmes aquatiques (Lintelmann et al., 2003) :

- la solubilité dans l'eau, qui correspond à la concentration maximale d'un soluté dans l'eau pure. Ce paramètre varie en fonction de la température, du pH, de la force ionique, de la présence de substances humiques et de matières en suspension.
- Le coefficient d'adsorption, K_{oc} , qui traduit la propension d'un composé à s'adsorber sur les phases solides présentes dans les eaux de surface. Cette grandeur est intimement liée au coefficient de partage octanol/eau, K_{ow} , qui traduit l'hydrophobicité d'une molécule. Plus K_{ow} (ou $\log K_{ow}$, parfois encore noté $\log P$) est élevé, plus une molécule aura tendance à être accumulée dans la fraction lipidique d'un organisme vivant ou à s'adsorber sur les phases solides présentes

en milieu aqueux. Dans les milieux aquatiques, les phénomènes d'adsorption modulent la disponibilité des contaminants vis-à-vis d'un organisme ; la fraction « dissoute » est en général plus facilement absorbée.

- La bioconcentration (et le facteur de bioconcentration, FBC, qui en découle) fait référence à l'absorption d'une substance présente dans l'eau par un organisme aquatique. La bioaccumulation fait, en revanche, référence à l'accumulation d'un composé donné à travers la chaîne trophique. Ces deux phénomènes dépendent, entre autres facteurs, de la capacité d'un organisme à métaboliser les xénobiotiques. Les processus de biotransformation se déroulent en deux étapes. La première (métabolisme de phase I) correspond à l'hydroxylation ou à l'époxydation des contaminants. La conjugaison de ces métabolites polaires permet d'augmenter leur hydrosolubilité, facilitant ainsi leur excrétion (métabolisme de phase II).

L'objet des paragraphes suivants est de dresser une liste des substances dont l'activité xénohormonale a été démontrée *in situ* ou en laboratoire, à l'aide de tests *in vivo* ou *in vitro*. Une description succincte des effets observés sera faite pour chaque classe de contaminants et les sources de contamination seront, dans la mesure du possible, détaillées.

4.2.1 Métaux et composés organométalliques

Le tributylétain (TBT) a été l'un des premiers composés formellement identifié comme perturbateur endocrinien (revue par Sumpter, 2001 et De Fur et al., 1999). Ce composé, plutôt hydrophobe (LogP : 3,6), a longtemps été employé comme biocide dans les peintures anti-salissures des coques de navire. Il est semi-persistant dans la colonne d'eau (temps de demi-vie de l'ordre de quelques semaines), mais persistant dans les sédiments (temps de demi-vie de l'ordre 500 jours) (Lintelmann et al., 2003). Le TBT est à l'origine des phénomènes d'imposex observés chez des mollusques gastéropodes marins (notamment *Nucella lapillus*). L'imposex correspond à l'apparition de caractères mâles chez des individus femelles, allant de l'apparition d'un canal déférent à celle d'un pénis. Ce phénomène est observé pour des concentrations en TBT relativement faibles, de l'ordre du ng.L^{-1} . Le TBT est également capable de perturber la stéroïdogénèse chez des mollusques bivalves comme *Mytilus edulis* (Morcillo et al., 1999) ou *Crassostrea gigas* (Le Curieux-Belfond et al., 2001), en inhibant l'activité aromatasase.

Peu d'exemples de perturbation endocrinienne par des éléments métalliques ont été publiés. Ruby et al. (2000) ont exposé des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) femelles en cours de maturation sexuelle à des concentrations sub-léthales de plomb. Les individus exposés à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ lors de la recrudescence gonadique présentaient

des indices gonado-somatiques réduits, ainsi qu'une altération de la sécrétion hypophysaire de gonadotropines. Thomas (1989) a montré que le cadmium était, contrairement au plomb, capable d'accélérer la croissance ovarienne chez le tambour brésilien (*Micropogonias undulatus*). De plus, les individus exposés à ce métal présentaient des taux plasmatiques de 17β -œstradiol élevés et une sécrétion accrue de gonadotropines.

4.2.2. Pesticides et herbicides

De nombreux pesticides ont été reconnus comme perturbateurs endocriniens, notamment les plus anciens. Certains possèdent des propriétés œstrogéniques (*o,p'*-DDT et méthoxychlore), tandis que d'autres possèdent une activité anti-androgénique (*p,p'*-DDE) (revue par Pait et Nelson (2002) et Lintelmann et al. (2003)).

Le DDT (1,1,1-trichloro-2,2-di(4-chlorophényl)éthane) (figure 1.6) a été l'un des pesticides les plus employés; on estime que plus de deux millions de tonnes de ce composé ont été introduites dans l'environnement jusqu'à son interdiction dans les années 1970 dans la plupart des pays industrialisés. De nombreux pays en voie de développement et au climat tropical l'utilisent encore de jours pour lutter contre la malaria. Le DDT commercial est essentiellement un mélange de deux isomères, *p,p'*-DDT et *o,p'*-DDT (figure 1.6), mais il peut également contenir d'autres composés tels le DDD (1,1-dichloro-2,2-di(4-chlorophényl)éthane) ou encore le DDE (1,1-dichloro-2,2-di(4-chlorophényl)éthylène). Le DDE est, en outre, le principal produit de dégradation du DDT; très rémanent (temps de demi-vie compris entre 3 et 20 ans), le DDE est facilement accumulé par les poissons, puisque des facteurs de bioconcentration de 81000 ont été rapportés (Lintelmann et al., 2003).

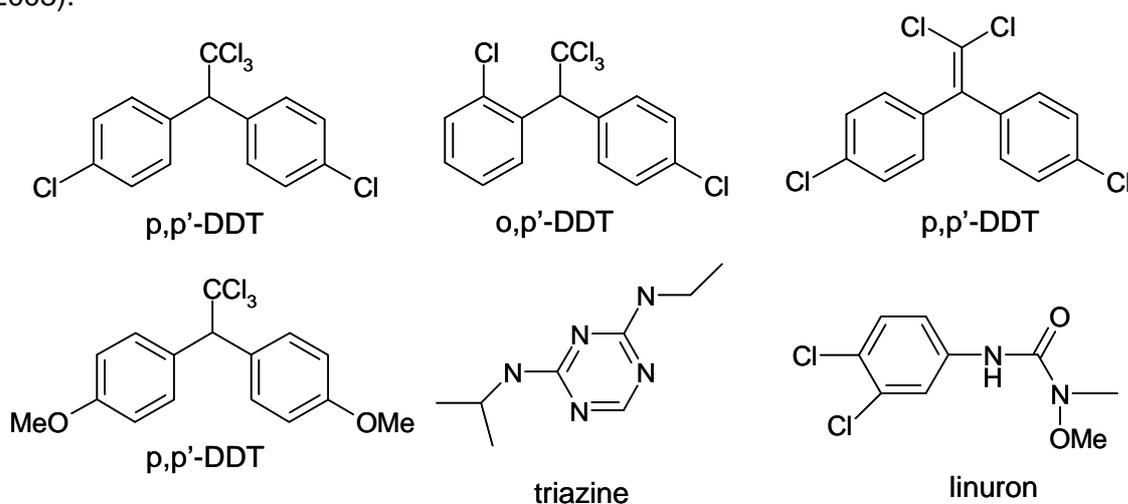


Figure 1.6. Structures de pesticides considérés comme perturbateurs endocriniens.

Le *o,p'*-DDT est le composé le plus actif présent dans le DDT technique (Lintelmann et al., 2003). Ce composé peut induire la production de vitellogénine et l'apparition d'intersexualité chez le médaka (*Oryzias latipes*) et peut également altérer la fertilité des mâles exposés durant 8 semaines à $1,4 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Cheek et al., 2001). Son affinité pour le récepteur aux œstrogènes a été prouvée par des tests *in vitro* : elle est voisine de 5.10^{-3} fois celle du 17β -œstradiol (Lintelmann et al., 2003). Le p-p'DDE est en revanche un puissant antagoniste du récepteur aux androgènes dont l'activité a été démontrée *in vitro* (Sohoni et Sumpter, 1998) et *in vivo*, chez le rat (Kelce et al., 1995).

Le méthoxychlore (1,1,1-trichloro-2,2-di(4-méthoxyphényl)éthane) a été employé comme substitut au DDT, en raison de sa toxicité moindre. Chez les poissons, ce composé est rapidement métabolisé par hydroxylation, déchloration ou déméthylation (Lintelmann et al., 2003). Certains métabolites ainsi formés possèdent une affinité certaine pour le récepteur aux œstrogènes ; à titre d'exemple, celle du méthoxychlore monodéméthylé, proche de 10^{-3} fois celle du 17β -œstradiol, est environ 50 fois supérieure à celle du composé parent (Schlenck et al., 1998). Ce métabolite est capable d'induire la synthèse de vitellogénine *in vivo* chez le poisson chat (*Ictalurus punctatus*) (injection 100 mg.kg^{-1}). Le métabolite obtenu par déchloration, le MDDE ($5,6 \mu\text{g.L}^{-1}$), est également capable d'induire la production *in vivo* de vitellogénine chez *Cyprinodon variegatus* (Hemmer et al., 2001).

Plusieurs pesticides dérivés de l'hexachlorocyclopentadiène (aldrine, dieldrine, mirex, chlordécone...) ont montré une activité œstrogénique *in vitro* (affinité pour le récepteur aux œstrogènes, 10^{-4} à 5.10^{-3} celle du 17β -œstradiol), mais seule la chlordécone a confirmé cette activité *in vivo* (revue par Lintelmann et al., 2003). Ce composé lipophile s'est également révélé être un compétiteur pour le récepteur de la 17α , 20β , 21 -trihydroxy-4-pregnène-3-one chez le tambour brésilien (*Micropogonias undulatus*) (Ghosh et Thomas, 1995).

Le linuron (3-(3,4-dichlorophényl)-1-méthoxy-1-méthylurée) est un herbicide couramment employé pour des applications domestiques et agricoles. Ce composé peu lipophile ($\log P$: 3,2) est relativement persistant, avec des temps de demi-vie de l'ordre de 90-180 jours. Le linuron et certains de ses métabolites (notamment la 3,4-dichloroaniline) sont suspectés d'être des antagonistes compétitifs des récepteurs aux androgènes ; la 3,4-dichloroaniline est en outre capable d'inhiber la synthèse des androgènes chez des épinoches mâles matures (*Gasterosteus aculeatus*), à la dose de $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ (Lintelmann et al., 2003).

Les hexachlorocyclohexanes (HCH) sont une autre famille de pesticides lipophiles et rémanents dont l'activité xénoœstrogénique a été observée chez le poisson. Wester et al. (1991) ont constaté l'apparition d'ovocytes testiculaires chez des médakas mâles (*Oryzias latipes*) exposés au β -HCH. Celius et al. (1999) ont pour leur part observé la production de vitellogénine et de zona radiata par des hépatocytes primaires de saumon mâles (*Salmo salar*) exposés au γ -HCH (lindane).

Les herbicides de la famille des triazines possèdent un caractère anti-œstrogénique (Cooper et al., 1999). L'atrazine ainsi que ses produits de dégradation (déséthylatrazine et déisopropylatriazine) n'induisent pas de réaction positive avec le test *in vitro* ER-Calux (Legler et al, 2000). L'atrazine n'a pas non plus d'effet œstrogénique *in vivo* chez le carassin *Carassius auratus* (pas d'induction de la production de vitellogénine, [atrazine] = 100-1000 µg.L⁻¹) (Spanó et al., 2004). Ce composé perturbe en revanche le métabolisme des stéroïdes hormonaux, en provoquant une baisse des concentrations plasmatiques de testostérone et de 11-cétotestostérone et une augmentation de la concentration en 17β-œstradiol (Spanó et al., 2004). Ce dernier résultat est en bon accord avec le fait que l'atrazine soit reconnue comme un composé inducteur de l'activité aromatase (Sanderson et al., 2001).

4.2.3. Polychlorobiphényles

Les polychlorobiphényles (PCB ; figure 1.7) constituent une famille d'hydrocarbures aromatiques halogénés utilisés jusqu'en 1987 en France dans le cadre de diverses applications industrielles en tant que fluide caloporteur, diélectrique ou hydraulique. Le degré de chloration de ces substances peut varier (1 à 10 atomes de chlore par molécule) et 209 congénères de PCB existent. Les propriétés physico-chimiques dépendent grandement du degré de chloration : plus ce dernier est élevé, plus le caractère lipophile augmente (log K_{ow} 4,5-10), tandis que la solubilité dans l'eau et la biodégradabilité décroissent. Le métabolisme des PCB dépend également du degré de chloration : plus il est élevé, plus la métabolisation est lente. Chez les mammifères, le métabolisme des PCB suit essentiellement l'enchaînement hydroxylation, conjugaison et excrétion. Les PCB sont cependant fortement bioaccumulés et la proportion des composés les plus chlorés augmente avec les niveaux de la chaîne trophique. Malgré leur interdiction progressive dans de nombreux pays au cours des années 1970 et 1980, la quantité de PCB actuellement présente dans l'environnement est estimée à 400 000 tonnes (Lintelmann et al, 2003).

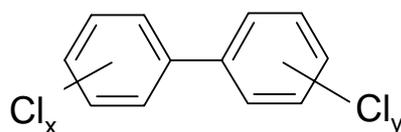


Figure 1.7. Structure générique des polychlorobiphényles.

De nombreux PCB sont capables d'agir directement sur les récepteurs des stéroïdes hormonaux. Des tests *in vitro* (prolifération de cellules MCF-7) ont montré que les PCB, et

notamment les PCB hydroxylés en position para (métabolites des PCB), avaient une affinité certaine pour les récepteurs aux œstrogènes (Soto et al., 1995). *In vitro*, Sumpter et Jobling (1995) ont observé une activité œstrogénique (induction de la synthèse de vitellogénine) de l'Aroclor 1221 sur des hépatocytes de truite arc en ciel mâles exposés à 1 µM de ce mélange commercial de PCB. Thomas et al. (1988) ont étudié l'effet d'un mélange commercial de PCB, l'Aroclor 1254 (exposition via la nourriture, 0,24 mg/ 70 g poisson / jour), sur le tambour brésilien *Micropogonias undulatus* ; ils ont observé une réduction de la croissance ovarienne, accompagnée d'une diminution du taux plasmatique de 17β-œstradiol.

4.2.4. Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), générés principalement par les processus de combustion incomplète (carence en dioxygène), sont présents dans tous les compartiments environnementaux. Les émissions d'origine anthropique sont prédominantes (trafic routier, production d'acier ou d'aluminium), mais des sources naturelles existent : incendies de forêt, éruptions volcaniques... Dans le milieu marin, les HAP sont majoritairement introduits ou formés de manière naturelle, par biosynthèse par les organismes vivants, par suintement à travers le plateau continental ou lors des processus de diagenèse dans les sédiments. Les HAP sont hydrophobes et leur log K_{ow} augmente avec le nombre de cycle : de 3,2 pour le naphthalène (2 cycles) à 7,6 pour le benzo[g,h,i]pérylène. Ils sont cependant moins accumulés que les PCB, car leur transformation métabolique est plus importante (formation de phénols, d'époxydes, de dihydrodiols ou de chatécols, suivie d'une étape de conjugaison).

Certains métabolites de HAP font preuve d'une certaine affinité pour le récepteur aux œstrogènes ; ainsi, celle du 3,9-dihydroxybenzo(a)anthracène est $1,2 \cdot 10^{-2}$ celle du 17β-œstradiol (*in vitro*, chez le rat).

L'activité antioestrogénique de certains HAP a fait l'objet de plusieurs études. Anderson et al. (1996) ont montré que le β-naphtoflavone, un dérivé de HAP, réduisait la production de vitellogénine chez la truite arc en ciel juvénile. Les auteurs ont attribué cet effet à une inhibition de la synthèse de récepteurs aux œstrogènes. Certains HAP sont capables de se lier aux récepteurs cytosoliques (Ah) générant une activité antioestrogénique via l'induction d'enzymes catalysant, par exemple, l'hydroxylation du 17β-œstradiol (Santodonato, 1997). Monteiro et al. (2000a et 2000b), ont montré que trois HAP (le phénanthrène, le benzo[a]pyrène et le chrysène ; figure 1.8) administrés par voie orale à des flets femelles (*Platichthys flesus*) étaient capables d'altérer la stéroïdogénèse, provoquant notamment une

diminution de la production ovarienne de 17- β œstradiol et du taux plasmatique de cet œstrogène.

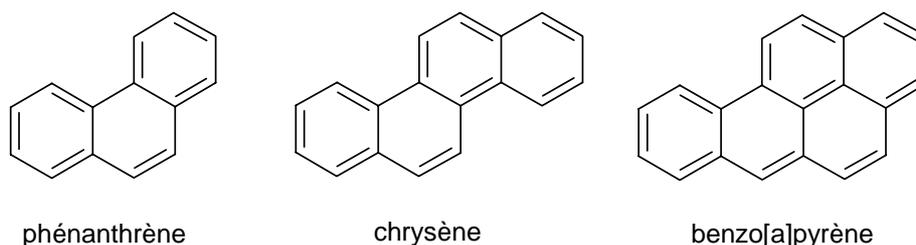


Figure 1.8. Structures de trois HAP possédant une activité antiœstrogénique.

4.2.5. Polychlorodibenzodioxines et polychlorodibenzofuranes

Les polychlorodibenzodioxines (PCDD) et les polychlorodibenzofuranes (PCDF) sont deux classes de composés chlorés présentant des structures similaires (figure 1.9). On recense 75 congénères de PCDD et 135 congénères de PCDF. Ces substances persistantes ne sont pas synthétisées industriellement ; elles sont générées involontairement comme sous-produits lors de la production de chlore ou d'hydrocarbures, et lors de la pyrolyse ou de la combustion de matière organique en présence de chlore (dans un incinérateur, par exemple) (Lintelmann et al., 2003). Les PCDD et PCDF sont fortement lipophiles ($\log K_{ow} > 6$) et, comme pour les PCB, leurs propriétés physico-chimiques dépendent de leur degré de chloration. Bien qu'elles soient métabolisables par les mammifères et les poissons, ces substances sont accumulées dans la chaîne alimentaire, avec des facteurs de bioaccumulation compris entre 1000 et 86000, suivant l'espèce de poisson et le congénère. Les composés substitués en positions 2,3,7 et 8 présentent les activités biologiques les plus prononcées : carcinogénicité, perturbation des systèmes immunitaire et reproductif... Ainsi, la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzodioxine (TCDD) est la dioxine la plus active biologiquement, et la plus étudiée.

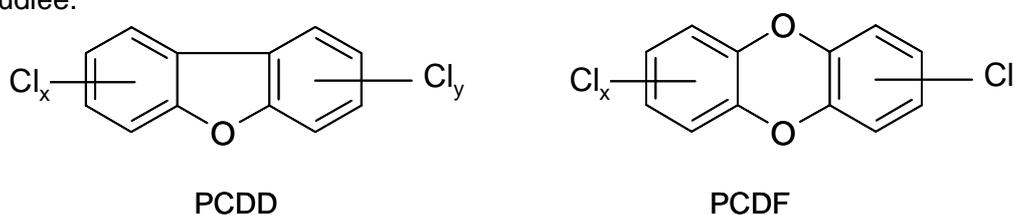


Figure 1.9. Structure des PCDD et des PCDF.

PCDD et PCDF semblent avoir une activité antiœstrogénique *in vitro* (inhibition de la synthèse de récepteurs aux œstrogènes et de la prolifération œstrogéno-dépendante de cellules du carcinome mammaire, MCF-7) (revue par Lintelmann et al., 2003). Anderson et al. (1996) ont montré que la TCDD, ainsi que deux furanes (2,3,7,8-tétrasubstitué et 2,3,4,7,8-pentasubstitué) avaient un effet antiœstrogénique sur des hépatocytes de truite

arc-en-ciel puisqu'ils étaient capables de réduire la synthèse de vitellogénine par ces cellules hépatiques. L'amplitude de la réponse était directement liée à la faculté des composés à induire la production d'une protéine, la CYP1A1, suggérant un mécanisme d'action similaire à celui des HAP.

4.2.6. Phtalates

Les phtalates, diesters de l'acide phtaliques formés par réaction avec divers alcools aliphatiques, sont des composés largement employée dans l'industrie. On recense une soixantaine de phtalates, dont les plus importants (en termes de production) sont le di(éthylexyl)phtalate (DEHP) et le butylbenzylphtalate (BBP) employés respectivement dans la synthèse du polychlorure de vinyle et dans la fabrication de revêtement type linoléum (figure 1.10). La dégradation bactérienne des phtalates est en général relativement rapide (demi-vie de quelques jours pour des incubations en laboratoire) mais la vitesse de dégradation dépend de la longueur de la chaîne alkyle, ce qui fait du DEHP l'un des phtalates les plus persistants (Harris et Sumpter, 2001).

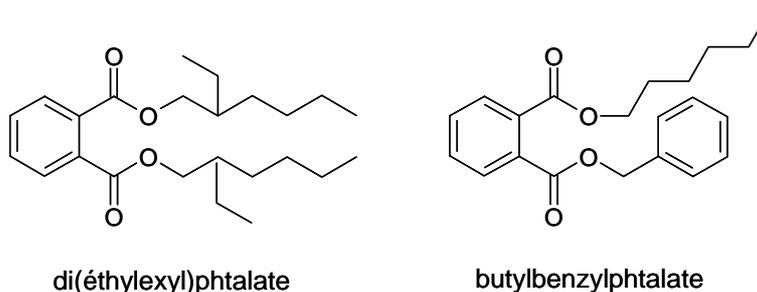


Figure 1.10. Structure de deux phtalates courants.

Le caractère faiblement œstrogénique des phtalates a été démontré par de nombreuses études *in vitro* (revue par Harris et Sumpter, 2001). L'affinité de ces composés pour le récepteur aux œstrogènes varie de $2 \cdot 10^{-5}$ à $7 \cdot 10^{-3}$ fois celle du 17β -œstradiol, suivant le test employé et le composé considéré. L'activité œstrogénique des métabolites des phtalates (généralement des monoesters) est négligeable par rapport à celle des composés parents.

Christiansen et al. (1998) ont injecté du dibutylphtalate (DBP) et du butylbenzylphtalate (BBP) à des truites arc en ciel juvéniles ($500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) et ont montré que seul le BBP induisait (faiblement) la synthèse de vitellogénine. D'autres études – impliquant des doses plus faibles de phtalates ou une exposition via l'eau (revue par Harris et Sumpter (2001) – n'ont cependant pas réussi en mettre en évidence de caractère œstrogénique pour ce composé. Harris et Sumpter (2001) concluent d'ailleurs que les phtalates, aux concentrations auxquelles ils sont présents dans les écosystèmes aquatiques (maximum de $21 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$), ne constituent pas a priori un risque pour le système endocrinien des organismes aquatiques.

Enfin, on pourra également noter que les métabolites de certains phtalates, comme le monobutylphtalate, sont des antagonistes du récepteur aux androgènes et font preuve d'une activité antiandrogénique *in vivo* chez le rat (Harris et Sumpter, 2001).

4.2.7. Bisphénol A

Le bisphénol A (figure 1.11) est l'une des substances les plus utilisées par l'industrie chimique. Ainsi, la production mondiale de ce composé atteignait 640000 tonnes en 1993 (Lintelmann et al., 2003). Le Bisphénol A est un intermédiaire important dans la synthèse de nombreux polymères, résines fongicides, retardateurs de flammes... Il est ainsi présent dans de nombreux produits tels les prothèses dentaires ou les emballages alimentaires et autres matériaux plastiques.

Ce composé, modérément lipophile (logP 3,4), est relativement persistant puisque sa demi-vie est voisine de 150 jours dans les eaux de surface et de 180 jours en milieu sédimentaire (Lintelmann et al., 2003). Les mesures de FBC indiquent une faible accumulation (FBC : 5-68) de ce composé, sans doute en raison d'une rapide métabolisation.

L'activité œstrogénique du bisphénol A a été démontrée à l'aide tests *in vitro* (revue par Markey et al., 2001) ; l'affinité du bisphénol A pour le récepteur aux œstrogènes ainsi estimée est environ $2 \cdot 10^{-3}$ fois plus faible que celle du 17β -œstradiol. Ce composé est capable d'augmenter l'expression des récepteurs aux œstrogènes et d'induire la prolifération de cellules MCF-7 (contrôlée par le 17β -œstradiol). Le bisphenol A est également capable de stimuler la synthèse de vitellogénine par des hépatocytes de poissons (saumon et truite), à des doses de l'ordre de 10^{-6} M (Sumpter et Jobling, 1995 ; Celius et al., 1999).

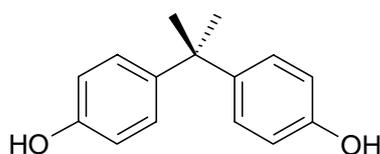


Figure 1.11. Formule semi-développée du bisphénol A.

Les effets *in vivo* du bisphénol A sur les organismes aquatiques, et notamment les poissons, ont été largement documentés. Plusieurs études ont décrit l'induction de la production de vitellogénine chez des poissons mâles. Lindholst et al. (2001) ont ainsi exposé des truites arc en ciel juvéniles au bisphénol A (10 - $500 \mu\text{g.L}^{-1}$) et ont observé une induction significative de la synthèse de vitellogénine pour la dose de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$, après seulement 6 jours d'exposition. Les auteurs ont déterminé que la concentration minimale effectrice pour un temps d'exposition était $40 \mu\text{g.L}^{-1}$. Van den Belt et al. (2003) ont observé une induction de

la production de vitellogénine similaire chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*) et la truite arc en ciel pour une concentration en bisphénol A de 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (trois semaines d'exposition). Une étude d'exposition chronique (43-164 jours d'exposition) réalisée sur le tête de boule (*Pimephales promelas*) a montré la capacité du bisphénol A à altérer le cycle de reproduction de ce poisson (Sohoni et al., 2001). Les mâles exposés à 16 $\mu\text{g.L}^{-1}$ durant 164 jours présentaient des troubles de la spermatogenèse et dès 640 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (également durant 164 jours), l'indice gonado-somatique de ces individus était significativement réduit. En outre, à cette dernière concentration, une baisse significative du taux d'éclosion des œufs était observable.

Enfin, une action du bisphénol A sur les enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse chez les organismes aquatiques n'est pas à exclure. En effet, Hanioka et al. (2000) ont démontré (*in vitro*, sur des microsomes hépatiques de rat) l'inhibition par le bisphénol A d'enzymes telles que la testostérone 16 β -hydroxylase ou la testostérone 16 α -hydroxylase.

4.2.8. Alkylphénols polyéthoxylates et alkylphénols

Les alkylphénols polyéthoxylates (APE) sont utilisés, entre autres applications, pour la fabrication de résines phénoliques ou d'élastomères, le traitement de la laine et le recyclage du papier ; ils entrent dans la formulation de nombreux produits à usage industriel ou domestique, en tant qu'émulsifiants, agents dispersants ou détergents. La production mondiale de ces composés est voisine de 400000 tonnes (Lintelmann et al., 2003). La structure de ces composés (figure 1.12), comprenant une partie hydrophobe (alkylphénol) et une chaîne plutôt hydrophile constituée de 1 à 100 motifs éthoxylates, est responsable de leurs propriétés tensioactives. Le groupement alkyle (substitution en position para) est généralement constitué de chaînes nonyl, octyl ou dodécyl ramifiées, les nonylphénols polyéthoxylates représentant environ 80% de la production.

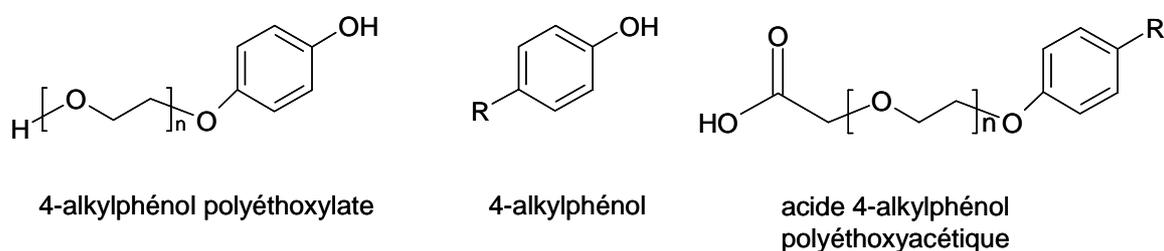


Figure 1.12. Structure des alkylphénols polyéthoxylates, des alkylphénols et des alkylphénols carboxylates.

La toxicité des APE croît avec la longueur de la chaîne hydrophobe tandis qu'elle est inversement proportionnelle au nombre de motifs éthoxylates présents dans la chaîne

hydrophile. Ainsi, la DL50 (dose entraînant la mort de 50% des individus exposés) déterminée pour le médaka *Oryzias latipes* est de 110 mg.L⁻¹ pour le 4-nonylphénol 16-éthoxylate (NP16EO), tandis qu'elle est respectivement de 11,2 mg.L⁻¹ et 1,4 mg.L⁻¹ pour le 4-nonylphénol 9-éthoxylate et le 4-nonylphénol (données toxicologiques revues par Lintelmann et al., 2003).

Lors du traitement des eaux usées par les STEP, les APE sont dégradés en métabolites toxiques comme le 4-nonylphénol, ou le 4-nonylphénol mono-éthoxylate. Ces produits de dégradation sont relativement hydrophobes (logK_{ow} 3,9-6,0) et possèdent une activité œstrogénique assez élevée, contrairement aux APE commerciaux. Lintelmann et al. (2003) ont compilé les différents dosages de composés alkylphénoliques publiés dans la littérature. A titre d'exemple, on pourra citer les résultats obtenus en Allemagne dans le cadre de l'étude de 65 rivières. Il apparaît que le 4-nonylphénol est présent dans 50 % des rivières étudiées (concentration maximale (C_m): 2,7 µg.L⁻¹), l'octylphénol est présent dans 12 % des eaux testées (C_m : 0,3 µg.L⁻¹), tandis que le 4-nonylphénol 1-éthoxylate et le 4-nonylphénol 2-éthoxylate sont détectés dans, respectivement, 40% des échantillons (C_m : 3,3 µg.L⁻¹) et 5% des échantillons (C_m : 0,8 µg.L⁻¹). Dans le cadre des mêmes travaux, le 4-nonylphénol a été détecté dans les sédiments des rivières étudiées (concentration médiane 2,51 mg.kg⁻¹) ; le 4-nonylphénol monoéthoxylate et le 4-nonylphénol diéthoxylate ont également été détectés dans le sédiment, mais à des niveaux 10 à 20 fois plus faibles. Le 4-nonylphénol présente donc une tendance très prononcée à l'adsorption ; une fois incorporé au milieu sédimentaire, ce composé est très résistant à la dégradation (notamment bactérienne), puisque son temps de demi-vie est de l'ordre de 60 ans.

White et al. (1994) ont déterminé la capacité de différents alkylphénols et alkylphénols éthoxylates à induire *in vitro* la synthèse de vitellogénine par des hépatocytes de truite arc en ciel. Tous les composés testés se sont avérés être œstrogéniques, mais 10⁻⁶ à 10⁻⁴ fois moins que le 17β-œstradiol. Ces résultats ont été confirmés *in vivo*, toujours sur la truite arc en ciel, par Jobling et al. (1996). Ces auteurs ont cependant observé que, à concentration égale, les effets de ces composés étaient deux fois plus élevés *in vivo* que *in vitro*. Ils ont classés les composés testés par ordre décroissant de potentiel œstrogénique : octylphénol > 4-nonylphénol > 4-nonylphénol 2-éthoxylate > acide 4-nonylphénol éthoxyacétique. Toujours d'après Jobling et al. (1996), la concentration minimale de 4-nonylphénol effectrice chez la truite arc en ciel est de 30 µg.L⁻¹ (3 semaines d'exposition, en utilisant la vitellogénine comme biomarqueur).

L'action du nonylphénol sur la balance hormonale a été déterminée chez plusieurs espèces de poissons. Schwaiger et al. (2002) et Giesy et al. (2000) ont observé une augmentation des niveaux plasmatiques de 17β-œstradiol chez, respectivement, *Oncorhynchus mykiss* et *Pimephales promelas* exposés à une concentration en nonylphénol

inférieure à $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (durée d'exposition supérieure à un mois). Des anomalies du développement testiculaire chez des poissons exposés à divers alkylphénols ont été rapportées : réduction de l'indice gonado-somatique (Jobling et al., 1996), ovo-testis (Gray et Metcalfe, 1997) ou blocage de la spermatogenèse (Kinnberg et al., 2003). Enfin, Matozzo et Marin (2004) ont également montré que le 4-nonylphénol pouvait induire la production d'une protéine analogue à la vitellogénine chez des individus mâles de *Tapes philippinarum* (mollusque bivalve).

4.2.9. Phytoœstrogènes

Les phytoœstrogènes sont, comme l'indique leur nom, des substances d'origine naturelle possédant une activité œstrogénique. Ces composés peuvent être répartis en trois classes : les lignanes, les coumestanes et les isoflavones. Un des principaux points communs de ces substances est leur analogie structurale avec les œstrogènes (notamment le 17β -œstradiol) (figure 1.13). Les lignanes, tels le (-)-matairesinol ou le (-)-sécoisolaricirésinol, sont présents en abondance dans les céréales, les fruits, les légumes et les algues marines ($1\text{-}10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Le coumestrol (principal coumestane) est présent dans les germes de plusieurs végétaux (luzerne, soja, trèfle, haricots...) à des niveaux encore plus élevés que les lignanes ($14\text{-}280 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Les isoflavones sont également contenues dans de nombreux aliments, les plus fortes concentrations étant décelées dans le soja (environ $200 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Ward et al., 2001).

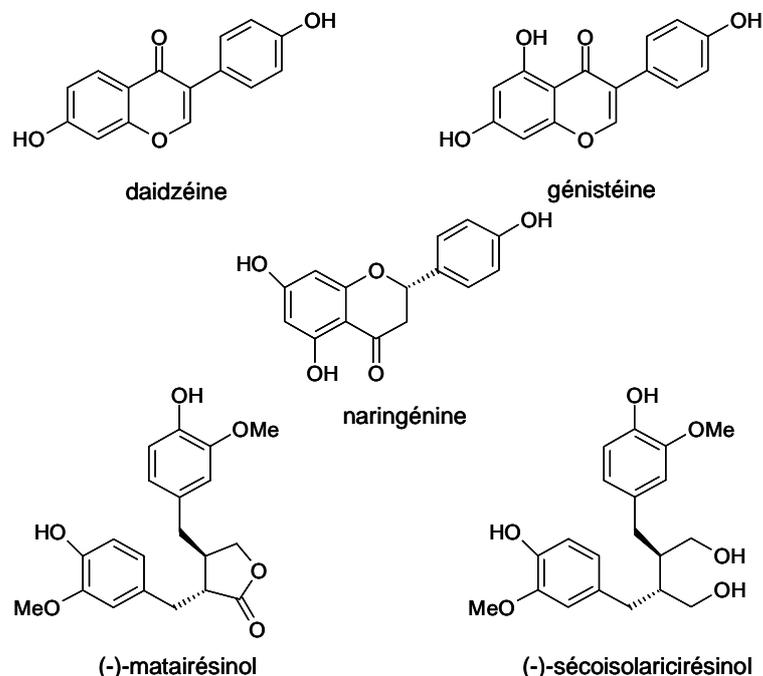


Figure 1.13. Structures de quelques phytoœstrogènes.

Des mesures *in vitro* ont montré que de nombreux phytoœstrogènes étaient capables de se lier de manière agoniste au récepteur aux œstrogènes. Les isoflavones sont les

composés dont l'affinité pour ce type de récepteur nucléaire est la plus élevée, environ 10^{-4} à 10^{-3} celle du 17β -œstradiol. Lorsque ces composés sont présents en grande quantité dans le régime alimentaire, des troubles sévères du système endocrinien et de la reproduction peuvent se manifester. Ainsi, un exemple marquant est celui de la stérilité de brebis australiennes nourries avec une variété spéciale de trèfle, très riche en isoflavones (Lintelmann et al., 2003).

Les concentrations de plusieurs flavones et isoflavones ont été déterminées dans des rivières allemandes : les niveaux de naringénine et de daidzéine étaient inférieurs à 17 ng.L^{-1} alors que ceux de génistéine étaient compris entre 400 et 1300 ng.L^{-1} . Les effets sur les poissons sont cependant observés à des concentrations nettement plus élevées : chez le *Danio rerio*, des altérations du système reproductif sont détectées à partir de $4,2 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ (Lintelmann et al., 2003).

Le β -sitostérol, autre composé d'origine végétale présent dans le bois ainsi que dans certains légumes et certaines huiles, possède une activité xénohormonale. Le β -sitostérol, dont la structure est très proche de celle du cholestérol (figure 1.14), est un des principaux stérols dans les effluents de papeterie ; la concentration médiane mesurée dans 53 effluents en Allemagne était de 519 ng.L^{-1} (Lintelmann et al., 2003). Ce composé est capable d'induire la production de vitellogénine chez des poissons mâles et de provoquer des réponses de type œstrogéniques sur des cellules MCF-7 et T47D (Mellanen et al., 1996 ; Tremblay et Van der Kraak, 1999). Le β -sitostérol a la capacité (pour une concentration supérieure à $75 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$) d'altérer la stéroïdogénèse chez des cyprinidés, sans doute en raison de l'inhibition de l'enzyme du cytochrome P450 catalysant la rupture de la chaîne latérale du cholestérol (P450ccl). Il en résulte une chute des taux plasmatiques de stéroïdes, notamment ceux de la testostérone (Tremblay et Van der Kraak, 1999 ; MacLatchy et al., 1997).

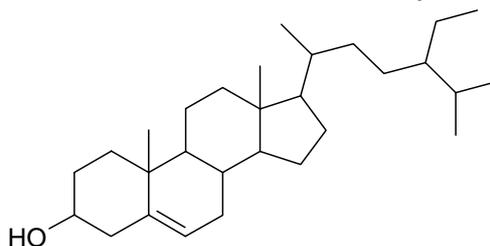


Figure 1.14. Structure du β -sitostérol.

Au cours du traitement des eaux usées, le β -sitostérol peut être transformé en androgènes. Ce stérol est d'ailleurs employé comme substrat dans le cadre de la production d'androgènes (notamment en androstènedione) à l'aide de mycobactéries (Lintelmann et al., 2003). Jenkins et al. (2001) ont détecté la présence d'androstènedione dans l'eau d'une rivière, en aval d'un rejet d'effluent de papeterie. Ils ont attribué la présence de ce composé à la dégradation bactérienne de stérols, dont le β -sitostérol. Ils ont, en outre, observé des

phénomènes de masculinisation chez des gambusies (*Gambusia holbrooki*) vivant dans ce cours d'eau, ainsi qu'une activité androgénique *in vitro*.

4.2.10. Stéroïdes hormonaux

4.2.10.1. Stéroïdes naturels

Œstrogènes, progestagènes et androgènes sont produits, en proportions variables suivant le sexe, par les individus mâles et femelles de nombreux organismes, notamment l'homme. Le schéma de la stéroïdogénèse chez les êtres humains est très proche de celui observé chez les poissons (figure 1.2). Les hormones stéroïdiennes sont des composés modérément lipophiles ($\log K_{ow}$: 2,5-4,0) qui sont principalement excrétés sous forme conjuguée (glucuronide ou sulfate), plus hydrosoluble. Le tableau 1.2 présente les quantités d'œstrogènes excrétés via l'urine par l'homme et la femme à différents états sexuels. Dans cette matrice, D'Ascenzo et al. (2002) ont détecté les œstrogènes uniquement sous leurs formes conjuguées (environ 80% de glucuronides et 20% de sulfates).

($\mu\text{g}\cdot\text{jour}^{-1}$)	femme pré-ménopause	femme post-ménopause	femme enceinte	homme
2-hydroxyœstrone	11,5	8,5	670	4,9
œstrone	8,0	4,0	600	3,9
œstriol	4,8	1,0	19980	1,5
2-hydroxy-17 β -œstradiol	3,6	0,7	82	0,6
17 β -œstradiol	3,0	2,3	259	1,5
4-hydroxyœstrone	2,5	2,0	-	0,9
16- hydroxyœstrone	2,2	0,6	3650	1,2
Total	35,6	19,1	25241	14,5

Tableau 1.2. Excrétion des œstrogènes chez l'homme ($\mu\text{g}/\text{jour}$) (Turan, 1995).

Lors du transit des stéroïdes au sein du réseau de transport des eaux usées, une hydrolyse partielle des formes conjuguées a lieu, avec une dégradation conséquente des glucuronides par les bactéries fécales ; le rapport sulfate/glucuronide est ainsi doublé par rapport au rapport observé dans l'urine (D'Ascenzo et al., 2002). Au cours du traitement en

STEP, la quasi-totalité des glucuronides est hydrolysée ; les sulfates sont en revanche nettement moins bien dégradés (seulement 64% pour l'œstrone-3-sulfate ; D'Ascenzo et al., 2002). Les œstrogènes naturels ainsi formés sont ensuite relativement bien éliminés lors du traitement des eaux usées, avec des taux d'élimination supérieurs à 90 % pour le 17 β -œstradiol et l'œstriol, et voisins de 60% pour l'œstrone (Lintelmann et al., 2003). Dans le cas du 17 β -œstradiol, on a d'abord une oxydation en œstrone suivie d'une oxydation et d'une minéralisation – partielle – de ce dernier composé. Tout ceci peut expliquer pourquoi Baronti et al. (2000) ont observé dans 13% de leurs échantillons, des niveaux d'œstrone dans l'effluent traité supérieurs à ceux de l'effluent brut. Une fraction importante de l'élimination des œstrogènes est toutefois due à des phénomènes d'adsorption sur les boues activées employées au sein des stations d'épuration ; environ 60 % des œstrogènes sont en effet adsorbés sur ces particules en suspension. Cependant, moins de 2% des stéroïdes sont éliminés via les boues, puisque la dégradation de ces composés adsorbés est rapide par rapport au temps de séjour des particules dans la STEP (Andersen et al., 2004).

Les concentrations mesurées dans les effluents sont très variables. Pour une même STEP, des variations d'un facteur 10 sont parfois observées entre deux prélèvements réalisés à 24 heures d'intervalle (Williams et al., 2003). Les concentrations mesurées dans la phase dissoute sont dans la gamme <0,5-50 ng.L⁻¹, et sont le plus souvent inférieures à 10 ng.L⁻¹ (Lintelmann et al., 2003). Parmi les œstrogènes les plus étudiés, on observe généralement l'ordre suivant : [œstrone] >> [17 β -œstradiol] \approx [œstriol].

Dans la plupart des eaux de rivière, les œstrogènes ne sont pas détectés par les méthodes de dosage communément employées (enrichissement par extraction sur phase solide puis analyse par chromatographie (phase gazeuse ou liquide) couplée à la spectrométrie de masse). Lorsque ces composés sont détectés, les niveaux observés sont généralement inférieurs à 10 ng.L⁻¹, et sont le plus souvent de l'ordre du ng.L⁻¹. Etant donné les faibles quantités de matière en suspension dans ces eaux (quelques mg.L⁻¹), la fraction particulaire des œstrogènes est estimée à moins de 1% de la quantité totale présente dans la colonne d'eau ($C_{\text{particulaire}} < 1 \text{ ng.g}^{-1}$) et ce, malgré le caractère modérément hydrophobe de ces composés (Holthaus et al., 2002). Les œstrogènes sont peu persistants dans les milieux naturels, avec des temps de demi-vie de l'ordre de quelques jours ; photolyse et activité bactérienne sont responsables de cette rapide dégradation (Jürgens et al., 2002). Enfin, certains conjugués, notamment des sulfates, plus résistants à la dégradation microbienne, ont été détectés dans des effluents de station d'épuration (D'Ascenzo et al., 2002 ; Tilton et al., 2002) et dans des eaux de rivières (Isobe et al., 2003).

Les déjections animales constituent une autre source non négligeable de stéroïdes dans l'environnement. Leur présence a été déterminée dans l'urine et les excréments de porcs (200-4700 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), de volailles (3-900 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) et de bovins (300-900 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) (revue par

Hanselman et al., 2003). L'épandage de ces produits dans le cadre d'applications agricoles est susceptible de contaminer les sols traités et éventuellement la nappe phréatique ou les cours d'eau avoisinants. Bien que plusieurs études aient montré que la mobilité des stéroïdes dans les sols était extrêmement réduite (Casey et al., 2003 ; Colucci et Topp, 2001), d'autres études ont observé la présence d'œstrogènes dans des cours d'eau et des nappes phréatiques contaminées par le lessivage de sols amendés avec des excréments d'origine agricole (bonne corrélation avec la présence de bactéries fécales telles que *Escherichia coli*). Les résultats (revus par Hanselman et al., 2003) indiquent une présence d'œstrogènes naturels à des niveaux de l'ordre du ng.L^{-1} (<1-40 ng.L^{-1}).

Enfin, peu d'études ont concerné la progestérone, bien que ce stéroïde soit produit en grandes quantités par la femme (3-30 mg/jour). Aux Etats-Unis, Vanderford et al. (2003) l'ont cependant détecté dans les eaux de rivières impactées par des rejets de STEP (14-44 ng.L^{-1}), mais leurs résultats sont discutables en raison de mauvais blancs analytiques (niveau moyen de progestérone dans les blancs : 217 ng.L^{-1}).

4.2.10.2 Stéroïdes synthétiques

Ce groupe de médicaments (figure 1.15) regroupe essentiellement des contraceptifs oraux (hormones inhibant l'ovulation) et des stéroïdes employés dans les thérapies de substitution hormonale (traitement de la ménopause). Les autres usages de ces composés, tel le traitement du cancer du sein, sont négligeables – en terme de quantités consommées – par rapport aux applications précédemment citées. Les hormones naturelles comme la progestérone ou le 17β -œstradiol ne sont pas adaptées aux applications orales, du moins dans les formulations microdosées. Ces composés sont, en effet, rapidement métabolisés (hydroxylés et conjugués) puis excrétés. L'alkylation ou l'éthynylation de ces hormones ralentit leur métabolisation et modifie considérablement leurs propriétés pharmacocinétiques. Ainsi, dans le plasma humain, la demi-vie du 17α -éthynylœstradiol est de 30 h, alors que celle du 17β -œstradiol est inférieure à 1h (Bolt, 1979). Les principaux œstrogènes de synthèse sont le 17α -éthynylœstradiol et le mestranol, alors que les principaux progestagènes de synthèse sont le lévonorgestrel et la noréthindrone (figure 1.15). La posologie courante de ces substances est la suivante : 30-50 $\mu\text{g/jour}$ de 17α -éthynylœstradiol en association avec 150-1000 $\mu\text{g/jour}$ de progestagène synthétique (Lintelmann et al., 2003).

Le diéthylstilbestrol est un autre œstrogène synthétique, dont l'usage en santé humaine (prévention des fausses couches) n'est plus autorisé en raison de ses effets secondaires : cancer du vagin chez les filles des mères traitées au diéthylstilbestrol, altération de la qualité du sperme chez les fils... Cette substance est cependant encore utilisée illégalement par

certaines éleveurs de bovins, comme hormone de croissance ; elle a ainsi été détectée en Catalogne, dans une rivière irrigant une zone agricole (Petrovic et al., 2002).

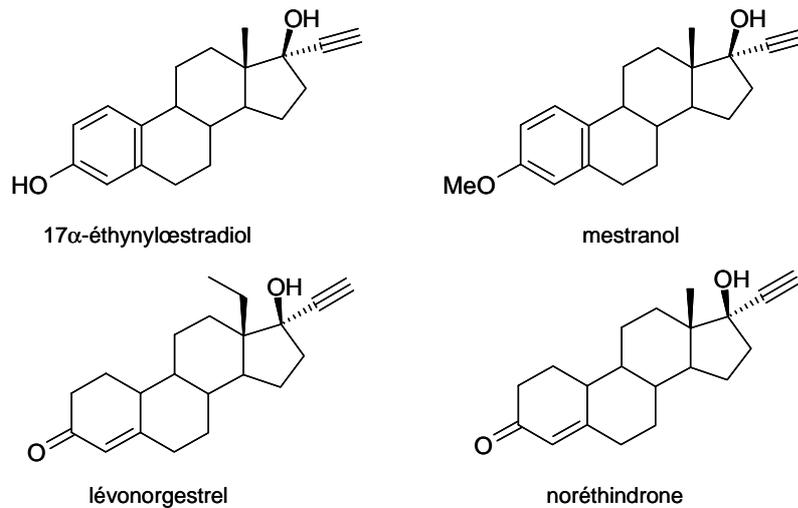


Figure 1.15. Structures des principaux stéroïdes de synthèse employés dans les traitements œstroprogestatifs.

In vivo, le 17α-éthynylœstradiol est métabolisé par dé-éthynylation et hydroxylation, puis conjugué. On trouve cependant une proportion importante (environ 40%) de 17α-éthynylœstradiol non métabolisé dans l'urine (Johnson et Williams, 2004). Le mestranol, quant à lui, est rapidement hydrolysé en 17α-éthynylœstradiol après son absorption. Les progestagènes synthétiques sont rapidement métabolisés par réduction du cycle A (porteur de la fonction cétone) et hydroxylation (Ranney, 1977). Les métabolites de la noréthindrone (figure 1.16) peuvent se comporter comme des agonistes du récepteur aux œstrogènes (type α ; Larrea et al., 2001) et peuvent ainsi potentiellement contribuer à l'œstrogénicité des effluents de station d'épuration.

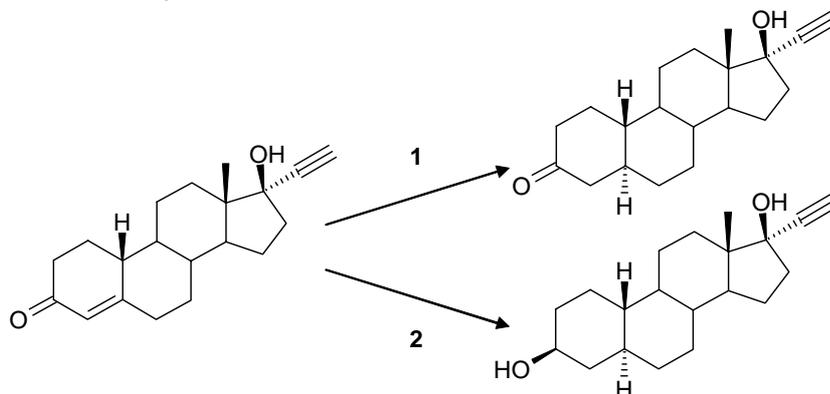


Figure 1.16. Métabolisme de la noréthindrone (d'après Larrea et al., 1977). Voie 1 : formation de 5α-dihydronoréthindrone ; voie 2 : formation de 3β-5α-tétrahydronoréthindrone.

Bien que les stéroïdes synthétiques soient généralement légèrement plus hydrophobes que les stéroïdes naturels ($\log K_{ow} = 3,94$ pour le 17β -œstradiol et $\log K_{ow} = 4,15$ pour le 17α -éthynylœstradiol), leurs propriétés physico-chimiques (adsorption, volatilisation, photodégradabilité) sont cependant très similaires. L'élimination du 17α -éthynylœstradiol lors du traitement des eaux usées est du même ordre de grandeur que celle du 17β -œstradiol (environ 90%) (Johnson et Williams, 2004 ; Shi et al, 2004). Les progestagènes synthétiques sont également rapidement dégradés (90% en 72h) au contact de boues activées (Turan, 1995).

La présence de stéroïdes synthétiques dans l'environnement aquatique a été largement documentée. Dans la majorité des effluents de STEP, les niveaux de 17α -éthynylœstradiol sont inférieurs aux limites de détection des procédures mises en œuvre ($0,3-1 \text{ ng.L}^{-1}$, suivant les études). Cet œstrogène a toutefois été détecté dans certains effluents, le plus souvent à des niveaux inférieurs à 5 ng.L^{-1} , ainsi que dans certains cours d'eau, à des concentrations comprises entre $0,4$ et 15 ng.L^{-1} (Lintelmann et al., 2003). La présence de mestranol a été moins étudiée ; les rares travaux incluant ce stéroïde font état de niveaux compris entre 10 et 45 ng.L^{-1} . Des tests de biodégradation menés en laboratoire par Jürgens et al. (2002) ont montré que le temps de demi-vie du 17α -éthynylœstradiol dans une eau de rivière était environ 14 fois supérieur à celui du 17β -œstradiol (17 jours contre 1,2 jour), tandis que celui du mestranol est beaucoup plus court (<24 heures, d'après Ternes et al., 1999) car ce composé est rapidement déméthylé en 17α -éthynylœstradiol.

4.2.11. Importance des hormones stéroïdiennes dans les phénomènes de féminisation observés chez les poissons.

Plusieurs études ont démontré l'implication des composés présents dans les effluents de station d'épuration dans les phénomènes de féminisation observés chez certains poissons. Bien que présents à l'état de traces (ng.L^{-1}) dans les effluents et les cours d'eau impactés par ces effluents, les œstrogènes naturels et synthétiques sont souvent, dans ces milieux, les composés les plus actifs sur le plan hormonal.

Körner et al. (2001) ont déterminé les concentrations en xénoœstrogènes dans les effluents de 18 stations d'épuration allemandes, et ont trouvé les concentrations médianes suivantes : $0,4-1,6 \text{ ng.L}^{-1}$ pour l'œstrone, le 17β -œstradiol et le 17α -éthynylœstradiol, contre $300-600 \text{ ng.L}^{-1}$ pour le 4-nonylphénol, le 4-nonylphénol diéthoxylate, le dibutylphthalate et le β -sitostérol. Ils ont parallèlement évalué les contributions relatives de ces différents

composés à l'œstrogénicité globale des effluents : les trois œstrogènes majoritaires représentaient plus de 90 % de l'activité observée *in vitro* (prolifération œstrogéno-dépendante de cellules MCF-7). Desbrow et al. (1998) et Aerni et al. (2004) ont publié des résultats similaires. Les premiers ont montré que les trois œstrogènes précédemment cités avaient une contribution supérieure à 80% dans l'œstrogénicité totale de l'effluent, alors que les seconds ont montré que cette contribution (en y ajoutant celle de l'œstriol) était de l'ordre de 99% (le 1% restant étant dû aux composés alkylphénoliques).

Petrovic et al. (2002) ont étudié l'induction de la synthèse de vitellogénine chez des carpes mâles *Cyprinus carpio* prélevées sur des sites impactés par des effluents de station d'épuration. Ils ont observé une corrélation entre les concentrations d'œstrone et d'œstriol (6,3-8,0 ng.L⁻¹) dans la phase dissoute de l'eau des rivières étudiées et la concentration en vitellogénine plasmatique des carpes prélevées. On pourra noter qu'une corrélation a également été observée avec les composés alkylphénoliques, ces derniers étant cependant présents à des niveaux environ 1000 à 10000 fois plus élevés (somme des concentrations des composés alkylphénoliques comprise entre 10 et 90 µg.L⁻¹).

Ces différentes observations s'expliquent par le fait que les œstrogènes (naturels ou synthétiques) sont actifs à des concentrations extrêmement faibles, de l'ordre du ng.L⁻¹. Purdom et al. (1994) ont montré qu'une concentration de 17 α -éthynylœstradiol (nominale) de 0,1 ng.L⁻¹ induisait de manière significative la synthèse de vitellogénine chez des truites immatures exposées durant 10 jours. En outre, ces mêmes auteurs ont également montré qu'une exposition à 1 ng.L⁻¹ était suffisante pour générer une réponse de même amplitude que celle observée chez des poissons placés en cage en aval de rejets de station d'épuration. Routledge et al. (1998), en conduisant une étude similaire, ont estimé qu'une concentration d'œstrone ou de 17 β -œstradiol inférieure à 10 ng.L⁻¹ induisait le même type d'effet. Metcalfe et al. (2001) ont comparé le pouvoir œstrogénique de différents xénobiotiques sur des médakas exposés durant 100 jours après éclosion (tableau 1.3), en étudiant l'apparition d'ovocytes testiculaires. Ils ont ainsi montré que les œstrogènes étaient actifs à des concentrations de l'ordre du ng.L⁻¹, contrairement aux autres principaux œstrogènes environnementaux.

L'effet des œstrogènes peut être d'autant plus important que leurs effets *in vivo* sont additifs (Thorpe et al., 2003). En outre, dans de nombreuses études, les limites de détection du 17 α -éthynylœstradiol sont plus élevées que les concentrations minimales n'entraînant pas d'effet observable, d'où l'impossibilité de conclure quant aux risques potentiels de perturbation endocrinienne.

Composé	CMEO ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		CMNEO ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
	C nominale	C moyenne	C nominale	C moyenne
17 β -œstradiol	0,01	0,004	0,001	0,0004
17 α -éthynylœstradiol	0,0001	0,00003	<0,0001	<0,00003
œstrone	0,01	0,008	<0,01	<0,008
œstriol	1	0,75	0,1	0,075
nonylphénol mono-éthoxylate	100	31/47	50	15,5/23,5
nonylphénol di-éthoxylate				
nonylphénol mono-carboxylate				
nonylphénol di-carboxylate				
	<i>Pas de réponse à la concentration maximale ($40 \mu\text{g.L}^{-1}$)</i>			
bisphénol A	10	5,9	<10	<5,9
diéthylphtalate	<i>Pas de réponse à la concentration maximale ($5000 \mu\text{g.L}^{-1}$)</i>			

Tableau 1.3. Comparaison du pouvoir œstrogénique de différentes xénohormones sur le médaka mâle (*Oryzias latipes*) – effet observé : ovo-testis chez au moins un individu). CMEO : Concentration Minimale entraînant un Effet Observable ; CMNEO : Concentration Minimale N'entraînant pas d'Effet Observable (Metcalf et al., 2001).

5. BUTS DE L'ETUDE

L'objectif initial de ces travaux a été le développement de procédures analytiques pour la détermination des stéroïdes hormonaux (naturels et synthétiques, 18 au total) dans diverses matrices, biologiques et non biologiques. Ces méthodes, optimisées et validées, ont ensuite été appliquées à des problématiques environnementales, selon deux axes principaux :

- Etude des stéroïdes hormonaux en tant que contaminants des écosystèmes aquatiques. Ceci avait initialement pour but de documenter la présence éventuelle de stéroïdes dans les estuaires et cours d'eau français, qui n'avait fait l'objet d'aucune publication lorsque les présents travaux ont démarré. L'étude a ainsi été focalisée sur deux sites. Tout d'abord, une évaluation de la contamination de l'estuaire de la Seine par ces composés a été réalisée (suivi annuel), dans le cadre du programme multidisciplinaire Seine Aval. Ensuite, la variation saisonnière des gradients de concentration des stéroïdes hormonaux le long de la Jalle d'Eysines a été étudiée, afin de mieux comprendre les cycles biogéochimiques de ces substances. Ce cours d'eau est un petit affluent de la Garonne,

fortement impacté par le rejet de la station d'épuration d'Eysines (banlieue nord de Bordeaux). Ces études ont été conduites sur cinq œstrogènes (naturels : œstrone, 17β -œstradiol, œstriol ; synthétiques : 17α -éthynylœstradiol et mestranol) ainsi que sur trois progestagènes (naturel : progestérone ; synthétiques : lévonorgestrel et noréthindrone), issus du métabolisme hormonal naturel ou de traitements hormonaux.

- Etude des phénomènes de perturbation endocrinienne chez le turbot juvénile (*Psetta maxima*). L'impact de différents contaminants sur le métabolisme des hormones stéroïdiennes de ce poisson a été étudié au moyen de plusieurs séries d'expérimentations en milieu contrôlé (microcosmes). La plupart des études s'intéressant aux stéroïdes hormonaux se limitent souvent au dosage plasmatique de un à trois composés (17β -œstradiol, testostérone ou 11-cétotestostérone). Les méthodes analytiques développées durant ces travaux de thèse ont permis l'étude de 14 stéroïdes endogènes dans trois matrices : les gonades (principal organe de la stéroïdogénèse), le plasma (fluide transportant les hormones vers les organes cibles) et la bile (réceptacle des métabolites issus du métabolisme hépatique).

En outre, on peut inclure dans ce volet de la thèse l'étude des variations saisonnières de stéroïdes hormonaux endogènes chez le flet (*Platichthys flesus*) et la moule (*Mytilus edulis*). Ces deux espèces sont couramment utilisées comme organismes sentinelles en écotoxicologie, notamment en raison de leur répartition géographique et de leur abondance. L'étude réalisée visait à documenter les variations saisonnières naturelles des hormones endogènes chez l'une et l'autre espèce pour, éventuellement, pouvoir utiliser le métabolisme des stéroïdes sexuels comme marqueur d'exposition de ces organismes à des xénohormones.

CHAPITRE 2

Matériels et méthodes

Ce chapitre recense les techniques employées pour l'étude des stéroïdes hormonaux dans les matrices environnementales sélectionnées. Les sites et la méthodologie d'échantillonnage, ainsi que les procédures analytiques développées (préparation des échantillons et analyse), sont décrits.

1. COMPOSES ETUDIES

1.1. Hormones naturelles

Nom usuel	N° CAS	abréviation
17 β -œstradiol	50-28-2	E2
œstrone	53-16-7	E1
œstriol	50-27-1	E3
androstènedione	63-05-8	A
testostérone	58-22-0	T
5-dihydrotestostérone	521-18-6	DHT
5-dihydroandrostènedione	846-46-8	DHA
déhydroépiandrostérone	53-43-0	DHEA
11-cétotestostérone	564-35-2	11-cT
progestérone	57-83-0	Pg
pregnénolone	145-13-1	Pn
17 α -hydroxypregnénolone	387-79-1	OHPn
17 α -hydroxyprogestérone	200-699-4	OHPg
17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogestérone	1662-06-2	DHP

Tableau 2.1. Stéroïdes hormonaux étudiés en tant qu'hormones endogènes.

Quatorze stéroïdes naturels ont été étudiés chez les différents organismes considérés dans ces travaux (poissons, moules) (tableau 2.1). Ces composés, représentatifs du métabolisme des hormones endogènes chez ces espèces, ont été fournis par Sigma-Aldrich (S^t Quentin Fallavier, France) ; leurs formules développées sont présentées dans la figure 1.1 (synthèse bibliographique).

1.2. Hormones naturelles et synthétiques considérées comme contaminants potentiels des systèmes aquatiques

Cinq œstrogènes (trois naturels et deux synthétiques), ainsi que trois progestagènes (un naturel et deux synthétiques) ont été étudiés dans le cadre de ces travaux (tableau 2.2 ; formules développées présentées figure 1.15). Ces stéroïdes sont représentatifs du métabolisme naturel des œstrogènes et des progestagènes, ainsi que des principaux principes actifs employés dans les traitements hormonaux (ménopause, contraception...). Tous les étalons ont été fournis par Sigma-Aldrich.

Nom usuel	origine	N° CAS	abréviation
17 β -œstradiol	naturelle	50-28-2	E2
œstrone	naturelle	53-16-7	E1
œstriol	naturelle	50-27-1	E3
17 α -éthynylœstradiol	synthétique	57-63-6	EE2
mestranol	synthétique	72-33-3	MeEE2
progestérone	naturelle	57-83-0	Pg
noréthindrone	synthétique	797-63-7	No
lévonorgestrel	synthétique	68-22-4	DN

Tableau 2.2. Hormones naturelles et synthétiques considérées comme contaminants potentiels des systèmes aquatiques.

2. ORGANISMES : PRELEVEMENTS ET EXPOSITIONS

2.1. Flets

Dans le cadre du suivi du cycle reproductif des flets de l'estuaire de Seine, des individus de *Platichthys flesus* mâles et femelles ont été capturés par chalutage dans le secteur de Fosse Sud, situé au large de Honfleur (figure 2.1.), de février 2002 à juin 2003. Ces prélèvements ont été réalisés dans le cadre du programme Seine-Aval, en collaboration avec le LEMA (Université du Havre). Des individus ont également été prélevés à deux reprises dans un site « référence » du Programme-Seine Aval (Gallien, 2003): l'estuaire du Ster, situé sur la côte Sud du Finistère (figure 2.2). Ces prélèvements ont été réalisés dans

le cadre d'une collaboration avec le Laboratoire des Ressources Halieutiques et Poissons Marins (Université de Bretagne Occidentale, à Brest).

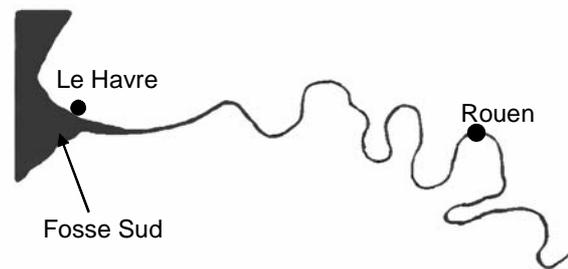


Figure 2.1. Localisation du site de prélèvement des flets dans l'estuaire de Seine.



Figure 2.2. Localisation du site de prélèvement des flets dans le Finistère : estuaire du Ster à Lesconil (source : www.viamichelin.com).

Après anesthésie des poissons par immersion dans une solution aqueuse d'éthylaminobenzoate (1 g.L^{-1} ; Sigma-Aldrich), une prise de sang est réalisée par piqûre dans la veine caudale, au moyen d'une seringue préalablement rincée avec un anticoagulant (héparine $300 \text{ unités.mL}^{-1}$). Le sang prélevé est ensuite placé dans un tube de type Eppendorf rincé à l'héparine et contenant $2\mu\text{L}$ d'aprotinine (inhibiteur d'activité protéase) et stocké à 4°C . Le plasma est obtenu par centrifugation des échantillons de sang (5 min , $5000 \text{ tour.min}^{-1}$, température ambiante), puis conservé à -80°C afin de minimiser l'évolution de sa composition. Les poissons sont ensuite disséqués : la vésicule biliaire et les gonades sont prélevées et placées à -80°C jusqu'à leur analyse. Le sexe des individus est identifié grâce à la morphologie des gonades.

2.2. Moules

Des moules *Mytilus* sp. (présence de *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis* et d'hybrides, d'après Lubet, 1959) ont été prélevées au lieu-dit « jetée de la Chapelle », situé à Arcachon (figure 2.3). Ce site subit une forte influence océanique puisque la salinité moyenne observée est de 32 ‰ (31-34 ‰). Des prélèvements d'une soixante de moules ont été réalisés à intervalles réguliers (1-2 mois) de mai 2002 à mai 2004. Le sexe des individus prélevés a été déterminé par observation microscopique d'un broyat du manteau (gonade diffuse).

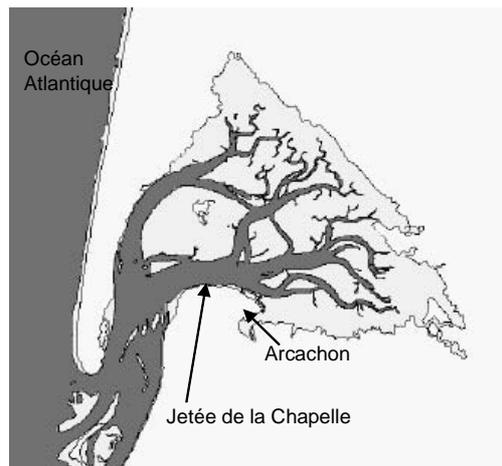


Figure 2.3. Site de prélèvement de *Mytilus* sp. (Source : Ifremer Arcachon).

Pour chaque échantillonnage, les glandes digestives de 6 individus de chaque sexe ont été prélevées pour le dosage des hormones stéroïdiennes endogènes, puis broyées (2 min à 6000 tour.min⁻¹, à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turrax T25 (Ika Werke, Staufen, Allemagne)) dans 27 mL d'un mélange méthanol/eau (55 : 45, v/v) et conservées à -20°C jusqu'à leur analyse. Six individus entiers (par sexe) ont également été prélevés pour l'estimation du taux de lipides, corrélé chez ce mollusque avec le cycle de reproduction (Lubet, 1959). Cette estimation a été réalisée de la manière suivante :

- extraction assistée par micro-ondes (20W, 10 min) sur environ 400 mg de tissus lyophilisés et en utilisant 10 mL de dichlorométhane.
 - filtration des extraits sur coton et transvasement dans un flacon taré.
 - évaporation à sec des extraits sous flux d'azote (chauffage 50°C).
 - pesée des résidus secs et calcul du taux de lipides, par rapport à la masse sèche.
- La variabilité de cette analyse est inférieure à 1% (n=3).

2.3. Turbots

2.3.1. Individus utilisés

Des expositions à différents composés ont été conduites en milieu contrôlé sur des turbots juvéniles (*Psetta maxima* ou *Scophthalmus maximus*, sexuellement immatures) âgés de 6 à 8 mois. Ces individus provenaient d'établissements piscicoles : ferme aquacole de l'île de Ré (Loix en Ré, France) ou RF Rogaland Research (Stavanger, Norvège).

2.3.2. Expositions en milieu contrôlé

Trois séries d'exposition ont été conduites en laboratoire, les deux premières dans les installations du centre de recherche RF Rogaland Research (Stavanger, Norvège), et la troisième dans les locaux du LPTC :

- 1^{ère} série : exposition durant trois semaines au nonylphénol (85% d'isomères substitués en *para*, concentration effective 29 $\mu\text{g.L}^{-1}$), au pétrole de mer du Nord (gisement Staffjord B ; 515 $\mu\text{g.L}^{-1}$) et à ce pétrole en association avec un mélange technique d'alkylphénols (respectivement 484 et 140 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Température de l'eau : 10-12°C; photopériode: 10 h de lumière/14h d'obscurité ; environ 300 individus par bac.

- 2^{ème} série : exposition durant trois semaines au bisphénol A (59,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$), au diallylphtalate (38,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$) et au tétrabromodiphényléther 47 (0,23 $\mu\text{g.L}^{-1}$) ; environ 300 individus par bac. Température de l'eau : 10-12°C; photopériode: 10h de lumière/14h d'obscurité ; environ 300 individus par bac.

- 3^{ème} série : exposition durant 15 jours au 17 α -éthynylœstradiol (3,5 et 75 ng.L^{-1}); 50 individus par bac (100L); température régulée à 16°C; photopériode: 10h de lumière/14h d'obscurité.

Les expositions réalisées en Norvège ont été conduites en utilisant un flux continu de contaminants, dispersés (cas du pétrole) ou dissous dans de l'eau de mer naturelle (solvant : acétone); le flux de contaminants était contrôlé par des vannes hautes pression. La contamination réalisée au LPTC était en revanche basée sur une exposition en mode semi-statique (solvant : méthanol), avec renouvellement quotidien d'environ 30% du volume d'eau contenu dans les bacs. L'eau utilisée (34‰), était préparée à partir de sel de type Reef Crystals (Red Sea, Verneuil sur Avre, France) et d'eau osmosée obtenue à l'aide d'un système Aquafeeling (Bordeaux, France).

Pour les trois séries, des individus témoins, non exposés aux contaminants, étaient disponibles. Le contrôle des principaux paramètres physico-chimiques attestant de la qualité

de l'eau (nitrites, nitrates, pH, phosphates) a été réalisé au moyen de kits JBL (Neuhofen, Allemagne), tandis que le contrôle de la teneur en oxygène dissous a été assuré par un oxymètre StrathKelvin 781 (StrathKelvin, Glasgow, Royaume-Uni). L'échantillonnage (prise de sang et dissection) a été réalisé de manière analogue à celle décrite pour l'échantillonnage des flets.

3. SITES D'ECHANTILLONNAGE D'EAU

3.1. Estuaire de Seine

Dans le cadre du programme Seine-Aval, de mars à novembre 2002, quatre campagnes de prélèvement d'eau et d'effluents de station d'épuration (STEP) ont été entreprises sur l'estuaire de la Seine, depuis l'embouchure de l'estuaire (Honfleur) jusqu'à la limite de la marée dynamique (barrage de Poses) : Honfleur (1), Tancarville (2, STEP), Caudebec-en-Caux (3), Rouen (4, STEP), Elbeuf (5, STEP) et Poses (6), (figure 2.4 et tableau 2.3).

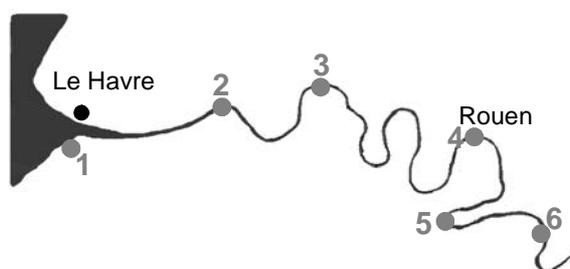


Figure 2.4. Points d'échantillonnage d'eau sur l'estuaire de Seine

Station	Point kilométrique	Date d'échantillonnage	Capacité nominale de la STEP (équivalents habitants)*
Poses	200	mars, mai	-
Caudebec	313	mars, mai	-
Honfleur	355	mars, mai	-
Elbeuf (STEP de S ^t Aubin Les Elbeuf)	220	mars, mai, juillet septembre, novembre	110000
Rouen (STEP)	245	mars, mai, juillet septembre, novembre	450000
Tancarville (STEP)	330	mars, mai, juillet septembre, novembre	non connu

Tableau 2.3. Détails des campagnes d'échantillonnage entreprises en 2002 sur l'estuaire de Seine. * : source : Ministère de l'écologie et du développement durable.

Les échantillons d'eau dite "de surface" ont été prélevés à une profondeur de 0,1 m (approximativement), tandis que les effluents ont été prélevés directement dans le rejet des stations étudiées. Du formaldéhyde 37 % (Sigma-Aldrich) a systématiquement été ajouté aux échantillons, immédiatement après le prélèvement (1%, v/v) et avant stockage à 4°C en bouteille de verre ambré. Des tests ont montré que l'ajout de formaldéhyde ralentissait la dégradation bactérienne des stéroïdes, avec des pertes négligeables pour une semaine de conservation à 4°C (à l'obscurité). Sans formaldéhyde, la dégradation des stéroïdes naturels est rapide (temps de demi-vie compris entre 8 h (progestérone) et 3,6 jours (œstrone)), tandis que celle des stéroïdes synthétiques est négligeable à l'échelle d'une semaine.

3.2. Jalle d'Eysines

Trois campagnes de prélèvement d'eau et d'effluent ont été menées sur la Jalle d'Eysines, en juillet et septembre 2003, ainsi qu'en février 2004. Ce cours d'eau, situé dans la banlieue nord de Bordeaux, est un petit affluent de la Garonne fortement impacté par le rejet de la STEP d'Eysines (station de Cantinolle, 50000 équivalents habitants). Les échantillons ont été prélevés en sept sites répartis le long de la rivière : un point situé environ 2 km en amont du rejet, le rejet lui-même et 5 points en aval du rejet : 30 m, 1 km, 2 km, 4 km et 10 km (figure 2.5). Du formaldéhyde 37 % (concentration finale 1 %, v/v) était ajouté aux échantillons immédiatement après le prélèvement (en bouteille de verre ambré) et avant conservation à 4°C.

Parallèlement aux dosages de stéroïdes hormonaux, les niveaux de bore dissous ont également été déterminés par ICP/MS (annexe 1); cet élément entre dans la composition de nombreuses lessives, en tant qu'azurant optique. Présent sous forme de borate (inerte) dans les effluents de STEP, le bore peut être utilisé comme traceur conservatif pour évaluer la dilution du rejet car la diminution des niveaux de bore dissous est liée à d'éventuels apports d'eau dans le cours d'eau étudié (Neal et al., 1998; Williams et al., 2003).



Figure 2.5. Jalle d'Eysines : sites de prélèvement (1 : site référence ; 2 : rejet ; 3 à 7 : points en aval du rejet).

4. QUANTIFICATION DES STÉROÏDES PAR CG-SM ET CL-SM

Des méthodes d'analyse des stéroïdes par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM) et par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM) ont été développées. Les caractéristiques de ces méthodes sont présentées dans les paragraphes suivants.

4.1. Etalonnage interne

Toutes les analyses ont été réalisées par étalonnage interne. Cette méthode consiste à rajouter, en début de protocole analytique, des composés non présents dans l'échantillon et de structure proche de celle des analytes. Ceci a pour but de s'affranchir des pertes d'analytes intervenant au cours de l'analyse : rinçage incomplet de la verrerie, pertes par volatilisation... Dans le cadre de ces travaux, trois étalons internes deutérés ont principalement été utilisés : le 17 β -œstradiol-*d*4, le 17 α -éthynylœstradiol-*d*4 et la testostérone-*d*3 (figure 2.6) (C/D/N Isotopes, Montréal, Canada ; pureté isotopique > 98%). Ces trois étalons correspondent aux deux classes de stéroïdes sexuels: ceux possédant un noyau phénolique et ceux n'en possédant pas.

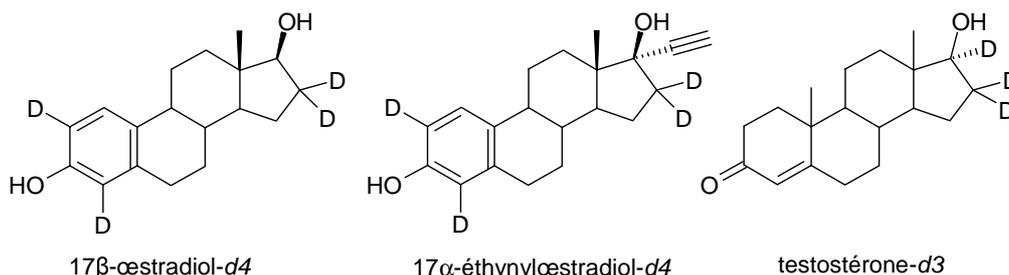


Figure 2.6. Stéroïdes deutérés utilisés comme étalons internes pour la quantification des stéroïdes natifs.

La méthode de calcul faisant intervenir les étalons internes est relativement simple. Elle repose sur l'utilisation de mélanges étalons, dans lesquels les concentrations respectives en analytes (*i*) et en étalons internes (*e*) sont connues. A chaque pic chromatographique *i*, est associée une aire A_i , proportionnelle à une quantité injectée m_i . Le coefficient de réponse d'un analyte *i* par rapport à un étalon *e* est alors obtenu par la relation suivante :

$$K_{i/e} = (A_i / (C_i \cdot m_i)) / (A_e / (C_e \cdot m_e))$$

La quantité d'analyte m'_i présente dans un échantillon inconnu est alors donnée par l'équation suivante :

$$m'_i = (A_i \cdot m'_e) / (K_i \cdot A_e)$$

où m'_e est la quantité d'étalon interne *e* ajoutée à cet échantillon et où K_i est le coefficient de réponse calculé précédemment, qui dépend de multiples facteurs, notamment de l'état du système analytique.

4.2. CG-SM

4.2.1. Dérivation

Les stéroïdes sont des molécules trop polaires et pas assez volatiles pour être analysées directement en CG. Pour améliorer leur comportement chromatographique, il est nécessaire de « dériver » les fonctions polaires (hydroxyles, cétones) en formant, par exemple, des dérivés silylés (figure 2.7). Le réactif de dérivation retenu dans le cadre de cette étude est le MSTFA (N-méthyl-N(triméthylsilyl)trifluoroacétamide), capable de silyler les fonctions cétones conjuguées et les alcools tertiaires, en présence d'un catalyseur (association iodure d'ammonium et mercaptoéthanol). Le choix de la composition du réactif de dérivation, ainsi que ceux du temps et de la température d'incubation ont fait l'objet d'une optimisation afin de maximiser l'abondance du signal détecté en CG-SM tout en minimisant la variabilité du coefficient de réponse de chaque analyte (Togola, 2001).

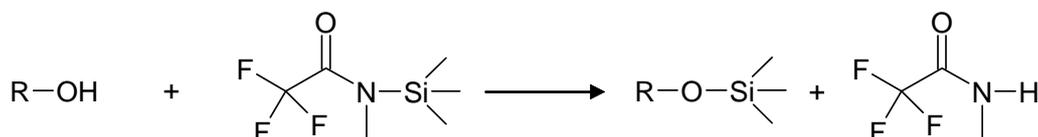


Figure 2.7. Réaction de silylation d'une fonction hydroxyle par le MSTFA

Le réactif de dérivation est préparé en deux temps : une solution mère est préparée (250µL de MSTFA + 10 mg NH₄I + 15 µL C₂H₆OS) puis chauffée 10 min à 65°C pour assurer une bonne dissolution de l'iodure d'ammonium. Ce mélange est ensuite dilué 10 fois avec du MSTFA, pour donner le réactif de dérivation. L'échantillon est évaporé à sec, puis repris dans 30 µL du réactif de dérivation et 30 µL de dichlorométhane ; la réaction est complète après chauffage à 65°C durant 35 min (Togola, 2001).

4.2.2. Conditions d'analyse

Les analyses ont été réalisées avec un chromatographe Agilent Technologies 6890 (équipé d'une colonne capillaire HP5-MS) couplé à un spectromètre de masse Agilent Technologies 5973. Les stéroïdes sont séparés suivant un gradient de température allant de 90 à 290 °C, avec une rampe de 7,5 °C.min⁻¹. Les conditions chromatographiques sont détaillées dans l'annexe 2.

Composé	Ion de quantification (m/z)	Ion de confirmation (m/z)	abréviation	étalon interne
œstrone	414*	399	E1	E2- <i>d4</i>
17β-œstradiol	416*	285	E2	E2- <i>d4</i>
œstriol	504*	386	E3	E2- <i>d4</i>
androstènedione	430*	432	A	T- <i>d3</i>
testostérone	432*	417	T	T- <i>d3</i>
5-dihydrotestostérone	434*	405	DHT	T- <i>d3</i>
5-dihydroandrostènedione	432*	417	DHA	T- <i>d3</i>
déhydroépiandrostérone	432*	417	DHEA	T- <i>d3</i>
11-cétotestostérone	503	518*	11-cT	T- <i>d3</i>
progestérone	458*	443	Pg	T- <i>d3</i>
prégnénone	445	460*	Pn	T- <i>d3</i>
17α-hydroxyprégnénone	548*	230	OHPn	T- <i>d3</i>
17α-hydroxyprogestérone	546*	317	OHPg	T- <i>d3</i>
17α-hydroxy,20β dihydroprogestérone	431	548*	DHP	T- <i>d3</i>
17α-éthynylœstradiol	425	440*	EE2	EE2- <i>d4</i>
mestranol	367*	227	MeEE2	EE2- <i>d4</i>
noréthindrone	442*	287	No	T- <i>d3</i>
lévonorgestrel	456*	316	DN	T- <i>d3</i>

Tableau 2.4. Ions utilisés pour l'analyse par CG-SM (* : ion moléculaire).

Après leur séparation sur colonne capillaire, les analytes sont directement introduits dans la source du spectromètre de masse, où ils sont ionisés par impact électronique (70 eV). L'ion moléculaire ainsi obtenu subit ensuite un certain nombre de fragmentations, en fonction de sa stabilité. Ainsi, pour les stéroïdes silylés, l'ion moléculaire est souvent majoritaire, mais l'ion $[M-15]^+$, lié à la perte d'un groupement méthyle, est généralement assez abondant et même majoritaire pour certains analytes (annexe 3). Pour chaque composé, le spectre de masse a été obtenu en injectant des solutions individuelles des stéroïdes ($100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en mode scan (balayage de la totalité du domaine m/z analysé par le quadrupôle : 50-600 uma). L'ion majoritaire du spectre de masse ainsi obtenu a ensuite été retenu pour la quantification. Un second ion (choisi parmi les plus abondants du spectre de masse) a été utilisé pour confirmer l'attribution du pic (tableau 2.4), les abondances relatives des deux ions étant

comparées à celles obtenues pour l'étalon correspondant. Les ions retenus pour les étalons internes sont les suivants : m/z 435 pour T-*d*3, m/z 420 pour E2-*d*4 et m/z 429 pour EE2-*d*4.

Progestérone-*d*9, androstènedione-*d*7 et œstrone-*d*2 ont également été testés comme étalons internes (structures : cf. annexe 4). Tous trois ont cependant donné des résultats peu reproductibles, avec des variations de coefficient de réponse (aire du pic/quantité injectée) parfois supérieures à 30% au sein d'une même série d'analyse. Ce comportement est très probablement lié à une faible stabilité du marquage au deutérium de ces composés lors de l'étape de dérivation. A titre d'exemple, dans le cas de l'androstènedione-*d*7, différents signaux correspondant aux ions m/z 435, 434 et 432 sont détectés, ce qui indique la perte de plusieurs atomes de deutérium. Les abondances relatives de ces différents signaux fluctuant d'un facteur deux à trois entre différents échantillons, toute tentative de quantification à l'aide de cet étalon s'avère vaine. En conséquence, progestérone-*d*9, androstènedione-*d*7 et œstrone-*d*2 n'ont pas été utilisés pour l'analyse quantitative par CG-SM.

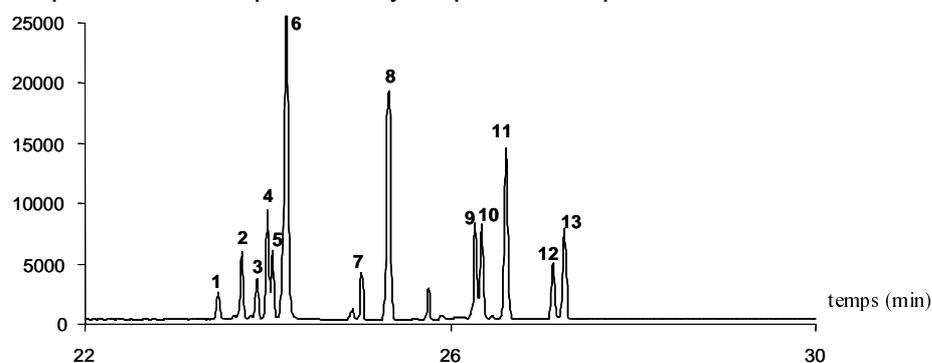


Figure 2.8. Chromatogramme obtenu par CG-SM pour un mélange étalon de stéroïdes naturels silylés ($3-10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suivant l'analyte ; mode sélection d'ions). 1 : DHEA; 2 : DHA; 3 : DHT; 4 : E1; 5 : A; 6 : E2, E2-*d*4, T et T-*d*3; 7 : 11-*c*T; 8 : Pn; 9 : E3; 10 : Pg; 11 : OHPg; 12 : DHP; 13 : OHPn.

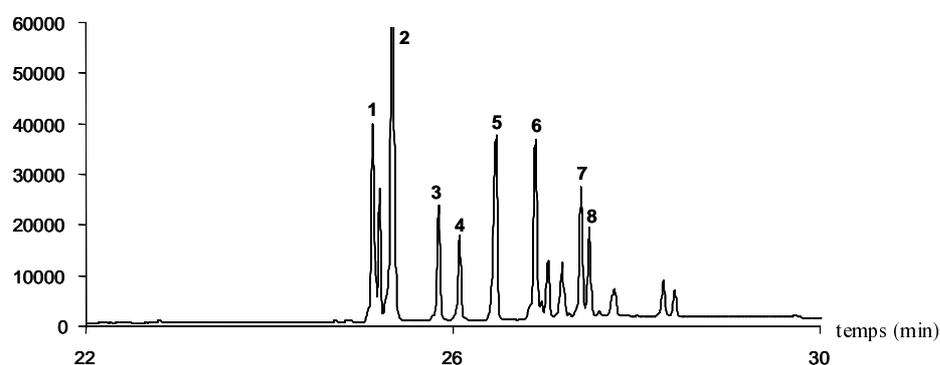


Figure 2.9. Exemple de chromatogramme obtenu par CG-SM pour un mélange étalon de stéroïdes naturels et synthétiques silylés ($3-10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ suivant l'analyte ; mode sélection d'ions). 1 : E1; 2 : T-*d*3, E2 et E2-*d*4; 3 : MeEE2; 4 : No; 5 : EE2 et EE2-*d*4; 6 : DN; 7 : E3; 8 : Pg.

Pour OHPg et OHPn, on observe la formation de dérivés tri- et disilylés (annexe 3), peut-être en raison de l'encombrement stérique ; le rapport tri/disilylé est relativement constant (environ 70% sous la forme disilylée), au sein d'une même série ou entre deux séries d'analyse. Pour les deux composés, les ions correspondant aux dérivés trisilylés ont été retenus pour la quantification car, outre le fait que ces formes sont majoritaires, les interférences matricielles sont plus généralement plus faibles pour les hauts rapports m/z.

Les figures 2.8 et 2.9 présentent les chromatogrammes obtenus, respectivement, pour un mélange de 14 stéroïdes naturels et de 8 stéroïdes considérés comme contaminants dans les effluents de STEP.

Tous les composés présentent une réponse linéaire sur une gamme de 15 pg à 5 ng injectés. A titre indicatif, les droites de réponses obtenues pour le 17 β -œstradiol et la testostérone sont représentées sur la figure 2.10.

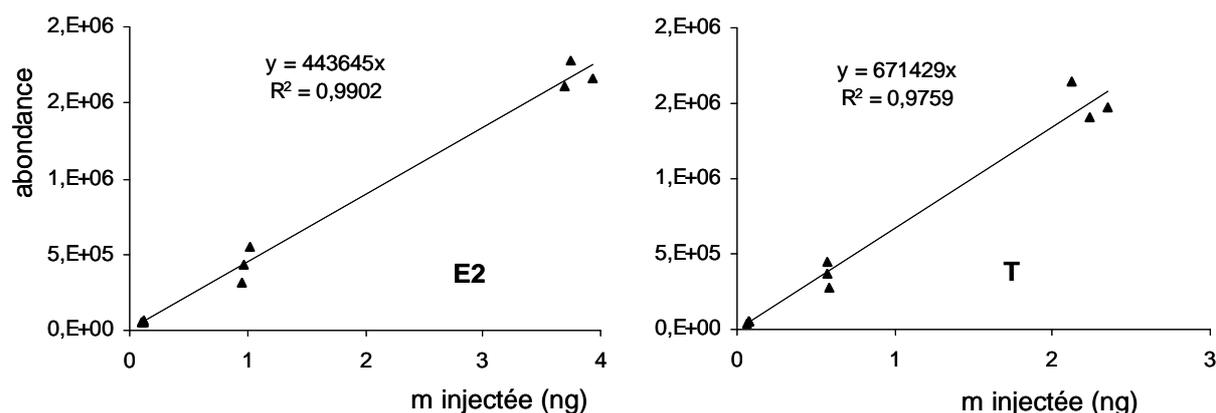


Figure 2.10. Droites de réponse du 17 β -œstradiol (E2) et de la testostérone (T) (analyse CG-SM en mode sélection d'ions).

Le protocole de quantification a été validé au moyen de solutions étalons contenant des stéroïdes natifs et deutérés en quantités connues. La quantification a été vérifiée pour des quantités injectées variant de 10 pg à 4 ng, cet intervalle couvrant la gamme des concentrations observées dans les échantillons environnementaux (tableau 2.5) ; les limites de détection sont présentées plus loin (cf. § 4.4).

	15 pg	100 pg	1 ng	5 ng
E1	102 ± 8	121 ± 1	100 ± 3	89 ± 4
E2	102 ± 12	114 ± 6	100 ± 3	93 ± 2
E3	125 ± 4	109 ± 10	100 ± 1	89 ± 1
A	104 ± 9	123 ± 15	100 ± 5	85 ± 3
T	92 ± 2	115 ± 3	101 ± 1	91 ± 4
DHT	64 ± 12	118 ± 4	119 ± 8	107 ± 7
DHA	42 ± 3	142 ± 13	106 ± 3	80 ± 6
DHEA	—	107 ± 8	100 ± 4	100 ± 8
11-cT	109 ± 7	120 ± 15	98 ± 5	94 ± 4
Pg	127 ± 9	119 ± 14	100 ± 1	93 ± 2
Pn	80 ± 1	115 ± 14	100 ± 2	89 ± 2
OHPn	103 ± 20	136 ± 18	100 ± 6	124 ± 6
OHPg	132 ± 8	126 ± 14	100 ± 1	121 ± 10
DHP	87 ± 11	132 ± 16	100 ± 6	86 ± 2
EE2	—	117 ± 8	100 ± 7	81 ± 3
MeEE2	—	114 ± 6	100 ± 4	72 ± 2
No	—	113 ± 7	87 ± 4	95 ± 1
DN	—	115 ± 10	100 ± 3	90 ± 1

Tableau 2.5. Quantification des stéroïdes en fonction de la quantité injectée (résultats exprimés en pourcentage de la quantité théorique (moyenne ± écart-type, n=3)).

4.3. CL-SM

Une méthode d'analyse par CL-SM a également été développée. Deux techniques d'ionisation ont été testées :

- l'électrospray (ESI) : la phase mobile chromatographique est pulvérisée à travers un capillaire, tandis qu'un courant de gaz sec (N₂) est dirigé dans le sens contraire de cette pulvérisation. Un potentiel de quelques kV est appliqué entre le capillaire et la paroi de la chambre d'ionisation, provoquant l'accumulation de charges au sein des gouttelettes, celles-ci devenant de plus en plus petites au fur et à mesure que le solvant s'évapore (explosions coulombiennes successives). D'explosion en explosion, les ions désolvatés sont finalement émis en phase gazeuse, puis sont guidés vers l'analyseur (ici, un quadripôle).

- l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) : la phase mobile chromatographique est nébulisée, puis subit une décharge corona. Ceci permet d'induire l'ionisation des molécules majoritaires au sein de l'aérosol, à savoir celles de la phase mobile et de l'atmosphère ambiante. Les ions formés réagissent avec les solutés pour donner des ions de type $[M-H]^-$ et $[M+H]^+$, suivant le mode d'ionisation sélectionné.

Des tests préliminaires ont rapidement montré que la sensibilité de la méthode APCI était nettement plus faible que celle de la méthode ESI : environ 5 fois plus faible pour les œstrogènes et 2 fois plus faible pour les androgènes et progestagènes (stéroïdes non phénoliques). Dès lors, l'optimisation des paramètres d'ionisation a été conduite uniquement pour l'ESI. Un plan expérimental a permis d'obtenir la meilleure combinaison pour les facteurs suivants : pression de nébulisation, température et débit du gaz desséchant, différence de potentiel appliquée au capillaire, différence de potentiel utilisée pour la fragmentation des ions. L'optimisation des paramètres (annexes 5 et 6) a permis d'obtenir un signal maximal avec une fragmentation minimale pour la plupart des analytes (cf. annexe 7). Les œstrogènes ont été analysés en mode négatif (ions $[M-H]^-$), tandis que les androgènes et les progestagènes ont été analysés en mode positif (ions $[M+Na]^+$) (tableau 2.6).

composé	(m/z)	composé	(m/z)	composé	(m/z)
E1	269	A	309	Pg	337
E2	271	T	311	Pn	339
E3	287	DHT	313	OHPn	355
EE2	295	DHA	311	OHPg	353
MeEE2	pas de signal	11-cT	325	DHP	355
E2-d4	275	T-d3	314	No	321
EE2-d4	299			DN	335

Tableau 2.6. Ions utilisés pour la quantification par CL-SM.

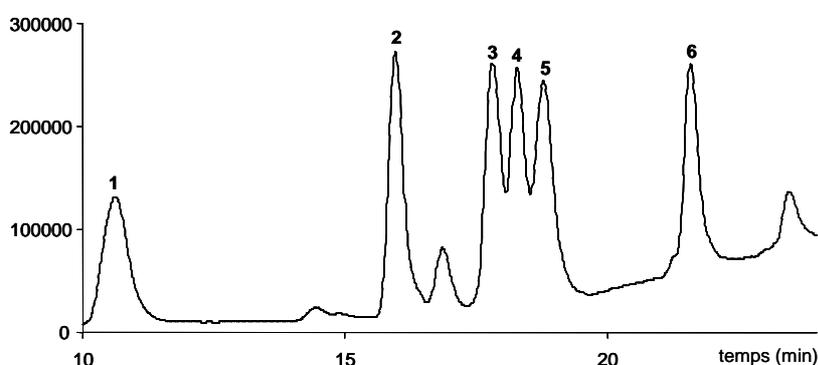


Figure 2.11. Chromatogramme d'un mélange d'androgènes et de progestagènes naturels obtenu par CL-SM en mode sélection d'ions (environ $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). 1 : 11-cT; 2 : A; 3 : T; 4 : OHPg, OHPn et DHP; 5 : Pg; 6 : Pn.

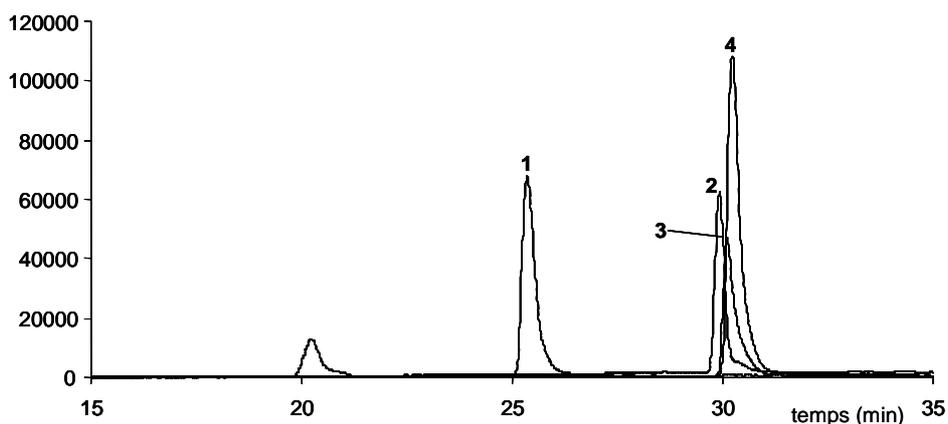


Figure 2.12. Chromatogramme d'un mélange d'œstrogènes obtenu par CL-SM en mode sélection d'ions (environ $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour chaque analyte). 1 : E3 ; 2 : E2 ; 3 : E1 ; 4 : EE2.

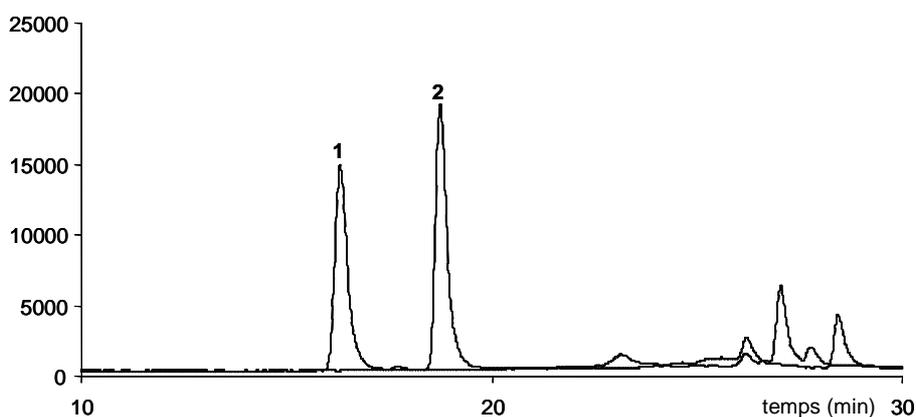


Figure 2.13. Chromatogramme d'un mélange de progestagènes synthétiques obtenu par CL-SM en mode sélection d'ions (environ $10 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pour chaque analyte). 1 : DN; 2 : No.

Les figures 2.11 à 2.13 présentent des chromatogrammes obtenus en CL-SM pour des mélanges étalons d'androgènes, de progestagènes et d'œstrogènes.

4.4. Choix de la méthode d'analyse

Le tableau 2.7 présente les limites de détection (signal/bruit = 3) obtenues pour chaque analyte en utilisant la CG-SM et la CL-SM. Il ressort clairement que la première méthode est nettement plus sensible que la seconde pour les œstrogènes, alors que la différence est moins marquée pour les stéroïdes non phénoliques, notamment pour ceux répondant le moins bien en CG-SM (Pg et métabolites). En outre, une extinction de signal, totale et

attribuée à un effet matriciel, a été observée lors de l'analyse d'échantillons complexes (effluent de station d'épuration (figure 2.13) ou ovaire de truite). Enfin, aucun signal n'a pu être obtenu pour le mestranol en CL-SM, phénomène également observé par Lopez de Alda et Barceló (2001). En conséquence, la CG-SM a été la seule méthode retenue pour l'analyse des échantillons étudiés dans le cadre de ces travaux.

	CG-SM	CL-SM		CG-SM	CL-SM
E1	2	25	Pg	9	6
E2	2	32	Pn	2	9
E3	3	43	OHPn	6	7
A	1	5	OHPg	7	7
T	1	4	DHP	2	7
DHT	2	4	EE2	4	160
DHA	2	4	MeEE2	3	pas de signal
DHEA	2	nd	No	3	11
11-cT	2	5	DN	5	10

Tableau 2.7. Limites de détection des stéroïdes (pg) en mode sélection d'ions (analyse en CG-SM et en CL-SM).

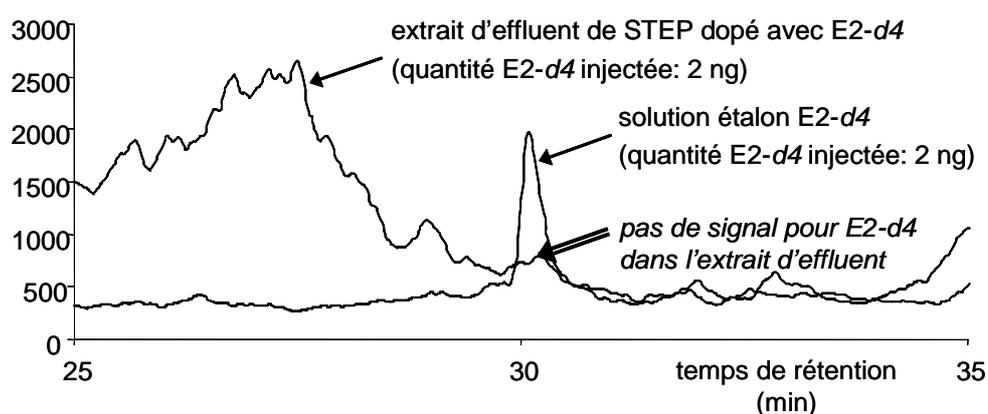


Figure 2.14. Extinction de signal observée lors de l'analyse par CL-SM d'un extrait d'effluent de STEP (1L d'effluent de la STEP d'Eysines extrait sur Oasis HLB et purifié sur NH₂).

5. PROTOCOLES DE PREPARATION DES ECHANTILLONS

5.1. Dosage des formes libres

La figure 2.14 présente, de manière schématique, la procédure générale mise en œuvre pour l'analyse des stéroïdes sous formes libres dans les différentes matrices étudiées.

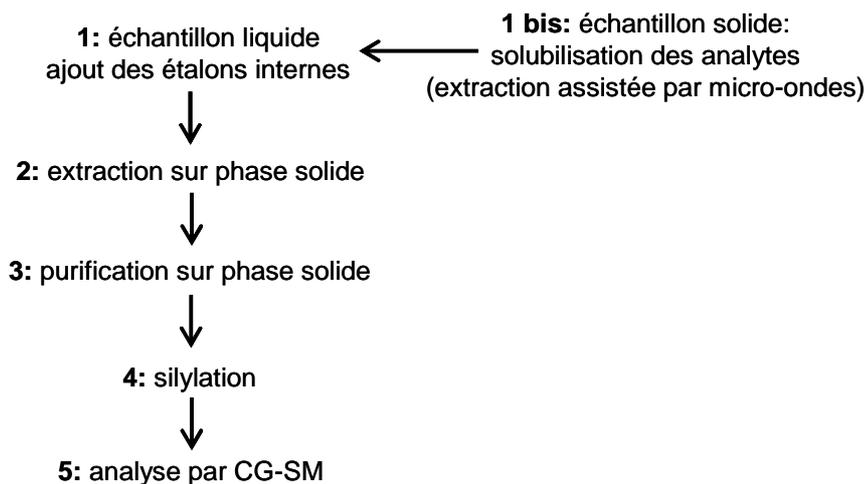


Figure 2.15. Représentation schématique de la procédure de traitement des échantillons.

Le schéma général d'analyse est similaire pour tous les types d'échantillons, seuls changent le type de cartouches d'extraction sur phase solide employé (à base de silice greffée, copolymère poreux...) et la quantité d'étalons internes ajoutée en début de protocole. Pour chaque série d'analyse, un échantillon dit « blanc » est mis en œuvre et analysé parallèlement aux véritables échantillons, afin d'estimer les contaminations pouvant éventuellement survenir au cours du protocole.

5.1.1. Plasma

Après décongélation à température ambiante, les échantillons individuels de plasma sont combinés puis répartis en aliquotes d'environ 1 g ; environ 10 ng de chaque étalon interne sont ensuite ajoutés à chacune (quantités exactes déterminées par gravimétrie). Les échantillons, dilués avec 2 mL de tampon acétate de sodium (pH 5,0, 10^{-2} M), sont ensuite passés à $3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ à travers une cartouche de type silice greffée C18 (Varian BondElut, 200 mg ; Interchim, Montluçon, France), conditionnée par passage successif de 3 mL de

méthanol et 3 mL d'eau (qualité Milli-Q, pH≈6). La phase stationnaire est rincée avec 3 mL d'eau, puis séchée durant 15 min par un flux d'azote (P=3 bar). Les analytes sont ensuite élués par passage de 3 mL de méthanol ($3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Les extraits sont évaporés à sec (50°C sous flux d'azote) et repris dans 2 mL d'un mélange acétate d'éthyle/méthanol (80:20, v/v). Ils sont ensuite purifiés par passage sur cartouches de silice greffée aminopropyle (NH_2) (Supelco, 500 mg ; S^t Quentin Fallavier, France ; conditionnement : 4 mL d'acétate d'éthyle et 4 mL du mélange acétate d'éthyle/méthanol). L'éluat est directement récupéré et les cartouches sont rincées avec 2 mL du mélange acétate d'éthyle/méthanol. Les deux fractions sont combinées et évaporées à sec sous flux d'azote. Les extraits sont ensuite repris dans 30 μL de dichlorométhane et 30 μL de réactif de silylation (cf. § 4.2.1), puis dérivés (35 min à 65°C) avant d'être analysées par CG- SM.

5.1.2. Bile

Après décongélation à température ambiante, les échantillons individuels de bile sont combinés puis répartis en aliquotes d'environ 100 mg ; 10 ng de chaque étalon interne sont ensuite ajoutés à chacune. Les stéroïdes étant présents essentiellement sous forme conjuguée dans cette matrice, les échantillons doivent tout d'abord subir une déconjugaison car glucuronides et sulfates sont trop polaires pour être analysés directement par CG-SM. La déconjugaison est réalisée en deux temps (solvolyse puis hydrolyse enzymatique) car certaines formes conjuguées (disulfates, sulfoglucuronides...) ne sont en effet que partiellement hydrolysées par les enzymes employées pour cet usage (glucuronidases et sulfatases).

Les échantillons sont évaporés à sec sous flux d'azote à 50°C , puis repris dans un mélange méthanol/tétrahydrofurane/acide trifluoroacétique (200 μL /800 μL /10 μL) et incubés durant 30 min à 45°C . Après neutralisation par ajout de Na_2CO_3 (400 μL à 0,2 M), les solvants organiques sont évaporés sous flux d'azote (50°C). Les échantillons sont dilués avec 5 mL de tampon acétate de sodium (10^{-2} M, pH 5,0), puis 30 μL d'arylsulfatase/ β -glucuronidase) sont ajoutés et les échantillons sont placés durant 3 h à 55°C (enzyme issue du suc digestif de *Helix pomatia* ; Sigma-Aldrich ; activité arylsulfatase ≤ 7500 unités Sigma.mL⁻¹ et activité β -glucuronidase ≥ 100000 unités Sigma.mL⁻¹). Les rendements de déconjugaison ont été déterminés pour deux formes conjuguées du 17 β -œstradiol choisis comme modèles lors du développement des procédures analytiques (tests réalisés sur des solutions étalons, tableau 2.8).

	solvolyse seule (%)	hydrolyse enzymatique seule (%)	solvolyse + hydrolyse (%)
E2-S	97 (12)	90 (16)	100
E2-G	< 1	88 (8)	88

Tableau 2.8. Rendement moyen de déconjugaison (%) déterminé pour deux formes conjuguées du 17 β -œstradiol (entre parenthèses : coefficient de variation de reproductibilité (%), n=9). E2-S : 17 β -œstradiol-3-sulphate; E2-G: 17 β -œstradiol-17-glucuronide.

Après déconjugaison, les échantillons de bile (100 μ L de bile « déconjugée » + 5 mL de tampon acétate pH 5,0) sont centrifugés (5 min, 4500 tour.min⁻¹, température ambiante). Le surnageant subit alors un protocole rigoureusement similaire à celui employé pour les échantillons de plasma : passage sur BondElut C18 200 mg (conditionnée par passages successifs de 3 mL de méthanol et 3 mL d'eau Milli-Q), rinçage avec 3 mL d'eau Milli-Q, séchage 15 min sous flux d'azote, élution avec 3 mL de méthanol. Les extraits sont alors évaporés à sec (50°C sous flux d'azote) et repris dans 2 mL d'un mélange acétate d'éthyle/méthanol (80:20, v/v). Ils sont ensuite purifiés par passage sur cartouches de silice greffée aminopropyle (NH₂) (Supelco, 500 mg ; S^t Quentin Fallavier, France ; conditionnement : 4 mL d'acétate d'éthyle et 4 mL du mélange acétate d'éthyle/méthanol). L'éluat est directement récupéré et les cartouches sont rincées avec 2 mL du mélange acétate d'éthyle/méthanol. Les deux fractions sont combinées et évaporées à sec sous flux d'azote. Les extraits sont ensuite repris dans 30 μ L de dichlorométhane et 30 μ L de réactif de silylation (cf. § 4.2.1), puis dérivés (35 min à 65°C) avant d'être analysées par CG-SM.

5.1.3. Eaux de surface et effluents

Les échantillons (1L) sont filtrés à 0,7 μ m sur des filtres en fibre de verre préalablement calcinés durant 6 h à 450°C. Les étalons internes sont alors ajoutés au filtrat (20 ng), qui est ensuite passé à environ 15 mL.min⁻¹ à travers des cartouches de type IST ENV+ (200 mg ; Bios Analytique, L'Union, France). Ces cartouches, composées de poly(styrène-divinylbenzène) hydroxylé, sont activées par passage successif de 4 mL d'acétate d'éthyle/acétone (1 :1, v/v), 4 mL de méthanol et 4 mL d'eau Milli-Q. Après rinçage de la phase stationnaire avec 4 mL d'un mélange méthanol/eau (1 :1, v/v), les stéroïdes sont élués avec 10 mL du mélange acétate d'éthyle/acétone (1 :1, v/v). Les extraits sont évaporés à sec (50°C sous flux d'azote) et repris dans 2 mL d'un mélange acétate d'éthyle/méthanol (80:20, v/v). Ils sont ensuite purifiés par passage sur cartouches de silice greffée aminopropyle

(NH₂) (Supelco, 500 mg ; conditionnement : 4 mL d'acétate d'éthyle et 4 mL du mélange acétate d'éthyle/méthanol (1 :1, v/v)). L'éluat est directement récupéré et les cartouches sont rincées avec 2 mL du mélange acétate d'éthyle/méthanol. Les deux fractions sont combinées et évaporées à sec sous flux d'azote. Les extraits sont ensuite repris dans 30 µL de dichlorométhane et 30 µL de réactif de silylation (cf. § 4.2.1), puis dérivés (35 min à 65°C) avant d'être analysées par CG-SM.

5.1.4. Matrices solides

Dans le cas des matrices solides, une étape supplémentaire de broyage et d'extraction est nécessaire. Les gonades de poissons (prise d'essai : 0,3-2 g ; tissus humides décongelés) et les glandes digestives de moules (1,5-2,5 g ; tissus humides décongelés) sont broyées dans 27 mL d'un mélange méthanol/eau (55 : 45, v/v) (2 min à 6000 tour.min⁻¹, température ambiante, homogénéiseur de type Ultra-Turrax). La suspension ainsi obtenue est répartie en trois aliquotes et 15 ng de chaque étalon interne sont ajoutés à chacune. Une extraction assistée par micro-ondes est ensuite réalisée au moyen d'un appareil Microdigest 301 (Prolabo), à la puissance de 30 W et durant 5 min. Les extraits obtenus sont centrifugés (4500 tour.min⁻¹, 5 min, température ambiante) ; le surnageant est récupéré puis le méthanol qu'il contient est évaporé à 60°C sous flux d'azote. Une première purification est ensuite réalisée sur cartouches EnviChrom-P (poly(styrène-divinylbenzène), 500 mg; Supelco, S^t Quentin Fallavier, France), conditionnées avec 4 mL d'acétate d'éthyle, 4 mL de méthanol et 4 mL d'eau Milli-Q. Après dépôt des extraits micro-ondes (solvant : eau contenant des traces de méthanol), la phase stationnaire est rincée avec 4 mL d'eau Milli-Q et 4 mL de cyclohexane, puis séchée 15 min sous flux d'azote (P : 3 bar). Les stéroïdes sont ensuite élués avec 10 mL d'un mélange cyclohexane/diéthyléther (7:3, v/v). Les extraits sont alors évaporés à sec (50°C sous flux d'azote), repris dans 2 mL d'un mélange acétate d'éthyle/méthanol (80:20, v/v), puis purifiés par passage sur cartouches de silice greffée aminopropyle (NH₂) (Supelco, 500 mg ; conditionnement : 4 mL d'acétate d'éthyle et 4 mL du mélange acétate d'éthyle/méthanol). L'éluat est directement récupéré et les cartouches sont rincées avec 2 mL du mélange acétate d'éthyle/méthanol. Les deux fractions sont combinées et évaporées à sec sous flux d'azote. Les extraits sont ensuite repris dans 30 µL de dichlorométhane et 30 µL de réactif de silylation (cf. § 4.2.1), puis dérivés (35 min à 65°C) avant d'être analysées par CG-SM.

Les échantillons de sédiments et de particules (phase particulière > 0,7 µm des échantillons d'eau et d'effluent de STEP) doivent également subir une étape d'extraction assistée par micro-ondes. La prise d'essai est de 1 g de sédiment tandis qu'elle est variable

pour la phase particulaire, entre 15 et 150 mg suivant la quantité de matière en suspension. Environ 25 ng d'étalons internes deutérés sont ajoutés et l'extraction micro-ondes est réalisée comme décrit précédemment pour les échantillons de gonades et de glandes digestives. Les extraits obtenus sont centrifugés (4500 tour.min⁻¹, 5 min, température ambiante), puis purifiés sur cartouches EnviChrom-P et NH₂.

5.2. Fractionnement formes libres / formes conjuguées

Un protocole a été développé pour l'analyse des stéroïdes libres et conjugués présents au sein de divers types d'échantillons (eaux et effluents, gonades, plasma et bile de poisson). Les prises d'essai et les quantités d'étalons internes ajoutées sont identiques à celles employées dans les procédures décrites dans la section 5.1 ; les procédures de préparation des échantillons – conservation, homogénéisation et extraction micro-ondes éventuelle – sont également identiques. Le protocole (figure 2.15) repose sur une étape de fractionnement réalisée au moyen de cartouches de type Oasis HLB 200 mg, phase copolymérique commercialisée par Waters (St Quentin en Yvelines, France) et constituée de poly(divinylbenzène-co-N-vinylpyrrolidone).

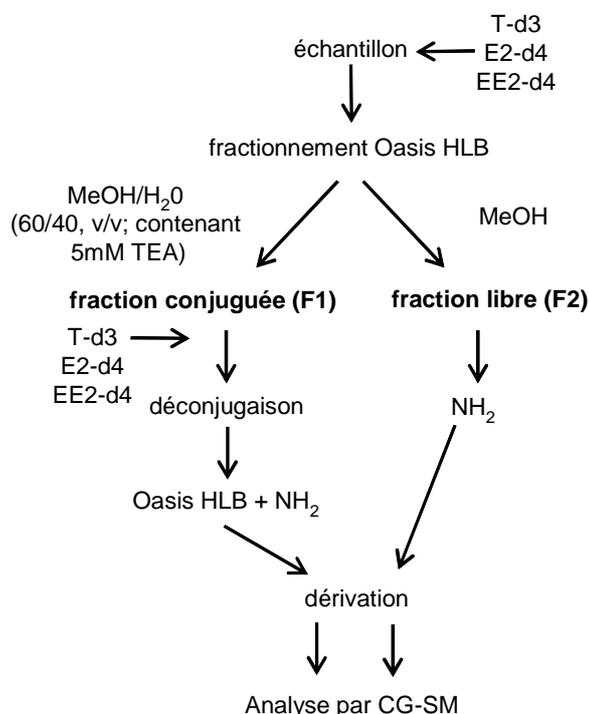


Figure 2.16. Fractionnement sur Oasis HLB des formes libres et des formes conjuguées présentes au sein d'un même échantillon (F1 : fraction conjuguée ; F2 : fraction libre).

Le pH des échantillons est tout d'abord ajusté à 5,0 à l'aide de tampon acétate (10^{-2} M) dans le cas des échantillons biologiques et avec de l'acide chlorhydrique dilué (30%) dans le cas des échantillons d'eau ou d'effluent. Les cartouches sont conditionnées par passage de 4 mL de méthanol et 4 mL d'eau Milli-Q, avant dépôt des échantillons et rinçage à l'eau Milli-Q (5 mL).

La première fraction (*F1*), contenant les formes conjuguées, est éluée avec 5 mL d'un mélange méthanol/eau (6:4, v/v) contenant de la triéthylamine (concentration dans le mélange : $5 \cdot 10^{-3}$ M). Les rendements d'extraction pour le 17β -œstradiol-3-sulphate et le 17β -œstradiol-17-glucuronide (choisis comme conjugués « modèles ») sont présentés dans le tableau 2.9. Les étalons internes sont alors ajoutés, puis les échantillons sont évaporés à sec (60°C sous flux d'azote) pour subir ensuite une double déconjugaison (solvolysse puis hydrolyse enzymatique, cf. § 5.1.2). L'extrait obtenu étant alors en milieu aqueux, il est nécessaire d'utiliser une cartouche Oasis HLB 200 mg pour passer en milieu organique, condition nécessaire pour la purification sur NH_2 . Les cartouches Oasis HLB 200 mg sont conditionnées par passage de 4 mL de méthanol et 4 mL d'eau Milli-Q, avant le dépôt des échantillons. Après rinçage avec 5 mL d'un mélange méthanol/eau (6:4, v/v) contenant de la triéthylamine (concentration dans le mélange : $5 \cdot 10^{-3}$ M), puis séchage sous flux d'azote (15 min ; $P = 3$ bar), les stéroïdes sont élués avec 10 mL de méthanol. Les extraits sont évaporés à sec (50°C sous flux d'azote) et repris dans 2 mL d'un mélange acétate d'éthyle/méthanol (80:20, v/v). Ils sont ensuite purifiés par passage sur cartouches de silice greffée aminopropyle (NH_2) (Supelco, 500 mg ; S^t Quentin Fallavier, France ; conditionnement : 4 mL d'acétate d'éthyle et 4 mL du mélange acétate d'éthyle/méthanol). L'éluat est directement récupéré et les cartouches sont rincées avec 2 mL du mélange acétate d'éthyle/méthanol. Les deux fractions sont combinées et évaporées à sec sous flux d'azote. Les extraits sont ensuite repris dans 30 μL de dichlorométhane et 30 μL de réactif de silylation (cf. § 4.2.1), puis dérivés (35 min à 65°C) avant d'être analysées par CG-SM.

La seconde fraction (*F2*), contenant les stéroïdes libres, moins polaires que les formes conjuguées, est éluée avec 10 mL de méthanol (tableau 2.9). Les extraits sont évaporés à sec (50°C sous flux d'azote) et repris dans 2 mL d'un mélange acétate d'éthyle/méthanol (80:20, v/v). Ils sont ensuite purifiés par passage sur cartouches de silice greffée aminopropyle (NH_2) (Supelco, 500 mg ; S^t Quentin Fallavier, France ; conditionnement : 4 mL d'acétate d'éthyle et 4 mL du mélange acétate d'éthyle/méthanol). L'éluat est directement récupéré et les cartouches sont rincées avec 2 mL du mélange acétate d'éthyle/méthanol. Les deux fractions sont combinées et évaporées à sec sous flux d'azote. Les extraits sont ensuite repris dans 30 μL de dichlorométhane et 30 μL de réactif de silylation (cf. § 4.2.1), puis dérivés (35 min à 65°C) avant d'être analysées par CG-SM.

	<u>fraction 1 (%)</u>	<u>fraction 2 (%)</u>		<u>fraction 1 (%)</u>	<u>fraction 2 (%)</u>
E1	nd	106 (6)	Pn	nd	95 (11)
E2	nd	101 (6)	OHPn	nd	95 (21)
E3	3 (1)	102 (9)	OHPg	nd	93 (16)
A	nd	96 (7)	DHP	nd	105 (34)
T	nd	98 (5)	EE2	nd	107 (6)
DHT	nd	96 (10)	MeEE2	nd	86 (25)
DHA	nd	84 (11)	No	nd	113 (7)
DHEA	nd	83 (16)	DN	nd	101 (22)
11-cT	4 (2)	104 (7)	E2-G	98 (12)	nd
Pg	nd	87 (10)	E2-S	86 (5)	10 (3)

Tableau 2.9. Récupération moyenne des stéroïdes lors du fractionnement des formes libres et des formes conjuguées sur Oasis HLB (entre parenthèses : coefficient de variation de reproductibilité (%), n=9). Détermination réalisée sur des échantillons de tampon acétate pH 5,0 (5 mL) supplémentés en stéroïdes (50 ng). nd : non détecté.

5.3. Limites de détection

Les limites de détection calculées (signal/bruit=3) dans les extraits obtenus à partir des différentes matrices étudiées sont présentées dans le tableau 2.10.

Si ces limites sont relativement constantes dans les matrices biologiques, il n'en va pas de même pour les échantillons d'eaux de surface et d'effluents de STEP. La variabilité « naturelle » de la composition de ces deux derniers types de matrices entraîne une forte variabilité des limites de détection entre deux échantillons, en raison d'une fluctuation importante du bruit de fond et des interférences matricielles. Ainsi, les variations des limites de détection peuvent, pour certains analytes, atteindre un facteur 13 entre deux échantillons, qu'ils soient prélevés en deux stations distinctes ou qu'ils soient prélevés à la même station en des dates différentes. Dès lors, il s'avère nécessaire de calculer les limites de détection pour chaque échantillon, pour chaque série d'analyse.

	plasma	bile	gonades de poisson	glande digestive de moule	eau de surface	effluent de STEP	sédiment
E1	0,1	1,5	0,2	0,1	0,4 - 1,3	1,1 – 4,3	0,7
E2	0,1	1,6	0,2	0,1	0,2 - 1,5	0,6 – 3,8	0,7
E3	0,3	0,9	0,7	1,2	0,4 - 2,2	0,6 – 8,0	0,4
A	0,1	2,2	0,2	0,1	nd	nd	nd
T	0,06	1,6	0,2	0,1	nd	nd	nd
DHT	0,3	7,0	0,8	0,4	nd	nd	nd
DHA	0,3	6,0	0,7	0,5	nd	nd	nd
DHEA	0,3	5,5	0,8	nd	nd	nd	nd
11-cT	0,3	3,4	0,5	nd	nd	nd	nd
Pg	0,3	13,9	0,9	0,3	1,3-2,7	1,7 – 8,0	1,7
Pn	0,2	3,4	0,3	0,3	nd	nd	nd
OHPn	0,3	9,4	0,8	0,5	nd	nd	nd
OHPg	0,4	8,1	0,9	0,9	nd	nd	nd
DHP	0,2	3,6	0,7	nd	nd	nd	nd
EE2	0,2	2,6	0,4	nd	1,1 – 1,8	0,8 – 4,1	1,7
MeEE2	nd	nd	nd	nd	0,4 - 1,6	0,6 – 5,4	1,9
No	nd	nd	nd	nd	0,8 – 2,5	1,1 – 6,5	2,1
DN	nd	nd	nd	nd	0,7 – 5,9	1,9 -7,2	2,3

Tableau 2.10. Limites de détection calculées pour les analytes dans des extraits des différentes matrices étudiées (ng.g⁻¹ pour les matrices biologiques et le sédiment, ng.L⁻¹ pour les eaux et les effluents de STEP). Prise d'essai : 1 g de plasma, 0,1 g de bile, 0,5 g de gonades, 0,5 g de glandes digestives de moule, 1 L d'eau de surface, 1 L d'effluent de STEP ou 1 g de sédiment. nd : non déterminé.

6. VALIDATION DES PROCEDURES D'EXTRACTION ET DE QUANTIFICATION

Les procédures d'extraction et de quantification ont été validées au moyen de différents types d'échantillons dans lesquels une quantité connue de stéroïdes a été ajoutée (après détermination préalable des teneurs initiales en analytes dans les échantillons naturels). Dans le cas du plasma, des matrices de référence ont également été employées; pour ces échantillons, la concentration en progestérone et en 17 β -œstradiol est certifiée par un organisme accrédité, en l'occurrence le Bureau Communautaire de Référence (BCR) de l'Union Européenne.

6.1. Echantillons fortifiés

6.1.1. Matrices modèles

Afin de proposer une première validation des procédures d'extraction sur phase solide, les rendements d'extraction ont tout d'abord été déterminés pour des échantillons d'eau Milli-Q fortifiés avec environ 50 ng de chaque analyte. Dans le cas des cartouches NH₂, les tests ont été menés sur 1 mL du mélange acétate d'éthyle/méthanol (80 :20, v/v).

Les résultats présentés dans le tableau 2.11 montrent que les rendements d'extraction/récupération sont globalement satisfaisants (>70%) pour toutes les phases testées et pour la plupart des analytes. Deux points méritent cependant une brève discussion. Tout d'abord, pour une raison inexplicée, les deux androgènes DHA et DHT sont mal élués des cartouches NH₂; ceci est difficilement compréhensible car ces deux stéroïdes ont des structures extrêmement proches de celles de l'androstènedione et de la testostérone, analytes bien récupérés sur NH₂. Ensuite, le taux de récupération de l'œstriol (E3) sur Env+, assez faible (60%) s'explique très probablement par le fait que le volume de fuite de cet analyte sur ce type de phase stationnaire (polystyrène-divinylbenzène hydroxylé) est inférieur à 1L (et même inférieur à 250 mL selon López de Alda et Barceló, 2001).

	C18 (%)* (n=9)	EnviChrom-P (%)* (n=9)	NH₂ (%)[†] (n=9)	Env+ (%)° (n=3)	Oasis HLB (%)° (n=3)
E1	105 (12)	101 (15)	99 (9)	97 ± 2	88 ± 15
E2	104 (10)	87 (18)	102 (10)	91 ± 1	102 ± 7
E3	97 (9)	nd	93 (14)	60 ± 5	93 ± 13
A	104 (9)	95 (22)	104 (11)	nd	nd
T	100 (9)	86 (14)	101 (3)	nd	nd
DHT	107 (9)	88 (18)	41 (12)	nd	nd
DHA	105 (14)	89 (24)	36 (37)	nd	nd
DHEA	nd	81 (28)	89 (15)	nd	nd
11-cT	94 (22)	75 (10)	100 (22)	nd	nd
Pg	69 (11)	81 (32)	97 (24)	nd	nd
Pn	65 (13)	76 (14)	90 (14)	nd	nd
OHPn	97 (16)	77 (10)	102 (19)	nd	nd
OHPg	101(12)	113 (17)	114 (13)	nd	nd
DHP	80 (19)	62 (9)	98 (23)	nd	nd
EE2	nd	nd	98 (17)	110 ± 10	83 ± 11
MeEE2	nd	nd	96 (13)	105 ± 6	78 ± 12
No	nd	nd	107 (25)	95 ± 3	108 ± 9
DN	nd	nd	106 (25)	98 ± 5	77 ± 6
E2-G	nd	nd	nd	nd	101 ± 3
E2-S	nd	nd	nd	nd	84 ± 15

Tableau 2.11. Rendement moyen d'extraction des stéroïdes sur différents types de cartouches d'extraction solide/liquide. Echantillons fortifiés avec 50 ng de chaque analyte. (nd : non déterminé). * : 1 mL d'eau Milli-Q ; [†]: 1 mL d'acétate d'éthyle/méthanol (80 :20, v/v) ; °: 1 L d'eau Milli-Q. C18, EnviChrom-P et NH₂ : entre parenthèses, coefficient de variation de reproductibilité (%) (n=9). Env+ et Oasis HLB : moyenne ± écart-type, n=3.

6.1.2 Matrices biologiques

Les rendements d'extraction/purification ont également été déterminés sur des matrices biologiques supplémentées en stéroïdes (50 ng). Afin d'estimer les pertes liées aux étapes

d'extraction et de purification, les étalons internes ont été ajoutés en fin de protocole. Les résultats présentés dans le tableau 2.12 indiquent que, globalement, de bons taux de récupération des stéroïdes sont obtenus sur les différents types de cartouches, pour toutes les matrices considérées. On pourra cependant noter que, dans le cas de la préparation d'échantillons de bile sur C18+NH₂, des valeurs plus faibles que la moyenne sont observées (environ 70%), peut-être en raison d'une saturation partielle de la cartouche C18.

	C18 + NH ₂ (%)		EnviChrom-P + NH ₂ (%)		Oasis HLB+NH ₂ (%)*		
	plasma (1g)	bile (0,1g)	gonades de flet (0,5 g)	glande digestive de moule [♦] (0,5 g)	plasma (1 g)	bile (0,1 g)	gonades de flet [♦] (0,5 g)
E1	106 ± 1	63 ± 5	91 ± 2	94 ± 10	102 ± 19	84 ± 2	84 ± 1
E2	108 ± 5	68 ± 3	85 ± 3	114 ± 16	92 ± 6	88 ± 2	94 ± 3
E3	nd	nd	30 ± 12	nd	112 ± 9	73 ± 17	70 ± 6
A	96 ± 3	68 ± 2	77 ± 7	102 ± 3	76 ± 1	81 ± 1	80 ± 2
T	104 ± 2	63 ± 2	93 ± 13	101 ± 9	95 ± 1	97 ± 26	89 ± 2
DHEA	nd	nd ± 2	112 ± 8	nd	141 ± 30	120 ± 1	105 ± 10
11-cT	104 ± 2	60 ± 1	62 ± 5	67 ± 5	81 ± 9	87 ± 1	78 ± 1
DHA	16 ± 3	33 ± 3	26 ± 3	85 ± 5	56 ± 23	48 ± 17	41 ± 3
DHT	24 ± 2	43 ± 4	32 ± 3	64 ± 3	55 ± 3	76 ± 7	46 ± 5
Pg	122 ± 2	68 ± 5	105 ± 8	107 ± 15	99 ± 6	96 ± 8	86 ± 1
Pn	112 ± 3	55 ± 3	73 ± 6	85 ± 9	69 ± 1	64 ± 6	73 ± 1
OHPn	93 ± 6	64 ± 1	76 ± 8	98 ± 2	77 ± 15	82 ± 13	75 ± 4
OHPg	103 ± 7	62 ± 2	94 ± 3	110 ± 5	86 ± 5	95 ± 23	91 ± 6
DHP	93 ± 2	62 ± 2	81 ± 8	nd	67 ± 1	90 ± 7	82 ± 8
EE2	nd	nd	nd	nd	98 ± 6	89 ± 9	89 ± 3
E2-S	nd	nd	nd	nd	107 ± 2	nd	nd

Tableau 2.12. Rendement global « extraction+purification » dans différentes matrices biologiques fortifiées avec 50 ng de chaque analyte (moyenne ± écart-type (n= 3)). nd : non déterminé. * : résultats correspondant aux formes libres (sauf E2-S).
♦ : comprend l'étape d'extraction assistée par micro-ondes.

6.1.3. Eaux de surface, effluents de STEP et sédiment

Les rendements d'extraction/purification ont été déterminés pour des échantillons de 1 L d'eau, d'effluent ou de 1g de sédiment fortifiés en stéroïdes (50 ng) (tableaux 2.13 et 2.14). Les cartouches Oasis HLB (200 mg) et Env+ (200 mg) se sont avérées satisfaisantes pour l'extraction des stéroïdes présents dans les eaux et les effluents de STEP : les taux de récupération sont supérieurs à 70 % pour tous les analytes. Même l'œstriol présent dans un effluent de STEP fortifié est bien récupéré sur Env+, peut-être en raison d'un effet de matrice ou d'une interférence.

Il n'existe pas de matrice solide de référence pour l'analyse des stéroïdes hormonaux ; en conséquence, un sédiment fortifié a fait office de matrice test pour la validation de la procédure d'extraction assistée par micro-ondes. Les résultats obtenus sont satisfaisants, avec des taux de récupération supérieurs à 70 % pour tous les analytes (tableau 2.13). Par la suite, il a été considéré, arbitrairement, que l'extraction présentait des performances similaires pour les autres types d'échantillons solides analysés (gonades de poissons et glandes digestives de moules), bien que les interactions entre matrice et analytes soient vraisemblablement différentes dans les échantillons biologiques.

	eau de surface (%) [*]	effluent de STEP (%) [*]	sédiment (%) [†]
E1	98 ± 2	102 ± 8	73 ± 6
E2	97 ± 4	102 ± 11	73 ± 4
E3	105 ± 5	117 ± 12	87 ± 9
MeEE2	73 ± 3	74 ± 5	72 ± 6
EE2	95 ± 14	112 ± 15	91 ± 5
Pg	122 ± 5	interférence	72 ± 2
No	86 ± 3	115 ± 2	85 ± 11
DN	84 ± 2	119 ± 2	80 ± 4
E2G	92 ± 3	nd	nd
E2S	94 ± 12	nd	nd

Tableau 2.13. Rendement global « extraction+purification » (moyenne ± écart-type, n=3) sur des échantillons d'eau de surface, d'effluent de STEP et de sédiment fortifiés avec 50 ng de chaque analyte. nd : non déterminé. * : Oasis HLB+NH₂ (protocole permettant le fractionnement entre formes libres et formes conjuguées); † : extraction micro-ondes suivie d'une purification sur EnviChrom-P+NH₂.

	rendement (%)	écart-type (% , n=3)
E1	105	10
E2	98	1
E3	91	2
EE2	118	9
MeEE2	123	12
DN	104	3
NR	108	4
Pg	112	2

Tableau 2.14. Rendement global « extraction ENV+/purification NH₂», pour un effluent de STEP fortifié avec 20 ng de chaque analyte.

6.2. Matrices certifiées

Afin de valider l'ensemble du protocole (extraction/purification/quantification), des tests ont été réalisés sur différents échantillons de plasma humain dont les concentrations en progestérone et en 17 β -œstradiol sont certifiées par le Bureau Communautaire de Référence (BCR) de l'Union Européenne (dosage par CG-SM haute résolution).

Les résultats présentés dans le tableau 2.15 correspondent à des analyses réalisées avec le protocole décrit au § 5.1.1 (*plasma sur C18+NH₂*) ; ils indiquent une bonne quantification du 17 β -œstradiol, aux deux concentrations considérées. Pour la progestérone, les résultats sont moins bons, même s'ils restent acceptables lorsque la testostérone-*d3* est utilisée comme étalon interne. En revanche, la quantification par rapport à la progestérone deutérée est extrêmement mauvaise, ce qui illustre le mauvais comportement de cet étalon lors de l'étape de dérivation.

	stéroïde	étalon interne	C certifiée (ng.mL ⁻¹)	C mesurée (ng.mL ⁻¹)
BCR 347	Pg	Pg- <i>d9</i>	3,19 ± 0,07	0,51 ± 0,64
BCR 347	Pg	T- <i>d3</i>	3,19 ± 0,07	3,99 ± 0,75
BCR 577	E2	E2- <i>d4</i>	0,19 ± 0,01	0,20 ± 0,02
BCR 578	E2	E2- <i>d4</i>	0,37 ± 0,02	0,34 ± 0,02

Tableau 2.15. Comparaison entre les concentrations en progestérone et en 17 β -œstradiol obtenues sur 3 réplicats et les valeurs fournies par le BCR pour 3 matrices certifiées (plasma humain : BCR 347, 577 et 578).

CHAPITRE 3

Ce chapitre regroupe deux publications portant sur l'étude des stéroïdes hormonaux en tant que contaminants des systèmes aquatiques. Ces hormones, excrétées via l'urine, sont présentes dans les eaux usées parvenant aux stations d'épuration (STEP). L'élimination de ces composés lors du traitement n'est que partielle, ce qui explique la présence de traces de stéroïdes (ng.L^{-1}) dans les effluents de STEP.

La première publication présente les premiers développements analytiques réalisés dans le cadre de cette thèse pour l'étude des stéroïdes hormonaux dans les eaux de surface et les effluents de STEP, ainsi que l'application de ces procédures à l'évaluation de la contamination de l'estuaire de Seine par cette famille de perturbateurs endocriniens.

La seconde publication concerne le devenir des œstrogènes dans la Jalle d'Eysines, affluent de la Garonne fortement contaminé par des effluents de station d'épuration. Le but des travaux décrits dans cet article était d'étudier le gradient des concentrations en stéroïdes en aval du rejet de la STEP d'Eysines (jusqu'au confluent avec la Garonne, 10 km en aval) et d'évaluer la variabilité saisonnière de ce gradient (échantillonnage en février, juillet et septembre).

Development of an analytical procedure for the determination of selected estrogens and progestagens in water samples.

Application : study of the Seine river estuary

Pierre LABADIE et Hélène BUDZINSKI

Une méthode a été développée pour l'analyse de huit stéroïdes hormonaux (naturels et synthétiques) dans les eaux de surface et les effluents de station d'épuration. Plusieurs points méthodologiques ont particulièrement été étudiés et sont discutés : choix de la nature de la phase adsorbante employée lors de l'étape d'extraction, influence du débit sur les taux de récupération, volume de relargage pour deux adsorbants (IST Env+ et Oasis HLB) et optimisation de l'étape de purification. La conservation des échantillons après prélèvement et avant analyse a également été étudiée. Il a ainsi été constaté que, sans ajout d'agent de préservation, les concentrations des stéroïdes naturels contenus dans un échantillon d'effluent de station d'épuration chutaient rapidement : 85 % de la progestérone et environ 30% de l'œstrone et du 17β -œstradiol étaient dégradés en 24 heures (conservation à 4°C, à l'obscurité).

La procédure analytique développée a été ensuite appliquée à l'évaluation de la contamination de l'estuaire de Seine par les stéroïdes hormonaux. Des prélèvements ont été réalisés au cours de l'année 2002, dans le cadre du programme Seine Aval. Aucun stéroïde n'a été détecté dans les eaux de surface de cet estuaire; en revanche, les œstrogènes naturels ont été détectés à plusieurs reprises dans les effluents des stations d'épuration déversés dans l'estuaire. L'œstrone a été l'analyte le plus fréquemment détecté, à de faibles niveaux (1,8 à 8,3 ng.L⁻¹). Les analytes synthétiques n'ont jamais été détectés, quelle que soit la période d'échantillonnage.

Publication n°1, acceptée par Analytical and Bioanalytical Chemistry

Development of an analytical procedure for the determination of selected estrogens and progestagens in water samples

Application : study of the Seine river estuary

Pierre LABADIE and Hélène BUDZINSKI

ABSTRACT

An analytical procedure for the determination of eight selected natural and synthetic hormonal steroids in surface water and in effluent samples has been developed. Several methodological points have been investigated and are discussed; they include the choice of the solid-phase extraction sorbent, the influence of the flow rate on the recoveries, the breakthrough volume for a given sorbent (Env+ and Oasis HLB), the sample clean-up and the sample storage. As regards the latter point, it was found that when no preservative was added to a sewage treatment plant effluent, severe loss of steroids occurred : 85% of progesterone and about 30% of both estrone and estradiol were found to be degraded in 24 h. The developed protocol was applied to samples from the Seine river estuary. Sex steroids were not detected in surface water; estrone was the most commonly detected steroid in sewage treatment plant effluent, with levels ranging from 1.8 to 8.3 ng.L⁻¹. Synthetic estrogens (ethynylestradiol and mestranol) and progestagens (levonorgestrel and norethindrone) were never detected, whatever the sampling season.

INTRODUCTION

Numerous chemicals discharged in aquatic ecosystems via waste water treatment plants (WWTP) have been shown to mimic endogenous sex steroid hormone: phthalates, alkylphenols and their ethoxylated precursors, as well as hormones (both natural and synthetic). The latter compounds are obviously the most potent endocrine disruptors and they include estrogens and progestagens. So far, research has focused mainly on estrogenic effects and there is an increasing number of papers demonstrating the estrogenicity of WWTP effluents. Several adverse effects were reported in male fish exposed to WWTP discharge, such as the induction of vitellogenin [1-6] or adverse alterations of gonads [4]. In vitro tests performed on fractionated WWTP effluents showed that the natural estrogens estrone and estradiol, as well as the synthetic contraceptive ethynylestradiol were the main contributors to the estrogenic potency of sewage discharge [7-8].

The aim of this study was to develop an analytical procedure to enable the determination of sex steroids in WWTP effluents and in surface water, in order to study their occurrence in the Seine river estuary (France). This research is part of the multidisciplinary "Seine Aval II" research program, which aims to assess the water quality of the seine river estuary and to better understand its functioning. If the Seine river estuary has been well studied for chemical contamination such as PAHs, PCBs, heavy metals [9], there was a serious lack of data concerning emerging contaminants such as hormonal steroids and a need to acquire data on their concentration level : for it has been found some evidence of endocrine disruption on fishes from this estuary [10]. As target compounds, we selected the natural estrogens estrone, estradiol and estriol, the synthetic estrogens ethynylestradiol and mestranol, the natural progestagen progesterone and the synthetic progestagens norethindrone and D-norgestrel. As regards natural hormones, the selection was based upon their occurrence in the human body and their potency. With respect to synthetic compounds, those most commonly used in estroprogestative treatments were chosen. This study focused on the levels of free steroids, since previous observations showed that glucuronides, the major form of excretion of sex steroids, were cleaved either in the sewers or during the sewage treatment, probably by the β -glucuronidase secreted by the fecal bacteria *Escherichia coli* [11-12].

EXPERIMENTAL

Chemicals

Both natural and synthetic steroids were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France). The selected steroids are listed in Table 1. Deuterated steroids (testosterone-d₃, 17 β -estradiol-d₄ and 17 β -ethynylestradiol-d₄, purity>99%), used as internal standards, were obtained from CDN Isotopes (Montreal, Canada). Stock solutions were prepared in MeOH at 20 μ g/g and stored at 4°C. They were found to be stable over a 6-month period (Δ C<5%). All solvents were either *HPLC grade* or *Organic residue analysis* and were obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Solid-phase extraction was carried out using either Varian BondElut C18 (endcapped 500mg) cartridges (Interchim, Montluçon, France), or IST Env+ cartridges (Bios Analytique, L'Union, France), or Waters Oasis HLB cartridges (Waters, St Quentin en Yvelines, France). LC-NH₂ and silica cartridges were purchased from Supelco (S^t Quentin Fallavier, France) and were used for clean-up of the extracts. Whatman GF-F glass fiber filters (pore size 0.7 μ m) were purchased from VWR International (Strasbourg, France). MSTFA (N-Methyl-N(trimethylsilyl)trifluoroacetamide ; Acros Organics, Noisy le Grand, France) was used as the silylation agent. Deionized water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France).

	Trivial name	Abbreviation	Type	CAS Registry number
Estrogens	Estrone	E1	N	53-16-7
	17 β -Estradiol	E2	N	50-28-2
	Estriol	E3	N	50-27-1
	17 β -Ethynylestradiol	EE2	S	57-63-6
	Mestranol	MeEE2	S	72-33-3
Progestagens	Progesterone	Pg	N	57-83-0
	D-norgestrel	DN	S	797-63-7
	19-Norethindrone	No	S	68-22-4

Table 1. Target analytes (N : natural; S : synthetic)

Analysis and quantification of the target steroids

Quantification of the steroids was carried out by GC/MS, using internal standards and after silylation of the steroids. Firstly, the final SPE extracts were evaporated until dryness, under N₂ stream, at 50-60°C. The silylation reagent was prepared as follows : a mixture of 250 µL MSTFA, 15 µL mercaptoethanol and 10 mg NH₄I was left for about 10 at 65 °C, so as to insure the total dissolution of the catalyst ammonium iodide. Thereafter, the mixture was diluted 10 times with MSTFA and this solution was used as the derivatisation reagent : 30 µL of the reagent were added to each extract and the samples were left at 65 °C for 30-40 min. Then, 20 µL of isooctane were added and the samples were injected.

Separation and detection of the analytes were achieved using an Agilent GC system (6890 series) coupled with an Agilent MS detector (5973 series). The separation was performed on a Agilent HP5-MS column (length: 30 m; internal diameter: 250 µm; stationary phase thickness: 0,25 µm), with the following oven parameters: 90°C, 1min; 7,5°C.min⁻¹; 290°C, isothermal 5min. The injection volume was set at 2.5 µL (splitless; pulsed pressure: 25.0 psi), while the injector temperature was set at 250°C. The purge flow was set at 60 mL.min⁻¹ during 1.5 min.

Deuterated steroids were used as internal standards ; the ions used for quantification and confirmation are listed in Table 2. For a given peak, the ratio QI/QC was compared to that obtained with authentic standards analysed in full-scan mode, prior to definitive attribution of the peak. For each series, blank samples were run and the signals detected were equivalent to levels of steroids systematically lower than 0.2 ng.

Steroid	Internal standard	Identification and Quantification Ion (m/z)	Confirmation Ion (m/z)
E1	E2-d4	414	399
E2	E2-d4	416	285
E3	E2-d4	504	386
EE2	EE2-d4	425	440
MeEE2	EE2-d4	367	227
Pg	T-d3	458	443
DN	T-d3	456	316
No	T-d3	442	287

Table 2. Ions used for identification and quantification of the analytes

Optimisation of the Solid-Phase Extraction parameters

SPE sorbent

The recovery rates of the selected estrogens and progestagens were determined for three sorbents : the silica based Varian BondElut C18 and the polymeric sorbents OASIS HLB and IST Env+. The influence of the flow rate (5-20 mL.min⁻¹) and the breakthrough volume were assessed for the polymeric sorbents. Prior to sample analysis, BondElut C18 and Oasis HLB sorbents were conditioned with 2 x 4mL methanol, followed by 10 mL deionised water. Elution was also performed with 2x5 mL methanol. The Env+ sorbent was conditioned by passing successively 4 mL of ethyl acetate/acetone (1:1, v/v), 4 mL methanol and, eventually, 4 mL of deionised water for the equilibration. 10 mL of ethyl acetate/acetone (1:1, v/v) were used for the elution.

Sample clean-up

In an attempt to improve the limits of detection of the developed protocol, three clean up procedures were compared :

1. *Water/methanol mixture* : prior to drying, the Env+ cartridges were rinsed with 4 mL of a H₂O/MeOH mixture (1:1, v/v), and the effluent discarded.

2. *Silica cartridges* : the Env+ extract was first blown down to dryness under a nitrogen stream, at 40-50 °C. The residue was then dissolved in 2 mL of cyclohexane/acetone (65:53, v/v) and passed through a silica cartridge previously conditioned with cyclohexane and cyclohexane/acetone; steroids were directly collected and further eluted with 2 mL cyclohexane/acetone (adapted from [14]).

3. *Aminopropyl cartridges* : as for silica cartridges, the Env+ extract was first blown down to dryness. It was then dissolved in 2 mL of ethyl acetate/methanol (4:1, v/v) and passed through a LC-NH₂ cartridge; steroids were directly collected and further eluted with 2 mL ethyl acetate/ methanol [15].

WWTP effluent sample storage

The stability of the selected steroids in WWTP effluent during storage in bottled water was evaluated. For this study, steroids were added (100 ng.L⁻¹) to a 8L-WWTP effluent sample from the town of Tancarville (COD : 7.70 mg.L⁻¹; COP :1.13 mg.L⁻¹; MES : 3.2 mg.L⁻¹; pH : 8.0, conductivity : 1152 µS.cm⁻¹, salinity : 0.3). The sample was shaken vigorously and

left to equilibrate for 1 hour at room temperature since Lai et al [16] showed that maximal sorption occurred after 1h. The initial concentration of each compound in the dissolved phase was then determined as described above.

Subsequently, the remaining water was divided in four aliquots, each one undergoing a different treatment: no preservative added, 1% formaldehyde added, 1% methanol added and acidification to pH 3-3.5 with HCl 3M. All four bottles were stored at 4°C, in the dark. These storage methods are widely used in environmental steroid analysis [17]. After 24h, 48h and 7 days of storage, 200mL-aliquots were taken in each bottle and triplicate measurements of the steroids levels were performed using Env+ sorbent after filtration on GF/F filters. Cartridges were rinsed with 4 mL water/methanol (1:1, v/v) prior to drying and elution with 10 mL acetone/ethyl acetate (1:1, v/v).

Sampling and analysis of surface water and WWTP effluents

From March 2002 to November 2002, water samples were collected every two months in the Seine river estuary. Amber bottles were used and methanol or formaldehyde was immediately added to the samples (1%, v/v). The bottles were kept in the dark at 4°C until analysis within 24 hours after collection. Prior to the SPE step, 1L-water samples were filtered through pyrolysed (400 °C, 6h) GF/F glass fiber filters. About 25 ng of each deuterated standard (T-d3, E2-d4 and EE2-d4) were added to the sample before it was passed through the Env+ cartridges at a flow rate of 20 mL.min⁻¹. Cartridges were rinsed with MeOH/H₂O and subsequent drying and elution were performed as mentioned above.

RESULTS AND DISCUSSION

Recoveries, influence of the flow rate and breakthrough volume

The recovery rates for three different sorbents are presented in Table 3. All three sorbents exhibited good extraction efficiency for the selected steroids. E3 experienced slight breakthrough when extracted on Env+, whereas the Oasis HLB phase was capable to extract satisfactorily this compound, probably because of a higher capacity factor. Similar results were obtained by Lopez de Alda and Barceló [18].

Using Env+ sorbent, mean recoveries in spiked WWTP effluent (25 ng.L⁻¹ for each compound) exceeded 80 % for all the analytes. Results are similar to those obtained with Milli-Ω water. No matrix effect was observed with the effluent, except perhaps that the

recovery of E3 was higher in the effluent (90% instead of 60%). Relative standard deviations were lower than 15% in both matrices.

Compound	BondElut C18	ENV+	Oasis HLB
E1	101±10	97±2	88±15
E2	101±1	91±1	102±7
E3	70±5	60±5	93±13
EE2	85±8	110±10	83±11
MeEE2	90±5	105±6	78±12
Pg	96±9	100±8	76±8
DN	97±3	98±5	77±6
No	92 ±2	95±3	108±9

Table 3. Comparison of the recovery percentages obtained for the analysis (mean value±standard deviation, n=3) of Milli-Ω water samples (1L) spiked at 50 ng.L⁻¹ for each compound and extracted on three different sorbents.

Recoveries of steroids in 1L-samples were determined for the Env+ sorbent at 2 different flow rates : 5 and 15-20 mL.min⁻¹. No significant differences were observed between the two experimental conditions. Therefore, subsequent extractions were carried out at 15-20 mL.min⁻¹.

Recovery rates were also compared for several sample volumes, ranging from 1 to 4 L. As regards the Env+ sorbent, the results presented in Table 4 indicate that breakthrough occurs for samples volumes between 2 and 4 L, whatever the sorbent amount. Indeed, although good recoveries were achieved when processing a 2L-sample on a 200 mg cartridge, severe breakthrough occurred when analysing a 4L-sample with a 500 mg cartridge : the recovery of estrogens was below 10%, except for MeEE2 (85%). Thus, this sorbent is not suitable for analysis of samples which volume is larger than 2L. The Oasis HLB sorbent (200mg) exhibited good extraction recoveries towards the selected compounds, even for E3, and may therefore be used when large volumes of water have to be analysed (i.e., surface water).

Sample volume	2L	4L	4L	4L
Sorbent	Env+ 200 mg	Env+ 200 mg	Env+ 500 mg	Oasis HLB 200 mg
E1	97±3	3±2	4±1	75±7
E2	99±3	1±0	10±2	84±3
E3	47±2	0±0	0±0	80±4
EE2	110±2	6±1	8±2	71±14
MeEE2	109±11	85±1	85±10	73±19
Pg	74±2	75±2	96±4	93±5
DN	115±15	97±10	108±8	80±5
No	74±2	98±10	107±5	109±5

Table 4. Comparison of the recoveries obtained for the analysis (recovery ± standard deviation, n=3) of Milli-Ω water samples of different volumes (2-4 L) spiked at 50 ng.L⁻¹ for each compound and extracted on Env+ and Oasis HLB sorbents.

Sample clean-up – Limits of detection

So as to improve the limits of detection of the analytes, several protocols were tested to clean-up the extracts obtained from the Env+ cartridges. The use of NH₂ and silica cartridges reduced significantly the amount of co-extracted compounds. Rinsing the Env+ sorbent with 4 mL methanol/water (1/1, v/v) prior to the drying step, although slightly less effective than the previous procedures, gave good results too; the noise could be largely reduced and the limits of detection were lowered by a factor 5-8, depending on the analyte. Hence, the latter method was chosen for subsequent analysis of WWTP effluents, because of both its simplicity and its rapidity. As regards estrogens, the limits of detection of the developed protocol (S/N = 3) ranged from 0.3 to 8.0 ng.L⁻¹, depending on the analyte and on the matrix. The best results were obtained for E2 in surface water, while the highest limits of detection results were obtained for E3 in WWTP effluent. Regarding progestagens, the limits of detection were higher, ranging from 1,0 up to 8,0 ng.L⁻¹. The limits of detection depended on both the matrix composition and the derivatisation efficiency, and they exhibited a large inter-sample variability : for instance, the calculated limits of detection of E3 ranged from 0.8 up to 8.0 ng.L⁻¹.

Sample storage

As can be seen from the results presented in Table 5, serious problems of stability can arise during sample storage. When no preservative was added, severe losses of natural steroids occurred. Indeed, in such storage conditions, approximate half lives of natural steroids ranged from 8 hours (Pg) to 12 days (E3), while E1 and E2 exhibited intermediate half lives of respectively 87 hours (2.9 days) and 69 hours (3.6 days). No clear oxidation of E2 to E1 was observed. Synthetic estrogens and progestagens were found to be stable over the whole storage duration. It has to be noted that the loss of Pg was not due to sorption onto particulate matter. Indeed, this was checked by determining the steroids levels in the suspended solid phase. Briefly, steroids were recovered using microwave-assisted extraction and a mixture MeOH/H₂O (1:1) as the extraction solvent; the so-obtained extracts were then purified on Env+ SPE cartridges, as described above for water samples. Adsorption was not detected, in any of the four assays. This may be due to the low amount of suspended matter (3.5 mg.L⁻¹); previous studies dealing with binding of waterborne steroids to solid phase involved particle loads one order of magnitude higher [19], which may have favoured sorption.

Assay	No preservative			MeOH			HCl			Formaldehyde		
	24h	48h	7days	24h	48h	7days	24h	48h	7days	24h	48h	7days
E1	70±5	67±1	27±1	79±14	77±6	37±2	98±8	106±4	189±17	92±3	96 ± 9	113±5
E2	79±6	72±6	18±3	90±8	77±4	31±1	90±8	127±7	106±14	100±7	94±7	109±3
E3	105±14	112±3	62±1	111±7	115±10	65±3	153±19	115±13	174±24	109±1	98±7	107±3
EE2	99±15	101±6	104±8	99±14	103±4	92±1	92±5	94±2	86±9	92±1	81±5	96±3
MeEE2	98±12	102±20	74±20	109±4	103±10	100±14	107±11	113±20	105±11	98±11	84±8	94±4
Pg	14±2	8±4	2±1	21±5	18±8	1±1	73±7	61±6	87±19	73±2	67±3	82±5
DN	97±17	122±1	81±5	106±18	94±7	88±2	81±4	94±7	85±38	86±6	94±7	107±10
No	110±2	120±10	74±1	127±28	128±9	92±2	116±25	128±16	160±7	100±6	104±15	120±5

Table 5. Effect of various preservation treatments on the stability of sex steroids in the dissolved phase of WWTP effluent (results are expressed as mean percentage of the initial concentration (standard deviation , n=3).

The addition of 1 % MeOH (v/v) was not able to effectively slow down the biotic degradation of natural steroids for a 7 day-storage time. Conversely, formaldehyde was found to block the bacterial activity in the WWTP effluent since no significant loss of steroid was observed; similar results were published by Baronti et al [20] for longer storage times. Acidification to pH 3.5 also blocked the biologically mediated degradation of estrogens and progestagens, but coeluted matrix interferences strongly disrupted the quantification, as can be seen from high C/Co values (greater than 100%) and from the standard deviations (Table 5), higher than those observed with the other preservative treatments. As a consequence, the addition of formaldehyde was retained for long term storage (>24h), but MeOH was also used when analysis was performed within 24 h and when estrogens were the only analytes of interest.

Occurrence of sex hormones in the Seine river estuary

In most samples measured in this study, the levels of estrogens and progestagens were below the limits of detection (Table 6). Sex steroids were not detected in any surface water sample, whatever the salinity, the sampling season or the flow rate of the river. In an attempt to improve the limits of detection, an extraction procedure for 4-L samples was developed above, but the limits of detection were not improved because the baseline noise was higher than with 1-L samples.

As regards WWTP, sex steroids were not systematically detected in the three effluents investigated; similar observations were reported by several other studies [12, 20-23]. The sex steroid most commonly detected was E1 (1.8 to 8.3 ng.L⁻¹, figure 1). The slight seasonal variability of E1 levels in WWTP effluent may perhaps be partially explained by differences of efficiency in the waste water treatment: the lowest value was measured in July, warmest month of this study. Another, more likely, explanation is that this variability is due to our study being based on discrete sampling and WWTP effluent composition being highly variable [3;22]. E2 was never detected, probably because of its fast oxidation to E1 during the sewage treatment and E3 was detected only once, at a low concentration (3.1 ng.L⁻¹).

Although synthetic steroids were found to be more persistent in water samples than natural ones, they were not detected in the studied WWTP effluents. This is perhaps a consequence of the higher detection limits obtained for EE2, MeEE2, DN and No, but this may also be due to the relatively low amounts consumed for contraception purposes (about 30 µg of EE2 and 150 µg DN or No per woman and per day). As a comparison, the daily production of natural estrogens is close to 150 µg/woman/day [11] and that of progesterone range from 3 to 30 mg/woman/day [11].

Sampling Location	Kilometric point	Sampling Month	Concentration (ng.L-1)							
			E1	E2	E3	EE2	MeEE2	Pg	DN	No
Poses	200	March	<1.3	<1.0	<1.9	<1.8	<1.6	<2.5	<4.0	<2.5
		May	<1.2	<0.5	<2.0	<1.1	<1.0	<2.7	<5.9	<2.5
Caudebec	313	March	<1.3	<1.5	<1.9	<1.8	<1.6	<2.5	<4.0	<2.5
		May	<0.8	<0.5	<2.2	1.0	<0.4	<2.7	<3.8	<1.3
Honfleur	355	March	<1.2	<1.0	<1.0	<1.5	<1.0	<2.2	<4.5	<1.5
		May	<1.1	<0.8	<1.2	1.3	<0.8	<2.0	<5.0	<1.3
Elbeuf (WWTP)	220	March	<2.0	<1.9	<4.5	<3.0	<3.5	<5.0	<4.5	<5.0
		May	4.3±0.9	<3.8	<8.0	<5.3	<5.4	<8.0	<7.2	<6.5
		July	<3.5	<0.6	<4.9	<0.8	<0.7	<4.5	<6.7	<3.2
		September	<0.5	<0.4	<0.8	<0.8	<0.9	<3.5	<6.1	<4.3
		November	<4.3	<2.4	<5.6	<1.1	<1.1	<4.3	<6.3	<1.9
Rouen (WWTP)	245	March	<1.8	<1.9	<4.0	<2.9	<3.0	<3.5	<3.8	<5.2
		May	<3.0	<3.8	<8.0	<5.3	<5.0	<7.0	<7.2	<5.0
		July	<3.3	<0.5	3.5±1.0	<1.1	<1.1	<4.3	<6.0	<3.1
		September	<0.5	<0.4	<2.1	<1.0	<0.7	<3.5	<5.8	<4.0
		November	<3.4	<2.5	<7.3	<1.2	<0.9	<6.8	<2.5	<2.5
Tancarville (WWTP)	330	March	<2.8	<2.5	<3.0	<2.5	<2.7	<4.0	<3.2	<4.5
		May	4.2±1.0*	<0.8	<1.8	<0.7	<1.2	<1.7	<3.2	<1.1
		July	1.8±0.3	<0.3	<3.6	<1.0	<0.6	<3.7	<5.0	<3.3
		September	8.3±1.0*	<0.3	<1.9	<0.7	<0.7	<3.7	<4.3	<3.9
		November	4.9±0.2	<1.4	<5.0	<1.0	<1.1	<5.0	<5.0	<1.5

Table 6. Occurrence of selected sex steroids in surface water and WWTP effluent samples from the Seine river estuary. When C>limit of detection, results are presented as the mean value ± standard deviation (n=3). Otherwise, < X means < limit of detection and "*" means > limit of quantification.

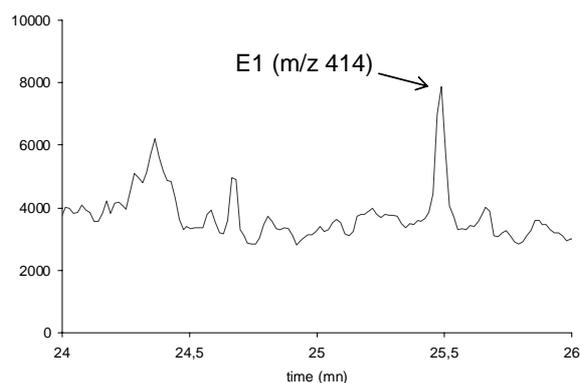


Figure 1. GC/MS chromatogram resulting from the analysis of estrone (ion $m/z = 414$) in treated sewage (Tancarville, September 2002).

To our knowledge, the fate of Pg within WWTPs has never been reported. In this study, we observed a fast degradation of Pg in spiked WWTP effluent samples. One can assume that this steroid is rapidly eliminated in sewers or during the sewage treatment and, hence, Pg levels in WWTPs effluents are well below the limits of detection of the analytical method presented in this paper. Vanderford et al. [24] reported concentrations of Pg in surface waters impacted by municipal effluent ranging from 14 up to 44 ng.L^{-1} , but these results were viewed with caution due to high concentrations in their blank sample (average level : 217 ng.L^{-1}).

CONCLUSION

An analytical procedure has been developed that enables the determination of five estrogens and three progestagens in waste water and surface water with good recoveries and limits of detection ranging from 0.3 ng.L^{-1} up to 8.0 ng.L^{-1} , depending on the matrix and on the analyte. It was found that sample storage is a critical step of steroid analysis in water samples ; formaldehyde (1%, v/v) must be added to the samples immediately after collection if natural steroids are to be analysed. Otherwise, dramatic degradation of Pg and, to a less extent, of E1 and E2 occurs. Application of the developed procedure to the Seine river estuary revealed no occurrence of steroids in surface water, the levels being lower than the limits of detection. The natural estrogens E1 and E2 were detected at concentrations below 10 ng.L^{-1} , only in sewage treatment plant effluents.

Acknowledgements:

The authors would like to thank the "Seine Aval" research programme for financial support. Pierre LABADIE was funded by the CNRS and the Aquitaine Regional Council.

REFERENCES

1. Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock MJ, Sumpter JP (1998) *Environ. Sci. Tech.*, 32 (1998), 1559
2. Tilton F, Benson WH, Schlenck D (2002) *Aquat. Toxicol.*, 61: 211.
3. Rodgers-Gray T, Jobling S, Morris S, Kelly C, Kirby S, Janbakhsh A, Harries JE, Waldock MJ, Sumpter JP, Tyler CR (2001) *Environ. Sci. Tech.*, 34 : 1521.
4. Rodgers-Gray T, Jobling S, Kelly C, Morris S, Brighty G, Waldock MJ, Sumpter JP, Tyler CR, (2001) *Environ. Sci. Tech.*, 35 : 462.
5. Larsson DGJ, Adolfsson-Erici M, Parkkonen J, Pettersson M, Berg AH, Olsson PE, Förlin L (1999) *Aquat.Tox.*, 45 : 91.
6. Solé M, Lopez de Alda MJ, Castillo M, Porte C, Ladegaard-Pedersen K, Barcelo D, (2000) *Environ. Sci. Tech.*, 34 : 5076.
7. Desbrow C, Routledge EJ, Brighty G, Sumpter JP, Waldock MJ (1998), *Environ. Sci. Tech.*, 32: 1549.
8. Aerni HR, Kobler B, Rutishauser BV, Wettstein FE, Fischer R, Giger W, Hungerbühler A, Marazuela MD, Peter A, Schönenberger R, Vögeli AC, Suter MJF, Eggen RIL (2003) *Anal. Bioanal. Chem.* 378 : 688.
9. Tronczynski J, Munsch C, Moisan K (1999), *Seine Aval programme*, vol 12, Editions Ifremer, Plouzané, France.
10. Minier C, Levy F, Rabel D, Bocquené G, Godefroy D, Burgeot, Leboulanger F (2000) *Mar. Env. Res.*, 50 : 373-377
11. D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, Samper R (2003) *Sci. Tot. Env.*, 302 :199-209.
12. Belfroid AC, Van der Horst A, Vethaak AD, Schäfer AJ, Rijs GBJ, Wegener J, Cifino WP (1999) *Sci. Tot. Env.*, 225 : 101.
13. Ternes TA, Kreckel P, Mueller J (1999) *Sci. Tot. Env.*, 225 : 81.
14. Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M (1999) *Sci. Tot.*

Env., 225: 81.

15. Le Bizec B, Marchand P, André F (2000) *An.Toxicol.Anal.*, 12 : 56.
16. Lai KM, Johnson KL, Scrimshaw MD, Lester JN (2000) *Environ. Sci. Tech*, 34: 3890.
17. Lopez de Alda M, Barceló D (2001) *Fresenius J.Anal. Chem.*, 371 : 437.
18. Lopez de Alda M, Barceló DJ (2001) *Chromatogr. A*, 938 : 145
19. Baronti C, Curini R, D'ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Samperi R (2000) *Environ. Sci. Tech*, 34 : 5059.
20. Kuch HM, Ballschmiter K (2000) *Fresenius J.Anal. Chem*, 366: 392
21. Huang CH, Sedlak DL (2001) *Environ. Tox. Chem*, 20: 133.
22. Snyder SA, Keith TL, Verbrugge DA, Snyder EM, Gross TS, Kannan K, Giesy JP (1999) *Environ. Sci. Tech.*, 33: 2814.
23. Williams RJ, Johnson AC, Smith JLL, Kanda R (2003) *Environ. Sci. Tech.*, 37 : 1744-1750.
24. Vanderford BJ, Pearson RA, Rexing DJ, Snyder SA (2003) *Anal. Chem*, 75 : 6265-6274.

Determination of steroid hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (nearby Bordeaux, France)

Pierre LABADIE et Hélène Budzinski

Les concentrations des formes libres et conjuguées de 8 stéroïdes hormonaux (œstrone, 17β -œstradiol, œstriol, mestranol, 17α -éthynylœstradiol, progestérone, noréthindrone et D-norgestrel) ont été déterminées dans l'effluent de la station d'épuration d'Eysines (près de Bordeaux), et dans la rivière recevant les effluents de cette station, la Jalle d'Eysines. Trois campagnes d'échantillonnage ont été menées (deux en conditions estivales, une en conditions hivernales), afin d'étudier les distributions spatiales et temporelles des stéroïdes hormonaux dans ce cours d'eau.

Seuls les œstrogènes naturels ont pu être détectés dans l'effluent de la station d'épuration d'Eysines, uniquement sous forme libre et dans la phase dissoute. L'œstrone, stéroïde majoritaire dans l'effluent, a été détecté dans les trois échantillons analysés ($17 - 71 \text{ ng.L}^{-1}$), tandis que le 17β -œstradiol et l'œstriol n'ont été détectés qu'une seule fois, à des niveaux nettement plus faibles ($< 5 \text{ ng.L}^{-1}$). En aval du rejet, les niveaux de stéroïdes étaient ainsi très nettement supérieurs aux limites de détection.

Des variations saisonnières de la vitesse de dégradation de l'œstrone ont pu être mises en évidence. Ainsi, en conditions estivales, la diminution apparente de la concentration en œstrone ne peut être expliquée par la seule dilution (estimée à partir des concentrations en bore dissous); on observe une chute de 50 % de la concentration initiale en œstrone en moins de 1.6 km en aval du rejet. Un effet saisonnier a été observé puisqu'en conditions hivernales aucune diminution significative de la concentration en œstrone n'a pu être mise en évidence dans la Jalle d'Eysines. Il apparaît que les phénomènes d'adsorption jouent un rôle mineur dans le processus observé, puisque l'œstrone n'a pu être détectée dans la phase particulaire des échantillons prélevés dans la Jalle d'Eysines. Par conséquent, il est plausible que la biodégradation des œstrogènes naturels soit le processus central dans le phénomène observé, et les différences observées entre les différentes campagnes d'échantillonnage sont probablement liées à des différences d'activité bactérienne dans la Jalle d'Eysines.

Publication n2, soumise à Environmental Science & Technology

Determination of steroid hormone profiles along the Jalle d'Eysines river (nearby Bordeaux, France)

Pierre LABADIE and H el ene BUDZINSKI

ABSTRACT

Concentrations of conjugated and unconjugated hormonal steroids (estrone, 17 β -estradiol, estriol, 17 α -ethynylestradiol, mestranol, progesterone, norethindrone and D-norgestrel) were determined in the effluent of the Eysines sewage treatment plant (nearby Bordeaux, France), and along the receiving river, the Jalle d'Eysines River. Sampling was undertaken in summer and in winter conditions, so as to study both the temporal and the spatial distribution of steroids in this river. Only unconjugated natural estrogens were detected in the effluent. Estrone was the dominant compound (detected in all effluent samples: 17.1-71.0 ng.L⁻¹) while estradiol and its metabolite estriol were detected only once, at much lower levels (4.4 and 2.9 ng.L⁻¹, respectively). Levels of estrogens were clearly raised above the detection limits downstream of the Eysines STP effluent discharge. Seasonal variations of estrone degradation rates were observed. In summer, the apparent decay rates of estrogen levels exceeded that of dilution, indicating high removal rates from the water column : 50% of the initial amount of this steroid was degraded within 1.65 km downstream of the effluent discharge. In winter, however, estrone levels did not significantly decrease over a 10 km-reach downstream of the effluent discharge (1.9-1.8 ng.L⁻¹). Steroids were determined in the particulate material of the river but levels were below the detection limits (0.4-1.9 ng.g⁻¹), indicating that sorption was not a major sink of estrogens. Therefore, it is likely that biodegradation plays a major role in the removal of steroids from the river and the different decay rates are probably related to differences in bacterial activity within the river.

INTRODUCTION

There is a growing concern about the occurrence of estrogenic substances in aquatic systems impacted by anthropogenic activities [1]. Alteration of the sexual function has been observed in fish living downstream of sewage treatment plants (STP) [2-5]. Natural estrogens (estrone and 17 β -estradiol) as well as the synthetic estrogen 17 α -ethynylestradiol contribute to a large extent to the estrogenicity of STP effluents [6, 7]. These chemicals are active at trace levels; for instance, 17 α -ethynylestradiol has been reported to induce the production of vitellogenin, a protein normally synthesised only by female fish, in male rainbow trout at concentrations as low as 0.1 ng.L⁻¹ [9]. The occurrence of estrogens in sewage effluents and in receiving waters at trace level (ng.L⁻¹) has been well documented [10-19].

The aim of this study was to investigate the occurrence of eight steroids in the effluent of the Eysines sewage treatment works and in the receiving river, the Jalle d'Eysines River (nearby Bordeaux, France). The target analytes were natural estrogens (estrone, 17(-estradiol and estriol), synthetic estrogens (17(-ethynylestradiol and mestranol), a natural progestin (progesterone) and synthetic progestins (norethindrone and D-norgestrel). The latter compounds were included in the study because they are often associated to estrogens in contraceptive treatments, at concentrations exceeding those of estrogens 5 to 10-fold. Furthermore, the degradation products of norethindrone may behave as agonists of the estrogens receptor ER([20]. Steroid profiles were determined with measurements performed on samples taken upstream and downstream (up to 10 km) of the discharge. The seasonal variations of steroid profiles were studied, with sampling undertaken under early/late summer and mid-winter conditions. Furthermore, both conjugated and "free" (unconjugated) forms of the sex steroids were determined since recent studies reported the occurrence of steroid conjugates in STP effluents and surface waters [21, 22]. Although being endocrinally inactive, these species are a potential source of free, active, steroids in the environment. To achieve these objectives, an analytical procedure was developed and validated for the analysis of unconjugated and conjugated steroids in surface water and effluent samples.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All native steroids were supplied by Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France; purity > 98 %): estrone (E1), 17(-estradiol (E2), estriol (E3), 17(-ethynylestradiol (EE2), mestranol (MeEE2), progesterone (Pg), norethindrone (No) and D-norgestrel (DN), 17(-estradiol-17-glucuronide (E2G), 17(-estradiol-3-sulphate (E2S). Deuterated steroids (testosterone-d3 (T-d3), 17(-estradiol-d4 (E2-d4) and 17(-ethynylestradiol-d4 (EE2-d4), isotopic purity > 99%),

used as internal standards, were obtained from C/D/N Isotopes (Montreal, Canada). Stock solutions were prepared in methanol at 100-200 µg.g⁻¹ and stored at 4°C.

All solvents were either HPLC grade or Organic residue analysis and were obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Nitric acid 70% (Baker Instra-Analysed® for trace metal analysis) and hydrochloric acid 37% (Reagent grade) were also obtained from Atlantic Labo. Solid-phase extraction (SPE) was carried out using 200 mg-Oasis HLB cartridges (Waters, St Quentin en Yvelines, France) and 500 mg-LC-NH₂ cartridges purchased from Supelco (St Quentin Fallavier, France). Triethylamine (TEA; purity > 99%) was used for some SPE procedures (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Trifluoroacetic acid (Reagent grade, purity > 99%) was obtained from Fischer chemicals (Fischer Scientific Labosi, Elancourt, France). MSTFA (N-Methyl-N(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, purity > 97%; Acros Organics, Noisy-Le-Grand, France) was used as the silylation agent for GC/MS analysis of the steroids, in combination with mercaptoethanol and ammonium iodide (both from Acros Organics, purity > 99%). Deionized water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). (-glucuronidase-arylsulphatase from *Helix pomatia* (glucuronidase: 100 000 Sigma units.mL⁻¹ and sulphatase: 7500 Sigma units.mL⁻¹) was supplied by Sigma-Aldrich. Sodium acetate tri-hydrate (purity > 99%, Sigma Aldrich) and acetic acid 100 % (analytical reagent grade, VWR International, Strasbourg, France) were used for the preparation of acetate pH buffer. Whatman GF-F glass fibre filters (pore size 0.7 µm) were purchased from VWR International.

Sampling location and procedure

The Eysines sewage water treatment plant (STP) is located in the northern suburbs of Bordeaux (France). This medium-sized works serves a catchment of about 50 000 population equivalent, ensuring the treatment of mainly domestic sewage through both primary and secondary treatments. The Jalle d'Eysines is the river receiving the effluent of the Eysines STP and runs in agricultural and residential areas. It is heavily impacted by the STP, because treated effluent can account for up to 33 % of its flow (data shown below, see *Steroids profiles in the Jalle d'Eysines River* in the Results & Discussion section). The location of the sampling stations along the river is presented in figure 1. A preliminary study was undertaken on 7 July 2003, with one reference station chosen about 2 km upstream of the STP and four stations selected up to 10 km downstream of the effluent discharge. Sampling started at 10.00 and about 4 hours were required to collect all samples. For subsequent sampling campaigns (23 September 2003 and 2 February 2004), five stations were studied downstream of the STP; as for the July 2003 campaign, samples were taken

between 10.00 and 14.00. For all three campaigns, steroids levels were also determined in the effluent itself but bed sediments were not sampled due to either access problems or to the type of bottom substrate (gravels).

River water and effluent samples were collected in amber glass bottles, previously detergent washed, acid rinsed and pyrolysed at 450°C for 6 hours. Samples were stored at 4°C and formaldehyde (1%, v/v) was added immediately after collection to prevent bacterial degradation of natural steroids [23]. Filtration was carried out within 12 hours after sample collection and filtrates were analysed within 24 h.

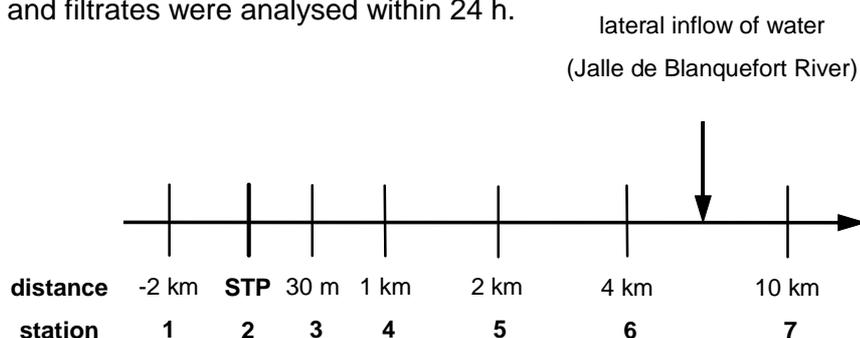


Figure 1. Sampling stations along the Jalle d'Eysines River

Sample preparation

Dissolved phase of river water and STP effluent

A scheme of the SPE procedure is given in figure 2 ; 1L-water samples were filtered through pyrolysed (450 °C, 6h) GF/F glass fibre filters , spiked with internal standards (T-d3, E2-d4 and EE2-d4, about 20 ng each) and pH was adjusted at 3-5 with diluted hydrochloric acid (30%). Extraction of the analytes was then performed using 200-mg Oasis HLB cartridges (flow rate 15-20 mL.min⁻¹) previously conditioned with 6 mL of methanol and 6 mL of Milli-Q water (3 mL.min⁻¹). The cartridge was washed with 3 mL of Milli-Q water and the steroids conjugates were eluted with 5 mL of methanol/Milli-Q water (6:4, v/v) containing triethylamine (TEA), which concentration in the mixture was 5.10⁻³ M. The sorbent was then dried with a nitrogen flow (positive pressure), and the free steroids were eluted with 8 mL methanol. The latter fraction was evaporated at 50°C under a nitrogen stream. The residue was cleaned-up using aminopropyl-silica based cartridges conditioned with 4 mL of ethyl acetate and 4 mL of ethyl acetate/methanol (4:1, v/v). The dried Oasis HLB extracts were first dissolved in 2 mL of the latter solvent and then sucked through the NH₂ cartridges. The steroids passed unretained through the sorbent and the eluate was directly collected; the cartridges were further rinsed with 2 mL of the solvent mixture and the final extracts were taken to dryness, at 50°C under a nitrogen stream prior to silylation. A mixture of 250 µL

MSTFA, 15 μL mercaptoethanol and 10 mg NH_4I was left for about 10 min at 65 $^\circ\text{C}$; thereafter, this mixture was diluted 10 times with MSTFA to obtain the derivatisation reagent, 30 μL of which were added to each extract and the samples were left at 65 $^\circ\text{C}$ for 30-40 min. Eventually, 30 μL of dichloromethane were added prior to GC/MS analysis.

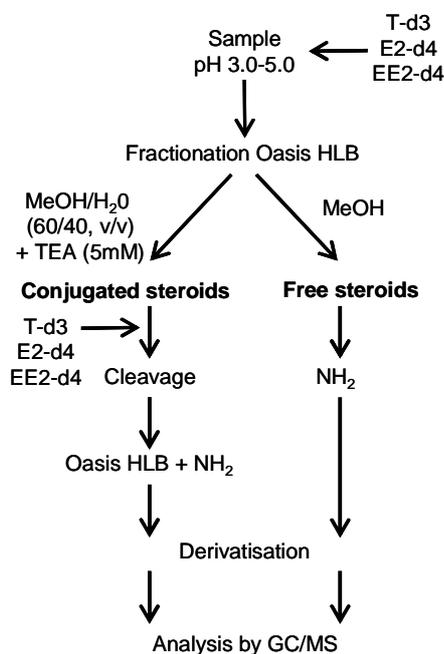


Figure 2. Schematic analytical procedure for the analysis of unconjugated and conjugated steroids (river water and STP effluent).

Solvolysis, enzymatic hydrolysis and purification

Steroid conjugates are not readily analysed by GC/MS, because of both their low volatility and their high polarity. Therefore, the dried residue of the Oasis HLB conjugated fraction was subjected to both solvolysis and enzymatic hydrolysis. Extracts were incubated at 45 $^\circ\text{C}$ for 30 min with trifluoroacetic acid/methanol/tetrahydrofuran (10/200/800 μL , adapted from [24]). After neutralisation with 400 μL of Na_2CO_3 , the organic solvents were evaporated at 60 $^\circ\text{C}$ under a gentle nitrogen stream. Sodium acetate buffer (5 mL, pH 5.0, 10^{-2} M) and 30 μL β -glucuronidase-arylsulphatase were added and the samples were further incubated at 55 $^\circ\text{C}$ for 3 hours [adapted from 25]. These extracts, containing only unconjugated steroids, were purified using Oasis HLB and aminopropyl SPE cartridges as previously described.

Particulate phase of river water and STP effluent

For each station, the filters used for sample filtration (pore size: 0.7 μm) were combined (particle load equivalent to 3 L of either river water or effluent: about 15 and 150 mg,

respectively). Steroids were then extracted by Focussed Microwave Assisted Extraction (Microdigest 301, Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France): 30 W, 5 min, 10 mL of methanol/Milli-Q water (55:45, v/v). The extracts were then centrifuged at 4500 rpm during 5 min. The supernatant was transferred to a vial and the methanol content of the extracts was evaporated at 60 °C under a nitrogen stream. The residues were then purified with Oasis HLB and NH₂ cartridges, as described above. Detection limits were in the range 0.4-1.9 ng.g⁻¹ of particulate material.

Analysis of SPE extracts

Analysis of the derivatised steroids contained in the SPE extracts were achieved using an Agilent Gas Chromatograph system (6890 series) coupled with an Agilent Technologies Mass Spectrometer Detector (5973 series), used in electron impact mode (70 eV). The separation was performed on an Agilent Technologies HP5-MS capillary column (length: 30 m; internal diameter: 250 µm; stationary phase thickness: 0.25 µm), with the following oven parameters: 90°C, 1 min; 7.5°C.min⁻¹, 290°C, isothermal 5 min. The injection volume was set at 2.5 µL (splitless; pulsed pressure: 25.0 psi during 60 s), while the injector temperature was set at 250°C, and the purge flow was set at 60 mL.min⁻¹ during 1.5 min; helium 6.0 (Linde, Bassens, France) was used as the carrier gas (constant flow: 1 mL.min⁻¹). Acquisition was performed in selected ion monitoring mode (SIM), with three acquisition windows (dwell time 85 ms). The source temperature was set at 230°C, and the electron multiplier voltage ranged from 1500 up to 1800 V. For each analyte, two ions were monitored, generally the molecular ions M⁺ and the ion corresponding to the loss of a methyl group, [M-CH₃]⁺. The ions selected for quantification and identification purposes were, respectively, m/z 416 (M⁺) and 285 for E2, 414 (M⁺) and 399 for E1, 504 (M⁺) and 386 for E3, 425 (M⁺) and 440 for EE2, 367 (M⁺) and 227 for MeEE2, 456 (M⁺) and 316 for DN, 442 (M⁺) and 287 for No, 458 (M⁺) and 443 for Pg. For a given peak, the ratio quantification ion area to confirmation ion area was compared to that obtained with an authentic standard, prior to definitive attribution of the peak. T-d3 (m/z 435) was used as internal standard for the quantification of progestins, while E2-d4 (m/z 420) and EE2-d4 (m/z 429) were used to quantify natural and synthetic estrogens, respectively. For each series of analyses, blank samples were run and levels of steroids in these controls were usually lower than 0.1 ng and, in most cases, lower than 0.05 ng.

Other parameters

For both river water and treated sewage effluent, samples were taken for boron determination. They were acidified immediately after filtration (< 0.7 µm) with 1% nitric acid

and stored at 4°C for up to 4 months prior to analysis. Analysis was performed with an ICP-MS analyser (HP 4500, Agilent Technologies) equipped with a cross flow nebuliser and with nickel cones. Operating parameters were set as follows: power 1250 W, plasma gas flow rate 15 L.min⁻¹, nebuliser gas flow rate 0.98 L.min⁻¹, auxiliary gas flow rate 0.8 L.min⁻¹, sample flow rate 1 mL.min⁻¹ pulse counting as detection mode and dwell time 200 μs. The external calibration range was 5-100 μg.L⁻¹. Results were drift corrected using rhodium (25 μg.L⁻¹) as internal standard and blank corrected. The analytical procedure was validated using a sample with a certified value for boron level (NIST SRM 1640, [B] = 301.1 ± 6.1 μg.L⁻¹). Results (expressed as mean value ± standard deviation) were within 10% of the certified level : 308.6 ± 22.4 μg.L⁻¹ (7 July 2003), 273.8 ± 1.8 μg.L⁻¹ (23 September 2003) and 287.5 ± 12.0 μg.L⁻¹ (2 February 2004). Dissolved organic carbon and particulate organic carbon (> 0.7 μm) were determined with a LECO CS125 and a SHIMADZU 5000A analysers, respectively. Samples for dissolved organic carbon were preserved with phosphoric acid (0.15%, v/v) and all samples (including those for particulate organic carbon) were stored at 4°C immediately after collection and until further analysis. The average river water temperature was also monitored : 22°C in July 2003, 18 °C in September 2003 and 10 °C in February 2004.

Statistical analysis

Statistical analysis of the steroid levels and non-linear least squares curve fitting of steroids profiles were performed using Prism[®] software (GraphPad Software Inc.).

RESULTS AND DISCUSSION

Analytical procedure: fractionation, extraction, purification and conjugates cleavage

A pilot study was performed to optimise the fractionation procedure. For this purpose, E2S and E2G were chosen as model conjugates. E2S, E2G and a mixture of 8 unconjugated steroids were added to pH 5.0 Milli-Q water samples. Several solvent mixtures were tested for the elution of the first fraction, the goal being the selective elution of conjugated (polar) forms with minimal elution of unconjugated forms. Oasis HLB was found to be a suitable sorbent for this purpose, when conjugates were eluted with methanol/Milli-Q water (6:4, v/v) containing 5 mM TEA. The developed procedure enabled the separation of conjugates from free steroids; the recovery (in the first HLB fraction) of E2S was 85.0 ± 4.8 % (n = 9) and that of E2G was 98.0 ± 14.3 % (n = 9). For all compounds, recoveries of free steroids (second fraction) were higher than 85% with CV lower than 25% (n = 9). Low amounts of E3 were recovered in the first fraction (< 5%), potentially leading to an overestimation of E3 conjugated levels.

The extraction yield from river water and effluent samples was assessed using samples spiked with about 50 ng.L⁻¹ of each analyte. The concentrations of steroids prior to spiking had been determined, with most analytes being below the detection limits in both samples, except E1, E2 and E3 in the effluent sample (57.8, 4.4 and 2.9 ng.L⁻¹, respectively). In both surface water and effluent, recoveries were higher than 80% for all analytes, including conjugates, with standard deviations lower than 10% (n=3). The recovery of E2G was increased when sample pH was lowered from around 8.0, approximate river water pH (recovery 53%), down to 5.0 (recovery 84 %), whereas E2S extraction was not pH-dependent (98% at pH 8.0, 101 % at pH 5.0).

A solvolysis step adapted from [24], was included in the analytical procedure to insure the complete cleavage of all steroid sulphates present in the analysed samples. The cleavage yield of the combined procedure (solvolysis followed by enzymatic hydrolysis, carried out on standard solutions) was 99 % for E2S (CV: 12%, n=9) and 88 % for E2G (CV: 8%, n=9).

The limits of detection (LOD) of steroids in effluent or river water samples were set at three times the background noise of the chromatograms and it was found that they were dependent on the sample composition, since up to 5-fold inter-sample variations were observed for some compounds. LODs in effluents are presented in table 1. In surface water, the LODs were as follows: 0.3-1.0 ng.L⁻¹ for E1, 0.3-1.0 ng.L⁻¹ for E2, 0.5-1.0 ng.L⁻¹ for E3, 0.4-3.0 ng.L⁻¹ for EE2, 0.7-3.0 ng.L⁻¹ for MeEE2, 0.5-3.0 ng.L⁻¹ for DN, 0.4-3.0 ng.L⁻¹ for No and 3.0-9.0 ng.L⁻¹ for Pg. In addition, LODs in the conjugated fraction were in the same range than those observed in the free fraction. In an attempt to lower the LODs for river water samples, the sample volume was increased from 1 to 4 L for the reference station (station 1, 7 July 2003). This proved, however, to be useless: although no breakthrough of the analytes occurred (data not shown) the minimum detectable amount in 4-L sample extracts was about 5 times higher (mean value) than in 1-L sample extracts (range: 1.7-8.7, depending on the steroid), due to increased background noise. This showed that further purification of the extracts, such as HPLC fractionation, was required for the analysis of 4-L samples.

Steroids in the Eysines STP effluent

Only free steroids were detected in the effluent from the Eysines STP. E1 was the dominant steroid and was detected in the dissolved phase for all three analysed samples. As shown in table 1, E1 concentrations exhibited large inter-sample variations and ranged from 17.2 to 71.0 ng.L⁻¹ although samples were taken at the same time of the day (around 10 am) for all three sampling campaigns. These variations may be due to changes of the influent

composition or may just reflect differences in removal efficiency. The measured levels were higher than those predicted by Johnson and Williams [26], but in the same range than those reported by Baronti for roman STPs [27]. For all three analysed effluent samples the area ratio m/z 414 to m/z 399 was within 5 % of that obtained with an authentic E1 standard. This confirmed both peak attribution and quantification or, at least, showed the absence of major interference from the matrix. These high E1 concentrations are possibly linked to a low efficiency of the sewage treatment, because the investigated STP is overloaded and is currently being re-designed. E2 and E3 were detected in the September sample only, at much lower level ($< 4 \text{ ng.L}^{-1}$). The synthetic estrogens EE2 and MeEE2 were not detected in the analysed samples; as regards MeEE2, this is very likely to be due to the fact that this compound is rapidly and almost entirely converted into EE2 by demethylation [28], after administration. Concerning EE2, its levels are usually about one order of magnitude lower than that of E1 [10-11, 27-29]. Furthermore, Johnson and Williams [26] predicted EE2 effluent levels in the range $0.13\text{-}0.76 \text{ ng.L}^{-1}$, lower than the detection limits achieved with the protocol developed in the present study.

Steroid	July 2003	Sep 2003	Feb 2004
E1	71.4	57.8 ± 2.8	17.2 ± 0.3
E2	<2.0	4.4 ± 0.8	<1.0
E3	<1.0	2.9 ± 0.1	<1.0
EE2	<4.0	<2.0	<1.0
MeEE2	<2.0	<2.0	<2.0
Pg	<9.0	nd	nd
No	<5.0	<1.0	<2.0
DN	<5.0	<2.0	<2.0

Table 1. Steroid concentrations (ng.L^{-1}) in the effluent of the Eysines STP. Results above the quantification limits are expressed as mean values \pm standard deviations ($n=3$, except in July, $n=1$) and $<X$ means $<$ detection limit (ng.L^{-1}). nd: not determined because of matrix interference.

Neither natural nor synthetic progestins were detected in the effluent, due to either high detection limits or to matrix interferences (table 1). Progesterone was found to degrade quickly (half-life 8 hours) when incubated in STP effluent (data not shown), suggesting very efficient degradation during wastewater treatment and, consequently, extremely low levels in the effluent. The synthetic progestins are not expected to be present in high amounts in STP influents. In effect, although the average daily intake dose of DN or No exceed about 5-10 times that of EE2, these compounds are extensively metabolised prior to their excretion

(reduction of A ring and hydroxylation, leading to the formation of polar metabolites [20; 28]), whereas EE2 is excreted mainly in its conjugated unchanged form [29]. Furthermore, because of high removal rates for progestins during sewage treatment [30], the expected effluents levels of DN and No are presumably lower than the detection limits obtained in this study.

Steroids were not detected in the conjugated fraction of the effluent dissolved phase (LOD: 0.6–4.1 ng.L⁻¹ for estrogens; 2.0 – 9.0 for progestins, depending on the analyte and on the sample). This suggests high cleavage rates during the sewage treatment, even for E1-3-sulphate which is relatively resistant to bacteria-mediated cleavage [22]. High cleavage rates of estrone conjugates could partly explain the high levels of E1 measured in the free fraction, because E1 conjugates can represent up to 40 % of total E1 entering STPs [22].

Calculated logK_{ow} of progestins are similar to those calculated for estrogens (2.81 – 4.67, [31]): 2.99 for norethindrone, 3.44 for D-norgestrel and 3.67 for progesterone [32]. Hence, one can reasonably expect progestins to be relatively weak sorbates, like estrogens that exhibit suspended sediment distribution coefficients in the range 19-260 L.kg⁻¹ [33]. Steroids were not detected in the in the particulate phase (> 0.7 µm), even estrone that was present at high concentrations in the dissolved phase. This may reflect the rather low levels of suspended particulate material present in the effluent (around 50 mg.L⁻¹, with an average carbon content of 30%), although other parameters such as particle size distribution should also be taken in consideration [33]. Another explanation for the undetectable amount of particulate matter-associated estrogens could be the possible presence of large quantities of organic colloids in the effluent, since rather high levels of organic carbon were measured in the dissolved phase (<0.7 µm) of the Eysines STP effluent (mean value: 16.3 mg.L⁻¹). Wastewater colloids are efficient sorbents for steroids, with sorption coefficients one or two orders of magnitude higher than those observed for river bed sediments or river suspended solids [34]. Thus, the colloidal content of the effluent may have influenced steroid partitioning and may have increased the amount of E1 in the fraction < 0.7 µm.

Steroids profiles in the Jalle d'Eysines River

Three sampling campaigns were undertaken along the Jalle d'Eysines River in July 2003, September 2003 and February 2004. The aim was to study both the temporal and the spatial distribution of hormonal steroids in this river. The July campaign was conducted as preliminary work, to assess the extent of the contamination by steroid hormones. For the last two campaigns, measurements were carried out in samples taken at 6 stations along the river, as well as in the effluent itself.

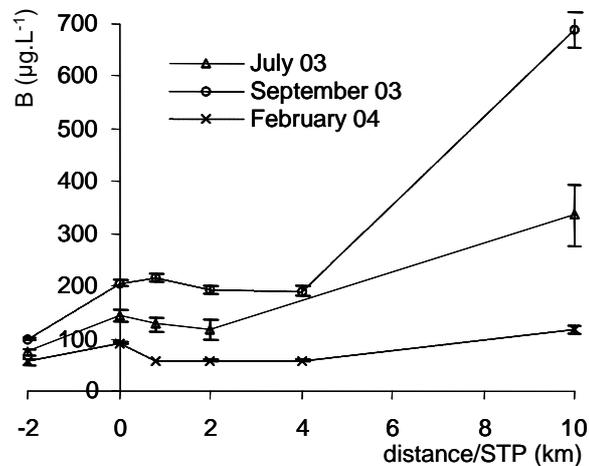


Figure 3. Dissolved boron concentrations ($\mu\text{g.L}^{-1}$) measured in the Jalle d'Eysines River. Results are expressed as mean values and the error bars correspond to the standard deviation ($n=5$).

Boron occurs in river water as the inert species borate. Originating from both domestic and industrial detergents, it is released into aquatic systems via wastewater. This element has previously been used as a conservative tracer of sewage pollution [10, 35] because, provided no lateral input of boron occurs, changes of its concentration downstream of a sewage discharge are directly related to dilution of the effluent. Elevated boron concentrations were measured in the STP effluent ($289\text{-}511 \mu\text{g.L}^{-1}$) but boron was also detected upstream of the STP (average concentration: $76 \mu\text{g.L}^{-1}$); this rather high mean level suggests the occurrence of wastewater input upstream of the reference station, possibly via domestic sewers of some of the houses located near the river. Boron data showed that, downstream of the discharge, the Eysines STP effluent accounted for 9-33 % of the river flow. The maximum value was observed in July, during a period of low flow, whereas the minimum value was observed in February, just after a period of heavy rain and while the level of the Jalle d'Eysines River was high (spate conditions). Four kilometres downstream of the effluent discharge (station 6, see fig. 1), the average decrease of boron concentration was 20% (fig. 3), indicating a small dilution that may arise from diffuse input of water to the Jalle d'Eysines River. At station 7, however, boron levels exhibited an average 2.5-fold increase compared to station 3, and were even higher than in the Eysines STP effluent itself

(July and September only). This indicated a large boron lateral inflow from the Jalle de Blanquefort River (see fig. 1), probably contaminated by the numerous factories located in its vicinity. As a matter of fact, and because relative flows of the two rivers were unknown, dilution of the Eysines STP effluent could not be assessed for station 7. Overall, boron measurements allowed the calculation of theoretical concentrations of E1, E2 and E3, assuming dilution only. Results are presented in figures 4 and 5. Steroids were not detected at station 1 (reference station), but levels of estrogens increased significantly downstream of the effluent discharge (Kruskal-Wallis test, $p < 0.01$ for E1 for both summer campaigns; $p < 0.05$ for E2 and E3 in September 2003).

For all three samplings, E1 was detected up to 10 km downstream of station 3, but only in the unconjugated fraction (figure 4). In July and in September 2003, E1 levels decreased significantly downstream of station 3 ($p < 0.01$). The apparent decrease rate for measured [E1] followed first order exponential decay rates for both sampling campaigns: $[E1]_{\text{measured}} = 30.46e^{-1.26\text{distance}}$ ($R^2=0.99$) in July and $[E1]_{\text{measured}} = 22.78e^{-0.42\text{distance}}$ ($R^2=0.99$) in September. Derived from these equations, calculations showed that the initial concentration of E1 at station 3 exhibited a 2-fold decrease within 0.55 km downstream of the discharge in July and within 1.65 km in September. In both cases, dilution was too low to explain entirely the observed decrease, as in the study of Williams et al [10]. When E1 levels were corrected for dilution, the following equations were obtained: $[E1]_{\text{dilution}} = 30.45e^{-1.07\text{distance}}$ ($R^2 = 0.98$) in July and $[E1]_{\text{dilution}} = 22.42e^{-0.42\text{distance}}$ ($R^2 = 0.99$) in September, indicating that the decay rates were higher within the first kilometres downstream of the discharge. The observed decay rate was apparently higher in July than in September. However, the river flow and, hence, the water velocity were unknown; thus, the intrinsic decay rates (as a function of time) could not be compared since it was impossible to assess the inter-station transit times. The apparently higher degradation rate (with respect to distance) observed in July is perhaps just a consequence of a longer transit time between stations 3 and 4, which may have favoured degradation of estrone.

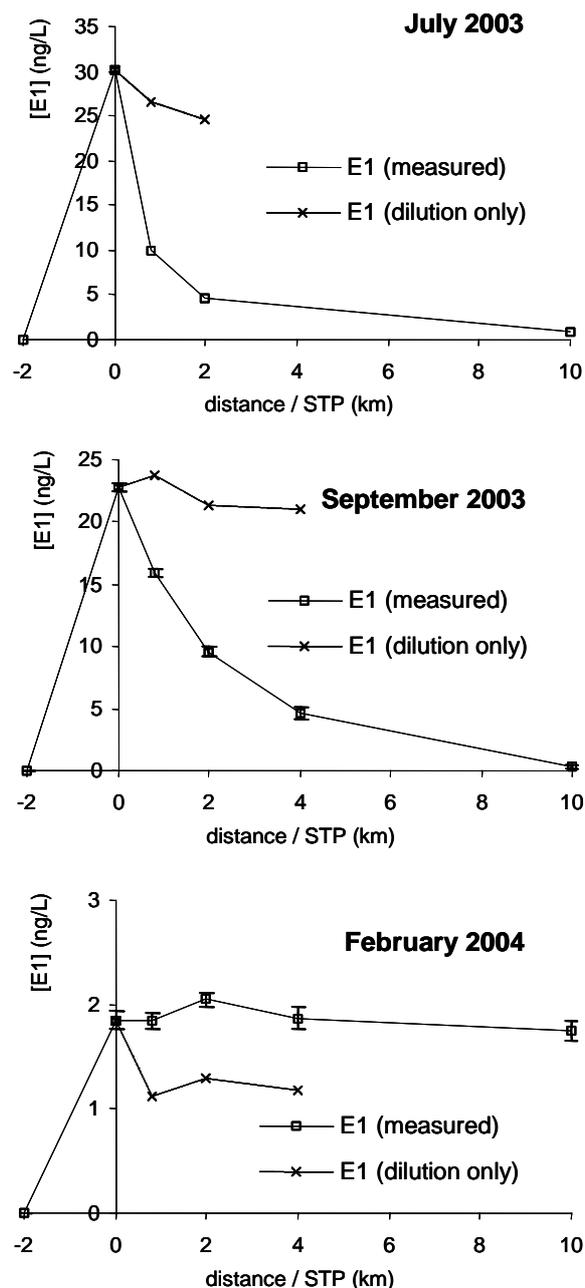


Figure 4. Mean concentration of estrone along the Jalle d'Eysines River (July 2003, September 2003 and February 2004). The error bars represent the standard deviation of the mean (n=3).

E1 was not detected in the particulate fraction, which tends to indicate that sorption is not considered to be a major sink for estrone in the Jalle d'Eysines River. Holthaus and co-workers [33] showed that in riverine systems removal through sorption processes was not expected to represent more than 1% of the dissolved amount of either E2 or EE2, even in the case of a particle load of 52 mg.L^{-1} with an organic carbon content of 8%. E1 removal by sorption onto suspended particulate matter should be in the same range, since Lai et al reported that the sorption coefficient for E1 was within 10% of that of E2 [31]. Conversely,

biodegradation is likely to be the main responsible for E1 removal from the river water. Jürgens and colleagues [36] showed that aerobic river microorganisms were able to degrade estrogen steroids, with modelled half-lives for E1 in the range 0.1-7.2 days, depending on both the sampling season and the river. They also reported that the degradation rates were higher during the summer months and attributed this to higher metabolic rates in the bacterial community. This is in good agreement with our results, which show a fast degradation of E1 in early and late summer months but no degradation in winter ($p > 0.05$ for the February 2004 campaign). In February 2004, the flow rate of the river was much higher than in September, about three times if assuming a constant effluent flow. Combined with minimal biologically mediated degradation, this could explain why no significant loss of E1 was observed along the investigated river stretch. For the February campaign, the calculated E1 levels – assuming dilution only – were lower than the measured levels; this is thought to arise from a possible contamination of the station 3 sample used for boron measurement, leading to an overestimation of boron level in at station 3. The trend observed downstream of station 3 shows, however, that no dilution occurred between stations 4 and 6 (respectively 1 and 4 km downstream of the effluent discharge).

Because summer sampling campaigns were undertaken during periods of warm sunny weather, photolysis may have increased E1 degradation rates. Jürgens et al [36] reported half-lives of about 5 days for both E2 and EE2 in irradiated samples, under controlled conditions; one would expect similar results for E1. They estimated that this was roughly equivalent to 10 days in an English river, suggesting that photolysis was much lower than biodegradation, at least for natural estrogens. Given the comparatively higher solar irradiation levels in South-Western France, photolysis rates may have been higher in the Jalle d'Eysines River than in the rivers studied by Jürgens and colleagues [36]. Still, photolysis was probably not a significant removal mechanism when compared to biodegradation.

E2 and E3 were detected in the river water at ng.L^{-1} level during the September 2003 campaign (fig 5), but solely in the dissolved phase. As for estrone, the levels of these two steroids in the river exhibited a rapid decrease, the apparent loss rate being higher than the dilution rate. E2 and E3 were not detected downstream of station 6. The decrease rates for these two analytes were not modelled because levels measured downstream of station 3 were higher than the detection limit but lower than the quantification limit. Logically, steroids not detected in the effluent (progestins and synthetic estrogens) were not detected either in the Jalle d'Eysines River.

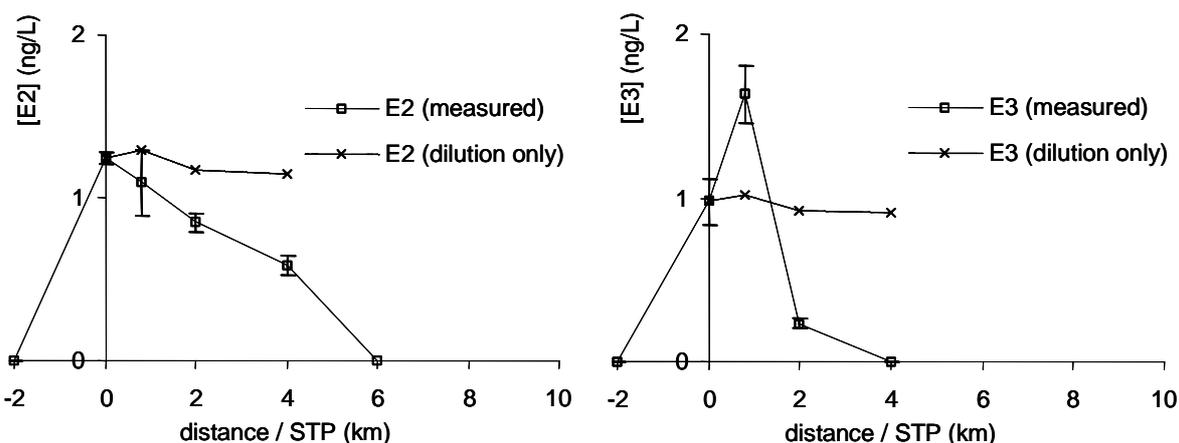


Figure 5. Mean concentration of 17 β -estradiol (E2) and estriol (E3) along the Jalle d'Eysines River (September 2003). The error bars represent the standard deviation of the mean (n=3).

This work demonstrated the occurrence of steroid estrogens up to 10 km downstream of a treated sewage discharge, with unconjugated estrone being the dominant compound. During the summer months, E1 levels declined rapidly with respect to distance, since 50% of E1 was degraded within 1.7 km downstream of the STP. Sorption was not a significant removal mechanism, suggesting that E1 loss was due to a combination of both biodegradation and photolysis. The estrogens concentrations presented in this study exceeded those reported to cause alteration of testicular structure – namely testis-ova – in juvenile Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [37], but were lower than those found to induce vitellogenin production in other fish species [38-39]. Thorpe et al [39] proved the additive effects of E1, E2 and EE2, with binary estrogen mixtures exhibiting the ability to induce vitellogenin production even at individual no-effect concentration. Therefore, the measured estrogen concentrations in this study, combined with the relatively high detection limits achieved for EE2 (the most potent estrogen), suggest the potentiality for adverse effects on fish in the Jalle d'Eysines River.

Acknowledgements: the authors wish to acknowledge the Aquitaine Regional Council and CNRS (PhD funding for Pierre Labadie), Dr Sylvie Augagneur for carrying out boron measurements, Dr Edith Parlanti and Dr Henri Hetcher for carrying out organic carbon measurements, as well as GIS-ECOBAG and BEEP (EU funded, contract EVK3-CT2000-00025) programmes for research funding.

REFERENCES

1. Metzler M, Pfeiffer E. 2001. Chemistry of natural and anthropogenic endocrine active compounds. In Metzler M, ed, Endocrine disruptors, Vol 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp 63-80.
2. Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. Widespread sexual disruption in wild fish. 1998. *Environ Sci Technol* 32: 2498-2506
3. Jobling S, Beresford N, Nolan M, Rodgers-Gray T, Brighty GC, Sumpter JP, Tyler CR. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. 2002. *Biol Reprod* 66: 272-281.
4. Arcand-Hoy LD, Benson WH. Fish reproduction: an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. 1998. *Environ Toxicol Chem* 17: 49-57
5. Lavado R, Thibault R, Raldúa D, Martín R, Porte C. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. 2004. *Toxicol Appl Pharmacol* 196: 247-257
6. Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M, Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. 1998. *Environ Sci Technol*. 32: 1549-1558.
7. Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M, Sumpter JP, Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. 1998. *Environ Sci Technol*. 32: 1559-1565.
8. Thomas KV, Hurst MR, Matthiessen P, Waldock MJ. 2001. Characterisation of estrogenic compounds in water samples collected from United Kingdom estuaries. *Environ Toxicol Chem* 20: 2165-2170.
9. Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 8: 275-285.
10. Williams RJ, Johnson AC, Smith JJJ, Kanda R. 2003. Steroid estrogens profiles along river stretches arising from sewage treatment works. *Environ Sci Technol* 37: 1744-1750.
11. Laganà A, Bacaloni A, De Leva I, Faberi A, Fago G, Marino A. 2003. Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Anal Chim Acta* 501: 79-88.

12. Majima K, Fukui T, Yuan J, Wang G, Matsumoto K. 2002. Quantitative measurement of 17 β -estradiol and estriol in river water by time-resolved fluoroimmunoassay. *Anal Sci* 18: 869-874.
13. Jeannot R, Sabik H, Sauvard E, Dagnac T, Dohrendorf K. 2002. Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *J Chrom A* 974: 143-159.
14. Laganà A, Bacaloni A, Fago G, Marino A. 2000. Trace analysis of estrogenic chemicals in sewage effluent using liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 14: 401-407.
15. Gomes RL, Scrimshaw MD, Lester JN. 2003. Determination of endocrine disrupters in sewage treatment works and in receiving waters. *Trends Anal Chem* 22: 697-707.
16. Li Z, Wang S, Lee NA, Allan RD, Kennedy IR. 2004. Development of a solid-phase extraction–enzyme-linked immunosorbent assay method for the determination of estrone in water. *Anal Chim Acta* 503: 171-177.
17. Liu R, Zhou JL, Wilding A. 2004. Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry. *J Chrom A* 1022: 179-189.
18. Ingrand V, Herry G, Beausse J, de Roubin MR. 2003. Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plant by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chrom A* 1020: 99-104.
19. Cargouet M, Perdiz D, Mouatassim-Souali A, Tamisier-Karolak S, Levi Y. 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci Tot Environ* 324: 55-66.
20. Larrea F, Garcia-Becerra R, Lemus AE, Garcia GA, Perez-Palacios G, Jackson KJ, Coleman KM, Dazce R, Smith CL, Cooney AJ. 2001. A-ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective agonist for ER α . *Endocrinol* 142: 3791-3799.
21. Isobe T, Shiraishi H, Yasuda M, Shinoda A, Suzuki H, Morita M. 2003. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chrom A* 984: 195-202.
22. D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, Samperi R. 2002. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci Tot Environ* 302: 199-209.

23. Labadie P, Budzinski H. 2004. Development of an analytical procedure for the determination of selected estrogens and progestagens in water samples – application: study of the Seine river estuary. Submitted to Anal Bioanal Chem.
24. Meng LJ, Sjövall, Method for the combined analysis of profiles of conjugated progesterone and bile acids in serum and urine of pregnant woman. 1997. *J Chrom B* 688: 11-26.
25. Al-Alousi LM, Anderson R. A relatively simple and rapid multi-component method for analysis of steroid profiles in blood, fecal and liver samples. 2002. *Steroids* 67: 269-275.
26. Johnson AC, Williams RJ. 2004. A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone and ethynylestradiol at sewage treatment works. *Environ Sci Technol*, 38 : 3649-3658.
27. Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Samperi R. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environ Sci Technol* 34: 5059-5066.
28. Ranney RE. 1977. Comparative metabolism of 17-ethynyl steroids used in oral contraceptives. *J Toxicol Environ Health* 3: 139-166.
29. Ternes TA, Kreckel P, Mueller J. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Tot Environ* 225: 81-90.
30. Turan A. 1995. Excretion of natural and synthetic estrogens and their metabolites: occurrence and behaviour in water. In Endocrinally active chemicals in the environment. UBA TEXT 3/96, German Federal Environmental Agency, Berlin, Germany, pp 21-27 (ISSN 0722-186X).
31. Lai KM, Johnson KL, Scrimshaw MD, Lester JN. 2000. Binding of waterborne steroid estrogens to solid phases in river and estuarine systems. *Environ Sci Technol* 34: 3890-3894.
32. KowWin program. 1999. Environmental Science Centre, Syracuse Research Corporation: New York, USA (<http://www.syrres.com/esc/kowwin.htm>) (used in May 2004).
33. Holthaus KIE, Johnson AC, Jürgens MD, Williams RJ, Smith JJJ, Carter JE. 2002. The potential for estradiol and ethynylestradiol to sorb onto suspended and bed sediments in some English rivers. *Environ Toxicol Chem* 21: 2526-2535.

34. Holbrook RD, Love NG, Novak JT. 2004. Sorption of 17 β -estradiol and 17 α -ethynylestradiol by colloidal organic carbon derived from biological wastewater treatment systems. *Environ Sci Technol*. 34: 3322-3329.
35. Neal C, Fox KK, Harrow M, Neal M. 1998. Boron in the major UK rivers entering the North Sea. *Sci Tot Environ* 210/211: 41-52.
36. Jürgens MD, Holthaus KIE, Johnson AC, Smith JJJ, Hetheridge M, Williams RJ. 2002. The potential for estradiol and ethynylestradiol degradation in English rivers. *Environ Toxicol Chem* 21: 480-488.
37. Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparrissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes Rj, Croley TR, March RE, Potter T. 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ Toxicol Chem* 20: 297-308.
38. Van den Belt K, Berckmans P, Vangenechten C, Verheyen R, Witters H. Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17 β -estradiol, estrone, 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol. 2004. *Aquat Toxicol* 66: 183-195.
39. Thorpe KL, Cummings RI, Hutchinson TH, Scholze M, Brighty G, Sumpter JP, Tyler CR. 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ Sci Technol* 37: 1142-1149.

CHAPITRE 4

Ce chapitre regroupe trois publications portant sur l'étude des stéroïdes hormonaux en tant qu'hormones endogènes chez les poissons.

Le premier article concerne l'étude comparative de deux méthodes communément employées pour le dosage des stéroïdes dans le plasma de poisson : la CG-SM et la RIA (méthode radioimmunologique). Ces deux techniques donnent des résultats similaires pour la testostérone, quelle que soit la concentration ($0,1 - 3,3 \text{ ng.g}^{-1}$); en revanche, le dosage du 17β -œstradiol par RIA semble moins fiable, notamment pour les faibles concentrations ($< 0,25 \text{ ng.g}^{-1}$).

La publication suivante décrit l'effet de différents contaminants sur le profil hormonal chez des juvéniles de turbot (*Psetta maxima*) : pétrole, pétrole en association avec un mélange industriel d'alkylphénols, bisphénol A, diallylphtalate, tétrabromodiphényl éther 47 (BDE 47) et *p*-nonylphénol (témoin positif pour les effets de type « œstrogéniques »). Deux contaminants se sont avérés être capable d'abaisser de manière significative le rapport androgènes/œstrogènes chez les turbot mâles : le bisphénol A et le *p*-nonylphénol. Le premier provoque une augmentation générale des niveaux d'œstrone (suggérant une activation de l'activité aromatasé), tandis que le second entraîne une chute des niveaux d'androsténone et de 11-cétotestostérone (altération apparente de l'activité de certaines enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse).

Afin de mieux comprendre l'effet des xénoœstrogènes sur le système hormonal du turbot (juvénile), des poissons ont été exposés à un puissant œstrogène de synthèse : le 17α -éthynylœstradiol. Un nouveau protocole a été développé pour pouvoir étudier à la fois les fractions libre et conjuguée des stéroïdes hormonaux, et un nouvel analyte a été également étudié : la DHEA, précurseur direct de l'androsténone. Les résultats obtenus indiquent que le 17α -éthynylœstradiol ne perturbe pas réellement l'activité de conjugaison mais qu'il altère la synthèse et le métabolisme des androgènes (chute des niveaux d'androsténone et de 11-cétotestostérone). Ce stéroïde semble ainsi avoir le même type d'effet que le *p*-nonylphénol.

Comparison of radioimmunoassay and gas chromatography/mass spectrometry for the measurements of testosterone and 17 β -estradiol in fish plasma

Pierre LABADIE, Ramon Lavado, Cinta Porte et H el ene BUDZINSKI

Des doutes ont été émis dans un certain nombre de publications quant à la validité des méthodes radioimmunologiques (RIA) employées pour le dosage des st ro ides hormonaux dans les matrices biologiques. Dans cette étude, des mesures des niveaux de testostérone et de 17 β -estradiol dans du plasma de poisson ont été réalisées en parallèle par RIA et par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM). L'influence du prétraitement de l'échantillon (extraction sur phase solide ou extraction liquide/liquide au dichlorométhane) a également été évaluée.

Des tests ont ainsi été conduits sur 7 échantillons différents, recouvrant une large gamme de concentration (0,05 – 10 ng.g⁻¹). Les résultats obtenus montrent que les deux techniques de quantification donnent des résultats proches pour la testostérone. Pour le 17 β -estradiol, en revanche, les résultats sont un peu plus complexes à interpréter. En effet, il semble que l'étalonnage de la méthode RIA soit, pour cet analyte, dépendante du solvant employé pour préparer les solutions étalons (méthanol ou dichlorométhane). Par conséquent, deux droites d'étalonnage ont été employées, l'une pour les extraits obtenus par extraction liquide/liquide, l'autre pour les échantillons préparés par extraction sur phase solide. Dans ces conditions, RIA et CG-SM donnent des résultats relativement proches pour les concentrations en 17 β -estradiol supérieures à 0,25 ng.g⁻¹, tandis que les niveaux plus faibles sont systématiquement sous-estimés par la RIA.

Publication n 3 soumise à Analytical and Bioanalytical Chemistry

Comparison of radioimmunoassay and gas chromatography/mass spectrometry for the measurement of testosterone and 17 β -estradiol in fish plasma

Pierre Labadie¹, Ramón Lavado², Cinta Porte², Hélène Budzinski¹

¹Laboratoire de Physico- et Toxicochimie des Systèmes Naturels

UMR 5472 CNRS-Université Bordeaux I

33405 Talence Cedex, FRANCE

² Environmental Chemistry Dpt

IIQAB-CSIC

C/Jordi Girona, 18

08034 Barcelona, SPAIN

ABSTRACT

Concern has been raised about the validation of radioimmunoassays for the determination of steroids in biological fluids. We compared testosterone and estradiol measurement in fish plasma by radioimmunoassay with mass spectrometry; we also evaluated the influence of sample pre-treatment by either solid phase extraction (SPE) or liquid/liquid extraction. Testosterone and estradiol were measured in 7 fish plasma pools (European flounder and rainbow trout) encompassing a wide range of steroids concentrations (0.05-10 ng.g⁻¹). Our results suggest that both methods gave similar results for testosterone. For estradiol, however, the results were not as clear. Indeed, we found that the calibration was dramatically dependent on the nature of the solvent used for standards preparation (methanol or dichloromethane). Therefore, two calibration curves were used for the quantification of estradiol : one for the diethylether extracts, and another one for the SPE extracts. Under these conditions, RIA and GC/MS results gave reasonably similar results at high estradiol levels (>0.25 ng.g⁻¹); at low levels, however, RIA underestimated estradiol concentration.

INTRODUCTION

Steroidal hormones such as testosterone (T) or 17 β -estradiol (E2) play a key role in mediating successful reproduction in vertebrates, including fish. Several analytical methods may be used for the determination of these compounds in biological samples : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS), High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC/MS) (reviewed in [1, 2]). Concerns have been raised, however, about the reliability of ELISA or RIA for the measurement of steroids in biological fluids [3]; several papers have compared the performance of immunoassays with that of chromatographic methods coupled to mass spectrometry [4-8]. The aim of the present study was to compare RIA and GC/MS for the determination of T and E2 in fish plasma, with special emphasis on sample pre-treatment. Analyses were carried out on plasma from juvenile rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) and adult European flounder (*Platichthys flesus*). Both males and females fish were sampled at different sexual maturity stages and, consequently, a wide concentration range was investigated (from 0.05 up to 10 ng.g⁻¹).

EXPERIMENTAL

Chemicals and reagents

Native estradiol (E2) and testosterone (T) were supplied by Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France; purity > 98%). Deuterated steroids (testosterone-d3 and 17 β -estradiol-d4, isotopic purity > 99%), used as internal standards for GC/MS analysis, were obtained from CDN Isotopes (Montreal, Canada). GC/MS stock solutions were prepared in methanol at about 100 μ g.g⁻¹ and stored at 4°C, while standards for RIA measurements were prepared in dichloromethane at 100 μ g.g⁻¹. All solvents were either *HPLC grade* or *Organic residue analysis grade*. Solid-phase extraction procedures were carried out using Varian BondElut C18 endcapped 200 mg (Interchim, Montluçon, France), and LC-NH₂ purchased from Supelco (St Quentin Fallavier, France). MSTFA (N-Methyl-N(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, purity > 97 % ; Acros Organics, Noisy-Le-Grand, France) was used as the silylation agent, in combination with ammonium iodide and mercapthoethanol (both from Acros Organics, purity > 99%). Deionized water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). RIA kits were purchased from Radim SpA (Rome, Italy).

Plasma samples

Blood samples were collected from the caudal vein of either flounder or trout, using a 3-mL syringe previously rinsed with heparin. After collection, samples were transferred to 2-mL centrifugation tubes. Afterwards, 5 μ L of heparin and 2 μ L of aprotinin were added to prevent coagulation and proteolysis. The blood samples were centrifuged and the plasma was kept at - 80°C until analysis. A total of six flounder and one rainbow trout plasma samples were analysed.

Pre-treatment of the plasma samples

Three different procedures were compared for the analysis of T and E2 by RIA: liquid/liquid extraction with diethylether, octadecyl silica (C18) solid phase extraction, and C18 solid phase extraction in combination with aminopropyl silica (NH₂) clean-up. Only the latter extracts were analysed by GC/MS. The overall procedure is summarised in figure 1.

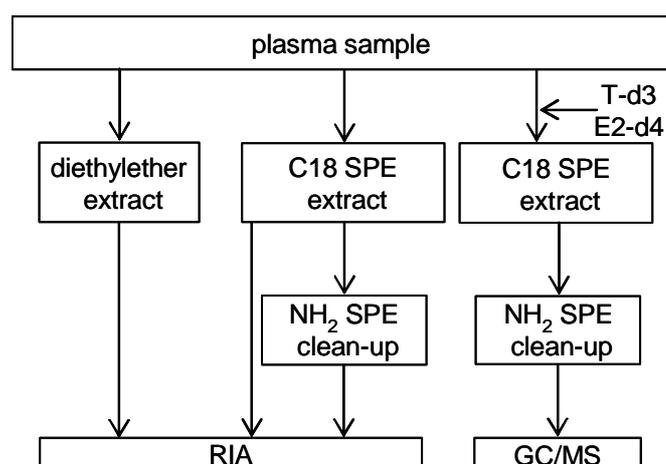


Figure 1. Schematic analytical strategy for the comparative analysis of T and E2 in fish plasma using RIA, GC/MS and solid phase extraction.

Frozen plasma samples were slowly defrosted at room temperature. About 1 g of plasma (exact amount checked gravimetrically) was combined with 2 mL sodium acetate buffer (pH 5.0, 10⁻² M) prior to extraction.

As regards liquid/liquid extraction, steroids were vortex-mixed twice with 2 mL diethylether during 1 min and the extracts were combined. The recovery of this procedure was estimated using spiked flounder plasma (50 ng of T and E2) for which endogenous

steroid content had previously been determined. The mean extraction yields of E2 and T from flounder plasma, as determined by GC/MS, are presented in table 1.

	Diethylether liquid/liquid extraction	C ₁₈ SPE	C ₁₈ + NH ₂ SPE
T	92 ± 4	91 ± 9	104 ± 2
E2	112 ± 7	87 ± 19	108 ± 5

Table 1. Mean recoveries of T and E2 from spiked flounder plasma samples (50 ng.g⁻¹), determined using GC/MS. Results are expressed as mean values standard deviation (n=3, except for C18, n=6).

Samples treated by SPE were first spiked with 5-10 ng of T-d3 and E2-d4. They were then passed through a 200 mg C18 SPE cartridge previously conditioned with 3 mL of methanol and 3 mL Milli-Q water at a flow rate of 3 mL.min⁻¹. After the cartridge was washed with 3mL of Milli-Q water and dried during 10 min with a nitrogen flow, the steroids were eluted with 3 mL of methanol (*C18 extracts*). The so-obtained extracts were evaporated at 50°C under a nitrogen stream and cleaned-up with NH₂ cartridges conditioned with successively 4 mL of ethyl acetate and 4 mL of ethyl acetate/methanol (4:1, v/v). The C18 extracts were dissolved in 2 mL of the latter solvent and sucked through the NH₂ cartridges. The steroids passed unretained through the sorbent and the eluate was directly collected; the cartridges were rinsed with 2 mL of the solvent mixture and the two fractions were combined, giving the *C18+NH₂ extracts*. The average recoveries for E2 and T in flounder plasma were determined by GC/MS and are presented in table 1.

GC/MS analyses

Quantification of the steroids was carried out by GC/MS on the *C₁₈+NH₂ extracts*, using isotopic dilution and after silylation of the steroids. Firstly, the extracts were evaporated to dryness, under N₂ stream, at 50°C. The silylation reagent was prepared as follows: a mixture of 250 µL MSTFA, 15 µL of mercaptoethanol and 10 mg of NH₄I was left for about 10 min at 65 °C. This mixture was diluted 10 times with MSTFA to obtain the derivatisation reagent; 30 µL of this mixture were added to each extract and the samples were left at 65 °C for 30 - 40 min. Then, 30 µL of dichloromethane were added and the samples were analysed by GC/MS.

Separation and detection of the analytes were achieved using an Agilent Technologies GC system (6890 series) coupled with an Agilent MS detector (5973 series),

used in electron impact mode (70 eV), with the electron multiplier voltage set at 1500-1800 V and the source temperature set at 230°C. The separation was performed on an Agilent Technologies HP5-MS column (length: 30 m; internal diameter: 250 µm; stationary phase thickness: 0.25 µm), with the following oven parameters: 90°C, 1 min; 7.5°C.min⁻¹; 290°C, isothermal 5 min. Helium 6.0 was used as the carrier gas (Linde, Bassens, France), at a constant flow (1 mL.min⁻¹). The injection volume was set at 2.5 µL (splitless; pulsed pressure: 25.0 psi), while the injector temperature was set at 250°C and the purge flow was set at 60 mL.min⁻¹ after 1.5 min. Analyses were performed in selected ion monitoring (SIM) mode (dwell time 120 ms). Deuterated steroids (T-d3 and E2-d4) were used as internal standards and the corresponding target ions were m/z 435 for T-d3 (M⁺) and m/z 420 for E2-d4 (M⁺). T was quantified using ion m/z 432 (M⁺), while ion m/z 417 ([M-CH₃]⁺) was used for the confirmation of the peak attribution. The ratio of m/z 432 peak area to m/z 417 peak area was compared to that obtained with an authentic T standard, prior to definitive attribution of the peak. For E2, ions m/z 416 (M⁺) and m/z 285 were used for quantification and identification, respectively. For each series, blank samples were run and levels of steroids in these controls were usually lower than 0.1 ng and, in most cases, lower than 0.05 ng. In plasma extracts, the average limit of detection of T was 0.04 ng.g⁻¹, while that of E2 was 0.08 ng.g⁻¹. In plasma extracts, the repeatability RSD was 2 and 12% for T and E2 (n=3), respectively, while reproducibility was 9 and 10 % for T and E2 (n=9), respectively.

RIA analyses

Radioimmunoassays were carried out using ¹²⁵I RIA kits. Dried organic extracts (diethylether, C₁₈ or C₁₈+NH₂) obtained from 1-mL plasma samples were re-dissolved in 450 µL phosphate buffer (0.1 M KH₂PO₄ and K₂HPO₄, pH 7.6, containing 0.1% gelatin (w/v)). Plasma extracts were assayed in duplicates, on 200 µL-aliquots and according to the kits manufacturer instructions. External calibration curves (20-4000 pg.mL⁻¹) were obtained using stock solutions prepared in dichloromethane (DCM). DCM was removed under a nitrogen flux, at room temperature, prior to re-dissolution in buffer (sonication assisted) and analysis. The limits of detection claimed by the kit manufacturer were 0.017 ng.mL⁻¹ for T and 0.010 ng.L⁻¹ for E2. For the T kit, cross reactivities were as follows: 100% with testosterone, 5.6% with 5α-dihydrotestosterone, 3.8% with 1,(5α)-androst-17β-olone, 2.6% with 19-hydroxy-androstenedione. For E2, cross reactivities were as follows: 100% with estradiol, 1.05% with estriol, 0.93 % with estrone. Two replicate analyses gave values within 5.8 % for T and within 6.4% for E2.

RESULTS AND DISCUSSION

Means and standard deviations of T measurements by both GC/MS and RIA are shown in figure 2. No error bars were plotted for RIA measurements because measurements were carried out in duplicates, but duplicate values were within 6% from each other (mean value). For most samples, there was a reasonable agreement between the values obtained by GC/MS and those obtained by RIA. For the highest T levels ($>0.3 \text{ ng.g}^{-1}$), measurements carried out on diethylether extracts gave systematically higher values than those obtained by GC/MS. However, the observed difference was rather small, which indicated that no major matrix interfering compounds were co-extracted with T when performing a simple diethylether liquid/liquid extraction. Conversely, T content of C18+NH₂ extracts as measured by RIA was systematically lower than the GC/MS value. Overall, no obvious effect of sample pre-treatment was observed on the result of RIA measurement.

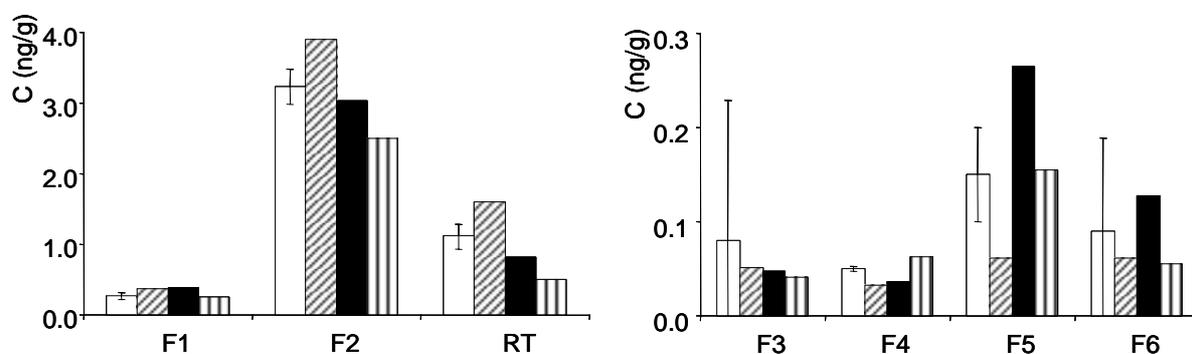


Figure 2. Comparative determination of testosterone in fish plasma samples by GC/MS or RIA. Results are expressed as mean values (GC/MS, $n=3$; RIA, $n=2$) and error bars correspond to the 95% interval of confidence (GC/MS only) F_i : flounder number i ; RT: rainbow trout. *: C18+NH₂ plasma extract analysed by GC/MS.

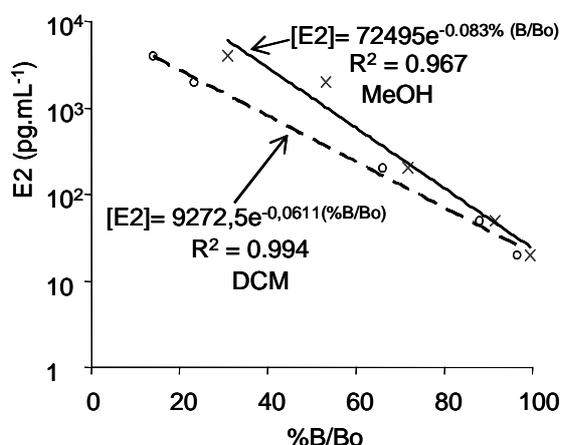


Figure 3. RIA calibration curves obtained with estradiol standard solutions prepared in methanol (solid line, crosses) and in DCM (dash line, circles).

When looking at the E2 measurements, a major discrepancy was observed. Figure 3 shows the calibration curves obtained with E2 standards prepared in methanol (MeOH) and dichloromethane (DCM), and of which concentrations had been validated by GC/MS. The obtained results are somewhat surprising: although for both type of standards the best-fit curve was exponential ($Ae^{-k(\%B/Bo)}$ with $R^2 > 0.96$), there were large differences between the equations of the two curves. For instance, the span calculated for the MeOH curve was about one order of magnitude higher than that calculated for the DCM curve. The “slopes” of the linearised curves were also rather different: 0.06 vs 0.08 (fig 3). In theory, there should be little difference between the two curves, since solvents were removed under a nitrogen flow prior to re-dissolution of E2 in phosphate buffer and subsequent RIA analysis. Because no heating was used for this operation, it is possible that low amounts of MeOH remained in the vials used for the calibration. For a given [E2], DCM standards gave B/Bo values – percentage of occupied binding sites on the immunosorbent – in good agreement with those indicated by the kits manufacturer (RADIM). Conversely, the B/Bo values obtained with the MeOH standards were correct for E2 levels up to 200 pg.mL⁻¹ ($\Delta_{B/Bo} < 9\%$), but largely different above this threshold ($\Delta_{B/Bo}$: 122-128%). Therefore, it seemed that there was a “methanol effect” that would have disrupted RIA titration of estradiol. Somehow, residual methanol would have disrupted the competitive binding of I¹²⁵ labelled E2 and unlabelled E2, leading to an overestimation of plasmatic E2 titers. MeOH is a polar protic solvent, whereas DCM is an aprotic nonpolar solvent; for some unexplained reason, these differences might perhaps explain the observed effect. Figure 4 provides an illustration of this phenomenon: when the MeOH calibration curve was used for the determination of E2 in ether extracts containing high levels of this steroid (i.e. > 0.5 ng.g⁻¹), a 4-6 fold overestimation of E2 levels was observed. Conversely, when the DCM curve was used for the calculations, RIA and GC/MS measurements agreed rather well (within 15 %). Therefore, we used the DCM curve for the diethylether extracts, but the MeOH curve was chosen for the C18 and C18+NH₂ extracts since they contained MeOH at some stage of the analytical procedure.

As regards samples with low E2 levels, another discrepancy was observed: whatever the sample treatment, RIA results were systematically lower than GC/MS values. The SPE-GC/MS determination of E2 (including C18 and NH₂ SPE steps) had previously been validated using two plasma samples with certified values for estradiol (BCR 577: certified value : 0.19 ± 0.01 ng.mL⁻¹; experimental value: 0.20 ± 0.02 ng.mL⁻¹; BCR 578: certified value 0.37 ± 0.02 ng.mL⁻¹, experimental value : 0.34 ± 0.02): measured levels were within 6 % of the certified ones. Therefore, it is likely that for low E2 levels (< 0.25 ng.g⁻¹, i.e. B/Bo > 85%), the RIA method underestimated E2 concentrations.

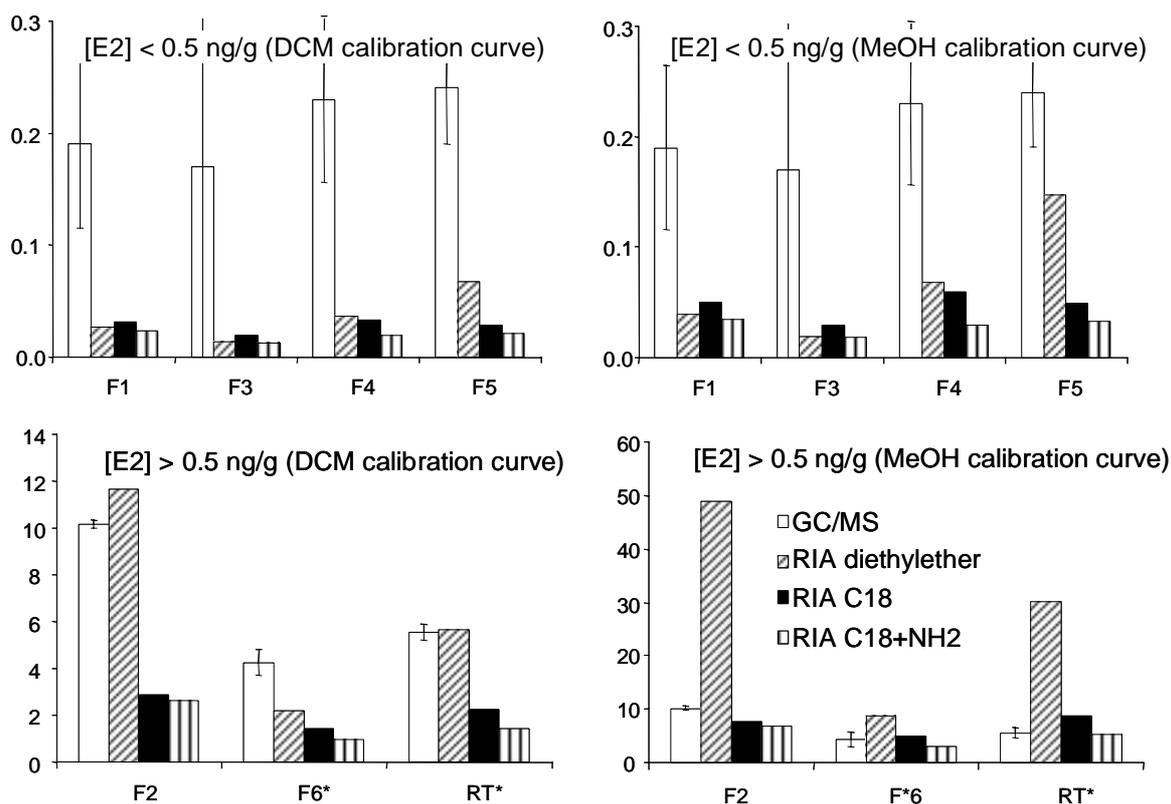


Figure 4. Comparative determination of estradiol in fish plasma samples by GC/MS or RIA. Results are expressed as mean values (GC/MS, n=3; RIA, n=2) and error bars correspond to the 95% interval of confidence (GC/MS only). Fi : flounder number i; RT: rainbow trout. *: concentration multiplied by a factor 5 for the sake of clarity.

Overall, this study showed that there was a good agreement between GC/MS and RIA for the measurement of T in fish plasma, whatever the pre-treatment procedure prior to RIA analysis. A simple diethylether extraction led to satisfactory results. On the contrary, the determination of E2 was more problematic, since the nature of the solvent used for the acquisition of calibration curves was crucial. Further research is needed to gain more insight into the “methanol effect” described in this study. As for T, diethylether extraction and C18 extraction gave similar results when analysed by RIA. For high E2 levels, RIA and GC/MS values were in good agreement, whereas RIA underestimated low E2 concentrations.

ACKNOWLEDGEMENTS: the authors wish to acknowledge the Aquitaine Regional Council, the CNRS, as well as the BEEP (EU funded, contract EVK3-CT2000-00025) and Seine-Aval Programmes.

REFERENCES

1. Shimada K, Mitamura K, Higashi T. 2001. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. *J Chrom A* 935: 141-172.
2. Giese RW. 2003. Measurement of endogenous estrogens: analytical challenges and recent advances. *J Chrom A* 1000: 401-412.
3. Nozaki O. 2001. Steroid analysis for medical diagnosis. *J Chrom A* 935: 267-278.
4. Sawaya WN, Lone KP, Husain A, Dashti B, Al-Zenki S. 1998. Screening for estrogenic steroids in sheep and chicken by the application of enzyme-linked immunosorbent assay and a comparison with analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem* 63: 563-569.
5. Boudou P, Taieb J, Mathian B, Badonnel Y, Lacroix I, Mathieu E, Millot F, Queyrel N, Somma-Delpero C, Patricot MC. Comparison of progesterone concentration determination by 12 non-isotopic immunoassays and gas chromatography/mass spectrometry in 99 human serum samples. *J Ster Biochem & Mol Biol* 78: 97-104.
6. Giton F, Valleix A, Boudou P, Villette JM, Bélanger A, Galons H, Fiet J. 2002. Specific radioimmunoassay of estrone sulfate – application to measurement in male plasma. *J Ster Biochem & Mol Biol* 81: 85-94.
7. Wu H, Ramsay C, Ozaeta P, Liu L, Aboleneen H. 2002. Serum estradiol quantification by isotope dilution – gas chromatography/Mass spectrometry. *Clinical Chemistry* 48: 364-366.
8. Dorgan JF, Fears TR, McMahon RP, Aronson Friedman L, Patterson BH, Greenhut. 2002. Measurement of steroid sex hormones in serum: a comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry. *Steroids* 67: 151-158.

Alteration of steroid hormone metabolism in juvenile turbot (*Psetta maxima*) exposed to nonylphenol, bisphenol A, BDE 47, diallylphtalate, oil and oil in combination with an alkylphenol industrial mixture

Pierre LABADIE et Hélène BUDZINSKI

Depuis quelques années, de nombreuses études ont démontré la capacité de certains contaminants à perturber le système endocrinien des animaux sauvages et des êtres humains. Dans cette étude, des turbots juvéniles (*Psetta maxima*) ont été exposés, par voie dissoute (et en milieu contrôlé) à différents contaminants : pétrole, pétrole en association avec un mélange industriel d'alkylphénols, bisphénol A, diallylphtalate, tétrabromodiphényl éther 47 (BDE 47) et *p*-nonylphénol (témoin positif pour les effets de type « œstrogéniques »).

Ce travail a été axé sur le métabolisme des stéroïdes hormonaux car ces composés jouent un rôle central dans le fonctionnement du système reproducteur des poissons. Des procédures analytiques ont été développées pour doser 12 stéroïdes endogènes dans trois compartiments biologiques différents (plasma, bile, gonades). Bisphenol A et *p*-nonylphenol se sont avérés être capables de réduire de manière importante le rapport androgènes/œstrogènes chez les individus mâles. Ces deux composés présentent cependant des modes d'action différents : alors que le bisphénol A provoque une augmentation des niveaux d'œstrone, ce qui suggère une augmentation de l'activité aromatasase, le *p*-nonylphénol induit une forte perturbation du métabolisme des androgènes, menant à une chute des niveaux d'androstènedione et de 11-cétotestostérone.

Publication n°4, soumise à Archives of Environmental Contamination and Toxicology

Alteration of steroid hormone metabolism in juvenile turbot (*Psetta maxima*) exposed to nonylphenol, bisphenol A, BDE 47, diallylphtalate, oil and oil + alkylphenol industrial mixture

Pierre LABADIE and Hélène BUDZINSKI

ABSTRACT

In recent years, concern has been raised about the ability of some classes of environmental contaminants to disrupt the endocrine system of both human and wildlife. In this study, juvenile turbot (*Psetta maxima*) were exposed under laboratory conditions to waterborne selected contaminants: oil, oil+alkylphenols, bisphenol A, diallyl phtalate, tetrabrominated diphenyl ether 47 (BDE 47) and *p*-nonylphenol as a positive control for « estrogenic-type » effects. This work focused on steroid hormone metabolism, since these hormones play a key role in the reproduction process. Analytical procedures, involving the off-line coupling of solid phase extraction and GC/MS, were developed for the determination of twelve endogenous sex steroids levels in turbot plasma, bile and gonads. Bisphenol A and nonylphenol exhibited the highest potency towards steroids dynamics, lowering significantly the ratio androgens to estrogens in all three studied matrices. However, these two chemicals had different modes of action, since NP induced a decrease of androstenedione and 11-ketotestosterone levels, whereas bisphenol A exposure led to an elevation of estrone level. Overall, these two chemicals were able to disrupt the steroidogenesis enzymes, leading to serious hormonal imbalance in juvenile turbot.

INTRODUCTION

Numerous chemicals discharged in aquatic ecosystems as a consequence of anthropogenic activities exhibit the potency to interact with the endocrine system of biota; this issue has been reviewed by Metzler and Pfeiffer [1]. As regards fish, many of the so-called “endocrine disruptors” have been shown to have effects on the reproductive system [1]. For instance, two widespread classes of phenolic chemicals such as alkylphenols and bisphenol A have been reported to have adverse effects on fish, such as vitellogenin induction in male fish [2-6], disruption of spermatogenesis [7] or testicular growth [8], induction of testis-ova [9] and alteration of egg production [10]. The impact of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates on sex steroids plasmatic levels (testosterone and estradiol) in fish plasma has also been studied [11-14]. Other classes of contaminants, such as phthalates or polyaromatic hydrocarbons also exhibit an endocrine disrupting potency [15-16] and brominated flame retardants such as polybromodiphenylethers are suspected to interact with thyroid hormone metabolism [17-18]

Since steroids play a key role in mediating successful reproduction, the first aim of this work was to develop analytical procedures for the determination of twelve endogenous steroids in fish. Three matrices were investigated: gonads as the major organ of steroidogenesis, plasma as a carrier of steroids to the target organs, and bile as the receptacle of hepatic metabolism products. Then, these procedures were applied to the study of steroid hormone metabolism alteration as a consequence of exposure to different waterborne contaminants. Juvenile turbot (*Psetta maxima*) were exposed under laboratory conditions to nonylphenol, bisphenol A, diallyl phthalate, tetrabromodiphenyl ether 47, North Sea Oil and North Sea Oil in combination with alkylphenols. The mixture “oil+alkylphenols” composition was close that of mixtures released in large amounts in the North Sea by off-shore oil platforms. The goal of this study was also to assess the potencies of these chemicals towards steroid hormone metabolism in juvenile turbot and these experiments were carried out within the frame of the BEEP programme, of which the scientific aim was to develop and to validate new biomarkers for the assessment of pollution impact in coastal ecosystems.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All native steroids were supplied by Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France; purity > 98%): estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), testosterone (T), androstanolone (DHT),

androstenedione (A), androstanedione (DHA), progesterone (Pg), 17 α -hydroxyprogesterone (OHPg), pregnenolone (Pn), 17 α -hydroxypregnenolone (OHPn) and 17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogesterone (DHP). Deuterated steroids (testosterone-d3 and 17 β -estradiol-d4, isotopic purity > 99%), used as internal standards, were obtained from CDN Isotopes (Montreal, Canada). Stock solutions were prepared in methanol at about 100 $\mu\text{g.g}^{-1}$ and stored at 4°C. They were found to be stable over a 6-month period. All solvents were either *HPLC grade* or *Organic residue analysis grade* and were obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Solid-phase extraction was carried out using three types of cartridges: Varian BondElut C18 endcapped 200 mg (Interchim, Montluçon, France), EnviChrom-P (PS-DVB, 250 mg) and LC-NH₂ purchased from Supelco (St Quentin Fallavier, France). Trifluoroacetic acid (*Reagent grade*, purity > 99%) was obtained from Fischer chemicals (Fischer scientific Labosi, Elancourt, France). MSTFA (N-Methyl-N(trimethylsilyl)trifluoroacetamide; Acros Organics, Noisy-Le-Grand, France; purity > 97%) was used as the silylation agent in combination with mercaptoethanol and ammonium iodide (both from Acros Organics, purity > 99%). Deionized water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). Human serum samples with a certified concentration for estradiol (BCR 577 and BCR 578) and progesterone (BCR 347) were supplied by Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). β -glucuronidase from *Helix pomatia* (glucuronidase: 100 000 Sigma units.mL⁻¹ and sulphatase: 7500 Sigma units.mL⁻¹), aprotinin (8.2 TIU.mL⁻¹), heparin (300 USP units.mL⁻¹) and MS 222 (tricaine methansulphonate) were also supplied by Sigma-Aldrich. Alkylphenols and BDE 47 (purity > 95%) were supplied by Chiron AS (Trondheim, Norway), oil was extracted from the Statfjord B oil field (North Sea), bisphenol A (purity > 97%) was obtained from Merck (Skarer, Norway) and diallylphtalate (purity > 98%) was provided by Fluka (Oslo, Norway).

Animals

Juvenile turbot (6-7 month old; body weight: experiment 1 = 61.1 \pm 9.7 g; experiment 2 = 63.2 \pm 11.3 g) were acclimated to laboratory conditions for 2 weeks before the initiation of the experiments. The exposures lasted for 3 weeks and, during the first two weeks, all groups were fed daily with Dana Feed pellets (Dana Feed, Horsens, Denmark).

Exposure to contaminants

In experiment 1, fish were exposed during three weeks to different chemicals. The first contaminant was *p*-nonylphenol (uncharacterised mixture of branched isomers), at the average concentration of 29 \pm 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$. As regards PAHs, fish were exposed to a crude North

Sea Oil concentration of $0.52 \pm 0.22 \text{ mg.L}^{-1}$ (level of dissolved PAHs, measured in the water of the exposure tank). The average PAH composition in the exposure water was as follows: 89% di-aromatic compounds, 7% tri-aromatic compounds, 3 % dibenzothiophenes and 1% tetra-aromatic compounds. Penta- and hexa-aromatic PAHs were not detected in the water; they represented less than 0.1 % of the total PAH content of the crude oil. Juvenile turbot were also exposed to North Sea Oil (Statfjord B, $0.48 \pm 0.11 \text{ mg.L}^{-1}$) in combination with an industrial mixture of alkylphenols ($\Sigma\text{phenols} = 140 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$, 63 % C₁ phenols, 25% C₂, 7% C₃, 2% C₄, 3% C₅). During experiment 2 (three-week duration), fish were exposed to diallylphthalate ($38 \pm 10 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$), bisphenol A ($59 \pm 11 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$) and tetrabromodiphenyl ether $47 (0.23 \pm 0.18 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1})$. Acetone (purity > 99.5 %) was used as carrier for NP and AP mixture, while hydrocarbons were dispersed in natural seawater (salinity 34‰, temperature 10 – 12°C) by means of high pressure mixing valves. High precision peristaltic pumps were used to deliver a continuous flow of stock solutions to the tanks. Exposures were conducted at the RF Rogaland Research Centre (Stavanger, Norway) and the concentrations presented above correspond to actual levels measured by GC/MS [19].

Sampling procedure

For each exposure and each sex, at least 4 fishes were sampled (5 for most exposures). The sex was determined according to gonadal morphology. Fish were first anaesthetised with MS 222 (1 g.L^{-1} in seawater) and blood samples were collected from the caudal vein, using a 3-mL syringe previously rinsed with heparin. After collection, samples were transferred to 2-mL centrifugation tubes and 5 μL of heparin, as well as 2 μL of aprotinin, were added to prevent coagulation and proteolysis. The blood samples were centrifuged and the plasma was kept at - 80°C until analysis. After fish were killed by a blow to the head, bile and gonads were taken, transferred to eppendorf tubes and kept on dry ice until the end of the sampling procedure. They were then stored at - 80°C until further analysis.

Measurement of plasma, bile and gonad steroids

Plasma samples

Frozen samples were slowly defrosted at room temperature. For each exposure and sex, pooled samples were prepared by combining equivalent volumes of plasma from individual samples (about 800 μL , $n \geq 4$ for most exposures) and triplicate measurements were carried out on the pool (whenever the amount of matrix was sufficient)). About 1 g of plasma

(exact mass determined by gravimetry) was combined with 2 mL sodium acetate buffer (pH 5.0, 10^{-2} M) and spiked with T-d3 and E2-d4 (10 ng each). The samples were then passed through a 200 mg C18 SPE cartridge previously conditioned with 3 mL of methanol and 3 mL of Milli-Q water at a flow rate of $3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. After the cartridge was washed with 3 mL of Milli-Q water and dried during 10 min with a nitrogen flow ($P = 3 \text{ bar}$), steroids were eluted with 3 mL of methanol and the so-obtained extracts were evaporated at 50°C under a nitrogen stream. A purification step was performed using aminopropyl silica (NH_2) cartridges conditioned with 4 mL of ethyl acetate and 4 mL of ethyl acetate/methanol (4:1, v/v). The C18 extracts were dissolved in 2 mL of the latter solvent and sucked through the NH_2 cartridges. Steroids passed unretained through the sorbent and the eluate was directly collected; the cartridges were further rinsed with 2 mL of ethyl acetate/methanol (4:1, v/v) and the two fractions were combined. This final extract was taken to dryness (50°C under a nitrogen stream) prior to derivatisation and analysis by GC/MS as described below (*Analysis of SPE extracts by GC/MS*).

Bile samples

The procedure was close to that used for plasma samples. However, prior to the SPE steps, pooled bile samples (about 100 mg) underwent a two-step conjugated forms cleavage. The first step consisted in incubating the dried samples at 45°C for 30 min with trifluoroacetic acid/methanol/tetrahydrofuran ($10\mu\text{L}/200\mu\text{L}/800\mu\text{L}$, adapted from [20]). After neutralisation with $400 \mu\text{L}$ Na_2CO_3 0.2 M, the organic solvents were evaporated at 60°C under a gentle nitrogen stream. Sodium acetate buffer (5 mL, pH 5.0, 10^{-2} M) and $30 \mu\text{L}$ β -glucuronidase/arylsulphatase were added and the samples were further incubated at 55°C for 3 hours [21]. This optimised protocole allowed the complete cleavage of both sulphates and glucuronides, without any side-effect (e.g. dehydration of tertiary alcohols, isomerisation of androstenedione or loss of deuterated internal standards) [22]. The samples were then processed as described above for plasma samples.

Gonad samples

Frozen samples were slowly thawed at room temperature. For each exposure and sex, pooled samples were prepared by combining roughly equivalent masses of either testes or ovaries tissues from individual samples ($n \geq 4$ for most exposures) : about 130 mg per females and about 20 mg per males. Tissues were homogenised using an Ultra-Turrax[®] T25 Basic dispersing tool (IKA[®] Werke, Staufen, Germany) during 2 min in 30 mL of methanol/Milli-Q water (55:45, v/v) at 6000 rpm (room temperature). The homogenate was divided in three aliquots and 20 ng of T-d3 and E2-d4 were added to each sub-sample. Steroids were extracted by Focussed Microwave Assisted Extraction: 30 W, 5 min, 10 mL of

methanol/ Milli-Q water (55:45, v/v). The extracts were then centrifuged at 4500 rpm during 5 min (room temperature). The supernatant was transferred to a vial and the methanol content of the extracts was evaporated at 60 °C under a nitrogen stream. The samples were then purified on EnviChrom-P cartridges previously conditioned with 4 mL of ethyl acetate, 4 mL of methanol and 4 mL of Milli-Q water. The sorbent was rinsed with 4 mL of Milli-Q water and 4 mL of cyclohexane. The latter step was meant to elute non polar matrix components, such as some classes of lipids. The sorbent was dried under nitrogen flow, before subsequent elution was performed with 10 mL of cyclohexane/diethylether (7:3, v/v). The extracts were blown down to dryness at 50°C under a nitrogen stream. Further purification was carried out using aminopropyl-silica cartridges, as described previously.

Analysis of SPE extracts by GC/MS

Quantification of the steroids was carried out by GC/MS, using internal standards and after silylation of the steroids. Firstly, the final SPE extracts were evaporated until dryness, under N₂ stream, at 50°C. The silylation reagent was prepared as follows : a mixture of 250 µL MSTFA, 15 µL mercaptoethanol and 10 mg NH₄I was left for about 10 min at 65 °C, so as to insure the total dissolution of ammonium iodide. Thereafter, this solution was diluted 10 times with MSTFA to obtain the derivatisation reagent: 30 µL of this mixture were added to each extract and the samples were left at 65 °C for 30-40 min. Then, 30 µL of dichloromethane were added and the samples were analysed by GC/MS.

Separation and detection of the analytes were achieved using an Agilent Technologies GC system (6890 series) coupled with an Agilent Technologies MS detector (5973 series), used in electron impact mode (70 eV). The separation was performed on a Agilent Technologies HP5-MS column (length: 30 m; internal diameter: 250 µm; stationary phase thickness: 0.25 µm), using helium as the carrier gas (purity 6.0; Linde, Bassens, France) and with the following oven parameters: 90°C , 1 min; 7.5°C.min⁻¹; 290°C, isothermal 5 min. The injection volume was set at 2.5 µL (splitless; pulsed pressure: 25.0 psi), while the injector temperature was set at 250°C and the purge flow was set at 60 mL.min⁻¹ after 1.5 min. Acquisition was performed in selected ion monitoring mode (SIM), with three acquisition windows (dwell time 85 ms). The source temperature was set at 230°C and the electron multiplier voltage ranged from 1500 up to 1800 V. For each analyte, two ions were monitored, generally the molecular ions M⁺ and the ion corresponding to the loss of a methyl group, [M-CH₃]⁺. Ions used for quantification and confirmation purposes are listed in Table 1. For a given peak, the ratio quantification ion to confirmation ion was compared to that obtained with an authentic standard, prior to definitive attribution of the peak.

E2-d4 (m/z 420, M⁺) was used as internal standard for estrogens, while T-d3 (m/z 435, M⁺) was used for other hormones. For each series, blank samples were run and levels

of steroids in these controls were usually lower than 0.1 ng and, for most series, lower than 0.05 ng.

Steroid	CAS registry number	Internal standard	Quantification Ion (m/z)	Confirmation Ion (m/z)
E1	53-16-7	E2-d4	414*	399
E2	50-28-2	E2-d4	416*	285
T	58-22-0	T-d3	432*	417
11-kT	564-35-2	T-d3	503	518*
A	63-05-8	T-d3	430	432*
DHA	846-46-8	T-d3	432*	417
DHT	521-18-6	T-d3	434*	405
Pg	57-83-0	T-d3	458*	443
OHPg	200-699-4	T-d3	546*	316
Pn	145-13-1	T-d3	445	460*
OHPn	387-79-1	T-d3	548*	230
DHP	1662-06-2	T-d3	431	548*

Table 1. Ions used for identification and quantification of the analytes by GC/MS. *: molecular ion.

RESULTS

Validation of the quantification procedures

The reproducibility of the SPE procedures was assessed and the inter-assay variability was below 25 % (n=9) for most compounds and most sorbents. The good extraction/recovery yields for the different sorbents used for this work and for the different investigated matrices (table 2) indicate that, for the amount of matrix used, no saturation of the cartridges occurs. As regards gonads, the extraction efficiency is somewhat difficult to estimate, but a test carried out on spiked sediment (data not shown) showed that the recoveries were greater than 70 %.

The accuracy of the SPE-GC/MS method was assessed using Milli-Q water samples spiked with low levels of steroids (0.4 ng.g⁻¹) and prepared using the SPE procedures described previously for plasma, bile and gonad samples. Quantification ranged from 80 %

up to 132 % except for DHA and DHT (50-60%, because of unexplained poor recovery from aminopropyl cartridges).

	Plasma	Bile	Ovary
E1	93 ± 1	71 ± 5	97 ± 3
E2	85 ± 6	74 ± 3	102 ± 2
T	98 ± 2	71 ± 2	104 ± 12
11-kT	101 ± 2	71 ± 1	73 ± 7
A	94 ± 3	70 ± 2	93 ± 4
DHA	16 ± 3	33 ± 3	26 ± 4
DHT	24 ± 2	43 ± 4	32 ± 4
Pg	118 ± 2	72 ± 5	111 ± 6
OHPg	100 ± 7	71 ± 3	104 ± 5
Pn	107 ± 3	71 ± 3	98 ± 4
OHPn	97 ± 6	64 ± 1	101 ± 4
DHP	95 ± 2	62 ± 2	81 ± 8

Table 2. Recoveries of steroids in spiked matrices (50-150 ng.g⁻¹, depending on the compound). Results are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Plasma: C18 + NH₂; Bile: C18 + NH₂ (without the conjugate cleavage step); Gonads: microwave assisted extraction followed by EnviChrom-P + NH₂.

The procedure was further validated using human serum samples with certified values for E2 and Pg levels. As regards E2, the experimental values (n = 3) agreed well with the certified ones: 106 ± 12% of the certified concentration for BCR 577 (0.19 ± 0.01 ng.mL⁻¹) and 95 ± 5% for BCR 578 (0.37 ± 0.02 ng.mL⁻¹). Results obtained for BCR 347 (progesterone certified level: 3.19 ± 0.07 ng.mL⁻¹) were not as good as those obtained for E2 (125 ± 23%). This is likely to be due to the fact that T-d3 was used as the internal standard, not labelled Pg. Deuterated progesterone (Pg-d9) was tested as an internal standard, but this led to extremely low reproducibility of the quantification, probably because of the poor and variable stability of the Pg-d9 deuterium labelling during the derivatisation reaction.

Steroids levels in plasma, gonads and bile

Steroid levels were measured in plasma, gonads and bile (figure 1 for males, figure 2 for females). As regards gonads, results were expressed as ng.g^{-1} of fresh weight.

Testosterone

Testosterone levels in plasma ranged between below the limit of detection (0.1 ng.g^{-1}) and 2.0 ng.g^{-1} . Similar levels were found in control fish from exposure study 1 and exposure study 2. Levels in males were about 3 times higher than in females. In NP-treated male plasma, T concentration exhibited a 7-fold decrease whereas it was not affected in females. Gonad T concentrations ranged from 16.2 ng.g^{-1} down to below the limit of detection (0.2 ng.g^{-1}). In the testes, T levels were not affected by the investigated contaminants and were at least 10 times higher than in the ovaries, in which T was not detected. In bile, total (free + conjugated) T levels ranged from 12.5 up to 62.9 ng.g^{-1} . Fish exposed to nonylphenol and bisphenol A exhibited depressed T levels (lower than those observed in females). In males only, diallylphthalate and BDE 47 induced an apparent elevation of plasmatic androgens; these results, however, should be taken with caution because of large intervals of confidence. T levels were also increased in bile and testes of males exposed to diallylphthalate and BDE 47.

11-ketotestosterone

11-kT was detected only in male individuals. Its plasmatic levels ranged between below the limit of detection (0.3 ng.g^{-1}) and 11.9 ng.g^{-1} . 11-kT was not detected in the plasma of fish exposed to nonylphenol. Conversely, DAP and BDE 47 induced a large increase of plasmatic 11-kT concentrations (4-fold elevation), while the other contaminants did not affect its level. Total biliary 11-kT concentration was depressed by nonylphenol and bisphenol A (100-fold and 3-fold decrease, respectively). 11-kT could not be measured in the gonads because of a matrix interference.

Androstenedione

In males, plasmatic androstenedione levels ranged between below the limit of detection (0.1 ng.g^{-1}) and 4.4 ng.g^{-1} . A plasma level was dramatically depressed by nonylphenol exposure, while it remained rather unaffected by most contaminants (except an increase in males exposed to DAP and to BDE 47). In the gonads, A levels ranged from below the LOD (0.2 ng.g^{-1}) and 22.7 ng.g^{-1} . Testis concentration was affected only by NP (6-

fold decrease), while ovary concentration was not much affected by the investigated contaminants (ranging from 0.2 ng.g⁻¹ up to 4.5 ng.g⁻¹). In bile, A levels ranged from 1.1 up to 36.8 ng.g⁻¹, without any marked difference between males and females. Biliary A level was highly depressed by NP exposure (18-fold decrease), but it was increased in fish exposed to DAP and to BDE 47.

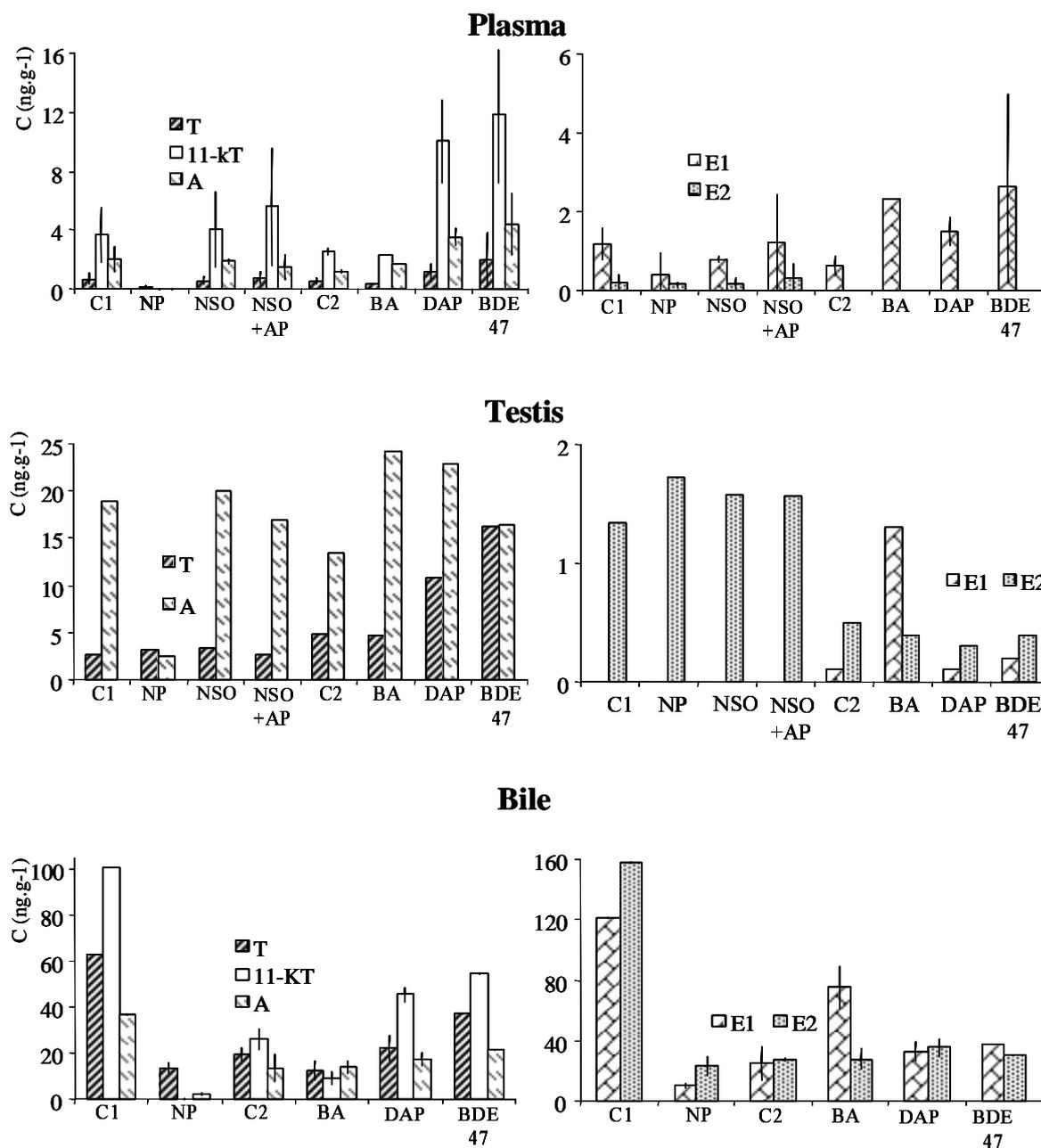


Figure 1. Levels of androgens and estrogens in plasma (*top*), testes (*centre*) and bile (*bottom*) of male turbot. Results are expressed as mean value and the error bars represent the 95% confidence interval of the mean (n=3; when no bars are plotted, only one single analysis was carried out). C1 : control 1; NP : p-nonylphenol; NSO: North Sea Oil; NSO+AP: North Sea Oil + alkylphenols; C2: control 2; BA: bisphenol A; DAP: diallylphthalate; BDE 47: tetrabromodiphenyl ether 47.

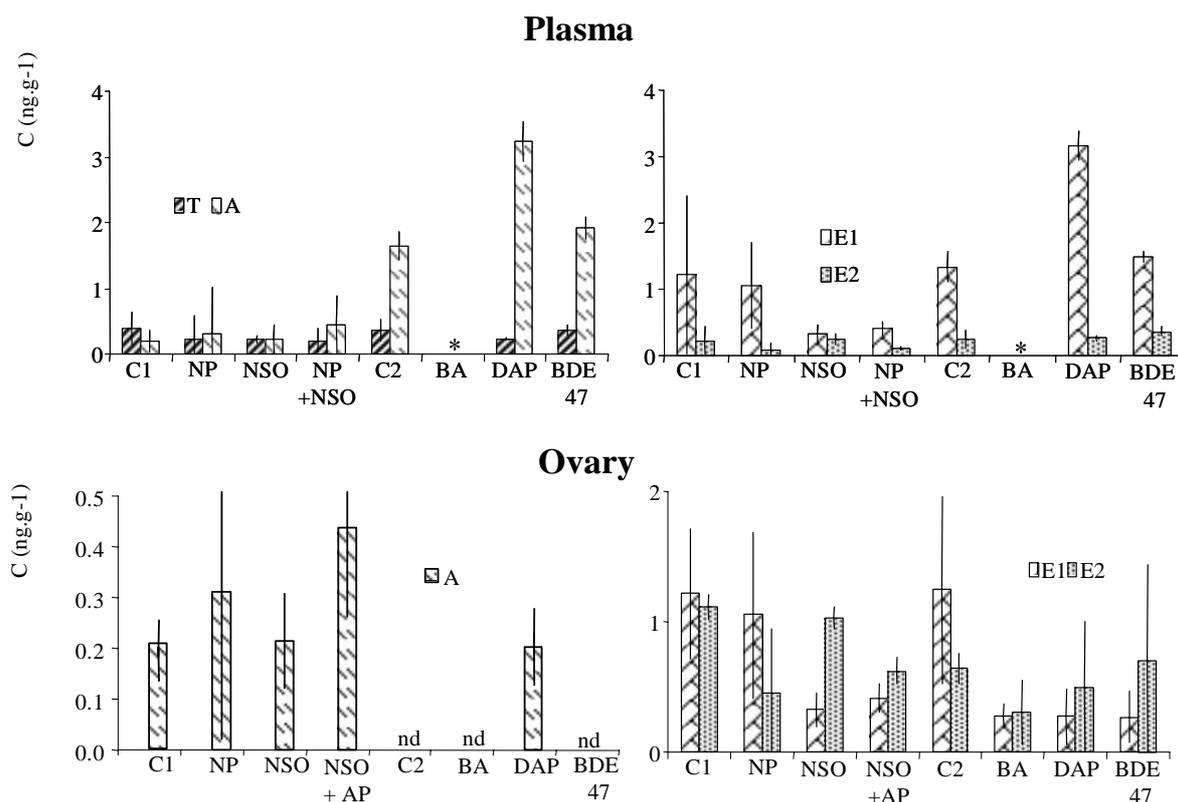


Figure 2. Levels of androgens and estrogens in plasma (*top*), and ovaries (*bottom*) of female turbot. Results are expressed as mean value and the error bars represent the 95% confidence interval of the mean (n=3). nd : not detected; *: not determined (no available sample). C1 : control 1; NP : p-nonylphenol; NSO: North Sea Oil; NSO+AP: North Sea Oil + alkylphenols; C2: control 2; BA: bisphenol A; DAP: diallylphthalate; BDE 47: tetrabromodiphenyl ether 47.

Estrone

Plasmatic E1 levels ranged from 0.4 up to 3.2 ng.g⁻¹, without any marked differences between males and females. In males, bisphenol A, DAP and BDE 47 induced an elevation of estrone plasma concentrations, although it was probably not significant for the latter compound. Conversely, E1 plasma concentration dropped by a factor 3 in males exposed to NP. Measured E1 gonad concentrations ranged between 0.1 and 1.3 ng.g⁻¹ and were about 10 times higher in control females than in control males. As regards the testes, E1 was determined only for exposure 2, because of matrix interference in samples from exposure 1. Bisphenol A was the only chemical able to induce an increase of E1 testis level (10-fold); the other contaminants did not affect E1 testicular content. In the ovaries, all contaminants – except nonylphenol – induced a general decrease of E1 concentration (about 4-fold). In bile, E1 levels increased following exposure to bisphenol A (3-fold increase for males) but decreased in nonylphenol-treated males (12-fold decrease).

Estradiol

Plasmatic levels of E2 were generally higher in females than in males. They ranged from below the limit of detection (0.1 ng.g^{-1}) up to 0.4 ng.g^{-1} . In males, levels were close to the limit of detection, either above (exposure 1) or below (exposure 2). Gonadal levels of estradiol ranged between 0.3 and 0.7 ng.g^{-1} , at similar levels in the testes and in the ovaries, and were not clearly affected by the investigated contaminants. In males, E2 bile levels were highly depressed by nonylphenol (5-fold decrease).

Pregnenolone and other steroids

The sex steroid precursor pregnenolone was detected in both gonads and bile. Gonad levels ranged between 0.5 and 6.9 ng.g^{-1} while bile levels ranged from 7.9 up to 57.1 ng.g^{-1} . Pregnenolone concentrations were similar in both males and females and no clear trend was observed. The other investigated sex steroids (progesterone, 17α -hydroxyprogesterone, 17α -hydroxypregnenolone, dehydroandrostenedione and dehydrotestosterone) were not detected in any of the analysed samples. This is likely to be a consequence of the sexual immaturity of the fish used in this study.

Androgens to estrogens ratio (R)

The impact of the selected contaminants on steroid hormone profiles was evaluated using a ratio noted R and defined by the following equation: $R = \sum C_{\text{androgens}} / \sum C_{\text{estrogens}}$.

In male plasma, nonylphenol and bisphenol A induced a dramatic decrease of R (fig 3). For these two exposures, the mean R value for males was close to that observed in females. Although measurements on testes were carried out in single analysis only (due to low amounts of tissues), the observed pattern was similar to that observed in plasma for nonylphenol and bisphenol A exposures. Furthermore, an elevation of R was also observed in males exposed to either DAP or BDE 47. As regards bile, the observed trends were less clear, perhaps as a consequence of the variability of bile composition. Overall, females were less sensitive than males, their R ratio being almost unaffected by the investigated chemicals.

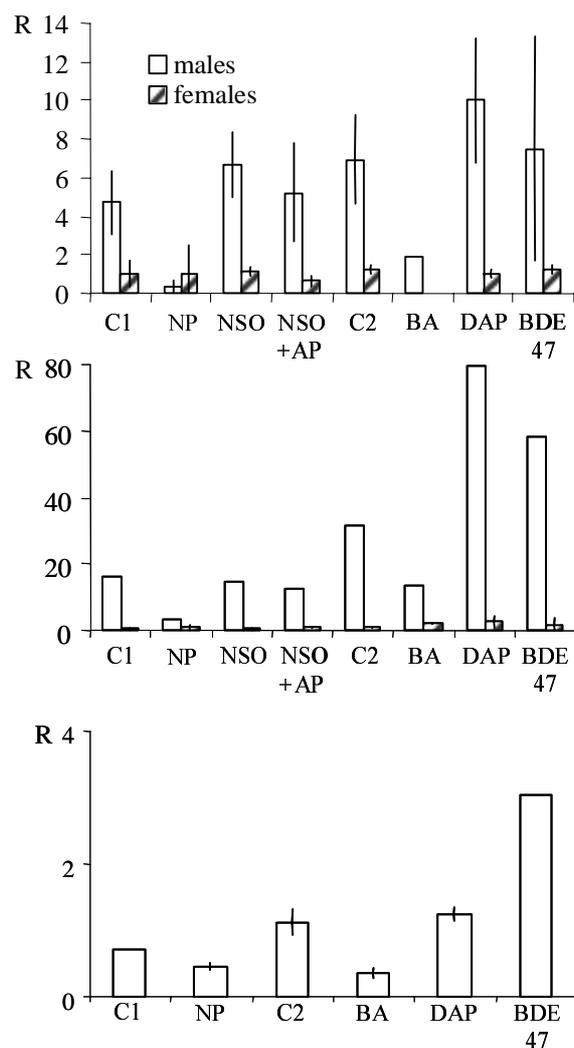


Figure 3. Androgen to estrogen ratio (R) in plasma (*top*), gonad (*centre*) and bile (*bottom*) of juvenile turbot. Results are expressed as mean value and the error bars represent the 95% confidence interval of the mean (when no bars are plotted, only one single analysis was carried out). C1 : control 1; NP : p-nonylphenol; NSO: North Sea Oil; NSO+AP: North Sea Oil + alkylphenols; C2: control 2; BA: bisphenol A; DAP: diallylphthalate; BDE 47: tetrabromodiphenyl ether 47.

DISCUSSION

The first aim of this work was to develop analytical procedures for the simultaneous determination of 12 endogenous sexual steroids in three biological matrices (fish plasma, bile and gonads) relevant for the study of sex steroid metabolism. The second objective was to apply these procedures to the investigation of the effect of selected contaminants on the sex steroid dynamics in juvenile turbot. The investigated contaminants included p-nonylphenol, North sea oil, North sea oil + mixture of alkylphenols, bisphenol A, diallylphthalate and tetrabromodiphenyl ether 47.

Among these compounds, *p*-nonylphenol and bisphenol A showed the highest potential to disrupt steroid hormone metabolism in turbot. Males were far more sensitive to these chemicals than females and testes were the most sensitive of the investigated biological compartments.

At the dose of 29 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, *p*-nonylphenol dramatically disrupted steroid profiles in male turbot. Because of its affinity for the estrogen receptors, NP is usually classified as estrogenic [1]; in this study, however, NP demonstrated anti-androgenic properties. In NP-treated fish, T plasmatic content decreased (7 times), although testicular level was unchanged. In addition, biliary T concentration was lowered by NP exposure; together, these results tend to suggest that NP affected hepatic T metabolism. Due to NP exposure, A secretion in the testes decreased (8-fold), while 11-kT could not be measured due to matrix interference. The plasmatic levels of A and 11-kT fell below the limits of detection of the analytical procedure, as a direct consequence of depressed testicular secretion. A concomitant (but at least 10-fold lower) decrease of the circulating estrone concentration was observed; this could be explained by the fact that estrone is directly metabolised from androstenedione, via the aromatase activity. The decrease of androgen levels in plasma in and testes was possibly due to an increase of the testicular conjugation activity. Arukwe and co-workers [23] reported, however, that 4-NP decreased hepatic glucuronyltransferase activity in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*), although the effect was not significant. Martín et al showed that testosterone-UDPGT was not affected in fish exposed to alkylphenols and alkylphenols ethoxylates [24]. Therefore, another possible explanation would be that the depression of A, T and 11-kT levels was linked to a shift in the steroidogenesis enzymatic pathway. Laurenzana et al [25] showed that, in rat, NP was a noncompetitive inhibitor of P450c17 activity, the enzyme that catalyses the conversion of progesterone to 17 α -hydroxyprogesterone (OHPg) and then converts OHPg to A. In turbot, the depression of A levels was not linked to any increase of its precursors, Pg and OHPg, which would tend to indicate that the enzymatic disruption occurred downstream of A production. It is also possible that conversion of dehydroepiandrosterone (DHEA) to A could have been affected by NP; however, since DHEA levels were not determined, this assumption could not be validated. Previous studies, involving different fish species, different exposure times and concentrations, did not indicate a clear effect of *p*-nonylphenol on T and E2 dynamics. Schwaiger et al [12] observed that a mixture of 2- and 4-nonylphenol induced a 2-fold increase in plasmatic level of E2 and a 30% decrease of T plasma level in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, 4-month intermittent exposure, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Giesy et al [11] exposed spawning fathead minnows (*Pimephales promelas*) to 4-NP (0.05 up to 3.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 42 days) and observed a significant elevation of plasmatic E2 levels, in both males

and females. Conversely, Villeneuve et al [13] found that 4-nonylphenol had no effect nor on E2 neither on T plasmatic levels in mature male common carp (*Cyprinus carpio*, 30-day exposure, 5.4 µg.L⁻¹). Thus, it appears that NP effect on steroid hormone metabolism depends on the sensitivity of the fish species considered, on the NP concentration and on the duration of the exposure. Moreover, it has been shown that the *in vivo* VTG induction by NP was isomer-dependent [26-27] and, therefore, the enzymatic disruption induced by NP could also be possibly isomer-dependent.

As mentioned above, bisphenol A lowered the androgens to estrogens ratio in males, although the observed decrease was about 4-fold lower than that observed with NP. However, the mode of action of bisphenol A on steroid hormone metabolism differed from that of NP since it did not affect androgens levels. Bisphenol A increased estrone levels, suggesting an up-regulation of the aromatase activity. A previous report by Kishida et al [28] indicated that bisphenol A exposure induced brain aromatase activity in zebrafish (*Danio rerio*). The results of the present study suggest that bisphenol A induces testicular aromatase, as observed with 17 α -ethynylestradiol in medaka [29]. In addition, it should be noted that only E1 levels were increased, while E2 levels were unaffected by bisphenol A, indicating that this chemical was more effective on androstenedione aromatisation than on testosterone aromatisation. Eventually, for both NP and bisphenol A, the modifications of the hormonal profile observed in the testes were also observed in the plasma, indicating that the repercussion of testicular secretion alteration was rapid.

PAHs contained in North Sea Oil exhibited no significant effect on steroidogenesis of juvenile turbot, in neither males nor females. Steroid production in the testes and the ovaries was not significantly depressed. Overall, there was no impact of oil exposure on the androgens to estrogens ratio (R). This is not consistent with previous reports by Monteiro and colleagues [16; 30] that showed that phenanthrene, benzo[a]pyrene and chrysene were antiestrogenic in female flounder (*Platichthys flesus*). *In vitro*, they observed that A and E2 production was inhibited by these PAHs. *In vivo*, E2 levels in PAH-treated females were depressed whereas androgens were unaffected. Several reasons may explain the discrepancy between their results and ours, at least for their *in vivo* study. First, they worked on individual compounds, while we used North Sea Oil, a complex mixture of hydrocarbons. Then, their study was carried out on adult flounders (in the previtellogenic phase of their reproductive cycle), while our work involved juvenile turbot. Eventually, they exposed fish in via the diet, which may have modified the bioavailability of the compounds, compared to waterborne PAHs.

PAHs in combination with alkylphenols had little effect on sex steroid dynamics in juvenile turbot. The composition of this mixture was meant to be close to that of water produced by

off-shore oil production platforms. Although it contained about 140 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of alkylphenols, its potency towards steroidogenesis was much lower than that of 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of p-nonylphenol. This is likely to be due to the presence of short alkyl chain alkylphenols that exhibit lower estrogenicity *in vivo* than p-nonylphenol [27], and are possibly less potent to disrupt steroidogenesis enzymes.

BDE 47 and DAP induced a general elevation of steroids levels in all three investigated matrices, due to an increase of steroid secretion. Androgen production was more sensitive to these chemicals than that of estrogens, which led to increased R values although it is difficult to draw definitive conclusions because of either high standard deviations or lack of replicate measurements. To our knowledge, this is the first report of the impact of DAP and BDE 47 on steroids profiles in fish. As regards phthalates, Jobling et al [31] showed that some of these compounds, such as butylbenzyl phthalate (BBP) and di-n-butylphthalate (DBP), exhibited affinity for the estrogen receptor in rainbow trout liver. Only BBP induced VTG production *in vivo* in BBP and DBP-injected immature rainbow trout which may suggest a possible antagonist effect of DBP [32]. No data on the estrogenicity was found for diallylphthalate (DAP). Using estrogen-receptor binding assays, Meerts et al [33] showed that BDE 47 was weakly estrogenic compared to other BDEs. An *in vivo* study conducted by Boon [34] using juvenile salmon (*Salmo salar*) showed that penta- and octa-BDEs had no short-term estrogenic effects (endpoints: expression of CYP1A, vitellogenin and *zona radiata* proteins).

In summary, this study showed that two chemicals usually considered as xenoestrogens, p-nonylphenol and bisphenol A, were able to disrupt the steroid hormone balance in juvenile turbot. Both chemicals induced a decrease of the androgens to estrogens ratio (R) in gonads, plasma and bile, although they exhibited different apparent modes of action on the steroidogenesis. Overall, the R ratio showed to be an efficient tool for the assessment of the relative potencies of selected contaminants towards the sex steroid dynamics in fish.

ACKNOWLEDGEMENTS : the authors wish to acknowledge the Aquitaine Regional Council and the CNRS for providing PhD funding for P.Labadie, as well as BEEP (EU funded, contract EVK3-CT2000-00025) and Seine Aval programmes for research funding.

REFERENCES

1. Metzler M, Pfeiffer E. 2001. Chemistry of natural and anthropogenic endocrine active compounds. In Metzler M, ed, Endocrine disruptors, Vol 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp 63-80.

2. Markley CM, Michaelson CL, Sonnenschein C, Soto AM. 2001. Alkylphenols and bisphenol A as environmental estrogens. In Metzler M, ed, Endocrine disruptors, Vol 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp 131-153.
3. Pait AS, Nelson JO. 2003. Vitellogenesis in male *Fundulus heteroclitus* (killifish) induced by selected estrogenic compounds. *Aquat Toxicol* 64: 331-342.
4. Madsen LL, Korsgaard B, Bjerregaard P. 2003. Estrogenic effects in flounder *Platichthys flesus* orally exposed to 4-tert-octylphenol. *Aquat Toxicol* 64: 393-405.
5. Lindholm C, Pedersen SN, Bjerregaard P. 2001. Uptake, metabolism and excretion of bisphenol A in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 55: 75-84.
6. Van den Belt K, Verheyen R, Witters H. 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotox Environ Safety* 56: 271-281.
7. Kinnberg K, Toft G. 2003. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotox Environ Safety* 54: 16-24.
8. Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P, Sumpter J. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Tox Chem* 15: 194-202.
9. Gray MA, Metcalfe CD. 1997. Induction of testis-ova in japanese medak (*Oryzias latipes*) exposed to *p*-nonylphenol. *Environ Toxicol Chem* 16: 1082-1086.
10. Sohoni P, Tyler CR, Hurd K, Caunter J, Hetheridge M, Williams T, Woods C, Evans M, Toy R, gargas M, Sumpter JP. 2001. Reproductive effect of long-term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol* 35:2917-2925.
11. Giesy JP, Pierens SL, Snyder EM, Miles-Richardson SM, Kramer VJ, Snyder SA, Nichols KM, Villeuve DA. 2000. Effects of 4-nonylphenol exposure on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 19: 68-87.
12. Schwaiger J, Mallow U, Ferling H, Knoerr S, Braunbeck Th, Kalbfus W, Negele RD. 2002. How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism. *Aquat Toxicol* 59: 177-189.
13. Villeneuve DL, Villalobos SA, Keith TL, Snyder EM, Fitzgerald SD, Giesy. 2002. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol on plasma sex steroid and

- vitellogenin concentrations in sexually mature male carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* 47: 15-28.
14. Nichols KM, Snyder EM, Snyder SA, Pierens SL. 2001. Effects of nonylphenol ethoxylates exposure on reproductive output and bioindicators of environmental estrogen exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environ Tox Chem* 20:510-522.
 15. Harris CA, Sumpter JP. 2001. The endocrine disrupting potential of phtalates. In Metzler M, ed, Endocrine disruptors, Vol 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp 169-202.
 16. Monteiro PRR, Reis-henriques MA, Coimbra J. 2000. Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mar Environ Research* 49: 453-467.
 17. Branchi I, Capone F, Alleva E, Costa LG. 2003. Polybrominated diphenyl ethers: neurobehaviorial effects following developments exposure. *Neurotoxicol* 24: 449-462.
 18. Legler J, Brouwer A. 2003. Are brominated flame retardants endocrine disruptors? *Environ Int* 29: 879-885.
 19. Larsen BK, Sundt RC, Bjørnstad A, Andersen OK. BEEP workshop, December 2003, Barcelona.
 20. Meng LJ, Sjövall J. 1997. Method for combined analysis of profiles of conjugated progesterone metabolites and bile acids in serum and urine of pregnant women. *J Chrom B* 688: 11-26.
 21. Al-Alousi LM, Anderson R. 2002. A relatively simple and rapid multi-component method for analysis of steroid profiles in blood, fecal and liver samples. *Steroids* 67: 269-275.
 22. Labadie P, Budzinski H. Short term exposure to waterborne 17 α -ethynylestradiol disrupts steroid hormone metabolism in juvenile turbot (*Psetta maxima*). Submitted to *Environmental Toxicology and Chemistry*.
 23. Arukwe A, Förlin L, Goksøyr A. 1997. Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environ Toxicol Chem* 16: 2576-2583.
 24. Martín R, Lavado R, Porte C. 2004. Co-occurrence of alkylphenols in the bile of carps (*Cyprinus carpio*) from the Ebro River with some biochemical indices of endocrine function. *Environ Toxicol Chem*, in press.

25. Laurenzana EM, Balasubramaniam G, Weis C, Blaydes B, Newbold RR, KB Delclos. 2002. Effect of nonylphenol on serum testosterone levels and testicular steroidogenic enzyme activity in neonatal, pubertal and adult rats. *Chem Biol Interact* 139: 23-41.
26. Chikae M, Ikeda R, Hasan Q, Morita Y, Tamyia E. 2003. Effect of alkylphenols on adult male medaka: plasma vitellogenin goes up to the level of estrous female. *Environ Toxicol Pharm* 15: 33-36.
27. Routledge EJ, Sumpter JP. 1997. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J Biol Chem* 272: 3280-3288.
28. Kishida M, McLellan M, Mirande JA, Callard GV. 2001. Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (P450aromB) and perturb markers of early development in zebrafish (*Danio rerio*). *Comp Biochem Phys Part B* 129: 261-268.
29. Scholz S, Gutzeit HO. 2000. 17 α -ethynylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 50: 363-373.
30. Monteiro PRR, Reis-henriques MA, Coimbra J. 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus*). *Aquat Toxicol* 48: 453-467.
31. Jobling S, Reynolds T, White R, Parker MG, Sumpter JP. 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect* 103: 582-587.
32. Christiansen LB, Pedersen KL, Korsgaard B, Bjerregaard P. 1998. Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using in vivo synthesis of vitellogenin as a biomarker. *Mar Environ Res* 46: 137-140.
33. Meerts IAT, Letcher RJ, Hoving S, Marsh G, Bergman A, Lemmen JG, Van den Burg B, Brouwer A. 2001. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated BDEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environ Health Perspect* 109: 399-407.
34. Boon JP, van Zanden JJ, Lewis WE, Zegers BN, Goksøyr A, Arukwe A. 2002. The expression of CYP1A, vitellogenin and zona radiata proteins in Atlantic salmon (*Salmo salar*) after oral dosing with two commercial BDE flame retardants mixtures: absence of short-term responses. *Mar Environ Res* 54: 719-724.

Short term exposure to waterborne 17 α -ethynylestradiol disrupts steroid hormone metabolism in juvenile turbot (*Psetta maxima*)

Pierre LABADIE et Hélène BUDZINSKI

Le 17 α -  thynyl  stradiol, œstrogène de synthèse, est un des x  noc  strog  nes les plus puissants détectés dans les effluents de stations d'épuration. Ce composé est capable, à très faible dose (de l'ordre du ng.L⁻¹), d'entraîner différents troubles chez les poissons : induction de la synthèse de vitellogénine chez des individus mâles, altération de la structure des tissus testiculaires, chute de la fertilité...

Dans cette étude, les effets du 17 α -éthynylœstradiol sur le métabolisme des stéroïdes hormonaux chez le turbot juvénile (*Psetta maxima*) ont été étudiés, par le biais d'une exposition de 15 jours en milieu contrôlé. Treize stéroïdes endogènes ont été mesurés chez les turbots, dans trois compartiments biologiques différents (gonades, plasma et bile). L'impact du 17 α -éthynylœstradiol sur le profil hormonal des turbots s'  st avéré être dépendant du sexe, les mâles étant nettement plus sensibles que les femelles à ce composé. Même à très faible concentration (3.5 ng.L⁻¹) et pour une durée d'exposition aussi courte, le 17 α -éthynylœstradiol est capable de perturber la synthèse testiculaire des androgènes, entraînant une chute significative de leurs niveaux plasmatiques. Androst  nedione et 11-cétotestostérone sont particulièrement affectés, puisque ces composés ne sont détectés ni dans les testicules ni dans le plasma des individus exposés au 17 α -  thynyl  stradiol. La production testiculaire d'œstrogènes et l'activité de conjugaison semblent au contraire augmenter chez ces mêmes individus. Globalement, chez les mâles traités au 17 α -éthynylœstradiol, le rapport androgènes/œstrogènes (plasma et gonades) diminue fortement pour approcher celui observé chez les femelles. Ces résultats indiquent la forte sensibilité du système hormonal des turbots juvéniles à l'exposition au 17 α -éthynylœstradiol ; ce composé est capable d'altérer le métabolisme des stéroïdes hormonaux chez ce poisson, même à très faible dose et pour un temps d'exposition relativement court.

Publication n  5 soumise    Environmental Toxicology and Chemistry

Short term exposure to waterborne 17 α -ethynylestradiol disrupts steroid hormone metabolism in juvenile turbot (*Psetta maxima*)

Pierre LABADIE and Hélène BUDZINSKI

ABSTRACT

17 α -ethynylestradiol is amongst the most potent xenoestrogens found in treated sewage. Several reproductive disorders have been reported in fish exposed to this chemical, such as vitellogenin induction and alteration of gonad structure or fertility. In this study, the effects of 17 α -ethynylestradiol (EE2) on the sex steroids dynamics in male and female juvenile turbot (*Psetta maxima*) was investigated in a 15-day *in vivo* experiment. Thirteen endogenous steroids were measured in three biological compartments (gonads, plasma and bile). The impact on the endocrine status of juvenile turbot was sex-dependent, since males were much more sensitive than females. Even at very low concentration (3.5 ngL⁻¹) EE2 depressed the testicular androgen production as well as plasmatic levels. Androstenedione and 11-ketotestosterone were highly affected by EE2-exposure, since their secretion was totally suppressed in EE2-treated males. Testicular estrogen production and conjugation appeared to increase as a consequence of EE2 exposure. Overall, the ratio androgens to estrogens in EE2-exposed males dropped in testes and plasma, and was close to that observed in females. These results indicate that male juvenile turbot are susceptible to hormonal imbalance as a consequence of short-term exposure to environmentally relevant EE2 levels.

INTRODUCTION

In recent years, concern has been raised about the occurrence of estrogenic chemicals in aquatic ecosystems impacted by sewage effluents; this issue has been reviewed by Metzler and Pfeiffer [1]. Adverse effects in fish have been reported [2-5]. Among the incriminated compounds, estrogens are of major concern, since most environmental xenoestrogens are orders of magnitude less potent than the natural estrogen estradiol. The natural estrogens, estrone (E1) and 17 β -estradiol (E2), as well as the synthetic estrogen 17 α -ethynylestradiol (EE2) are considered as the main contributors to estrogenicity in waste water treatment plant effluents [6, 7]. *In vitro* studies [8-10] indicated that EE2 potency was close to that of estradiol. Several *in vivo* experiments showed, however, that EE2 was at least one order of magnitude more potent than E2 [10, 11]. Numerous studies have reported adverse effects of EE2 on fish, such as vitellogenin induction in males [10-15], decrease of fertility of maturing male individuals [16], disturbance of the life cycle of several fish species [13, 17] or alteration of gonadal structure [15]. Purdom and al. reported that EE2 could induce vitellogenin production in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at extremely low level (0.1 ng.L⁻¹, [18]). MacLatchy et al. [12] showed that EE2 exposure altered plasmatic levels of 11-ketotestosterone and estradiol in mummichog (*Fundulus heteroclitus*), while Schultz et al. [16] have drawn the same conclusions for 11-ketotestosterone and 17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogesterone in rainbow trout.

The aim of this study was to investigate the impact of short term exposure to EE2 on sex steroid dynamics in juvenile turbot (*Psetta maxima*), to provide further insight of the mechanism of action of this chemical on the steroidogenesis in juvenile fish. Thirteen endogenous steroids (including androgens, estrogens, progestins and pregnenolone) were determined in three biological compartments: gonads as the major organ of steroidogenesis, plasma as the carrier of steroids to the target organs, and bile as the receptacle of hepatic metabolism and catabolism products. Furthermore, both conjugated and “free” (unconjugated) forms of the sex steroids were determined since steroid conjugates, although being endocrinally inactive, play a role in the clearance of steroids and, possibly, in the local regulation of active hormones. To achieve this goal, an analytical procedure was developed and validated for the fractionation and analysis of unconjugated/conjugated steroids. A short-term *in vivo* assay was carried out: fish were exposed during 15 days to EE2 (3.5 and 75 ng.L⁻¹). The low exposure level was environmentally relevant, whereas the high exposure level was used as a positive control for EE2-induced effects.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All native steroids were supplied by Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France): estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3), testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT), androstenedione (A), dihydroandrostenedione (DHA), dehydroepiandrosterone (DHEA), progesterone (Pg), 17 α -hydroxyprogesterone (OHPg), pregnenolone (Pn), 17 α -hydroxypregnenolone (OHPn), 17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogesterone (17,20-DHP), estradiol-17-glucuronide, estradiol-3-sulphate and 17 α -ethynylestradiol (EE2). Deuterated steroids (testosterone-d₃, 17 β -estradiol-d₄ and 17 α -ethynylestradiol-d₄, purity > 99%), used as internal standards, were obtained from C/D/N Isotopes (Montreal, Canada). Stock solutions were prepared in methanol at 100-200 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ and stored at 4°C.

All solvents were either *HPLC grade* or *organic residue analysis* and were obtained from Atlantic Labo (Eysines, France). Solid-phase extraction (SPE) was carried out using 200 mg-Oasis HLB cartridges (Waters, St Quentin en Yvelines, France) and 500 mg-LC-NH₂ cartridges purchased from Supelco (St Quentin Fallavier, France). Triethylamine (TEA) (purity >99%) was used for some SPE procedures (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Trifluoroacetic acid (TFA) (*reagent grade*, purity > 99%) was obtained from Fischer chemicals (Fischer Scientific Labosi, Elancourt, France). MSTFA (N-Methyl-N(trimethylsilyl)trifluoroacetamide, > 97%; Acros Organics, Noisy-Le-Grand, France) was used as the silylation agent for GC/MS analysis of the steroids, in combination with mercaptoethanol (purity > 99%) and ammonium iodide (purity > 99%) were both provided by Acros Organics. Pure water was obtained with a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France). β -glucuronidase-arylsulfatase from *Helix pomatia* (glucuronidase: 100 000 Sigma units.mL⁻¹ and sulphatase: 7500 Sigma units.mL⁻¹), aprotinin (8.2 TIU.mL⁻¹) and heparin (300 USP units.mL⁻¹) were supplied by Sigma-Aldrich. Sodium acetate tri-hydrate (purity >99%, Sigma-Aldrich) and acetic acid (purity >99,5%, VWR International, Strasbourg, France) were used for the preparation of acetate pH buffer. MS 222 (tricaine methanesulphonate) was purchased from Sigma-Aldrich.

Animals

Farmed juvenile turbot (body weight: 82.8 \pm 18.2 g for males (n=50), 79.7 \pm 18.3 g for females (n=49); provided by "Ferme aquacole de l'Île de Ré", Loix-en-Ré, France) were acclimated to laboratory conditions for 2 weeks prior to the experiment. The exposures lasted for 15 days and all groups were fed on a daily basis (10 am) with TU-5 pellets (Skretting-

Trouw, Fontaine-les-Vervins, France). Fish were held in 100-L glass aquaria filled with 90 L of seawater, with a 10:14 h light:dark regime.

Exposure to 17 α -ethynylestradiol

Groups consisting of 40 juvenile turbot (10-month old, males and females) were exposed to synthetic seawater, synthetic seawater + methanol (<0.1%,v/v) as solvent control, EE2 3.5 ng.L⁻¹ and EE2 75 ng.L⁻¹ (these are estimated concentrations; details of the calculation are provided in the Results & Discussion Section, see *EE2 concentration in the exposure aquaria*). Exposures were run in semi-static conditions : EE2 concentrations were monitored daily and the levels were adjusted by adding the appropriate mass of spike solution. Two different EE2 spike solutions were used for the low and high exposure levels (17.7 $\mu\text{g.g}^{-1}$ and 179.6 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectively). Thus, similar volumes (60-80 μL) of either methanol (solvent control tank) or spike solution (EE2 tanks) were added daily (around 10 am) to the exposure tanks, except the control tank, yielding a post-spike methanol concentration lower to 0.0001% (v/v) in all tanks (except the control tank). Synthetic seawater (salinity 33-35‰), was produced from reverse osmosis water (Aquafeel system, Bordeaux, France) and from sea salt (Red Sea, Verneuil sur Avre, France). Physical and chemical parameters were monitored daily to insure a good water quality: salinity (33-35‰), pH (8.0-8.5), nitrate (<10 mg.L⁻¹), nitrite (<0.6 mg.L⁻¹), phosphate (<0.3 mg.L⁻¹), oxygen (6.0-6.4 mg.L⁻¹) and temperature (14-16 °C). Chemical parameters were determined with JBL kits (Neuhofen, Germany), while dissolved oxygen levels were measured using a StrathKelvin 781 oxygen meter (StrathKelvin, Glasgow, UK). About 30% of the total seawater volume was renewed daily in each tank, so as to keep low nitrite levels. Seawater filtration was performed by means of expanded polypropylene foam, immersed in the tanks.

For measurement of EE2, 500 mL of water were spiked with 15 ng of EE2-d4 and extracted on Oasis HLB cartridges (flow rate 15 mL.min⁻¹), previously conditioned with 6 mL methanol and 6 mL Milli-Q water. The sorbent was rinsed with 5 mL of methanol/water (60/40, v/v), and the analytes were eluted with 8 mL of methanol. Extracts were taken to dryness under a stream of nitrogen at 50°C, prior to the silylation of EE2 and EE2-d4. The derivatisation reagent was prepared as follows: a mixture of 250 μL of MSTFA, 15 μL of mercaptoethanol and 10 mg of NH₄I was left for about 10 min at 65 °C. Thereafter, this mixture was diluted 10 times with MSTFA to obtain the derivatisation reagent, 30 μL of which were added to each extract and the samples were left at 65 °C for 30-40 min. Then, 30 μL of dichloromethane were added and the samples were analysed by GC/MS.

Separation and detection of the analytes were achieved using an Agilent Technologies Gas Chromatograph system (6890 series) coupled with an Agilent Technologies Mass Spectrometer detector (5973 series), used in electron impact mode (70 eV), with the electron multiplier voltage set at 1500-1800 V and the source temperature set at 230°C. The separation was performed on a Agilent HP5-MS capillary column (length: 30 m; internal diameter: 250 µm; stationary phase thickness: 0.25 µm), with the following oven parameters: 90°C, 1 min; 7.5°C.min⁻¹, 290°C, isothermal 5 min. Helium 6.0 (Linde, Bassens, France) was used as the carrier gas (constant flow: 1 mL.min⁻¹). The injection volume was set at 2.5 µL (splitless; pulsed pressure: 25.0 psi during 60 s), while the injector temperature was set at 250°C, and the purge flow was set at 60 mL.min⁻¹ after 1.5 min. For each series of analyses, blank samples were run and EE2 was never detected (< 0.05 ng/blank sample). Analyses were run in selected ion monitoring (SIM) mode, with a dwell time set at 85 ms. The ions used for the quantification of EE2 and EE2-d4 were m/z 425 ([M-CH₃]⁺) and 429 (M⁺), respectively. Furthermore, the ion m/z 440 (EE2 molecular ion) was used to confirm the peak attribution to EE2 : for a given peak, the area ratio m/z 425 to m/z 440 was compared to that obtained with an authentic EE2 standard, prior to definitive attribution of the peak.

Sampling procedure

For each exposure and each sex, at least 12 fish were sampled. The sex was determined according to gonadal morphology. Fish were first anesthetised with MS 222 (1g.L⁻¹ in seawater) and blood samples were collected from the caudal vein, using a 3-mL syringe previously rinsed with heparin. After collection, samples were transferred to 2-mL centrifugation tubes and 5µL of heparin, as well as 2 µL of aprotinin, were added into each tube to prevent coagulation and proteolysis. The blood samples were centrifuged (4500 rpm, 5 min, room temperature) and the plasma was kept at - 80°C until analysis. After fish were killed by a blow to the head, bile and gonads were taken, transferred to Eppendorf tubes and kept on dry ice until the end of the sampling procedure. They were then stored at - 80°C until further analysis.

Measurement of plasma, bile and gonad steroids

Sample preparation

Frozen samples were slowly defrosted at room temperature. For each exposure and sex, pooled samples were prepared by combining equivalent masses of plasma, bile or gonads

from individual samples and triplicate measurements were carried out on the pools. Analyses were performed on 1g-plasma samples (about 1 mL), 100-mg bile samples and 200-800-mg gonad samples. Prior to solid phase fractionation, plasma and bile samples were combined with 2 mL sodium acetate buffer (pH 5.0, 10^{-2} M) and spiked with 10 ng of T-d3, E2-d4 and EE2-d4. Testis and ovary tissues were homogenised using an Ultra-Turrax[®] T25 Basic dispersing tool (IKA[®] Werke, Staufen, Germany) during 1 min at 6000 rpm, in 30 mL of methanol/Milli-Q water (55:45, v/v). The homogenate was divided into three aliquots and 20 ng of T-d3 and E2-d4 were added to each replicate. The steroids were extracted by Focussed Microwave Assisted Extraction (Microdigest 301, Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France): 30 W, 5 min, 10 mL of Methanol/ Milli-Q water (55:45, v/v). The extracts were then centrifuged at 4500 rpm during 5 min, at room temperature. The supernatant was transferred to a vial and the methanol content of the extracts was evaporated at 60 °C under a nitrogen stream. The so-obtained extract was then fractionated and purified as described below.

Fractionation and clean-up

A scheme of the SPE procedure is presented in figure 1. The samples were passed through a 200- mg Oasis HLB SPE cartridge previously conditioned with 6 mL of methanol and 6 mL of Milli-Q water ($3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$). The cartridge was washed with 3mL of Milli-Q water and the steroid conjugates were eluted with 5 mL of methanol/Milli-Q water (6:4, v/v) containing TEA (final concentration : $5\cdot 10^{-3}$ M). The sorbent was then dried with a nitrogen flow (positive pressure, $P= 3$ bar), and the free steroids were eluted with 8 mL methanol. The latter fraction was evaporated at 50°C under a nitrogen stream. A clean-up step was performed using aminopropyl-silica cartridges (NH_2) conditioned with 4 mL of ethyl acetate and 4 mL of ethyl acetate/methanol (4:1, v/v). The Oasis HLB extracts were dissolved in 2 mL of the latter solvent and sucked through the NH_2 cartridges. The steroids passed unretained through the sorbent and the eluate was directly collected; the cartridges were further rinsed with 2 mL of the solvent mixture and these 2 mL were combined with the first eluate and taken to dryness, at 50°C under a nitrogen stream. Eventually, the samples were derivatised and analysed by GC/MS as previously described for the determination of EE2 in water. For each analyte, two ions were monitored, generally the molecular ions M^+ and the ion corresponding to the loss of a methyl group, $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$. The ions selected for quantification and identification purposes were, respectively, m/z 432 (M^+) and 417 for T, DHA and DHEA, 430 (M^+) and 432 for A, 434 (M^+) and 405 for DHT, 503 and 518 (M^+) for 11-kT, 416 (M^+) and 285 for E2, 414 (M^+) and 399 for E1, 504 (M^+) and 386 for E3, 458 (M^+) and 443 for Pg, 546 (M^+) and 316 for OHPg, 445 and 460 (M^+) for Pn, 548 (M^+) and 230 for OHPn, 431 and 548 (M^+) for DHP. E2-d4 (m/z 420, M^+) was used as internal

standard for the quantification of native estrogens, while T-d3 (m/z 435, M⁺) was used for that of all other steroids.

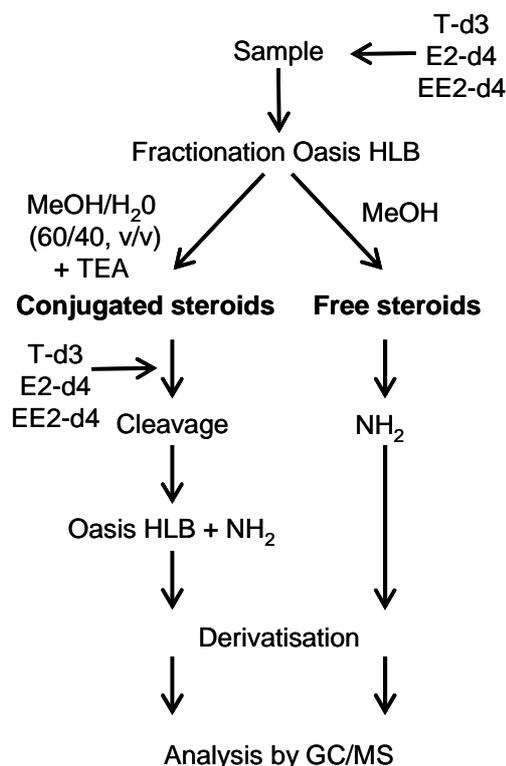


Figure 1. Schematic analytical procedure for the analysis of unconjugated and conjugated steroids from fish samples.

Solvolysis, enzymatic hydrolysis and purification

The conjugated fraction was subjected to both solvolysis and enzymatic hydrolysis. Dried Oasis HLB extracts were incubated at 45°C for 30 min with trifluoroacetic acid/methanol/tetrahydrofuran (10µL/200µL/800µL, adapted from [19]). After neutralisation with 400 µL of 0.2 M Na₂CO₃, the organic solvents were evaporated at 60°C under a gentle nitrogen stream. Sodium acetate buffer (5 mL, pH 5.0, 10⁻² M) and 30 µL β-glucuronidase-arylsulphatase were added and the samples were further incubated at 55°C for 3 hours (adapted from [20]). These extracts, containing only free steroids, were purified using Oasis HLB and aminopropyl SPE cartridges (figure 1) as previously described. The purpose of this second Oasis HLB step was to switch from aqueous buffer to organic solvent, but was also aimed at providing a first clean-up of the extract, prior to the efficient NH₂ clean-up. Finally, samples were derivatised and analysed by GC/MS as detailed above.

Statistical analysis

Statistical analysis of the gonadosomatic index was performed using Prism[®] software (Kruskal-Wallis test). Concerning steroid determinations, triplicate measurements were carried out on pool samples as described above. The resulting low amount of data did not allow the use of any statistical test for the inter-group comparisons, such as the Mann-Whitney *U*-test. Thus, the 95% intervals of confidence of the means were calculated and used for further discussion of the results.

RESULTS AND DISCUSSION

Analytical procedure : fractionation, extraction, purification and conjugates cleavage

A pilot study was performed to optimise the fractionation procedure. For this purpose, 17 β -estradiol-3-sulphate (E2S) and 17 β -estradiol-17-glucuronide (E2G) were chosen as model conjugates. E2S, E2G and a mixture of 14 endogenous steroids were added to separate acetate buffer samples (5 mL; pH 5.0, 10⁻² M). Several solvent mixtures were tested for the elution of the compounds, the goal being the selective elution of conjugated (polar) forms with minimal elution of free forms in the first fraction. It appeared that Oasis HLB was a suitable phase for the fractionation, when the elution of conjugates was performed with methanol/water (60/40, v/v) containing TEA (final concentration). Conversely, using octadecylsilane-bonded silica (C18), no satisfactory separation could be achieved : about 60% of E3 was eluted in the first fraction, together with the conjugated forms. The recoveries of steroids were higher than 80% with CV lower than 25% (n = 9) for most compounds (table 1). Low amounts of E3 and 11-kT were recovered in the first fraction (< 5%), potentially leading to an overestimation of these analytes in the conjugated fraction. The use of TEA probably reduces the interactions between the steroid conjugates and the sorbent and increases their recovery for a given methanol/water mixture. TEA is often used in HPLC separation as an ion-pairing agent, and Isobe et al. used it for the separation of free and conjugated steroids in surface water samples [21].

The extraction yield from biological matrices was assessed using pooled samples (plasma, bile and ovary) spiked with 50 ng.g⁻¹ of each analyte (free form); the recovery of E2S from plasma was also determined. The concentrations of endogenous steroids in these pools had previously been measured. Recoveries were higher than 70% for most analytes, with standard deviations below 10% (n=3) in most cases (table 2). DHA and DHT were the

only compounds exhibiting poor recoveries (around 50%), because of unexplained low recoveries from NH₂ cartridges (data not shown).

	fraction 1 (%)	fraction 2 (%)		fraction 1 (%)	fraction 2 (%)
E1	nd	106 (6)	Pn	nd	95 (11)
E2	nd	101 (6)	OHPn	nd	95 (21)
E3	3 (1)	102 (9)	OHPg	nd	93 (16)
A	nd	96 (7)	DHP	nd	105 (34)
T	nd	98 (5)	EE2	nd	107 (6)
DHT	nd	96 (10)	MeEE2	nd	86 (25)
DHA	nd	84 (11)	No	nd	113 (7)
DHEA	nd	83 (16)	DN	nd	101 (22)
11-kT	4 (2)	104 (7)	E2-G	98 (12)	nd
Pg	nd	87 (10)	E2-S	86 (5)	10 (3)

Table 1. Fractionation procedure: recoveries of analytes from Oasis HLB cartridges (5 mL-Milli-Q water spiked with 50 ng of each analyte). Results are expressed as mean values (between brackets: relative standard deviation of reproductibility, n=9).

	plasma	bile	ovary		plasma	bile	ovary
E1	102 ± 19	84 ± 2	84 ± 1	A	76 ± 1	81 ± 1	72 ± 2
E2	92 ± 6	88 ± 2	94 ± 3	T	121 ± 1	97 ± 26	85 ± 2
E3	112 ± 9	73 ± 17	70 ± 6	DHEA	141 ± 30	120 ± 1	105 ± 10
EE2	98 ± 6	89 ± 9	89 ± 3	11-kT	81 ± 9	87 ± 1	78 ± 1
E2S	107 ± 2	nd	nd	DHA	56 ± 23	48 ± 17	41 ± 3
Pg	99 ± 6	96 ± 8	86 ± 1	DHT	55 ± 3	76 ± 7	46 ± 5
Pn	70 ± 1	64 ± 6	73 ± 1				
OHPn	77 ± 15	82 ± 13	86 ± 1				
OHPg	86 ± 5	95 ± 23	91 ± 6				
DHP	67 ± 1	90 ± 7	82 ± 8				

Table 2. Recoveries of analytes from spiked fish samples (plasma (1 g), bile (0.1 g) and ovary (0.5 g) spiked with 50 ng of each steroid), purified with Oasis HLB and NH₂ cartridges. Results are expressed as mean±standard deviation, n=3). nd: not determined

Steroid conjugates are not readily analysed by GC/MS, because of both their low volatility and their high polarity. Furthermore, given the high number of steroids determined in this study, and considering the wide range of steroid conjugates that can be formed in biological matrices (glucuronides, sulphates, disulphates, sulfoglucuronides...), the authors considered that it was reasonable to cleave the conjugates prior to the analysis of the conjugated fraction. Indeed, the aim of the study was to quantify the “total conjugated fraction” rather than accurately quantify individual conjugates.

The enzymes contained in the digestive juice of *Helix pomatia*, β -glucuronidase and arylsulphatase, are widely used for the purpose of steroid conjugates cleavage. Some steroid sulphates, however, are not hydrolysed efficiently by these enzymes [22, 23]. Rinchard and co-workers [24] showed that up to 22% of plasmatic estradiol could be sulphated in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*); hence, the need for an efficient cleavage procedure of sulphated steroids is obvious. Therefore, a solvolysis step adapted from [19] was included in the procedure. When performed on standard solutions of E2G and E2S, the overall yield of the combined cleavage procedure (enzymatic hydrolysis + solvolysis) was 99 % for E2-3-sulphate (CV: 12%, n=9) and 88 % for E2-17-glucuronide (CV: 8%, n=9).

Concerning the use of β -glucuronidase-arylsulfatase from *Helix pomatia*, a last point must be addressed. Within the experimental conditions of this study, it was observed that a major drawback of this enzymes mixture was its ability to convert dehydroepiandrosterone (DHEA) to androstenedione (A), yielding to a potential overestimation of A (conversion rate close to 20%). This problem has also been reported by others [25]. A preliminary study, using solvolysis only, showed that neither DHEA nor DHEA-sulphate was present above the limits of detection in plasma, bile and gonads of juvenile turbot. Therefore, the digestive juice from *Helix pomatia* could be used for the determination of conjugated steroids in these matrices. No other enzyme-induced conversions were observed, conversely to results obtained by Messeri et al. [25].

The use of methanolic solution of trimethylchlorosilane (1M, 55°C, 1h) for the simultaneous cleavage of both steroid glucuronides and sulphates has been reported by Dehennin and al. [26]. We found that it was efficient for the deconjugation of both E2 glucuronide and sulphate (cleavage yield > 99%). However, serious drawbacks were observed: low and poorly reproducible stability of labelled E2 (E2-d4) and loss (70%) of tertiary alcohols (17 α -hydroxyprogesterone, 17 α -hydroxypregnenolone and 17 α -hydroxy, 20 β -dihydroprogesterone) due to dehydration. We tried to modify the procedure by neutralising the TMCS-generated hydrochloric acid prior to evaporation of the solvent (addition of Na₂CO₃ 0.2M); this increased greatly the stability of tertiary alcohols (2-fold elevation of their recovery), but it did not improve the stability of E2-d4 and, furthermore, the

efficiency of the E2G solvolysis exhibited a 2-fold decrease. Therefore, the procedure combining TFA solvolysis and enzymatic hydrolysis, although being more time consuming, was used for the analysis of steroid conjugates.

EE2 concentration in the exposure aquaria

Fish were exposed to EE2 under semi-static conditions. For the two levels (low and high), [EE2] was monitored over the first 24 hours: the decrease of EE2 levels in the aquaria was rapid, dropping from 140 to 30 ng.L⁻¹, and from 12 down to 2 ng.L⁻¹ within 24 hours. In both tanks, [EE2] followed a first order exponential decay rate: $140e^{-0.06 t}$ ($R^2 = 0.94$) for the high level and $12e^{-0.14 t}$ ($R^2 = 0.80$) for the low level. Using the daily monitored concentrations, the average EE2 level was estimated at 75 ng.L⁻¹ (high level) and 3.5 ng.L⁻¹ (low level) but, as explained above, concentrations exhibited 5 to 6-fold variations between two adjustments. The observed loss of EE2 was probably mainly due to sorption onto the components of the aquaria; the polypropylene filtration medium used for water-cleaning purposes proved to be an efficient sorbent, causing a rapid and important decrease of [EE2] (data not shown). No deactivation of the potential sorption sites was observed through the course of the exposures, possibly because polypropylene filters were cleaned daily. Uptake of EE2 by juvenile turbot may also have contributed to the apparent decrease of EE2 water levels (cf. *bioconcentration of EE2*). Eventually, EE2 was never detected (< 0.2 ng.L⁻¹) in the control and solvent control tanks (3 analyses over the 15-day exposure).

Bioconcentration of EE2

Results for the determination of EE2 in bile and plasma of juvenile turbot are presented in figure 2 for the EE2-treated fish only, since EE2 was not detected in fish from the control and solvent control tanks. High levels of EE2 were detected in the bile of EE2-exposed juvenile turbot. At the low-exposure level (3.5 ng.L⁻¹), EE2 was twice higher in females than in males, whereas it was the opposite at high level (75 ng.L⁻¹), so no sex-dependence of EE2 uptake could be established. EE2 was mainly found in the conjugated fraction, but for the high level exposure, about 10 % of biliary EE2 was unmetabolised. In humans, the principal metabolites of EE2 are the conjugates of the unchanged steroid, although hydroxylation and de-ethynylation also occur to a lesser extent [27]. As detailed below, no normalisation of the bile concentration was performed (see *EE2-induced alteration of steroid hormone dynamics, biliary steroids profiles*). Considering total biliary EE2 and [EE2]_{water} at the time of sampling, mean BCF values were 44600 and 41700 for the low and high exposure levels, respectively.

These values are in good agreement with those reported by Larsson et al. [28]. They observed that caged rainbow trout caged downstream of a sewage effluent could accumulate significant amounts of EE2, 10^4 to 10^6 times higher than the water concentration.

Similar EE2 levels were measured in plasma of male and female turbot and EE2 was found to circulate mainly unconjugated (figure 2). The total amount of plasmatic EE2 was dose-dependent and the corresponding bioconcentration factors were about 200-300. Considering only free EE2 and assuming that its *in vivo* potency is at least one order of magnitude higher than that of E2 [10-11], a rough calculation shows that the plasmatic estradiol equivalent content of EE2-treated fish increased at least 10^3 times and 10^4 times for the low and high levels of exposure, respectively. Plasmatic EE2 may come either from enterohepatic circulation or directly from the uptake at gills level, an organ where the conjugation activity is rather low [29].

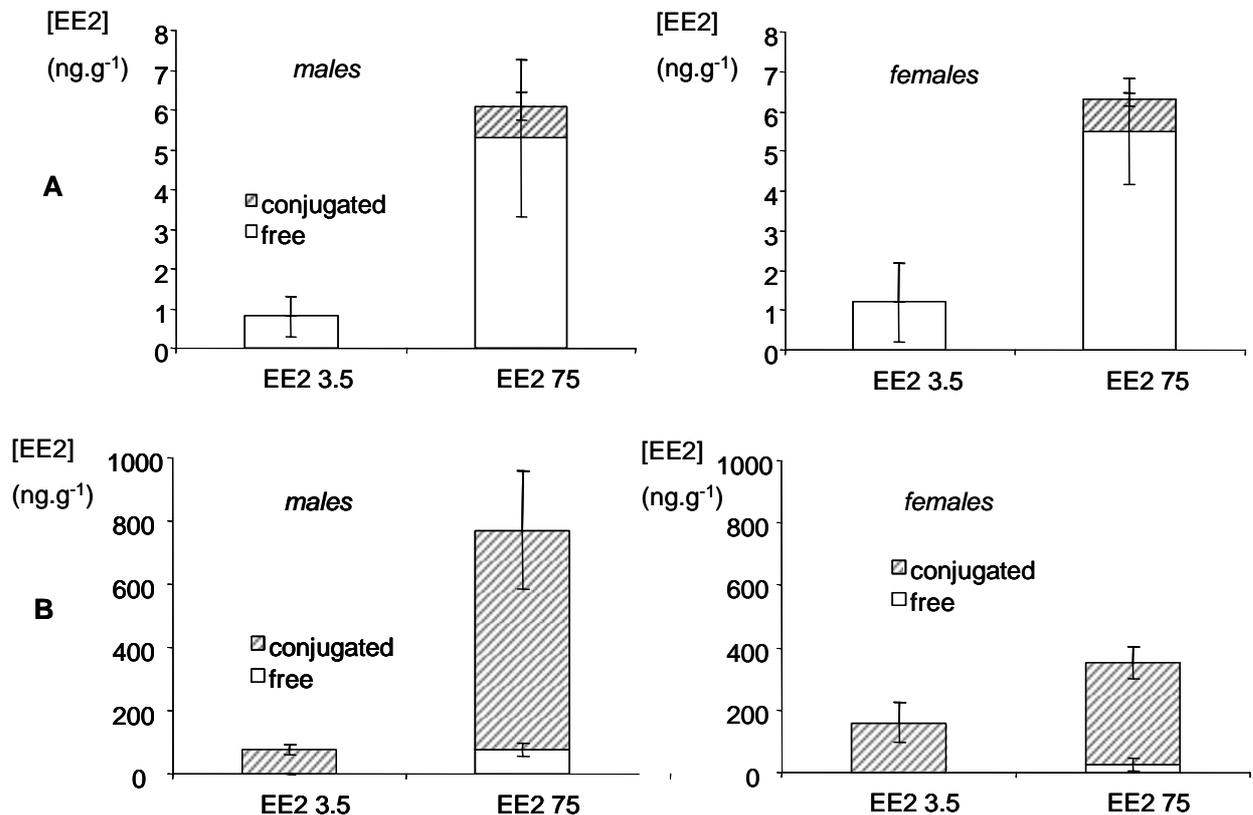


Figure 2. Concentration of 17 α -ethynylestradiol in plasma (A) and bile (B) of juvenile turbot. Results are expressed as mean values and the error bars correspond to the 95 % intervals of confidence (n=3).

Gonadosomatic index

The gonadosomatic index was derived by expressing the gonad weight as a percentage of the total body weight (table 3). For both sexes, no significant ($p>0.05$) difference was observed between the groups, regardless of solvent presence or EE2 concentration, indicating that GSI was not a sensitive endpoint for the assessment of the EE2 endocrine disrupting potential. Schultz et al. [16] showed that a nominal concentration of 100 ng.L⁻¹ EE2 significantly reduced GSI in maturing male trout (*Oncorhynchus mykiss*), whereas no effect was observed at 10 ng.L⁻¹. Conversely, MacLatchy et al. [12] showed no alteration of GSI in estuarine mummichog (*Fundulus heteroclitus*) exposed to EE2 (up to 500 ng.L⁻¹).

Sex	Treatment	GSI (%)
Male	C	0.047 ± 0.014
	SC	0.052 ± 0.022
	EE2 3.5	0.057 ± 0.019
	EE2 75	0.067 ± 0.040
Female	C	0.250 ± 0.070
	SC	0.264 ± 0.064
	EE2 3.5	0.257 ± 0.048
	EE2 75	0.291 ± 0.091

Table 3. Effect of EE2 on the gonadosomatic index (GSI) of male and female juvenile turbot (n≥12). C : control; SC: solvent control; 3.5 : EE2 3.5 ng.L⁻¹; 75 : EE2 75 ng.L⁻¹

EE2-induced alteration of steroid hormone dynamics

Free and conjugated steroid hormone profiles were determined in plasma, gonads and bile of males (figures 3 and 4) and females (figures 5 and 6). Overall, low steroids levels were detected in juvenile turbot, probably because of their sexual immaturity. Thereafter are successively presented the results of estrogen and androgen determinations in gonads, plasma and bile.

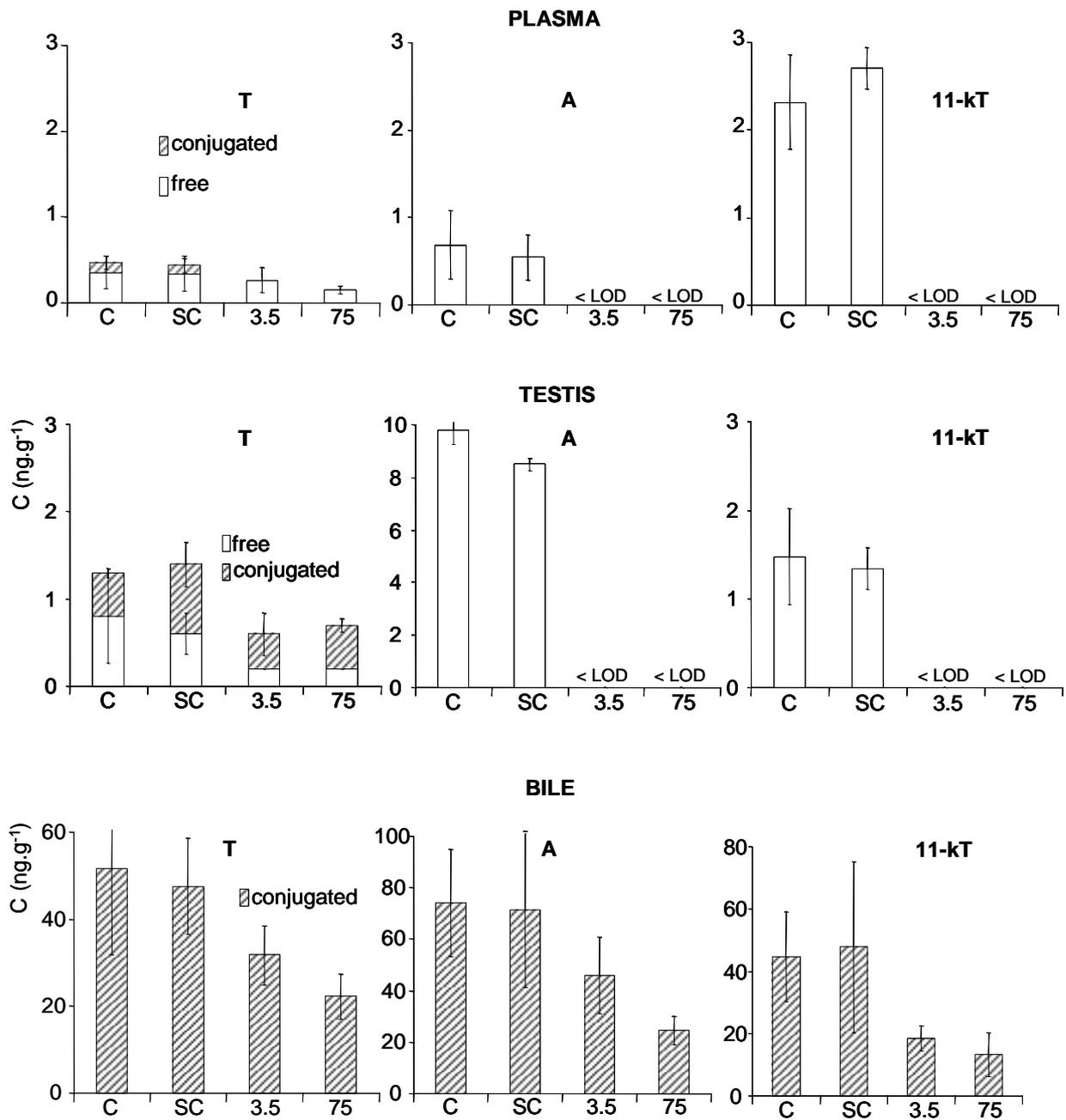


Figure 3. Effect of EE2 on androgen profiles in plasma (*top*), testes (*middle*) and bile (*bottom*) of male turbot. Results are expressed as mean values and the error bars correspond to the 95 % intervals of confidence of the mean (n=3). C : control ; SC: solvent control; 3.5 : EE2 3.5 ng.L⁻¹; 75 : EE2 75 ng.L⁻¹. T : testosterone; A : androstenedione; 11-kT: 11-ketotestosterone.

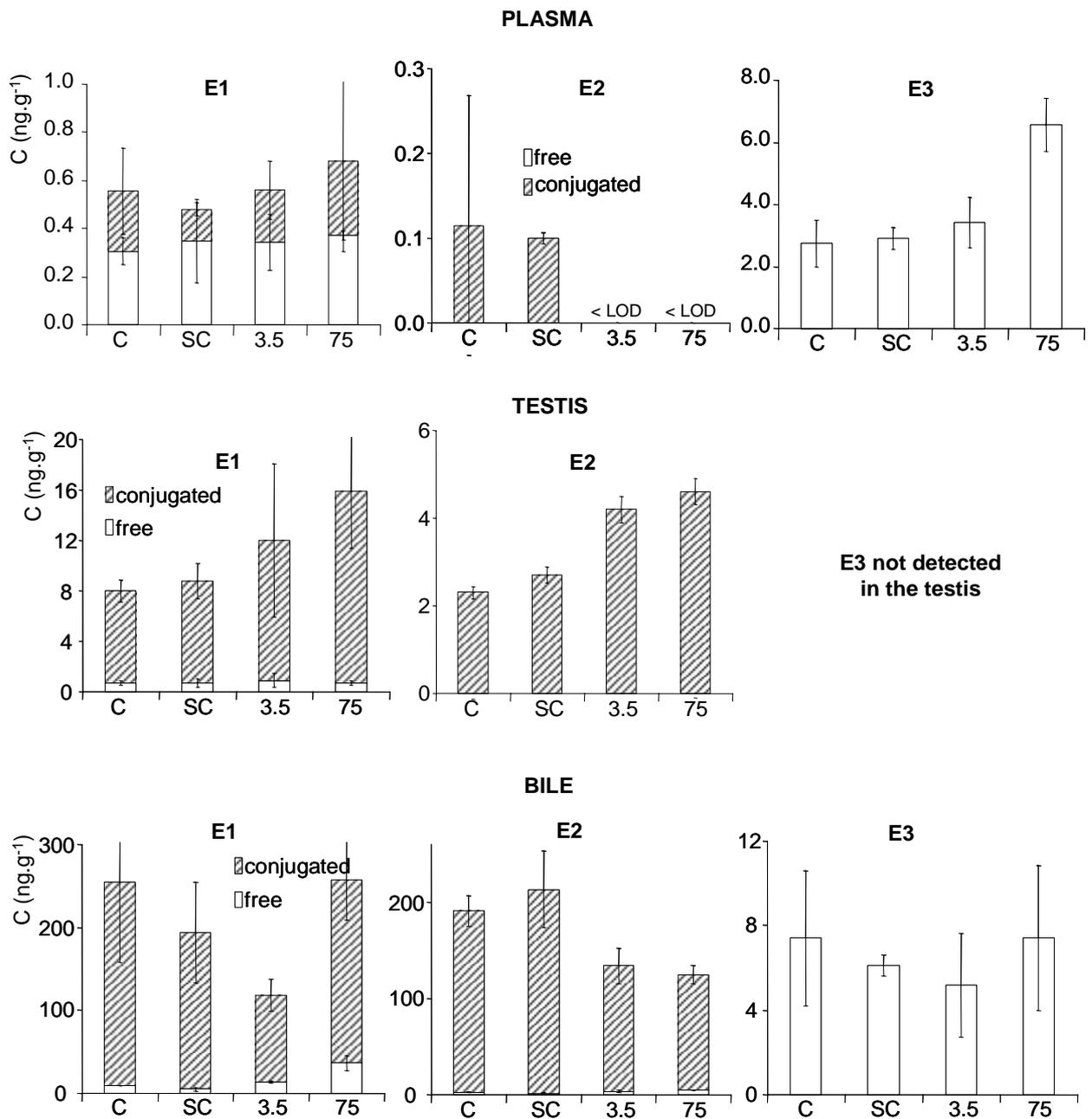


Figure 4. Effect of EE2 on estrogen profiles in plasma (*top*), testes (*centre*) and bile (*bottom*) of male turbot. Results are expressed as means (ng.g⁻¹) and the error bars correspond to the 95 % intervals of confidence of the means (n=3). C : control; SC: solvent control; 3.5 : EE2 3.5 ng.L⁻¹; 75 : EE2 75 ng.L⁻¹. E1: estrone; E2: estradiol; E3: estriol.

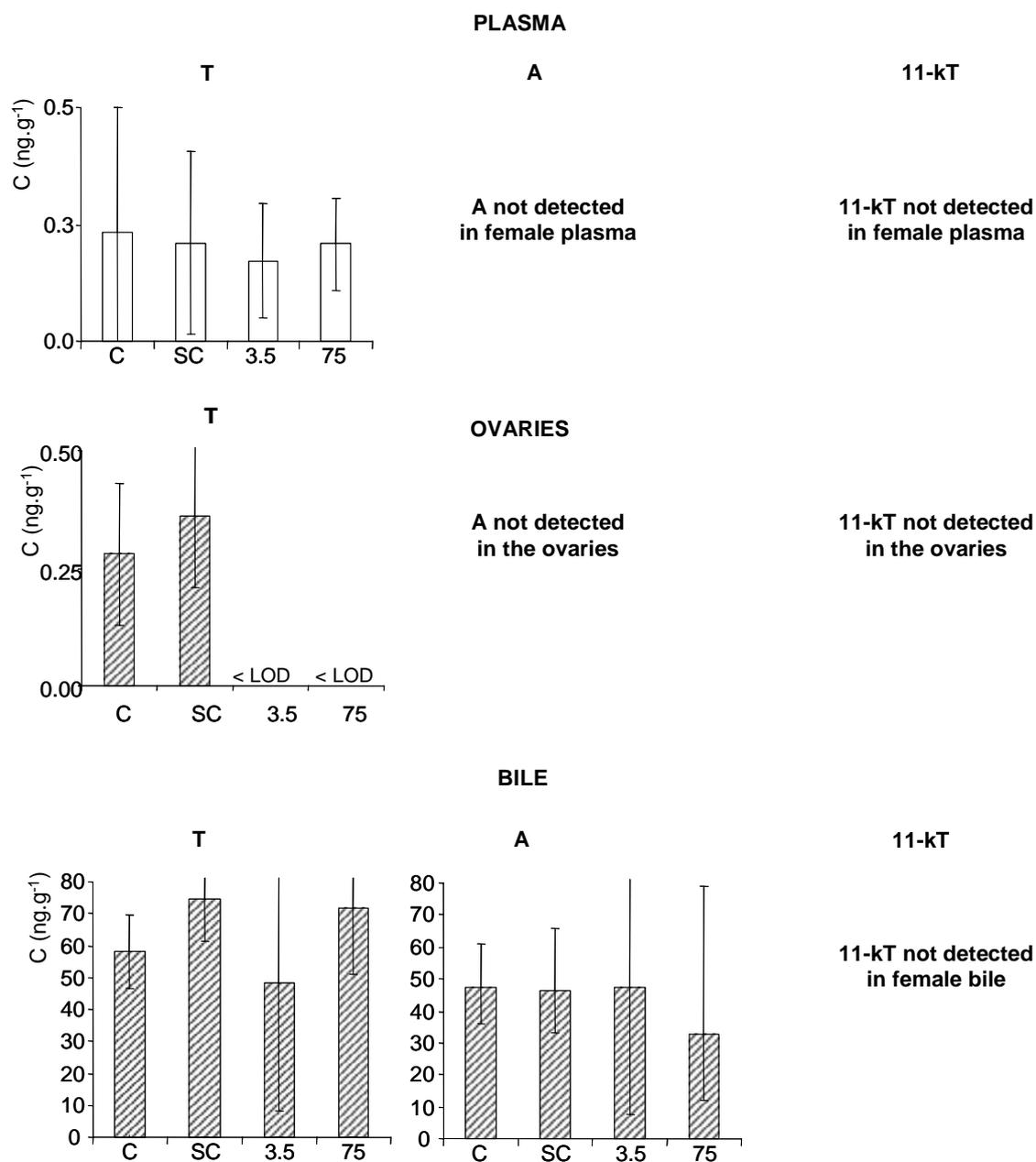


Figure 5. Effect of EE2 on androgen profiles in plasma (*top*), ovaries (*middle*) and bile (*bottom*) of female turbot. Results are expressed as mean values and the error bars correspond to the 95 % intervals of confidence of the mean (n=3). C : control ; SC: solvent control; 3.5 : EE2 3.5 ng.L⁻¹; 75 : EE2 75 ng.L⁻¹. T : testosterone; A : androstenedione; 11-kT: 11-ketotestosterone.

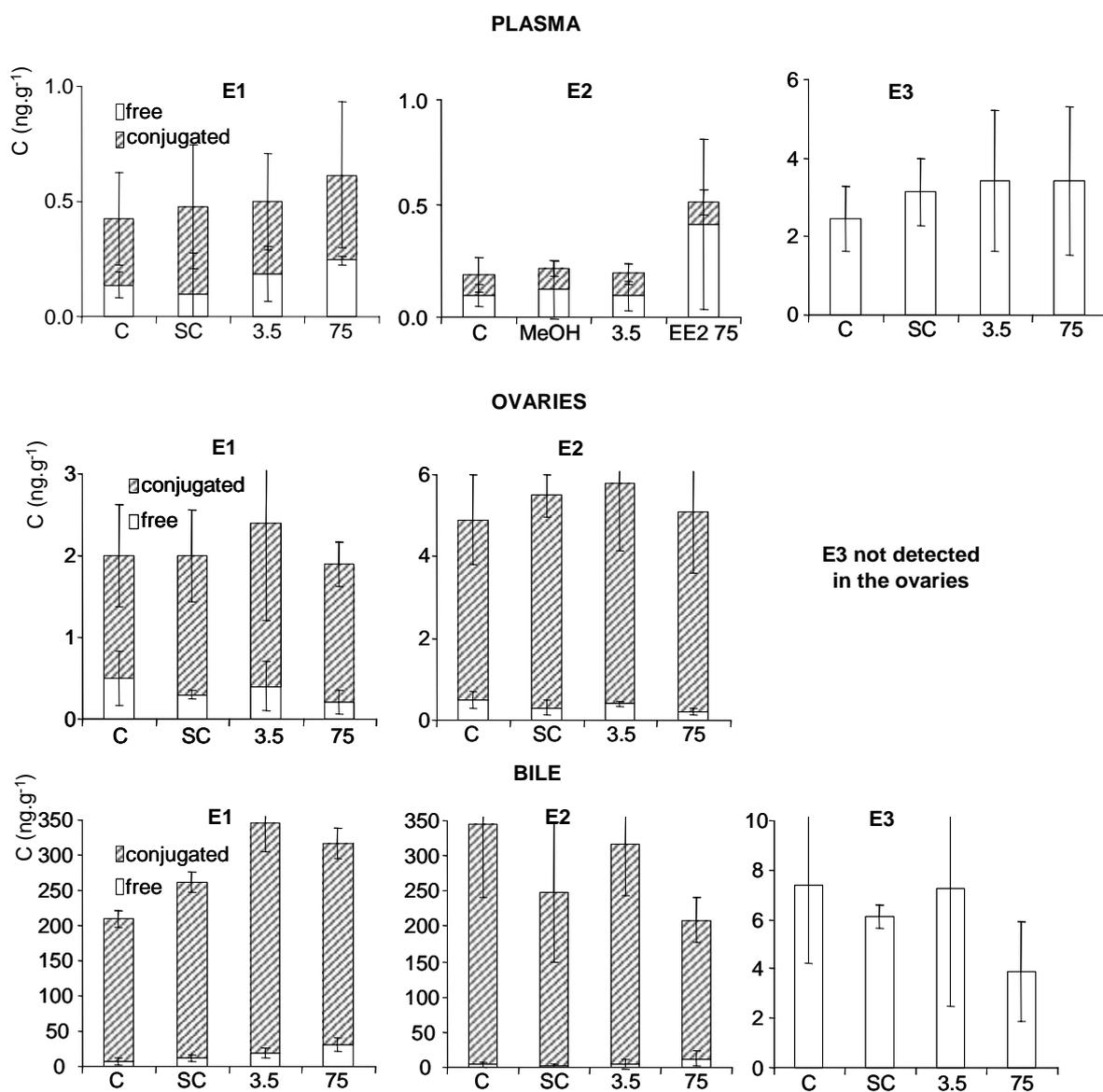


Figure 6. Effect of EE2 on estrogen profiles in plasma (*top*), ovaries (*centre*) and bile (*bottom*) of female turbot. Results are expressed as means (ng.g⁻¹) and the error bars correspond to the 95 % intervals of confidence of the means (n=3). C : control; SC: solvent control; 3.5 : EE2 3.5 ng.L⁻¹; 75 : EE2 75 ng.L⁻¹. E1: estrone; E2: estradiol; E3: estriol.

Higher mean levels of free gonadal E1 were detected in males than in females (0.7-0.9 vs 0.2-0.5 ng.g⁻¹, fresh weight); a similar observation was made for the conjugated fraction (7.3-15.2 ng.g⁻¹ in males vs 1.5-4.0 ng.g⁻¹ in females). Although conjugated E1 levels were not affected by EE2 in females, they increased in males (figure 4) but the difference was

probably significant only for the high-level exposure. Free E2 was detected only in the ovaries ($0.2\text{-}0.8\text{ ng.g}^{-1}$) and its synthesis was not apparently altered by EE2 exposure (figure 6). Conjugated E2 was detected in both sexes ($4.4\text{-}5.4\text{ ng.g}^{-1}$ in females and $2.3\text{-}4.7\text{ ng.g}^{-1}$ in males) and increased with EE2 exposure (factor 1.5) in males only. T was the only androgen detected in the ovaries of control females, in the conjugated fraction ($A < 0.1$ and $11\text{-kT} < 0.5\text{ ng.g}^{-1}$); T ovarian content was depressed ($C < 0.1\text{ ng.g}^{-1}$) by the exposure to EE2. T, A and 11-kT were all three detected in the testes of control males, in both the free and the conjugated fraction; in both fraction, T slightly decreased in EE2-exposed males. A and 11-kT secretion appeared to be totally suppressed even for the low level of exposure. Eventually, free pregnenolone (Pn), the sex steroids precursor, was detected in males ($3.9\text{-}5.6\text{ ng.g}^{-1}$) and in females ($0.9\text{-}1.8\text{ ng.g}^{-1}$); Pn levels were not affected by EE2 exposure, which suggests that conversion from cholesterol was not impaired by EE2 exposure.

In plasma, steroid concentrations were generally lower than in gonads. In plasma, free E1 ($0.2\text{-}0.7\text{ ng.g}^{-1}$) and conjugated E1 ($0.10\text{ - }0.31\text{ ng.g}^{-1}$) were detected at similar titers in males and in females; they were not affected by EE2 exposure. Free estradiol (E2) was detected in females plasma only, just above the limit of detection (0.1 ng.g^{-1}) and was not significantly affected by EE2 (large interval of confidence for the EE2 75 ng.L^{-1} group). Conjugated E2 was detected at low levels in the controls (just above the LOD), at similar concentrations in males and in females, and was depressed ($< \text{LOD}$) for EE2-exposed fish of both sexes; the magnitude of the observed effect was too low, however, to draw any conclusion. In control individuals, E3 was detected at similar levels in males and in females ($2.5\text{-}3.1\text{ ng.g}^{-1}$) in the free fraction, but was lower than LOD (0.3 ng.g^{-1}) in the conjugated fraction. In males, the 75 ng.L^{-1} EE2 concentration induced a two-fold increase of E3 level. Testosterone (T) was the only androgen detected in both male and female plasma. Free T was slightly lower in control females than in control males (0.21 vs 0.35 ng.g^{-1}) while conjugated T was detected only in control males, just above the detection limit (0.1 ng.g^{-1}). Free T levels were depressed by EE2 exposure, but the effect was probably not significant, due to large intervals of confidence. In control males, androstenedione and 11-ketotestosterone were detected at higher levels than testosterone (around 0.6 and 2.5 ng.g^{-1} , respectively), but only in the free fraction. A and 11-kT were dramatically depressed in EE2-exposed males (low and high levels), since their level dropped below the LOD (0.1 and 0.3 ng.g^{-1} for A and 11-kT, respectively).

The highest steroids concentrations were measured in bile, in the conjugated fraction. In an attempt to normalise biliary steroid concentrations, the absorbance at 380 nm (A_{380} , related to the biliverdin concentration and measured according to Ruddock et al. [30]) was used as a corrective factor. However, as previously reported elsewhere [31], this operation

may be a source of discrepancy. For instance, normalised testosterone concentrations were different in control males and in methanol control males, whereas “raw” concentrations were similar. Therefore, biliary steroids levels were not normalised with respect to A_{380} . Trends observed in the bile were not as clear and consistent as those observed in plasma or in testes. Both free and conjugated E1 levels were similar in males and in females (free E1: 4.9-36.5 ng.g⁻¹ in males, 0.2-0.4 ng.g⁻¹ in females; conjugated E1 : 104-244 ng.g⁻¹ in males, 202 – 326 ng.g⁻¹ in females); free E1 levels seemed to increase in an apparent dose-dependent way in males exposed to EE2. Free biliary E2 concentrations were similar in males and in females (1.1-4.7 ng.g⁻¹ in males vs 1.3-12.5 ng.g⁻¹ in females), but conjugated levels were somewhat higher in females (119-212 ng.g⁻¹ in males vs 196-340 ng.g⁻¹ in females). EE2 exposure induced a significant decrease of conjugated E2 concentration in males, whereas it did not affect it in females. E3 was detected solely in the free fraction and its titers were similar in individuals of both sexes (5.2-7.4 ng.g⁻¹ in males vs 4.0-7.4 ng.g⁻¹ in females) and rather insensitive to EE2 exposure. Contrary to estrogens, biliary androgens were detected only in the conjugated fraction. Testosterone levels were similar in males and females from the control aquaria (around 50 ng.g⁻¹). Although T levels were unaffected by EE2 in females, they exhibited a 2-fold decrease in high-level exposed males. In the control fish, A levels were similar in males and females (around 70 ng.g⁻¹ in males and 50 ng.g⁻¹ in females); [A] decreased in an apparent dose-dependent way in EE2-exposed males, whereas it was unchanged in females. In females, 11-kT was not detected, whereas in males it exhibited the same trend as A.

Several steroids (progesterone (Pg), 17-hydroxyprogesterone (OHPg), 17-hydroxypregnenolone (OHPn), dehydroepiandrosterone (DHEA), dehydrotestosterone (DHT) and dehydroandrostenedione (DHA)), were not detected in the investigated matrices. This is likely to be due to both the sexual immaturity of the fish and to the higher LODs achieved for these compounds (0.3 ng.g⁻¹ in plasma, 5.0 ng.g⁻¹ in bile and 0.8 ng.g⁻¹ in gonads), about three times higher than those obtained for T or E2.

For a better comparison of the effect of EE2 on sex steroid metabolism in males and in females and between the three biological compartments investigated, a ratio noted R was calculated : $R = \Sigma C_{\text{androgens}} / \Sigma C_{\text{estrogens}}$. For the calculation of R, the concentration of the undetected steroids was set arbitrarily at 0.5 LOD; results are presented in figure 7. Overall, EE2 exposure lowered R in testes, plasma and bile, even at low EE2 level (3.5 ng.L⁻¹), with testes being the most affected organ. In EE2-treated fish, R_{males} approached R_{females} , showing a sex-dependent sensitivity. Illustrating the fact that testes were the organ most vulnerable to EE2 exposure, the testicular R ratio exhibited a 25-fold decrease in both EE2-treated groups, whereas ovarian R was not affected. In plasma, the trend was similar to that observed in

testes, but to a lower extent (9-fold decrease). In bile, R was lowered only for the high level of exposure (2-fold decrease), suggesting a lower impact of EE2-treatment on hepatic steroid hormone metabolism.

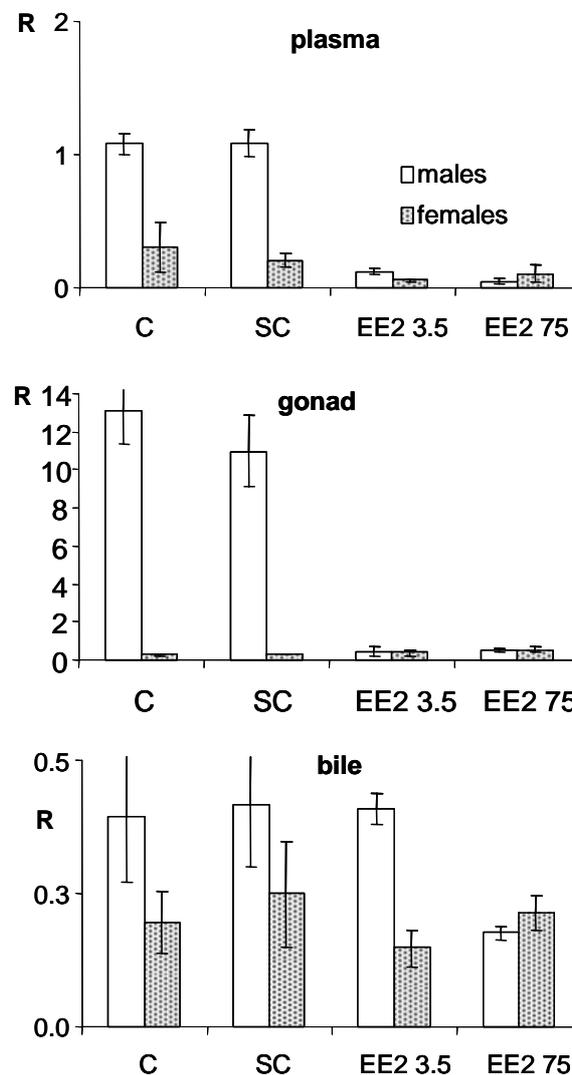


Figure 7. Effect of EE2 on the androgens to estrogens ratio (R) in plasma (*top*), gonad (*middle*) and bile (*bottom*) of juvenile turbot. Results are expressed as mean value and the error bars correspond to the 95 % intervals of confidence of the mean (n=3). C : control; SC : solvent control; 3.5 : EE2 3.5 ng.L⁻¹; 75 : EE2 75 ng.L⁻¹. For plasma and gonad, R corresponds to the free fraction, whereas for bile it corresponds to the conjugated fraction.

To summarise, the most dramatic effect of EE2 on the steroid hormone dynamics in juvenile turbot was the depression of A and 11-kT levels in testes and in plasma of males. Therefore, the synthetic estrogen EE2 appeared to act as an antiandrogen, able to alter the synthesis of some androgens in both testicular and extra-testicular tissues. The observed decrease could not be linked to an increase of androgens phase II metabolism, since A and

11-kT were not detected in the conjugated fraction of neither testes nor plasma. Solé et al. [32] observed that the microsomal liver fraction of EE2-injected carp (*Cyprinus carpio*) did not exhibit significantly higher total UDP-glucuronyl transferase activity. In this study, precursors of A, such as Pg, OHPg, OHPn, DHEA or DHEA-sulphate, were not detected. Thus, it is very likely that the EE2-induced disruption of the steroidogenesis enzymes did not occur upstream of A formation; rather, it seemed to result in a shift of A metabolism, but without apparent increased formation of T. Perhaps the synthesis of 11-kT from A, via 11 β -hydroxyandrostenedione and 11-ketoandrostenedione, was perturbed at some stage. The suppression of 11-kT did not appear to be directly linked to a lower conversion rate of T, since total T levels were also found to decrease (to a lesser extent). The conversion of T into 11-kT could possibly be blocked at the 11 β -hydroxytestosterone step (the only intermediate between T and 11-kT), which would suggest an inhibition of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. The impact of EE2 on endogenous sex steroids profiles in fish has been reported in several papers. MacLatchy and co-workers [12] showed that exposure of estuarine mummichog (*Fundulus heteroclitus*) to [EE2]>250 ng.L⁻¹ during 7 days resulted in the depression of androgen steroidogenesis (*in vitro* incubation of testis pieces) and of 11-kT plasmatic levels. Similarly, Schultz et al. [16] reported that maturing male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed for 62 days to a nominal concentration of 100 ng.L⁻¹ EE2 had significantly lower levels of plasmatic 11-kT and higher levels of 17,20-DHP. Their hypothesis was that the decrease of 11-kT was related to an increased gonadal testicular production of 17,20-DHP and to a shunt of precursors within the enzymatic pathway from progestins to androgens. Mac Latchy and colleagues [33] showed that high levels of E2 (300 μ g.L⁻¹, 12 days) depressed plasmatic 11-kT content in goldfish, while T levels were not affected. Those results, along with those presented in this paper, confirm the potential of waterborne estrogens to disrupt 11-kT metabolism in fish, whatever the species and the sexual stage of the exposed individuals. Since 11-kT plays a major role in testicular development in fish [34], severe alteration of the testes may arise from 11-kT depression in EE2-exposed males.

Aromatase, the enzyme complex that converts androgens into estrogens, is normally expressed in brain and ovaries only. However, Scholz and Gutzeit [35] showed that testicular aromatase activity was induced in EE2-exposed male medaka (10 ng.L⁻¹); similar effect on juvenile turbot could perhaps explain the increased testicular total levels of estrone and estradiol. Furthermore, the ratio conjugated to unconjugated estrone exhibited a two-fold increase in the testes of males exposed to 75 ng.L⁻¹ EE2; this may possibly reflect a higher phase II activity which would locally tend to regulate the amount of active estrogens. The observed induction would be estrogen-specific since, as mentioned above, androgen

conjugation was not clearly induced by EE2. Unchanged plasmatic E1 and E2 levels did not reflect the trend observed in the testes, perhaps because of higher clearance rate of the conjugates. Alternatively, the observed increase of E3 plasmatic levels could be explained by an increased conversion rate of E2 and E1 into E3, via 16 α -hydroxyestrone reduction.

This study showed that the impact of EE2 on the endocrine status of juvenile turbot was similar to that of *p*-nonylphenol [36], since the main effect of NP exposure was the depression of androgen levels in male individuals. Both chemicals are known as estrogen agonists as regards binding to the estrogen receptors [1]. They also proved to have antiandrogenic activities in juvenile turbot since they were able to disrupt androgen biosynthesis in this fish species.

The present work demonstrated the ability of EE2 to affect steroid hormone metabolism in juvenile turbot at environmentally relevant concentration and for a short time of exposure. Androgen dynamics was greatly affected by 17 α -ethynylestradiol and males were much more sensitive than females. At the time of this study, it is not clear yet how EE2 interacts with the steroidogenesis enzymes in juvenile turbot. The determination of hydroxy- or keto-derivatives of testosterone and androstenedione could perhaps help gaining more insight into the mode of action of EE2 on the endocrine system of juvenile fish.

ACKNOWLEDGEMENTS : the authors wish to acknowledge the Aquitaine Regional Council and the CNRS for providing PhD funding for P.Labadie, as well as the BEEP (EU funded, contract EVK3-CT2000-00025) and Seine Aval programmes for research funding.

REFERENCES

1. Metzler M, Pfeiffer E. 2001. Chemistry of natural and anthropogenic endocrine active compounds. In Metzler M, ed, Endocrine disruptors, Vol 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp 63-80.
2. Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ Sci Technol* 32: 2498-2506
3. Jobling S, Beresford N, Nolan M, Rodgers-Gray T, Brighty GC, Sumpter JP, Tyler CR. 2002. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol Reprod* 66: 272-281.
4. Arcand-Hoy LD, Benson WH. 1998. Fish reproduction : an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environ Toxicol Chem* 17: 49-57

5. Lavado R, Thibault R, Raldúa D, Martín R, Porte C. 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicol Appl Pharmacol* 196: 247-257
6. Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environ Sci Technol*. 32: 1549-1558.
7. Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M, Sumpter JP. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environ Sci Technol*. 32: 1559-1565.
8. Scholz S, Kordes C, Hamann J, Gutzeit HO. 2004. Induction of vitellogenin in vivo and in vitro in the model teleost medaka (*Oryzias latipes*): comparison of gene expression and protein levels. *Mar Environ Res* 57: 235-244.
9. Folmar LC, Hemmer MJ, Denslow ND, Kroll K, Chen J, Cheek A, Richman H, Meredith H, Grau EG. 2002. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquat Toxicol* 60: 101-110.
10. Van den Belt K, Berckmans P, Vangenechten C, Verheyen R, Witters H. 2004. Comparative study on the in vitro/in vivo estrogenic potencies of 17 β -estradiol, estrone, 17 α -ethynylestradiol and nonylphenol. *Aquat Toxicol* 66: 183-195.
11. Thorpe KL, Cummings RI, Hutchinson TH, Scholze M, Brighty G, Sumpter JP, Tyler CR. 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ. Sci. Technol* 37:1142-1149.
12. MacLatchy DL, Courtenay SC, Rice CD, Van der Kraak GJ. 2003. Development of a short-term reproductive bioassay using steroid hormone metabolism and vitellogenin end points in the estuarine mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environ Toxicol Chem* 22: 996-1008.
13. Länge R, Hutchinson TH, Croudace CP, Siegmund F, Schweinfurth H, Hampe P, Panter GH, Sumpter JP. 2001. Effects of the synthetic estrogen 17 α -ethynylestradiol on the life-cycle of the fathead minnow (*Pimaphales promelas*). *Environ Toxicol Chem* 20: 1216-1227.
14. Werner J, Wautier K, Evans RE, Baron CL, Kidd K, Palace V. 2003. Waterborne ethynylestradiol induces vitellogenin and alters metallothionein expression in lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Aquat Toxicol* 62: 321-328.

15. Van den Belt K, Wester PW, Van der Ven LTM, Verheyen R, Witters I. 2002. Effects of ethynylestradiol on the reproductive physiology in zebrafish (*Danio rerio*): time dependency and reversibility. *Environ Toxicol Chem* 21: 767-775.
16. Schultz IR, Skillman A, Nicolas JM, Cyr DG, Nagler JJ. 2003. Short-term exposure to 17 α -ethynylestradiol decreases the fertility of sexually maturing male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Toxicol Chem* 22: 1272-1280.
17. Zillioux EJ, Johnson IC, Kiparissis Y, Metcalfe CD, Wheat JV, Ward SG, Liu H. 2001. The sheepshead minnow as in vivo model for endocrine disruption in marine teleosts: a partial life-cycle test with 17 α -ethynylestradiol. *Environ Toxicol Chem* 20: 1968-1978.
18. Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem Ecol* 8: 275-285.
19. Meng LJ, Sjövall, Method for the combined analysis of profiles of conjugated progesterone and bile acids in serum and urine of pregnant woman. 1997. *J Chrom B* 688: 11-26.
20. Al-Alousi LM, Anderson R. A relatively simple and rapid multi-component method for analysis of steroid profiles in blood, fecal and liver samples. 2002. *Steroids* 67: 269-275.
21. Isobe T, Shiraishi H, Yasuda M, Shinoda A, Suzuki H, Morita M. 2003. Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chrom A* 984: 195-202.
22. Hobe G, Schön, Goncharov N, Katsiya G, Koryakin M, Gesson-Cholat I, Oettel M, Zimmermann H. 2002. Some new aspects of 17 α -estradiol in man. *Steroids* 67: 883-893.
23. Tang PW, Croone DL, A new method for hydrolysing sulphate and glucuronyl conjugates of steroids. 1989. *Anal Biochem* 182: 289-294.
24. Rinchar J, Dabrowski K, Ottobre J. 2001. Sex steroids in plasma of whitefish *Coregonus clupeaformis* during spawning in lake Erie. *Comp Biochem Physiol* 129C: 65-74.
25. Messeri G, Cugnetto G, Monetti G, Serio M. Helix pomatia induced conversion of some 3 β -hydroxysteroids. 1984. *J. Steroid Biochem* 20: 793-796.
26. Dehennin L, Lafarge P, Dailly Ph, Bailloux D, Lafarge JP. Combined profile of androgen glucuro- and sulphoconjugates in post-competition urine in sportsmen: a

- simple screening procedure using gas chromatography-mass spectrometry. 1996. *J. Chrom B* 687: 85-91.
27. Ranney RE, Comparative metabolism of 17 α -ethynyl steroids used in oral contraceptives. 1977. *J Toxicol Environ Health*. 3:139-166.
 28. Larsson DGJ, Adolfsson-Erici M, Parkkonen J, Berg AH, Olsson PE, Förlin L, Ethinyloestradiol – an undesired fish contraceptive? 1999. *Aquat Toxicol* 45: 91-97.
 29. Clarke DJ, George SG, Burchell B. Glucuronidation in fish. 1991. *Aquat Toxicol* 20: 35-56.
 30. Ruddock PJ, Bird DJ, McEvoy J, Peters LD. 2003. Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in European eels *Anguilla anguilla* from United Kingdom estuaries. *Sci Tot Environ* 301: 105-117.
 31. Aas E, Beyer J, Goksøyr A. 2000. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers* 5: 9-23.
 32. Solé, M, Porte C, Barceló D. 2000. Vitellogenin induction and other biochemical responses in Carp, *Cyprinus carpio*, after experimental injection with 17 α -ethynylestradiol. *Arch Environ Contam Toxicol* 38: 494-500.
 33. MacLatchy D, Peters L, Nickle J, Van der Kraak G. 1997. Exposure to β -sitosterol alters the endocrine status of goldfish differently than 17 β -estradiol. *Environ Toxicol Chem* 16: 1895-1904.
 34. Devlin RH, Nagahama Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208: 191-364.
 35. Scholz S, Gutzeit HO. 2000. 17 α -ethynylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat Toxicol* 50: 363-373.
 36. Labadie P, Budzinski H. Alteration of steroid hormone metabolism in juvenile turbot (*Psetta maxima*) exposed to *p*-nonylphenol, bisphenol A, BDE 47, diallylphtalate, oil and oil+alkylphenols industrial mixture. Submitted to *Aquatic Toxicology*.

CHAPITRE 5

Ce chapitre présente les suivis des profils hormonaux au cours du cycle sexuel chez le flet *Platichthys flesus* et la moule *Mytilus sp.*, deux organismes sentinelles couramment employés en écotoxicologie.

5.1. VARIATIONS SAISONNIERES DU PROFIL HORMONAL CHEZ LE FLET (*Platichthys flesus*)

5.1.1. Introduction

Le flet commun (*Platichthys flesus*) est un poisson benthique euryhalin, pouvant vivre aussi bien en eau douce lorsqu'il est juvénile qu'en milieu marin à l'âge adulte. Cette espèce est abondante dans l'Atlantique nord-est et près des côtes de la Méditerranée occidentale. Pour cette raison, le flet est souvent utilisé comme espèce sentinelle représentative des poissons plats. En outre, en raison de son mode de vie benthique et de sa tendance à « brouter » le sédiment pour s'alimenter, il est exposé de manière chronique aux contaminants hydrophobes accumulés dans les sédiments marins ou estuariens.

Le flet atteint sa maturité sexuelle à l'âge de trois ans pour les mâles et quatre ans pour les femelles (Gallien, 2003). Son cycle de reproduction se déroule sur une année. Dès le mois d'octobre, on assiste à un développement des gonades, qui est maximal en janvier-février, juste avant la ponte. Celle-ci est suivie d'une période de repos sexuel, de mars à septembre.

Comme décrit dans le chapitre « Matériels et méthodes », des flets ont été prélevés dans l'estuaire de Seine, ainsi que dans celui du Ster (Lesconil, site de référence). L'échantillonnage a débuté en février 2002 et s'est achevé en juin 2003, couvrant ainsi deux périodes de reproduction. Les poissons ont été classés en deux catégories : ceux mesurant moins de 20 cm ont été considérés comme immatures, tandis que ceux mesurant plus de 25 cm ont été considérés comme matures (C.Minier, communication personnelle).

Les résultats présentés ci-après concernent les dosages hormonaux réalisés sur le plasma et les gonades des individus étudiés. Le double objectif de cette étude était, d'une part, de documenter les variations du profil hormonal chez le flet et, d'autre part, de comparer les variations observées pour les individus prélevés dans l'estuaire de la Seine à celles observées pour l'estuaire du Ster. En outre, les stéroïdes exogènes susceptibles d'être bioconcentrés ont été recherchés dans deux échantillons de bile prélevée sur des individus provenant de l'estuaire de Seine (cf. paragraphe 1.3).

5.1.2. Stéroïdes endogènes

Les tableaux 5.1 à 5.4 présentent les variations du profil hormonal dans le plasma et les gonades de flets provenant de l'estuaire de Seine. Les résultats correspondent à des mesures réalisées en triplicats – quand la quantité de matrice le permettait – sur des échantillons préparés en combinant des échantillons individuels. Le rapport androgènes/œstrogènes a en outre été calculé ; lorsque la concentration d'un stéroïde était inférieure à la limite de détection, sa valeur a été arbitrairement fixée à 50% de cette dernière. Avant toute chose, il convient de préciser que les mesures ont été réalisées sur un très faible nombre d'individus (1 à 10 individus suivant la saison et le lieu d'échantillonnage). Etant donné le faible nombre de campagnes d'échantillonnage et la variabilité naturelle inter-individuelle des taux de stéroïdes (jusqu'à 100% chez le flet; Gallien, 2003), les tendances observées sont sujettes à caution ; elles apportent, tout au plus, une indication sur les fluctuations saisonnières du profil hormonal chez le flet.

Chez les individus mâles, on a globalement une augmentation des niveaux d'androgènes en février (période de reproduction), par rapport aux mois de septembre et juin (repos sexuel). La tendance est moins nette pour les œstrogènes, notamment dans le plasma. Le rapport androgènes/œstrogènes (R) ne varie presque pas dans le plasma, contrairement à ce qui est observé dans les testicules. Dans cette dernière matrice, en effet, R est multiplié quasiment par 4 durant la période de reproduction. Durant la période de repos sexuel, R est inférieur à 10, tant chez les individus matures que chez les individus immatures. Aucune tendance nette n'est observée pour les métabolites de la progestérone ; en outre, la DHP (17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one), stéroïde induisant la spermiation, n'a jamais été détectée. Ceci est sans doute dû au fait que la production de ce stéroïde présente un pic, ayant pu survenir avant ou après les prélèvements de janvier-février.

Chez les individus femelles, on assiste à une forte augmentation des niveaux d'œstrogènes en février, aussi bien dans le plasma que dans les ovaires. Cependant, les taux d'androgènes augmentant également, le rapport R a tendance à augmenter. Chez les femelles ayant pondu, les niveaux sont similaires à ceux observés chez des individus immatures. De même que chez les mâles, aucune tendance nette n'est observée pour les métabolites de la progestérone et la DHP n'a jamais été détectée.

	Date	Maturité	T	A	11-cT	E1	E2	Pn	Pg	OHPn	OHPg	R
Seine	02/02	Mature	0,3	0,9	6,2	0,1	<0,2	4	<0,4	1,3	6,9	37
	09/02	Mature	<0,1	0,2 ± 0,1	9,5 ± 0,1	0,2 ± 0,0	<0,2	1,4 ± 0,1	<0,4	0,6 ± 0,0	9,5 ± 1,5	32,5
	02/03	Immature	0,04	0,1	9,1	0,1	<0,2	2	<0,4	0,7	1,8 ± 0,2	46,2
		Mature	0,4 ± 0,0	0,8 ± 0,1	14,0 ± 0,2	0,2 ± 0,0	<0,2	2,1 ± 0,2	<0,4	0,6 ± 0,2	1,8 ± 0,2	50,7
Lesconil	06/03	Mature	0,1 ± 0,0	nd	nd	nd	0,2 ± 0,1	nd	nd	nd	nd	nd

Tableau 5.1. Variations saisonnières du profil hormonal dans le plasma de flet mâles (C en ng.g⁻¹, moyenne ± écart-type, n=3) et rapport androgènes/œstrogènes (R). (nd : non déterminé).

	Date	Maturité	T	A	kT	E1	E2	Pn	Pg	OHPn	OHPg	R
Seine	02/02	Mature	2,2	11,1	12,6	0,6	<0,2	4,1	<0,6	1,4	13,7	37
	09/02	Mature	0,3	5,3	0,5	0,5	<0,2	6,3	<0,6	1,6	2,6	10
	02/03	Immature	0,3	7,1	<0,8	1,5	<0,2	12,9	<0,6	1,9	4,1	5
		Mature	0,7 ± 0,1	14,2 ± 1,3	18,0 ± 2,6	0,8 ± 0,1	<0,2	2,3 ± 0,4	<0,6	1,7 ± 0,2	5,4 ± 0,8	37
Lesconil	01/03	Immature	1,3 ± 0,1	6,5 ± 0,2	<0,8	1,3 ± 0,2	<0,2	9,0 ± 0,4	<0,6	8,0 ± 0,1	8,7 ± 0,5	6
	01/03	Mature	1,5 ± 0,1	7,3 ± 0,6	27,8 ± 1,2	1,4 ± 0,1	<0,2	2,9 ± 0,8	<0,6	3,0 ± 0,6	8,0 ± 0,5	24
	06/03	Mature	0,7 ± 0,1	13,7 ± 2,9	3,1 ± 0,1	0,30 ± 0,02	<0,2	4,8 ± 1,1	<0,7	3,1 ± 0,9	2,4 ± 0,4	3

Tableau 5.2. Variations saisonnières du profil hormonal dans les testicules de flet mâles (C en ng.g⁻¹, moyenne ± écart-type, n=3) et rapport androgènes/œstrogènes (R).

	Date	Maturité	T	A	kT	E1	E2	Pn	Pg	OHPn	OHPg	R
Seine	02/02	Mature	0,1	1,1	7,2	0,4	0,5	2,0	<0,4	0,9	8,4	9,4
	02/03	Immature	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	3,1 ± 0,3	0,7 ± 0,1	1,3 ± 0,4	4,1 ± 0,1	<0,4	1,3 ± 0,2	5,0 ± 0,7	1,9
		Mature	3,0 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,3 ± 0,2	2,9 ± 0,2	14,3 ± 0,6	4,4 ± 0,5	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	4,5 ± 0,4	0,4
		Ponte terminée	0,1	0,2	3,6	0,2	0,5	1,3	<0,4	0,6	2,2	12,0
		Ponte en cours	0,2	0,3	0,3	0,2	0,6	1,7	<0,4	0,5	1,7	2,1
Lesconil	01/03	Mature	2,7 ± 0,1	3,4 ± 0,2	3,2 ± 0,6	3,4 ± 0,5	13,2 ± 0,3	2,4 ± 0,1	<0,4	0,5 ± 0,1	3,7 ± 0,4	0,6
	Mature	<0,1	nd	nd	nd	0,2 ± 0,0	nd	nd	nd	nd	nd	

Tableau 5.3. Variations saisonnières du profil hormonal dans le plasma de flet femelles (C en ng.g⁻¹, moyenne ± écart-type, n=3) et rapport androgènes/œstrogènes (R). (nd : non déterminé).

	Date	Maturité	T	A	kT	E1	E2	Pn	Pg	OHPn	OHPg	R
Seine	02/02	Mature	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	<0,8	0,60	1,2 ± 0,3	3,3 ± 0,4	<0,6	3,1 ± 0,1	2,5 ± 0,2	1,4
	09/02	Mature	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,2	<0,8	1,4 0,4	0,9 ± 0,2	3,7 ± 0,8	<0,6	0,6 ± 0,2	2,5 ± 0,3	0,9
	02/03	Immature	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	<0,8	1,5	1,0 ± 0,1	1,8 ± 0,6	<0,6	2,8 ± 0,6	2,6 ± 0,8	0,7
		Mature	2,5 ± 0,1	1,4 ± 0,2	<0,8	0,8 ± 0,1	6,8 ± 0,1	2,5 ± 0,2	<0,6	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	4,8
		Ponte terminée	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,1	<0,8	<0,2	3,0 ± 0,2	23,4 ± 1,0	<0,6	11,4 ± 1,2	3,2 ± 0,4	8,5
		Ponte en cours	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2	<0,8	2,7 ± 0,2	1,1 ± 0,1	11,4 ± 1,0	<0,6	8,5 ± 0,1	1,7 ± 0,4	0,8
Lesconil	01/03	Mature	4,6 ± 0,4	0,9 ± 0,3	<0,8	1,1 ± 0,2	5,9 ± 0,2	3,1 ± 0,7	<0,6	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1	4,9
	06/03	Mature	0,8 ± 0,0	0,4 ± 0,0	<0,8	4,9 ± 0,2	1,1 ± 0,1	2,7 ± 0,1	<0,6	1,1 ± 0,7	1,4 ± 0,3	0,3

Tableau 5.4. Variations saisonnières du profil hormonal dans les ovaires de flet femelles (C en ng.g⁻¹, moyenne ± écart-type, n=3) et rapport androgènes/œstrogènes (R).

Les résultats obtenus sur les flets de l'estuaire de Seine sont en bon accord avec ceux présentés dans l'étude réalisée par Gallien (2003), montrant une augmentation des niveaux plasmatiques de 11-cétotestostérone chez les mâles et de 17- β œstradiol chez les femelles, dans les mois précédant la ponte.

Globalement, aucune différence n'est observable entre les profils hormonaux des poissons provenant de l'estuaire de Seine et ceux des poissons provenant de Lesconil ; les flets provenant de l'estuaire de Seine ne présentent pas d'altération évidente de leur profil hormonal, bien qu'étant exposés de manière chronique à de nombreux contaminants dont l'action sur le système endocrinien des poissons est avérée. Des flets femelles exposés à des boues de dragage – contaminées en HAP et en PCB – présentaient des taux élevés de testostérone et de 17- β œstradiol, ainsi qu'une augmentation de la synthèse de vitellogénine (Janssen et al., 1997). De même, Monteiro et al (2000a et b) ont montré la capacité de certains HAP à altérer la stéroïdogénèse chez le flet femelle, en inhibant *in vivo* la synthèse des œstrogènes. Une exposition moindre à ces substances, ainsi que d'éventuels effets antagonistes ou synergiques, peuvent peut-être expliquer l'absence d'effet notable sur le profil hormonal des flets de l'estuaire de Seine.

Gallien-Landriau (2003) a cependant montré que de nombreux flets mâles de l'estuaire de Seine présentaient des anomalies du système reproductif : induction de vitellogénine ($> 1\mu\text{g.mL}^{-1}$ dans 67% des cas), réduction de l'indice gonadosomatique ou intersex (4% des individus). Les flets provenant de Lesconil ne présentaient aucun trouble, tant au niveau biochimique qu'histologique. Gallien (2003) a également observé l'absence de lien entre les niveaux de 17 β -œstradiol et l'induction de vitellogénine, suggérant que celle-ci était due à l'exposition à différents xénoœstrogènes (nonylphénol, nonylphénol éthoxylates, 17 α -éthynylœstradiol...).

5.1.3. Stéroïdes exogènes

Des analyses ont été réalisées, après déconjugaison, sur des échantillons de bile de flets mâtures provenant de l'estuaire de Seine (individus mâles et femelles prélevés en février 2003). L'objectif de ces analyses était d'évaluer l'accumulation par les flets des stéroïdes synthétiques, notamment le 17 α -éthynylœstradiol. Bien que ces tests aient été réalisés sur un volume de bile relativement important (200 μL), aucun stéroïde n'a pu être détecté (limites de détection voisines de 3 ng.g^{-1}), probablement en raison des concentrations extrêmement faibles dans les eaux de l'estuaire de la Seine (cf. chapitre 3, publication n°1). Ce résultat est en contradiction avec ceux présentés par Gallien (2003), et qui indiquaient la présence de

17 α -éthynylœstradiol dans la bile de flets mâles. Ceci est probablement dû à deux facteurs : d'une part, la variabilité naturelle de la composition de la bile en fonction de l'avancement de la digestion et, d'autre part, la probable variabilité des concentrations en stéroïdes hormonaux dans la Seine (jamais détectés dans les eaux de surface de cet estuaire, cf. publication n°1).

5.1.4. Conclusions

Cette étude a permis de documenter les variations naturelles du profil hormonal chez le flet commun (*Platichthys flesus*). D'importantes variations des niveaux plasmatiques et gonadiques d'androgènes et d'œstrogènes, liées au cycle de reproduction, ont été mises en évidence. Cependant, aucune différence n'a été observée entre les deux sites étudiés (estuaire du Ster et estuaire de Seine), alors que des altérations du développement testiculaire ont été observées chez de nombreux individus mâles prélevés dans ce dernier estuaire. La portée de ces observations doit cependant être relativisée en raison du faible nombre d'individus prélevés dans le cadre de ce suivi.

5.2. VARIATIONS SAISONNIERES DU PROFIL HORMONAL CHEZ LA MOULE (*Mytilus sp.*).

5.2.1. Variations saisonnières des taux endogènes de stéroïdes et de deux paramètres physiologiques (taux de lipides et indice de condition).

Les variations saisonnières des teneurs en stéroïdes endogènes dans la glande digestive de *Mytilus sp.* ont été déterminées sur une période deux ans. Des individus mâles et femelles ont été prélevés à proximité de la jetée de la Chapelle, dans le bassin d'Arcachon. Parallèlement, deux paramètres physiologiques ont été étudiés, dans le but d'essayer de relier les variations saisonnières des profils hormonaux au cycle sexuel de *Mytilus sp.* Le taux de lipides dans les organismes entiers a ainsi été estimé au moyen d'une extraction au dichlorométhane. Un indice de condition (IC) a également été calculé, de la manière suivante : $IC (\%) = 100 \times (\text{masse tissus mous} / \text{masse coquille})$; cet indice est supposé représenter le

taux de remplissage de la coquille, variant en fonction du développement des gonades des individus échantillonnés.

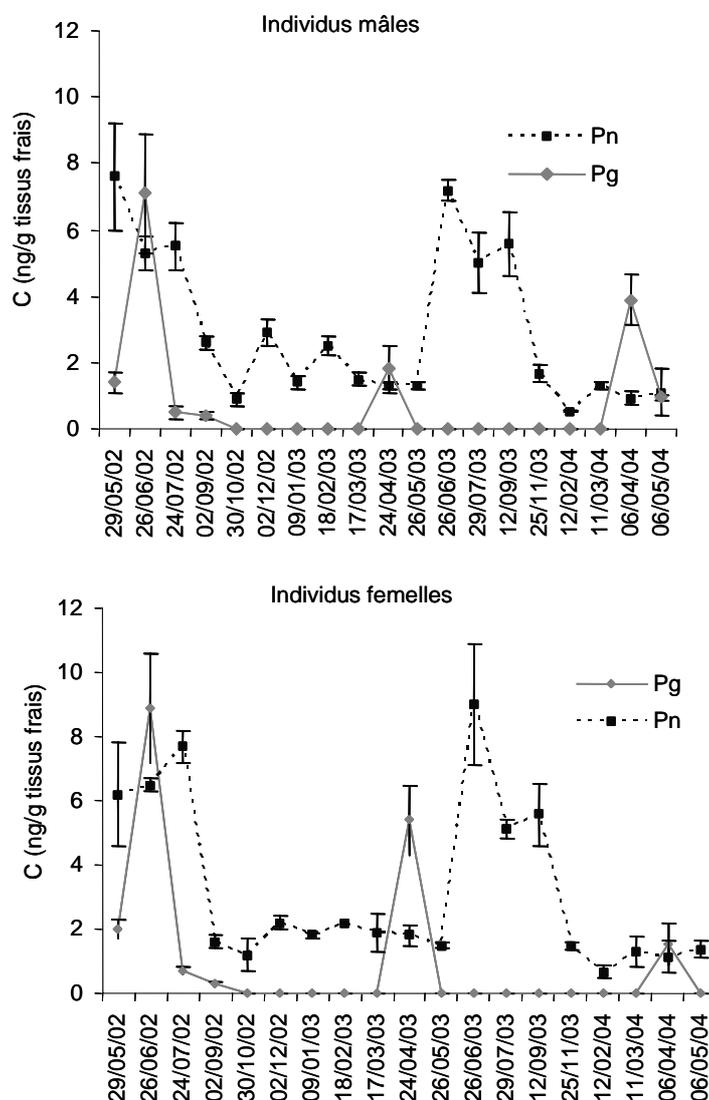


Figure 5.1. Variations saisonnières des taux moyens de progestérone (Pg) et de prégnénolone (Pn) dans la glande digestive d'individus de *Mytilus sp.* provenant de jetée de la Chapelle à Arcachon (en haut, individus mâles ; en bas, individus femelles). Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type sur la moyenne (n=3).

Seuls deux stéroïdes ont pu être détectés dans les extraits de glandes digestives : la progestérone et son précurseur direct, la prégnénolone. La progestérone présente des variations saisonnières similaires chez les mâles et les femelles (figure 5.1); les niveaux sont faibles la majeure partie de l'année ($< 0,3 \text{ ng.g}^{-1}$) et un pic survient généralement au printemps (entre avril et juin suivant l'année), alors que les gonades des mollusques sont dans une période d'activité maximale. Dans le Bassin d'Arcachon, la principale période de ponte a en

effet généralement lieu au mois d'avril (Lubet, 1959). Les variations saisonnières des niveaux de progestérone semblent ainsi coïncider avec les différents stades du développement sexuel et pourraient donc être liées à la gamétogenèse chez *Mytilus sp.* ; le fait que les profils soient similaires chez les individus des deux sexes suggère que ce stéroïde joue le même rôle chez les mâles et chez les femelles. Les pics de progestérone observés chez les moules du Bassin d'Arcachon ont lieu environ trois mois plus tôt que chez les individus de *Mytilus edulis* prélevés par Reis-Henriques et Coimbra (1990b) dans la ria d'Aveiro (Nord du Portugal) ; ce décalage est peut-être dû à des différences dans le cycle sexuel liées à des facteurs externes (température de l'eau, abondance du phytoplancton...). On pourra noter que les niveaux mesurés par Reis-Henriques et Coimbra chez *Mytilus edulis* (par RIA) sont du même ordre de grandeur que ceux déterminés dans la présente étude (1,5 - 5 ng.g⁻¹ de tissus frais).

L'interprétation des variations saisonnières des niveaux de prégnénone est moins aisée ; il semble cependant que les niveaux de prégnénone présentent un pic dans les mois suivant la ponte, avec des profils relativement similaires chez les mâles et les femelles. Les autres stéroïdes recherchés, notamment les métabolites de la progestérone (17 α -hydroxyprogestérone) et de la prégnénone (17 α -hydroxyprégnénone), ainsi que la testostérone et le 17 β -œstradiol n'ont jamais été détectés dans les extraits de glandes digestives, quel que soit le stade sexuel des individus prélevés.

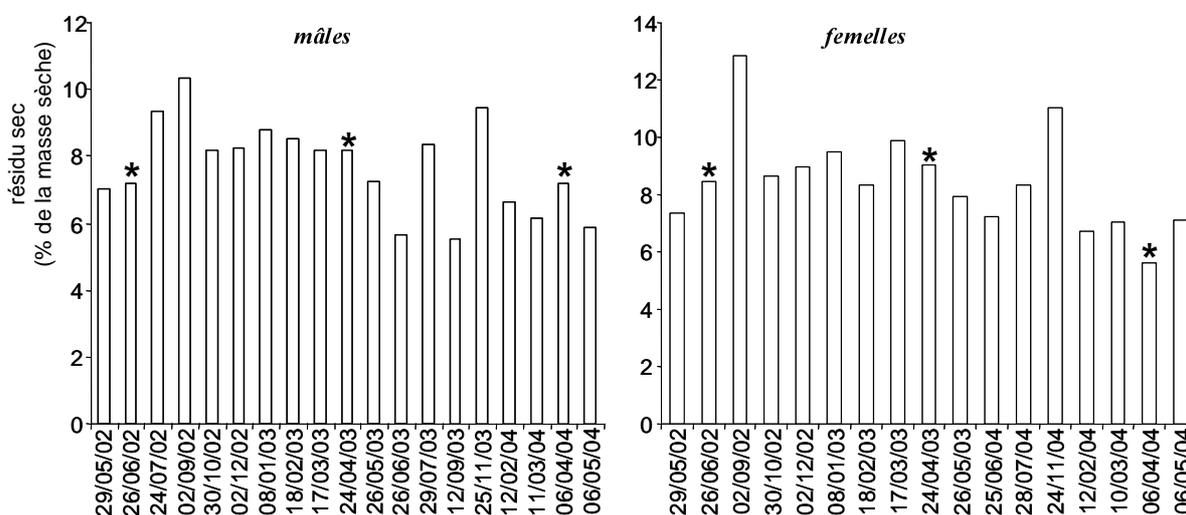


Figure 5.2. Variations du « taux de lipide » chez *Mytilus sp.* (prélèvement à la Jetée de la Chapelle, Arcachon ; 1 mesure sur un pool de 5 individus entiers). * : pic de progestérone.

Le taux lipidique chez *Mytilus sp.* est minimal lors de la période précédant la ponte, en raison de l'utilisation des lipides lors du processus de gamétogenèse (Lubet, 1959). Ceci n'est pas clairement observable sur la figure 5.2, peut-être parce que le taux de lipides a été

grossièrement estimé avec un protocole non sélectif (extraction au dichlorométhane) ; la mise en œuvre de méthodes plus spécifiques comme celles de Roese-Gotlieb ou Bligh-Dyer (Manirakiza et al., 2001) aurait peut-être permis d'affiner les résultats.

De même que pour le taux de lipides, aucun lien n'a pu être observé entre indice de condition et taux de stéroïdes endogènes (figure 5.3). Ceci est probablement lié à la forte variabilité naturelle de l'indice de condition chez *Mytilus sp.* (écart-type relatif moyen observé voisin de 20%), qui pourrait expliquer que la variation de IC liée à la ponte ne soit pas perceptible, même en travaillant sur 15 individus de chaque sexe.

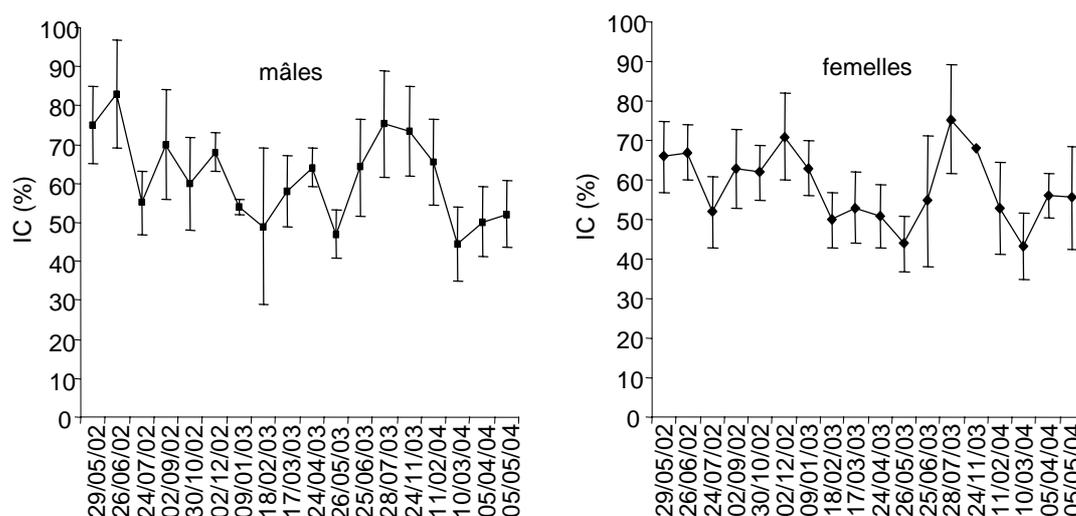


Figure 5.3. Indices de conditions moyens des individus *Mytilus sp.* prélevés à la jetée de la Chapelle (les barres d'erreur représentent l'écart-type, n = 15).

5.2.2. Conclusions

Reis-Henriques et al. (1990) ont observé une corrélation entre les taux de progestérone et les différents stades du cycle reproducteur et ils ont suggéré que la progestérone pourrait avoir un rôle dans l'activité sexuelle de ces bivalves. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude semblent confirmer la possibilité d'utiliser la progestérone comme biomarqueur de perturbation endocrinienne. Sa production semble être liée au cycle reproducteur de *Mytilus sp.* bien que, dans le cadre de ces travaux de thèse, aucun marqueur physiologique ou histologique ne vienne conforter de manière formelle cette hypothèse.

CHAPITRE 6

SYNTHESE

SYNTHESE

Le but de ce chapitre est de récapituler les principaux résultats obtenus dans le cadre de cette thèse et d'en présenter une synthèse. L'objet initial de ces travaux était de développer des méthodes d'analyse multi-analytes pour l'étude des stéroïdes hormonaux dans diverses matrices d'intérêt environnemental. Deux approches complémentaires ont ainsi été privilégiées.

Tout d'abord, les stéroïdes hormonaux ont été étudiés en tant que contaminants des milieux aquatiques, introduits dans l'environnement essentiellement via les stations d'épuration (STEP) et impliqués dans les phénomènes de perturbation endocrinienne. Deux sites ont été particulièrement étudiés et ont fait l'objet de plusieurs campagnes d'échantillonnage d'eau et d'effluent: l'estuaire de la Seine (Seine-Maritime) et la Jalle d'Eysines (Gironde). Pour le premier site, cinq campagnes ont été réalisées lors de l'année 2002, dans le cadre du Programme Seine-Aval, afin d'évaluer la contamination de cet estuaire par les hormones stéroïdiennes. Pour le second site, trois campagnes ont eu lieu entre juillet 2003 et février 2004, en amont et en aval d'un rejet d'effluent de STEP, afin de mieux comprendre le devenir de ces composés après leur introduction dans l'environnement. Huit stéroïdes ont été retenus pour cette étude, cinq œstrogènes (dont deux synthétiques) et trois progestagènes (dont deux synthétiques). Les critères ayant présidé au choix de ces composés étaient principalement, dans le cas des hormones naturelles, les quantités excrétées par le corps humain et, dans le cas des hormones synthétiques, les quantités consommées dans le cadre des traitements contraceptifs œstroprogestatifs.

Ensuite, le métabolisme des stéroïdes hormonaux a été étudié chez des turbots issus de fermes aquacoles, des flets capturés dans l'estuaire de la Seine et des moules prélevées dans le bassin d'Arcachon. Dans le cas des turbots, l'objectif fixé était d'estimer l'impact de différents contaminants sur la stéroïdogénèse chez ce poisson. Dans le cas des flets, il s'agissait d'étudier les variations saisonnières du profil hormonal chez des poissons capturés en milieu « contaminé » (estuaire de la Seine, Seine-Maritime) ou en milieu « propre » (estuaire du Ster, Lesconil, Finistère). Enfin, dans le cas des moules, l'objectif était également d'évaluer les variations saisonnières des taux de stéroïdes endogènes, afin d'estimer la pertinence de l'utilisation de ces composés comme biomarqueurs de perturbation endocrinienne chez cette espèce de mollusque bivalve. Quatorze stéroïdes naturels (androgènes, œstrogènes et progestagènes) ont été recherchés chez ces trois espèces, le choix des analytes étant motivé par leur rôle direct en tant qu'hormones ou par leur importance en tant qu'intermédiaire dans le processus de stéroïdogénèse.

1. VALIDATION DES PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Différents protocoles analytiques ont été développés dans le cadre de ces travaux. Un effort particulier a été fourni pour l'optimisation des procédures de préparation des échantillons, puisque les composés considérés étaient présents à l'état de traces dans les matrices étudiées (ng.L^{-1} dans les eaux et ng.g^{-1} dans les échantillons biologiques). Ces procédures ont reposé sur l'utilisation de cartouches d'extraction solide/liquide, employées pour la préconcentration et la purification des échantillons (figure 6.1).

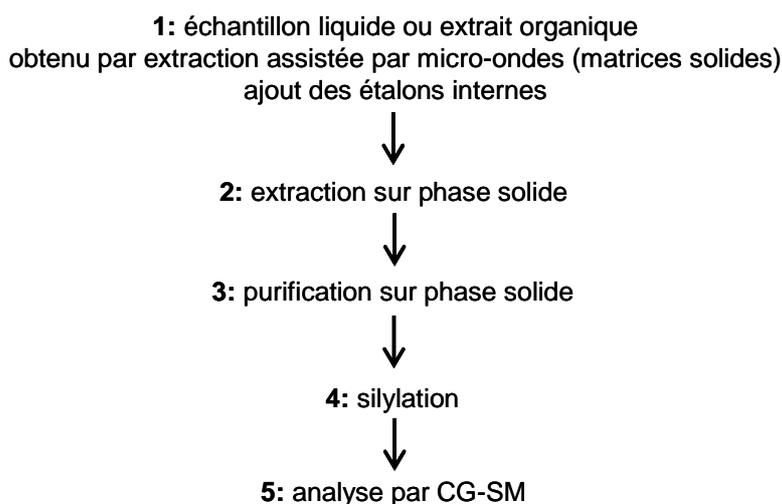


Figure 6.1. Représentation schématique de la procédure de traitement des échantillons

La préparation des solutions individuelles de stéroïdes ($100\text{-}200 \mu\text{g.g}^{-1}$ dans le méthanol, conservées à 4°C), les dilutions successives de ces solutions ainsi que leur addition lors des différents tests et analyses ont été contrôlées par gravimétrie afin de réduire les incertitudes associées.

La quantification des analytes a été réalisée essentiellement par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG-SM, ionisation par impact électronique), après silylation des fonctions hydroxyles et cétones. Une autre technique a également été employée, la chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (CL-SM, ionisation par électrospray). La CG-SM a cependant été employée pour la totalité des analyses car cette technique s'est avérée être nettement plus sensible que la CL-SM (10 à 20 fois pour les œstrogènes et 2 à 5 fois pour les androgènes ; volume injecté en CG-SM : $2,5 \mu\text{L}$ ($60 \mu\text{L}$ dans le flacon d'injection), volume injecté en CL-SM : $5 \mu\text{L}$ ($60 \mu\text{L}$ dans le flacon d'injection)). Des stéroïdes deutérés ont été utilisés pour la quantification des stéroïdes natifs : testostérone- d_3 , 17β -œstradiol- d_4 et 17α -éthynylœstradiol- d_4 . Des essais

ont été réalisés avec d'autres étalons internes (progestérone-*d*9, androsténone-*d*2, œstrone-*d*3), mais ils ont donné des résultats peu reproductibles, probablement en raison d'une faible stabilité de ces étalons lors de l'étape de dérivation. La testostérone-*d*3 a été retenue pour quantifier les stéroïdes non phénoliques, tandis que le 17β-œstradiol-*d*4 et le 17α-éthynylœstradiol-*d*4 ont été choisis pour quantifier, respectivement, les œstrogènes naturels et les œstrogènes synthétiques. La validité du dosage par CG-SM a été vérifiée, à l'aide de solutions étalons, pour tous les composés et pour des masses injectées variant de 15 pg à 5 ng.

Les rendements des procédures d'extraction solide/liquide, de même que ceux de l'extraction assistée par micro-ondes employée pour les matrices solides, ont été déterminés avec des échantillons fortifiés en stéroïdes. Des rendements compris entre 62 et 118% ont été obtenus pour l'ensemble des analytes, quelle que soit la matrice considérée.

Afin de valider l'ensemble du protocole (extraction/purification/quantification), des dosages ont été réalisés sur différents échantillons de sérum humain dont les concentrations en progestérone et en 17β-œstradiol sont certifiées par le Bureau Communautaire de Référence (BCR) de l'Union Européenne (dosage par CG-SM Haute Résolution). De bons résultats ont été obtenus pour le 17β-œstradiol (106 ± 12 % pour le BCR 577 et 95 ± 5 % pour le BCR 578), tandis que la quantification de la progestérone était moins satisfaisante, tout en restant acceptable (125 ± 23%) (figure 6.2)

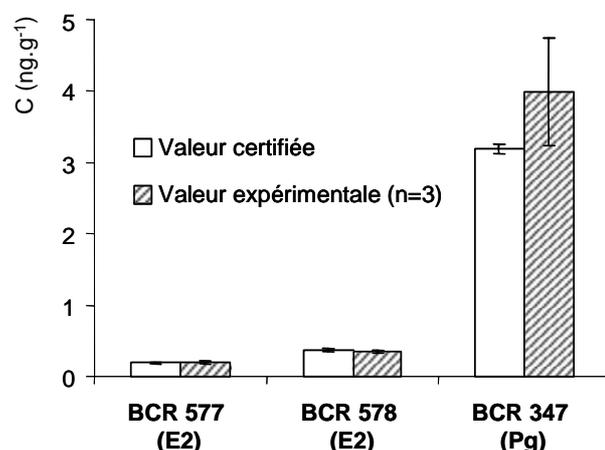


Figure 6.2. Validation de l'analyse quantitative du 17β-œstradiol (E2) et de la progestérone (Pg) au moyen d'échantillons de sérum humain certifiés (BCR 577 et 578 : E2 ; BCR 347 : Pg). Résultats expérimentaux : moyenne ± écart-type (n=3).

Au sein des matrices biologiques, les stéroïdes peuvent être présents sous formes libres ou conjuguées. Ces dernières sont des dérivés polaires formés par association d'un stéroïde

avec un ion sulfate ou une molécule d'acide glucuronique ; l'hydrosolubilité accrue de ces formes facilite l'excrétion des stéroïdes, composés dont le $\log K_{ow}$ est compris entre 2,5 et 4. Les formes conjuguées sont inactives sur le plan hormonal, mais jouent un rôle important dans le métabolisme des stéroïdes, d'où l'intérêt de les doser parallèlement aux formes libres dans les matrices biologiques. En outre, ces formes polaires sont également susceptibles d'être présentes dans les effluents de STEP car, dans l'urine humaine, les stéroïdes sont excrétés essentiellement sous forme de sulfates ou de glucuronides.

Une procédure de fractionnement sur phase solide a donc été développée afin de permettre le dosage des formes libres et conjuguées présentes au sein d'un même échantillon (matrices biologiques ou phase dissoute des échantillons d'eau et d'effluent). Après dépôt de l'échantillon sur cartouche Oasis HLB, deux fractions sont obtenues en jouant sur la polarité des solvants d'élution. L'optimisation du fractionnement permet de minimiser l'élution des composés libres dans la première fraction (contenant les formes conjuguées), point essentiel pour ne pas surestimer les concentrations en formes conjuguées. Ainsi, seuls l'œstriol et la 11-cétotestostérone sont détectables dans la première fraction, mais en quantités négligeables (tableau 6.1 ; *publication n°5*).

	fraction 1 (%)	fraction 2 (%)		fraction 1 (%)	fraction 2 (%)
E1	nd	106 ± 6	Pn	nd	95 ± 11
E2	nd	101 ± 6	OHPn	nd	95 ± 21
E3	3 ± 1	102 ± 9	OHPg	nd	93 ± 16
A	nd	96 ± 7	DHP	nd	105 ± 34
T	nd	98 ± 5	EE2	nd	107 ± 6
DHT	nd	96 ± 10	MeEE2	nd	86 ± 25
DHA	nd	84 ± 11	No	nd	113 ± 7
DHEA	nd	83 ± 16	DN	nd	101 ± 22
11-cT	4 ± 2	104 ± 7	E2-G	98 ± 12	nd
Pg	nd	87 ± 10	E2-S	86 ± 5	10 ± 3

Tableau 6.1. Rendement moyen de fractionnement des formes libres et des formes conjuguées sur Oasis HLB (entre parenthèses : coefficient de variation de reproductibilité (%), n=9), déterminés sur des échantillons d'eau supplémentés en stéroïdes (50 ng). nd : non détecté.

Les formes conjuguées ne peuvent être analysées directement en CG-SM en raison de leur trop grande polarité ; leur analyse nécessite donc une déconjugaison préalable, réalisée en deux temps : une solvolyse (en présence d'acide trifluoroacétique) suivie d'une hydrolyse enzymatique (arylsulfatase/ β -glucuronidase issue du suc digestif de *Helix pomatia*) (*publication n°5*). La seule action de cette dernière enzyme ne permet pas, en effet, d'hydrolyser certaines formes minoritaires tels les sulfo-glucuronides, les disulfates ou même certains sulfates (Tang et Croone, 1987 ; Hobe et al., 2002). Pour assurer une déconjugaison complète des formes sulfatées, il est nécessaire de procéder à une solvolyse. L'efficacité de cette double procédure sur été évaluée à l'aide de composés modèles disponibles commercialement : le 17β -œstradiol-3-sulphate et le 17β -œstradiol-17-glucuronide. Les rendements moyens de déconjugaison sont de 99% pour le sulfate et de 88 % pour le glucuronide (n=9) (solvolyse + hydrolyse enzymatique).

D'autres procédures de déconjugaison ont été testées, mais sans réel succès. La plus attractive, a priori, était celle dite de « méthanolyse », reposant sur l'utilisation de triméthylchlorosilane méthanolique (1M, incubation à 55°C durant 1h). Cette méthode permet en effet la solvolyse simultanée de tous les stéroïdes conjugués présents dans un échantillon donné (Tang et Croone, 1989). Les résultats obtenus ont montré que si les rendements de déconjugaison étaient excellents (>95%), cette méthode provoquait également des pertes importantes de 17β -œstradiol-*d4* (>60%) qui limitaient son emploi comme étalon interne. En conséquence, ce protocole n'a pas été retenu pour l'analyse des formes conjuguées.

Une étude a également été réalisée afin de comparer radioimmunoessai (RIA) et CG-SM pour le dosage du 17β -œstradiol et de la testostérone dans différents échantillons de plasma de poisson (flet et truite arc-en-ciel) (*publication n°3*). La RIA étant une méthode couramment employée pour l'analyse des stéroïdes hormonaux dans le plasma, le but de cette étude était d'évaluer la spécificité de la méthode RIA et sa sensibilité vis-à-vis d'éventuelles interférences matricielles, en employant différentes procédures de préparation des échantillons : extraction liquide/liquide au diéthyléther, extraction SPE sur silice greffée C_{18} et extraction SPE sur silice greffée C_{18} suivie d'une purification sur silice greffée NH_2 .

Les deux méthodes d'analyse ont donné des résultats relativement proches pour la testostérone, à tous les niveaux de concentrations étudiés (0,09-3,23 ng.g⁻¹) et quel que soit le protocole de traitement du plasma. Pour le 17β -œstradiol, en revanche, les résultats sont plus difficiles à interpréter. En effet, il apparaît que, pour une raison encore inexplicée, la nature du solvant utilisé pour la préparation des étalons (dichlorométhane ou méthanol) a un impact considérable sur la calibration externe nécessaire en RIA (figure 6.3).

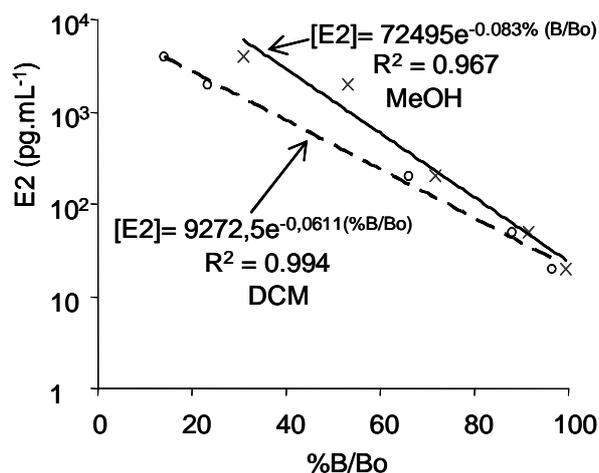


Figure 6.3. RIA : droites d'étalonnage externes obtenues avec des solutions étalons de 17β-œstradiol préparées dans le dichlorométhane (DCM) et dans le méthanol (MeOH). B/Bo : pourcentage d'occupation des sites de la phase greffée (anticorps).

Par conséquent, la droite d'étalonnage externe appropriée a été employée pour chaque échantillon, en fonction de la nature des solvants intervenant dans son traitement pré-analyse. Il en ressort que RIA et CG-SM donnent des résultats proches ($\Delta C < 15\%$) pour des concentrations supérieures à $0,5 \text{ ng.g}^{-1}$; en revanche, la RIA semble sous-estimer les concentrations en 17β-œstradiol lorsque celles-ci sont inférieures à $0,25 \text{ ng.g}^{-1}$.

Finalement, la nature des opérations de pré-traitement de l'échantillon semble avoir peu d'incidence sur le dosage par RIA. Dans les conditions optimales, CG-SM et RIA donnent des résultats voisins pour les deux stéroïdes considérés, exceptés pour les faibles concentrations de 17β-œstradiol.

2. ETUDE DES STEROÏDES COMME CONTAMINANTS DES SYSTEMES AQUATIQUES

2.1. Estuaire de la Seine

La présence de stéroïdes hormonaux dans les effluents de STEP déversés dans l'estuaire de la Seine, et dans le fleuve lui-même a été étudiée (publication n°1). Les sites retenus ont fait l'objet de prélèvements réguliers de mars à novembre 2002. La procédure de conservation des eaux après échantillonnage a été optimisée car des tests préliminaires ont mis en évidence une rapide dégradation des stéroïdes naturels lorsque aucune précaution n'était

prise (simple conservation à 4°C) : les temps de demi-vie des stéroïdes naturels variaient alors entre 8 heures et douze jours. L'ajout de formol (1 %, v/v) permet d'inhiber ce processus de dégradation bactérienne, durant au moins une semaine lorsque les eaux (ou effluents) sont conservés à 4°C. Les procédures de préparation des échantillons ont également fait l'objet d'une optimisation, tant pour l'étape d'extraction sur phase solide que pour celle de purification. L'influence sur le rendement d'extraction de paramètres tels que la nature de la phase adsorbante (silice greffée ou copolymère), le débit d'échantillonnage ou le volume d'échantillon, a été évaluée. Ce dernier paramètre est apparu être intrinsèquement lié à la nature de l'adsorbant : le volume de relargage sur IST ENv+ (polystyrène-divinylbenzène hydroxylé) est compris entre 2 et 4 L, tandis qu'il est supérieur à 4 L pour les Oasis HLB (poly(divinylbenzène-co-N-vinylpyrrolidone)) (tableau 6.2) (*publication n°1*).

volume de l'échantillon	2L	4L	4L	4L
nature de l'adsorbant	Env+ 200 mg	Env+ 200 mg	Env+ 500 mg	Oasis HLB 200 mg
E1	97 ± 3	3 ± 2	4 ± 1	75 ± 7
E2	99 ± 3	1 ± 0	10 ± 2	84 ± 3
E3	47 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	80 ± 4
EE2	110 ± 2	6 ± 1	8 ± 2	71 ± 14
MeEE2	109 ± 11	85 ± 1	85 ± 10	73 ± 19
Pg	74 ± 2	75 ± 2	96 ± 4	93 ± 5
DN	115 ± 15	97 ± 10	108 ± 8	80 ± 5
No	74 ± 2	98 ± 10	107 ± 5	109 ± 5

Tableau 6.2. Influence de la nature de la phase adsorbante sur le volume de fuite pour des échantillons d'eau osmosée fortifiés à 50 ng.L⁻¹ par analyte (pourcentage moyen de récupération ± écart-type, n=3).

Les analytes n'ont jamais été détectés dans les eaux de surface, quelle que soit la période d'échantillonnage et le débit du fleuve; en revanche, les œstrogènes naturels ont été détectés à des niveaux de l'ordre du ng.L⁻¹ à plusieurs reprises dans les effluents échantillonnés. (tableau 6.3) L'œstrone a été le composé le plus souvent détecté, aux concentrations les plus élevées (1,8-8,3 ng.L⁻¹), ce qui est en accord avec la plupart des observations publiées à ce jour (revue par Lintelmann et al., 2003). Des variations du niveau d'œstrone dans l'effluent d'une des STEP étudiées (Tancarville) ont été observées ; elles sont plus vraisemblablement dues aux variations de l'efficacité du traitement qu'à de réelles variations saisonnières,

comme l'ont montré Williams et al. (2003). Les stéroïdes synthétiques (mestranol, 17 α -éthynylœstradiol, noréthindrone et lévonorgestrel) n'ont été détectés dans aucun échantillon, soit en raison d'une élimination élevée lors du traitement en STEP soit en raison des limites de détection plus élevées que pour d'autres analytes.

station	PK	mois	Concentration (ng.L ⁻¹)							
			E1	E2	E3	EE2	MeEE2	Pg	DN	No
Poses	200	mars	<1,3	<1,0	<1,9	<1,8	<1,6	<2,5	<4,0	<2,5
		mai	<1,2	<0,5	<2,0	<1,1	<1,0	<2,7	<5,9	<2,5
Caudebec	313	mars	<1,3	<1,5	<1,9	<1,8	<1,6	<2,5	<4,0	<2,5
		mai	<0,8	<0,5	<2,2	<1,0	<0,4	<2,7	<3,8	<1,3
Honfleur	355	mars	<1,2	<1,0	<1,0	<1,5	<1,0	<2,2	<4,5	<1,5
		mai	<1,1	<0,8	<1,2	<1,3	<0,8	<2,0	<5,0	<1,3
Elbeuf (STEP)	220	mars	<2,0	<1,9	<4,5	<3,0	<3,5	<5,0	<4,5	<5,0
		mai	4,3±0,9	<3,8	<8,0	<5,3	<5,4	<8,0	<7,2	<6,5
		juillet	<3,5	<0,6	<4,9	<0,8	<0,7	<4,5	<6,7	<3,2
		septembre	<0,5	<0,4	<0,8	<0,8	<0,9	<3,5	<6,1	<4,3
		novembre	<4,3	<2,4	<5,6	<1,1	<1,1	<4,3	<6,3	<1,9
Rouen (STEP)	245	mars	<1,8	<1,9	<4,0	<2,9	<3,0	<3,5	<3,8	<5,2
		mai	<3,0	<3,8	<8,0	<5,3	<5,0	<7,0	<7,2	<5,0
		juillet	<3,3	<0,5	3,5±1,0	<1,1	<1,1	<4,3	<6,0	<3,1
		septembre	<0,5	<0,4	<2,1	<1,0	<0,7	<3,5	<5,8	<4,0
		novembre	<3,4	<2,5	<7,3	<1,2	<0,9	<6,8	<2,5	<2,5
Tancarville (STEP)	330	mars	<2,8	<2,5	<3,0	<2,5	<2,7	<4,0	<3,2	<4,5
		mai	4,2±1,0*	<0,8	<1,8	<0,7	<1,2	<1,7	<3,2	<1,1
		juillet	1,8±0,3	<0,3	<3,6	<1,0	<0,6	<3,7	<5,0	<3,3
		septembre	8,3±1,0*	<0,3	<1,9	<0,7	<0,7	<3,7	<4,3	<3,9
		novembre	4,9±0,2	<1,4	<5,0	<1,0	<1,1	<5,0	<5,0	<1,5

Tableau 6.3. Dosage des stéroïdes hormonaux dans différents échantillons d'eau et d'effluents de STEP prélevés à différents points kilométriques (PK) dans l'estuaire de la Seine (moyenne±écart-type, n=3). < X : < limite de détection ; * : > limite de quantification.

En outre, l'œstrone, principal œstrogène dans les effluents de STEP, a été détecté à deux reprises dans la phase particulière d'effluents de la STEP de Tancarville (1,7-2,4 ng.g⁻¹) et

dans des sédiments prélevés à proximité des émissaires des STEP d'Elbeuf (1,3 ng.g⁻¹) et de Tancarville (1,1 ng.g⁻¹).

Le suivi réalisé sur l'estuaire de la Seine indique que sa contamination par les stéroïdes hormonaux est relativement faible, mais il est cependant impossible de conclure quant à un éventuel risque écotoxicologique lié à ces seules substances. En effet, si l'on prend l'exemple du 17 α -éthynylœstradiol, des effets sont observés sur la truite arc-en ciel dès 0,1 ng.L⁻¹ (induction de la synthèse de vitellogénine); or, les limites de détection calculées pour ce stéroïde dans les extraits d'eau de surface sont nettement supérieures à cette valeur, puisqu'elles varient entre 1,0 et 1,8 ng.L⁻¹. En outre, les effets des hormones stéroïdiennes étant additifs (Thorpe et al., 2003), le risque présenté par ces substances au niveau de l'estuaire de la Seine ne peut être évalué avec certitude.

5.2. Jalle d'Eysines

Des tests préliminaires ayant montré que le rejet de la STEP d'Eysines contenait de fortes concentrations en œstrone, la rivière recevant cet effluent a été choisie pour l'étude du devenir des stéroïdes après leur introduction dans un système aquatique continental, en l'occurrence la Jalle d'Eysines (*publication n°2*).

Les niveaux de stéroïdes libres et conjugués ont ainsi été déterminés en amont et en aval de la STEP, ainsi que dans le rejet lui-même. Les formes conjuguées ont été incluses dans l'étude car elles peuvent être considérées comme des précurseurs des formes libres, susceptibles d'être hydrolysées sous l'action des bactéries présentes dans l'environnement. En outre, des stéroïdes conjugués, notamment des sulfates, ont été détectés dans différents effluents de STEP (D'Ascenzo et al., 2002 ; Tilton et al., 2002) et dans des eaux de rivières (Isobe et al., 2003). Afin d'évaluer les variations saisonnières des profils de concentration des stéroïdes en aval du rejet, trois campagnes d'échantillonnage ont été menées entre juillet 2003 et février 2004.

Seules les formes libres des œstrogènes naturels ont été détectées dans l'effluent et dans la Jalle d'Eysines (tableau 6.4). Comme pour les STEP de l'estuaire de la Seine, l'œstrone est le composé le plus abondant dans l'effluent, avec des niveaux relativement élevés, compris entre 17 et 71 ng.L⁻¹.

	juillet 2003	septembre 2003	février 2004
œstrone	71,4	57,8 ± 2,2	17,2 ± 0,3
œstradiol	< 1,7	4,4 ± 0,8	< 0,6
œstriol	<1,3	2,9 ± 0,1	< 0,6
mestranol	< 1,7	< 1,6	< 2,3
éthynylœstradiol	< 4,1	< 1,2	< 0,9
progestérone	< 8,7	nd	nd
noréthindrone	< 5,2	< 1,7	< 2,1
D-norgestrel	< 5,5	< 1,3	< 1,9

Tableau 6.4. Niveaux de stéroïdes hormonaux dans l'effluent de la STEP d'Eysines (ng.L⁻¹; moyenne ± écart-type). nd : non déterminé (interférence matricielle) ; <X : < limite de détection.

En conditions estivales, la chute des niveaux d'œstrone en aval du rejet est plus rapide que la dilution, estimée avec les niveaux de bore dissous : 50% de l'œstrone est dégradée en moins de 2 km en aval du rejet (figure 6.9, page suivante). La concentration en œstrone décroît alors selon une loi exponentielle de premier ordre (fonction de la distance par rapport au rejet), et la dégradation observée est probablement due à la combinaison des phénomènes de photolyse et d'hydrolyse bactérienne. En février 2004, seule l'œstrone a été détectée dans l'effluent ; la dégradation de ce stéroïde en conditions hivernales est minime puisque aucune différence significative des niveaux d'œstrone n'a pu être observée entre le point situé immédiatement en aval du rejet de la STEP d'Eysines et celui situé 10 km en aval.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer les différences observées entre les conditions estivales et hivernales. Une plus faible vitesse de photolyse en conditions hivernales est plausible, l'intensité de l'irradiation solaire étant minimale à cette période de l'année. Les processus de photolyse étant cependant relativement lents par rapport à la dégradation bactérienne (Jürgens et al., 2002), il est probable que les différences de profil observées pour l'œstrone soient liées à des variations de l'activité biologique au sein de la rivière.

œstriol et 17β-œstradiol ont été détectés, à des niveaux inférieurs à celui de l'œstrone, dans l'échantillon d'effluent du mois de septembre 2004 et dans les eaux des points aval. Une rapide diminution des niveaux d'œstriol et 17β-œstradiol a également été mise en évidence, mais les concentrations étaient trop faibles (inférieures à la limite de quantification) pour que les profils de concentration soient modélisés.

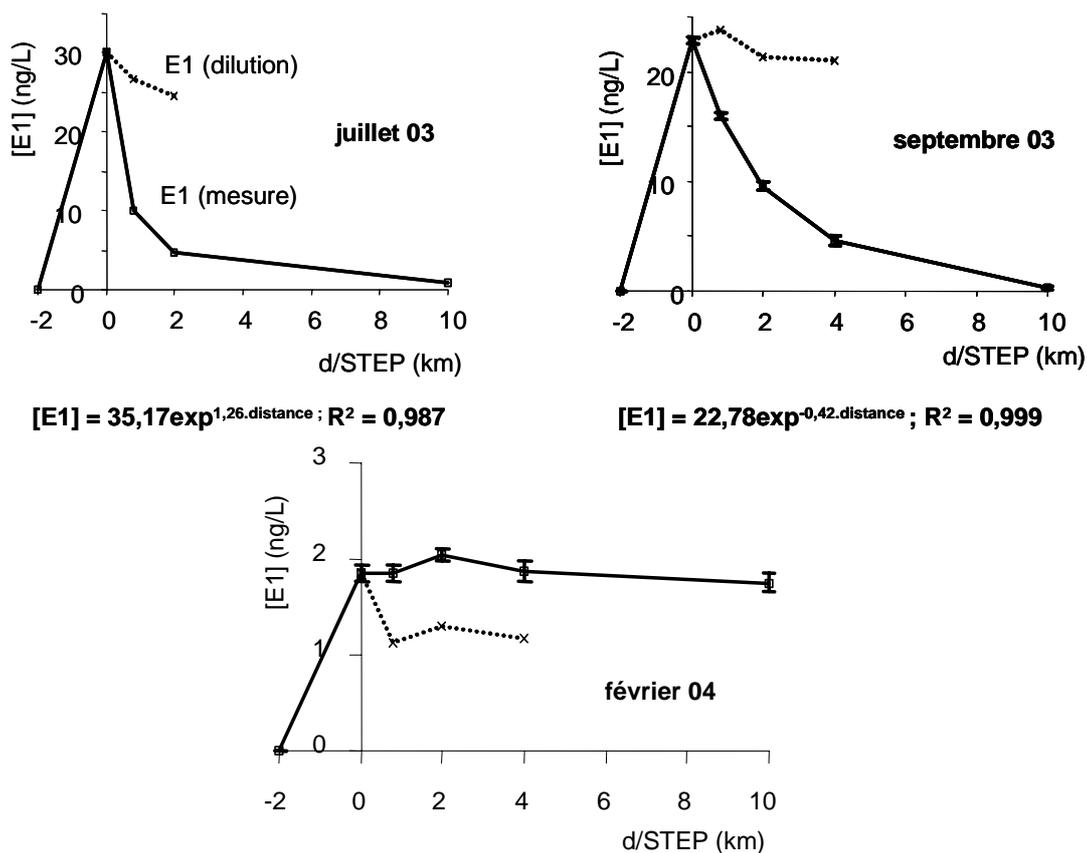


Figure 6.4. Variations saisonnières du gradient de concentration en œstrone en aval du rejet de la STEP d'Eysines. Comparaison de la concentration mesurée (moyenne±écart-type, n=3) et de la concentration corrigée par rapport à la dilution.

Par ailleurs, en raison de la faiblesse des quantités de matière en suspension dans la Jalle d'Eysines (quelques mg.L^{-1}), l'adsorption joue un rôle négligeable dans le devenir des stéroïdes bien que le $\log K_{ow}$ de ces composés soit compris entre 2,5 et 4,3 ; aucun analyte n'a été ainsi détecté dans la phase particulaire, même lorsque les niveaux en phase dissoute atteignait plusieurs dizaines de ng.L^{-1} .

Les concentrations en œstrogènes mesurées dans la Jalle d'Eysines sont supérieures à celles capables d'induire des malformations testiculaires chez le medaka (*Oryzias latipes*) (Metcalf et al., 2001). Dès lors, et compte tenu des limites de détection relativement élevées obtenues pour le 17α -éthynylœstradiol (voisines de 1 ng.L^{-1} , alors que ce composé est actif dès 0.1 ng.L^{-1}), il apparaît possible que les poissons vivant dans la Jalle d'Eysines puissent présenter des troubles de la reproduction.

3. Etude des perturbations de la stéroïdogénèse chez le turbot juvénile exposé à des contaminants en milieu contrôlé

Un certain nombre de substances d'origine anthropique introduites dans l'environnement possèdent la faculté d'altérer le fonctionnement du système endocrinien des organismes qui y sont exposés. Dans le cadre du programme européen BEEP (Biological Effects of Environmental Pollution in marine coastal ecosystems), des turbots juvéniles âgés de 6 mois environ (*Psetta maxima* ou *Scophthalmus maximus*) ont été exposés durant trois semaines à différents contaminants en phase dissoute reconnus comme perturbateurs endocriniens ou suspectés de l'être: pétrole de Mer du Nord, pétrole en association avec un mélange d'alkylphénols industriel, bisphénol A, diallylphtalate, tétrabromodiphényléther et 4-nonylphénol, ce dernier contaminant étant retenu comme témoin positif pour les effets de type œstrogénique. L'impact de ces différentes substances sur la biosynthèse et le métabolisme hormonal de poissons sexuellement immatures a été évalué au moyen de dosages hormonaux réalisés sur les gonades (organe principal pour la synthèse des stéroïdes hormonaux à partir du cholestérol), le plasma (fluide de transport des hormones) et la bile (réceptacle des produits issus du métabolisme hépatique).

Les individus exposés au pétrole et au pétrole en association avec un mélange d'alkylphénols industriel n'ont pas présenté de perturbation apparente de leur profil hormonal. Ceux exposés au diallylphtalate et au tétrabromodiphényléther ont vu leurs niveaux de stéroïdes et leur rapport androgènes/œstrogènes largement augmenter dans les trois compartiments biologiques étudiés; en raison d'écarts-type élevés ou d'absence de répliquat analytique, les conclusions sur l'impact de ces contaminants doivent cependant être relativisées. Le Bisphénol A et le 4-nonylphénol ont sérieusement perturbé la stéroïdogénèse chez les turbots juvéniles. Ces deux contaminants ont provoqué une baisse significative du rapport androgènes/œstrogènes (noté R, figure 6.4), essentiellement chez les mâles, mais ont présenté des modes d'action différents. Dans le cas du bisphénol A, la tendance est, chez les mâles et dans tous les compartiments biologiques étudiés, à l'augmentation des niveaux d'œstrone (x 13 dans les testicules, x 4 dans le plasma et x 3 dans la bile) sans que les niveaux d'androgènes soient particulièrement affectés. Ceci suggère une possible induction de l'activité aromatasase qui serait dépendante du sexe, les individus femelles étant peu affectés par ce contaminant. Dans le cas du 4-nonylphénol, l'effet observé est radicalement différent. En effet, les poissons exposés à ce composé présentent une réduction drastique de la synthèse gonadique d'androgènes entraînant une chute de leurs niveaux plasmatiques et biliaires ; les composés les plus affectés sont l'androsténedione et la 11-cétotestostérone,

leurs concentrations étant divisées par un facteur supérieur ou égal à 10 suivant la matrice. Cette chute n'étant pas accompagnée d'une augmentation des niveaux des précurseurs de ces composés (progestérone et 17 α -hydroxyprogestérone par exemple), il semble plausible que la perturbation induite par le 4-nonylphénol concerne plutôt les enzymes intervenant « en aval » de la formation d'androsténone (figure 6.5).

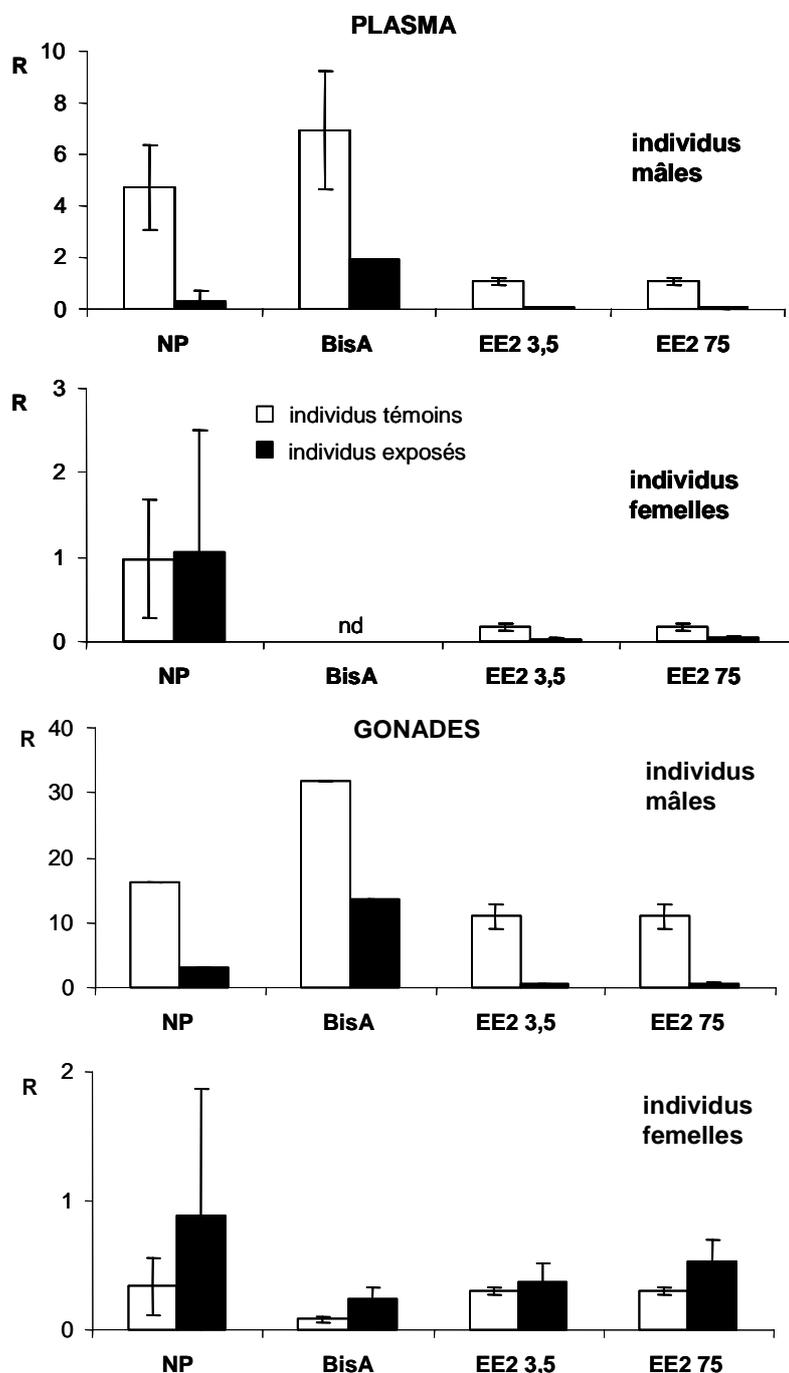


Figure 6.5. Impact de différents contaminants sur le rapport androgènes/œstrogènes (R) dans le plasma et les gonades de turbots juvéniles. NP : 4-nonylphénol ; BisA : bisphénol A ; EE2 3,5 : éthynylœstradiol 3,5 ng.L⁻¹ ; EE2 75 : éthynylœstradiol 75 ng.L⁻¹. Les histogrammes représentent les valeurs moyennes et les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%.

L'action du 4-nonylphénol pourrait ainsi résider dans une activation de l'activité 11 β -hydroxylase associée à une inhibition de l'activité 11 β -hydroxystéroïde déshydrogénase. Des réserves doivent cependant être émises par rapport à cette hypothèse car les niveaux de testostérone sont peu affectés par le 4-nonylphénol ; or, une augmentation de l'activité 11 β -hydroxylase tendrait à réduire les niveaux de testostérone, excepté en cas d'élévation de l'activité 17-hydroxystéroïde déshydrogénase (permettant la formation de testostérone à partir d'androsténedione). Une hypothèse alternative serait l'augmentation de l'activité UDPGT, catalysant la conjugaison des stéroïdes avec une molécule d'acide glucuronique, qui provoquerait une diminution des concentrations libres de certains stéroïdes.

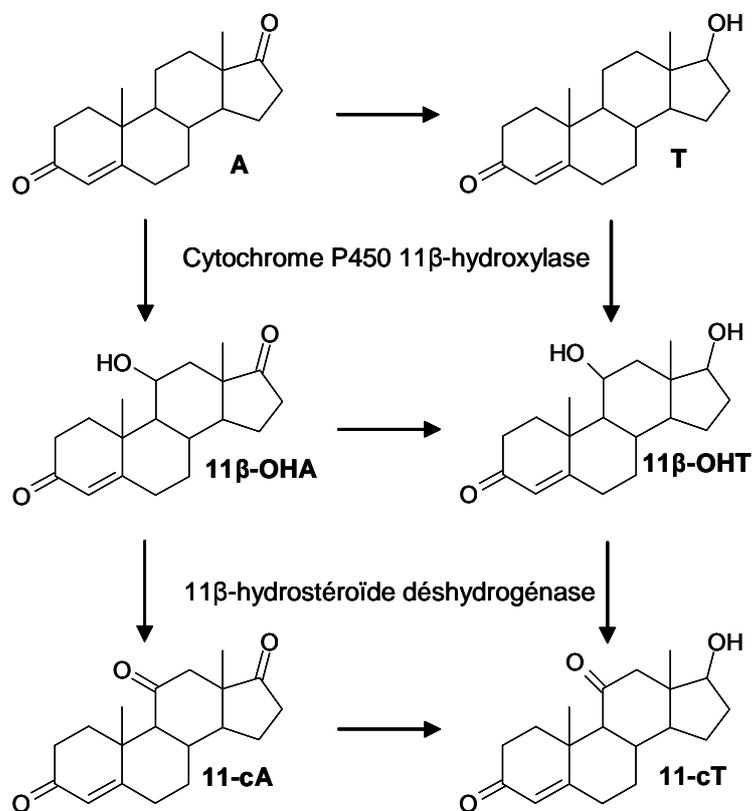


Figure 6.6. Synthèse de la 11-cétotestostérone (11-cT) à partir de l'androsténedione (A) (d'après Lokman et al., 2002). Abréviations : A : androsténedione ; T : testostérone ; 11 β -OHA : 11 β -hydroxyandrosténedione ; 11 β -OHT : 11 β -hydroxytestostérone ; 11-cA : 11-cétoandrosténedione ; 11-cT : 11-cétotestostérone.

Pour approfondir les différentes hypothèses formulées plus haut et mieux comprendre le mode d'action des xénoœstrogènes sur le système endocrinien des turbots, des juvéniles de *Psetta maxima* ont été exposés à un œstrogène de synthèse, le 17 α -éthynylœstradiol. Deux niveaux de contamination ont été retenus, l'un réaliste d'un point de vue environnemental (3,5

ng.L⁻¹), l'autre fixé beaucoup plus haut (75 ng.L⁻¹) et pouvant être considéré comme témoin positif au vu des données toxicologiques existantes. De nouvelles procédures analytiques ont été développées, afin de permettre le fractionnement entre formes conjuguées et formes libres présentes au sein d'un même échantillon (plasma, bile et gonades). En outre, la déhydroépiandrostérone, précurseur direct de l'androsténone, a été ajoutée à la liste des androgènes analysés.

Les résultats ont montré que le 17 α -éthynylœstradiol était lui aussi capable d'altérer la stéroïdogénèse chez le turbot juvénile, dès le niveau de 3,5 ng.L⁻¹. Les effets observés sur la fraction libre des stéroïdes sont similaires à ceux décrits précédemment chez les poissons exposés au 4-nonylphénol. L'amplitude de ces effets est cependant plus importante, puisque les niveaux plasmatiques (chez les mâles et les femelles) et testiculaires d'androsténone et de 11-cétotestostérone chutent sous la limite de détection chez tous les individus traités au 17 α -éthynylœstradiol (y compris ceux exposés à 3,5 ng.L⁻¹) (figure 6.6). L'effet observé sur la 11-cétotestostérone est en bon accord avec les résultats de MacLatchy et al. (2003) et Schultz et al. (2003) qui ont également mis en évidence une altération de la biosynthèse de la 11-cétotestostérone par le 17 α -éthynylœstradiol, sans toutefois pouvoir expliquer le mécanisme sous-jacent. De même que pour l'androsténone et la 11-cétotestostérone, les niveaux de testostérone sont également réduits chez les poissons exposés au 17 α -éthynylœstradiol, mais dans une moindre mesure. Inversement, les niveaux d'œstrogènes augmentent, mais de manière probablement non significative. Les effets observés sur la fraction conjuguée concernent essentiellement les œstrogènes et résident dans une élévation (x2) du rapport formes conjuguées / formes libres dans les testicules de mâles exposés à 75 ng.L⁻¹ de 17 α -éthynylœstradiol. Le métabolisme des androgènes n'est apparemment pas affecté par le 17 α -éthynylœstradiol, ce qui indique que la chute des niveaux d'androsténone et de 11-cétotestostérone dans la fraction libre n'est pas liée à une augmentation de l'activité de conjugaison, mais plutôt à une perturbation directe de la stéroïdogénèse.

Ces deux études ont donc démontré la capacité de différents perturbateurs endocriniens à moduler l'activité de certaines enzymes impliquées dans la stéroïdogénèse. Les procédures analytiques développées ont permis l'analyse des hormones stéroïdiennes dans trois matrices biologiques intervenant dans la stéroïdogénèse, ce qui a permis de mettre en évidence le fait que la production hormonale par les gonades était directement affectée par les xénohormones étudiées. Le dosage d'un nombre conséquent d'analytes a permis de proposer une ébauche de mécanisme pour l'action du bisphénol A, du 4-nonylphénol et du 17 α -éthynylœstradiol sur le système endocrinien du turbot juvénile. Par ailleurs, on pourra également retenir que les modifications du profil hormonal observées dans les testicules sont rapidement repercutées

sur le plasma, tandis que les dosages biliaires apparaissent plus difficiles à interpréter, probablement en raison de la variabilité de la composition de ce fluide.

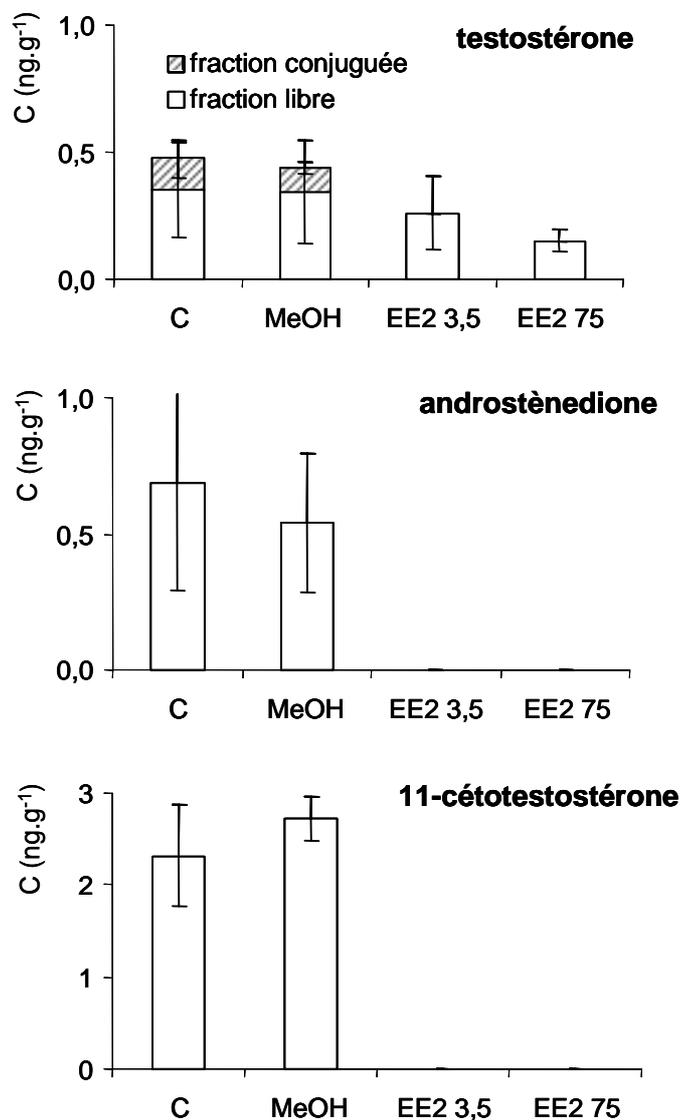


Figure 6.7. Effet du 17 α -éthynylœstradiol sur les niveaux moyens d'androgènes plasmatiques (libres et conjugués) chez le turbot mâle juvénile. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95% (n=3). Androstènedione et 11-cétotestostérone détectées seulement dans la fraction libre.

4. Suivi des variations saisonnières des profils hormonaux chez le flet

Les variations saisonnières des teneurs en stéroïdes endogènes ont été déterminées chez des flets provenant d'un site fortement impacté par les activités anthropiques, l'estuaire de la Seine, et chez des flets capturés dans un milieu relativement propre, l'estuaire du Ster, considéré comme site de référence dans le cadre du programme Seine-Aval.

L'échantillonnage a été réalisé sur un laps de temps de 16 mois comprenant deux périodes de reproduction.

Les résultats obtenus sur les flets de l'estuaire de la Seine indiquent une forte élévation, dans les mois précédant la ponte, des niveaux d'androgènes et d'œstrogènes, ainsi qu'une modification du rapport androgènes/œstrogènes, notamment dans les gonades. En revanche, aucune tendance claire n'a pu être mise en évidence pour les progestagènes entre les périodes de repos sexuel (mars à septembre) et celle de gamétogenèse (octobre à février). Des résultats similaires ont été obtenus pour les flets de l'estuaire du Ster ; globalement, aucune différence significative n'est observable entre les profils hormonaux des poissons provenant des estuaires de la Seine et du Ster.

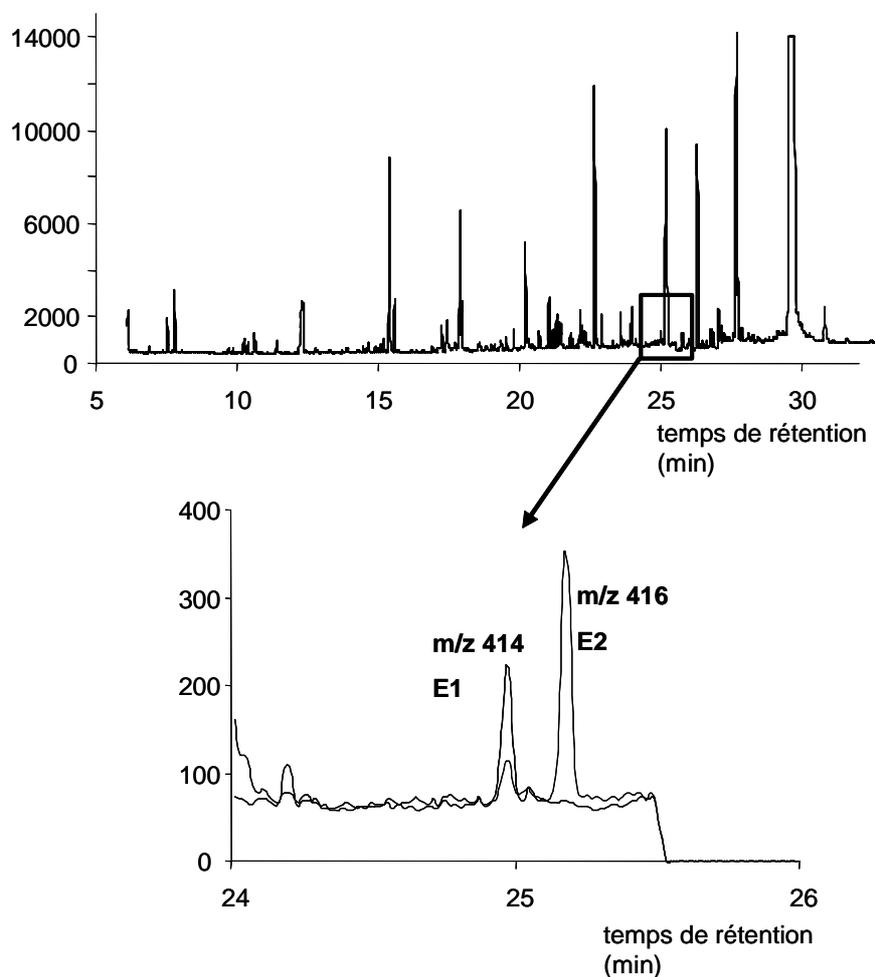


Figure 6.8. Chromatogramme d'un extrait de gonades de flet (individus femelles prélevés en juin 2003 sur le site de Lesconil). Agrandissement (en bas): présence d'œstrone (E1) et de 17 β -œstradiol (E2).

Les flets provenant de l'estuaire de la Seine ne présentent pas d'altération évidente de leur profil hormonal, bien qu'étant exposés de manière chronique à de nombreux contaminants dont l'action sur le système endocrinien des poissons est avérée. Les malformations testiculaires et l'induction de vitellogénine observées chez certains flets mâles de l'estuaire de la Seine sont donc peut-être liées directement à l'exposition à des xénoœstrogènes, plutôt qu'à un effet indirect des ces substances via une augmentation des niveaux d'œstrogènes endogènes (comme l'avait supposé Gallien, 2003). La portée des résultats obtenus dans le cadre de ce suivi doit cependant être relativisée, en raison du faible nombre d'individus échantillonnés et de la faible fréquence d'échantillonnage.

5. Suivi des variations saisonnières des profils hormonaux chez la moule *Mytilus sp.*

Les variations saisonnières des teneurs en stéroïdes endogènes dans la glande digestive de *Mytilus sp.* ont été déterminées sur une période deux ans, sur des individus provenant du bassin d'Arcachon (Site de la jetée de la Chapelle). Seuls deux stéroïdes hormonaux, la progestérone et la prégnénolone, ont pu être détectés dans les extraits de glandes digestives.

La progestérone présente des variations saisonnières similaires chez les mâles et les femelles (figure 6.8); les niveaux sont faibles la majeure partie de l'année (< limite de détection) et un pic survient généralement au printemps (entre avril et juin suivant l'année), alors que les gonades des mollusques sont dans une période d'activité maximale. Dans le Bassin d'Arcachon, la principale période de ponte a lieu au mois d'avril (Lubet, 1959). Les variations saisonnières des niveaux de progestérone semblent ainsi coïncider avec les différents stades du développement sexuel et pourraient donc être liées à la gamétogenèse chez *Mytilus sp.* Les pics de progestérone ont lieu environ deux mois plus tôt que chez les individus de *Mytilus edulis* prélevés par Reis-Henriques et al. (1990) dans la ria d'Aveiro (Nord du Portugal) ; ce décalage est peut-être dû à des différences dans le cycle sexuel liées à des facteurs externes (température de l'eau, abondance du phytoplancton...). Reis-Henriques et al. (1990) ont observé une corrélation entre les taux de progestérone et les différents stades du cycle reproducteur et ils ont suggéré que la progestérone pourrait jouer un rôle dans l'activité sexuelle de ces bivalves. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude semblent confirmer la possibilité d'utiliser la progestérone comme biomarqueur de perturbation endocrinienne, puisque sa production apparaît être liée au cycle reproducteur de *Mytilus sp.*

L'interprétation des variations saisonnières des niveaux de prégnénolone est moins aisée ; il semble cependant que les niveaux de prégnénolone présentent un pic dans les mois suivant la ponte, avec des profils relativement similaires chez les mâles et les femelles. Les autres stéroïdes recherchés, notamment les métabolites de la progestérone (17α -hydroxyprogestérone) et de la prégnénolone (17α -hydroxyprégnénolone), ainsi que la testostérone et le 17β -œstradiol n'ont jamais été détectés dans les extraits de glandes digestives, quel que soit le stade sexuel des individus prélevés.

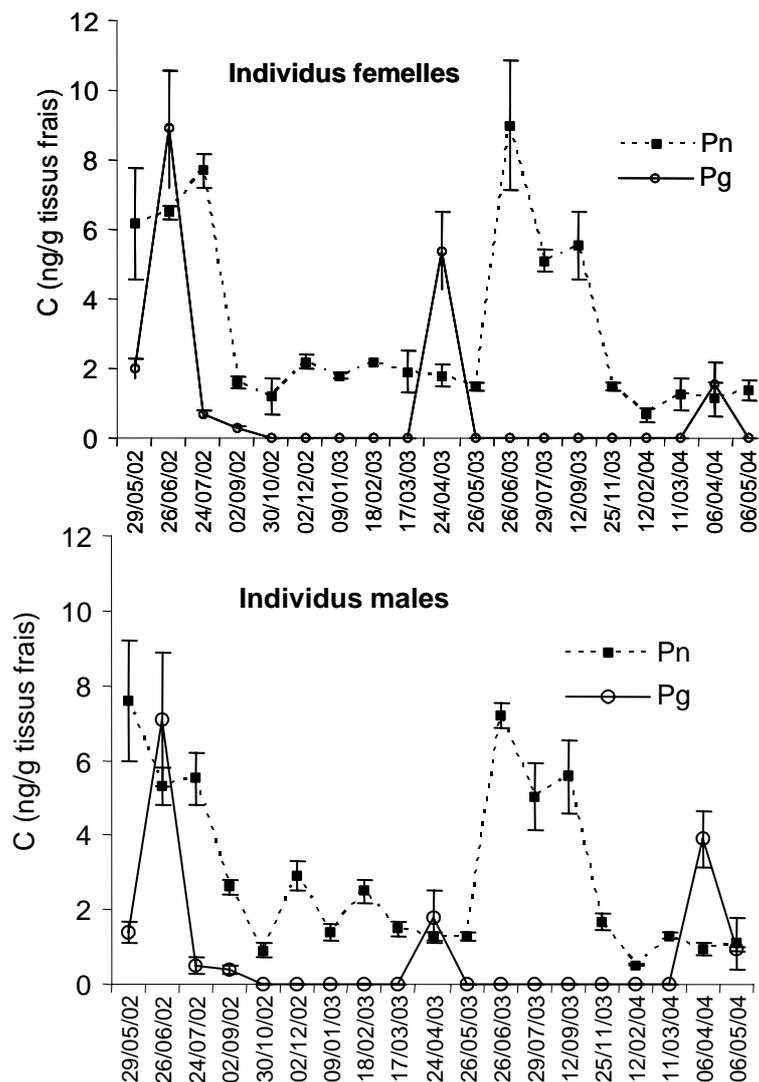


Figure 6.9. Variations saisonnières des taux moyen de progestérone (Pg) et de prégnénolone (Pn) dans la glande digestive de moules *Mytilus* sp, provenant de la jetée de la Chapelle, Arcachon (moyenne±écart-type).

Enfin, aucun lien n'a pu être établi entre taux de lipides et concentration en stéroïdes, alors que ce paramètre est lié à la gamétogenèse chez *Mytilus* sp. (Lubet, 1959). Ceci est peut-être dû au fait que le taux de lipides a été grossièrement estimé avec un protocole non sélectif (extraction au dichlorométhane) ; la mise en œuvre de méthodes plus spécifiques comme celles de Roesse-Gotlieb et Bligh et Dyer (Manirakiza et al., 2001) aurait peut-être permis d'affiner les résultats.

CONCLUSION GENERALE

L'objet initial de ces travaux de thèse était de développer des méthodes d'analyse des stéroïdes hormonaux dans diverses matrices d'intérêt environnemental. Le but était d'appliquer ensuite ces procédures analytiques à l'étude des stéroïdes hormonaux dans les systèmes aquatiques, en tant qu'hormones endogènes chez différents organismes ou en tant que contaminants issus du métabolisme hormonal humain, excrétés via l'urine et les excréments et introduits dans les milieux aquatiques essentiellement via les stations d'épuration.

Dans un premier temps, les travaux ont donc porté sur le développement de procédures permettant l'analyse quantitative, au sein des matrices étudiées, des analytes considérés. Ceux-ci étaient au nombre de 18, comprenant des androgènes, des œstrogènes et des progestagènes ; la plupart de ces composés étaient d'origine naturelle, mais certains analytes d'origine synthétique ont été inclus dans l'étude en raison de leur importance dans les traitements contraceptifs. L'optimisation des procédures analytiques, associant extraction sur phase solide et analyse par CG-SM, a permis d'obtenir des limites de détection compatibles avec les exigences requises pour l'analyse des hormones stéroïdiennes dans les matrices considérées, de l'ordre de $0,1 \text{ ng.g}^{-1}$ dans les échantillons biologiques et de 1 ng.L^{-1} dans les échantillons d'eau ou d'effluent de station d'épuration.

Concernant l'étude des stéroïdes endogènes chez les organismes aquatiques, les travaux se sont concentrés sur deux espèces de poissons, *Psetta maxima* et *Platichthys flesus*, ainsi que sur la moule commune *Mytilus sp.*

Dans le cas de *Psetta maxima*, le but de l'étude était d'évaluer l'impact de divers contaminants sur la stéroïdogénèse chez des individus sexuellement immatures (exposés en conditions contrôlées). Seuls le 4-nonylphénol (NP) et le bisphénol A (BA) ont démontré une aptitude à perturber, chez le turbot juvénile, le système enzymatique intervenant dans la stéroïdogénèse: chute de la synthèse d'androgènes dans le cas du NP, augmentation des niveaux d'œstrogènes dans le cas du BA. Ces études ont, pour la première fois, montré que la biosynthèse de l'androstènedione était considérablement affectée par l'exposition au NP. Ce

stéroïde, précurseur de deux autres androgènes importants chez les poissons (testostérone et 11-cétotestostérone), n'est généralement pas considéré dans les études écotoxicologiques, sans doute en raison d'un potentiel androgénique plus faible que celui de la testostérone ou de la 11-cétotestostérone.

Afin d'approfondir le mécanisme de perturbation de la stéroïdogénèse par les xénoœstrogènes, des turbots juvéniles ont été exposés au 17 α -éthynylœstradiol (EE2), puissant œstrogène de synthèse. Les effets dus à ce composé sont similaires à ceux observés pour le NP, à savoir une altération de la biosynthèse des androgènes, notamment celle de l'androstènedione et de la 11-cétotestostérone. Inversement, la conjugaison des androgènes apparaît faiblement perturbée par le 17 α -éthynylœstradiol, suggérant que les enzymes intervenant dans le métabolisme de phase II sont peu affectées par ce xénoœstrogène. Globalement, NP, BA et EE2 apparaissent capables d'altérer la biosynthèse gonadique des stéroïdes, ainsi que les niveaux plasmatiques de ces hormones, sans toutefois perturber de manière significative leur métabolisme et leur excrétion.

Les variations saisonnières des taux plasmatiques et gonadiques de stéroïdes ont été déterminées chez deux organismes fréquemment employés comme sentinelles en écotoxicologie, le flet *Platichthys flesus* et la moule *Mytilus sp.* Dans le cas des flets, des profils hormonaux "classiques" ont été observés, avec une forte augmentation des niveaux généraux de stéroïdes dans la période précédant la ponte. La faiblesse des effectifs échantillonnés n'a cependant pas permis de mettre en évidence une différence entre les deux sites étudiés : l'estuaire de la Seine, fortement contaminé par les micropolluants organiques, et l'estuaire du Ster, considéré comme référence dans le cadre du Programme Seine-Aval. Dans le cas des moules *Mytilus sp.* prélevées dans le bassin d'Arcachon, les variations des taux de progestérone - et de son précurseur, la prègnénone - semblaient étroitement liées au cycle reproductif de ce bivalve marin. Dès lors, il apparaît possible d'utiliser ces deux stéroïdes comme biomarqueurs de perturbation endocrinienne chez *Mytilus sp.*

La présence de stéroïdes hormonaux dans les effluents de stations d'épuration déversés dans l'estuaire de la Seine, et dans le fleuve lui-même a été étudiée pour la première fois dans le cadre de ces travaux. Dans certains effluents, des œstrogènes naturels - œstrone le plus fréquemment - ont pu être détectés à plusieurs reprises à des niveaux de l'ordre du ng.L⁻¹. Une dilution importante explique pourquoi les analytes détectés dans les effluents ne l'ont jamais été dans les eaux de surface de l'estuaire. Ce dernier apparaît donc très faiblement contaminé par les stéroïdes hormonaux, sans qu'il soit toutefois possible de conclure quant à un éventuel risque écotoxicologique lié à ces seules substances. En effet, les limites de

détection obtenues pour certains analytes sont supérieures aux concentrations effectrices des composés individuels ; en outre, les effets des hormones stéroïdiennes étant additifs, le risque présenté par ces substances au niveau de l'estuaire de la Seine ne peut être évalué avec certitude.

Le devenir des stéroïdes hormonaux après leur introduction dans des eaux surface a été déterminé dans la Jalle d'Eysines. Ce cours d'eau a été retenu comme site d'étude en raison des niveaux d'œstrogènes naturels relativement élevés détectés dans l'effluent de la station d'épuration d'Eysines rejeté directement dans la rivière (jusqu'à 80 ng.L⁻¹ d'œstrone dans la phase dissoute de l'effluent). En conditions estivales, la disparition des œstrogènes est rapide en aval du rejet, 50% de la quantité introduite via l'effluent disparaissant sur une distance inférieure à 1,5 km; cette chute n'est pas due aux phénomènes d'adsorption sur la phase particulaire, mais semble plutôt liée à la dégradation bactérienne et, de manière moins certaine, à la photodoxydation. En conditions hivernales, période où l'activité bactérienne dans la rivière est minimale, la concentration en œstrone ne diminue pas de manière significative, même 10 km en aval du rejet. Ces résultats partiels constituent un premier jeu de données sur la variabilité saisonnière de la dégradation des stéroïdes hormonaux dans des eaux de surface (*in situ*).

Des études supplémentaires permettraient bien évidemment de compléter les résultats obtenus dans le cadre de ces travaux de thèse.

En ce qui concerne la perturbation de stéroïdogénèse chez les poissons par les xénoœstrogènes, il s'agirait de s'intéresser à un plus grand nombre de stéroïdes, notamment aux métabolites de l'androstènedione et de la testostérone hydroxylés en position 11, qui sont des intermédiaires dans la biosynthèse de la 11-cétotestostérone. Ceci permettrait d'infirmer ou de confirmer les hypothèses formulées au sujet du mode d'action de certains xénoœstrogènes (4-nonylphénol et 17 α -éthynylœstradiol) sur la biosynthèse des androgènes. Des dosages réalisés par des méthodes immunologiques (RIA ou ELISA) permettraient de procéder à des dosages individuels, apportant ainsi des informations sur la variabilité inter-individuelles au niveau de l'altération de la stéroïdogénèse. En outre, des études structure/activité menées en parallèle pourraient permettre de mieux comprendre le mode d'action des différents xénoœstrogènes.

L'exposition de moules à divers perturbateurs endocriniens reconnus en tant que tels (en milieu contrôlé) permettrait de valider l'utilisation de la progestérone et, éventuellement, celle de la prégnénone comme biomarqueurs de perturbation endocrinienne. Des études histologiques devraient impérativement être alors réalisées en parallèle aux dosages

hormonaux afin de pouvoir corrélérer effet sur le profil hormonal et effet sur la gamétogenèse. En outre, le recours à des techniques analytiques plus sensibles et plus spécifiques que la CG-SM (CG-SM/SM par exemple) permettrait probablement de détecter d'autres stéroïdes chez ce bivalve.

Afin d'approfondir la biogéochimie des hormones stéroïdiennes, on pourrait envisager d'élucider de manière complète les voies de dégradation des œstrogènes dans les eaux de surface, en ajoutant à la liste des analytes des métabolites du 17β -œstradiol et de l'œstrone, tels le 16-céto- 17β -œstradiol, la 16β -hydroxyœstrone, la 2-hydroxyœstrone... Il serait bien sûr indispensable de s'intéresser alors également à l'aspect cinétique de ces processus, en évaluant l'importance de différents paramètres physico-chimiques (pH, température, complexation par les substances humiques...). En outre, de nombreuses algues jouant un rôle majeur dans le cycle biogéochimique des micropolluants organiques, il pourrait être intéressant de réaliser des tests d'accumulation et de dégradation avec, par exemple, *Chlorella vulgaris*, communément employée dans ce type de démarche. Les métabolites seraient identifiés, quantifiés et, éventuellement, le potentiel œstrogénique des produits formés serait évalué au moyen de tests in vitro (MCF7 par exemple). Enfin, de même que pour les études réalisées sur *Mytilus sp.*, le développement de procédures d'identification et de quantification par une autre technique analytique (CG-SM/SM, par exemple) permettrait, sans aucun doute, d'abaisser les limites de détection des stéroïdes dans des matrices aussi complexes que les effluents de station d'épuration. Ceci permettrait d'améliorer l'évaluation du risque écotoxicologique lié à la présence de stéroïdes hormonaux dans les systèmes aquatiques, conformément aux recommandations du rapport LOES (Vethaak et al., 2002), qui préconise l'obtention de limites de détection inférieures à $0,1 \text{ ng.L}^{-1}$.

BIBLIOGRAPHIE

Aerni HR, Kobler B, Rutishauser BV, Wettstein FE, Fischer R, Giger W, Hungerbühler A, Marazuela MD, Peter A, Schönenberger R, Vögeli AC, Suter MJF, Eggen RIL. 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 : 688-696.

Andersen H, Siegrist H, Halling-Sørensen et Ternes T. 2004. Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. *Environmental Science and Technology*, sous presse.

Anderson MJ, Miller MR, Hinton DE. 1996. In vitro modulation of 17 β -estradiol induced vitellogenin synthesis : effects of cytochrome P4501A1 inducing compounds on rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) liver cells. *Aquatic Toxicology* 34 : 327-350.

Arcand-Hoy LD, Benson WH. 1988. Fish reproduction : an ecologically relevant indicator of endocrine disruption. *Environmental toxicology and Chemistry* 17 : 49-57.

Arukwe A, Förlin L, Goksøyr A. 1997. Xenobiotic and steroid biotransformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environmental toxicology and Chemistry* 16 : 2576-2583.

Baker ME. 2004. Co-evolution of steroidogenic and steroid-inactivating enzymes and adrenal and sex steroid receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 215 : 55-62.

Baroiller JF, Guiguen Y, Fostier A. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Science*. 55 : 910-931.

Baronti C, Curini R, D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Samperi R. 2000. Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water. *Environmental Science and Technology* 34 : 5059-5066.

Bolt HM. 1979. Metabolism of estrogens – natural and synthetic. *Pharmacology and Therapeutics* 4 : 155-181.

Borg B. Androgens in teleost fishes. 1994. *Comparative Biochemistry and Physiology* 109C : 219-245.

Casey FXM, Larsen GL, Hakk H, Simunek J. 2003. Fate and transport of 17 β -estradiol in soil-water systems. *Environmental Science and Technology* 37 : 2400-2409.

Celius, T, Haugen TB, Grotmol T, Walther BT. 1999. A sensitive zonagenetic assay for rapid in vitro assessment of estrogenic potency of xenobiotics and mycotoxins. *Environmental Health Perspectives* 107 : 63-68.

Cheek AO, Vonier E, Oberdorster E, Burow BC, McLachlan JA, Brouwer M. 2001. Experimental evaluation of vitellogenin as a predictive evaluation for reproductive endocrine disruption. *Environmental Health perspectives* 109 : 681-690.

Christiansen LB, Pedersen KL, Korsgaard B, Bjerregaard P. 1998. Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) using in vivo synthesis of vitellogenin as a biomarker. *Marine Environmental Research* 46 : 137-140.

Colucci MS, Topp E. 2001. Dissipation of part per trillion concentrations of estrogenic hormones from agricultural soils. *Canadian Journal of Soil Science* 82 : 335-340.

Comprehend report, <http://europa.eu.int/comm/research/endocrine/pdf/env4-ct98-0798.pdf>

Cooper RL, Goldman JM, Stoker TE. 1999. Neuroendocrine and reproductive effects of contemporary-use pesticides. *Environmental Health perspectives* 104 : 615-617.

Crisp TM, Cregg ED, Cooper RL, Anderson DG, Baetcke KP, Hoffman JL, Morrow MS, Rodier DJ, Schaeffer JE, Touart LW, Zeeman MG, Patel YM. 1998. Special report on environmental endocrine disruption : an effects assessment and analysis. US EPA/630/R-96/012, pp 1-120.

D'Ascenzo G, Di Corcia A, Gentili A, Mancini R, Mastropasqua R, Nazzari M, Samperi R. 2002. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *The Science of the Total Environment* 302 : 199-209.

De Fur PL, Crane M, Ingersoll C, Tattersfield L (éditeurs). 1999. Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing and assessment. Workshop on Endocrine disruption in invertebrates: endocrinology, testing and assessment. Noordwijkerhout, Pays-Bas, 12-15 décembre 1998. Publié par "The Society of Environmental Toxicology and Chemistry" (SETAC), Pensacola, Florida, USA.

De Longcamp D, Lubet P, Drodowsky M. 1974. The in vitro biosynthesis of steroids by the gonad of the mussel (*Mytilus edulis*). *General and Comparative Endocrinology* 22 : 116-127.

Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP, Waldock M. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science and Technology* 32 : 1549-1558.

Devier M-H. 2003. Etude intégrée sur l'impact des différentes classes de contaminants (composés organostanniques, métaux, HAP, PCB) sur les moules. Bioaccumulation et réponses biochimiques. Thèse de doctorat, Université Bordeaux I, 345 p.

Devlin RH, Nagahama Y. 2002. Sex differentiation in fish: an overview. *Aquaculture* 208 : 191-364.

Folmar LC, Denslow ND, Rao V, Chow M, Crain DA, Enblom J, Marcino J, Guillette LJ. 1996. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environmental Health Perspectives* 104 : 1096-1101.

Gagné F, Blaise C, Salazar M, Salazar S, Hansen PD. 2001. Evaluation of estrogenic effects of municipal effluents to the freshwater mussel *Elliptio coplanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 128C : 213-225.

Gagné F, Blaise C, Pellerin J, Pelletier E, Douville M, Gauthier-Clerc S, Viglino L. 2003. Sex alteration in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in an intertidal zone of the Saint Lawrence River (Québec, Canada). *Comparative Biochemistry and Physiology* 134C : 189–198.

Gale WL, Patiño R, Maule AG. 2004. Interaction of xenobiotics with estrogen receptors α and β and a putative plasma sex hormone-binding globulin from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *General and Comparative Endocrinology* 136 : 338-345.

Gallien-Landriau I. 2003. Etude de l'altération fonctionnelle du système reproducteur par les perturbateurs endocriniens. Thèse de doctorat, Université du havre, 150 p.

Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Blaise C, Gagné F. 2002. Delayed gametogenesis of *Mya arenaria* in the Saguenay fjord (Canada) : a consequence of endocrine disruptors? *Comparative Biochemistry and Physiology* 131C : 457–467.

Ghosh S, Thomas P. 1995. Antagonistic effects of xenobiotics on steroid-induced final maturation of Atlantic croaker oocytes in vitro. *Marine Environmental Research* 39 : 159-163.

Giesy JP, Pierens SL, Snyder EM, Miles-Richardson SM, Kramer VJ, Snyder SA, Nichols KM, Villeuve DA. 2000. Effects of 4-nonylphenol exposure on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 : 68-87.

Gimeno S, Komen H, Venderbosch PWM, Bowmer T. 1997. Disruption of sexual differentiation in genetic male common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to an alkylphenol during different life stages. *Environmental Science and Technology* 31 : 2884-2890.

Gray MA, Metcalfe CD. 1997. Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 : 1082-1086.

Hanioka N, Jinno H, Tanaka-Kagawa T, Nishimura T, Ando M. 2000. Interaction of bisphenol A with rat hepatic cytochrome P450 enzymes. *Chemosphere* 41 : 973-978.

Hanselman TA, Graetz DA, Wilkie C. 2003. Manure-borne estrogens as potential environmental contaminants : a review. *Environmental Science and Technology* 37 : 5471-5478.

Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Mathiessen P, Neall P, Tylor T, Zaman N. 1997. Estrogenic activity in five UK rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 : 534-542.

Harris CA, Sumpter JP. 2001. The endocrine disrupting potential of phtalates. In Metzler M, ed, *Endocrine disruptors*, Vol 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Allemagne.

Hashimoto S, Bessho H, Hara A, nakamura M, Iguchi T, Fujita K. 2000. Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild male flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environmental Research* 49 : 37-53.

Hemmer MJ, Hemmer BL, Bowman CJ, Kroll KJ, Folmar LC, Marcovich D, Hoglund MD, Denslow ND. 2001. Effects of p-nonylphenol, methoxychlor and endosulfan on vitellogenin

induction and expression in sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 : 336-343.

Hobe G, Schön, Goncharov N, Katsiya G, Koryakin M, Gesson-Cholat I, Oettel M, Zimmermann H. 2002. Some new aspects of 17 α -estradiol in man. *Steroids* 67 : 883-893.

Holthaus KIE, Johnson AC, Jürgens MD, Williams RJ, Smith JJJ, Carter JE. 2002. The potential for estradiol and ethynylestradiol to sorb onto suspended and bed sediments in some English rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 : 2526-2535.

Illanes J. 1979. Recherches cytologiques et expérimentales sur la neurosécrétion chez la moule (*Mytilus edulis*, L.). Thèse de doctorat de 3^{ème} cycle, Caen, 134p.

Janssen PAH, Lambert JGD, Vethaak AD, Goos HJT. 1997. Environmental pollution caused elevated concentrations of estradiol and vitellogenin in the female flounder, *Platichthys flesus*. *Aquatic Toxicology* 39 : 195-214.

Jenkins R, Angus RA, McNatt H, Howell WM, Kemppainen JA, Kirk M, Wilson EM. 2001. Identification of androstenedione in a river containing paper mill effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 : 1325-1331.

Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P, Sumpter JP. 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15 : 194-202.

Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology* 32 : 2498-2506.

Jobling S, Beresford N, Nolan M, Rodgers-Gray T, Brighty GC, Sumpter JP, Tyler CR. 2002. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluent. *Biology of Reproduction* 66 : 272-281.

Johnson LL, Landhal JT, Kubin LA, Horness MH, Myers MS, Colliet TK, Stein JEU. 1998. Assessing the effects of anthropogenic stressors on Puget Sound flatfish population. *Journal of Sea Research* 39 : 125-137.

Johnson AC, Williams RJ. 2004. A model to estimate influent and effluent concentrations of estradiol, estrone and ethinylestradiol at sewage treatment works. *Environmental Science and Technology*, sous presse.

Jürgens MD, Holthaus KIE, Johnson AC, Smith JJJ, Hetheridge M, Williams RJ. 2002. The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in English rivers. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 : 480-488.

Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Earl Gray L, Kempainen JA, Wilson EM. 1995. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375 : 581-585.

Kinnberg K, Toft G. 2003. Effects of estrogenic and antiandrogenic compounds on the testis structure of the adult guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54 : 16-24.

Kleinkauf A, Scott AP, Stewart C, Simpson MG, Leath RT. 2004. Abnormally elevated VTG concentrations in flounder (*Platichthys flesus*) from the Mersey Estuary (UK) – a continuing problem. *Ecotoxicological and Environmental Safety*, sous presse.

Körner W, Spengler P, Bolz U, Schuller W, Hanf V, Metzger JW. 2001. Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 : 2142-2151.

Larrea F, Garcia-Becerra R, Lemus AE, Garcia GA, Perez-Palacios G, Jackson KJ, Coleman KM, Dazce R, Smith CL, Cooney AJ. 2001. A-ring reduced metabolites of 19-nor synthetic progestins as subtype selective agonist for ER α . *Endocrinology* 142 : 3791-3799.

Larsson DGJ, Adolfsson-Erici M, Parkkonen J, Berg AH, Olsson PE, Förlin L, Ethinylestradiol – an undesired fish contraceptive? 1999. *Aquatic Toxicology* 45 : 91-97.

Lavado R, Thibault R, Raldúa D, Martín R, Porte C. 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196 : 247-257.

Le Curieux-Belfond O, Moslemi S, Mathieu M, Seralini GE. 2001. Androgen metabolism in oyster *Crassostrea gigas* : evidence for 17 β -HSD activities and characterisation of an

aromatase-like activity inhibited by pharmacological compounds and a marine pollutant. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 78 : 359-366.

Legler J, Jonas A, Lahr J, Vethaak AD, Brouwer A, Murk AJ. 2000. Biological measurements of estrogenic activity in urine and bile conjugates with the in vitro ER-Calux reporter gene assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 : 473-479.

Lindholst C, Pedersen SN, Bjerregaard P. 2001. Uptake, metabolism and excretion of bisphenol A in the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 55 : 75-84.

Lintelmann J, Katayama A, Kurihara N, Shore L, Wenzel A. 2003. Endocrine disruptors in the environment. *Pure and Applied Chemistry* 75 : 631-681.

Lister AL, Van der Kraak GJ. 2001. Endocrine disruption : why is it so complicated? *Water Quality Research Journal of Canada* 36 : 175-190.

Lokman PM, Harris B, Kusakabe M, Kime DE, Schulz RW, Adachi S, Young G. 2002. 11-Oxygenated androgens in female teleosts : prevalence, abundance, and life history implications. *General and Comparative Endocrinology* 129 : 1–12.

López de Alda MJ, Barceló D. 2001. Use of solid-phase extraction in various of its modalities for sample preparation in the determination of estrogens and progestogens in sediment and water. *Journal of Chromatography A* 938 : 145-153.

Lubet P. 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission de gamètes chez les Mytilidés et les Pectinidés (mollusques bivalves). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* 23 : 387-548.

Lubet P, Mathieu M. 1999. Applications à la conchyliculture des récentes acquisitions sur la biologie des mollusques bivalves. *Année Biologique* 38 : 27-50.

Luconi M, Forti G, Baldi E. 2002. Genomic and non genomic effects of estrogens : molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 80 : 369-381.

Lye CM, Frid CLJ, Gill ME, McCormick D. 1997. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Marine Pollution Bulletin* 34 : 34-41.

MacDonald KK, Gross TS, Denslow ND, Blazer VS. 2000. Reproductive indicators. In Schmitt, C. J. and G. M. Dethloff eds. *Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) Program : selected methods for monitoring chemical contaminants and their effects in aquatic ecosystems*. U.S. Geological Survey, Biological Resources Division, Columbia, (MO) : Information and Technology Report USGS/BRD-2000-0005. 81 pp.

MacLatchy DL, Courtenay SC, Rice CD, Van der Kraak GJ. 2003. Development of a short-term reproductive bioassay using steroid hormone metabolism and vitellogenin end points in the estuarine mummichog (*Fundulus heteroclitus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 : 996-1008.

MacMaster ME, Van der Kraak GJ, Munkittrick KR. 1995. Exposure to bleached kraft pulp mill effluent reduces the steroid biosynthetic capacity of white sucker ovarian follicles. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112C : 169-178.

MacMaster ME, Van der Kraak GJ, Munkittrick KR. 1996. An epidemiological evaluation of the biochemical basis for steroid hormonal depressions in fish exposed to industrial wastes. *Journal of Great Lakes Research* 22 : 153-171.

Manirakiza P., Covaci A., Schepens P. 2001. Comparative study on total lipid determination using soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis* 14 : 93-100.

Marin MG, Matozzo V. 2004. Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. *Marine Pollution Bulletin* 48 : 835-839.

Matthiessen P, Allen Y, Bamber S, Craft J, Hurst M, Hutchinson T, Feist S, Katsiadaki I, Kirby M, Robinson C, Robinson C, Scott S, Thain J, Thomas K. 2002. The impact of oestrogenic and androgenic contamination on marine organisms in the United Kingdom – summary of the EDMAR programme. *Endocrine Disruption in the Marine Environment. Marine Environmental Research* 54 : 645–649.

Matozzo V, Marin MG. 2004. Can 4-nonylphenol induce vitellogenin-like proteins in the clam

Tapes philippinarum, *Environmental Research*, sous presse.

Markey CM, Michaelson CM, Sonnenschein C, Soto AM. 2001. Alkylphenols and bisphenol A as environmental estrogens. In Metzler M, ed, *Endocrine disruptors*, Vol 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Allemagne.

Martín R, Lavado R, Porte C. 2004. Co-occurrence of alkylphenols in the bile of carps (*Cyprinus carpio*) from the Ebro River with some biochemical indices of endocrine function. *Environmental Toxicology and Chemistry*, sous presse.

Mathiessen P, Allen YT, Allchin CR, Feist SW, Kirby MF, Law RJ, Scott AP, Thain JE, Thomas KV. 1998. Oestrogenic endocrine disruption in flounder (*Platyichthys flesus*) from UK estuaries and marine waters. In Science series, technical report, Vol 107. CEFAS. 48 pp.

Matsumoto T, Osada M, Osawa Y, Mori K. 1997. Gonadal estrogen profile and immunohistochemical localisation of steroidogenic enzymes in the oyster and scallop during sexual maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology* 118B : 811-817.

Mellanen P, Petanen T, Lehtimaki J, Makela S, Bylund G, Holmbolm B, Mannila E, Oikari A, Santti R. 1996. Wood-derived estrogens : studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout. *Toxicology and Applied Pharmacology* 136 : 381-388.

Mendes JJA. 2002. The endocrine disrupters: a major medical challenge. *Food Chemistry and Toxicology* 40: 781-788.

Metcalfe CD, Metcalfe TL, Kiparissis Y, Koenig BG, Khan C, Hughes RJ, Croley TR, March RE, Potter T. 2001. Estrogenic potency of chemicals detected in sewage treatment plant effluents as determined by in vivo assays with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 : 297-308.

Metzler M, Pfeiffer E. 2001. Chemistry of natural and anthropogenic endocrine active compounds. In Metzler M, ed, *Endocrine disruptors*, Vol 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Allemagne.

Minier C, Caltot G, Leboulanger F, Hill EM. 2000a. An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex regions. *Analisis*. 28 : 801-805.

Minier C, Levy F, Rabel D, Bocquené G, Godefroy D, Burgeot T, Leboulanger F. 2000b. Flounder health status in the Seine Bay : a multibiomarker study. *Marine Environmental Research* 50 : 373-377.

Monteiro PRR, Reis-Henriques MA, Coimbra J. 2000a. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus*). *Aquatic Toxicology* 48 : 549-559.

Monteiro PRR, Reis-Henriques MA, Coimbra J. 2000b. Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 49 : 453-467.

Morcillo Y, Albalat A, Porte C. 1999. Mussels as sentinels of organotin pollution : bioaccumulation and effects on P450-mediated aromatase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 : 1203-1208.

Mueller SO. 2004. Xenoestrogens : mechanism of action and detection methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 : 582-587.

Neal C, Fox KK, Harrow M, Neal M. 1998. Boron in the major UK rivers entering the North Sea. *The Science of the Total Environment* 210/211: 41-52.

Noaksson E, Linderöth M, Bosveld ATC, Norrgren L, Zebühr Y, Balk L. 2003. Endocrine disruption in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed to leachate from a public refuse dump. *The Science of the Total Environment* 305: 87: 103.

Noaksson E, Gustavsson B, Linderöth M, Zebühr Y, Broman D, Balk L. 2004. Gonad development and plasma steroid profiles by HRGC/HRMS during one reproductive cycle in reference and leachate-exposed female perch (*Perca fluviatilis*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 195: 247-261.

Okuzawa K. 2002. Puberty in teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry* 26 : 31-41.

Orlando EF, Guillette LJ. 2001. Developmental and reproductive abnormalities associated with endocrine disruption. In Metzler M, éditeur, Endocrine disruptors, Vol 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Allemagne.

Pait AS, Nelson JO. 2002. Endocrine disruption in fish : an assessment of recent research and results. NOAA Tech. Memo. NOS NCCOS CCMA 149. Silver Spring, MD : NOAA, NOS, Center for Coastal Monitoring and assessment, 55pp.

Petrovic M, Solé M, Lopez de Alda MJ, Barceló D. 2002. Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving waters and sediments: integration of chemical analysis and biological effects on feral carps. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 2146-2156.

Piferrer F. 2001. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. *Aquaculture* 197 : 229-281.

Pillière F. 2002. Perturbateurs endocriniens et effets toxiques. INRS *Documents pour le Médecin du Travail* 92 : 377- 381.

Purdom CE, Hardiman PA, Bye VJ, Eno NC, Tyler CR, Sumpter JP. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemistry and Ecology* 8 : 275-285.

Quinn B, Gagné F, Costello M, MacKenzie C, Wilson J, Mothershill C. 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology* 66 : 279-292.

Ranney RE. 1977. Comparative metabolism of 17-ethynyl steroids used in oral contraceptives. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 3 : 139-166.

Redding JM, Patino R. 1993. Reproductive physiology. In Evans EH, éditeur, *The Physiology of fishes*, CRC Press. Boca Raton, USA.

Reis-Henriques MA, Le Guellec D, Rémy-Martin JP, Adessi GL. 1990a. Studies of endogenous steroids from the marine mollusc *Mytilus edulis* by gas chromatography and mass spectrometry. *Comparative Biochemistry and Physiology* 95B: 303-309.

Reis-Henriques MA, Coimbra J. 1990b. Variations in the levels of progesterone in *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology* 95A: 343-348.

Rinchard J, Dabrowski K, Ottobre J. 2001. Sex steroids in plasma of Lake whitefish *Coregonus clupeaformis* during spawning in Lake Erie. *Comparative Biochemistry and Physiology* 129C: 65-74.

Robinson CD, Brown E, Craft JA, Davies IM, Moffat F, Pirie D, Robertson F, Stagg RM, Struthers S. 2003. Effects of sewage effluent and ethynylestradiol upon molecular markers of the estrogenic exposure, maturation and reproductive success in the sand goby (*Pomatoschistus minutus*). *Aquatic Toxicology* 62: 119-134.

Rodgers-Gray T, Jobling S, Kelly C, Morris S, Brighty G, Waldock MJ, Sumpter JP, Tyler CR. 2001. Exposure of juvenile roach (*Rutilus rutilus*) to treated sewage effluent induces dose-dependent and persistent disruption in gonadal duct development. *Environmental Science and Technology* 35 : 462-470.

Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M, Sumpter JP. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science and Technology* 32 : 1559-1565.

Ruby SM, Hull SMR, Anderson P. 2000. Sublethal lead affects pituitary functions of rainbow trout during exogenous vitellogenesis. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38 : 46-51.

Sanderson JT, Letcher RJ, HeneweerM, Giesy JP, Van den Berg M. 2001. Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes. *Environmental Health Perspectives* 109: 1027-1031.

Santodonato J. 1997. Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons : relationship to carcinogenicity. *Chemosphere* 34 : 835-848.

Schlenck D, Stresser DM, Rimoldi J, Arcand L, McCants J, Nimrod AC, Benson WH. 1998. Biotransformation and estrogenic activity of methoxychlor and its metabolites in Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*). *Marine Environmental Research* 46 : 159-162.

Scholz S, Gutzeit HO. 2000. 17 α -ethynylestradiol affects reproduction, sexual differentiation and aromatase gene expression of the medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 50: 363-373.

Schultz IR, Skillman A, Nicolas JM, Cyr DG, Nagler JJ. 2003. Short-term exposure to 17 α -ethynylestradiol decreases the fertility of sexually maturing male rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22: 1272-1280.

Schulz RW, Miura T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiology and Biochemistry* 26 : 43-56.

Schwaiger J, Mallow U, Ferling H, Knoerr S, Braunbeck Th, Kalbfus W, Negele RD. 2002. How estrogenic is nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) as a test organism. *Aquatic Toxicology* 59: 177-189.

Scott AP, Sumpter JP, Hardiman PA. 1983. Hormone change during ovulation in the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *General and Comparative Endocrinology* 49: 128-134.

Shi J, Fujisawa S, Nakai S, Hosomi M. 2004. Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidising bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Water Research* 38 : 2323-2330.

Siah A, Pellerin J, Benosman A, Gagné JP, Amiard J-C. 2002. Seasonal gonad progesterone pattern in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 132A : 499-511.

Siah A, Pellerin J, Amiard J-C, Pelletier E, Viglino L. 2003. Delayed gametogenesis and progesterone levels in soft-shell clams (*Mya arenaria*) in relation to in situ contamination to organotins and heavy metals in the St. Lawrence River (Canada). *Comparative Biochemistry and Physiology* 135C : 145–156.

Sohoni P, Sumpter JP. 1998. Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology* 158 : 327-339.

Sohoni P, Tyler CR, Hurd K, Caunter J, Hetheridge M, Williams T, Woods C, Evans M, Toy R, Gargas M, Sumpter JP. 2001. Reproductive effects of long-term exposure to bisphenol-A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental science and Technology* 35 : 3620-3625.

Solé M, Porte C et Barceló D. 2000a. Vitellogenin induction and other biochemical responses in carp (*Cyprinus carpio*) after experimental injection with 17 α -ethynylestradiol. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38 : 494-500.

Solé M, Castillo M, Lopez de Alda MJ, Porte C, Barceló. 2000b. Estrogenicity determination in carp (*Cyprinus carpio*) : a laboratory and field approach. *Analisis* 28 : 783-788.

Solé M, Raldua D, Barceló D, Porte C. 2003a. Long-term exposure effects in vitellogenin, sex hormones and biotransformation enzymes in females carps in relation to a sewage treatment works. *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

Solé M, Raldua D, Piferrer F, Barceló D, Porte C. 2003b. Feminization of wild carp, *Cyprinus carpio*, in a polluted environment : plasma steroid hormones, gonadal morphology and xenobiotics metabolizing system. *Comparative Biochemistry and Physiology* 136C : 145-156.

Soto AM, Sonneneschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FT. 1995. The E-screen assay as a tool to identify estrogens : an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives* 103 : 113-122.

Spanó L, Tyler CR, van Aerle R, Devos P, Mandiki SNM, Silvestre F, Thomé JP, Kestemont P. 2004. Effects of atrazine on sex steroids dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquatic Toxicology* 66 : 369-379.

Sperry T, Thomas P. 2000. Androgen binding profiles of two distinct nuclear androgen receptors in Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 73 : 93-103.

Stahlschmidt-Allner P. 1997. Endocrine disruption in the aquatic environment. *Environmental Science and Pollution Research* 4: 155-162.

Stefano GB, Zhu W, Mantione K, Jones D, Salamon E, Cho JJ, Cadet P. 2003. 17 β -estradiol down regulates ganglionic microglial cells via nitric oxide release : presence of an estrogen receptor β transcript. *Neuroendocrinology Letters* 24 : 130-136.

Steimer T. 2002. Steroid Hormone Metabolism. In Reproductive Health. Foundation for Medical Education and Research (Genève, Suisse).

URL: www.gfmer.ch/Books/Reproductive_health/Steroid_Hormone_metabolism.html

Stéquent B, Nuñez Rodriguez J, Cuisset B, Le Menn F. 2001. Gonadosomatic index and seasonal variations of plasma sex steroids in skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) from the western Indian Ocean. *Aquatic Living Resources* 14 : 313-318.

Sulistyo I, Fontaine P, Rinchar J, Gardeur JN, Migaud H, Capdeville B, Kestemont P. 2000. Reproductive cycle and plasma levels of steroids in male Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Living Resources* 13: 99-106.

Sumpter JP, Jobling S. 1995. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environmental Health Perspectives* 103: 173-178.

Sumpter JP. Endocrine disruption in the aquatic environment. 2001. In Metzler M, éditeur, Endocrine disruptors, Vol 2. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany, pp 271-290.

Susca V, Corriero A, Deflorio M, Bridges CR, De Metrio G. 2001. New results on the reproductive biology of the bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Mediterranean. *Collective Volume of Scientific Papers* 52 : 745-751.

Tang PW, Croone DL, A new method for hydrolysing sulphate and glucuronyl conjugates of steroids. 1989. *Analytical Biochemistry* 182 : 289-294.

Ternes TA, Kreckel P, Mueller J. 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *The Science of the Total Environment* 225 : 91-99.

Thomas P. 1988. Reproductive endocrine function in female Atlantic croaker exposed to pollutants. *Marine Environmental Research* 24 : 179-183.

Thomas P. 1989. Effects of Arochlor 1254 and cadmium on reproductive function and ovarian growth in Atlantic croaker. *Marine Environmental Research* 28 : 499-503.

Thorpe KL, Cummings RI, Hutchinson TH, Scholze M, Brighty G, Sumpter JP, Tyler CR. 2003. Relative potencies and combination of steroidal estrogens in fish. *Environmental Science and Technology* 37 : 1142-1149.

Tilton F, Benson WH, Schlenk D. 2002. Evaluation of estrogenic activity from a municipal wastewater treatment plant with predominantly domestic input. *Aquatic Toxicology* 61: 211-235.

Togola A. 2001. Développement d'un protocole analytique: dosage des stéroïdes dans des échantillons biologiques. DU de toxicologie et d'hygiène industrielles. 44 p.

Tremblay L, Van Der Kraak GV. 1999. Comparison between the effect of the phytosterol β -sitosterol and pulp and paper mill effluents on sexually immature rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18: 329-336.

Turan A. 1995. Excretion of natural and synthetic estrogens and their metabolites : occurrence and behaviour in water. In Gies A, éditeur, *Endocrinically Active Chemicals in the Environment* (UBA TEXTE 3/96), Umweltbundesamt, Berlin, Allemagne.

Van den Belt K, Verheyen R, Witters H. 2003. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56 : 271-281.

Van den Heuvel MR, Ellis RJ. 2002. Timing of exposure to a pulp and paper effluent influences the manifestation of reproductive effects in rainbow trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21 : 2338-2347.

Vanderford BJ, Pearson RA, Rexing DJ, Snyder SA. 2003. Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals and personal care products in water using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 75 : 6265-6274.

Vethaak AD, Rijs GBJ, Schrap SM, Ruiter H, Gerritsen A, Lahr J. 2002. Estrogens and xenoestrogens in the aquatic environment of the Netherlands Occurrence, Potency and Biological Effects. RIZA/RIKZ-report n°. 2002.001. ISBN 9036954010.

Ward WE, Thompson LU. 2001. Dietary estrogens of plant and fungal origin. In Metzler M, éditeur, *Endocrine disruptors*, Vol 1. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Allemagne.

Weltzien FA, Andersson E, Andersen Ø, Shalchian-Tabrizi K, Norberg B. 2004. The brain–pituitary–gonad axis in male teleosts, with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes). *Comparative Biochemistry and Physiology* 137A: 447–477.

Wester PW, Van der Ven LTM, Vethaak AD, Grinwiss GCM, Vos JG. 1991. Histopathological effects of environmental pollutants β -HCH and tributyltin on reproductive organs in freshwater fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100 : 237-239.

Weybridge European Workshop on the impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife. Reports of Proceedings, 2-4 Décembre 1996, Weybridge (Royaume-Uni).

White R, Jobling S, Hoare A, Sumpter JP, Parker MG. 1994. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135 : 175-182.

Williams RJ, Johnson AC, Smith JLL, Kanda R. 2003. Steroid estrogens profiles along river stretches arising from sewage treatment works. *Environmental Science and Technology* 37 : 1744-1750.

ANNEXES

Annexe 1

Procédure d'analyse du bore dissous par ICP-MS

- prélèvement de l'échantillon dans un flacon en polypropylène
- filtration à 0,7 μm .
- Ajout d'acide nitrique 70% (concentration finale 1%) et conservation à 4°C (analyse réalisée dans les six mois suivant le prélèvement).
- Analyse par ICP-MS (appareil HP 4500, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) :
 - nébuliseur « cross flow »
 - puissance Rf 1250 W
 - débit du gaz plasmagène 15 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
 - débit du gaz nébuliseur: 0.98 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
 - débit du gaz auxiliaire : 0.8 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$
 - débit d'échantillon: 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
- Les valeurs ont été corrigées par rapport au rhodium (utilisé comme étalon interne à la concentration de 25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et par rapport aux blancs.

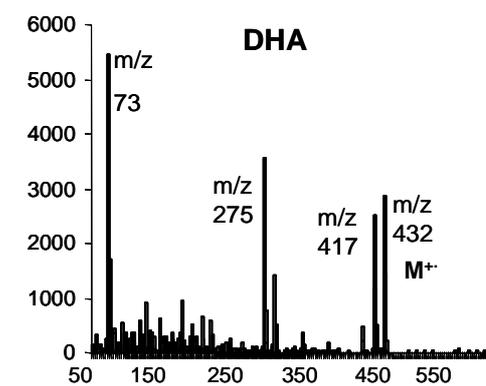
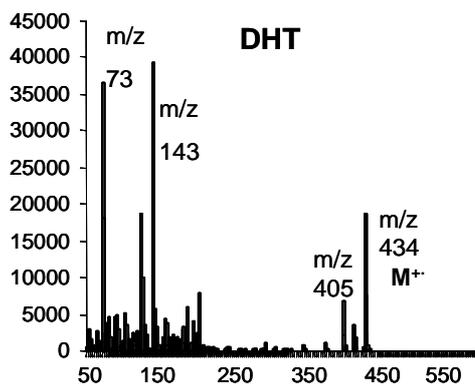
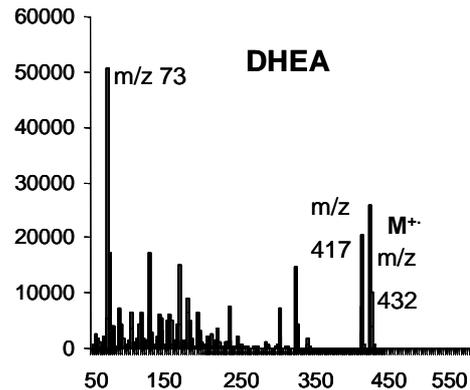
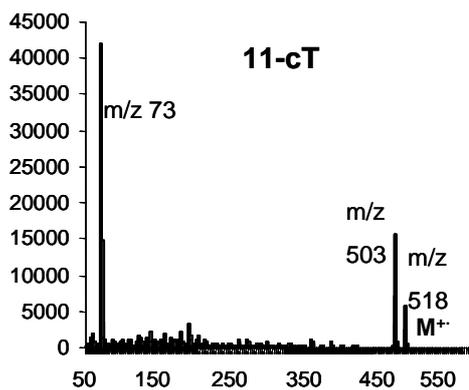
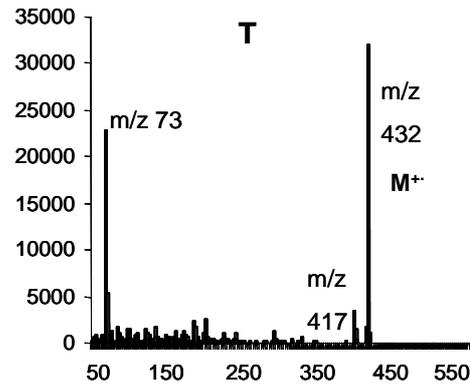
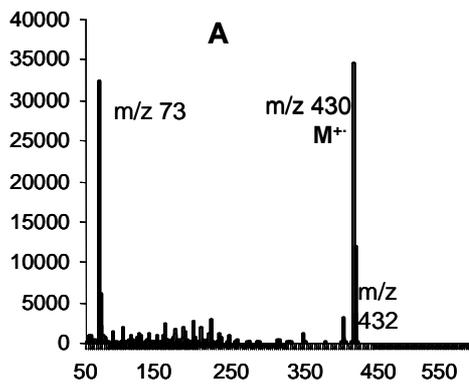
Annexe 2

Références et conditions d'analyse des stéroïdes par CG-SM

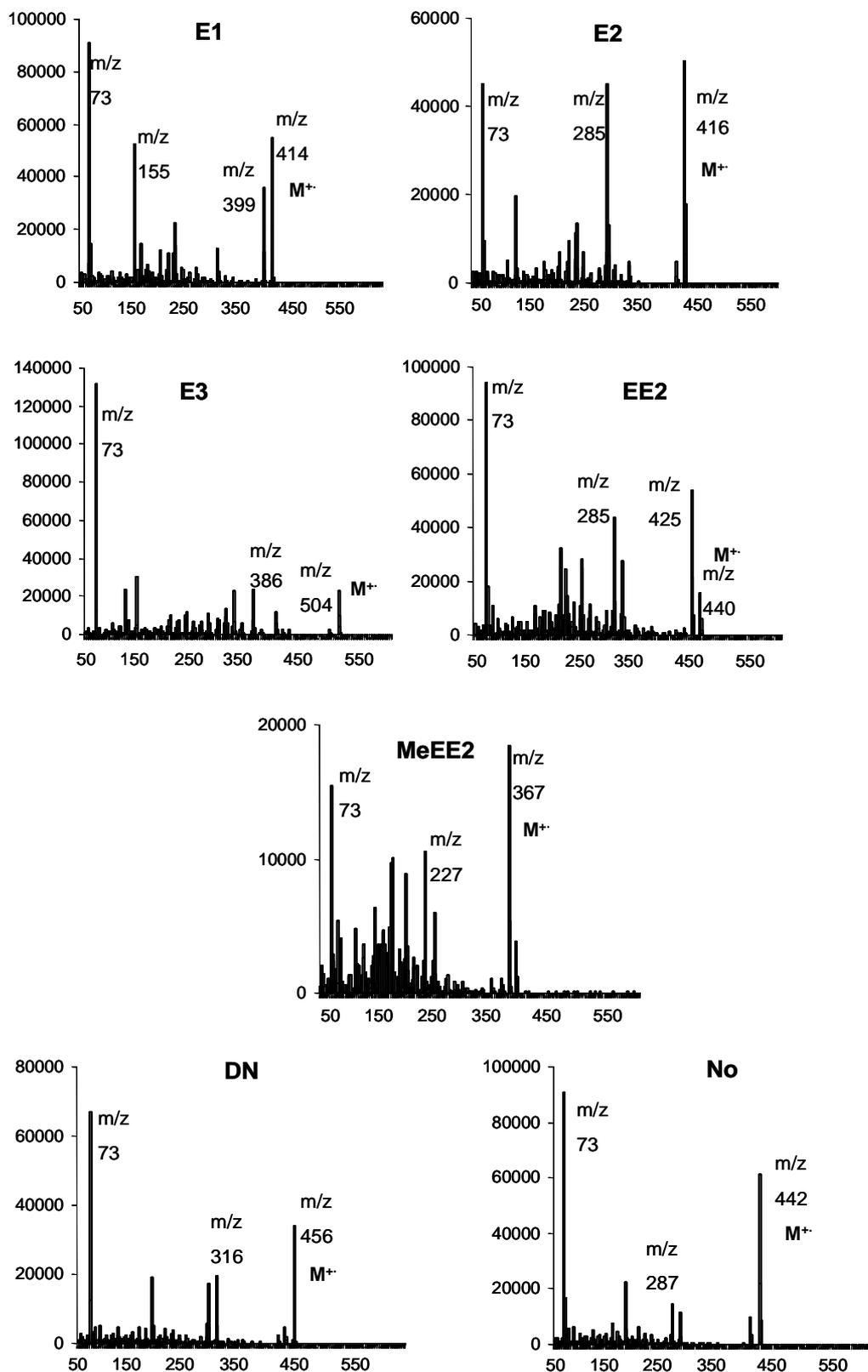
- appareillage : chromatographe 6890 couplé à un spectromètre de masse 5973 de marque Agilent Technologies (Palo Alto, USA)
- solvant d'injection : MSTFA + dichlorométhane (1 :1, v/v)
- volume injecté : 2,5 μL
- conditions d'injection : mode splitless, pression pulsée (25,0 psi pendant 60 s) ; purge à 60 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ après 1,5 min.
- mode d'analyse : sélection d'ion, (temps d'accumulation time 80 ms, 1,1 $\text{cycle}\cdot\text{s}^{-1}$)
- mode d'ionisation : impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV
- colonne chromatographique : HP5-MS (30m L x 0,25 mm \varnothing i, 0,25 μm ép) de marque Agilent Technologies (Palo Alto, USA)
- gaz vecteur : hélium Linde qualité 6.0 (99,9990%)
- débit de gaz vecteur : 1 $\text{mL}\cdot\text{mn}^{-1}$ (constant).
- gradient de température : 90°C, 1 min; montée à 290°C (rampe de 7.5°C. min^{-1}), isotherme 5 min.
- température de l'injecteur et de l'interface : respectivement 270°C et 290 °C.
- température de la source : 230°C- multiplicateur d'é lectron : 1500-1800 V

Annexe 3

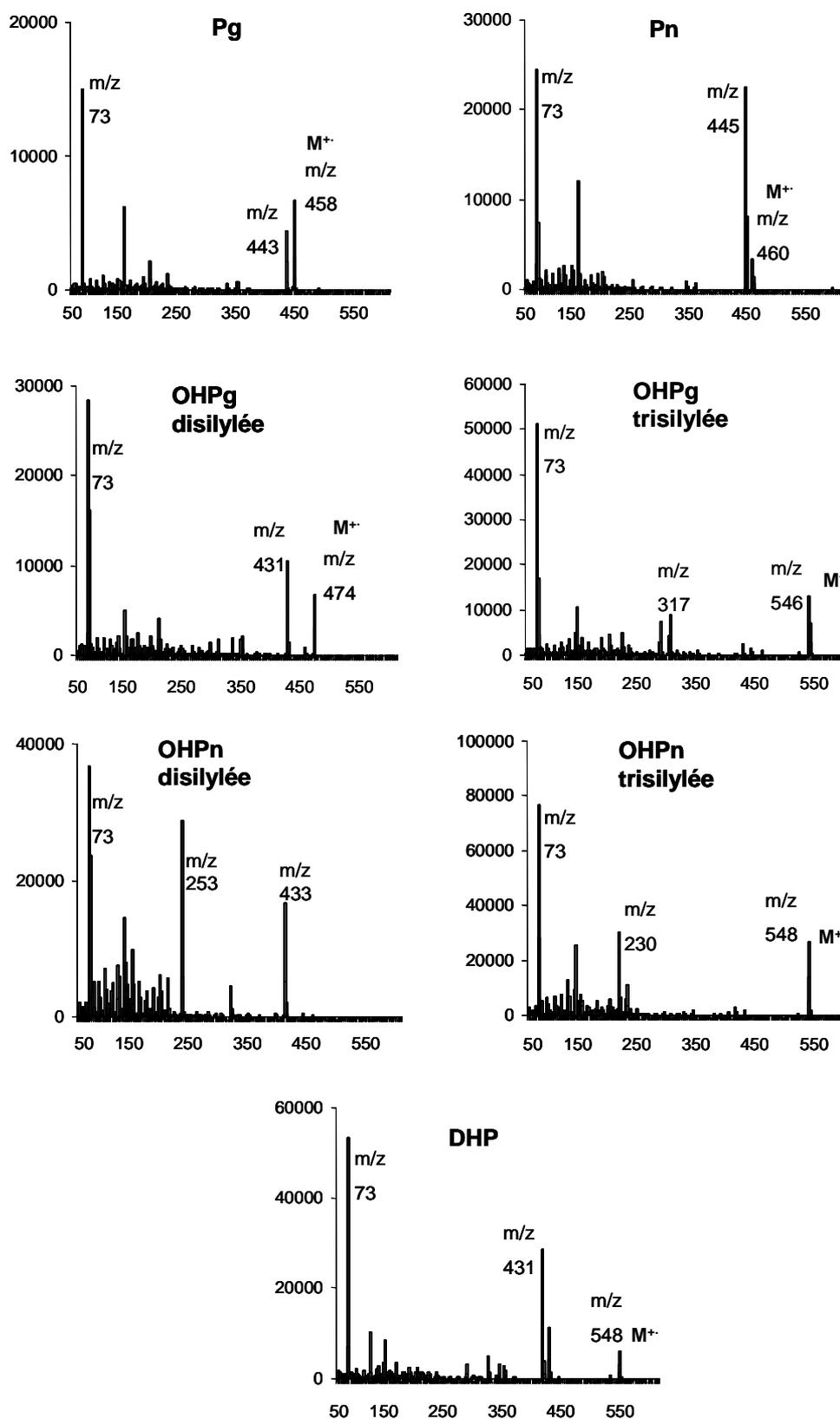
Spectres de masse obtenus par impact électronique (CG-SM), après dérivation par le MSTFA.



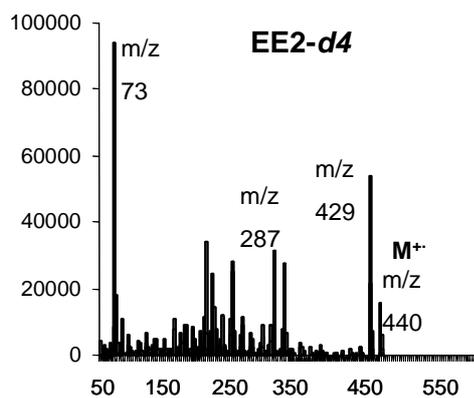
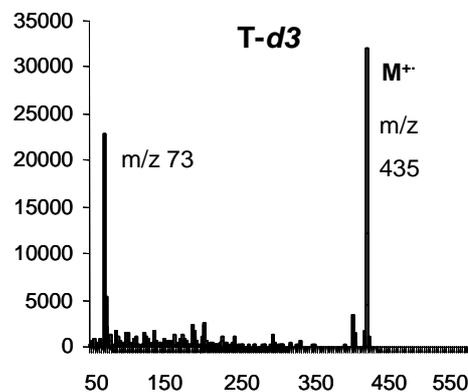
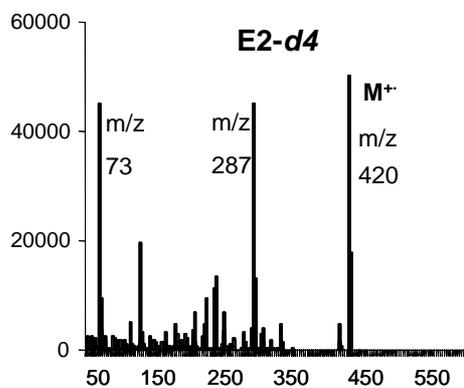
Annexe 3, suite : spectres de masse obtenus par impact électronique (CG-SM), après dérivation par le MSTFA.



Annexe 3, suite : spectres de masse obtenus par impact électronique (CG-SM), après dérivation par le MSTFA.

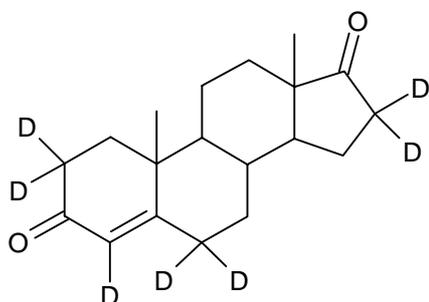


Annexe 3, suite : Spectres de masse des étalons internes, obtenus par impact électronique (CG-SM), après dérivation par le MSTFA.

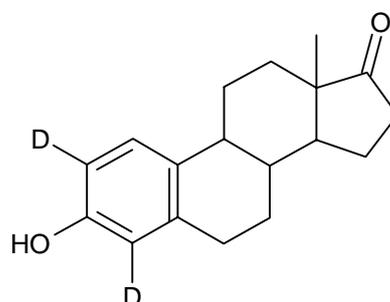


Annexe 4

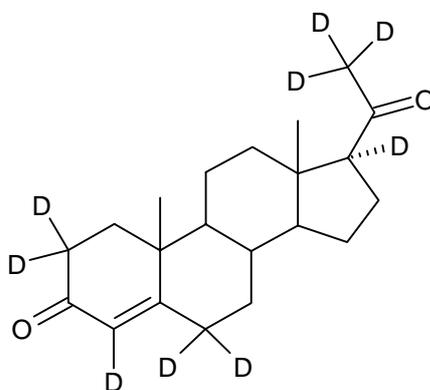
Structures de trois stéroïdes deutérés testés mais non utilisés comme étalons internes (comportement aléatoire lors de l'étape de dérivation)



androstènedione-*d*7



œstrone-*d*2



progestérone-*d*9

Annexe 5

Références et conditions d'analyse des œstrogènes par CLHP-SM ESI Mode Positif

- appareillage : chromatographe en phase liquide couplée à un spectromètre de masse (1100 series LC/MSD) de marque Agilent Technologies (Palo Alto, USA).
- solvant d'injection : méthanol
- volume injecté : 5 μ L
- mode d'analyse : sélection d'ion.
- mode d'ionisation : électrospray en mode négatif
- colonne chromatographique : silice greffée C18 Kromasil 100 C18 3 μ m, de marque Kromasil (Bios Analytique, L'Union, France) (150 x 2,1 mm, granulométrie 3 μ m, porosité 10 nm).
- phase mobile : méthanol/eau (débit 0,15 mL.min⁻¹)
 - t = 0 min, 20% méthanol
 - t = 5, 30 % méthanol
 - t = 20, 80 % méthanol
 - t = 21, 85 % méthanol
 - t = 35, 85 % méthanol
 - t = 36, 20 % méthanol
 - t = 50, 20 % méthanol

Méthanol : qualité HPLC, (Baker, fourni par Atlantic Labo, Eysines, France).

Eau : eau stérile pour préparation injectable (Laboratoires Aguettant, Lyon, France).

- paramètres de l'ionisation :

Fragmenteur : 110 V

Température du gaz : 350°C

Débit du gaz : 10 L.min⁻¹

Pression de nébulisation : 55 psi

Tension appliquée au capillaire : 6000 V

Annexe 6

Références et conditions d'analyse des œstrogènes par CLHP-SM ESI Mode Négatif

- appareillage : chromatographe en phase liquide couplée à un spectromètre de masse (1100 series LC/MSD) de marque Agilent (Palo Alto, USA).
- solvant d'injection : méthanol
- volume injecté : 5 μ L
- mode d'analyse : sélection d'ion, (temps d'accumulation 96 ms)
- mode d'ionisation : électrospray en mode positif
- colonne chromatographique : silice greffée C18 Kromasil 100 C18 3 μ m, de marque Kromasil (Bios Analytique, L'Union, France) (150x2,1 mm, granulométrie 3 μ m, porosité 10 nm).
- phase mobile : méthanol/eau (débit 0,15 mL.min⁻¹)
 - t = 0 min, 60% méthanol
 - t = 20 min, 100 % méthanol
 - t = 30 min, 100 % méthanol
 - t = 31 min, 60 % méthanol
 - t = 45 min, 60 % méthanol

Méthanol : qualité HPLC, (Baker, fourni par Atlantic Labo, Eysines, France).

Eau : eau stérile pour préparation injectable (Laboratoires Aguettant, Lyon, France).

- paramètres ionisation :

Fragmenteur : 110 V

Température du gaz : 350°C

Débit du gaz : 10 L.min⁻¹

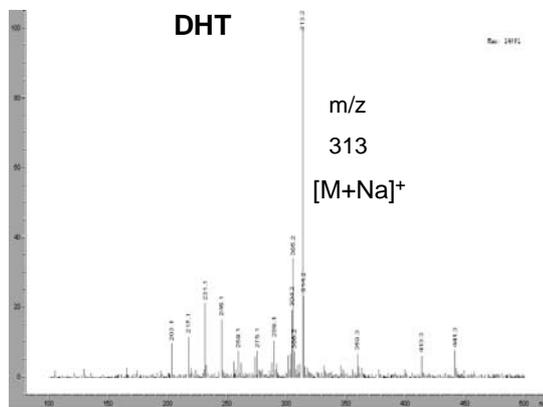
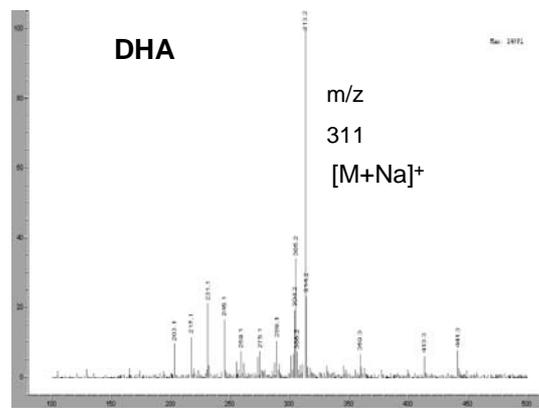
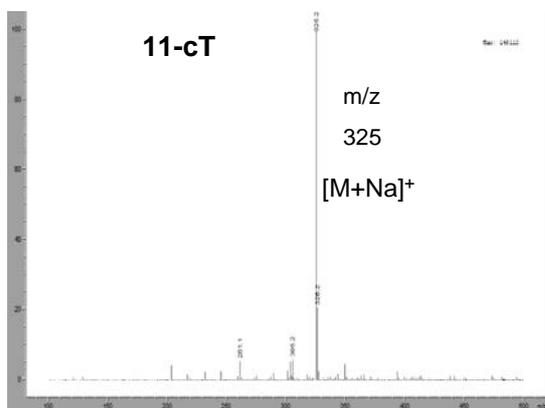
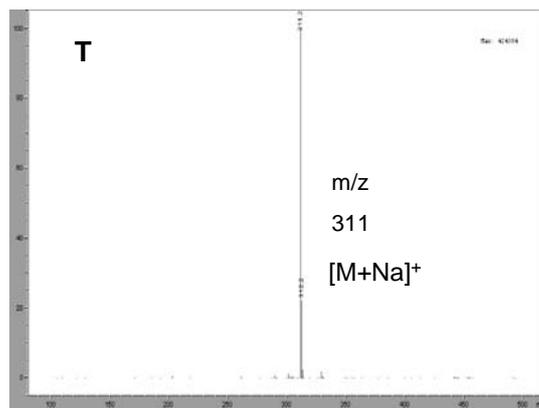
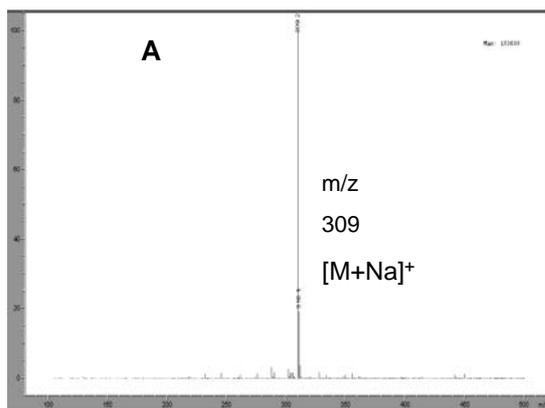
Pression de nébulisation : 55 psi

Tension appliquée au capillaire : 3500 V

Annexe 7 :

Spectres de masse obtenus en électrospray

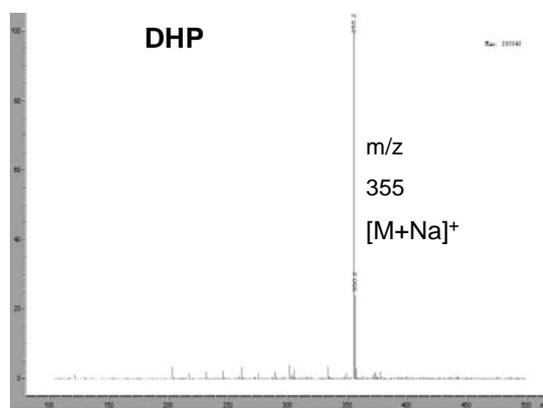
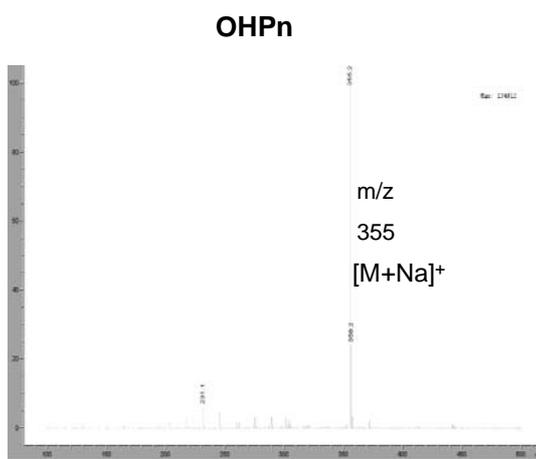
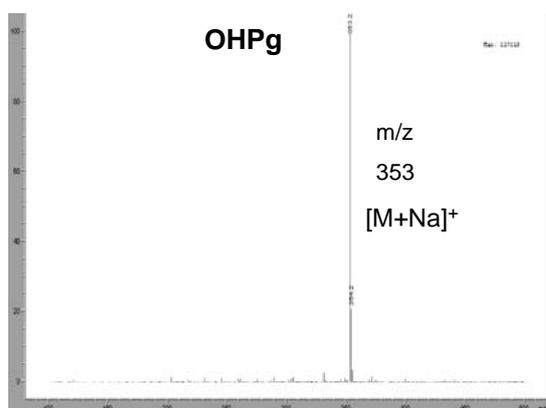
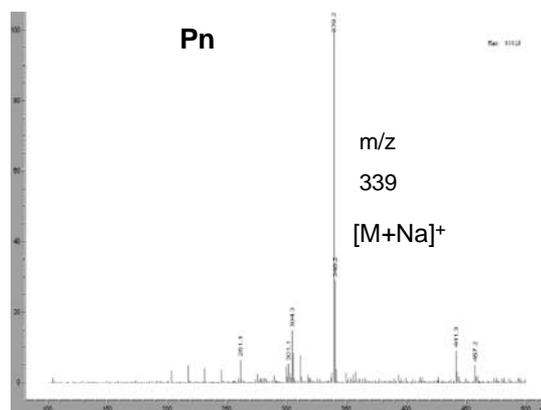
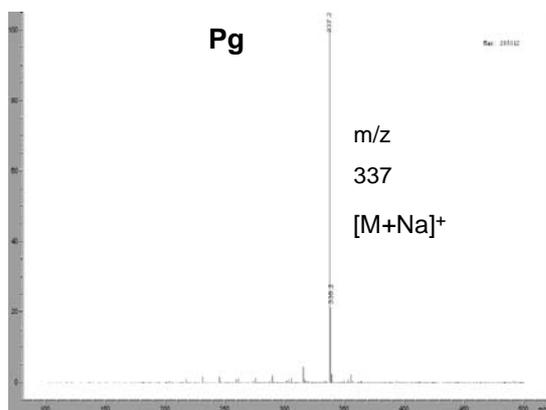
Androgènes : ion $[M+Na]^+$ (analyse en mode positif)



Annexe 7, suite :

Spectres de masse obtenus en électrospray

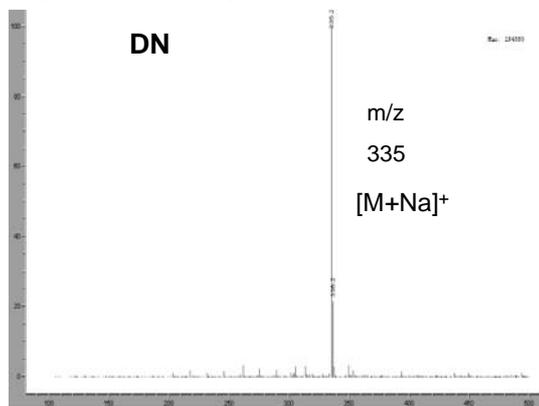
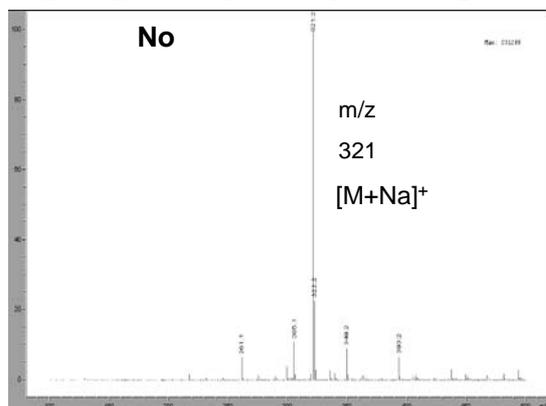
Progestagènes naturels : ion $[M+Na]^+$ (analyse en mode positif)



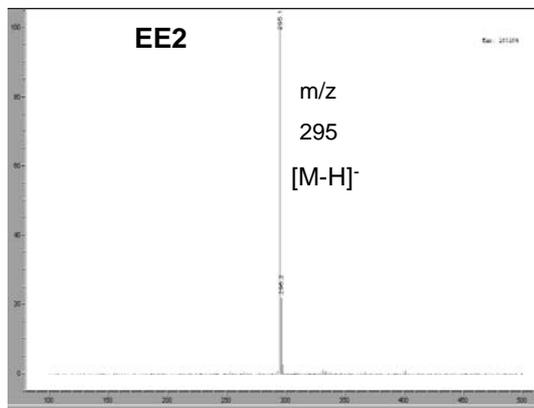
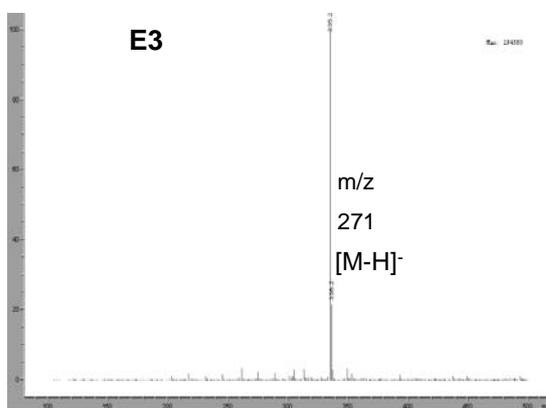
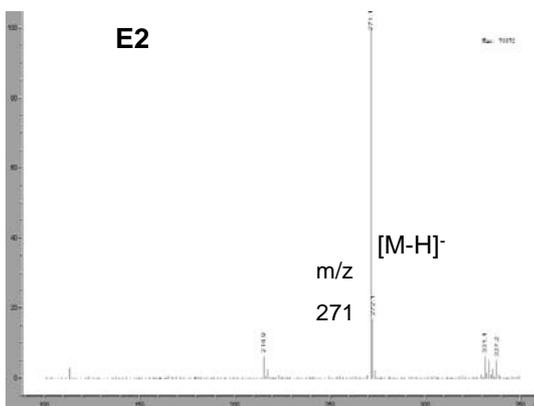
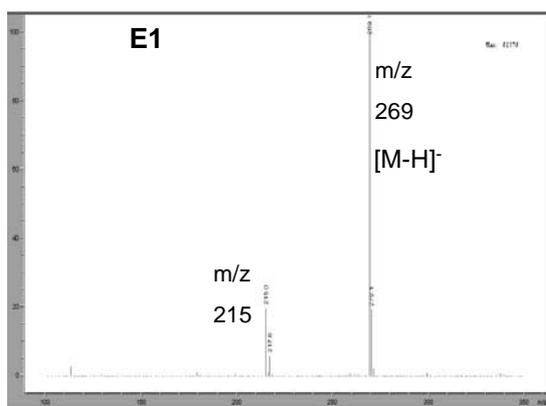
Annexe 7

Spectres de masse obtenus en électrospray

Progestagènes synthétiques: ion $[M+Na]^+$ (analyse en mode positif)



Œstrogènes : ion $[M-H]^-$ (analyse en mode négatif)

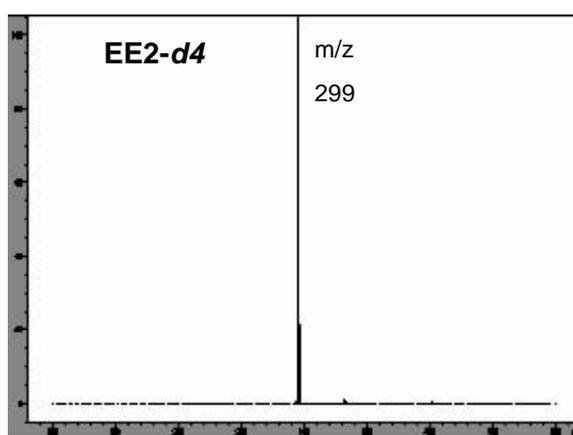
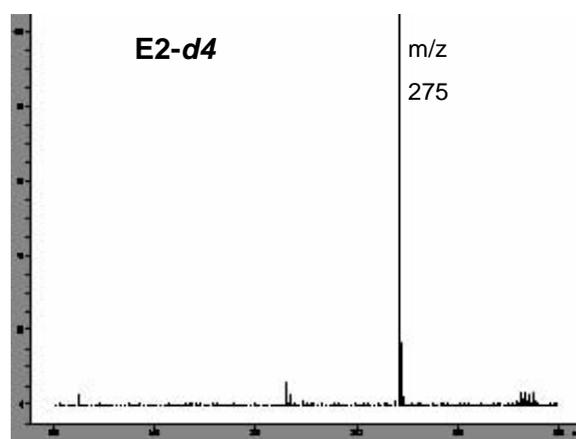
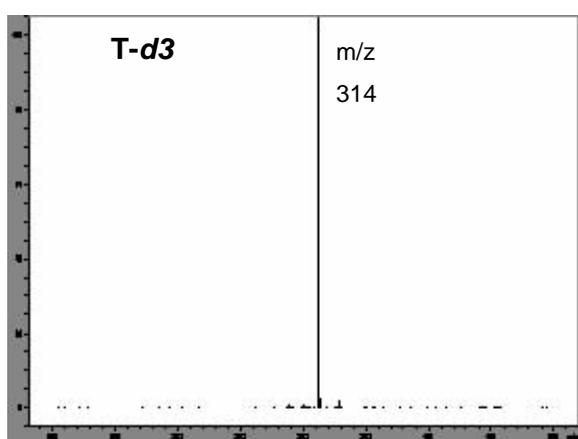


Annexe 7

Spectres de masse obtenus en électrospray : étalons internes

T-d3 : ion $[M+Na]^+$ (analyse en mode positif)

E2-d4 et *EE2-d4* : ion $[M-H]^-$ (analyse en mode négatif)



Annexe 8

Données brutes de l'étude comparative RIA/CG-SM pour le dosage de la testostérone et du 17 β -œstradiol dans le plasma de poisson

	Echantillon	Diéthyléther		C18	
		C (ng/g)	et (n=2)	C (ng/g)	et (n=2)
F1	Lesconil 01/03 M	0,368	0,008	0,377	0,005
F2	Lesconil 01/03 F	3,895	0,295	3,025	0,090
F3	Lesconil 06/03 M	0,051	0,003	0,048	0,005
F4	Lesconil 06/03 F	0,033	0,002	0,036	0,002
F5	Antifer 11/02 M	0,061	0,002	0,265	0,010
F6	Antifer 11/02 F	0,061	0,002	0,128	0,022
T	Truite F	1,596	0,024	0,823	0,045

	Echantillon	C18+NH ₂		CG/SM	
		C (ng/g)	et (n=2)	C (ng/g)	et (n=3)
F1	Lesconil 01/03 M	0,253	0,002	0,270	0,020
F2	Lesconil 01/03 F	2,508	0,226	3,230	0,100
F3	Lesconil 06/03 M	0,042	0,003	0,080	0,060
F4	Lesconil 06/03 F	0,063	0,005	0,050	0,001
F5	Antifer 11/02 M	0,155	0,008	0,150	0,020
F6	Antifer 11/02 F	0,055	0,004	0,090	0,040
T	Truite F	0,497	0,055	1,110	0,070

Dosage de la testostérone dans le plasma de flet (F \bar{i}) ou de truite

	Echantillon	Diéthyléther		C18	
		C (ng/g)	et (n=2)	C (ng/g)	et (n=2)
F1	Lesconil 01/03 M	0,039	0,004	0,050	0,011
F2	Lesconil 01/03 F	48,897	4,592	7,622	0,252
F3	Lesconil 06/03 M	0,018	0,001	0,029	0,001
F4	Lesconil 06/03 F	0,068	0,005	0,059	0,000
F5	Antifer 11/02 M	0,147	0,003	0,049	0,004
F6	Antifer 11/02 F	1,726	0,066	0,968	0,005
T	Truite F	6,001	0,046	1,754	0,142

	Echantillon	C18+NH ₂		CG/SM	
		C (ng/g)	et (n=2)	C (ng/g)	et (n=3)
F1	Lesconil 01/03 M	0,035	0,000	0,19	0,03
F2	Lesconil 01/03 F	6,816	0,698	10,17	0,17
F3	Lesconil 06/03 M	0,018	0,002	0,17	0,09
F4	Lesconil 06/03 F	0,029	0,001	0,23	0,03
F5	Antifer 11/02 M	0,033	0,003	0,24	0,02
F6	Antifer 11/02 F	0,578	0,101	0,85	0,11
T	Truite F	1,006	0,007	1,11	0,07

Dosage du 17 β -œstradiol dans le plasma de flet (F \bar{i}) ou de truite

Annexe 8

Données brutes de l'étude comparative RIA/CG-SM pour le dosage de la testostérone et du 17 β -œstradiol dans le plasma de poisson

(Pg/mL)	cpm	moyenne	moyenne-NSB	%B/Bo	ng/mL	%B/Bo
0	17412,5	17453,4	17453,4	100,0	21	47726187,5
	17494,2				53	43853401,4
21	17335,7	17378,0	17378,0	47726187,5	196	34487748,7
	17420,2				2017	25555884,2
53	15546,7	15967,8	15967,8	43853401,4	4201	14845199,4
	16388,9				<i>NSB = 23,40</i>	
196	12331,4	12557,6	12557,6	34487748,7		
	12783,8					
2017	9035,1	9305,4	9305,4	25555884,2		
	9575,6					
4201	5342,8	5405,4	5405,4	14845199,4		
	5468,0					

Dosage du 17 β -œstradiol par RIA : utilisation d'étalons préparés dans le méthanol

(Pg/mL)	cpm	moyenne	moyenne-NSB	%B/Bo	ng/mL	%B/Bo
0	17412,5	17453,4	17453,4	100,0	20	46208958,3
	17494,2				50	42219177,1
20	16809,4	16825,5	16825,5	46208958,3	200	31644162,7
	16841,6				500	23066579,3
50	15200,5	15372,8	15372,8	42219177,1	2000	11237849,5
	15545,0				4000	6719393,1
200	11335,0	11522,2	11522,2	31644162,7	<i>NSB = 23,40</i>	
	11709,4					
500	8424,2	8399,0	8399,0	23066579,3		
	8373,7					
2000	4094,1	4091,9	4091,9	11237849,5		
	4089,7					
4000	2506,9	2446,7	2446,7	6719393,1		
	2386,4					

Dosage du 17 β -œstradiol par RIA : utilisation d'étalons préparés dans le dichlorométhane

Annexe 9

Etude des stéroïdes dans les eaux de surface et les effluents de stations d'épuration

Données brutes du suivi réalisé sur l'estuaire de Seine

station	PK	mois	Concentration (ng.L ⁻¹)							
			E1	E2	E3	EE2	MeEE2	Pg	DN	No
Poses	200	mars	<1,3	<1,0	<1,9	<1,8	<1,6	<2,5	<4,0	<2,5
		mai	<1,2	<0,5	<2,0	<1,1	<1,0	<2,7	<5,9	<2,5
Caudebec	313	mars	<1,3	<1,5	<1,9	<1,8	<1,6	<2,5	<4,0	<2,5
		mai	<0,8	<0,5	<2,2	<1,0	<0,4	<2,7	<3,8	<1,3
Honfleur	355	mars	<1,2	<1,0	<1,0	<1,5	<1,0	<2,2	<4,5	<1,5
		mai	<1,1	<0,8	<1,2	<1,3	<0,8	<2,0	<5,0	<1,3
Elbeuf (STEP)	220	mars	<2,0	<1,9	<4,5	<3,0	<3,5	<5,0	<4,5	<5,0
		mai	4,3±0,9	<3,8	<8,0	<5,3	<5,4	<8,0	<7,2	<6,5
		juillet	<3,5	<0,6	<4,9	<0,8	<0,7	<4,5	<6,7	<3,2
		septembre	<0,5	<0,4	<0,8	<0,8	<0,9	<3,5	<6,1	<4,3
Rouen (STEP)	245	novembre	<4,3	<2,4	<5,6	<1,1	<1,1	<4,3	<6,3	<1,9
		mars	<1,8	<1,9	<4,0	<2,9	<3,0	<3,5	<3,8	<5,2
		mai	<3,0	<3,8	<8,0	<5,3	<5,0	<7,0	<7,2	<5,0
		juillet	<3,3	<0,5	3,5±1,0	<1,1	<1,1	<4,3	<6,0	<3,1
		septembre	<0,5	<0,4	<2,1	<1,0	<0,7	<3,5	<5,8	<4,0
Tancarville (STEP)	330	novembre	<3,4	<2,5	<7,3	<1,2	<0,9	<6,8	<2,5	<2,5
		mars	<2,8	<2,5	<3,0	<2,5	<2,7	<4,0	<3,2	<4,5
		mai	4,2±1,0	<0,8	<1,8	<0,7	<1,2	<1,7	<3,2	<1,1
		juillet	1,8±0,3	<0,3	<3,6	<1,0	<0,6	<3,7	<5,0	<3,3
		septembre	8,3±1,0	<0,3	<1,9	<0,7	<0,7	<3,7	<4,3	<3,9
novembre	4,9±0,2	<1,4	<5,0	<1,0	<1,1	<5,0	<5,0	<1,5		

Annexe 10

Etude des stéroïdes dans les eaux de surface et les effluents de stations d'épuration Données brutes du suivi réalisé sur la Jalle d'Eysines

	juillet 2003	septembre 2003	février 2004
E1	71,4	57,8 ± 2,8	17,2 ± 0,3
E2	<2,0	4,4 ± 0,8	<1,0
E3	<1,0	2,9 ± 0,1	<1,0
EE2	<4,0	<2,0	<1,0
MeEE2	<2,0	<2,0	<2,0
Pg	<9,0	nd	nd
No	<5,0	<1,0	<2,0
DN	<5,0	<2,0	<2,0

Concentrations en stéroïdes dans la phase dissoute de l'effluent de la STEP d'Eysines

Annexe 10

Etude des stéroïdes dans les eaux de surface et les effluents de stations d'épuration Données brutes du suivi réalisé sur la Jalle d'Eysines

mois	distance/ rejet (km)	[B] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	écart-type (n = 5)
juillet 03	-2	74	6
	0	289	42
	0,02	144	12
	0,8	127	13
	2	117	20
	10	335	60
septembre 03	-2	100	2
	0	511	8
	0,02	206	5
	0,8	215	8
	2	193	7
	4	190	9
10	688	33	
février 03	-2	55	4
	0	463	32
	0,02	92	3
	0,8	56	3
	2	58	2
	4	58	2
10	116	7	

Concentration en bore dissous dans les échantillons prélevés dans la Jalle d'Eysines

Annexe 11

Etude des stéroïdes dans les eaux de surface et les effluents de stations d'épuration

Données brutes du suivi réalisé sur la Jalle d'Eysines

	distance/ rejet (km)	(E1) _{exp} (ng.L ⁻¹)		(E1) _{th} (ng.L ⁻¹)
juillet 03	-2	0		
	0,02	30,17		30,17
	0,8	10,02		26,61
	2	4,63		24,51
	10	0,83		
septembre 03	-2	0	0	
	0,02	22,80	0,31	22,80
	0,8	15,94	0,31	23,79
	2	9,58	0,39	21,36
	4	4,63	0,51	21,03
	10	0,35	0,12	
février 04	-2	0,00	0,00	
	0,02	1,85	0,09	1,85
	0,8	1,84	0,08	1,12
	2	2,04	0,06	1,29
	4	1,87	0,11	1,18
	10	1,75	0,10	
septembre 03	-2	0	–	–
	0,02	1,24	0,04	1,24
	0,8	1,09	0,20	1,30
	2	0,85	0,05	1,17
	4	0,58	0,07	1,15
	10	< 0,2	–	–
septembre 03	-2	0	–	–
	0,02	0,98	0,14	0,98
	0,8	1,63	0,17	1,02
	2	0,23	0,03	0,92
	4	< 0,2	–	0,90
	10	< 0,2	–	–

Concentrations en œstrogènes dans la Jalle d'Eysines

E1 : œstrone ; E2 : 17β-œstradiol ; E3 : œstriol

exp: expérimental; th: théorique (calcul à partir de la concentration en bore dissous)

Annexe 12

Exposition de turbots

Stavanger 1 : p-nonylphénol, pétrole et pétrole + alkylphénols

PLASMA		T		A		11-cT		E1		E2	
		C	et	C	et	C	et	C	et	C	et
M	C1	0,7	0,2	2,0	0,3	3,7	0,7	1,1	0,2	0,2	0,1
M	NP	0,1	0,0	<0,1		<0,3		0,4	0,2	0,1	0,1
M	Pét	0,6	0,1	1,9	0,1	4,0	1,0	0,8	0,0	0,3	0,1
M	Pét + AP	0,7	0,2	1,5	0,3	5,6	1,6	1,2	0,5	0,3	0,1
F	C1	0,4	0,1	0,8	0,3	<0,3	<0,3	1,2	0,5	0,2	0,2
F	NP	0,2	0,1	0,2	0,1	<0,3	<0,3	1,1	0,3	0,1	0,0
F	Pét	0,2	0,0	0,5	0,1	<0,3	<0,3	0,3	0,1	0,2	0,1
F	Pét + AP	0,2	0,1	0,4	0,1	<0,3	<0,3	0,4	0,0	0,1	0,0
GONADES		T		A		11-cT		E1		E2	
		C	et	C	et	C	et	C	et	C	et
M	C1	2,7	–	18,9	–	nd	nd	nd	nd	1,3	–
M	NP	3,2	–	2,4	–	nd	nd	nd	nd	1,7	–
M	Pét	3,3	–	20,1	–	nd	nd	nd	nd	1,6	–
M	Pét + AP	2,7	–	16,9	–	nd	nd	nd	nd	1,6	–
F	C1	0,2	0,0	0,2	0,1	<0,5	<0,5	1,2	0,5	1,1	0,0
F	NP	0,1	0,0	0,3	0,3	<0,5	<0,5	1,1	0,3	0,5	0,2
F	Pét	0,1	0,1	0,2	0,1	<0,5	<0,5	0,3	0,1	1,0	0,0
F	Pét + AP	0,1	0,0	0,4	0,2	<0,5	<0,5	0,4	0,0	0,6	0,0
BILE		T		A		11-cT		E1		E2	
		C	et	C	et	C	et	C	et	C	et
M	C1	62,9		36,8		100,6		121,4		157,4	
M	NP	13,4	1,1	2,0	0,2	<0,5		10,0	0,5	23,3	2,6

Androgènes et œstrogènes détectés dans les différentes matrices étudiées (C en ng.g⁻¹ ; et : écart-type, n = 3). C1 : contrôle, NP : p-nonylphénol ; Pét : pétrole ; Pét + AP : pétrole + alkylphénols ; M : mâle ; F : femelle. nd : non détecté en raison d'une interférence matricielle.

Annexe 12

Exposition de turbots

Stavanger exposition 2 : bisphénol A, diallyl phtalate et BDE 47

PLASMA		T		A		11-cT		E1		E2	
		C	et	C	et	C	et	C	et	C	et
M	C2	0,6	0,1	1,2	0,0	2,6	0,1	0,6	0,1	<0,1	–
M	BA	0,3	0,0	1,7	–	2,3	–	2,3	0,0	<0,1	–
M	DAP	1,1	0,7	3,5	0,2	10,0	1,1	1,5	0,1	<0,1	–
M	BDE 47	2,0	0,7	4,4	0,8	13,3	3,0	2,6	1,0	<0,1	–
F	C2	0,4	0,2	1,7	0,2	< 0,3	–	1,3	0,2	0,3	0,1
F	DAP	0,2	0,0	3,2	0,3	< 0,3	–	3,2	0,2	0,3	0,0
F	BDE 47	0,4	0,1	1,9	0,2	< 0,3	–	1,5	0,1	0,4	0,0
GONADES		T		A		11-cT		E1		E2	
		C	et	C	et	C	et	C	et	C	et
M	C2	4,8	–	13,3	–	nd	–	0,1	–	0,5	–
M	BA	4,6	–	19,2	–	nd	–	1,3	–	0,4	–
M	DAP	10,7	–	22,7	–	nd	–	0,1	–	0,3	–
M	BDE 47	16,2	–	16,3	–	nd	–	0,2	–	0,4	–
F	C2	< 0,2	–	0,1	0,0	nd	–	1,2	0,3	0,6	0,0
F	BA	< 0,2	–	0,1	0,0	nd	–	0,3	0,0	0,3	0,1
F	DAP	< 0,2	–	0,2	0,1	nd	–	0,3	0,1	0,5	0,2
F	BDE 47	< 0,2	–	0,1	0,0	nd	–	0,264	0,079	0,7	0,3
BILE		T		A		11-cT		E1		E2	
		C	et	C	et	C	et	C	et	C	et
M	C2	19,26	1,12	13,29	2,42	26,08	1,81	27,53	8,84	27,2	0,3
M	BA	12,51	0,73	13,75	1,06	9,19	1,15	74,8	5,58	27,7	2,7
M	DAP	22,07	2,23	17,23	1,18	45,35	1,16	32,7	2,49	35,1	2,3
M	BDE 47	37,62	–	21,4	2,41	54,5	–	38,14	–	30,5	–
F	C2	18,65	3,18	24,79	2,75	<4,0	–	23,69	1,03	48,6	1,3
F	BA	–	–	nd	–	<4,0	–	79,26	0,3	57,02	–
F	DAP	34,83	2,52	20,54	1,14	<4,0	–	37,13	3,91	89,9	3,3
F	BDE 47	–	–	nd	–	<4,0	–	42,1	3,18	40,72	9,4

Androgènes et œstrogènes détectés dans les différentes matrices étudiées (C en ng.g⁻¹ ; et : écart-type, n = 3). C2 : contrôle, BA : bisphénol A, DAP : diallyl phtalate, BDE 47 : tétrabromodiphenyl éther; M : mâle ; F : femelle. nd : non détecté en raison d'une interférence matricielle.

Annexe 13

Exposition de turbots (*Psetta maxima*) au 17 α -éthynylœstradiol : données brutes

PLASMA

		fraction		T		kT		A	
				C	et	C	et	C	et
Mâles	Cont	Libre		0,35	0,08	0,68	0,16	2,32	0,22
		Conjugué		0,12	0,03	< 0,5	–	<0,1	–
	MeOH	Libre		0,34	0,08	0,54	0,10	2,71	0,10
		Conjugué		0,10	0,01	< 0,5	–	<0,1	–
	EE2 3,5	Libre		0,26	0,06	< 0,5	–	< 0,2	–
		Conjugué		< 0,1	–	< 0,5	–	< 0,2	–
	EE2 75	Libre		0,15	0,02	< 0,5	–	< 0,2	–
		Conjugué		< 0,1	–	< 0,5	–	< 0,2	–
		fraction		E1		E2		E3	
				C	et	C	et	C	et
Mâles	Cont	Libre		0,31	0,02	< 0,1	–	2,74	0,31
		Conjugué		0,25	0,07	0,12	0,06	< 0,3	–
	MeOH	Libre		0,35	0,07	< 0,1	–	2,91	0,14
		Conjugué		0,13	0,01	0,10	0,01	< 0,3	–
	EE2 3,5	Libre		0,34	0,05	< 0,1	–	3,41	0,66
		Conjugué		0,22	0,05	< 0,1	–	< 0,3	–
	EE2 75	Libre		0,37	0,01	< 0,1	–	6,58	0,99
		Conjugué		0,31	0,15	< 0,1	–	< 0,3	–
		fraction		T		kT		A	
				C	et	C	et	C	et
Femelles	Cont	Libre		0,23	0,11	< 0,5	–	0,47	0,04
		Conjugué		0,08	0,04	< 0,5	–	0,00	0,00
	MeOH	Libre		0,21	0,08	< 0,5	–	0,40	0,11
		Conjugué		0,05	0,02	< 0,5	–	0,00	0,00
	EE2 3,5	Libre		0,17	0,05	< 0,5	–	< 0,2	–
		Conjugué		0,04	0,02	< 0,5	–	< 0,2	–
	EE2 75	Libre		0,21	0,04	< 0,5	–	< 0,2	–
		Conjugué		0,04	0,00	< 0,5	–	< 0,2	–
		fraction		E1		E2		E3	
				C	et	C	et	C	et
Femelles	Cont	Libre		0,29	0,08	0,07	0,02	2,45	0,33
		Conjugué		0,14	0,04	0,10	0,03	< 0,3	–
	MeOH	Libre		0,38	0,11	0,13	0,05	3,14	0,34
		Conjugué		0,10	0,01	0,10	0,02	< 0,3	–
	EE2 3,5	Libre		0,31	0,08	0,10	0,03	6,77	0,65
		Conjugué		0,19	0,05	0,1	0,01	< 0,3	–
	EE2 75	Libre		0,37	0,13	0,43	0,16	3,42	1,56
		Conjugué		0,25	0,04	0,1	0,03	< 0,3	–

Androgènes et œstrogènes détectés dans la plasma des turbots lors de l'exposition au 17 α -éthynylœstradiol (C en ng.g⁻¹ ; et : écart-type, n = 3). Cont : contrôle, MeOH : méthanol, EE2 3,5 : 17 α -éthynylœstradiol 3,5 ng.L⁻¹, EE2 75 : 17 α -éthynylœstradiol 75 ng.L⁻¹.

Annexe 13

Exposition de turbots (*Psetta maxima*) au 17 α -éthynylœstradiol : données brutes

GONADES

			T		11-cT		A	
fraction			C (ng/g)	et (ng/g)	C (ng/g)	et (ng/g)	C (ng/g)	et (ng/g)
Mâles	Cont	Libre	0,8	0,1	1,5	0,3	9,8	0,2
		Conjugué	0,5	0,0	< 0,5	–	< 0,2	–
	MeOH	Libre	0,6	0,2	1,3	0,3	8,5	0,6
		Conjugué	0,8	0,1	< 0,5	–	< 0,2	–
	EE2 3,5	Libre	0,2	0,0	< 0,5	–	< 0,2	–
		Conjugué	0,4	0,1	< 0,5	–	< 0,2	–
	EE2 75	Libre	0,2	0,0	< 0,5	–	< 0,2	–
		Conjugué	0,5	0,0	< 0,5	–	< 0,2	–
fraction			E1	E2	E3			
fraction			C (ng/g)	et (ng/g)	C (ng/g)	et (ng/g)	C (ng/g)	et (ng/g)
Mâles	Cont	Libre	0,7	0,1	< 0,2	–	< 0,7	–
		Conjugué	7,3	0,4	2,3	0,1	< 0,7	–
	MeOH	Libre	0,7	0,2	< 0,2	–	< 0,7	–
		Conjugué	8,1	0,6	2,7	0,1	< 0,7	–
	EE2 3,5	Libre	0,9	0,2	< 0,2	–	< 0,7	–
		Conjugué	11,1	2,5	4,2	0,3	< 0,7	–
	EE2 75	Libre	0,7	0,1	< 0,2	–	< 0,7	–
		Conjugué	15,2	1,8	4,6	0,3	< 0,7	–
			T		11-cT		A	
fraction			C (ng/g)	et (ng/g)	C (ng/g)	et (ng/g)	C (ng/g)	et (ng/g)
Femelles	Cont	Libre	< 0,1	–	< 0,5	–	< 0,1	–
		Conjugué	0,3	0,1	< 0,5	–	< 0,1	–
	MeOH	Libre	< 0,1	–	< 0,5	–	< 0,1	–
		Conjugué	0,4	0,1	< 0,5	–	< 0,1	–
	EE2 3,5	Libre	< 0,1	–	< 0,5	–	< 0,1	–
		Conjugué	< 0,1	–	< 0,5	–	< 0,1	–
	EE2 75	Libre	< 0,1	–	< 0,5	–	< 0,1	–
		Conjugué	< 0,1	–	< 0,5	–	< 0,1	–
fraction			E1	E2	E3			
fraction			C (ng/g)	et (ng/g)	C (ng/g)	et (ng/g)	C (ng/g)	et (ng/g)
Femelles	Cont	Libre	0,5	0,1	0,8	0,1	< 0,7	–
		Conjugué	1,5	0,3	4,4	0,4	< 0,7	–
	MeOH	Libre	0,3	0	0,5	0,1	< 0,7	–
		Conjugué	1,7	0,2	5,2	0,2	< 0,7	–
	EE2 3,5	Libre	0,4	0,1	0,3	0,1	< 0,7	–
		Conjugué	4,0	0,5	5,4	0,7	< 0,7	–
	EE2 75	Libre	0,2	0,1	0,2	0,1	< 0,7	–
		Conjugué	1,7	0,1	4,9	0,5	< 0,7	–

Androgènes et œstrogènes détectés dans les gonades des turbots lors de l'exposition au 17 α -éthynylœstradiol (C en ng.g⁻¹ ; et : écart-type, n = 3). Cont : contrôle, MeOH : méthanol, EE2 3,5 : 17 α -éthynylœstradiol 3,5 ng.L⁻¹, EE2 75 : 17 α -éthynylœstradiol 75 ng.L⁻¹.

Annexe 13

Exposition de turbots (*Psetta maxima*) au 17 α -éthynylœstradiol : données brutes

BILE

	fraction	T		kT		A		
		C	et	C	et	C	et	
		fraction		fraction		fraction		
Mâles	Cont	Libre	< 1,6	–	< 3,4	–	< 2,2	–
		Conjugué	51,6	8	44,6	5,8	74,2	8,4
	Cont	Libre	< 1,6	–	< 3,4	–	0	–
		Conjugué	47,5	4,5	47,8	11,1	71,5	12,2
	EE2 3,5	Libre	< 1,6	–	< 3,4	–	0	–
		Conjugué	31,7	2,8	18,4	1,6	45,8	6,0
	EE2 75	Libre	< 1,6	–	< 3,4	–	0	–
		Conjugué	22,2	2,1	13,3	2,9	24,6	2,3
			E1		E2		E3	
	fraction		C	et	C	et	C	et
Mâles	Cont	Libre	9,9	0,0	2,5	0,2	7,4	1,3
		Conjugué	244,9	15,7	188,4	6,4	< 0,9	–
	Cont	Libre	4,9	0,4	1,1	0,3	6,1	0,2
		Conjugué	189,0	9,8	212,0	16,2	< 0,9	–
	EE2 3,5	Libre	14,1	0,2	3,4	0,5	5,2	1,0
		Conjugué	104,3	3,1	130,3	7,4	< 0,9	–
	EE2 75	Libre	36,5	1,4	4,7	0,2	7,4	1,4
		Conjugué	221,4	8,0	119,9	3,9	< 0,9	–
			T		kT		A	
	fraction		C	et	C	et	C	et
Femelles	Cont	Libre	< 1,6	–	< 3,4	–	< 2,2	–
		Conjugué	58,1	4,6	< 3,4	–	47,3	5,5
	Cont	Libre	< 1,6	–	< 3,4	–	< 2,2	–
		Conjugué	74,5	5,4	< 3,4	–	46,5	7,9
	EE2 3,5	Libre	< 1,6	–	< 3,4	–	< 2,2	–
		Conjugué	48,2	16,1	< 3,4	–	47,5	20,6
	EE2 75	Libre	< 1,6	–	< 3,4	–	< 2,2	–
		Conjugué	71,5	8,4	< 3,4	–	32,5	18,7
			E1		E2		E3	
	fraction		C	et	C	et	C	et
Femelles	Cont	Libre	7,2	1,7	4,0	0,4	7,4	1,3
		Conjugué	201,9	19,3	340,8	42,1	< 0,9	–
	Cont	Libre	11,8	1,6	1,3	0,3	6,1	0,2
		Conjugué	250,2	52,2	247,7	40,2	< 0,9	–
	EE2 3,5	Libre	19,4	2,8	4,2	0,6	7,3	1,9
		Conjugué	326,3	27,6	312,9	29,9	< 0,9	–
	EE2 75	Libre	30,8	4,2	12,5	0,7	3,9	0,8
		Conjugué	285,6	8,4	196,6	12,5	< 0,9	–

Androgènes et œstrogènes détectés dans la bile des turbots lors de l'exposition au 17 α -éthynylœstradiol (C en ng.g⁻¹ ; et : écart-type, n = 3). Cont : contrôle, MeOH : méthanol, EE2 3,5 : 17 α -éthynylœstradiol 3,5 ng.L⁻¹, EE2 75 : 17 α -éthynylœstradiol 75 ng.L⁻¹.

Annexe 14 : Profils hormonaux chez le flet MÂLE (*Platichthys flesus*)

	Date	Maturité	T	A	11-cT	E1	E2	Pn	Pg	OHPn	OHPg	R
Seine	02/02	Mature	0,3	0,9	6,2	0,1	<0,2	4	<0,4	1,3	6,9	37
	09/02	Mature	<0,1	0,2 ± 0,1	9,5 ± 0,1	0,2 ± 0,0	<0,2	1,4 ± 0,1	<0,4	0,6 ± 0,0	9,5 ± 1,5	32,5
	02/03	Immature	0,04	0,1	9,1	0,1	<0,2	2	<0,4	0,7	1,8 ± 0,2	46,2
		Mature	0,4 ± 0,0	0,8 ± 0,1	14,0 ± 0,2	0,2 ± 0,0	<0,2	2,1 ± 0,2	<0,4	0,6 ± 0,2	1,8 ± 0,2	50,7
Lesconil	06/03	Mature	0,1 ± 0,0	nd	nd	nd	0,2 ± 0,1	nd	nd	nd	nd	nd

Variations saisonnières du profil hormonal dans le plasma de flet mâles (ng.g⁻¹, moyenne ± écart-type, n=3) et rapport androgènes/œstrogènes (R). (nd : non déterminé).

	Date	Maturité	T	A	kT	E1	E2	Pn	Pg	OHPn	OHPg	R
Seine	02/02	Mature	2,2	11,1	12,6	0,6	<0,2	4,1	<0,6	1,4	13,7	37
	09/02	Mature	0,3	5,3	0,5	0,5	<0,2	6,3	<0,6	1,6	2,6	10
	02/03	Immature	0,3	7,1	<0,8	1,5	<0,2	12,9	<0,6	1,9	4,1	5
		Mature	0,7 ± 0,1	14,2 ± 1,3	18,0 ± 2,6	0,8 ± 0,1	<0,2	2,3 ± 0,4	<0,6	1,7 ± 0,2	5,4 ± 0,8	37
Lesconil	01/03	Immature	1,3 ± 0,1	6,5 ± 0,2	<0,8	1,3 ± 0,2	<0,2	9,0 ± 0,4	<0,6	8,0 ± 0,1	8,7 ± 0,5	6
	01/03	Mature	1,5 ± 0,1	7,3 ± 0,6	27,8 ± 1,2	1,4 ± 0,1	<0,2	2,9 ± 0,8	<0,6	3,0 ± 0,6	8,0 ± 0,5	24
	06/03	Mature	0,7 ± 0,1	13,7 ± 2,9	3,1 ± 0,1	0,30 ± 0,02	<0,2	4,8 ± 1,1	<0,7	3,1 ± 0,9	2,4 ± 0,4	3

Variations saisonnières du profil hormonal dans les testicules de flet mâles (ng.g⁻¹, moyenne ± écart-type, n=3) et rapport androgènes/œstrogènes (R).

Annexe 14 : Profils hormonaux chez le flet FEMELLE (*Platichthys flesus*)

	Date	Maturité	T	A	kT	E1	E2	Pn	Pg	OHPn	OHPg	R
Seine	02/02	Mature	0,1	1,1	7,2	0,4	0,5	2,0	<0,4	0,9	8,4	9,4
	02/03	Immature	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	3,1 ± 0,3	0,7 ± 0,1	1,3 ± 0,4	4,1 ± 0,1	<0,4	1,3 ± 0,2	5,0 ± 0,7	1,9
		Mature	3,0 ± 0,1	2,4 ± 0,1	1,3 ± 0,2	2,9 ± 0,2	14,3 ± 0,6	4,4 ± 0,5	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1	4,5 ± 0,4	0,4
		Ponte terminée	0,1	0,2	3,6	0,2	0,5	1,3	<0,4	0,6	2,2	12,0
		Ponte en cours	0,2	0,3	0,3	0,2	0,6	1,7	<0,4	0,5	1,7	2,1
Lesconil	01/03	Mature	2,7 ± 0,1	3,4 ± 0,2	3,2 ± 0,6	3,4 ± 0,5	13,2 ± 0,3	2,4 ± 0,1	<0,4	0,5 ± 0,1	3,7 ± 0,4	0,6
		Mature	<0,1	nd	nd	nd	0,2 ± 0,0	nd	nd	nd	nd	nd

Variations saisonnières du profil hormonal dans le plasma de flet femelles (ng.g⁻¹, moyenne ± écart-type, n=3) et rapport androgènes/œstrogènes (R). (nd : non déterminé).

	Date	Maturité	T	A	kT	E1	E2	Pn	Pg	OHPn	OHPg	R
Seine	02/02	Mature	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,1	<0,8	0,60	1,2 ± 0,3	3,3 ± 0,4	<0,6	3,1 ± 0,1	2,5 ± 0,2	1,4
	09/02	Mature	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,2	<0,8	1,4 0,4	0,9 ± 0,2	3,7 ± 0,8	<0,6	0,6 ± 0,2	2,5 ± 0,3	0,9
	02/03	Immature	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	<0,8	1,5	1,0 ± 0,1	1,8 ± 0,6	<0,6	2,8 ± 0,6	2,6 ± 0,8	0,7
		Mature	2,5 ± 0,1	1,4 ± 0,2	<0,8	0,8 ± 0,1	6,8 ± 0,1	2,5 ± 0,2	<0,6	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	4,8
		Ponte terminée	0,7 ± 0,0	0,6 ± 0,1	<0,8	<0,2	3,0 ± 0,2	23,4 ± 1,0	<0,6	11,4 ± 1,2	3,2 ± 0,4	8,5
		Ponte en cours	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,2	<0,8	2,7 ± 0,2	1,1 ± 0,1	11,4 ± 1,0	<0,6	8,5 ± 0,1	1,7 ± 0,4	0,8
Lesconil	01/03	Mature	4,6 ± 0,4	0,9 ± 0,3	<0,8	1,1 ± 0,2	5,9 ± 0,2	3,1 ± 0,7	<0,6	0,6 ± 0,2	0,6 ± 0,1	4,9
	06/03	Mature	0,8 ± 0,0	0,4 ± 0,0	<0,8	4,9 ± 0,2	1,1 ± 0,1	2,7 ± 0,1	<0,6	1,1 ± 0,7	1,4 ± 0,3	0,3

Variations saisonnières du profil hormonal dans les ovaires de flet femelles (ng.g⁻¹, moyenne ± écart-type, n=3) et rapport androgènes/œstrogènes (R).

Annexe 15 : Suivi *Mytilus sp.*
(hormones, indice de condition et taux de lipides)

Mois	Males								Femelles							
	T eau (°C)	Pg C	et	Pn C	et	IC %	et	T lipides %	Pg C	et	Pn C	et	IC %	et	T lipides %	
29/05/02	18	1,4	0,3	7,6	1,6	75,0	10,0	7,0	2,0	0,3	6,2	1,6	66	9	7,3	
26/06/02	21	7,1	1,8	5,3	0,5	83,0	14,0	7,2	8,9	1,7	6,5	0,2	67	7	8,4	
24/07/02	23	0,5	0,2	5,5	0,7	55,0	8,0	9,4	0,7	0,1	7,7	0,5	52	9	—	
02/09/02	20	0,4	0,1	2,6	0,2	70,0	14,0	10,3	0,3	0,0	1,6	0,2	63	10	12,9	
30/10/02	14	0,0	0,0	0,9	0,2	60,0	12,0	8,2	0,0	0,0	1,2	0,5	62	7	8,6	
02/12/02	11	0,0	0,0	2,9	0,4	68,0	5,0	8,3	0,0	0,0	2,2	0,2	71	11	9,0	
09/01/03	8	0,0	0,0	1,4	0,2	54,0	2,0	8,8	0,0	0,0	1,8	0,1	63	7	9,5	
18/02/03	7	0,0	0,0	2,5	0,3	49,0	20,0	8,5	0,0	0,0	2,2		50	7	8,3	
17/03/03	13	0,0	0	1,5	0,2	58,0	9,0	8,2	0,0	0,0	1,9	0,6	53	9	9,9	
24/04/03	16	1,8	0,7	1,3	0,1	64,0	5,0	8,2	5,4	1,1	1,8	0,3	51	8	9,0	
26/05/03	19	0,0	0,0	1,3	0,1	47,0	6,0	7,2	0,0	0,0	1,5	0,1	44	7	8,0	
25/06/03	25	0,0	0,0	7,2	0,3	64,1	12,4	5,7	0,0	0,0	9,0	1,9	55	17	7,2	
28/07/03	24	0,0	0,0	5,0	0,9	75,2	13,8	8,3	0,0	0,0	5,1	0,3	75	14	8,3	
11/09/03		0,0	0,0	5,6	1,0			5,5	0,0	0,0	5,6	1,0			—	
24/11/03	12	0,0	0,0	1,7	0,2	73,5	11,5	9,5	0,0	0,0	1,5	0,1	68	12	11,1	
11/02/04	13	0,0	0,0	0,5	0,0	65,6	11,1	6,6	0,0	0,0	0,7	0,2	53	8	6,7	
10/03/04	11	0,0	0,0	1,3	0,1	44,5	9,6	6,1	0,0	0,0	1,3	0,5	43	6	7,0	
05/04/04	15	3,9	0,8	0,9	0,2	50,1	8,9	7,2	1,5	0,7	1,1	0,5	56	13	5,6	
05/05/04	16	1,0	0,1	1,1	0,7	52,1	8,6	5,8	0,0	0,0	1,4	0,3	56	12	7,1	

Indices de condition (IC), concentration en progestérone (Pg) et en prégnéolone (ng.g⁻¹) et taux de lipides chez *Mytilus sp.* (Jetée de la Chapelle, Bassin d'Arcachon).

RESUME

L'objet initial de ces travaux de thèse était de développer des méthodes d'analyse des stéroïdes hormonaux (androgènes, œstrogènes et progestagènes) dans diverses matrices d'intérêt environnemental (eau, sédiment, matériel biologique). Le but était d'appliquer ensuite ces procédures analytiques (associant extraction sur phase solide et chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) à l'étude des stéroïdes hormonaux dans les systèmes aquatiques, en tant qu'hormones endogènes chez différents organismes ou en tant que contaminants issus du métabolisme hormonal humain (stéroïdes naturels et synthétiques), excrétés via l'urine et les excréments et introduits dans les milieux aquatiques essentiellement via les stations d'épuration.

La présence des stéroïdes hormonaux dans l'estuaire de la Seine a ainsi été étudiée lors de quatre campagnes d'échantillonnage entreprises en 2002. Aucun analyte n'a pu être détecté dans l'eau de surface de l'estuaire, mais les œstrogènes naturels l'ont été dans les rejets de deux stations d'épuration (ng.L^{-1}). La contamination d'un affluent de la Garonne, la Jalle d'Eysines, impacté par les rejets d'une station d'épuration a également fait l'objet d'une étude : les profils de concentration des stéroïdes hormonaux en aval du rejet (jusqu'à 10 km) ont été déterminés. Les œstrogènes naturels, seuls analytes détectés, disparaissent ainsi rapidement de la phase dissoute de la colonne d'eau en conditions estivales ; en conditions hivernales, cependant, aucune baisse significative n'a été observée. Les processus d'adsorption semblent jouer un rôle mineur dans ces phénomènes et la chute des niveaux d'œstrogènes semble plutôt liée à la biodégradation et, peut-être, à la photolyse.

L'impact de différents xénobiotiques sur le profil des stéroïdes endogènes du turbot (*Psetta maxima*), a été étudié par le biais d'expositions en milieu contrôlé. Parmi les composés testés, bisphénol A, p-nonylphénol et 17α -éthynylœstradiol se sont avérés être les perturbateurs endocriniens les plus puissants. Ces trois xénoœstrogènes sont capables d'induire une chute significative du rapport androgènes/œstrogènes, notamment chez les individus mâles et ce, dans les trois compartiments biologiques étudiés (gonades, plasma et bile). Ces trois composés agissent cependant de manière différente, puisque le bisphénol A tend à augmenter les niveaux d'œstrone, tandis que les deux autres composés tendent à faire chuter les niveaux d'androgènes, indiquant des modes d'action différents sur la stéroïdogénèse.

Mots clés : perturbation endocrinienne, stéroïdes, œstrogènes, progestagènes, androgènes, profil hormonal, station d'épuration, eaux de surface, biogéochimie.

SUMMARY

Analytical methodologies have been developed for the determination of sex steroids in environmental samples such as water, bed sediment or biological matrices. The aim of this work was to apply these procedures (SPE coupled to GC/MS) to the study of sex steroids in aquatic systems, either as contaminants introduced via sewage discharge or as endogenous substances present in fishes or in molluscs.

The occurrence of sex steroids in the Seine river estuary was investigated. None of the analytes steroids could be detected in surface water, but natural estrogens were detected at low level (ng.L^{-1}) in sewage treatment plant effluent; synthetic steroids were never detected, whatever the sample type and the sampling time. Concentrations of hormonal steroids were also determined in the effluent of the Eysines sewage treatment plant (nearby Bordeaux, France), and along the receiving river, the Jalle d'Eysines River. Levels of estrogens were clearly raised above the detection limits downstream of the effluent discharge. Seasonal variations of estrone loss rates were observed, since a rapid decrease of estrone levels was observed in summer, while no significant degradation could be observed in winter. The apparent loss was probably due to both biodegradation and photolysis, since sorption appeared to play a minor role in this process.

The impact of several xenobiotics on the steroid hormone profiles in juvenile turbot (*Psetta maxima*) was also investigated. Bisphenol A, p-nonylphenol and 17α -ethynylestradiol, three well-known xenoestrogens, were found to be able to lower the androgen to estrogen ratio. Although the two latter compounds were able to depress androgen synthesis, bisphenol A exhibited a different mode of action since it induced an increase of estrogen levels in plasma and gonads. Overall, males were found to be much more sensitive than females.

Keywords : endocrine disruption, steroids, estrogens, progestins, androgens, hormonal profile, sewage works, surface water, biogeochemistry.