

FRANCO-BRITISH INTERREG EUROPEAN PROGRAMME



PROGRAMME EUROPEEN FRANCO-BRITANNIQUE INTERREG IIIA

**ANALYSE DES RISQUES ASSOCIES AUX PERTURBATEURS
ENDOCRINIENS EN MANCHE ORIENTALE (ARPE)**

**RISK ANALYSIS ASSOCIATED WITH ENDOCRINE DISRUPTION
IN THE MANCHE REGIONS (RAED)**

**RAPPORT FINAL / FINAL REPORT
PHASE II**

Janvier/ January, 2009

C. MINIER, P. MALTRET, T. MONSINJON, T. KNIGGE, J. LERAY, C. LECOMTE, S. BARKA & X. DENIER¹
R. AMARA & J. SELLESLAGH²
E. M. HILL, J.M. ROTCHELL, E. CUBERO & C. CIOCAN³
G. DUSSART & J. TRIGWELL⁴
S. ST PIERRE, N. PRINGLE & R. PEPPER⁵

¹Laboratoire d'Ecotoxicologie Milieux Aquatiques (LEMA) - Université du Havre

²Université du Littoral, Côte d'Opale

³Center for Environmental Research, University of Sussex

⁴Biological Sciences, Canterbury Christ Church University College, Canterbury

⁵Sussex Ouse Conservation Society



REMERCIEMENTS

Les auteurs de ce rapport tiennent à remercier :

- les organismes financeurs :
 - la Communauté Européenne ;
 - la Région Haute-Normandie ;
 - les Agences de l'Eau Seine-Normandie et Artois-Picardie ;
 - l'Agence Environnementale Anglaise ;
- les personnes sans qui ce projet n'aurait pu être réalisé et travaillant dans les différentes institutions et associations :
 - l'Autorité de Gestion du programme INTERREG IIIA au Conseil Régional de Haute-Normandie ;
 - le Government Office for the South East (GOSE);
 - les services de gestion des organismes impliqués dans le projet ;
 - les associations de pêcheurs
 - la Carpe Posienne ;
 - la Brême d'Elbeuf ;
 - les Babillards à Audruicq
 - l'Office National d'Etudes des Milieux Aquatiques (ONEMA) ;
 - les pisciculteurs (monsieur et madame Hoydrie);
 - le service d'anatomie-pathologie de l'Hôpital Jacques Monod au Havre ;
 - Le laboratoire d'Ecotoxicologie de l'INERIS à Verneuil-en-Halatte.

Il a été particulièrement agréable et enrichissant de travailler avec chaque personne.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors of this report would like to thank:

- the financing organizations:
 - the European Community;
 - the Région Haute-Normandie;
 - the Agences de l'Eau Seine-Normandie et Artois-Picardie ;
 - the Environmental Agency;
- all people without whom this project could not have been carried out and who are working in various institutions and associations including:
 - the Managing Authority of the INTERREG IIIA program at the Regional Council of Haute-Normandie;
 - the Government Office for the South East (GOSE);
 - the managing departments of the project partners;
 - the associations of fishermen
 - la Carpe Posienne ;
 - la Brême d'Elbeuf ;
 - les Babillards à Audruicq.
 - the Office National d'Etudes des Milieux Aquatiques (ONEMA) ;
 - Mrs and Mr Hoydrie;
 - the service of anatomy-pathology of the Hospital Jacques Monod in Le Havre.
 - The laboratory of Ecotoxicologie de l'INERIS à Verneuil-en-Halatte

TABLE DES MATIERES

	Page
I. INTRODUCTION GENERALE.....	9
II. ETUDE DES PERTURBATIONS ENDOCRINIENNES CHEZ LES MOLLUQUES BIVALVES.....	12
II.1. Concentration en œstradiol libre et expression de genes liés au cycle gamétogénétique annuel chez la moule zébrée <i>Dreissena polymorpha</i>	13
1.1. Introduction	13
1.2. Méthodes	15
1.3. Résultats et discussion	18
1.4. Conclusions	30
1.5 Références.....	31
2. Identification de biomarqueurs de perturbation endocrinienne chez la moule marine, <i>Mytilus edulis</i> : une approche métabolomique.....	33
2.1. Introduction.....	33
2.2. Méthodes	34
2.3. Résultats	39
1.4. Résumé/Conclusions	47
3. Développement d’outils moléculaires pour l’étude de la contamination chimique.....	48
3.1. Introduction.....	48
3.2. Gènes œstrogéno-régulés et effets des composés œstrogéniques (naturels et synthétiques) et des saisons.....	49
3.3. Développement d’un outil analytique lié à la quinone réductase pour l’évaluation de la génotoxicité chez la moule (<i>M.edulis</i>).....	53
3.4. Développement d’un outil analytique lié à la cyclooxygénase pour l’évaluation de l’œstrogénicité chez la moule.....	56
III. ETUDE DES PERTURBATIONS ENDOCRINIENNES CHEZ LES POISSONS TELEOSTEENS.....	59
1. Etude biochimique et histologique de la reproduction du gardon en Haute-Normandie.....	60
1.1. Introduction.....	60
1.2.. Matériel et méthodes.....	61
1.3. Résultats.....	62
1.4. Discussion.....	72
1.5. Conclusions.....	75
2. Etude des variations saisonnières des taux d’hormones stéroïdiennes chez le gardon.....	76
2.1. Introduction.....	76
2.2. 11-cétotestostérone	77

2.3. 17- β -œstradiol	80
2.4. Progestérone	83
2.5. Vitellogénine plasmatique	85
2.6. Taux de stéroïdes chez des gardons de sites contaminés	87
2.7. Vitellogénine plasmatique chez les gardons des sites contaminés	88
2.8. Discussion	89
3. Etude des conséquences physiologiques de l'infection du gardon par le parasite <i>Ligula intestinalis</i>	92
3.1. Introduction.....	92
3.2. Méthodes.....	93
3.3. Résultats.....	94
3.4. Discussion.....	99
3.5. Conclusions.....	100
4. Etude de l'expression de l'aromatase dans le cerveau et les gonades des gardons.....	101
4.1. Introduction.....	101
4.2. Matériel et méthodes.....	102
4.3. Résultats.....	104
4.4. Discussion.....	114
4.5. Conclusions.....	116
4.6. Références.....	117
5. Etude de la contamination œstrogénique en estuaire de Seine et identification des composés actifs dans la bile de flet.....	118
5.1. Résumé.....	118
5.2. Introduction.....	119
5.3. Vitellogénine et oestrogénicité chez les flets femelles	121
5.4. Vitellogénine et oestrogénicité chez les flets males	125
5.5. Identification des composés œstrogéniques	127
5.6. Discussion.....	132
5.7. Conclusions.....	137
6. Croissance et condition des juvéniles du groupe-0 de flet, <i>Platichthys flesus</i> comme indicateurs de la qualité des habitats estuariens	142
6.1. Résumé.....	142
6.2. Introduction.....	143
6.3. Matériel et méthodes.....	148
6.4. Résultats.....	156
6.5. Discussion.....	161
IV. MESURES SUR SITES	170
1. Evaluation de la qualité des eaux dans la rivière Ouse et ses affluents.....	171

1.1. Introduction.....	171
1.2.. Analyses chimiques.....	171
1.3. Mesures biologiques.....	173
1.4. Conclusions	179
2. Cartographie des composés et perturbations estrogéniques en Manche Orientale.....	181
V. COMMUNICATION DES RESULTATS	184
1 Introduction	185
2 Conférences scientifiques	185
3 Communication au public	186
4 Publications scientifiques.....	187
VI. CONCLUSIONS.....	190

CONTENT

	Page
I. GENERAL INTRODUCTION.....	9
II. ENDOCRINE DISRUPTION IN BIVALVES.....	12
1. Free estradiol levels and gene activities related to the annual gametogenic cycle of the zebra mussel <i>Dreissena polymorpha</i>	13
1.1. Introduction	13
1.2. Methods	15
1.3. Results and discussion	18
1.4. Conclusions	30
1.5. References.....	31
2. Identification of biomarkers of endocrine disruption in the marine mussel, <i>Mytilus edulis</i> : a metabolomic profiling approach	33
2.1. Introduction	33
2.2. Methods	34
2.3. Results	39
2.4. Summary/ Conclusions	47
3. Development of molecular analytical tools for monitoring of chemical contaminants	48
3.1. Introduction.....	48
3.2. Estrogen regulated genes and the effects of different estrogen compounds (natural and human-made) and season.....	49
3.3. Development of quinone reductase (QR) gene as an analytical tool for genotoxic chemicals from mussel (<i>M.edulis</i>).....	53
3.4. Development of the cyclooxygenase (COX)-2 gene as a molecular analytical tool of estrogenic exposure in mussels.....	56
III. ENDOCRINE DISRUPTION IN TELEOST	59
1. Biochemical and histological study of the roach reproduction in haute normandy... ..	60
1.1. Introduction	60
1.2. Material and methods	61
1.3. Results	62
1.4. Discussion	72
1.5. Conclusions	75
2. Seasonal variations of steroid hormones in roach.....	76
2.1. Introduction	76
2.2. 11-kétotestostérone	77
2.3. 17- β -œstradiol	80

2.4. Progesterone	83
2.5. Plasma vitellogenin	85
2.6. Steroid levels in roach from contaminated sites	87
2.7. Plasma vitellogenin in roach from contaminated sites.....	88
2.8. Discussion	89
3. A study on consequences of the tapeworm <i>Ligula intestinalis</i> on its teleost host, the roach (<i>Rutilus rutilus</i>).....	92
3.1. Introduction.....	92
3.2. Methods.....	93
3.3. Results.....	94
3.4. Discussion.....	99
3.5. Conclusions.....	100
4. <i>CYP19a</i> and <i>b</i> gene expression in roach (<i>Rutilus rutilus</i>).....	101
4.1. Introduction.....	101
4.2. Materials and methods.....	102
4.3. Results.....	104
4.4. Discussion.....	114
4.5. Conclusions.....	117
5. Investigation of estrogenic contamination in the Seine estuary: Plasma vitellogenin and estrogenicity identification evaluation of flounder bile content....	118
5.1. Abstract.....	118
5.2. Introduction.....	119
5.3. Vitellogenin concentration and bile estrogenicity in female flounder	121
5.4. Vitellogenin and bile estrogenicity in male flounder	125
5.5. Identification of estrogenic compounds	127
5.6. Discussion.....	131
5.7. Conclusions.....	137
6. Growth and condition of 0-group European flounder, <i>Platichthys flesus</i> as indicators of estuarine habitat quality	142
6.1. Abstract.....	142
6.2. Introduction.....	143
6.3. Materials and methods.....	148
6.4. Results.....	156
6.5. Discussion.....	161
IV. ENVIRONMENTAL SURVEY	170
1. Monitoring of water quality in the Sussex River Ouse and its tributaries	171
1.1. Introduction.....	171
1.2. Chemical analyses	171

1.3. Biological Monitoring	173
1.4. Conclusions	179
2. Maps of estrogenic compounds and effects in the Manche Orientale region	181
V. DISSEMINATION OF RESULTS	184
1 Introduction	185
2 Scientific meetings	185
3 Dissemination to the general public	186
4 Publications	187
VI. CONCLUSIONS.....	190

I

INTRODUCTION GENERALE

/

GENERAL INTRODUCTION

Les perturbations endocriniennes sont des modifications défavorables du système de contrôle hormonal de la physiologie d'un organisme. Or ce système endocrinien, dont les effecteurs sont les hormones, est essentiel à de nombreuses régulations dans un organisme. Il contrôle par exemple le développement des organes et leurs activités métaboliques, les équilibres en ions et autres composés du milieu intérieur et la reproduction. Les modifications du système endocrinien peuvent s'opérer à de nombreux niveaux, depuis la synthèse des hormones jusqu'à leur élimination en incluant le transport des molécules et leur mécanisme d'action. Chaque interférence peut avoir des conséquences très importantes sur la santé des individus.

De nombreux composés présents dans l'environnement peuvent interférer avec le système endocrinien. L'étude des perturbations endocriniennes est donc très vaste puisqu'elle combine un nombre très important de polluants (il existe environ 100 000 composés d'utilisation courante), une diversité importante d'hormones (différant au niveau de leur structure et de leurs mécanismes d'action), et un ensemble vaste d'organes qui sont autant de cibles des perturbations.

Endocrine disrupters can disrupt the normal neuroendocrine control of the physiology of a given organism. The endocrine system, whose effectors are hormones, is essential to the regulation of many processes within an organism. It controls, for example, the development of organs and their metabolic activity, the balance of ions and other compounds of the internal environment and it also regulates reproductive development and differentiation. The disruption of the endocrine system can occur at many levels of the biological organisation, from synthesis to catabolism of hormones and including the transport of molecules and their mechanism of action. These methods of disruption may have very important consequences on the health of individuals.

Many compounds in the environment may interfere with the endocrine system. The study of endocrine disruption is very broad because it combines a very large number of pollutants (there are approximately 100 000 compounds commonly in use worldwide), a variety of important hormones (differing in their structure and their mechanisms of action), and a wide range of organs that are targets for endocrine disrupters.

Dans ce programme de recherche, l'étude des risques que constituent les perturbateurs endocriniens pour la santé des écosystèmes a été envisagée à différents niveaux. Des interactions moléculaires souvent impliquées dans le mécanisme d'action des hormones ont été prises en compte avec une attention particulière sur les récepteurs des hormones stéroïdiennes impliquées dans la reproduction. Associées à ces modifications moléculaires, des effets sur la reproduction et le développement ont été étudiés par des investigations histopathologiques d'organes importants ou par les conséquences observables sur les individus. Cette association vise à constituer un ensemble cohérent d'informations concourant à identifier les perturbations endocriniennes et leurs conséquences. En plus de cette complexité biologique (des molécules à l'association d'organes coordonnés dans un individu), les travaux ont aussi pris en compte la diversité de formes de vie et de physiologies. Ainsi les investigations ont non seulement concernés des vertébrés (deux espèces de poissons en particulier : le gardon et le flet), mais aussi les mollusques (moules marines et d'eau douce). Cette diversité d'espèce étudiées permet d'apporter des informations fondamentales sur la physiologie des différents animaux (et de leurs régulations hormonales) et des différents milieux dans lesquels ils vivent (rivières, côtes).

Le présent rapport, présentant les travaux effectués dans la deuxième phase du projet (2006-2008), est découpé en plusieurs chapitres. Le premier présente les travaux effectués chez les mollusques tandis que le second présente les résultats des études effectuées chez les poissons. Deux buts ont chaque fois été poursuivis : accroître

In this research project, risk analysis related to endocrine disrupters was investigated at different levels. Molecular interactions often involved in the mechanism of action of hormones have been taken into account with particular attention on steroid hormone receptors involved in reproduction. Associated with these molecular changes, effects on reproduction and development have been studied by histopathological investigations of important target organs and by observations of consequences on individuals. These measurements aim to provide a coherent set of information contributing to identify endocrine disruption and their consequences. In addition to the biological complexity (from molecules to the coordinated association of organs in a given individual), the work also took into account the diversity of life forms and physiologies. Thus the investigations have not only concerned vertebrates (two fish species in particular: the roach and flounder), but also molluscs (mussels marine and freshwater). This diversity of species studied will provide basic information about the physiology of different animals (and their hormonal regulation) and the different environments in which they live (rivers, coastlines).

This report on the work carried out in the second phase (2006-2008), is divided into four main sections. The first presents the work performed in molluscs while the second presents the results of studies conducted in fish. Two goals have been pursued: increasing our understanding of the

nos connaissances de la physiologie des organismes concernés et apporter des informations sur les dysfonctionnements liés aux régulations endocriniennes. En effet, il est évident que nos connaissances fondamentales limitent les évaluations de l'état de santé de l'environnement. Nos travaux permettent donc de développer de nouveaux indicateurs contribuant à cette évaluation des risques associés aux perturbateurs endocriniens. La troisième section correspond à l'effort qui a été fait de cartographier les risques sur la région éligible tandis que la dernière section illustre le travail de dissémination des résultats depuis l'échelle locale à l'échelle la plus large.

physiology of organisms and providing information on malfunctions related to endocrine regulations. Indeed, it is clear that our limited knowledge of the physiology of these species can influence our ability to assessing the health of the environment. Our work thus allowed us to develop new indicators contributing to the evaluation of risks associated with endocrine disrupters. The third section details the effort that has been done to map risks in the eligible region while the final section shows the work of disseminating the results from the local to the widest scale.

Partie / part

II

**ETUDE DES PERTURBATIONS ENDOCRINIENNES CHEZ LES MOLLUQUES
BIVALVES**

/

ENDOCRINE DISRUPTION IN BIVALVES

1. CONCENTRATIONS EN ESTRADIOL LIBRE ET ACTIVITES DES GENES LIES AU CYCLE GAMETOGENIQUE ANNUEL DE LA MOULE ZEBREE *DREISSENA POLYMORPHA*

1.1 Introduction

Chez les vertébrés, les perturbateurs endocriniens (EDC) les plus puissants sont les stéroïdes sexuels des vertébrés eux-mêmes, mais aussi leurs dérivés et analogues synthétiques car ils interagissent avec les récepteurs nucléaires impliqués dans l'activation des gènes sous contrôle hormonal (Depledge, 1999).

La présence d'hormones sexuels de vertébrés a également été rapportée chez des invertébrés tels que des mollusques (Reis-Henriques *et al.*, 1990; Gauthier-Clerc *et al.*, 2006; Peck *et al.*, 2007). Toutefois la présence des récepteurs respectifs ainsi que leurs fonctionnalités est encore ouvert à discussion (Baker, 2003; Keay *et al.*, 2006; Bannister *et al.* 2007; Köhler *et al.* 2007). C'est ainsi très surprenant et intrigant de savoir si les hormones stéroïdes des vertébrés présents chez les invertébrés ont une origine endogène, ce qui laisserait supposer un rôle fonctionnel de ces hormones dans la physiologie des invertébrés ou au contraire si ces hormones sont d'origine environnementale et simplement métabolisés après leur absorption. Chose intéressante, les enzymes nécessaires à la métabolisation des hormones stéroïdes existent chez les mollusques (Janer *et al.*, 2004), ce qui semble indiquer une fonction intrinsèque de ces molécules dans le métabolisme des invertébrés. Néanmoins si une synthèse endogène de ces hormones telles que l'estradiol

1. FREE ESTRADIOL LEVELS AND GENE ACTIVITIES RELATED TO THE ANNUAL GAMETOGENIC CYCLE OF THE ZEBRA MUSSEL *DREISSENA POLYMORPHA*

1.1 Introduction

Considering vertebrate species, the most powerful endocrine chemicals compounds (EDC) are certainly to be found amongst the vertebrate sex steroids, their derivatives as well as their synthetic counterparts, as they interact with the nuclear receptors involved in the activation of genes under hormonal control (Depledge, 1999). The occurrence of vertebrate sex steroids has also been reported for invertebrate species, such as molluscs for instance (Reis-Henriques *et al.*, 1990; Gauthier-Clerc *et al.*, 2006; Peck *et al.*, 2007). However, the presence of the respective receptors as well as their functionality is subject to ongoing discussion (Baker, 2003; Keay *et al.*, 2006; Bannister *et al.*, 2007; Köhler *et al.*, 2007). It is thus intriguing whether vertebrate steroid hormones in invertebrate animals are indeed of endogenous origin, which would assume a functional role in invertebrate physiology, or if they are rather taken up from the environment and merely metabolised following absorption. Interestingly, the necessary enzymes for metabolising steroid hormones have been demonstrated to exist in molluscs (Janer *et al.*, 2004), which may indicate an intrinsic function of these molecules in invertebrate metabolism. Nonetheless, if one could assume an endogenous synthesis of hormones like oestradiol in molluscs or other invertebrates, their role in regulating the

chez des mollusques ou tout autre invertébré est présumée, leur rôle dans la régulation du cycle gamétogénique ainsi que dans le développement sexuel reste à élucider. Afin de répondre à cette question fondamentale, il est tout à fait raisonnable de rechercher les changements des taux d'œstradiol, hormone sexuelle féminine tout au long du cycle gamétogénique afin de visualiser si une corrélation peut être observée.

Dans ce but, nous avons mesuré les taux d'œstradiols libres chez des individus de moule zébrée originaire d'un site de référence non pollué dont le cycle gamétogénique avait été analysé antérieurement (rapport de 2007). Afin de pouvoir relier les taux d'œstradiol libres au développement des oocytes, une mesure quantitative du développement des oocytes a été menée à partir de la technique de stéréologie.

Comme il le fut mentionné précédemment, les éléments clés du système endocrinien des vertébrés ne sont pas complètement confirmés chez les invertébrés. Par voie de conséquence, l'extrapolation des mécanismes régulés par les hormones stéroïdiennes tels que nous les connaissons chez les vertébrés pour les invertébrés doit être faite avec beaucoup de réserve. Pour le moins nous avons appris que des difficultés significatives survenaient lorsque nous avons essayé d'utiliser des indicateurs équivalents à la fois chez les mollusques comme chez les poissons. Ceci fut testé à la fois pour la vitellogénine mais aussi pour les récepteurs aux œstrogènes (Puinean *et al.*, 2006; Keay *et al.*, 2006; Bannister *et al.*, 2007).

Bien que certaines des difficultés puissent être circonscrites et certaines des informations

gametogénique cycle as well as the sexual development remains to be elucidated. To answer this fundamental question, it might be sensible to investigate changes in the levels of oestradiol, the female sex hormone, throughout the gametogenic cycle to see whether any correlation can be observed. We have thus measured free oestradiol levels in female specimens of the zebra mussels from an unpolluted reference site, the gametogenic cycle of which has been analysed previously (see 2007 report). To be able to relate free oestradiol levels to oocyte development a quantitative measure of the latter had to be carried out for which stereology was used.

As is insinuated by the aforementioned, key elements of the vertebrate endocrine system are not fully confirmed in invertebrates. Consequently, deducing mechanisms regulated by steroid hormones from vertebrates to invertebrate species has to be done with reservation. At least we have learned that significant difficulties occur when trying to use equivalent indicators in molluscs as in fish. This has been experienced for vitellogenin as well as for the oestrogen receptor (Puinean *et al.*, 2006; Keay *et al.*, 2006; Bannister *et al.*, 2007). Although some of the difficulties might be overcome and some of the missing pieces will be found with ongoing research, it is also necessary to envisage other roles and mechanisms in the control of reproductive and developmental processes. Despite the fact that directed approaches could be successful when based on founded prior knowledge, the latter is often absent. In this case, an open or global approach provides an option to discover unknown

manquantes puissent être découvertes en poursuivant les recherches, il semble nécessaire d'envisager d'autres rôles et mécanismes dans le contrôle des processus développementaux et reproductifs. En dépit du fait que des approches dirigées peuvent être couronnées de succès lorsqu'elles sont basées sur des connaissances fondées acquises antérieurement, ces dernières sont souvent absentes. Dans ce cas, une approche ouverte et globale fournit une bonne option afin de découvrir des éléments inconnus des processus en question. Par conséquent, nous avons eu recours à la technique d'hybridation soustractive et suppressive (SSH) pour étudier l'expression des gènes qui sont possiblement liés aux principaux événements du cycle gamétogénique de la moule zébrée.

1.2 Méthodes

1.2.1. Echantillonnage

Des moules ont été échantillonnées mensuellement dans le bassin d'une ancienne carrière à Yville-sur-Seine durant une année (de février/mars 2005 à février/mars 2006). Des analyses antérieures avaient démontrées une faible contamination estrogénique de ce bassin (cf rapport antérieur).

20 moules zébrées par échantillonnage ont été disséquées en laboratoire : une partie des gonades de ces moules a été traitée pour des analyses histologiques (d'après la méthode décrite dans le rapport antérieur) et l'autre moitié a été congelée pour des extractions ultérieures des stéroïdes par la méthode XY décrite dans des rapports antérieures. Les échantillons destinés à la SSH ont été prélevés séparément et congelés immédiatement sur site afin

constituants of the processes in question. Consequently, we have applied suppression subtractive hybridisation (SSH) to study the expression of genes which are possibly related to major events within the gametogenic cycle of the zebra mussel.

1.2 Methods

1.2.1. Sampling

Specimens of mussels were sampled monthly in a quarry pond at Yville-sur-Seine, throughout one year (February/March 2005 to February/March 2006). Previous analysis of the oestrogenic contamination has been shown to be low in this quarry pond (see previous report).

20 zebra mussels per sampling event have been dissected in the laboratory; one part of the gonad has been processed for histological analysis (according to the method described in the previous reports), the other part has been snap frozen for subsequent steroid extraction. Specimens for suppression subtractive hybridisation were taken separately and snap frozen immediately on-site to avoid any possible changes in gene expression.

d'éviter des changements possible de l'expression du transcriptome.

1.3.2. Stéréologie de l'oogenèse

Des analyses stéréologiques de sections histologiques ont été menées uniquement sur les ovaires, puisque les sections de testicules ne sont pas sensibles à ce type d'examen. Cette analyse décrite par Gundersen *et al.* (1988) fournit des informations quantitatives sur les structures microscopiques tridimensionnelles et dans le cas présent sur les volumes d'oocytes, basés sur les observations réalisées sur des coupes bidimensionnelles de gonades femelles. En plus de l'intégration du volume de l'oocyte (σV_v) qui est calculé comme étant le nombre de points comptés pour les oocytes divisés par le nombre de points total, nous avons également utilisé un comptage stéréologique par point pour estimer la distribution des différents stades de développement. Dans ce but, ce type de comptage doit être effectué de façon aussi précisément que possible afin de réduire les éventuels biais qui pourrait découler d'une interprétation suggestive des stades développementaux par la personne qui analyse les lames. Nous avons développé pour ce faire un schéma décisionnel basé sur de multiples descriptions du développement des oocytes chez les invertébrés et plus spécialement en faisant référence aux mollusques.

Six stades différents ont pu être identifiés sur les coupes histologiques qui sont (1) ovogonie-ovocyte prévitellogénique, (2) ovocyte vitellogénique précoce, (3) ovocyte vitellogénique, (4) ovocyte vitellogénique tardif, (5) ovocyte mature, (6) ovocyte atrétique. Les stades développementaux des ovocytes ainsi définis peuvent être mis en relation avec

1.2.2. Stereology of oogenesis

Stereological analysis of the histological sections has been carried out for ovaries only, as testes sections were not amenable to this type of examination. This analysis, as described in Gundersen *et al.* (1988), provides quantitative information about three-dimensional, microscopic structures, in this case oocyte volumes, based on observations made on two-dimensional sections of the female gonad. Besides integrating the overall oocyte volume (σV_v) which is calculated as the number of points tallied for oocytes divided by the overall number of points, we have also used stereological point-counting to estimate the relative distributions of oocyte developmental stages. For this purpose the latter had to be defined as precisely as possible in order to reduce possible bias which may derive from the analysts interpretation of developmental stages. We have thus developed a decision scheme based on several descriptions of oocyte development in invertebrates with special reference to molluscs. Six different developmental stages could be identified on the histological sections, which were (1) oogonia-previtellogenic oocytes, (2) early vitellogenic oocytes, (3) vitellogenic oocytes, (4) late vitellogenic oocytes, (5) mature oocytes and (6) atretic oocytes. The so-defined developmental stages of oocytes could, in part, be aligned with the developmental stages of zebra mussel gametogenesis, as described in the previous report.

les stades de la gamétogenèse des moules zébrée décrits dans un rapport antérieur.

1.2.3. Analyse des hormones stéroïdes

Le taux d'estradiol libre a été analysé selon la méthode décrite par Gauthier-Clerc *et al.* (2006). Avant de déterminer le taux d'estradiol par une technique ELISA compétitive, (test ELISA commercial pour dosage de l'estradiol, Cayman Chemical), les stéroïdes ont été extraits des gonades femelles en utilisant du dichlorométhane.

1.2.4. Suppression subtractive hybridisation (SSH)

Les trois différents stades de développement basés sur l'analyse du cycle gamétogénique conduit plus tôt durant ce projet (cf rapport antérieur) ont été choisis pour la comparaison de l'expression des gènes. Cinq individus de chacun des 3 stades de développement à savoir avant ponte (stade 1) correspondant à un indice somatique des gonades (GSI) <0.14, mature à post-ponte avec un GSI de 0.24 (stade 2) et un stade de repos caractérisé par un GSI de 0.10 ont été rassemblés. De ces pools, les ARNms ont été extraits et traités selon Boutet *et al.* (2004) et Tanguy *et al.* (2004) en utilisant le kit de soustraction Clontech. En tout, six différentes banques d'ADNc ont été créées correspondant aux trois stades mentionnés plus haut, chacun des stades est comparé avec un autre stade pour les gènes induits ou réprimés.

1.2.3. Steroid hormone analysis

Free oestradiol levels were analysed according to the method described by Gauthier-Clerc *et al.* (2006). Prior to the determination of oestradiol levels using a competitive immunoassay (commercial oestradiol ELISA, Cayman Chemicals), the steroids were extracted from female gonads using dichloromethane.

1.2.4. Suppression subtractive hybridisation (SSH)

Three different developmental stages as based on the analysis of the gametogenic cycle conducted earlier in the project (see previous report) were chosen for comparison of gene expression. Five specimens each of the respective developmental stages, *i.e.* pre-spawn (stage 1) corresponding to a gonad somatic index (GSI) of <0.14, ripe to post-spawn with a GSI of 0.24 and a resting stage having the lowest GSI of 0.10, were pooled. From these pools, mRNA was extracted and proceeded according to Boutet *et al.* (2004) and Tanguy *et al.* (2004) using the PCR-SELECT cDNA Subtraction Kit (Clontech) following the manufactures recommendations. Altogether, six different cDNA banks have been generated, corresponding to the three aforementioned stages, each compared with one another for up-regulated as well as for down-regulated genes between two conditions at a time.

1.3 Résultats et discussion

1.3.1 Ovogénèse

De façon simplifiée, la densité du volume total des oocytes reflète la progression du GSI des moules femelles pour une même période (cf rapport précédent) (Fig1).

Ainsi l'augmentation de la densité du volume de l'oocyte entraîne une augmentation équivalente du poids de la gonade femelle. Considérant que les changements de la densité du volume des ovocytes sont associés à différents classes d'ovocytes, une image plus détaillée du cycle gamétogénique femelle peut être obtenue ce qui permet une corrélation entre les changements structuraux et fonctionnels durant le développement des gonades. L'interprétation du cycle gamétogénique de la moule zébrée (voir rapport antérieur), a été soulignée par une série de données quantitatives. De façon notable la ponte marquée qui prend place en avril se déduit clairement d'une chute des densités de volume des stades de développement précoces (Fig. 2A) associée à une augmentation marquée des densités des stades de développement tardifs (Fig. 2B). La pente des courbes pour les cinq classes d'ovocytes décrites dans la figure 2 comme celle observée pour Février et Mars 2005 démontre un rapide développement à la fin de l'hiver et au début du printemps qui est probablement la conséquence d'une augmentation de la température durant cette période. Cette même augmentation de température en 2006 survient environ un mois plus tard et s'avère moins marquée ce qui peut expliquer la raison pour laquelle les activités correspondantes dans le développement des ovocytes ne sont pas représentées dans les données. La courbe de progression des différentes classes d'ovocytes

1.3 Results and discussion

1.3.1 Oogenesis

Basically the total oocyte volume density reflects the curve progression of the GSI of female zebra mussels determined for the same period (see previous report) (Fig. 1). Hence, the increase in oocyte volume density entails an equivalent weight increase of the female gonad.

Considering the changes in oocyte volume densities belonging to different classes of oocytes a more detailed picture of the female gametogenic cycle could be obtained which allows for correlation of structural and functional changes in gonad development. The interpretation of the gametogenic cycle of the zebra mussel (see previous report) has thus been underpinned by a series of quantitative data. Notably the marked spawning event in April, which we have reported earlier, is clearly deducible from the drop in volume densities of early developmental stages (Fig. 2A) combined with a sharp increase of those of later stages of development (Fig. 2B). The slope of the curves for all five classes of oocytes depicted in Fig. 2 as observed for February and March of 2005 demonstrates a rapid development in late winter to early spring which is likely to be triggered by a temperature increase in this period. The corresponding temperature rise in 2006 appeared about one month later and was less pronounced which may explain why the corresponding activities in oocyte development are not represented in the data

The curve progression of the different oocyte classes also displays that the number of oogonia/previtellogenic oocytes as well as early

montre également que le nombre d'ovogonie-ovocytes prévitellogéniques ainsi que celui des ovocytes vitellogéniques précoces restent à un niveau très important tous les mois, excepté pour la ponte et la fin de l'été (pvoV_v) et l'automne (evoV_v). Cela corrobore des observations faites précédemment de différents stades de développement présents durant la plupart de la période considérée.

A la fois les stades gamétogéniques mais aussi les densités des volumes spécifiques d'ovocytes suggèrent une grande plasticité du cycle gamétogénique de ces bivalves au moins en ce qui concerne les conditions environnementales et la structure populationnelle existant sur ce site d'Yville-sur-Seine.

Le volume global des ovocytes ainsi que les volumes spécifiques de chacun des ovocytes ont montré qu'une seconde ponte, d'importance moindre, pouvait être identifiée en été (juin à juillet) ce qui était peu évident au regard du GSI et de la distribution des stades gonadiques (cf rapport antérieur).

De plus, le minimum d'ovogonies-ovocytes prévitellogéniques en août ainsi que celui des ovocytes vitellogéniques précoces en septembre qui sont produits probablement à la suite de la ponte de l'été indiquent une période de repos qui est quelque peu limitée. Toutefois même si les moules recommencent rapidement à produire de nouvelles ovogonies et des stades d'ovocytes précoces, leurs développements ne s'effectuent pas durant les mois hivernaux.

vitellogenic oocytes remains at a considerable level over all months, except for spawning and late summer (pvoV_v) to autumn (evoV_v). This corroborates previous observations of several developmental stages being present for the most of the periods considered (see report 2007). Both, the gametogenic stages as well as the specific oocyte volume densities suggest a considerable amount of plasticity for the gametogenic cycle of this bivalve, at least for the given environmental conditions and the population structure present at this site.

The overall oocyte volume as well as the specific oocyte volumes also shows that a second, less important spawning event in summer (June to July) can be identified which was less obvious from the GSI and the distribution of gonad stages (see previous report).

Furthermore, the minima in oogonia/previtellogenic oocytes for August as well as in early vitellogenic oocytes for September, which are likely to follow the summer spawning, indicate a resting period, although quite limited in time. However, even though the mussels rapidly begin to generate new oogonia and early oocyte stages, their development does not proceed throughout the winter months.

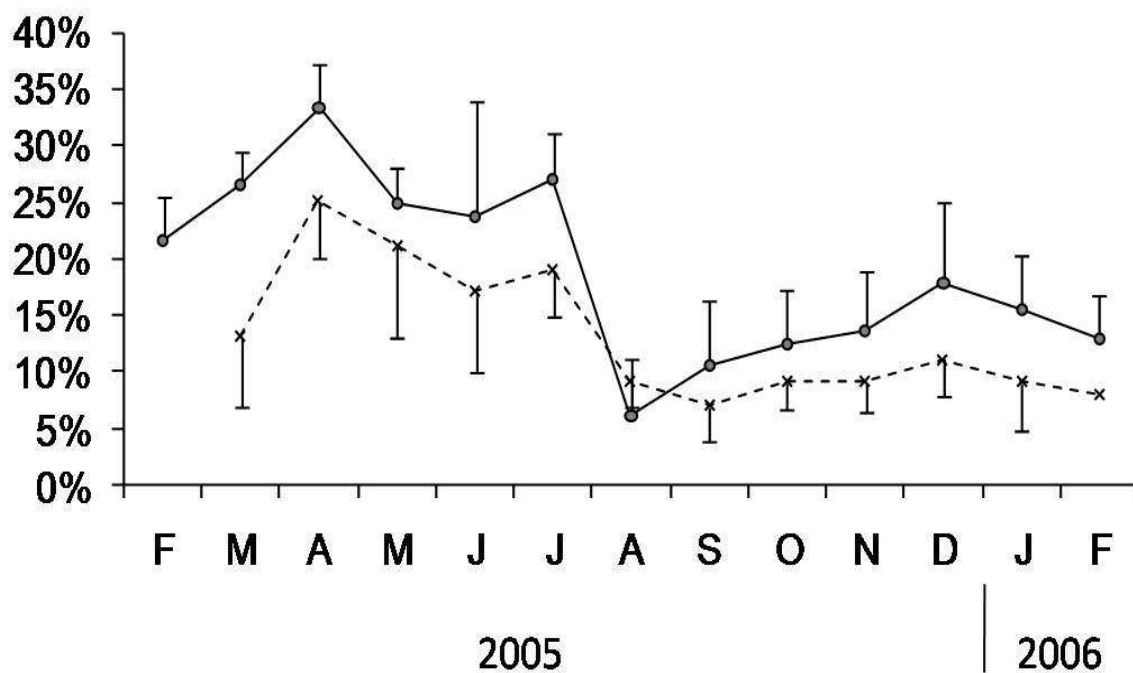


Figure 1: Densité du volume total des ovocytes (ligne continue) et index gonadosomatique femelle (ligne en pointillée) pour un cycle gamétogénique complet de la moule zébrée *Dreissena polymorpha* (échantillonnage mensuel en 2005 et 2006). Les barres d'erreur représentent les écart-types.
 Total oocyte volume density (continuous line) vs. female gonado-somatic index (dashed line) for one entire gametogenic cycle of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* (monthly samplings in year 2005 and 2006). Error bars represent standard deviation.

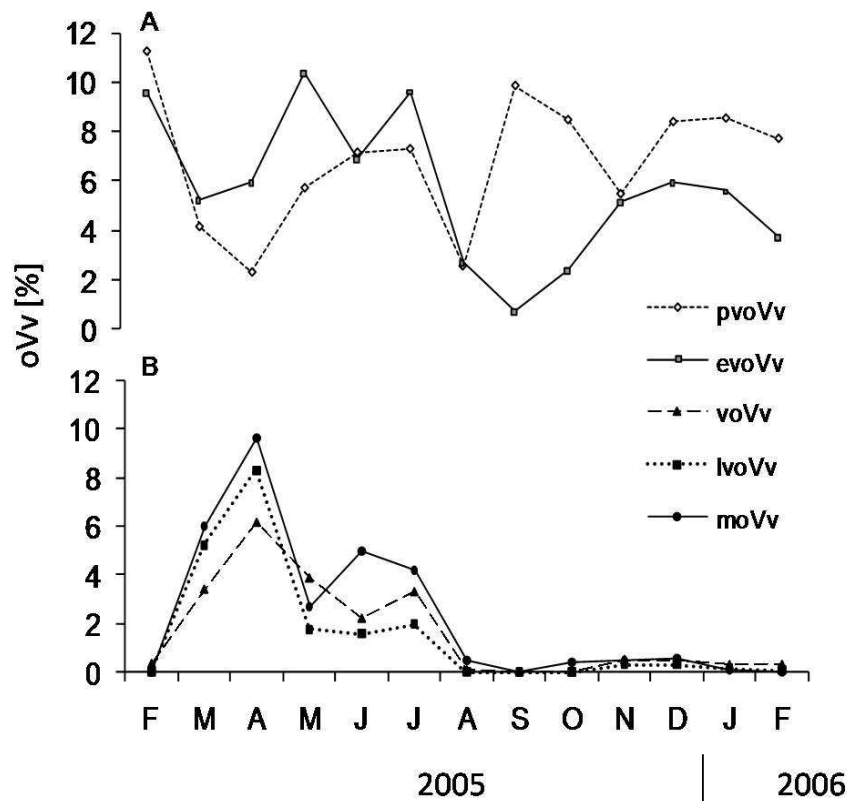


Figure 2: Densités volumiques des différents types d'ovocytes chez la moule zébrée *Dreissena polymorpha* de Février 2005 à Février 2006; ovogonies- ovocytes prévitellogéniques (pvoVv, ligne en discontinu sur le graphe A), ovocytes précoces vitellogéniques (evoVv, ligne continue dans le graphe A), ovocytes vitellogéniques (voVv, ligne en discontinu dans le graphe B), ovocytes vitellogéniques tardifs (lvoVv, ligne en pointillés dans le graphe B) et ovocytes matures (moVv, ligne continue dans le graphe B). Non présenté : ovocytes atrétiques (~1 à 2 %). /

Oocyte volume densities of different oocyte types recorded for the zebra mussel *Dreissena polymorpha* from February 2005 to February 2006; oogonia/previtellogenic oocytes (pvoVv, dashed line in graph A), early vitellogenic oocytes (evoVv, continuous line in graph A), vitellogenic oocytes (voVv, dashed line in graph B), late vitellogenic oocytes (lvoVv, dotted line in graph B) and mature oocytes (moVv, continuous line in graph B). Not shown: Atretic oocytes (~1 to 2 %).

1.2.2. Les taux d'estradiol libre

A première vue les taux d'estradiol libre mesurés chez des femelles sur une période d'un an de Février 2005 à Février 2006 ne montrent absolument pas de corrélation évidente avec le cycle gamétogénique comme il le fût observé avec les coupes histologiques, les GSI et les fractions volumiques des oocytes. En fait il apparaît que les mois avec des taux d'estradiol croissants, Août et Février notamment sont marqués par une variabilité majorée des taux d'estradiol tandis que des taux d'estradiol plus faibles sont plutôt associés avec

1.3.2. Free estradiol levels

At first view, the free oestradiol levels measured in female animals on an one-year basis from February 2005 to February 2006 do not show any obvious correlation with the gametogenic cycle as observed by histological observation, the GSI or the oocyte volume fraction. It appears that those months with seemingly increasing oestradiol levels, August and February notably, are marked by an escalated variability of oestradiol levels, whereas lower oestradiol levels are rather associated with a

une variabilité moindre (Fig.3). Toutefois aucune tendance claire ne ressort de ces observations. Les mois avec des taux moyens d'estradiol plus élevés apparaissent dispersés tout au long de l'ovogenèse. En réalité l'interprétation est rendue difficile par le fait que le cycle reproducteur a été suivi en théorie du stade pré-ponte au stade pré-ponte mais très probablement a été décalé légèrement vers une ponte tardive en 2006 étant donné que le GSI et la densité du volume total des ovocytes ont été plus importants en Février 2005 qu'en Février 2006. Par voie de conséquence, il se peut que nous ne puissions pas voir la totalité du cycle de développement.

lesser variability (Fig. 3). However, no clear trend can be obtained from these observations. Months with higher mean oestradiol levels appear dispersed throughout oogenesis. Actually, the interpretation is hampered by the circumstance that the reproductive cycle was followed in theory from pre-spawn to pre-spawn, but most likely has been slightly shifted towards a later spawn in 2006, as GSI and total oocyte volume density have obviously been more developed in February 2005 than in February 2006. As a matter of consequence, we might not see the entire developmental cycle.

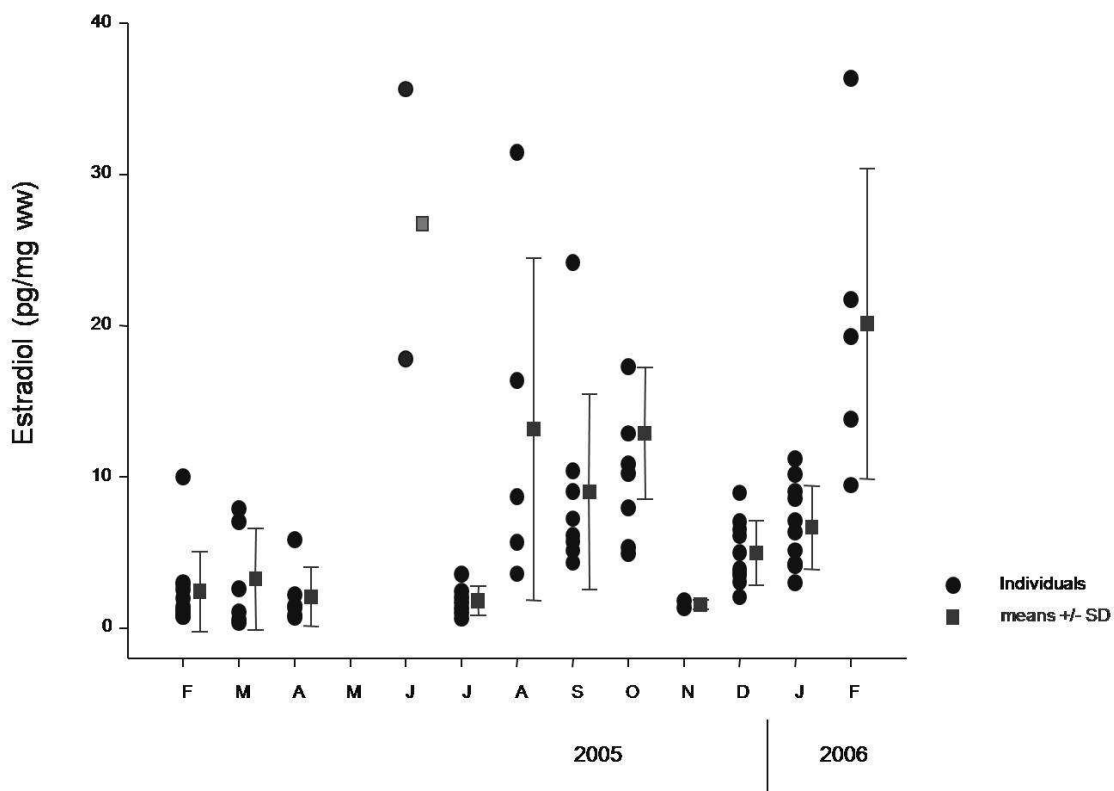


Figure 3: Taux d'estradiol libre chez les femelles *Dreissena polymorpha* durant un cycle de reproduction annuel. Cercles : valeurs individuelles; carrés : moyennes avec les écarts types; ww : poids humide. / Free oestradiol levels in female *Dreissena polymorpha* during a one year reproductive cycle. Circles, individual values; squares, means with standard deviation; ww, wet weight

Toutefois quand les taux d'estradiol sont reliés à la densité du volume des oocytes une corrélation négative faible mais significative peut être obtenue ($R^2 = -0.33$, $p \leq 0.05$; Fig. 4). En fait, des taux d'estradiol plus élevés correspondent aux mois avec de faibles GSI et des densités de volume des oocytes faibles tandis que des taux d'estradiol faibles correspondent à la période juste avant la ponte où les oocytes semblent être bien développés (Fig. 2B).

However, when oestradiol levels are related to oocyte volume density, a weak, but significant negative correlation can be obtained ($R^2 = -0.33$, $p \leq 0.05$; Fig. 4). As a matter of fact higher oestradiol levels correspond to months with low GSI and low oocyte volume density whereas low oestradiol levels correspond to the period just before spawning where oocytes seem to be well-developed (see figure 2B).

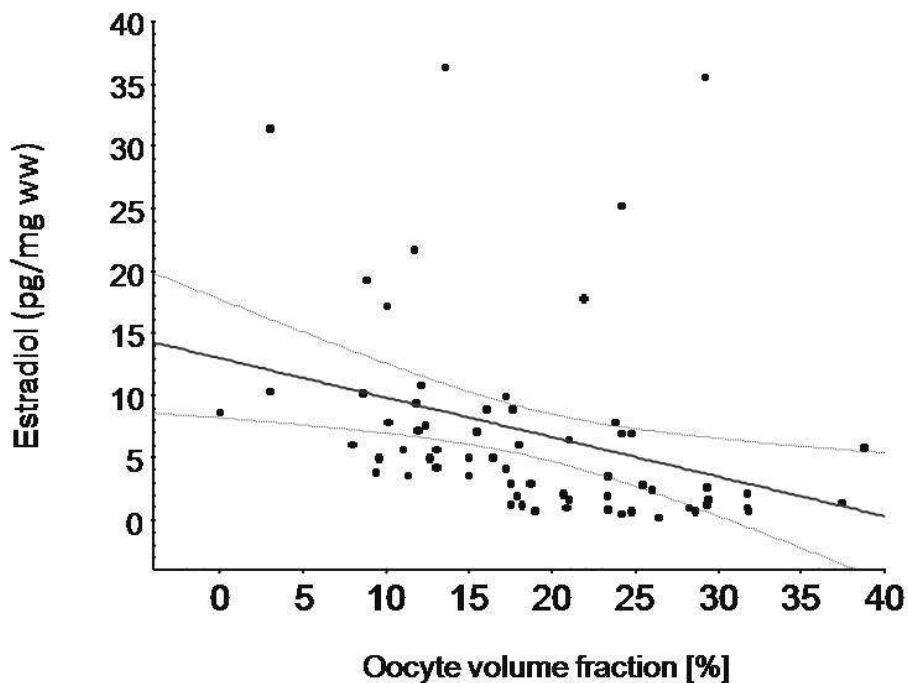


Figure 4: Taux d'estradiol libre en fonction de la fraction volumique des ovocytes chez les femelles *Dreissena polymorpha* durant un cycle de reproduction. Régression Linéaire $R^2 = -0.33$, $p \leq 0.05$, les lignes plus claires représentent l'intervalle de confiance 95%; ww, poids humide. / free oestradiol levels as a function of oocyte volume fraction in female *Dreissena polymorpha* during a one-year reproductive cycle. Linear regression $R^2 = -0.33$, $p \leq 0.05$, light lines represent 95% confidence interval; ww, wet weight

Une observation similaire a été publiée par Gauthier-Clerc *et al.* (2006) pour la palourde *Mya arenaria* pour lequel les taux d'estradiol diminuent proportionnellement à l'augmentation du diamètre des oocytes. Une telle corrélation est encore plus évidente si les stades précoces de développement des oocytes (oogonies et oocytes vitellogéniques précoces) ne sont pas pris en considération. A partir de tous ces éléments, nous pouvons conclure avec toutefois une certaine prudence que l'estradiol pourrait être impliquée dans les stades précoces de développement plutôt que dans la maturation des oocytes

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les mois estivaux présentent une image très inhomogène au regard des stades gonadiques (cf rapport antérieur) puisque certains individus se préparaient clairement pour le repos tandis que d'autres étaient soumis à des transformations complexes de leurs ovocytes et d'autres enfin se préparaient à la ponte. A la lumière de cette situation qui semble quelque peu désordonnée, la partie centrale de la figure 3 trouve une explication. En faisant abstraction de cette période estivale plutôt confuse, une meilleure idée de la façon dont l'estradiol peut être impliquée dans le développement des ovaires de bivalve surgit. Quand l'oogenèse progresse dès la fin de l'automne, les taux d'estradiol augmentent lentement, atteignant un pic juste avant que la maturation des oocytes ne soit terminée et que la majorité des animaux ne soient prêts pour la ponte. Par la suite les taux d'estradiol chutent jusqu'à une sorte de taux de base représenté par les valeurs de février à avril 2005. Bien sûr ce ne sont que des spéculations basées sur des faits uniques. En raison

A similar observation has been reported by Gauthier-Clerc *et al.* (2006) for the clam *Mya arenaria* for which oestradiol levels decreased with increasing oocyte diameter. It must be assumed that such correlation becomes even more obvious when the early stages of oocyte development (oogonia to early vitellogenic oocytes) would not have been taken into consideration. From this, we may conclude, with due reservation, that oestradiol could be implicated in early stages of oocyte development rather than in the maturation of oocytes.

It has been stated earlier, that especially the summer months were found to display a quite inhomogeneous picture with regards to gonad stages (see previous report) where individuals clearly prepare for resting whereas others undertake complex transformations of the oocytes and even prepare for another spawning. In the light of this somewhat disorderly situation the central part of Fig. 3 may be explained. Disregarding this rather noisy summer period, one might get a better idea of how estradiol could be possibly involved in the development of bivalve ovaries. When oogenesis progresses in late autumn, estradiol levels rise slowly, potentially reaching a peak before oocyte maturation is accomplished and the majority of animals are prepared to spawn. Subsequently, the estradiol levels drop to some kind of a base level represented by the values for February to April 2005. It is understood that these assumptions are highly speculative and are being made on a rather weak basis. Due to the random distribution of males and females it was not possible to obtain a constant number of females out of each sampling.

de la distribution au hasard des mâles et des femelles, il ne fût pas possible d'obtenir un nombre constant de femelles pour chacun des échantillonnages. Néanmoins ces assomptions semblent être corroborées par les découvertes faites par Gauthier-Clerc et ainsi dynamiser la discussion à propos des possibles implications des stéroïdes sexuels des vertébrés dans la gamétogenèse des invertébrés tels que celle de nos bivalves.

1.2.3. Suppression subtractive hybridisation

Le but qui nous a conduit à utiliser cette technique de SSH était de découvrir les gènes qui jusque lors étaient inconnus pour leurs implications dans le cycle gamétogénique des bivalves. La SSH a permis de révéler 2149 unigènes qui peuvent être eux-mêmes regroupés en 177 contigs. Jusqu'à présent nous n'avons encore qu'une vision assez imprécise des gènes qui sont différemment exprimés et qui se regroupent autour de plusieurs fonctions physiologiques majeures (Fig.5).

Nonetheless, they seem to be corroborated by the findings of Gauthier-Clerc *et al.* (2006) and hence may invigorate the discussion about possible implications of vertebrate type sex steroids in the gametogenesis of invertebrate species such as bivalves.

1.3.3 Suppression subtractive hybridisation

The aim to carry out SSH was to discover genes previously unknown for being involved in the bivalve gametogenic cycle. SSH revealed 2149 unigenes which could be regrouped in 177 contigs. For the time being we only have a crude impression of differentially expressed genes which group around several major cellular physiological functions (Fig.5).

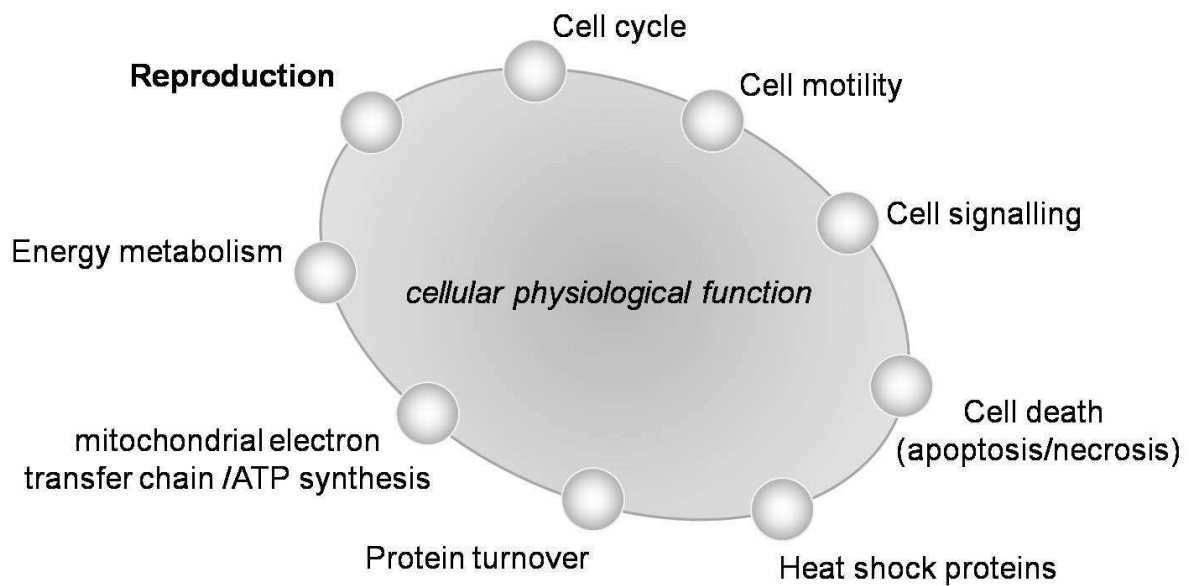


Figure 5: Principales fonctions physiologiques auxquelles les gènes différentiellement régulés de *Dreissena polymorpha* aux stades de pré-ponte, mature/post-ponte et repos peuvent être attribués. Quelques exemples sont donnés dans le tableau 1.

Main cellular physiological functions to which the differentially regulated genes of *Dreissena polymorpha* from pre-spawn, ripe/post-spawn and resting stages can be attributed. Some examples are given in table 1.

La majorité des gènes différemment régulés entre les différents stades choisis appartient à des gènes impliqués dans la chaîne respiratoire tels que la cytochrome C, ainsi que des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et la motilité cellulaire, comme la tubuline par exemple. En prenant l'exemple des protéines de choc thermique (hsp) ou celui des protéines de résistance aux drogues et ceux de la famille des P-glycoprotéines, tous ces gènes sont très conservés et bien étudiés au sein des banques de données de protéines ou de gènes et le produit de ces gènes est abondamment présent dans les cellules. A priori leur implication dans le cycle reproductif ne peut pas être exclut bien qu'il soit considéré tout au mieux comme indirect. Nonobstant, il doit être pris en considération que

The majority of genes being differentially regulated between the different stages chosen belong to genes involved in the respiratory chain, such as cytochrome c, as well as genes implied in the cell cycle and cell motility, tubulin for instance. As heat shock proteins or multidrug resistance protein and P-glycoprotein alike, these genes are well-conserved and well-documented in the respective gene- and protein databanks and their products are abundantly found in the cell. A priori, their involvement in the reproductive cycle cannot be excluded, although it must be considered indirect at best. Notwithstanding, it must also be taken into consideration that their appearance may be due to other factors, either inherent to the technique or to their

leur présence peut être due à d'autres facteurs, soient inhérents à la technique soient à leur représentation dans les banques de données. En fait, puisque les gènes des invertébrés en général et ceux des bivalves en particulier sont moins représentés dans les entrées des banques de données, nous revenons à la case départ avec le même problème qui aurait du avoir pour solution l'utilisation d'une approche globale, c'est-à-dire déduisant des gènes des vertébrés et de leurs fonctions physiologiques celles des invertébrés.

Toutefois l'identification de gènes par croisement d'espèces n'est possible que si le degré de conservation des séquences est élevé. En dépit de ces évidentes limitations dues aux manques actuels d'informations sur les gènes de nos espèces en question, les banques d'ADNc établies peuvent s'avérer utiles et pleines de valeurs dans le futur quand le séquençage d'espèces de la même famille ou assimilées aura été accompli.

Jusqu'à présent seules quelques séquences potentiellement connectées avec la physiologie de la reproduction ont pu être révélées puisque l'analyse n'a été menée que sur les « contigs », c'est-à-dire les séquences obtenues à partir de multiples clones couvrant différentes régions d'un même gène unique assemblé en séquence contiguë non redondante. Pour deux gènes intéressants et leurs protéines respectives, à savoir la tectorine et l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE), les relations avec la reproduction ne sont pas évidentes de prime abord car ils ont d'autres fonctions chez les vertébrés (Legan *et al.*, 1997; Sibony *et al.*, 1994). Toutefois, ils appartiennent à une plus large famille de protéines ayant des implications dans la reproduction. De façon tout à

représentation in the databanks. In fact, since invertebrate genes in general, and those of bivalves in particular, are less covered by databank entries, one is turned back to the same problem that should have been circumvented by this global approach, *i.e.* deducing from vertebrate genes and their corresponding physiological functions to invertebrates. Moreover, cross-species identification of genes is only possible where the degree of sequence-conservations is high. In spite of these obvious and well-known limitations due to the current lack of sequence information for the species in question, the established cDNA-banks may prove useful and reveal their full value in the future when the sequencing of more closely related species has been accomplished.

For the time being, only few sequences potentially related to reproductive physiology could be revealed, as the examination was only carried out for the so-called "contigs", *i.e.* sequences obtained from multiple clones covering different regions of one and the same gene assembled to a non-redundant contiguous sequence. For two interesting genes and their respective proteins, tectorin or angiotensin I-converting enzyme (ACE) the relations to reproductive development are not quite evident at first sight since they are known for having other functions in vertebrates (Legan *et al.*, 1997; Sibony *et al.*, 1994). However, they belong to larger protein families with implications in reproduction. Interestingly, the non-collagenous glycoprotein Tectorin contains the *zona pellucida* domain (Legan *et al.*, 1997). The *zona pellucida* is a glycoprotein membrane surrounding the

fait intéressante, la glycoprotéine non collagénuse tectorine contient le domaine de la zone pellucide (Legan *et al.*, 1997). Cette zone pellucide est une membrane de nature glycoprotéique entourant la membrane plasmique d'un ovocyte et qui est nécessaire pour initier la réaction acrosomale du spermatozoïde (Wassarman, 2008). L'isoforme courte de l'ACE est connue pour être abondamment exprimée dans les testicules des animaux sexuellement matures (Sibony *et al.*, 1994). Son expression durant des étapes bien définies de la spermiogenèse apparaît être corrélée avec un processus unique de la différenciation des cellules germinales. D'autres gènes avec de possibles rôles dans les processus de reproduction pourraient être une petite protéine interagissant avec un récepteur aux androgènes et un membre de la famille des protéines liant les lipides, ceci étant encore que des résultats préliminaires qui demandent une validation ultérieure. Entre temps, l'examen de ces unigènes c'est-à-dire ceux qui sont représentés par un seul clone dans une banque SSH (c'est-à-dire un stade de développement) peut laisser entrevoir bien d'autres gènes candidats intéressants.

plasma membrane of an oocyte required to initiate the acrosome reaction of the spermatozoa (Wassarman, 2008). The short isoform of ACE is known to be abundantly expressed in the testis of sexually mature animals (Sibony *et al.*, 1994). Its expression during definite maturation steps of spermiogenesis appears to be correlated with the unique process of germ cell differentiation. Other genes with possible roles in reproductive processes could be a small androgen receptor-interacting protein and a lipid binding protein family member, the latter possibly having a function similar to vitellogenin. Admittedly, these are only preliminary findings that require further validation. Meanwhile, the examination of the unigenes, *i.e.* those represented only by one clone in a bank may disclose other interesting candidate genes..

Table 1: Gènes sur- ou sous-exprimés en tant que séquences contiguës non redondantes assemblées à partir de multiples clones, numéro d'accès des protéines correspondantes avec leurs fonctions.
Up- or down regulated genes as non-redundant contiguous sequences assembled from multiple clones, accession numbers of the corresponding proteins with function.

Gene(s)	InterPro acc. no.*	Function
NADH dehydrogenase/ NADH:ubiquinone oxidoreductase	IPR000283 IPR001949	First enzyme (EC:1.6.5.3) within the mitochondrial electron transport chain = Complex I
Cytochrome c oxidase Cytochrome b	IPR002429 IPR005797	Electron-transfer protein (carrier of e ⁻) (EC:1.9.3.1) The cytochrome bc1 complex (complex III) is the third complex in the electron transport chain (EC 1.10.2.2) Central role in apoptosis, signalling the cell to begin the process of programmed cell death; apoptosis is essential in many natural processes, such as the coordinated growth.
ATP synthase	IPR006721	synthesis of ATP
Aconitase	IPR001030, IPR015932	Essential enzyme (aconitate hydratase; EC:4.2.1.3) in the tricarboxylic acid cycle, the central pathway of energy production.
Ubiquitin / polyubiquitin	IPR000626	involved in many cell processes : regulation of the cell cycle, regulation of transcription, DNA repair, embryogenesis, apoptosis
Heat shock proteins – hsp70 – hsp90	IPR001023, IPR013126 IPR001404	involved in many cell processes : protein folding and degradation, intracellular translocation of proteins, cell signalling, stress responses
Actin Tubulin Myosin	IPR004000 IPR000217 IPR001609,I PR002928	cytoskeleton, cell motility (movement of cells and cellular processes)
Multidrug-resistant- protein P-glycoprotein	IPR004734 IPR013283	efflux transporters, xenobiotic transport proteins implicated in multidrug resistance ^{x)} , mediate cellular resistance to toxicants

* <http://www.ebi.ac.uk/interpro>

^{x)}Matheny *et al.*, 2001

1.4. Conclusions

Bien qu'étant des indicateurs biologiques intéressants, les moules présentent un certain nombre d'obstacles pour une utilisation dans le suivi des perturbations endocriniennes qui concernent également les vertébrés tels que les poissons. S'il existe quelques indications d'un partage d'éléments de la physiologie de la reproduction entre les invertébrés et les vertébrés, ils sont loin d'être concluants. De plus les moules semblent présenter une grande plasticité dans leur cycle reproductif, cycle sur lequel nous ne connaissons que peu de choses. Il apparaît ainsi assez difficile de décider d'un état de référence qui nous permettrait une identification de potentielles perturbations.

En dépit des nombreux aspects de la physiologie reproductive des mollusques en général et de celle des moules zébrées en particulier qui restent à élucider, et ceci sans prendre en compte les nombreuses questions qui ont été soulevées lors du travail sur les moules zébrées, nous avons maintenant de nombreux outils en main qui nous permettent une évaluation basique mais aussi de paramètres détaillés de la gamétogenèse des bivalves. Ceci est d'autant plus vrai pour les ovocytes femelles qui ont été soumises à une analyse quantitative des différents stades de développement. Les méthodes déployées devraient fournir une bonne base pour la détection de potentielles perturbations lors du développement des gamètes.

De plus chacun devrait garder à l'esprit que les invertébrés tels que les mollusques peuvent répondre d'une manière non anticipée à une

1.4. Conclusions

Although being interesting biological indicators, mussels present many obstacles for their use in monitoring the type of endocrine disruption that also concerns vertebrates like fish. There is at least some indication for shared elements of reproductive physiology with vertebrates. However, they are far from being conclusive. Moreover, mussels appear to have a great deal of plasticity in their reproductive cycle(s) of which we do know only very little. It is thus rather difficult to decide upon a reference status which would allow for the identification of potential perturbations.

Despite numerous aspects of mollusc reproductive physiology in general as well for zebra mussel in particular that remain to be elucidated, and notwithstanding the numerous questions that have been evoked as a consequence of the work carried out on zebra mussels in this project, we now have indeed several tools at hand that allow for the evaluation of basic as well as more detailed parameters of bivalve gametogenesis. This applies especially to female oocytes which are amenable to a specific and quantitative analysis of developmental stages. The deployed methods should indeed provide a good basis for the detection of putative perturbations of gamete development.

Yet one should keep in mind that invertebrate species such as molluscs may respond in an unanticipated manner to exposure to endocrine disrupting chemicals (EDCs). Global methods analysing differential expression of genes or regulation of protein levels have the

exposition à des perturbateurs endocriniens (EDCs). Des méthodes globales analysant l'expression différentielle des gènes ou des niveaux d'expression des protéines ont le potentiel de révéler des réponses inconnues jusqu'alors à des EDCs. Les contraintes méthodologiques seront surpassées peu à peu et ainsi on peut espérer que de plus en plus d'informations de valeur pourront être tirées de ces méthodes « omics » dans le futur proche. En utilisant la SSH, nous avons mis en pratique cette idée et acquis des expertises supplémentaires qui peuvent être utilisées pour analyser l'expression différentielle de gènes lors d'exposition.

potential to unravel unknown responses to EDCs. The methodological constraints will be overcome by and by, so that it can be expected that more and more valuable information will be attained from these “-omics”-methods in the near future. Using SSH we have embraced this idea and acquired complementary know how which may be used for analysing differential gene expression under exposure conditions.

1.5. References

- Baker ME (2003). Evolution of adrenal end sex steroid action in vertebrates: a ligand-based mechanism for complexity. *BioEssays* 25:396-400
- Bannister R, Beresford N, May D, Routledge EJ, Jobling S, Rand-Weaver M (2007) Novel estrogen-receptor-related transcripts in *Marisa cornuarietis*; a freshwater snail with reported sensitivity to estrogenic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 41:2643-2650
- Boutet I, Tanguy A, Moraga D (2004). Response of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* to hydrocarbon contamination under experimental conditions. *Gene* 329:147-157
- Depledge MH, Galloway TS, Billingham Z (1999). Effects of endocrine disrupting chemicals in invertebrates. *Environment. Sci. Tech.* 12:49-60
- Gauthier-Clerc S, Pellerin J, Amiard JC (2006). Estradiol-17 β and testosterone concentrations in male and female *Mya arenaria* (Mollusca, Bivalvia) during the reproductive cycle. *General and Comparative Endocrinology* 145:133-139
- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbø L, Marcussen N, Møller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sørensen FB, Vesterby A, West MJ (1988). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96:379-349
- Janer G, Mesia-Vela S, Porte C, Kauffman FC (2004). Esterification of vertebrate-type steroids in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*). *Steroids* 69:129-136
- Keay J, Bridgham JT, Thornton JW (2006). The Octopus vulgaris estrogen receptor is a constitutive transcriptional activator: evolutionary and functional implications. *Endocrinology* 147:3861-3869
- Köhler H-R, Kloas W, Schirling M, Lutz I, Reye A, Langen J-S, Triebkorn R, Nagel R, Schönfelder G (2007) Sex steroid receptor evolution and signalling in aquatic invertebrates. *Ecotoxicology* 16: 131-143
- Legan PK, Rau A, Keen JN, Richardson GP (1997) The Mouse Tectorins. *J. Biol. Chem.* 272: 8791-8801
- Matheny CJ, Lamb MW, Brouwer KLR, Pollack GM (2001). Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Implications of P-glycoprotein Modulation. *Pharmacotherapy* 21:778-796
- Peck MR, Labadie P, Minier C, Hill EM (2007). Profiles of environmental and endogenous estrogens in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere* 69:1-8

- Puinean AM, Labadie P, Hill EM, Kishida M, Nakao R, Novillo A, Callard IP, Rotchell JM (2006). Laboratory exposure to 17 β -estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. *Aquatic toxicology* 79:376-383
- Reis-Henriques MA, Le Guellec D, Remy-Martin JP Adessi GL (1990). Studies of endogenous steroids from the marine mollusc *Mytilus edulis* L. by gas chromatography and mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B:303-309
- Sibony M, Segretain D, Gasc JM (1994) Angiotensin-converting enzyme in murine testis: step-specific expression of the germinal isoform during spermiogenesis. *Biol. Repro.* 50: 1015-1026
- Tanguy A, Huo X, Ford SE (2004). Discovery of genes expressed in response to *Perkinsus marinus* challenge in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*C. Gigas*) oysters. *Gene* 338:121-131
- Wassarman P.M. (2008) Zona pellucida glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 283:24285-24289

2. IDENTIFICATION DE BIOMARQUEURS DE PERTURBATION ENDOCRINIENNE CHEZ LA MOULE MARINE, *MYTILUS EDULIS*: UNE APPROCHE METABOLOMIQUE

2.1 Introduction

Les milieux aquatiques reçoivent des niveaux significatifs de perturbateurs endocriniens (PE), dont les œstrogènes, qui sont présents dans les eaux usées. Les stéroïdes tels que le 17β-œstradiol (E2), l'estrone (E1) et l'éthinylestradiol (EE2) ont été associés à l'intersexualité de poissons dans les cours d'eau qui reçoivent de fortes quantités d'effluents. Les effets des contaminants oestrogéniques sur la différenciation sexuelle ont été observés principalement dans les poissons d'eau douce et le risque pour les invertébrés aquatiques est moins clair. À l'heure actuelle, il n'existe pas de biomarqueurs appropriés pour la pollution œstrogénique des eaux douces ou marines. Il est donc impératif de développer des méthodes de surveillance de l'exposition à ces contaminants de l'environnement.

Les mollusques bivalves sont souvent utilisés comme espèces sentinelles pour la surveillance de l'exposition à des contaminants chimiques. Leur nature sessile, l'intensité de filtration et leur faible capacité à métaboliser les xénobiotiques en font des organismes idéals pour bioaccumuler des contaminants de l'environnement aquatique et ils sont souvent utilisés comme modèles dans le domaine de la toxicologie environnementale. Les stéroïdes des vertébrés sont naturellement présents dans les moules telles que *M. edulis* et l'œstradiol

2. IDENTIFICATION OF BIOMARKERS OF ENDOCRINE DISRUPTION IN THE MARINE MUSSEL, *MYTILUS EDULIS*: A METABOLOMIC PROFILING APPROACH

2.1 Introduction

Aquatic environments receive significant levels of endocrine disrupting chemicals (EDCs) including estrogens, which are present in wastewater treatment works. Steroids such as 17β-estradiol (E2), estrone (E1) and the pharmaceutical ethinylestradiol (EE2) have been associated with the causation of intersexuality in fish present in rivers that receive high concentrations of wastewater effluents. The effects of estrogenic contaminants on sexual differentiation have been observed principally in freshwater fish and the risk to aquatic invertebrates from exposure to vertebrate sex steroids is less clear. At present there is no suitable biomarker for estrogenic pollution in either freshwater or marine bivalves and because of the extensive contamination of coastal and river waters by estrogenic chemicals, it is imperative to develop methods to monitor exposure to these environmental contaminants.

Bivalve molluscs are often used as sentinel species to monitor exposure to chemical contaminants. Their sessile nature, high filtering rate and poor ability to metabolise xenobiotics make them ideal organisms for bioaccumulating contaminants from the aquatic environment and they are often used as models in the field of environmental toxicology. Vertebrate-like steroids are present naturally in *M. edulis* and

présent dans l'eau peut être bioconcentré jusqu'à 1000 fois dans les tissus de *M. edulis* et stockés sous forme estérifiée à de longues chaînes d'acide gras (voir rapport précédent). Le rôle de l'E2 chez *M. edulis* est actuellement inconnu et il est nécessaire de déterminer si les stéroïdes présents dans les effluents peuvent perturber la fonction endocrine des mollusques et de rechercher des biomarqueurs d'exposition dans ces invertébrés.

Cette phase du projet visait donc à développer une méthodologie basée sur la spectrométrie de masse permettant de générer des profils métaboliques chez *M. edulis*. Cette nouvelle technologie a été ensuite appliquée afin de fournir des informations sur la toxicité potentielle et le mode probable d'action de l'E2. Cette approche pourrait être une méthode utile de détection de la perturbation endocrinienne *in situ*, fournissant des indications précoces des effets.

2.2 Méthodes

2.2.1. Développement méthodologique

Les technologies "omiques" se révèlent très utiles pour élucider les gènes ou les voies métaboliques impliquées dans les maladies, le stress, les insultes médicamenteuses ou toxiques. La métabolomique concerne la mesure non-ciblée de toute modification ou fluctuation de métabolites d'un échantillon biologique. Cette approche, complémentaire à la génomique et à la protéomique peut conduire à des informations sur l'état physiologique de l'organisme et peut donc être utilisée comme un outil de développement de biomarqueurs d'exposition à des substances chimiques.

Bien que la métabolomique ait pour but de

recent work in Dr Hill's laboratory have shown that estradiol present in ambient waters can bioconcentrate up to 1000 fold in *M. edulis* and are stored in tissues as free estrogens and long chain fatty acid esters. The role of E2 in *M. edulis* is currently unknown and there is a need to determine whether vertebrate –type sex steroids in estrogenic effluents disrupt endocrine function in molluscs and to investigate suitable biomarkers for estrogen exposure in these invertebrates.

This phase of the project aimed to develop mass spectrometry based methodologies to profile a variety of metabolites in the marine bivalve *Mytilus edulis*. This new technology was then applied to provide information on the likely mode of action and potential toxicity of the E2. This approach could be an extremely useful method of detecting endocrine disruption *in situ*, providing early indications of ecologically relevant effects and can be used in environmental monitoring.

2.2 Methods

2.2.1. Method development

'Omics' technologies have proved very useful in elucidating which genes or pathways are altered in organisms as a result of diseases, drugs, stress, or toxic insults. Metabolomics, which involves non-targeted approaches, measures any changes or fluctuations of the metabolites present in an organism or biological sample. This approach, complementarily to genomic and proteomic approaches can lead to information about the physiological status of the organisms and therefore can be used as a tool for the development of biomarkers of exposure to potentially toxic chemicals or drugs.

réaliser des profils de tous les métabolites présents dans un tissu, il n'existe pas de méthode analytique capable d'extraire et de détecter toutes ces molécules à la fois. Détecter simultanément l'ensemble du "métabolome" d'un individu est un défi car il existe une grande variété de structures chimiques et de concentrations. L'émergence de systèmes UPLC-MS (chromatographie ultra pression en phase liquide associée à la spectrométrie de masse) fournit une méthode robuste et reproductible, permettant l'amélioration de la résolution chromatographique et de réduire le problème de suppression d'ions provenant de la co-élution des pics. Toutefois, de nombreux paramètres liés à la configuration de la plateforme LC-MS peuvent influencer la performance des analyses métabolomiques et une méthodologie adéquate doit être développée conformément aux objectifs de l'analyse et afin de réduire au minimum les limites de la technologie.

Dans cette partie du projet, une nouvelle méthode d'extraction en phase solide (SPE) associée à la chromatographie-temps de vol-spectrométrie de masse (UPLC-TOF-MS) a été développée afin d'extraire et de détecter 27 molécules de signalisation. La méthode proposée a été validée pour son aptitude à l'analyse métabolomique des tissus de moules. Ce résultat a été obtenu par fractionnement des extraits de moules par SPE par différents solvants (Figure 1) et par détection des métabolites au moyen d'un TOF-MS avec un système électro ionisation (ESI) source soit exploité en mode positif (+ESI) ou en négatif (-ESI) (Tableau 1). La récupération de la cible analytique a été calculée à la fois pour l'eau et pour une matrice de tissu gonadique afin de prouver

Although metabolomics aims to profile all the metabolites present in a tissue, there is no single analytical method which is capable of extracting and detecting all the different molecules at once. The challenges of detecting simultaneously the whole "metabolome" of an individual arise in the variety of chemical structures and the large range of concentrations at which metabolites are present. Emerging UPLC-MS (ultra pressure liquid chromatography mass spectrometry) systems provide a robust, reproducible, and improved chromatographic resolution reducing the problem of ion suppression from co-eluting peaks so common with MS technologies. However, many parameters related to the configuration of the LC-MS platform may influence the performance of metabolomic analyses and an adequate methodology should be developed appropriate to the aims of the analysis and minimize the limitations of the technology.

In this part of the project a new solid phase extraction (SPE) and UPLC-Liquid Chromatography-Time-of-Flight-Mass spectrometry (UPLC-TOF-MS) methodology to simultaneously extract and detect 27 signalling molecules was developed. The proposed method was validated for its suitability for metabolomic analysis of mussel tissues. This was achieved by the fractionation of mussel extracts on SPE using for different solvents (Figure 1) and the detection of the metabolites using a TOF-MS system with an electrospray ionization (ESI) source operated in either positive (+ESI) or negative (-ESI) mode (Table 1). The recovery of the target analytes was calculated from both a water and in a gonadal

l'efficacité de la méthode d'extraction.

tissue matrix to prove the efficiency of the extraction method.

Table 1. Conditions utilisées pour l'extraction et la détection des différents analytes à l'aide de la plate-forme LC-MS. SPE: extraction en phase solide. LC: chromatographie en phase liquide. MS: spectrométrie de masse

Conditions used for extraction and detection of the different analytes using the LC-MS platform. SPE: solid phase extraction. LC: liquid chromatography. MS: mass spectrometry

Analytes	Elution fraction in SPE	Mobile phase in LC	Ionization mode (ESI) in MS
Androgens	Ethyl acetate	0.2 % formic acid in methanol and 0.2 % formic acid in water	Positive
Estrogens	Ethyl acetate	acetonitrile and 5% acetonitrile in water	Negative
Progestagens	Ethyl acetate	0.2 % formic acid in methanol and 0.2 % formic acid in water	Positive
Conjugated steroids	Ammonium hydroxide in methanol	0.2% formic acid in methanol and 0.2 % formic acid in water	Negative
Peptides	Methanol	0.2 % formic acid in methanol and 0.2 % formic acid in water	Positive
Eicosanoids	Formic acid in methanol	0.2 % formic acid in methanol and 0.2 % formic acid in water	Negative

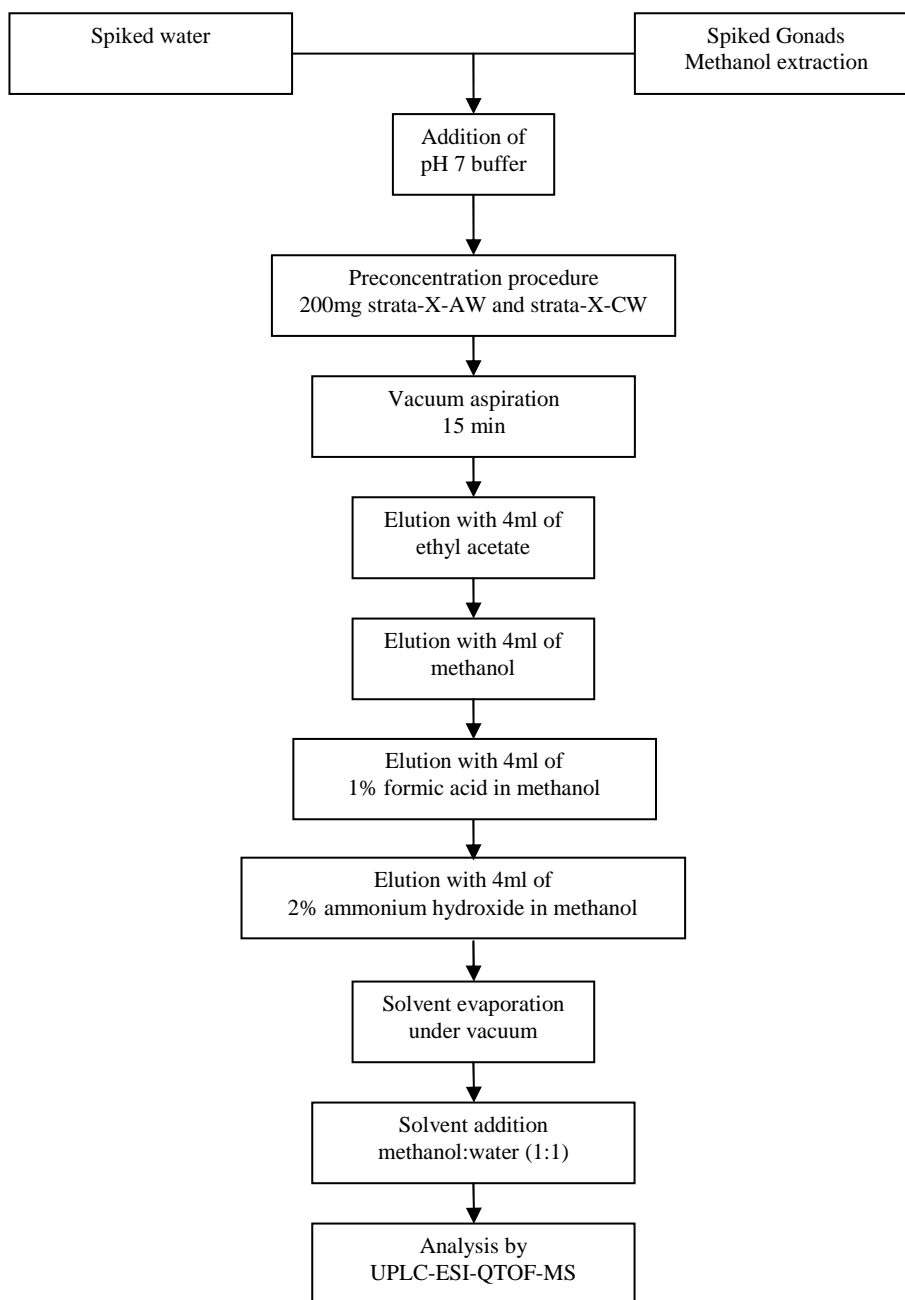


Figure 1. Schéma des méthodes analytiques développées dans cette étude
Flow diagram of the analytical methods developed in this study

2.2.2. Expériences d'exposition

Des spécimens matures de *M. edulis* ont été recueillis dans la Manche, près de Brighton en avril 2007 et immédiatement acheminés au laboratoire. 60 moules (taille $5,63 \pm 0,33$ cm) ont été placées au hasard dans chacun des trois réservoirs en verre avec 60 L d'eau de mer artificielle avec un régime lumière/obscurité de 12 /12 heures. Les moules ont été acclimatées pendant une période de 7 jours et l'eau a été renouvelée toutes les 24 heures. Après la période d'acclimatation, deux des citernes ont été dopées avec des concentrations différentes de E2 sous conditions semi-statiques tandis que l'un des réservoirs a été maintenu avec de l'eau de mer propre (pour contrôle). Chaque fois que l'eau a été renouvelée, l'E2 a été mélangée avec l'eau de mer dans deux des réservoirs expérimentaux pour obtenir une concentration de 5 et 50 ng/L. Des échantillons d'eau ont été pris à 30 min et 24 heures après l'ajout de E2. L'analyse de l'E2 dans l'eau a été effectuée par UPLC-TOF-MS et quantifiée à l'aide d'étalons de concentration connue. Toutes les moules ont été échantillonnées après une période d'exposition de 10 jours et les tissus ont été préparés suivant la méthodologie décrite dans la section précédente.

Les données brutes obtenues à partir de la chromatographie / spectrométrie de masse ont été pré-traitées à l'aide du logiciel MarkerLynx V 4.1. Les paramètres utilisés pour la détection des caractéristiques spectrales des pics ont été optimisés afin de réduire le niveau de bruit à un minimum. Les données ont été ensuite exportées vers les logiciels SIMCA-P où elles ont été centrées en soustrayant leurs moyennes, mais pas réduites. Une analyse en composante principale a été

2.2.2. Exposure experiments

Specimens of sexually mature *M. edulis* were collected in the English Channel near Brighton on April 2007 and immediately brought to the laboratory. 60 mussels (size 5.63 ± 0.33 cm) were placed randomly in each of three glass tanks with 60 l of artificial seawater at a light regime of 12 hrs light/12 hrs dark. The mussels were acclimatised for a period of 7 days and the water was renewed every 24 hrs throughout all the experiment. After the acclimatisation period two of the tanks were spiked with different concentrations of E2 under semi-static conditions and one of the tanks was kept with clean seawater (control treatment). Every time the water was renewed, the E2 was then mixed with the seawater in two of the experimental tanks to give a concentration of 5 ng/l and 50 ng/l respectively. Water samples were taken at different time points during the experiment at 30 min and 24 hrs after the addition of E2 to the tanks. The analysis of the E2 in water was done by UPLC-TOF-MS and quantified using calibration standards of known concentration. All the mussels were sampled after an exposure period of 10 days and the gonadal tissue was processed following the methodology described in the previous section.

Raw data obtained from the chromatography/mass spectrometry was pre-processed using MarkerLynx V 4.1 software package. The parameters used for the detection of the spectral peaks were optimised to reduce the noise level to a minimum. Data was then exported to SIMCA-P software where it was centered by subtracting their averages but not scaled. Principal Component Analysis (PCA) was

réalisée en vue d'obtenir une vue d'ensemble des données et de détecter les valeurs aberrantes. Les valeurs très ou modérément aberrantes ont été identifiées, respectivement, par les scores et les distances du modèle X-space (DModX) et ont été enlevées de l'analyse. Afin de trouver les différences permettant la classification, l'analyse PLS-DA (analyse discriminante des moindres carrés partiels pour les structures latentes) a été réalisée en comparant les trois traitements puis en comparant par paire. Une validation impliquant 7 comparaisons croisées a été utilisée pour la détermination des composants principaux de chaque modèle. Enfin, pour améliorer l'interprétation du modèle PLS, des modèles OPLS (PLS orthogonal) ont été utilisés afin que la séparation de classe se trouve uniquement dans la première composante. Les biomarqueurs potentiels ont été sélectionnés à partir des scores des modèles OPLS. La performance des modèles a été décrite par la variation expliquée (R^2X dans le cas de l'ACP et OPLS et R^2Y dans le cas de PLS), et les prévisions de variation (Q^2). Des tests de permutation ont été effectués pour modèles PLS afin d'évaluer le risque de surcorrespondance. Afin de tester la prédictivité (validation externe), les modèles PLS ont été construits en laissant trois observations de chaque traitement jusqu'à ce que 60% des observations aient été testées pour obtenir un classement correct.

2.3. Résultats

Les concentrations faible et forte d'E2 dans l'eau immédiatement après mélange étaient de 3.7 ± 0.6 ng/l et de 48.8 ± 22.6 ng/l, respectivement. Toutefois, après 24 h les concentrations n'étaient plus

performed in order to obtain an overview of the data and to detect outliers. Strong and moderate outliers were identified in the scores plot and in the distance to the model in the X-space (DModX) respectively and were removed for subsequent analysis. In order to find class-separating differences, the supervised analysis PLS-DA (partial least-squares to latent structures discriminant analysis) was performed comparing the three treatments and then using pairwise comparisons. A 7-fold cross validation was used for the determination of the number of significant components in each model. Finally, to improve interpretation of the PLS model, OPLS (orthogonal PLS) models were performed so that class separation is found only in the first predictive component. The potential biomarkers were selected from the S-Plot of the OPLS models, a plot of contribution of variables vs. confidence. The performance of the models was described by the explained variation (R^2X in the case of PCA and OPLS and R^2Y in the case of PLS), and the predicted variation (Q^2). Response permutation testing was performed for PLS models to assess the risk of overfitting. In order to test the predictivity (external validation), PLS models were built leaving three observations of each treatment out in turn until 60% of the observations were tested for correct classification.

2.3. Results

The concentrations of E2 in the water immediately after dosing were 3.7 ± 0.6 ng/l and 48.8 ± 22.6 ng/l for the low and the high dose respectively. However, 24 h after dosing the E2

que de 0.9 ± 0.8 ng/l et 22.6 ± 5.3 ng/l, ce qui suggère que l'E2 ait été soit accumulée par les moules au cours de la période d'exposition et/ou adsorbée sur les parois de l'aquarium (Figure 2).

L'estrone n'a jamais été détectée dans les réservoirs indiquant qu'il y a eu peu d'oxydation pendant l'expérimentation.

levels were decreased to an average of 0.9 ± 0.8 ng/l and 22.6 ± 5.3 ng/l for the low and the high dose respectively, suggesting that the E2 was either taken up by the mussels during the exposure period and/or adsorbed on the tank walls (Figure 2).

No estrone was detected in any of the tanks indicating that there was little oxidation in the spiked tank water

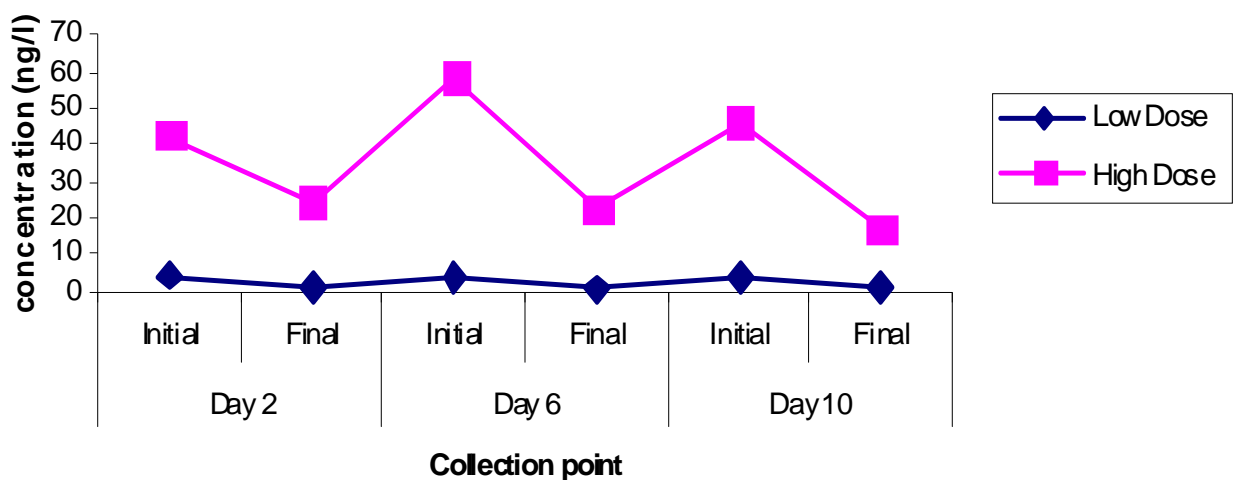


Figure 2. Concentration en E2 dans l'eau des deux bacs d'exposition au cours de l'expérimentation.

E2 concentration in the water

L'approche métabolomique mise en œuvre sur les quatre extractions en phase solide a révélé que le métabolisme des moules des deux sexes a été modifié par l'exposition expérimentale.

Les données issues de l'analyse par PLS-DA des fractions dans l'acétate d'éthyl, ont permis une séparation entre le contrôle, la faible dose et la dose élevée d'exposition, à la fois pour les échantillons males et femelles. Toutefois, dans le méthanol (- ESI) et l'hydroxyde d'ammonium (+ ESI), seules les données des males analysées en mode négatif et positif respectivement, ont permis une séparation des trois groupes de traitement (Tableau 2, Figures 3 et 4).

Pour identifier les marqueurs potentiels de l'exposition à l'E2, de nouvelles analyses PLS ont été effectuées entre deux groupes de traitement. Les validations extérieures ont montré que la précision de l'ensemble des modèles était supérieure à 70% (sauf pour le cas de la comparaison entre le contrôle et la dose élevée dans le méthanol et l'acétate d'éthyle).

Dans le cas de la fraction dans l'acétate d'éthyle, les analyses PLS des données du contrôle et de la faible dose ont donné de bons modèles pour les femelles et les mâles tant en mode d'ionisation négative que positive comme en témoignent les valeurs élevées des variations de Y expliquées (R^2Y) et le pourcentage de variation prédite (Q^2) (Tableau 2). Toutefois, seuls les échantillons des mâles ont donné de bons modèles pour la fraction méthanolique analysée dans les deux modes d'ionisation. Lorsque les groupes contrôle et dose élevée dans l'acétate d'éthyle et le méthanol ont été comparés

The metabolomic approach performed on the four solid phase extraction fractions revealed that the metabolism of both female and male mussels were affected by experimental E2 exposure

The datasets, when analysed by PLS-DA, resulted in a separation between the control, low dose and high dose exposure groups in the ethyl acetate fraction, for both male and female samples. However, in the methanol (-ESI) and the ammonium hydroxide (+ESI) fractions, only the male datasets analysed in negative and positive mode respectively, showed a separation of the three treatment groups (table 2 and figures 3 and 4).

To identify the potential markers of E2 exposure, a subsequent PLS analyses were carried out between two treatment groups. The external validations obtained from the training sets in the PLS models showed that the accuracy of all the models was higher than 70% (except for the case of the comparison between control and high dose groups in the methanol and ethyl acetate fractions).

In the case of the ethyl acetate fraction PLS analyses of the datasets of control and low dose samples gave good models for females and males in both negative and positive ionization modes as evidenced by the high values for explained Y variation (R^2Y) and the % of variation (Q^2) predicted by the models (table 2). However, only male samples gave good models for the methanol fraction analysed in both ionization modes. When the control and the high dose groups were compared by PLS in the ethyl acetate and methanol fractions, only the ethyl acetate fraction

par le PLS, seule la fraction d'acétate d'éthyle analysée en mode positif a donné de bons modèles pour les mâles et femelles, ce qui suggère que les différences étaient plus fortes entre le groupe contrôle et faible dose. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'existence d'une dose seuil au-dessus de laquelle les procédés de détoxification sont activés. Si tel est le cas, d'autres études sont nécessaires pour décrire la relation dose-réponse pour prédire les risques associés à de faibles doses d'exposition.

Les modèles PLS mis en oeuvre dans les fractions hydroxyde d'ammonium - méthanol et acide formique - méthanol ont révélé qu'il y avait des différences entre le contrôle et le groupe à dose élevée à la fois pour les mâles et les femelles. À l'inverse, des différences entre le groupe contrôle et le groupe faible dose n'ont pu être trouvées que pour les mâles dans les fractions hydroxyde d'ammonium - méthanol. Ces résultats suggèrent que les différences dans les fractions hydroxyde d'ammonium - méthanol et acide formique - méthanol sont plus fortes entre le contrôle et la dose élevée, suivant une relation directe dose - réponse.

La plupart des marqueurs de discrimination (métabolites) entre le contrôle et les moules exposées ont été détectés par les scores des modèles OPLS (Figure 5). Les données originales LC-MS ont été analysées afin de confirmer que les marqueurs identifiés sont dus à l'exposition à E2. Pour ce faire, l'intensité des marqueurs de chaque dose d'exposition a été comparée aux échantillons contrôle par analyse statistique non-paramétrique (Mann-Whitney). Un total de 129 marqueurs a été détecté dans les

analysés en mode positif ont donné de bons modèles pour les mâles et femelles, ce qui suggère que les différences étaient plus fortes entre le groupe contrôle et faible dose. Ce phénomène pourrait être expliqué par l'existence d'une dose seuil au-dessus de laquelle les processus de détoxification sont activés. Si tel est le cas, d'autres études sont nécessaires pour décrire la relation dose-réponse afin de prédire les risques associés à de faibles doses d'exposition.

Les modèles PLS effectués sur les fractions ammonium hydroxyde en méthanol et acide formique en méthanol ont révélé qu'il y avait une séparation de classe entre le contrôle et le groupe à haute dose chez les mâles et les femelles. Seuls les jeux de données mâles de la fraction ammonium hydroxyde en méthanol ont montré une séparation entre le contrôle et le groupe à faible dose. Ces résultats suggèrent que les différences dans le cas de l'ammonium hydroxyde en méthanol et l'acide formique en méthanol sont plus fortes entre le contrôle et le groupe à haute dose, suivant une relation directe entre la dose et la réponse.

Les marqueurs les plus discriminatifs (métabolites) du contrôle et des moules exposées ont été détectés par les S-Plots des modèles OPLS (voir figure 5). Les données originales LC-MS ont été analysées pour confirmer que les marqueurs identifiés étaient en effet le résultat de l'exposition à E2. Afin de le faire, l'intensité de chaque marqueur à chaque dose d'exposition a été comparée aux échantillons de contrôle à l'aide d'une analyse statistique non-paramétrique (test de Mann-Whitney). Un total de 129 marqueurs ont été détectés comme étant des marqueurs significatifs de l'exposition à E2 dans les différentes fractions gonadiques. An

différentes fractions gonadiques. Quelques marqueurs parmi les plus importants sont indiqués au tableau 3. Certains de ces marqueurs potentiels de la pollution œstrogénique correspondent à des molécules de type prostaglandines.

example of some of the most significant markers of E2 exposure with their p-values are given in table 3. Some of these potential markers of estrogenic pollution have been identified as prostaglandin-like molecules.

Tableau 2. Paramètres de performance des modèles de discrimination multivariés pour la comparaison de gonades de moules contrôle et exposées à l'E2 (5 et 50 ng / l)
 Performance parameters of multivariate discriminant models for the comparison of control and E2 exposed mussels (5 and 50 ng/l) in gonad

Gender	Fraction	Ionisation mode	Groups	Multivariate Method	Number of significant components	R ² X	R ² Y	Q ²	External Validation
♀	EA	Positive	C,L,H	PLS-DA	4	0.728	0.732	0.468	75% accuracy
	EA	Positive	C,L	PLS	6	0.784	0.988	0.787	90% accuracy
	EA	Positive	C,H	PLS	4	0.763	0.934	0.745	95% accuracy
♂	EA	Positive	C,L,H	PLS-DA	10	0.761	0.974	0.669	88% accuracy
	EA	Positive	C,L	PLS	4	0.588	0.952	0.758	96% accuracy
	EA	Positive	C,H	PLS	6	0.704	0.986	0.695	64% accuracy
♀	EA	Negative	C,L,H	PLS-DA	1	0.224	0.178	0.0127	-
	EA	Negative	C,L	PLS	2	0.404	0.728	0.437	64% accuracy
♂	EA	Negative	C,L,H	PLS-DA	1	0.266	0.132	0.0582	-
	EA	Negative	C,L	PLS	2	0.39	0.735	0.433	83% accuracy
♀	M	Positive	C,L,H	PLS-DA	0				-
	M	Positive	C,H	PLS	0				-
	M	Positive	C,L	PLS	2	0.303	0.742	0.409	-
♂	M	Positive	C,L,H	PLS-DA	2	0.404	0.628	0.55	85% accuracy
	M	Positive	C,L	PLS	3	0.528	0.977	0.928	100% accuracy
	M	Positive	C,H	PLS	2	0.285	0.829	0.458	-
♀	M	Negative	C,L,H	PLS-DA	0				-
	M	Negative	C,L,H	PLS-DA	0				-
♂	M	Negative	C,L,H	PLS-DA	2	0.41	0.372	0.248	-
	M	Negative	C,L	PLS	2	0.426	0.821	0.731	90% accuracy
♀	NH ₄	Negative	C,L,H	PLS-DA	1	0.158	0.273	0.215	-
	NH ₄	Negative	C,H	PLS	2	0.283	0.9	0.646	100% accuracy
♂	NH ₄	Negative	C,L,H	PLS-DA	4	0.517	0.824	0.567	-
	NH ₄	Negative	C,H	PLS	3	0.575	0.932	0.794	95% accuracy
	NH ₄	Negative	C,L	PLS	2	0.506	0.913	0.845	100% accuracy
♀	FA	Negative	C,L,H	PLS-DA	5	0.648	0.715	0.355	-
	FA	Negative	C,H	PLS	3	0.545	0.873	0.721	100% accuracy
♂	FA	Negative	C,L,H	PLS-DA	1	0.172	0.172	0.0499	-
♂	FA	Negative	C,H	PLS	3	0.55	0.785	0.447	75% accuracy

EA: ethyl acetate fraction; M: methanol fraction; NH₄: ammonium hydroxide in methanol fraction; FA: formic acid in methanol fraction; C: control group; L: low dose group (5ng / l of E2); H: high dose group (50 ng/l of E2); R²Y: cumulative variation explained by the model; Q²: cumulative variation predicted by the model

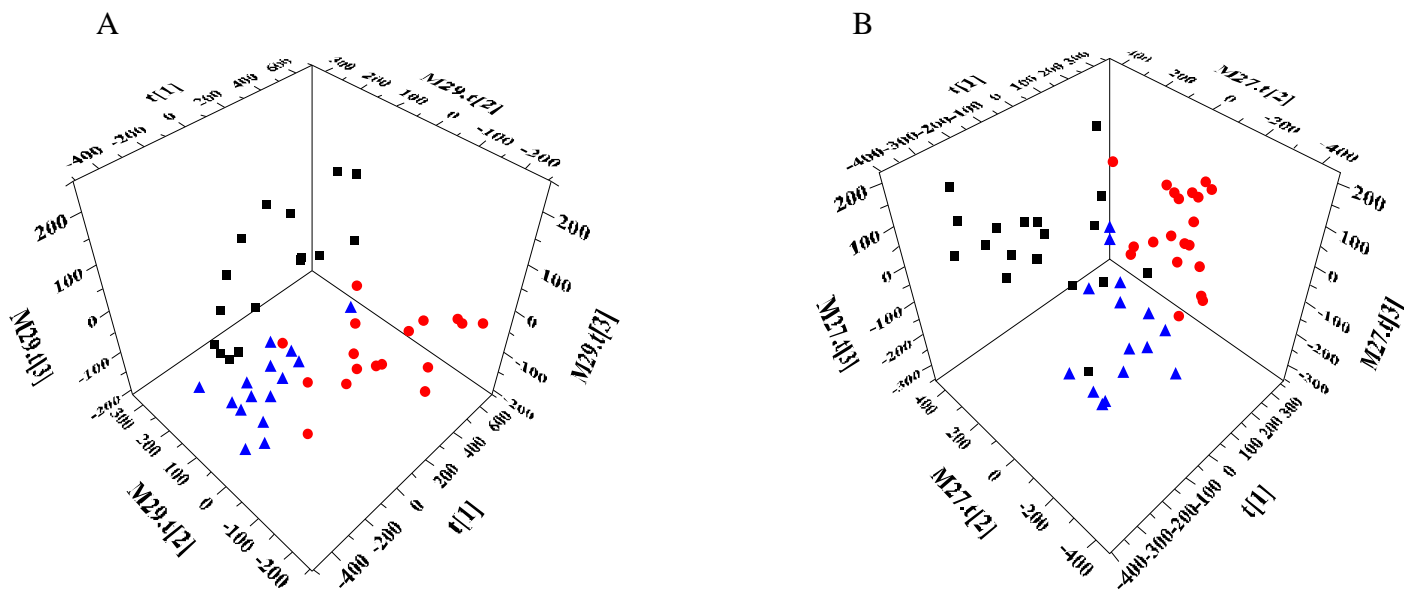


Figure 3. A et B: Scores 3D PLS-DA de la fraction en acétate d'éthyle de gonades de moules femelles et mâles analysée en mode d'ionisation positive. (■) contrôle ; exposé à 5 (●) et 50 (▲) ng/d'E2.
 A and B: PLS-DA scores 3D plots of the ethyl acetate fraction from female and male gonad extracts respectively of control (■) and exposed mussels) analyzed in positive ionization mode

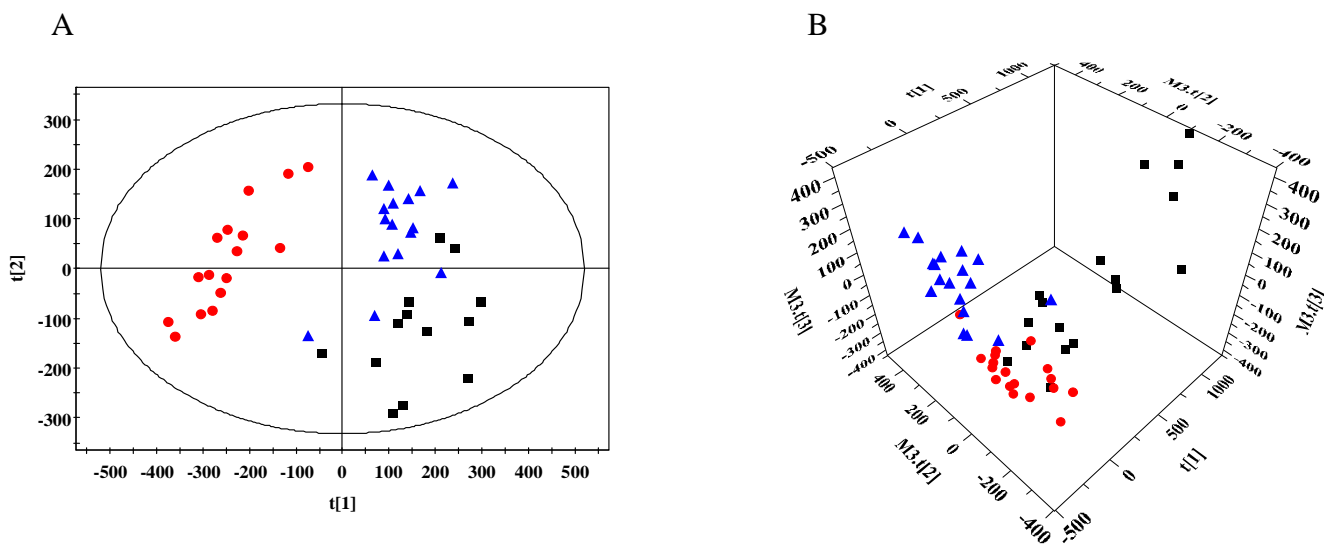


Figure 4. A: Scores PLS-DA de la fraction méthanolique d'extraits de gonades mâles analysée en mode d'ionisation positive. B: Scores PLS-DA de la fraction hydroxyde d'ammonium - méthanol d'extraits de gonades mâles analysée en mode d'ionisation négative.
 A: PLS-DA scores plot of the methanol fraction from male gonad extracts analyzed in positive ionization mode. B: PLS-DA scores plot of the ammonium hydroxide in methanol fraction from male gonad extracts analyzed in negative ionization mode

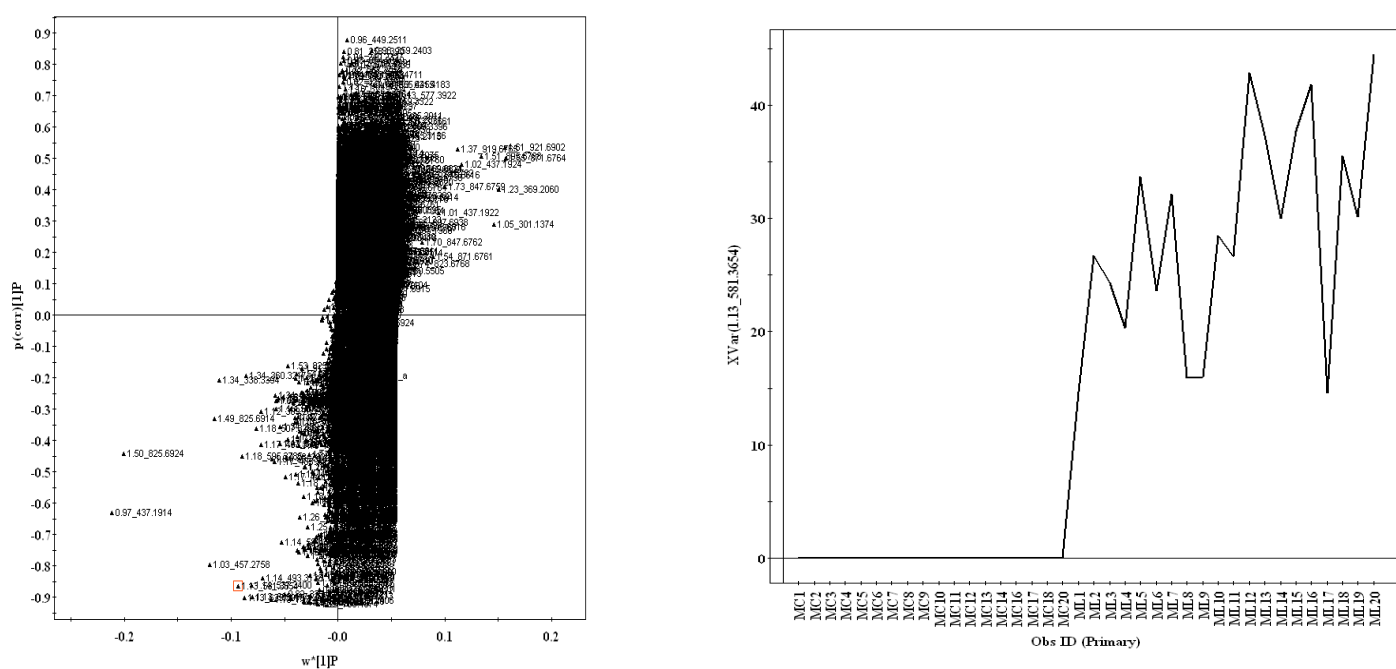


Figure 5. A: Scores du modèle OPLS de la fraction en acétate d'éthyle des extraits de gonades mâles de moules analysée en mode d'ionisation positive. B: Niveaux d'un métabolite de moule sélectionné pour des scores élevés (de la masse de charge de 581.3654). MC correspond à moules contrôle alors que ML correspond aux moules exposées à 5ng /L de E2.

A: S-Plot from the OPLS model of male mussel gonads in the ethyl acetate fraction analysed in positive ionization mode. B: Levels of a mussel metabolite selected in the extreme of the S-plot (mass to charge ratio of 581.3654) altered with E2 exposure. MC corresponds to control mussels whereas ML corresponds to individuals exposed to 5ng/l of E2. The graph shows an increase on the levels of the metabolite present in exposed gonads.

Tableau 3. Liste de certains des plus importants marqueurs d'exposition à E2 dans les gonades de *M. edulis*.
List of some of the most significant markers of E2 exposure in gonads of *M. edulis*.

Fraction and ionization mode	Mass to charge value of marker ion	Effect of E2	P-values			
			Control vs 5 ng E2/l		Control vs 50 ng E2/l	
			Females	Males	Females	Males
Ethyl acetate/+ ionization	713.440	↑	4x10 ⁻¹⁰	3x10 ⁻¹¹	2x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁴
Ethyl acetate/+ ionization	709.471	↓	2x10 ⁻¹⁰	3x10 ⁻¹¹	2x10 ⁻⁴	2x10 ⁻⁵
Methanol/+ ionization	985.563	↓	6x10 ⁻⁹	6x10 ⁻⁹	1x10 ⁻⁵	2x10 ⁻⁸
Methanol/+ ionization	980.600	↓	6x10 ⁻⁹	6x10 ⁻⁹	1x10 ⁻⁶	7x10 ⁻⁹
Methanol/+ ionization	663.049	↓	5x10 ⁻⁸	6x10 ⁻⁹	4x10 ⁻⁷	3x10 ⁻⁷
Methanol/+ ionization	677.726	↓	6x10 ⁻⁹	2x10 ⁻⁷	2x10 ⁻⁶	6x10 ⁻⁵
Methanol/- ionization	591.169	↑	5x10 ⁻⁹	3x10 ⁻¹¹	9x10 ⁻⁸	3x10 ⁻¹¹
Methanol/- ionization	637.173	↑	3x10 ⁻¹¹	3x10 ⁻¹¹	1x10 ⁻¹⁰	2x10 ⁻⁸
Methanol/- ionization	659.155	↑	5x10 ⁻⁹	3x10 ⁻¹¹	5x10 ⁻⁷	3x10 ⁻¹¹
Methanol/- ionization	727.145	↑	8x10 ⁻⁸	3x10 ⁻¹¹	1x10 ⁻⁶	5x10 ⁻⁸
Ammonium hydroxide/- ionization	311.150	↓	10 ⁻⁷	2x10 ⁻⁵	8x10 ⁻⁷	10 ⁻⁵

2.4. Résumé/ Conclusions

- Une méthode a été élaborée pour établir le profil de toute une gamme de molécules de signalisation présentes dans les tissus de moules en vue d'identifier les biomarqueurs et les voies de la perturbation endocrinienne.
- Cette méthode a été utilisée pour étudier l'effet de l'exposition de *M. edulis* à l'œstradiol, E2. Après 10 jours d'exposition, des différences significatives dans les profils de métabolites ont été observées dans les deux sexes de moules, par rapport au groupe contrôle, pour l'exposition à 5 ng / L et à 50 ng / L de E2.
- Ces études révèlent que l'exposition à des concentrations de E2 présentes dans l'environnement engendrent des modifications marquées de la présence d'un certain nombre de métabolites dans les gonades de moules et suggèrent que l'E2, qui est une hormone endogène de *M. edulis*, pourrait avoir un rôle physiologique au sein de l'espèce.
- Les résultats suggèrent également que certains effets de l'exposition à E2 puissent ne pas être liés à la reproduction, et que les œstrogènes pourraient modifier d'autres aspects de la physiologie des moules. D'autres travaux sont en cours pour déterminer la structure chimique de ces marqueurs d'effet, les voies touchées et l'identité de biomarqueurs potentiels de la contamination.

2.4. Summary/ Conclusions

- A method was developed to profile a range of signalling molecules in mussel tissues in order to identify potential biomarkers and pathways of endocrine disruption.
- This methodology was used to investigate the effect of exposure of *M. edulis* to the environmental estrogen, E2. After 10 days of exposure, significant differences in metabolite profiles were observed in both male and female mussels, compared with the control groups, when exposed of 5ng/L and to a higher level (50ng/L of E2).
- These studies reveal that exposure to environmentally relevant concentrations of E2 results in marked perturbation of a number of metabolites in mussel gonads and suggest that E2, which is an endogenous hormone in *M. edulis*, also has a physiological role within the species.
- The results also suggest that some of the endpoints of E2 exposure may not be reproductive and that environmental estrogens may alter other aspects of mussel physiology. Further work is underway to determine the chemical structures of these markers, the affected pathways and the identity of potential biomarkers of contamination.

3. DEVELOPPEMENT D'OUTILS MOLECULAIRES POUR L'ETUDE DE LA CONTAMINATION CHIMIQUE

3.1 Introduction

Les milieux aquatiques sont contaminés par de nombreux contaminants, dont des composés génotoxiques (*eg.* Benzo(a)pyrene), des mutagènes (*eg.* nitrosamines) ou des composés reprotoxiques (*eg.* nonylphenols). Ainsi l'indication la plus précoce de la pollution des milieux aquatiques sont les effets affectant les espèces indigènes telles que les poissons ou des invertébrés. Alors que l'étude de l'incidence de tumeurs ou de dommages cellulaires revêt une importance reconnue, il est désormais possible d'étudier les effets de la pollution à l'échelle moléculaire (ADN et protéines), offrant ainsi l'opportunité d'un indicateur plus sensible et précoce. Ces techniques peuvent aussi être utilisées pour analyser la susceptibilité des espèces aux polluants et obtenir des informations au niveau populationnel. Ces techniques moléculaires ont été utilisées pour développer de nouveaux biomarqueurs de perturbations endocriniennes dans le cadre de ce projet.

Cette phase du projet a pour objectif d'utiliser de nouveaux outils moléculaires et d'étudier les réponses afin d'inclure à la fois des effets génotoxiques et des perturbations endocriniennes. L'accent a été mis particulièrement sur la caractérisation du rôle de la quinone réductase (QR), sur les enzymes de biosynthèse des stéroïdes et sur les gènes liés à l'activité

3. DEVELOPMENT OF MOLECULAR ANALYTICAL TOOLS FOR MONITORING OF CHEMICAL CONTAMINANTS

3.1 Introduction

Aquatic environments receive significant levels of chemical contaminants, many of which are known carcinogens (*eg.* Benzo(a)pyrene a component of oil), mutagens (*eg.* nitrosamines produced during meat/fish curing) or reproductive toxicants (*eg.* nonylphenols used in detergents) to both humans and indigenous animals. Indeed, the earliest indication of pollution in aquatic environments is the effect on indigenous animals, including fish and invertebrates. While tumour incidence and cellular damage studies have traditionally played an important role, advances in medical techniques now make it possible to study pollution-induced change at the DNA and protein level or 'molecular' level, offering an earlier and more sensitive indicator. Such techniques can also be exploited to investigate species susceptibility to pollution-induced damage, linking biological effects to the population level. Such techniques have been our focus of previous Interreg projects and we successfully developed a novel molecular biomarker of endocrine disruption for invertebrate species.

This phase of the project aimed to deploy those new molecular tools and extend the study of molecular responses to wider pollution and, in particular to include genotoxic combined with endocrine disruption responses. The specific focus is the characterisation and role of quinone

œstrogénique (vitellogénine, vtg et récepteur à l'oestradiol, ER) et leurs implications dans l'instabilité du génome et dans les problèmes de la reproduction. Les gènes sélectionnés sont conservés au cours de l'évolution et les espèces d'invertébrés peuvent ainsi être des sentinelles permettant de prévenir les impacts sur la santé humaine dans la même région.

3.2 Gènes œstrogéno-régulés et effets des composés œstrogéniques (naturels et synthétiques) et des saisons

3.2.1. introduction

Ce travail est en continuité avec la phase 1 au cours de laquelle deux gènes spécifiques (VTG et ER) ont été isolés et utilisés dans une tentative de mesurer l'exposition des œstrogènes dans les moules, *Mytilus edulis*. Le travail est basé sur l'hypothèse que les moules (invertébrés) se comportent de façon similaire aux poissons (vertébrés) et que les œstrogènes conduisent à une augmentation de l'expression des gènes VTG et ER. Nos premiers résultats ne montraient pas de façon claire (statistiquement significative) de réponse. Les résultats suggéraient que les moules répondent différemment aux œstrogènes présents dans l'environnement par rapport aux poissons. D'autres travaux au cours de cette phase du projet ont étudié l'effet possible de la saison (et plus précisément, de la maturation des moules), ainsi que le rôle possible de différents œstrogènes.

reductase (QR) and steroid biosynthesis enzymes and specifically estrogen-related genes (vitellogenin, vtg; and estrogen receptor, ER) and their involvement in genome instability and reproductive impairment respectively, in determining aquatic invertebrate species susceptibility to environmental pollution. The candidates selected are conserved throughout evolution and the aquatic invertebrates can potentially act as sentinels to predict impacts on human health in the same region.

3.2 Estrogen regulated genes and the effects of different estrogen compounds (natural and human-made) and season

3.2.1. Background

This objective was a continuation of a Phase 1 Interreg III objective in which two specific estrogen-related genes (vtg and ER) were isolated and then employed in an attempt to monitor estrogen exposure in mussels, *Mytilus edulis*. The work was based on the assumption that mussels (invertebrates) would behave similarly to fish (vertebrates) and that estrogens would lead to an increase in the vtg and ER gene response. Our initial results failed to show a clear, statistically significant, response. In brief, the results suggested mussels are not similarly affected by estrogen compounds found in the environment when compared to fish. Further work during this phase of the project investigated the possible effect of season (and, specifically, maturation status of the mussel) as well as the possible role of differing estrogen compound structures.

3.2.2. Méthodes

Des moules bleues (*M. edulis*) ont été recueillies à la main, à marée basse, près de Brighton, en Février 2008, un moment de l'année différent de nos expériences antérieures et donc à un stade différent du processus de maturation sexuelle (début de gamétogenèse). Les moules ont été exposées pendant 10 jours à deux composés œstrogéniques (17 β -œstradiol –E2- et benzoate d'œstradiol –BE) et à différentes concentrations (5 et 200 nM). Les échantillons ont été traités et analysés pour des changements dans l'expression des gènes de VTG et ER.

3.2.3. Résultats

L'expression des gènes VTG et ER dans les moules a été modifiée de façon similaire par l'exposition à E2 et BE. Une augmentation significative de l'expression de VTG a été mesurée après exposition à 50 nM d'œstradiol et à BE (Figure 1). L'expression du gène ER a augmenté de manière significative après l'exposition à BE. Bien que non significatives, les résultats montrent une tendance similaire pour les doses d'œstradiol (figure 2). L'augmentation de l'expression du gène VTG suggère que la concentration de contaminants chimiques est un facteur important

3.2.4. Conclusions/Résumé

L'expression des gènes VTG et ER, dans les moules à un stade précoce de la gamétogenèse dans leur cycle de reproduction, sont tous deux affectés par l'exposition expérimentale à des composés œstrogéniques. Le niveau de concentration semble également être un facteur

3.2.2. Methods

Blue mussels (*M. edulis*) were collected by hand, at low tide near Brighton Pier, in February 2008, a different time of year to our previous experiments and thus at a different stage of the reproductive process (beginning of gametogenesis). Mussels were experimentally exposed for 10 days to two estrogen compounds (17 β -estradiol and estradiol benzoate) and at various dose levels (of 5-200 nM). The samples have been processed and analysed for changes in gene expression of vtg and ER. Each of these genes may represent a new molecular analytical tool if the gene expression is found to vary with dose of chemical exposure compound.

3.2.3. Results

The vtg and ER gene expression in the mussels were both similarly affected by estradiol and estradiol benzoate experimental exposure. There was a significant increase in vtg gene expression after exposure to estradiol at the 50nM dose and after exposure to estradiol benzoate (Figure 1). While, the ER gene expression did increase significantly after exposure to EB, results did show a similar trend for the estradiol doses (Figure 2). The increase in vtg gene expression is less marked at the other estradiol doses, suggesting that concentration of chemical contaminants of exposure is an important factor.

3.2.4. Conclusions/Summary

The vtg and ER gene expression, in mussels at the early stage of gametogenesis in their reproductive cycle, are both affected by

important dans l'induction du gène VTG.

experimental exposure of estrogenic compounds found in the environment. The dose level also appears to be an important factor in the induction response of the vtg gene.

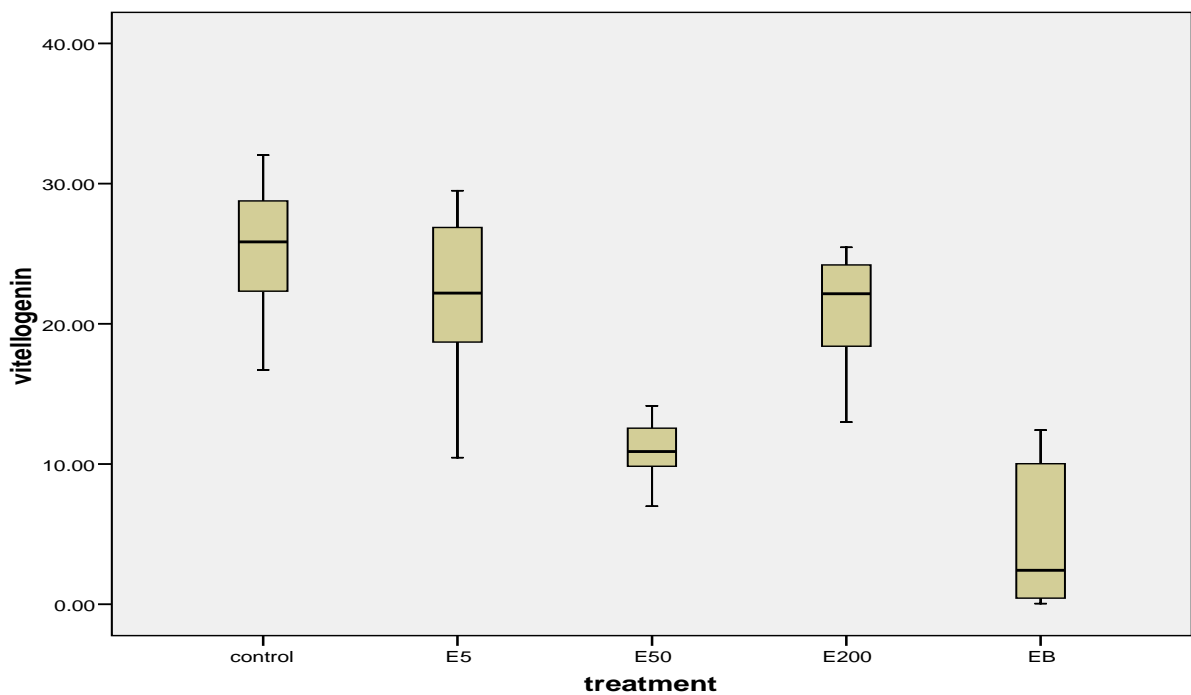


Figure 1 : Niveaux d'expression du gène codant pour la vitellogénine dans des moules exposées à différentes concentrations d'œstradiol (E, suivi de la concentration en ng/L) et d'œstradiol benzoate (EB) lors du début de gamétogenèse. L'analyse statistique sur la PCR quantitative a été effectuée en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. Les différences entre tous les traitements ont été déclarées importantes pour des valeurs de $p < 0,05$.

Vtg gene expression in estradiol and estradiol benzoate-exposed mussels at the early gametogenesis stage of the reproductive cycle. Statistical analysis on quantitative PCR datasets was conducted using non parametric Mann-Whitney test. Differences between all treatments were declared significant with p -value < 0.05 .

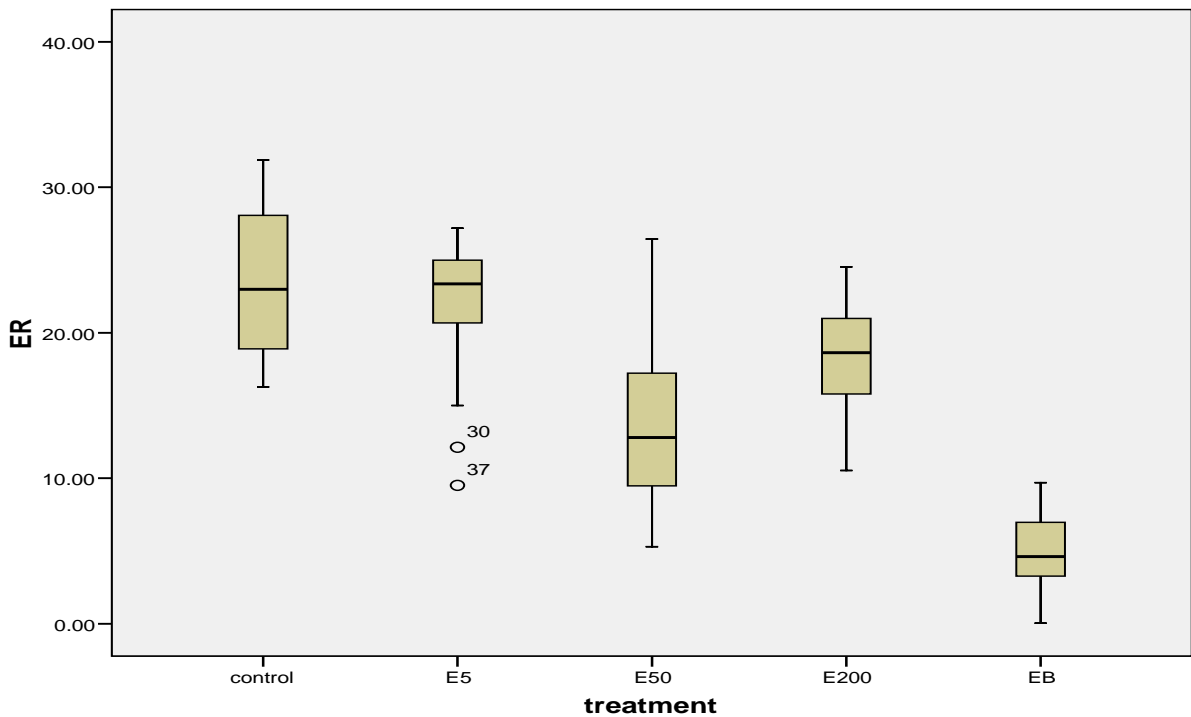


Figure 2. Niveaux d'expression du gène codant pour le récepteur à l'oestradiol (ER) dans des moules exposées à différentes concentrations d'oestradiol (E, suivi de la concentration en ng/L) et d'oestradiol benzoate (EB) lors du début de gamétogenèse. L'analyse statistique sur la PCR quantitative a été effectuée en utilisant le test non paramétrique de Mann-Whitney. Les différences entre tous les traitements ont été déclarées importantes pour des valeurs de $p < 0,05$.

ER gene expression in estradiol and estradiol benzoate-exposed mussels at the early gametogenesis stage of the reproductive cycle. Statistical analysis on quantitative PCR datasets was conducted using non parametric Mann Whitney test on quantitative PCR data sets shows a significant difference between treatments groups in estrogen receptor (ER2) gene expression

3.3 Développement d'un outil analytique lié à la quinine réductase pour l'évaluation de la génotoxicité chez la moule

3.3.1. Introduction

L'œstradiol et d'autres œstrogènes sont potentiellement génotoxiques suite à la formation de métabolites réactifs. Les quinone catécholestrogènes peuvent se lier à l'ADN et former des adduits à l'ADN. Ces métabolites peuvent également conduire à la formation d'espèces réactives de l'oxygène et promouvoir la formation de dommages à l'ADN. La quinone réductase (QR), ou NAD(P)H oxydoréductase, sont des enzymes de biotransformation de phase II qui aident à maintenir la fonction anti-oxydante des cellules. Ici, nous avons l'intention d'isoler le gène QR de moules et d'étudier la possibilité de l'utiliser pour la mesure d'effets génotoxiques liés à des espèces réactives de l'oxygène.

3.3.2. Méthodes

Des spécimens de *M. edulis* adultes ont été recueillis dans la Manche, près de Brighton. Des séquences d'amorces dégénérées ont été réalisées sur la base des alignements de différents gènes QR de l'homme (*Homo sapiens*), du poisson-zèbre (*Danio rerio*), de la grenouille (*Xenopus laevis*) et du dauphin (*Monodelphis sp*). Aucune séquence n'est actuellement disponible chez les invertébrés rendant la conception des amorces difficile. L'homologie de ce gène dans les espèces de vertébrés est également faible.

3.3. Development of quinine reductase gene as an analytical tool for genotoxic chemicals from mussel (*M. edulis*)

3.3.1. Background

Estradiol and other estrogens potentially have genotoxic activity as a result of the formation of reactive estrogen metabolites. Quinone catecholestrogens can bind to DNA and form DNA adducts. These metabolites can also lead to the formation of reactive oxygen species, also promoting DNA damage. Quinone reductase (QR), or NAD(P)H oxidoreductase, is a phase II detoxification enzyme that helps maintain the antioxidant function of the cells by detoxifying quinones. Here, we intended to isolate the mussel QR gene and investigate the possibility of its use in measuring genotoxic damage as a result of estrogen-related reactive oxygen species.

3.3.2. Methods

Specimens of *M. edulis* adults were collected in the English Channel near Brighton. To isolate the gene of interest, and develop a new molecular tool that could be used with mussel samples from across the region, a PCR-based method was used. Sequences for the degenerate primers were designed based on alignments of QR genes in human (*Homo sapiens*), zebrafish (*Danio rerio*), frog (*Xenopus laevis*) and dolphin (*Monodelphis sp*). No sequences are currently available for invertebrates making primer design difficult. The homology for this gene across these vertebrate species was also found to be low.

3.3.3. Résultats

Un petit fragment de 220 pb a été isolé à partir de moules, et a montré 40% d'homologie avec la séquence du gène QR de souris (Figure 3). La faible homologie et le fait de n'avoir pu amplifier le reste du gène en utilisant l'amplification rapide des extrémités d'ADNc (technique RACE) nous a empêché de mener à bien cet objectif. De plus amples études biochimiques / structurelles sont nécessaires afin de confirmer l'identité de ce gène QR chez la moule.

3.3.3. Conclusions/Résumé

Le fragment de gène de moule isolé pourrait correspondre à un fragment d'un gène QR mais l'homologie est faible et il n'est pas possible d'être certain de l'identité du gène sans de nouvelles études moléculaires et biochimiques. Les travaux futurs permettront de répéter la tentative de l'approche RACE pour essayer d'isoler un plus long fragment du gène et permettre de définir son identité. Une fois confirmé, il sera alors possible d'analyser l'expression du gène QR dans les moules exposées expérimentalement à des niveaux élevés d'estrogènes et des effluents des eaux usées, ainsi que dans les moules d'environnements contaminés tels que la Seine où nous avons observé que des mutagènes / composés génotoxiques sont présents dans les sédiments (voir le précédent rapport).

3.3.3. Results

A small 220 bp fragment was isolated from mussel that showed 40% homology with mouse QR (Figure 3). Poor homology and the failure to amplify the rest of the gene using rapid amplification of cDNA ends (RACE) techniques prevented us from completing this objective. Further biochemical/structural studies are required in order to confirm the identity of this putative mussel QR gene.

3.3.3. Conclusions/Summary

The gene fragment isolated from the mussel may be a partial QR gene fragment but the homology is low and it is not possible to be certain without molecular/biochemical further studies. Future work would repeat the RACE approach to try to isolate more of the gene and help decide its identity. Once confirmed it is then possible to analyse the expression of the QR gene in mussels exposed experimentally to high levels of estrogens and sewage effluent, as well as mussels sampled from contaminated environments such as the Seine where we have observed that mutagens/genotoxic compounds are present in sediments (see previous report).

```

M.edulis      -----
CTGCTATCCTCAAGGG 16
M.musculus    AGGAGGCCTCTAGGTTCGCCATGGCAACTGGGCAGAAAGTTGATGAGGGCTAT--
TCGAGTG 58
                                                    ***** ** **
*

M.edulis      CTGGATTGAGTTGAAGTAGAAAGAATGATAGCTTGAGAAGTAAGGTGTCAT--
CTGAGGT 74
M.musculus    TTTGAGTTTGGTGGACCAGAAGTGCTGA-
AGCTCCAGTCGGATGTGGTCGTGCCTGTTCC 117
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
*

M.edulis      AAGGTGTCATCTGAGGTAAGGTGTTATCTACACTGGTGAA--
CAAACCAGCTAAAGTAAG 132
M.musculus    ACAGAGCCATCAGGTCCTAATCAAAGTCCACGCCGTGCGGTGTCAACCCAGTAGAGACATA 177
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
*

M.edulis      GGATAGGT-TAGAGTTTA-AGTAGAAAGAATGA--
TAGCTTGAGAAGTAAGGTGTCATCT 188
M.musculus    CATTGCTCTGGGGCCTACAGTCGAAAACCTGCCCTACCCTACACTCCAGGCTCTGATGT 237
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
*

M.edulis      GAGGTAAGGTGTCATCTACACTGGTGAACAAACCAGC--CCTTCAGGATAG----
CAGGA 242
M.musculus    GGCTGGGATCATAGAATCCGTTGGAGA-
CAAAGTGTCTGCTTTCAAGAAAGGCGACAGGG 296
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
*

M.edulis      ATCACTAGT-----
- 251
M.musculus    TCTTCTGCTACAGCACCGTCTCTGGTGGCTACGCGGAATTTGCTCTTGCAGCCGATGACA 356
          ** *

M.edulis      -----
-
M.musculus    CTATCTACCCCTGCCCGAGACACTGAACTTCAGGCAGGGGGCTGCCCTGGGGATCCCGT 416

```

Figure 3. Aligement de la séquence nucléotidique du fragment putatif de la quinone réductase de moules et la NADPH-quinone oxydoréductase de souris (GenBank Accession No: AAB30620). Les deux séquences ont 40% de similarité. Les domaines homologues sont mis en évidence avec un astérisque.
Nucleotide alignment of putative mussel quinone reductase nucleotide sequence and the mouse NADPH-quinone oxidoreductase gene (GenBank Accession no: AAB30620). The two sequences share 40% similarity. Homologous areas are highlighted with an asterisk.

3.4. Développement d'un outil analytique lié à la cyclooxygénase pour l'évaluation de l'œstrogénicité chez la moule

3.4.1. Introduction

Les études métabolomiques réalisées dans le cadre de ce projet Interreg III (Chapitre 2) ont révélé que l'exposition à des concentrations environnementales de 17- β œstradiol (E2) engendre une perturbation dans un certain nombre de métabolites dans les gonades de moule. Certains de ces métabolites sont similaires à des prostaglandines.

Les prostaglandines sont connues pour être impliquées dans des processus tels que l'inflammation, l'ovulation, et le cancer. La cyclooxygénase (COX) catalyse la biosynthèse des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Il existe deux isoformes de la COX chez les vertébrés. La première, appelée COX-1, est constitutivement exprimée habituellement dans tous les types de cellules chez les vertébrés, tandis que la seconde, la COX-2, est principalement inducible par un large éventail de stimuli intracellulaires et extracellulaires. L'objectif de ce travail était d'isoler le gène de la COX de moules et de déterminer si cette expression des gènes est modulable et indicative de l'altération de la biosynthèse de prostaglandine, suite à des expositions contrôlées d'œstradiol.

3.4.2. Méthodes & Résultats

Pour étudier l'activation de la COX-2, à la suite de l'exposition à des composés

3.4. Develop cyclooxygenase (COX)-2 as a molecular analytical tool of estrogenic exposure in mussels

3.4.1. Background

Metabolomic studies performed as part of the analytical chemistry tools (Chapter *) of this Interreg III project have revealed that exposure to environmentally relevant concentrations of 17 β -estradiol (E2) results in perturbation of a number of metabolites in mussel gonads. We have identified some of these metabolites as prostaglandin-like molecules.

Prostaglandins are known to be involved in processes such as inflammation, ovulation, and cancer. Cyclooxygenase (COX) catalyzes the biosynthesis of prostaglandins from the substrate arachidonic acid. There are two isoforms of COX. The first, termed as COX-1, is usually constitutively expressed in all cell types in vertebrates, while the second, COX-2, is mainly inducible by a wide range of extracellular and intracellular stimuli. The aim of this objective was to use isolate the COX gene from mussel and determine if it's gene expression varied, indicative of altered prostaglandin biosynthesis, following controlled experimental estradiol exposure.

3.4.2. Methods & Results

To explore the activation of COX-2 activity as a result of exposure to estrogenic compounds we have partially isolated and characterized the COX-2 gene in *M. edulis*. The COX-2 gene has been isolated using degenerated primers based on

œstrogéniques, nous avons partiellement isolé et caractérisé la COX-2 de *M. edulis*. Le gène COX-2 a été isolé en utilisant des amorces dégénérées synthétisées sur la base des séquences conservées de la COX-2. La séquence obtenue possède 83% de similitude avec la séquence du COX-2 de *Danio rerio* (poisson zèbre) (figure 4).

3.4.3. Conclusions/Résumé

Les travaux futurs concerneront la quantification des niveaux de mRNA de la COX-2 dans les moules exposées à l'E2 par PCR en temps réel. Les résultats obtenus révéleront si la COX-2 peut être utilisée comme un indicateur précoce de l'exposition œstrogénique chez les mollusques et fournira des informations importantes sur le mode probable d'action et de la toxicité potentielle des composés œstrogéniques chez les moules.

the conserved sequences of COX-2. The sequence obtained had 83% similarity to *Danio rerio* (zebrafish) COX-2 (Figure 4).

3.4.3. Conclusions/Summary

Future work will involve the quantification of the levels of COX-2 mRNA in mussels exposed to E2 using the real-time PCR technique. The results obtained will reveal if COX-2 can be used as an early indicator of estrogenic exposure in molluscs and will provide important information on the likely mode of action and potential toxicity of estrogenic compounds.

Partie / part

III

**ETUDE DES PERTURBATIONS ENDOCRINIENNES CHEZ LES POISSONS
TELEOSTEENS**

/

ENDOCRINE DISRUPTION IN TELEOSTS

1. ETUDE BIOCHIMIQUE ET HISTOLOGIQUE DE LA REPRODUCTION DU GARDON EN HAUTE-NORMANDIE

1.1. Introduction

Le succès de la reproduction est fortement dépendant de nombreux facteurs et, compte tenu de son importance pour une espèce donnée, mérite une attention particulière. De nombreuses études ont souligné les tendances préoccupantes dans la perturbation endocrinienne chez de nombreuses espèces, comme les poissons, qui sont soumis à une série d'effets indésirables de plus en plus documentés (Tyler et al 1998; Chichester et Mills 2005). Parmi les espèces de poissons, le gardon, *Rutilus rutilus* a montré sa vulnérabilité aux perturbations endocriniennes et son intérêt comme un organisme modèle sensible pour évaluer l'impact des xénobiotiques dans l'eau douce (Tyler et al. 2007). Le gardon est une espèce strictement gonochorique, mais l'incidence de l'intersexualité, c'est-à-dire le développement d'ovotestis, a été signalée à des degrés divers, dans de nombreux environnements (Jafri et Ensor 1979; Jobling et al. 1998; Minier et al. 2000).

Compte tenu de l'importance des facteurs environnementaux sur la reproduction et la nécessité d'informations sur la santé des écosystèmes, l'objectif de cette étude était de décrire le cycle de reproduction du gardon, grâce à un échantillonnage mensuel sur dix-huit mois dans un site peu contaminé situé en Normandie. Compte tenu de l'importance des paramètres de l'environnement, il était nécessaire de décrire précisément le cycle de reproduction à l'échelle régionale. L'objectif était également de

1. BIOCHEMICAL AND HISTOLOGICAL STUDY OF THE ROACH REPRODUCTION IN HAUTE NORMANDY

1.1. Introduction

Reproductive success is highly dependent on numerous factors and, given its importance, deserves particular attention. Numerous studies highlighted worrying trends in endocrine disruption including fish, which are subject to a series of adverse effects (Tyler et al 1998; Mills and Chichester 2005). Among fish species, the cyprinid roach, *Rutilus rutilus* has shown its vulnerability to endocrine disturbances and its interest as a sensitive model organism to assess the impact of xenobiotics in freshwater systems (Tyler et al. 2007). Roach is a strict gonochoric species but incidence of intersexuality, *i.e.* development of ovotestis, has been reported to varying degrees in many environments (Jafri and Ensor 1979; Jobling et al. 1998; Minier et al. 2000).

In light of the importance of the environmental factors on reproduction and the need for information on ecosystems health, the aim of this study was to describe the gonadal cycle of *Rutilus rutilus*, by monthly sampling in a low contaminated site located in Normandy (France) over eighteen months. Given the importance of environmental parameters, there is a need to accurately describe the reproductive cycle at a regional scale. The objective was also to document the natural variations of biochemical, histological and physiological features which may be indicative of fish reproductive health (Stentiford et al. 2003). Particular attention was

documenter les variations naturelles des caractéristiques biochimiques, physiologiques et histologiques susceptibles d'être indicatrices de la santé de la reproduction des poissons (Stentiford et al. 2003). Une attention particulière a été portée sur les paramètres qui pourraient être d'un grand intérêt dans le suivi des troubles endocriniens tels que rapport gonado-somatique (GSI), la concentration plasmatique en vitellogénine et les paramètres histologiques.

1.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Echantillonnage

De Septembre 2005 à Juillet 2007, trente poissons adultes (> 14 cm de long), ont été prélevés chaque mois à partir d'un site de référence situé en Normandie (France). Ce site, une ancienne carrière, ne reçoit pas d'effluents urbains ou industriels. Les mesures de l'activité oestrogénique et mutagène des extraits de sédiments effectuées à l'aide du test YES (Peck et al. 2006) et SOS Chromotest (Couteau et al. 2007), respectivement, ont révélé des activités au-dessous des limites de détection. Après avoir été anesthésié, les poissons ont été examinés, mesurés et pesés. Des échantillons de sang ont été prélevés au moyen d'une seringue hypodermique à partir de la veine caudale, centrifugé à 5000 tr / min pendant 5 min à 4 ° C et les plasmas ont été conservés à -80 ° C jusqu'à analyse. Les poissons ont ensuite été disséqués, les gonades ont été enlevées, pesées, découpées en trois morceaux (partie antérieure, moyenne et postérieure), puis fixées dans du formaldéhyde à 4% (pH = 7).

Le facteur de condition (CF), un paramètre écologique, et l'indice gonadosomatique (GSI) ont été calculés comme suit: $CF = (\text{poids corporel éviscéré}) / (\text{longueur totale})^3$; $GSI = (\text{poids des$

directed toward parameters which could be of high interest in monitoring of endocrine disruption such as gonado-somatic index (GSI), plasma vitellogenin content and histological parameters.

1.2. Material and methods

1.2.1. sampling

From September 2005 to July 2007, thirty mature fish (>14 cm long), were sampled every month from a reference site located in Normandy (France). This site, a former sand quarry, does not receive any effluents from urban or industrial origin. Measurements of estrogenic activity and mutagenicity of sediment extracts performed using the yeast estrogen screen (YES assay, Peck et al. 2006) and SOS chromotest (Couteau et al. 2007), respectively, yield activities below detection limits (Minier and Couteau, personal communications). After being anaesthetised, the fish were externally examined, measured and weighted. Blood samples were taken using a hypodermic syringe from the caudal vein, centrifuged at 5000 rpm for 5 min at 4°C and the resulting plasma were kept at -80°C until analysis. Fish were then dissected, gonads were removed, weighed, cut into three pieces from the anterior, middle and posterior region and then fixed in 4% formaldehyde (pH=7).

The condition factor (CF), an ecological parameter, and gonadosomatic index (GSI) were calculated as: $CF = (\text{eviscerate body weight}) / (\text{total length})^3$; $GSI = (\text{gonad weight} / (\text{eviscerate body weight} - \text{gonad weight}) \times 100)$. Mean temperature and photoperiod were obtained from the local French weather forecast station (Météo France).

gonades / (poids corporel éviscéré - poids des gonades) × 100). La température moyenne et la photopériode ont été obtenues à partir de la station de prévisions météorologiques (Météo France).

1.2.2. Histologie

Les tissus ont été déshydratés puis inclus dans la paraffine. Des sections transversales de 5 µm ont été coupées, colorées avec du safran, haematoxylin et éosine puis analysées sous microscope optique. Les stades spermatogénétiques ont été fractionnés en six étapes en fonction de la morphologie et la taille des cellules: spermatogonies primaires, secondaires spermatogonies, spermatocytes, spermatides et spermatozoïdes (Fig.1). La maturation des ovocytes a été divisée en cinq étapes: oogonies, ovocytes primaires, pré-vitellogéniques, secondaires et atrétiques (Fig.2). La classification était basée sur la taille des cellules, la morphologie, et la mesure de l'accumulation de vitellus. Le stade prépondérant a été utilisé pour caractériser la maturité sexuelle des poissons.

1.2.3. Plasma vitellogénin assessment

La quantification des concentrations plasmatiques en vitellogénine (vtg) ont été obtenus en utilisant un test immunologique qui a été validé pour une grande variété de cyprinidés (Jobling et Sumpter, 1995).

1.3. Résultats

1.3.1. Condition générale et développement gonadique

Plus de cinq cents poissons ont été capturés au cours de cette étude et aucun n'a montré de lésions pathologiques externes. Néanmoins 8,13% des poissons étaient infectés par le parasite *Ligula intestinalis*. Parce que ce parasite modifie de façon

1.2.2. Gonad histology

Gonad tissues were dehydrated through a series of graded ethanol (50-99,9 %), cleared with xylene, and finally embedded in paraffin. Transverse sections of 5 µm were cut, stained with safran, haematoxylin and eosin and analysed under optical microscope.

Six spermatogenic stages were differentiated according to the morphology and the size of the cells: primary spermatogonia, secondary spermatogonia, spermatocytes, spermatids and spermatozooids (Fig.1). Oocyte maturation was divided into five different stages: oogonia, primary oocytes, pre-vitellogenic oocytes, secondary oocytes, and degenerated oocytes (Fig.2). The classification was based on cell size, morphology, and the extent of vitellus accumulation. The preponderant stage was used to characterize the sexual maturity of the fish.

1.2.2. Plasma vitellogénin assessment

Quantification of plasma vitellogénin concentrations were achieved using an established homologous carp an enzyme-linked immunoassay that has been validated for use with a wide variety of cyprinid fish (Sumpter and Jobling 1995).

1.3. Results

1.3.1. General condition and gonadal development

More than five hundred fish were caught during this study and none shown evidence of pathologic lesions when examined externally. Nevertheless 8.13% of the fish appeared infected by the parasite *Ligula intestinalis* upon dissection.

significative la croissance et les mécanismes endocriniens (voir le chapitre 2; Carter et al. 2005), les poissons infectés ont été exclus de la présente étude. La plupart des poissons mesuraient entre 15 et 25 cm de long bien que quelques un dépassaient les 30 cm mais aucune différence significative n'a pu être démontrée entre les prélèvements (données non présentées). Le facteur de condition (FC) variait entre 0,7 et 1,3 pour une grande majorité (68,8%) des poissons mâles et de 0,7 et 2,0 pour 80,4% des femelles (fig. 3). Seulement 5,3% des mâles et 2,2% des femelles, avaient un CF au-dessous de 0,7, ce qui indique que la plupart de la population étudiée était en bonne santé. Bien que les FC n'ont pas beaucoup varié au cours de la période d'échantillonnage, une augmentation significative a été observée pour les deux sexes en Mars 2007, au cours de la période de fraie, atteignant une valeur moyenne de 1,0 pour les mâles et 2,8 pour les femelles.

Comme l'indique le GSI (fig. 4), la croissance des testicules était régulière, passant de 1-2% du poids corporel en septembre 2006 pour atteindre 6-12% en Mars 2007. Cette croissance presque linéaire n'a pas été observée l'année précédente puisque le GSI a diminué en décembre 2005, avant d'augmenter de nouveau en Février 2006. Des observations similaires ont été obtenues à partir des mesures des GSI femelles. Les ovaires ne représentaient que 3-5% du poids corporel total en septembre 2006 et ont atteint des valeurs variant de 15 à 25% selon les poissons en Mars 2007. Entre novembre et décembre 2005, le GSI moyen a diminué de 50% et une croissance significative des ovaires n'a pu être mesurée avant Février 2006. Ainsi, la période hivernale apparaît comme un

Because the parasite can significantly alter growth and endocrine mechanisms (see chapter 2; Carter et al. 2005), infected fish were subsequently excluded from the present study. Most of the fish were between 15 and 25 cm long although a few exceeded 30 cm long but no significant difference could be assessed between sampling times (data not shown). Condition factor (CF) varied from 0.7 and 1.3 for a large majority (68.8%) of the male fish and from 0.7 and 2.0 for 80.4% of the female fish (fig 3). Only 5.3% and 2.2% of the males and females, respectively, had a CF below 0.7, indicating that most of the studied population was healthy. Although the CF did not varied much over the sampling period, a significant rise was observed for both sex in March 2007, during the spawning period, reaching a mean value of 1.0 and 2.8 respectively in males and females.

As indicated by the gonado-somatic index (Fig. 4), testes grew steadily from September 2006 (with values of 1-2%) to March 2007 (reaching 6-12% according to fish). This almost linear growth was not observed the previous year as the GSI decreased in December 2005 before it rose again in February 2006. Similar observations could be derived from the measurements of the female GSI. Ovaries represented only 3-5% of the total body weight in September 2006 and reached values varying from 15 to 25% according to fish in March 2007. Between November and December 2005, mean GSI decreased by 50% and significant ovarian growth could not be measured before February 2006. Thus the winter period appeared as a time where gonad maturation was either stopped or slowed down for both sexes during the two studied years.

temps où la maturation des gonades a été soit arrêtée soit ralentie pour les deux sexes au cours des deux années étudiées.

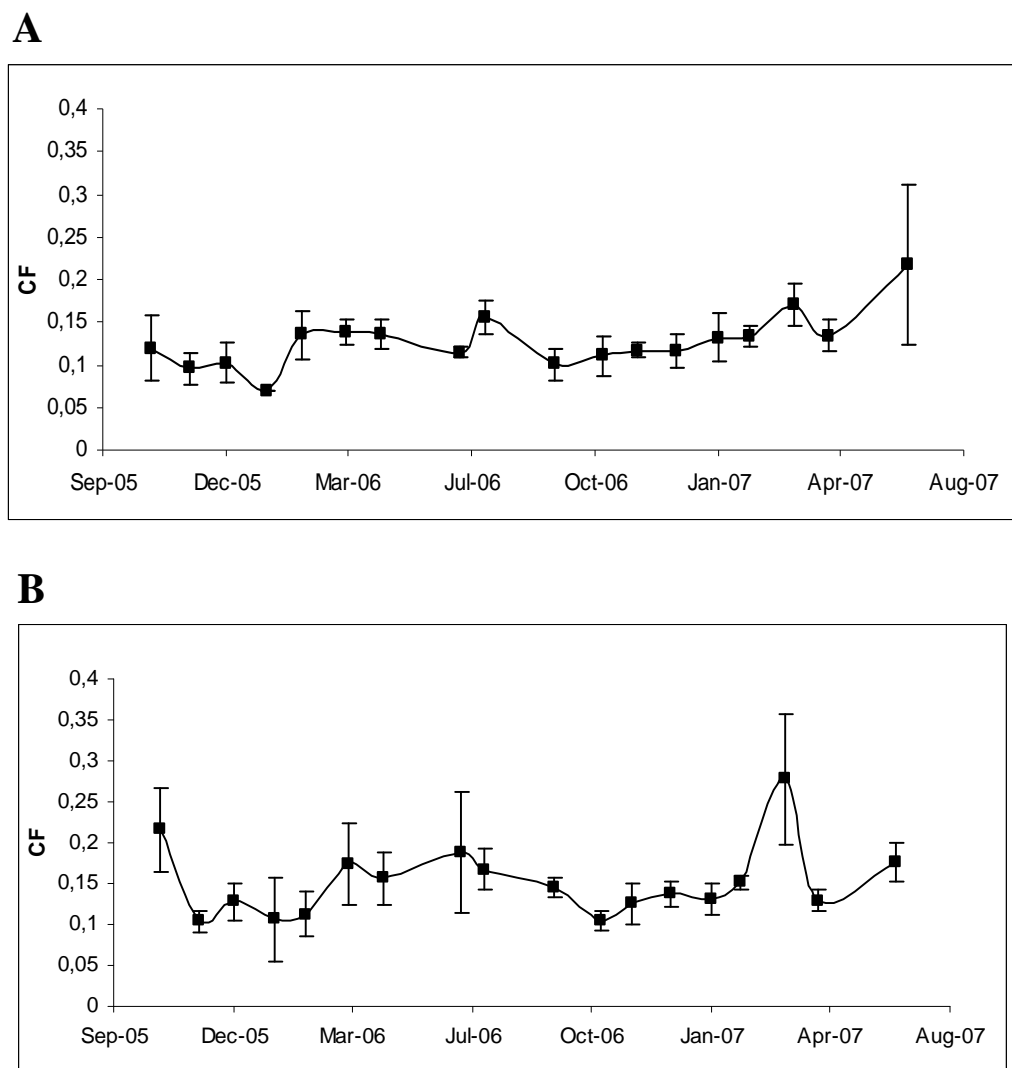


Figure 5: Condition factor during the reproductive cycle of males (A) and females (B) roach. Results are given as mean \pm S.E. Significant mean differences were indicated by star (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

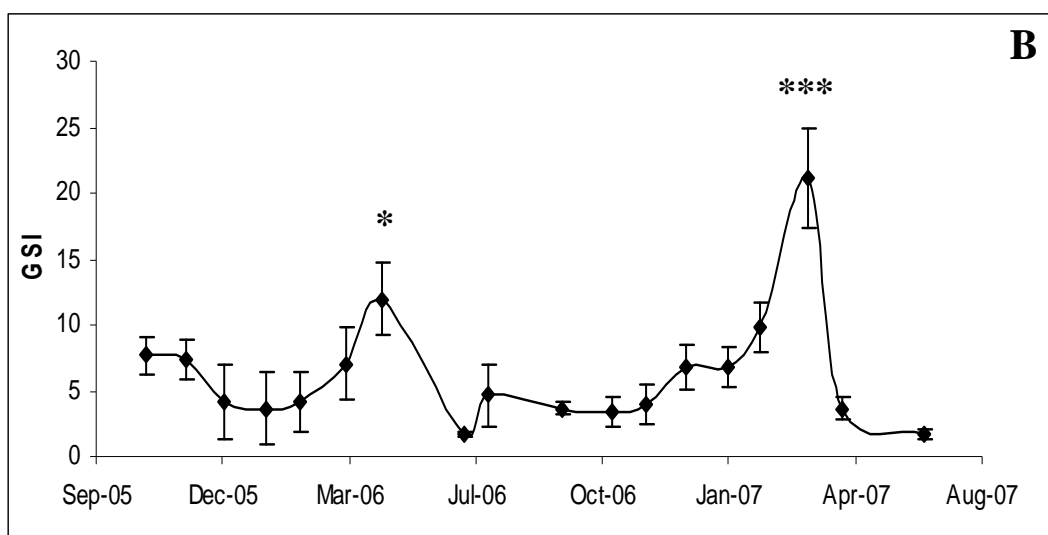
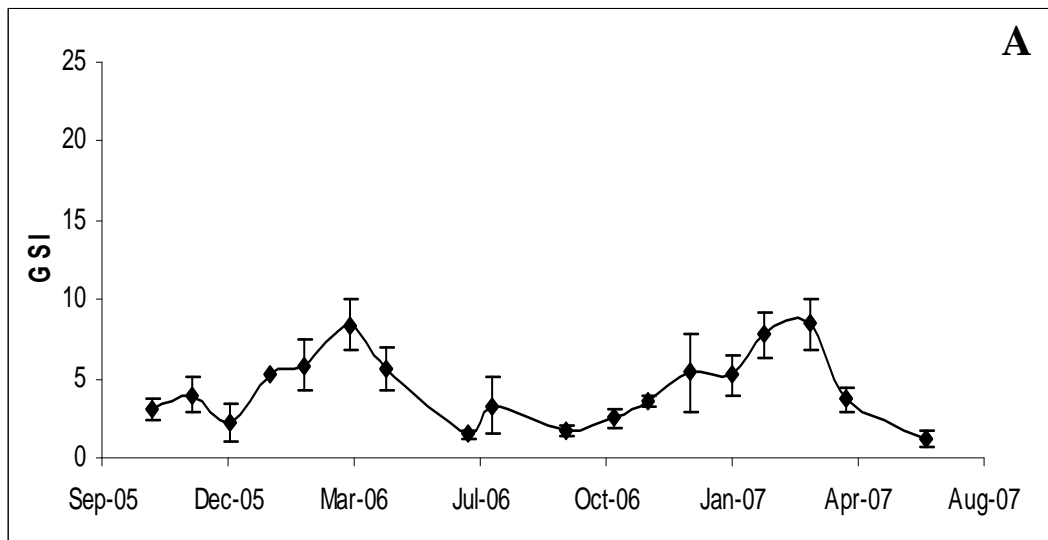


Figure 2: Gonadosomatic index of males (A) and females (B) roach during the reproductive cycle. Results are given as mean ± S.E. Significant mean differences were indicated by star (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

1.3.2. Observations histologiques

Des lésions histologiques n'ont été que rarement trouvées dans les gonades des échantillons. Le nombre de poissons présentant des fibroses, des foyers inflammatoires et des nécroses était inférieur à 2% pour les deux sexes sur l'ensemble de la période d'échantillonnage. En outre, aucun intersexué n'a été observé en dépit de sa très grande fréquence dans différents pays, y compris dans les rivières de la région d'étude (Minier et al. 2000). Ceci, avec l'examen externe et l'état engénéral suggère fortement que la population étudiée est dans une relative bonne santé dans le site échantillonné.

Les fréquences relatives des différents stades gonadiques au cours du cycle de reproduction ont été déterminées (Fig. 5). L'une des caractéristiques de l'ovaire a été la présence d'ovocytes primaires tout au long de l'année. Au contraire, les stades plus matures tels que les ovocytes secondaires ne se développaient qu'à des périodes précises. Ces cellules ont été observées d'abord en septembre-novembre puis en janvier-mars au cours de la première année, coïncidant avec la croissance rapide du GSI. Ce développement biphasique, indique que la maturation gonadique a été interrompue et que des ovocytes ont été sans doute résorbés en décembre 2005, alors qu'une majorité d'ovocytes primaires étaient observés au sein des sections. Au contraire, au cours du deuxième cycle de reproduction, des ovocytes secondaires étaient prépondérants de septembre 2006 à mars 2007.

La comparaison des deux cycles de reproduction (2006 et 2007) a montré que 80% des gardons femelles étaient déjà mature en janvier 2007 et présentaient des ovocytes secondaires

1.3.2. Histological observations

Histopathological lesions were only seldom found in gonads of sampled roach. The number of fish showing gonads with connective tissue, inflammatory foci and necrosis was less than 2% in both sexes over the whole sampling period. Furthermore, no intersex fish were observed despite its wide occurrence in different countries including rivers of the region of the study (Minier et al. 2000). This, together with the external examination and condition index recorded strongly suggests that the population studied was in relative good health in the sampling site.

Relative frequencies of the different gonadic stages during the reproductive cycle were determined by microscopic observations (Fig. 5). One characteristic of the ovary was the presence of primary oocytes throughout the year. In contrast, maturing stages such as secondary oocytes developed only at definite periods. These cells were observed first in September-November then in January-March during the first studied year and coincided with the rapid GSI growth. This biphasic development indicated that gonadal maturation was interrupted and oocytes probably partly resorbed in December 2005 when only a majority of primary oocytes were observed within sections. On the contrary, during the second reproductive cycle, secondary oocytes were preponderant from September 2006 to March 2007.

Comparison of the two reproductive cycles (2006 and 2007) showed that secondary oocytes developed earlier in winter 2007 as 80% of the female roach were already mature in January 2007 while only 25% had reached this stage in January 2006. Furthermore, all studied female fish finally

développés alors que seulement 25% avaient atteint ce stade en Janvier 2006. En outre, tous les poissons femelles étudiés sont arrivés à maturité en 2007 alors que ce n'était pas le cas en 2006. Bien que le temps de la maturité complète peut avoir été manquée (entre deux échantillonnages), les données indiquent qu'une grande proportion de femelles n'ont pas développé d'ovocytes secondaires en 2006 (seulement 50% présentaient des ovocytes secondaires en mars et avril, bien qu'aucune différence de longueur des poissons n'a pu être observée entre les poissons de l'échantillon des deux années).

Des observations analogues peuvent être faites concernant l'étude de la gamétogenèse mâle. L'examen histologique des testicules a montré que les spermatogonies (I et II) étaient présentes tout au long de l'année, mais les spermatozoïdes se développaient apparemment deux fois au cours du cycle de reproduction. Ces cellules ont été observées pour la première fois de septembre à novembre, mais étaient absentes en décembre. Elles étaient de nouveau présentes en janvier et puis se sont différenciées en spermatides puis spermatozoïdes. Ces dernières étapes ont été plus fréquentes et sont apparues plus tôt en 2007 qu'en 2006. 90% des testicules de poissons avaient des spermatozoïdes en mars 2007 tandis que les mâles matures ont été observés seulement un mois plus tard en 2006, avec une proportion limitée à moins de 30% des mâles étudiés.

1.3.3. Plasma vitellogenin concentrations

La concentration plasmatique en vitellogénine (vtg) a augmenté rapidement dès septembre 2006 chez les gardons femelles. Cette augmentation a été simultanée à la forte augmentation de GSI et à

reached maturity in 2007 while this was not the case in 2006. Although time of complete maturity could have been missed between two sampling times, data indicated that a large proportion of female never even developed secondary oocytes in 2006 (only 50% of the females in March and April showed secondary oocytes, although no differences in fish length could be seen between the sampled fish both years).

Similar observations could be derived from the study of male gametogenesis. Histological examination of the testes showed that spermatogonias (I and II) were present throughout the year but spermatozooids apparently developed twice during the reproductive cycle. These cells were first observed from September to November but were absent in December when only spermatogonias were observed. Spermatozooids again developed in January and cells then differentiated into spermatids and spermatozooids. These latter stages were more frequent and arose earlier in 2007 than in 2006. 90% of the testis of fish had spermatozooids in March 2007 while mature males were only observed a month later in 2006 with a proportion restricted to less than 30% of the studied males.

1.3.3. Plasma vitellogenin concentrations

Plasma vitellogenin (vtg) rose rapidly in September 2006 in female roach. This rise was simultaneous to the sharp GSI increase and the appearance of secondary oocytes (both at the cortical alveoli and vitellogenic stages). Value reached 600 µg/mL in October 2006 and stayed at this level until March 2007 when another sharp increase in vtg content was measured in mature females (Figure 6). Vtg concentrations peaked at

l'apparition d'ovocytes secondaires. La valeur atteint 600 mg / mL en octobre 2006 et est resté à ce niveau jusqu'en mars 2007, date à laquelle une autre forte augmentation de vtg a été mesurée chez les femelles matures (figure 6). Les concentrations de vtg ont culminé à 2000 mg / mL et ont ensuite diminué jusqu'à de très faibles valeurs de juin à août (5-50 mg/mL). En mars 2006, la vtg plasmatique moyenne était seulement de 800 mg/mL illustrant la forte proportion de femelles qui ne sont pas parvenues à maturité. En outre, la diminution de GSI mesurée chez les femelles en décembre 2005 a été accompagnée par une très faible concentration en vtg (10 mg/mL).

De faibles concentrations de vtg plasmatique ont été enregistrées dans tous les mâles tout au long de l'étude (valeur moyenne = 24 ng/mL). Une augmentation a été mesurée pendant la période de fraie avec des valeurs atteignant 120 mg/mL.

1.3.2. Paramètres environnementaux

La température mensuelle moyenne et la photopériode au site d'échantillonnage sont indiquées à la figure 7. La température et la lumière du jour a chuté de façon spectaculaire d'octobre à décembre 2005. La température était alors de 4°C et n'est pas remonté avant mars 2006, date à laquelle la température n'était que de 6°C. Les variations ont été différentes l'hiver suivant. La température n'est tombée qu'à 6°C en décembre 2007 et est repassé au-dessus de 8°C les mois suivants. Ainsi, l'hiver 2007 a été beaucoup plus doux que l'hiver 2006 alors que les cycles de reproduction étaient aussi différents. Au contraire, les variations de la photopériode ont été très similaires les deux années. Des valeurs faibles ont été observées en hiver et une première

2.000 µg/mL and then decreased to very low values from June to August (5-50 µg/mL). In March 2006, mean plasma vtg was only 800 µg/mL illustrating the high proportion of females that did not reach maturity. In addition, the decrease in GSI measured in female in December 2005 was accompanied by a very low plasma vtg (10 µg/mL).

Low plasma vtg concentrations were recorded in all males throughout the study (mean value = 24 ng/mL). Only a small increase was measured during spawning time with value up to 120 µg/mL.

1.3.2. Environmental parameters

Mean monthly temperature and photoperiod at the sampling site are shown in figure 7. Temperature and daylight time dropped dramatically from October to December 2005. Temperature was then 4°C and did not rise before March 2006 when it was only 6°C. A different temperature pattern has been observed during the next winter. Temperatures dropped only to 6°C in December 2007 and rose above 8 °C the following months. Thus winter 2007 was characterised by much more mild temperatures than winter 2006 and this paralleled the different pattern of gametogenesis and gonadal growth observed both years. On the contrary, variations of photoperiod were more similar during the two years. Low values were observed in winter and a first significant increase arose between February and March. Nevertheless, in 2007, high values were measured in April and was followed by a sudden decrease in daylight and a slow increase in temperature combined with a period of strong rainfalls.

augmentation importante du jour est apparue entre février et mars. Néanmoins, en 2007, des valeurs élevées ont été mesurées en avril et ont été suivies d'une brusque diminution de la lumière naturelle et d'une lente augmentation de la température combinée avec une période de fortes pluies.

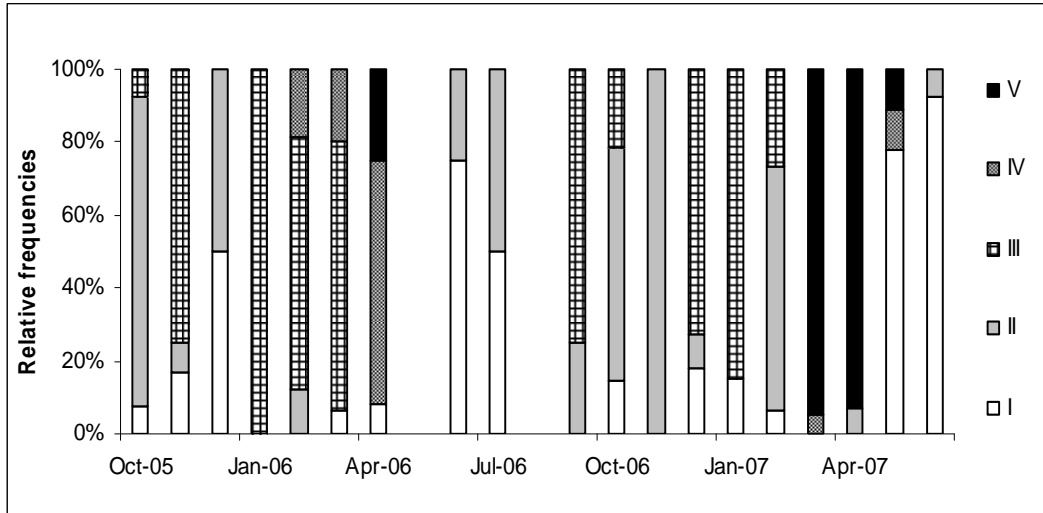


Figure 3 : Fréquences relatives des différents stades de maturité des cellules males.
 Relative frequencies of different stages of maturity of the spermatogenic cycle.
 I and II: spermatogonias I and II; III: spermatocytes; IV: spermatids; V: Spermatozooids.

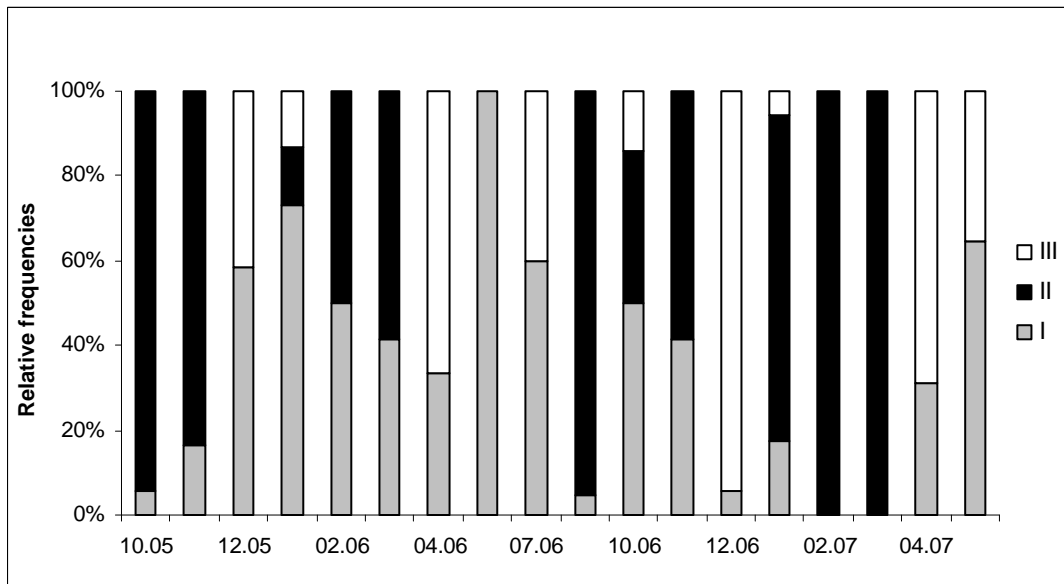


Figure 4: Fréquences relatives des différents stades de maturité des cellules femelles.
 Relative frequencies of different stages of maturity of the ovogenetic cycle.
 I: Primary oocytes; II: Mature secondary oocytes; III: atretic oocytes

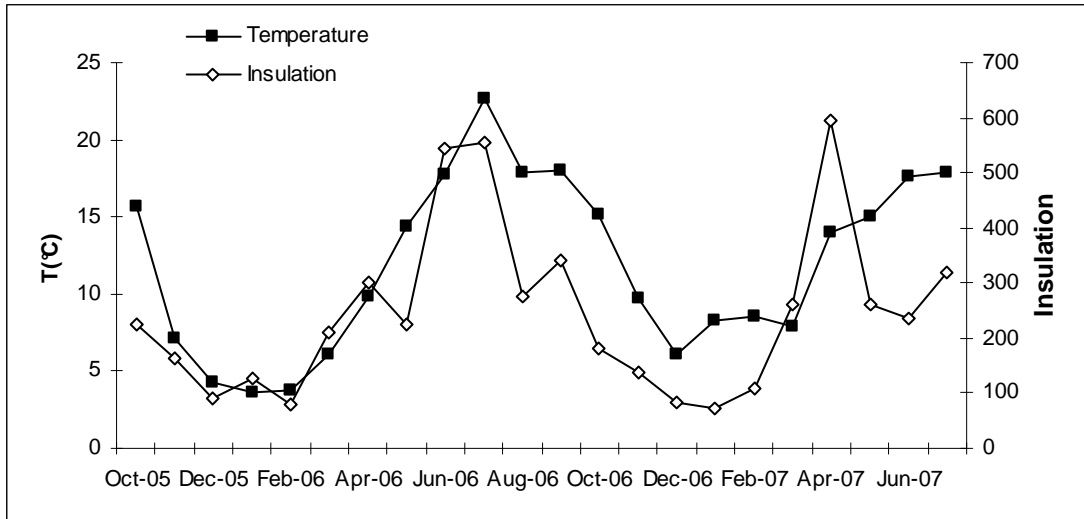


Figure 5: Variations de la température (■) et de la période diurne (◇, en min) pendant la période d'échantillonnage.
 Monthly mean temperature (■) and photoperiod (◇, en min) over the sampling period.

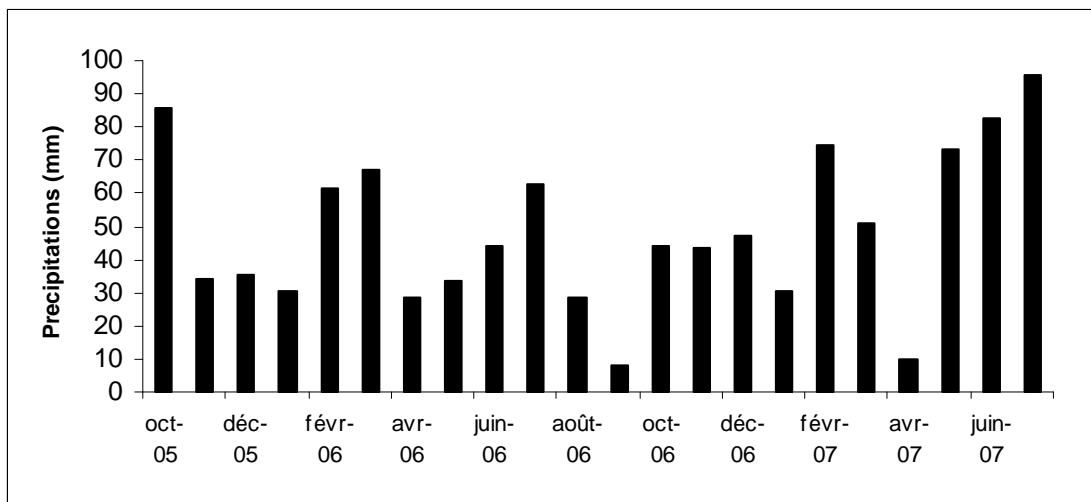


Figure 6: Variations des précipitations pendant la période d'échantillonnage
 Monthly mean rainfall over the period October 2005-July 2007.

1.4. Discussion

La reproduction des poissons a été l'objet de beaucoup d'attention au cours de la dernière décennie, essentiellement parce qu'il a été montré que les mécanismes endocriniens peuvent être affectés par des effluents domestiques, agricoles ou d'origine industrielle (Jobling et al. 1998; Noaksson et al. 2001; Bjerregard et al. 2006). Bien que les conséquences à long terme de ces observations soient toujours débattues, quelques rapports indiquent que la présence de perturbateurs endocriniens (PE) pourrait entraîner l'effondrement des populations de poissons exposés (Kidd et al. 2005). La présence de poissons intersexués et l'induction de vtg chez les males sont parmi les modifications liées aux PE les plus fréquemment rapportées. Même les « sites de référence » présentent des poissons intersexués à des taux compris entre 1 et 4% (Jobling et al. 2002; Bjerregard et al. 2006). Au cours de ces deux années d'étude, plus de 500 gardons (225 males) ont été échantillonnés dans un site où aucun effluent anthropique n'a pu être observé. Malgré un examen histologique scrupuleux des gonades, aucun intersexué n'a pu être observé. Ces résultats renforcent l'idée que de très faibles niveaux d'intersexualité peuvent exister dans des sites peu contaminés. Jafri et Ensor (1979) ont signalé un seul gardon intersexué parmi plus d'un millier de poissons examinés histologiquement. Lukšienė et al. (2000) n'ont également trouvé qu'un intersexué parmi 949 gardons en Suède. En conséquence, le développement naturel d'intersexués doit donc se produire pour moins de 0,5% de la population chez cette espèce. En outre, les faibles niveaux de vtg mesurés indiquent une faible occurrence de xéno-

1.4. Discussion

Fish reproduction received much attention during the last decade mainly because it has been showed that endocrine mechanisms can be impaired by effluents of domestic, agricultural or industrial origin released into the water (Jobling et al. 1998; Noaksson et al. 2001; Bjerregard et al. 2006). Although long term consequences of these observations are still under debate, a few reports indicated that the presence of endocrine disrupting compounds (EDCs) could be of high ecological relevance as it can lead to the collapse of exposed fish populations (Kidd et al. 2005). Among the more commonly reported alterations linked to EDCs are the presence of intersex fish and the induction of plasmatic vtg in males. Even so-called reference sites contain intersex fish with basal levels often considered to be between 1 and 4% (Jobling et al. 2002; Bjerregard et al. 2006). During this two year study, more than 500 roach (225 males) were sampled in a site where no obvious anthropogenic effluents could be observed. Despite scrupulous examination of histological gonad sections, no intersex could be observed among the local population. These results reinforce the idea that no or very low levels of intersexuality should occur in low contaminated sites. Jafri and Ensor (1979) reported that only one intersex roach was observed among over a thousand of histologically examined fish. Lukšienė et al. (2000) also found one intersex among 949 roach in Sweden. Accordingly, natural intersex occurrence may thus be below 0.5% in this gonochoristic species. Furthermore, low levels of plasma vtg were measured in male fish thus indicating low occurrence of xeno-oestrogens. A mean value of 24 (± 10) ng/mL was recorded during

oestrogènes. La valeur moyenne de 24 ng/mL enregistrée au cours de cette étude pourrait être représentative du taux de vtg chez des poissons mâles non exposés. Néanmoins, des valeurs plus élevées ont été mesurées au cours de la période de fraie comme cela a déjà été rapporté chez le flet (Kirby et al. 2004). Ce phénomène pourrait être lié à des composés endogènes synthétisés au cours de cette période (voir chapitre suivant) et suggère que des concentrations de vtg proches du microgramme ne sont pas indicatives d'une perturbation endocrinienne chez le gardon au cours du fraie.

L'échantillonnage mensuel a permis la réalisation d'une étude détaillée du cycle de reproduction. La principale caractéristique issue des observations histologiques a été l'apparente maturation biphasique des gamètes mâles et femelles au cours du cycle. Les ovocytes secondaires apparaissent à la fin de l'été et accumulent rapidement des réserves en parallèle de l'augmentation du taux de vtg plasmatique et du GSI. Ce développement des gonades s'interrompt apparemment au début de l'hiver et ne reprend qu'en février de l'année suivante. Cet arrêt de la maturation des gonades a rarement été signalé (Lukšienė et Svedang 1997; Rinchar et Kestemont 1996) et pourrait être dû à un manque de réserve énergétique. Rowe et al. (1991) ont suggéré que la maturation des poissons dans l'environnement est régulée par les réserves de matières grasses et par la photopériode. Ce n'est que lorsque les réserves énergétiques sont suffisantes que le processus de maturation gonadique peut se poursuivre. L'insuffisance de réserves pourrait donc conduire à l'arrêt de la maturation gonadique. La diminution apparente du nombre d'ovocytes secondaires

this study and may be representative of non-exposed male fish. Nevertheless, higher values were measured during the reproductive period as was already observed in flounder (Kirby et al. 2004). This may be related to estrogenic endogenous compounds synthesised during this period (see next chapter) and suggest that vtg concentrations close to the microgram range may not be indicative of endocrine disruption in roach during reproduction.

Monthly sampling of roach resulted in a detailed study of the roach reproductive cycle. The main feature shown by histological observations was the apparent biphasic maturation of the male and female gametes during the reproductive cycle. Vitellogenic oocytes developed in female gonads at the end of the summer and rapidly accumulated reserves which paralleled the increase of plasma vtg. Accordingly, a rapid rise of the female GSI could be measured. This gonad development and accumulation of vtg into secondary oocytes apparently stopped at the beginning of the winter and only resumed in February of the following year. An arrest in gonad maturation has seldom been reported in wild roach (Lukšienė and Svedang 1997; Rinchar and Kestemont 1996) and might be attributed to a lack of energy reserve. Rowe et al. (1991) suggested that maturation in fish is environmentally regulated by fat stores and photoperiod. Only when energy reserves are sufficient the gonadal maturation process proceeds on. Insufficient fat stores may thus have led to gonadal maturation arrest. The apparent decrease in the number of secondary oocytes could also suggest that vitellus and glycogen contained in these cells may be used by the fish as substitute energy during oocyte degeneration when environmental conditions

pourrait également permettre de subvenir en énergie lorsque les conditions environnementales sont difficiles.

Un autre résultat intéressant de cette étude réside dans les différences de GSI et de pourcentage de poissons matures mesurées les deux années. La dernière période de maturation observée entre janvier et mars 2006 a été caractérisée par de faibles pourcentages de males et femelles matures, probablement en raison de la faible température hivernale. Au contraire, la maturité sexuelle a été précoce au cours du deuxième cycle de reproduction, dès janvier 2007 pour les femelles et février 2007 pour les males. En outre, le pourcentage de poissons matures des deux sexes était plus élevé au cours de la deuxième année. Les températures plus chaudes enregistrées au cours de l'hiver 2007 pourraient expliquer cette précocité car il a été montré que la température régule la maturation gonadique (Bromage 2001; Morrison, 1986). Plusieurs études ont également signalé des effets similaires d'une température élevée pendant l'hiver. Des gardons exposés aux rejets d'eau de refroidissement d'une centrale thermique, fraient un mois plus tôt selon Lukšienė et al. (2000) ou 2 mois selon Bray (1971).

Les conséquences de cette plus grande proportion de poissons matures devraient être un meilleur succès de la reproduction avec un nombre plus élevé de juvénils. Néanmoins, le moment de frai est essentiel. Pour un développement optimal, il faut de bonnes conditions environnementales, en terme de températures et de nourriture. La diminution de l'état nutritionnel peut conduire à altérer la fécondité (Bryuzgin 1974; Kuznetsov et Khalitov 1978) et à la baisse de la qualité des oeufs qui dégénèrent rapidement après la fraie (Lukšienė

are difficult.

Another interesting result of this study is the differences in both GSI and percentage of mature fish measured between the two studied years. The final maturation period observed between January and March 2006 was characterized by low percentages of both males and females mature fish probably due to the low temperatures measured during winter time. On the contrary, precocity of sexual maturity was observed during the second reproductive cycle, with a complete maturation achieved in January 2007 for females and in February 2007 for male roach. Moreover, the percentage of mature fish in both sexes was higher during this second year. The warmer temperatures recorded during the winter of 2007 could explain this earlier spawning because it has been shown that temperature regulates the gonadal maturation (Bromage 2001; Morrison 1986). Several studies have also reported similar effects of elevated temperature during winter time. In roach exposed to power plant cooling water discharges, spawning arose a month earlier (Lukšienė et al. 2000) and Bray (1971) even observed spawning of roach to take place two months in advance in such conditions.

The consequences of this higher proportion of mature fish should be a better reproductive success with a higher number of offspring. Nevertheless, timing in spawning is essential. Optimal development of the offspring would require good environmental conditions including higher temperature and food availability. Decrease in nutritional status can result in altered fecundity (Bryuzgin 1974; Kuznetsov and Khalitov 1978) and in lower quality of the eggs

et Svedang 1997). L'apparition de fortes pluies, la diminution de la luminosité et des températures observées après le fraie en 2007 pourraient compromettre le développement des juvénils. En outre, ces conditions pourraient aussi affecter les poissons adultes. De même que les juvénils, les adultes ont besoin de bonnes conditions environnementales afin de se remettre de cette période. Bien que ceci ne soit que spéculation, cela souligne que la reproduction est un moment très critique fortement dépendant des régulations endocrines et des interactions complexes avec les facteurs environnementaux. Dans le contexte d'un réchauffement climatique de la planète et du dérèglement des événements climatiques, ces dérégulations pourraient être alarmantes.

1.5. Conclusions

Cette étude a souligné l'importance de la température pour la reproduction des gardons. Une élévation de la température en hiver peut moduler la date de frai et pourrait avoir de profondes conséquences sur la population. Il a également été montré qu'un retard dans la gamétogenèse ne doit être attribué aux perturbateurs du système endocrinien qu'avec prudence car la température peut avoir des effets importants. Au contraire, d'autres biomarqueurs semblent être clairement indicatifs de perturbations endocriniennes. Un très faible taux de gardons intersexués et de vtg plasmatique peuvent être observés dans les sites peu contaminés.

which quickly degenerate after spawning (Lukšienė and Svedang 1997). The occurrence of heavy rainfall, decreased luminosity and lower temperatures than normal observed after spawning in 2007 could compromise the development of the offspring. Furthermore, negative impact could also result from this earlier spawning event for mature fish. Together with the offspring, adult roach would require good environmental condition to recover from this period. Although this may only be speculation, it emphasises that reproduction is a critical moment highly dependant on both endocrine regulations and complex interactions with environmental factors. Changes in environmental conditions due to global warming and deregulation of climatic events may exacerbate the reproductive dysfunction observed in many fish populations.

1.5. Conclusions

This study further emphasised the importance of temperature for roach reproduction. Elevated temperature during winter time can modulate spawning time and may have profound consequences on the population. It also showed that delay in gametogenesis may not necessarily be related to exposure to endocrine disrupting compounds as fluctuation in temperature can have major effects on reproductive development. On the contrary other biomarkers may be clearly indicative of endocrine-mediated effects. Very low occurrence of intersex roach and vtg concentration can be observed in non-impacted sites.

2. ETUDE DES VARIATIONS SAISONNIERES DES TAUX D'HORMONES STEROÏDIENNES CHEZ LE GARDON

2.1. Introduction

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont susceptibles d'interférer avec de nombreux mécanismes de régulation interne. Leur action sur les hormones stéroïdiennes a souvent été signalée. Ainsi, il est important d'étudier les taux hormonaux d'hormones stéroïdiennes qui contrôlent la reproduction des poissons.

Différentes enzymes sont responsables de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes à partir du cholestérol. Parmi les hormones stéroïdiennes, les androgènes, les estrogènes et les progestagènes sont les plus importants. De nombreux organes sont capables de produire des stéroïdes et notamment le cerveau, les gonades, les tissus adipeux (Sanderson, 2006).

Chez les poissons mâles, ce sont les androgènes 11-oxygénés qui sont les stéroïdes synthétisés en plus grande quantité par les testicules, la 11-kétotestostérone (11-KT) étant l'androgène circulant majoritaire chez la plupart des espèces gonochoriques (Borg, 1994). Chez la plupart des téléostéens, une augmentation des niveaux plasmatiques de 11-KT et dans une moindre mesure de testostérone (T) permet la croissance des gonades mâles et leur développement. Des tests *in vitro* et *in vivo* ont montré que la 11-KT stimule directement la spermatogénèse alors que la T stimule plutôt l'axe hypothalamo-hypophysaire. La 11-KT est aussi

2. SEASONAL VARIATIONS OF PLASMA STEROID HORMONES IN ROACH

2.1. Introduction

Endocrine disruptors (PE) are likely to interfere with many internal regulatory mechanisms. Their influence on steroidal hormones has often been reported. Thus, it is of importance to study the levels of sex steroid hormones which are controlling fish reproduction

Several enzymes are responsible for the biosynthesis of steroid hormones from cholesterol. Among steroid hormones, androgens, estrogens and progestogens are most important. Many organs are able to produce steroids, including the brain, gonads and adipose tissue (Sanderson, 2006)

In male fish, the androgens 11-oxygenated steroids are synthesized in larger quantities by the testes. The 11-ketotestosterone (11-KT) is a major circulating androgen in most gonochoristic species (Borg, 1994). In most teleosts, increasing 11-KT plasma levels and, to a lesser extent, testosterone (T) allows the growth and development of male gonads. *In vitro* and *in vivo* measurements showed that 11-KT directly stimulates spermatogenesis while T rather stimulates the hypothalamic-pituitary axis. 11-KT is also involved in establishing the reproductive behavior and secondary sexual characteristics (Borg, 1994).

Estrogens and especially 17 β -estradiol (E2) are hormones inducing the development of

impliquée dans l'établissement du comportement reproducteur et des caractères sexuels secondaires (Borg, 1994).

Les estrogènes et particulièrement la 17 β -estradiol (E2) sont des hormones induisant l'établissement de caractères sexuels femelles. La synthèse d'E2 a lieu au niveau des cellules de Leydig dans les gonades et est régulée via la P450 aromatasase par des gonadotrophines (LH et FSH) d'origine hypophysaires.

La progestérone (P) est un des stéroïdes les plus importants et peu étudié. Elle pourrait stimuler la sécrétion de gonadotrophines hypophysaires lors de la maturation sexuelle et un de ses dérivés, la dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) est responsable de la maturation des ovocytes chez le poisson (McGonnell et al., 2006).

Des dosages immuno-enzymatiques des taux d'hormones ont donc été réalisés sur les gardons prélevés mensuellement à Venables (voir chapitre précédent) pendant 18 mois.

2.2. 11-cétotestostérone

Des variations saisonnières des concentrations plasmatiques en 11-KT sur le site de Venables (site de référence) ont été observées pour les deux sexes (figure 1 et figure 2). Les concentrations chez les mâles étaient significativement supérieures aux valeurs mesurées chez les femelles et pouvaient atteindre 1200 pg.ml⁻¹ alors que les concentrations maximales observées chez les femelles étaient 25 fois plus faibles.

Chez les mâles, les concentrations plasmatiques en 11-KT étaient faibles en hiver 2005-2006 (entre novembre et février), puis un pic a été atteint en mars 2006 (figure 1). Les valeurs de

female sexual characteristics. E2 synthesis takes place in the Leydig cells in the gonads and is controlled through the P450 aromatasase by gonadotropins (LH and FSH) of pituitary origin.

Progesterone (P) is one of the most important steroids although less studied. It could stimulate the secretion of pituitary gonadotropins during sexual maturation and one of their derivatives, the dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) is responsible for the maturation of oocytes in fish (McGonnell et al., 2006).

Enzyme-linked immunoassays measurements of hormone have been undertaken on plasma from roach that were sampled monthly for 18 months (see previous chapter).

2.2. 11-ketotestosterone

Seasonal variations in plasma concentrations of 11-KT on the site Venables (reference site) were observed for both sexes (Figure 1 and Figure 2). The concentrations in males were significantly higher than the values measured in females and reached 1.200 pg.ml⁻¹ while the observed maximum in females was 25 times lower.

In males, plasma concentrations in 11-KT were low in winter 2005-2006 (between November and February), then a peak was reached in March 2006 (Figure 1). The values then significantly decreased until July 2006. Significant fluctuations in concentrations of 11-KT were recorded between July 2006 and February 2007. A peak was measured in April 2007 followed by low values in May and June 2007.

In females, no significant variations in 11-

11-KT ont ensuite significativement diminué jusqu'en juillet 2006. Des fluctuations importantes des concentrations en 11-KT ont été enregistrées entre juillet 2006 et février 2007. Un pic atteignant la valeur maximale a été mesurée en avril 2007. Une diminution des concentrations en 11-KT a suivi avec des valeurs faibles en mai et juin 2007.

Chez les femelles, aucune variation des valeurs de 11-KT n'apparaît au cours du premier cycle de reproduction du gardon (figure 2). La deuxième année, une augmentation des niveaux de 11-KT chez les femelles a été observée avec une valeur maximale de 50 pg.ml⁻¹ atteinte en mars 2007. Les concentrations en 11-KT ont ensuite diminué et sont restées faibles d'avril à juin 2007.

KT concentration were measured during the first reproductive cycle of roach (Figure 2). The second year, an increase in 11-KT levels was observed with a maximum value of 50 pg.ml⁻¹ reached in March 2007. Concentrations then fell and remained low from April to June 2007

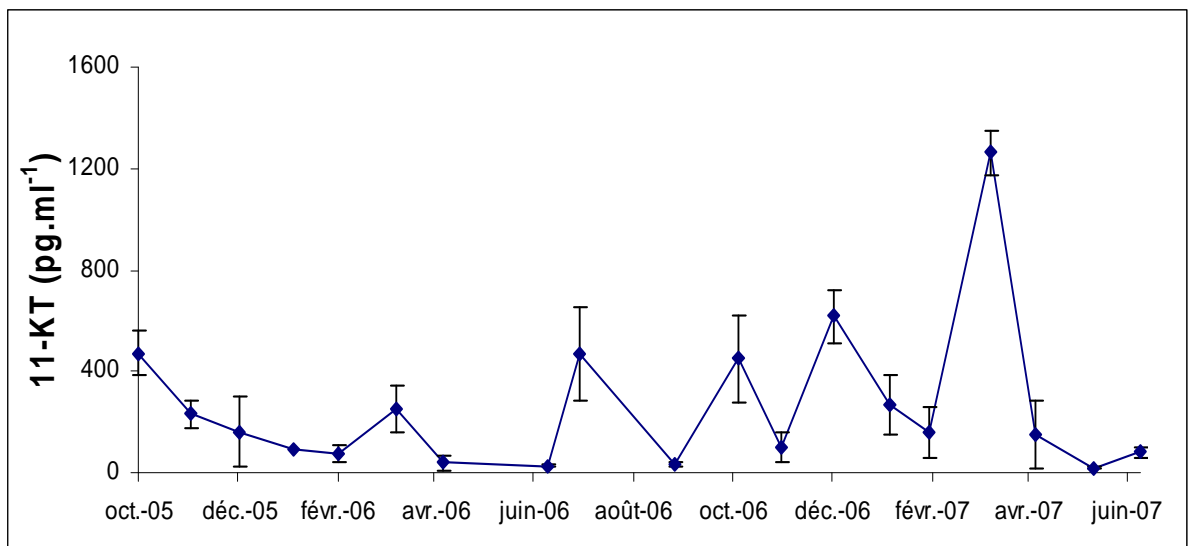


Figure 1: Concentrations plasmatiques en 11-KT au cours du cycle de reproduction des gardons mâles. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95%. N= 219 individus.
 11-KT plasma concentrations during the reproductive cycle of male roach. Error bars correspond to the 95% confidence intervals. N = 219 individuals.

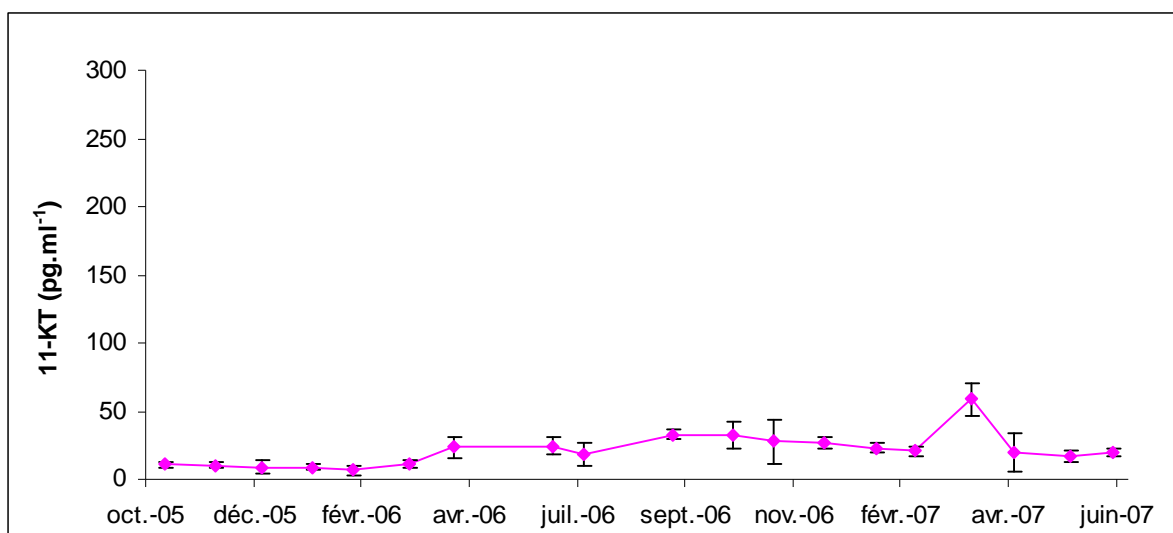


Figure 2: Concentrations plasmatiques en 11-KT au cours du cycle de reproduction des gardons femelles. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95%. N=254 individus.
 11-KT plasma concentrations during the reproductive cycle of female roach. Error bars correspond to the 95% confidence intervals. N = 219 individuals

Des variations de concentrations plasmatiques en 11-KT en fonction des différents stades de la gamétogenèse ont été mesurées chez les deux sexes (figure 3). Chez les mâles, les quatre premiers stades de la gamétogenèse ont présentés des taux faibles. Par contre, les poissons matures (stade V) possédaient des taux significativement plus élevés.

Chez les femelles, une augmentation progressive de la concentration en 11-KT en fonction du stade de la gamétogenèse a été observée. Les taux de 11-KT étaient les plus forts au stade III (stade ovocyte atrésique) et les plus faibles pour les ovocytes primaires.

Variations in plasma in 11-KT levels were measured in both sexes according to the different stages of gametogenesis (Figure 3). In males, the first four stages of gametogenesis presented low values. On the contrary, mature males (stage V) had significantly higher concentrations.

In females, a gradual increase in 11-KT concentration was observed and was related to the stage of gametogenesis. Levels of 11-KT were the highest in stage III (oocyte atresia) and lowest for primary oocytes.

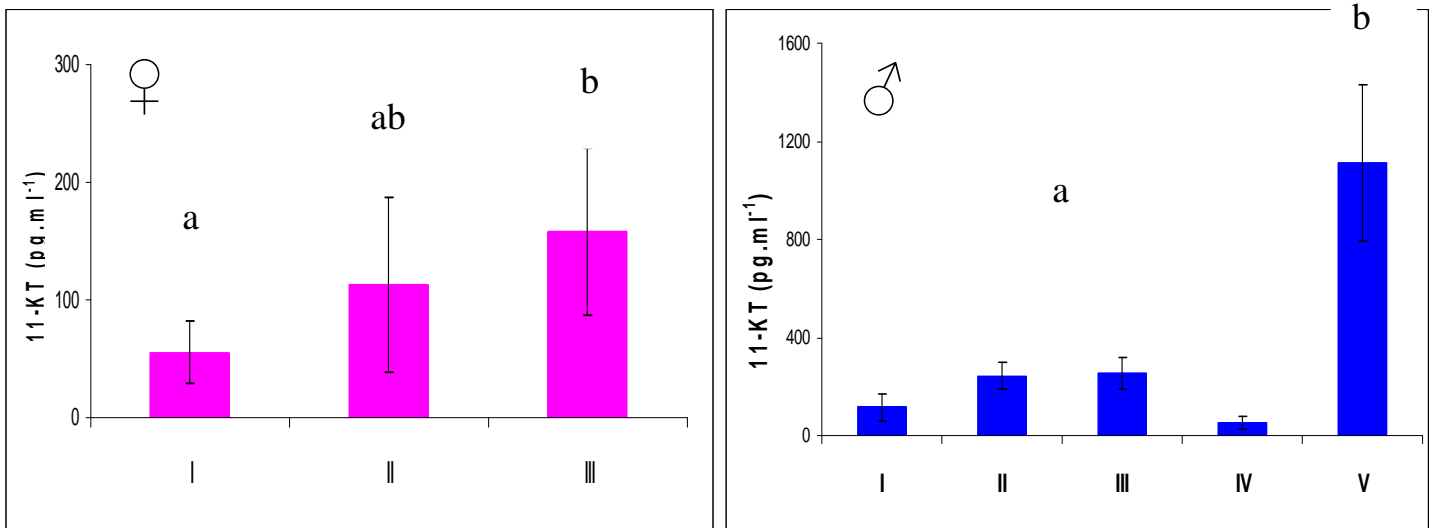


Figure 3: Variations des concentrations en 11-KT en fonction du stade de maturation. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95%. Les différences significatives sont représentées à l'aide de lettres. N=473 individus.

Variations of 11-KT concentrations according to maturation stage. Error bars correspond to the 95% confidence intervals. Significant differences are represented with letters. N = 473 individuals
 For females: I: Primary oocytes; II: Mature secondary oocytes; III: atretic oocytes
 For males: I and II: spermatogonias I and II; III: spermatocytes; IV: spermatids; V: Spermatozooids.

2.3. 17- β -œstradiol

Chez les femelles du site de référence, les concentrations plasmatiques en E2 étaient significativement supérieures aux valeurs mesurées chez les mâles. Des variations au cours du cycle de reproduction ont pu être observées chez les deux sexes (figure 4 et 5).

Chez les mâles, après une diminution des taux d'E2 entre septembre 2005 et décembre 2006, les valeurs ont augmenté pour atteindre un pic en février 2006 (figure 4). Une diminution a été observée juste après la ponte aboutissant à des concentrations faibles maintenues de mars à décembre 2006. Lors du deuxième cycle de reproduction, des valeurs maximales ont été atteintes en février, mars et avril 2007 puis ont chuté à des valeurs faibles en mai et juin 2007.

2.3. 17- β -œstradiol

In females from the reference site, E2 plasma concentrations were significantly higher than in males. Variations during the reproductive cycle were observed in both sexes (Figure 4 and 5).

In males, after a reduction in E2 level between September 2005 and December 2006, values rose to a peak in February 2006 (Figure 4). A decrease was subsequently observed and concentrations were low from March to December 2006. During the second cycle of reproduction, maximum values were reached in February, March and April 2007 and then declined to lowest values in May and June 2007.

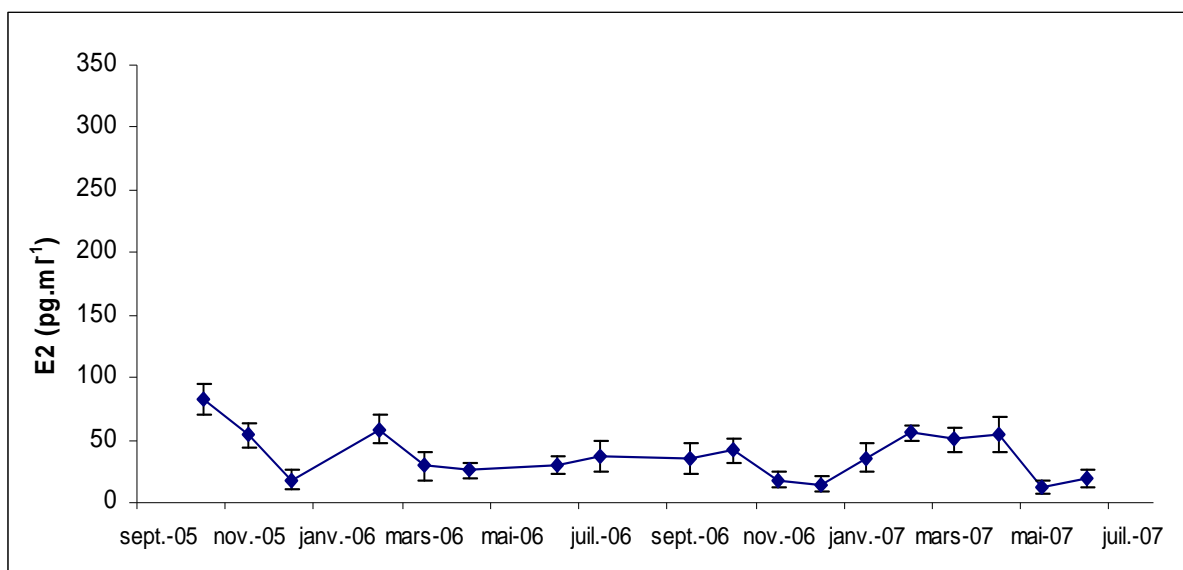


Figure 4: Concentrations plasmatiques en E2 au cours du cycle de reproduction des gardons mâles. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95%. N=219 individus.
 E2 concentrations in plasma during the reproductive cycle of male roach. Error bars correspond to the 95% confidence intervals. N = 219 individuals.

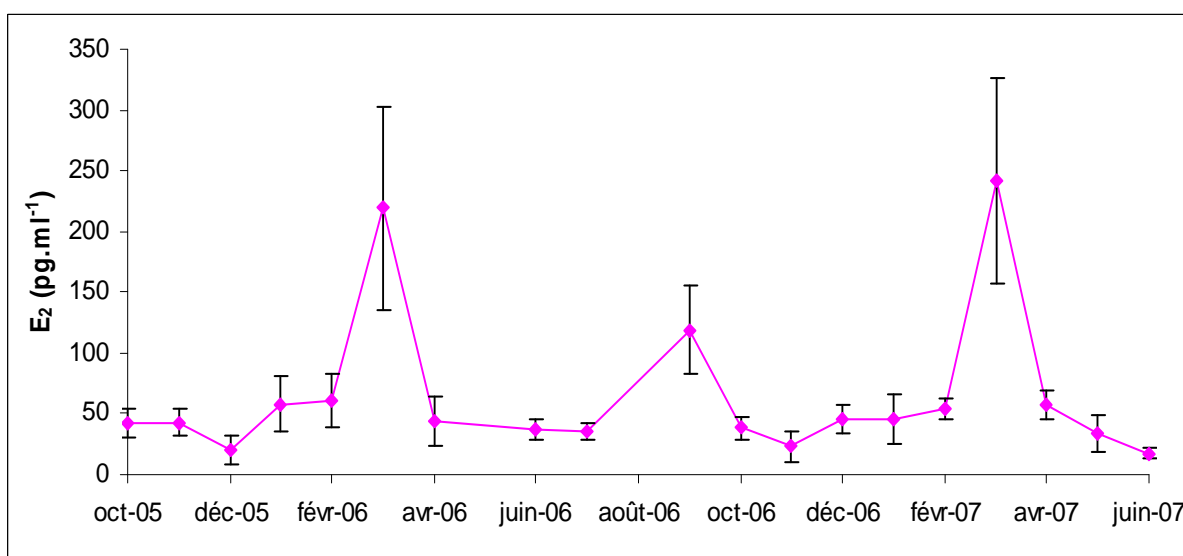


Figure 5: Concentrations plasmatiques en E2 au cours du cycle de reproduction des gardons femelles. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95%. N=219 individus.
 E2 concentrations in plasma during the reproductive cycle of female roach. Error bars correspond to the 95% confidence intervals. N = 219 individuals.

Chez les femelles, des variations importantes d'E2 au cours des deux années ont été observées (figure 5). Les concentrations en E2 étaient faibles d'octobre 2005 à février 2006 et ont augmenté jusqu'aux valeurs maximales en mars 2006. Des valeurs faibles ont été mesurées d'avril à juillet puis un autre pic a été observé en septembre 2007. De faibles taux en hiver (octobre 2006 à février 2007) ont été relevés avant le pic de mars 2007 comme pour l'année précédente. D'avril à juin 2007 les taux en E2 restaient faibles.

Chez les mâles et les femelles, une corrélation entre les taux plasmatiques en E2 et les stades de la gamétogenèse a pu être établie (figure 6). Les taux les plus élevés d'E2 ont été mesurés chez les poissons matures, c'est-à-dire chez ceux présentant des stades avancés de la gamétogenèse. .

In females, large variations of E2 were observed during the two years (Figure 5). E2 concentrations were low from October 2005 to February 2006 and increased to maximum values in March 2006. Low values were measured from April to July and then another peak was observed in September 2007. Low levels in winter (October 2006 to February 2007) were recorded before the peak of March 2007 similarly to the previous year. From April to June 2007 levels remained low.

In males and females, a correlation between plasma levels in E2 and stages of gametogenesis has been established (Fig. 6). The highest concentrations in E2 were measured in mature fish, *i.e.* in fish with advanced stages of gametogenesis.

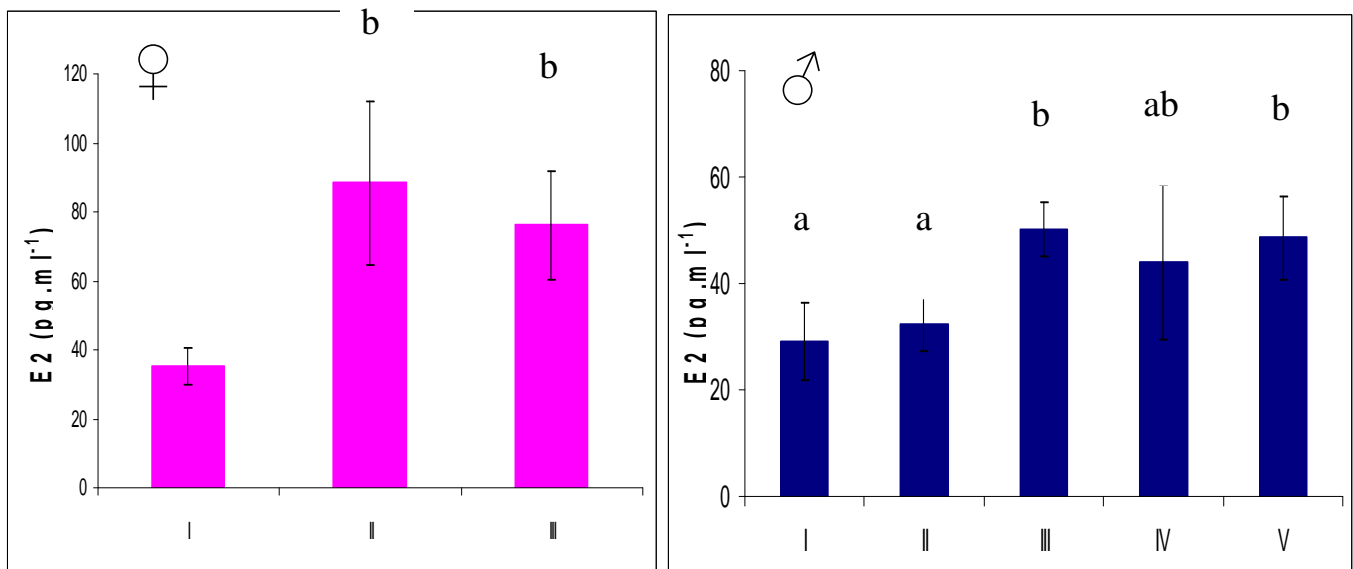


Figure 6 : Variations des concentrations en E2 en fonction du stade de maturation. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95%. Les différences significatives sont représentées à l'aide de lettres. N=473 individus.

Variations of E2 concentrations according to maturation stage. Error bars correspond to the 95% confidence intervals. Significant differences are represented with letters. N = 473 individuals. Different letters indicate significant differences between sample groups.

2.4. Progestérone

Les concentrations plasmatiques en P ne diffèrent pas entre les mâles et les femelles (figure 7 et 8) et suivent les mêmes variations au cours du cycle, avec un pic au mois de juin pour les deux années. Le reste du temps, les valeurs mesurées étaient faibles mais des taux significativement supérieurs ont été mis en évidence la deuxième année (de septembre 2006 à avril 2007) par rapport à la même période de l'année précédente.

Chez les mâles, les forts taux de P ont été observés pour les poissons aux stades précoces de la gamétogenèse (stade I) alors que les autres stades présentaient tous des valeurs plus faibles (stade II, III, IV et V) (figure 9). Chez les femelles, les valeurs mesurées les plus importantes étaient aussi chez les poissons au stade I. Des valeurs plus faibles ont été mesurées chez les femelles aux stades II et III.

2.4. Progesterone

Plasma concentrations of P do not differ between males and females (Fig. 7 and 8) and followed the same changes over the cycle, with a pick in June for both years. Otherwise, the measured values were low although significantly higher level have been measured the second year (September 2006 to April 2007).

In males, high levels of P were observed for fish in the early stages of gametogenesis (stage I) while all other stages showed low values (stage II, III, IV and V) (Fig. 9). In females, the measured values were higher in fish in stage I. Low values were measured in females at stages II and III.

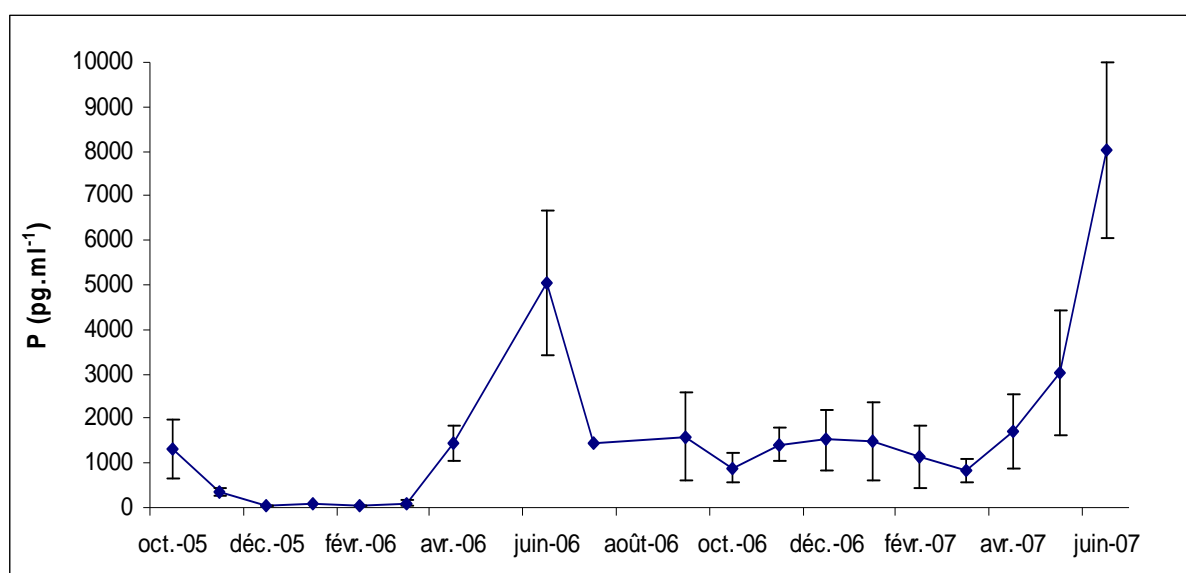


Figure 7: Concentrations plasmatiques en progestérone au cours du cycle de reproduction des gardons males. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95%. N=219 individus. Progesterone concentrations in plasma during the reproductive cycle of male roach. Error bars correspond to the 95% confidence intervals. N = 219 individuals.

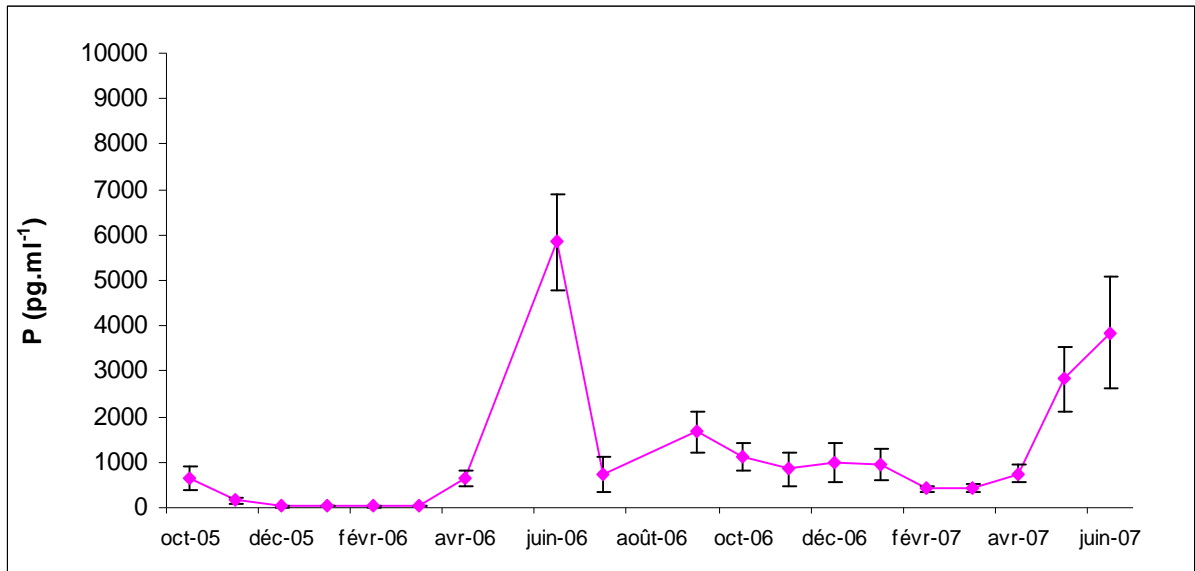


Figure 8: Concentrations plasmatiques en progestérone au cours du cycle de reproduction des gardons femelles. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95%. N=219 individus.
 Progesterone concentrations in plasma during the reproductive cycle of female roach. Error bars correspond to the 95% confidence intervals. N = 219 individuals.

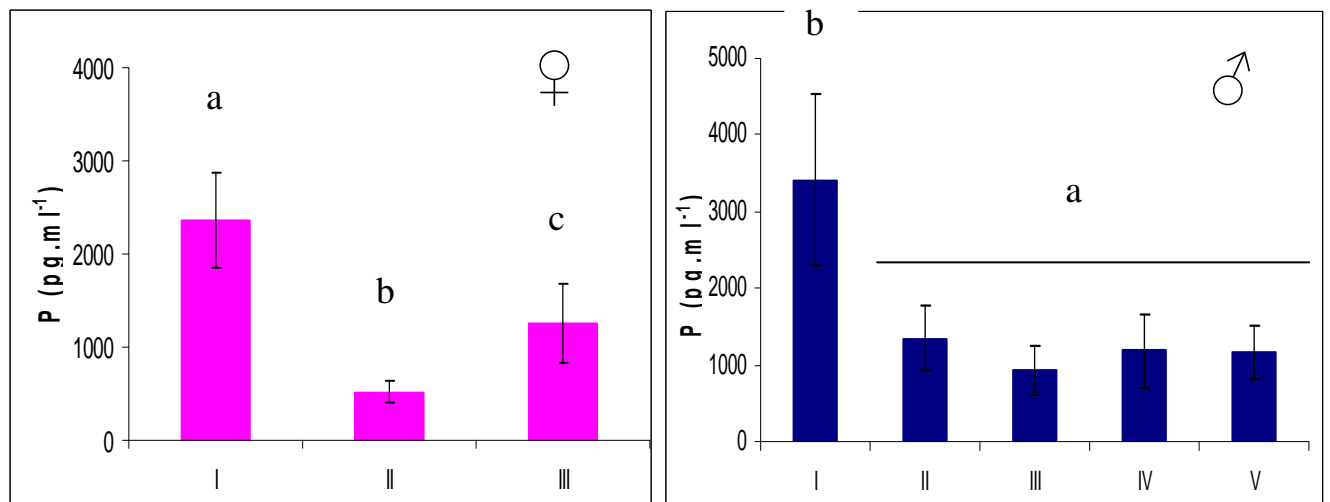


Figure 9 : Variations des concentrations en progestérone en fonction du stade de maturation. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95%. Les différences significatives sont représentées à l'aide de lettres. N=473 individus.
 Variations of progesterone concentrations according to maturation stage. Error bars correspond to the 95% confidence intervals. Significant differences are represented with letters. N = 473 individuals

2.5. Vitellogéine plasmatique

Les concentrations plasmatiques de vtg chez les mâles étaient très faibles (figure 10) avec une moyenne annuelle de 24,6 ng.ml⁻¹. Chez les femelles, les taux plasmatiques de VTG étaient les plus faibles en hiver (octobre à février) puis une augmentation significative jusqu'aux valeurs les plus fortes a été observée en mars les deux années (figure 11). De plus, les valeurs mesurées la deuxième année étaient significativement supérieures à celles de l'année précédente.

Des variations significatives des taux de vtg ont été mesurées entre les différents stades de l'ovogenèse avec les niveaux les plus hauts chez les femelles matures (stade II) et des niveaux plus faibles aux stades immatures (I et III) (figure 12).

2.5. Plasma vitellogenin

Male plasma vtg in was very low (Fig. 10) with an annual average of 24.6 ng.ml⁻¹. In females, plasma levels were lowest in winter (October to February) and a significant increase was observed in March both years (Figure 11). Moreover, values measured the second year were significantly higher than the previous year.

Significant changes in vtg levels were measured between the different stages of oogenesis with highest levels found in mature females (stage II) and lower levels in immature fish (I and III) (Fig. 12).

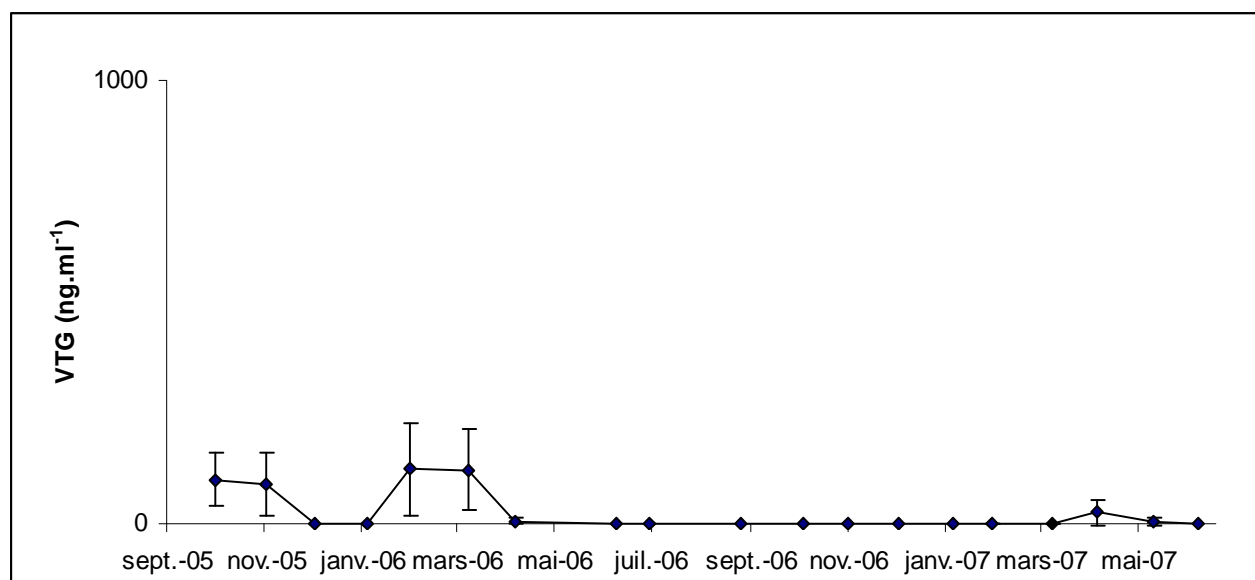


Figure 10: Concentrations plasmatiques en vitellogéine au cours du cycle de reproduction des gardons mâles. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95%. N=219 individus.
Plasma vitellogenin concentrations during the reproductive cycle of male roach. Error bars correspond to the 95% confidence intervals. N = 219 individuals.

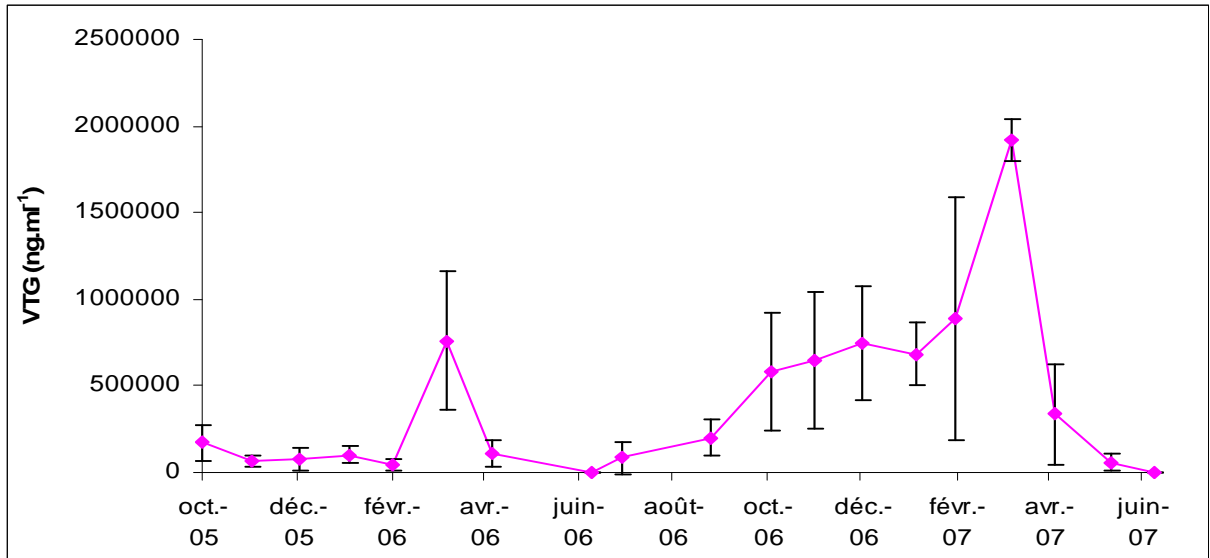


Figure 11: Concentrations plasmatiques en vitellogénine au cours du cycle de reproduction des gardons femelles. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95%. N=219 individus.
 Plasma vitellogenin concentrations during the reproductive cycle of female roach. Error bars correspond to the 95% confidence intervals. N = 219 individuals.

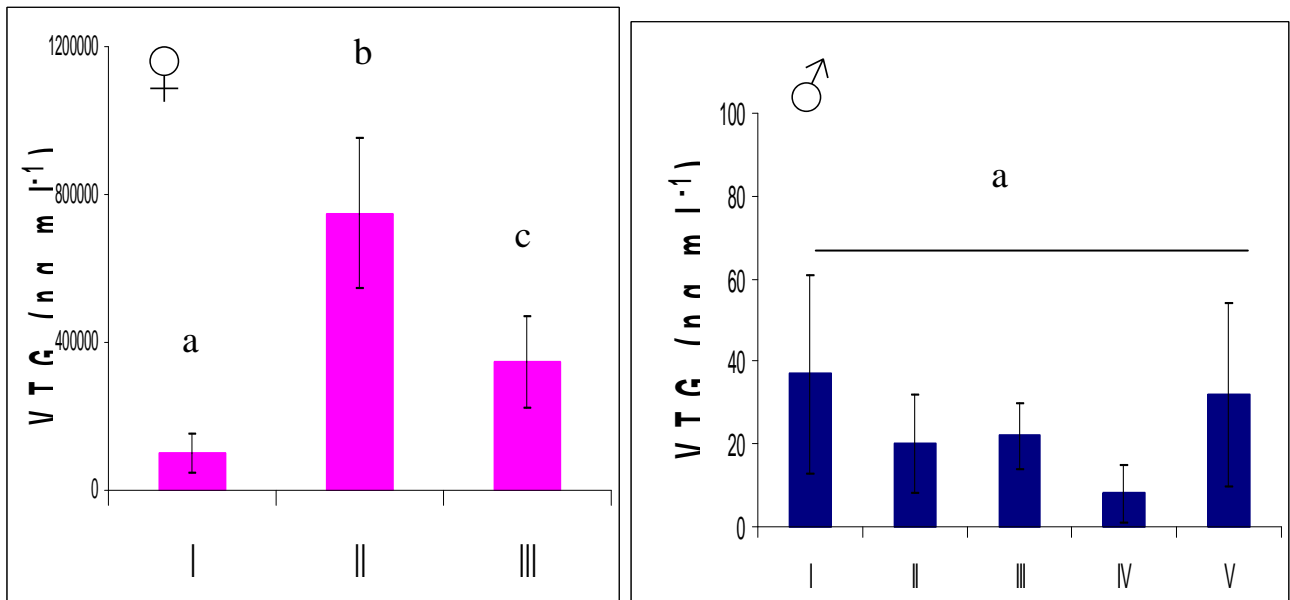


Figure 12: Variations des concentrations en vitellogénine en fonction du stade de maturation. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95%. N=473 individus.
 Change in vitellogenin concentration according to oocyte maturation stages. Error bars correspond to the 95% confidence intervals. N = 219 individuals.

2.6. Taux de stéroïdes chez des gardons de sites contaminés

Les niveaux de stéroïdes sexuels ont été mesurés sur des poissons prélevés de sites de la Seine, de l'Epte et du Don, dont les niveaux de vitellogénine et d'intersexués ont montrés qu'ils étaient perturbés par des composés hormono-actifs.

Des niveaux altérés de 11-KT ont été observés sur l'ensemble des sites étudiés chez les mâles avec un profil variable selon la période de pêche (figure 13). Les poissons prélevés à l'automne ont présentés des taux de 11-KT environ 10 fois plus élevés que ceux mesurés chez les mâles du site de référence. A l'inverse, les niveaux de 11-KT rencontrés chez les poissons prélevés en été, étaient significativement inférieurs à ceux des mâles du site de référence.

A l'inverse, aucune modification des taux d'œstradiol n'a été mesurée.

2.6. Steroid levels in roach from contaminated sites

Sex steroids were measured in blood samples from fish caught in the Seine, Epte and Don rivers. These sites receive urban effluents and showed high levels of vtg and intersex fish (see previous reports).

Altered male 11-KT levels were observed in all studied sites with a profile depending on the fishing period (Fig. 13). Fish collected in the fall presented 11-KT levels about 10 times higher than those measured in males from the reference site. In contrast, levels of 11-KT found in fish collected in summer were significantly lower than those of males of the reference site.

In contrast, no change in E2 level was measured.

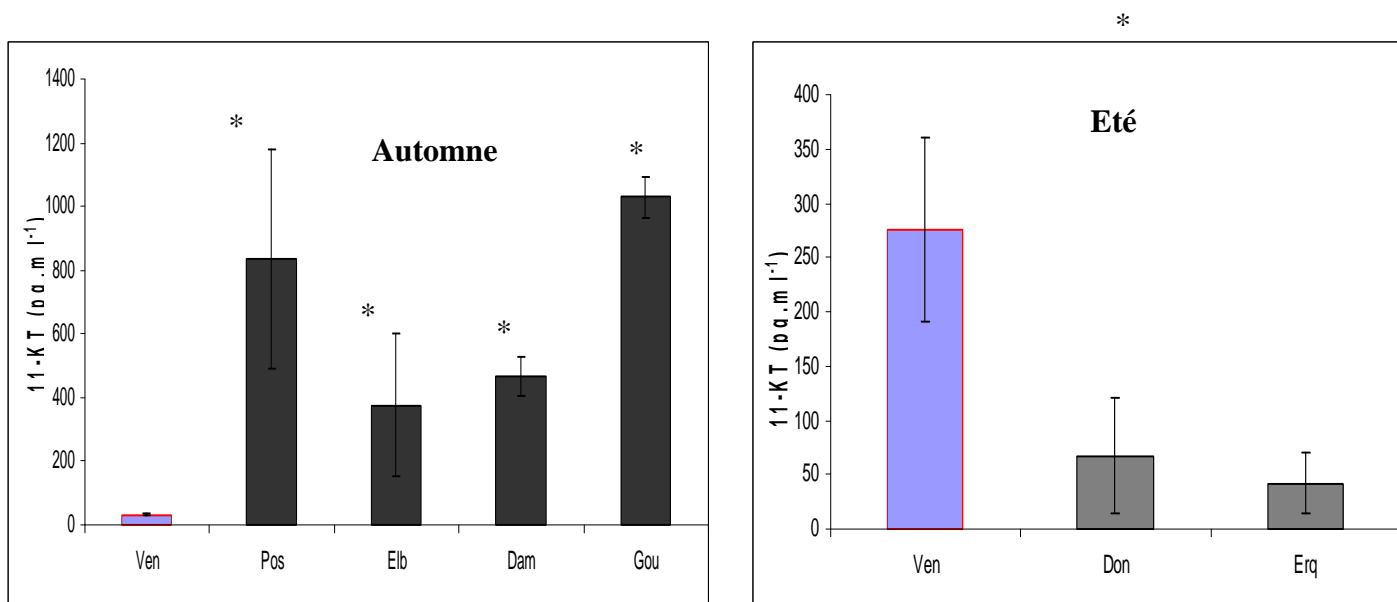


Figure 13 : Concentrations en 11-KT de gardons mâles issus de la Seine (Pos, Elb) de l'Epte (Dam, Gou), de la Deule (Don) ou de la Lys (Erq) par rapport au site de référence (Ven = venables). Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95%. Les différences significatives sont représentées par des étoiles. n= 82 individus.

11-KT concentrations in various sampling sites from the Seine (Pos, Elb) the Epte (Dam, Gou) and the Deule (Don) or the Lys (Erq) as compared to the reference site (Ven = venables). Error bars correspond to the 95% confidence intervals. n = 82.

2.7. Vitellogénine plasmatique chez les gardons des sites contaminés

Les poissons mâles échantillonnés sur les sites de Erquinghem (Erq), Gournay (Gou), Eu, Poses (Pos), Martot (Mar) et Rouen (Rou) avaient des taux de VTG supérieures à ceux du site de référence (Ven) (figure 15). Les moyennes dépassaient 100 ng.ml⁻¹ et pour deux sites de la seine, Poses et Martot les taux moyens de VTG dépassent 1 mg.ml⁻¹.

2.7. Plasma vitellogenin in roach from contaminated sites

Male fish sampled in sites such as Erquinghem (Erq), Gournay (Gou), Eu, Poses (Pos), Martot (Mar) and Rouen (Rou) had higher vtg levels than those of the reference site (Ven) (Figure 15). The average exceeded 100 ng.ml⁻¹ and two sites in the Seine, Poses and Martot were above 1 mg.ml⁻¹.

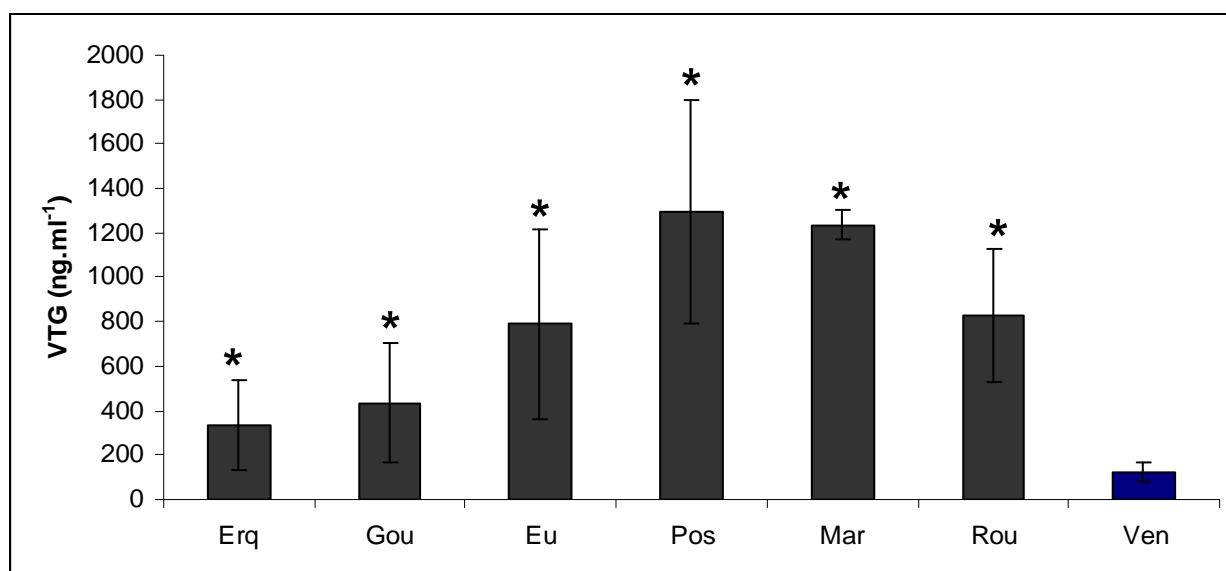


Figure 15: Concentrations plasmatiques en VTG au cours du cycle de reproduction des gardons mâles de différents sites par rapport au site de référence. Les barres d'erreurs correspondent aux intervalles de confiance à 95%. Les différences significatives sont représentées par des étoiles. n=762.
Plasma vitellogenin concentration in various sampling sites (Ven = venables). Error bars correspond to the 95% confidence intervals. n = 762.

2.8. Discussion

Chez les mâles, un pic de 11-KT a été mis en évidence en mars pour les deux années étudiées, coïncidant avec la période de ponte déterminée par observations histologiques (spermatozoïdes, stade V). Ces résultats confirment que la 11-KT est impliquée dans l'initiation et le maintien du développement testiculaire (Chavez-Pozo et al., 2008) et est fortement impliqué dans le processus de la gamétogenèse (Billard et al., 1982). Des constatations similaires ont été observées chez différentes espèces de téléostéens avec des concentrations en 11-KT maximum au stade le plus mature de la spermatogenèse, notamment chez le flétan atlantique (*Hippoglossus hippoglossus L.*) (Weltzien et al. 2002) et le Dentex commun (*Dentex dentex*) (Pavlidis et al, 2000). Chez les femelles, seul un pic de 11-KT a pu être identifié en mars 2007, lors de la ponte. Ceci pourrait indiquer que les androgènes sont aussi impliqués dans la maturation des gonades femelles gardon comme cela a été démontré pour d'autres espèces de téléostéens (Fostier et al., 1983).

L'E2 semble jouer un rôle essentiel dans la reproduction des mâles puisque les valeurs d'E2 ont pu être corrélées avec les différents stades spermatogéniques. Ceci pourrait indiquer une régulation par les estrogènes de la spermatogenèse et de la physiologie des cellules de Sertoli comme il a été démontré chez d'autres espèces (Amer et al., 2001; Miura et al., 1999). Les concentrations d'E2 chez les femelles varient au cours du cycle de reproduction avec deux pics majoritaires observés en septembre et au moment de la ponte. Il paraît donc évident que les estrogènes assurent un rôle

2.8. Discussion

In males, a peak of 11-KT was measured in March both studied years thus coinciding with the mature stage as determined by histologic observations (spermatozoïdes, stade V). These results confirm that 11-KT is involved in the initiation and maintenance of testicular development (Chavez-Pozo et al., 2008) and is deeply involved in the process of gametogenesis (Billiards et al., 1982). Similar findings were observed in various téléost species with maximum 11-KT concentrations occurring in the most mature stages of spermatogenesis, especially among halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*) (Weltzien et al. 2002) and the common Dentex (*Dentex dentex*) (Pavlidis et al, 2000). In females, only a peak of 11-KT was identified in March 2007, when fish were laying eggs. This could indicate that androgens are also involved in the maturation of female roach gonads as has been demonstrated for other téléost species (Fostier et al., 1983).

E2 seems to play a key role in male reproduction since E2 concentrations were correlated with the spermatogenic stages. This could indicate that E2 regulates the spermatogenesis and physiology of Sertoli cells as it has been demonstrated in other species (Amer et al. 2001; Miura et al., 1999). E2 concentrations in females varied during the reproductive cycle with two major picks observed in September and during spawning. It seems clear that estrogen plays a key role in females by regulating oogenesis.

P concentrations presented values and

primordial chez les femelles en régulant l'ovogenèse.

Les concentrations en P ont présenté des valeurs et des fluctuations identiques chez les deux sexes avec des taux plus élevés chez les poissons immatures au mois de juin. La P ne présenterait donc aucune spécificité sexuelle chez le gardon et pourrait avoir un rôle dans l'initiation de la gamétogenèse par stimulation de la synthèse des gonadotropines (Mc Gonnell et al., 2006).

Les faibles concentrations en vtg mesurées chez les mâles confirment l'absence de contamination par des xénoestrogènes au niveau du site de référence. Chez les femelles, les variations des taux de vtg ont suivi des profils similaires aux fluctuations observées pour l'E2 ce qui confirmerait le rôle de l'E2 dans la synthèse de la vtg.

La mesure des concentrations en stéroïdes plasmatiques a été utilisée comme biomarqueur d'exposition aux PE chez les poissons (Lavado et al, 2004; Noaksson et al, 2003). Des altérations des niveaux de stéroïdes et de vtg ont été observées sur l'ensemble des sites étudiés. Les taux maximaux de vtg ont été mesurés sur la Seine. Le fait que des niveaux différents de stéroïdes aient été mesurés selon la période de prélèvement indique que la période de prélèvement est un paramètre important dans l'interprétation des résultats. Aucun lien n'a cependant pu être établi entre les différents biomarqueurs utilisés. Les stéroïdes jouant un rôle essentiel dans la reproduction, les anomalies des taux d'hormones sexuelles peuvent engendrer des conséquences au niveau de la fertilité, du succès reproductif ou encore du sex-ratio et des effectifs des populations de gardon exposée à des perturbateurs endocriniens.

fluctuations identiques in both sexes with higher plasma concentration in immature fish in June. P is thus not sex-specific in roach and may have a role in the initiation of gametogenesis by stimulating the synthesis of gonadotropins (Mark Gonnella et al., 2006).

Low vtg concentrations were measured in males confirming the absence of xenoestrogen contamination at the reference site. In females, variations in vtg concentrations followed similar trends than E2 confirming the role of the latter in the induction of vtg synthesis.

Measurement of steroid plasma concentrations has been used as biomarkers of exposure to PE in fish living in contaminated rivers (Lavado et al, 2004; Noaksson et al, 2003). Impaired levels of steroids and vtg were observed on all the studied sites. The maximum concentrations of vtg were measured in the river Seine and are higher than the rate observed on the tributaries of the Seine which shows a higher exposure to xenoestrogens in the river. The fact that different levels of steroids were measured according to sampling period indicates that sampling period is an important parameter in order to interpret the results. However, no link has been established between the different biomarkers used. Steroids play an important role in reproduction. Abnormal levels of sex hormones can lead to consequences for fertility, reproductive success or the sex ratio and the population of roach exposed to endocrine disrupters.

2.9. Références

- Amer M.A., Miura T., Miura C., Yamauchi K., 2001. Involvement of Sex Steroid Hormones in the Early Stages of Spermatogenesis in Japanese Huchen (*Hucho perryi*). *Biol. Reprod.* 65(4): 1057-1066.
- Baroiller J.F. 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cell Mol. Life Sci.* 55 : 910-931.
- Billard R., Fostier A., Weil C., Breton B. 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 65-79.
- Borg, B., 1994. Androgens in teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 109C. pp. 219-245.
- Bruslé, J., Quignard, J.P., 2001. Biologie des poissons d'eau douce européens. Editions TEC et DOC, Collection Aquaculture – Pisciculture, p199-211.
- Chaves-Pozo, E.; Arjona, F. J.; Garcia-Lopez, A.; Garcia-Alcazar, A.; Meseguer, J.; Garcia-Ayala, A., 2008. Sex steroids and metabolic parameter levels in a seasonal breeding fish (*Sparus aurata* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.* 156(3): 531-536.
- Dodds E.C., Lawson W. 1938. Molecular structure in relation to oestrogenic activity: compounds without a phenanthrene nucleus. *Proceedings of the Royal Society. London B.* 122, 222-232
- Fostier A., Jalabert B., Billard R., Breton, B., Zohar Y. 1983. The Gonadal Steroids Fish Physiology. *Reproduction - Endocrine Tissues and Hormones.* D.J.R. a. E.M.D. W.S. Hoar, Academic Press: 277-372.
- Jobling S., Beresford N., Nolan M., Rogers-Gray T., Tyler C.R., Sumpter J.P. 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.
- Kavlock R.J., Daston G.P., DeRosa C., Fenner-Crisp P., Gray L.E., Kaattari S., Lucier G., Sheehan D.M., Sinks T., Tilson H.A. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA – sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* 104 (4): 715-740.
- Lavado R., Thibaut R., Raldúa D., Martín R., Porte C. 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicol. Applied Pharmacol.* 196: 247-257.
- Lye C.M., Frid C.L.J., Gill M.E., McCormick D. 1997. Abnormalities in the reproductive health of flounder *Platichthys flesus* exposed to effluent from a sewage treatment works. *Mar. Pollut. Bull.* 34: 34-41.
- Minier C., Caltot G., Leboulenger F., Hill E.M. 2000. An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex regions. *Analisis.* 28 : 801-806.
- Miura T., Miura C., Ohta T., Nader M.R., Todo T., Yamauchi K. 1999. Estradiol-17 β stimulates the renewal of spermatogonial stem cells in males. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264: 230-234.
- McGonnell I.M., Fowkes R.C. 2006. Fishing for gene function—endocrine modelling in the zebrafish. *J. Endocrinol.* 189: 425-439.
- Noaksson E., Linderöth M., Bosveld A.T.C., Balk L. 2003. Altered steroid metabolism in several teleost species exposed to endocrine disrupting substances in refuse dump leachate. *Gen. Comp. Endocrinol.* 134 : 273-284.
- Pavlidis M., Greenwood L., Mourot B., Kokkari C., Le Menn F., Divanach P., Scott A.P. 2000. Seasonal Variations and Maturity Stages in Relation to Differences in Serum Levels of Gonadal Steroids, Vitellogenin, and Thyroid Hormones in the Common Dentex (*Dentex dentex*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 118(1): 14-25.
- Roubal W.T., Lomax D.P., Maryjean L., Lyndal L.J. 1997. Purification and partial characterization of English sole (*Pleuronectes vetulus*) vitellogenin. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B: 613-622.
- Sanderson JT. 2006. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. *Toxicol Sci.* 94: 3-21.
- Sonnenschein C., Soto A.M. 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 65: 143-150.
- Sumpter J.P. 1998. Xenoendocrine disrupters—environmental impacts. *Toxicol. Letters.* 95: 17.
- Taylor M.R., Harrison P.T.C. 1999. Ecological effects of endocrine disruption: current evidence and research priorities. *Chemosphere.* 39: 1237-1248.
- Weltzien F.-A., Taranger G.L., Karlsen Ø., Norberg B. 2002. Spermatogenesis and related plasma androgen levels in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comp. Biochem. Physiol. A.* 132: 567-575.
- Yaron Z. 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture.* 129 (1-4): 49-73.

3. ETUDE DES CONSEQUENCES PHYSIOLOGIQUES DE L'INFECTION DU GARDON PAR LE PARASITE *LIGULA* *INTESTINALIS*

3.1. Introduction

Le ténia *Ligula intestinalis* est un cestode qui infeste successivement 3 différents hôtes au cours de son cycle de développement. Les poissons et en particulier les cyprinidés, correspondent au 2^e hôte et sont généralement infestés par les larves de après avoir mangé du zooplancton parasité. Au cours de l'infection, le ténia envahit la cavité abdominale où il demeure pour la vie de l'hôte. Le poisson peut être mangé par des oiseaux piscivores et ainsi compléter le cycle du parasite. Les effets de ce parasite sur les poissons ont été étudiés dans plusieurs espèces, y compris la brème, *Abramis brama* (Barus et Prokes, 2002), la brème blanche, *Blicca bjoerkna* (Barus et Prokes, 2002), le goujon, *Gobio gobio* (Arme et Owen, 1968), la tanche, *Tinca tinca* (Yavuzcan et al, 2003), le rotengle, *Scardinius erythrophthalmus*, le vairon à tête de boule, *Pimephales promelas*, la vendoise, *Leuciscus leuciscus* (Arme et Owen, 1968) et le gardon *Rutilus rutilus* (Arme et Owen, 1968; Kennedy et al, 2001). Le gardon semble être l'hôte principal de *L. intestinalis* d'après la prépondérance des infections enregistrées (Arme et Owen, 1968, Butin et al, 2002). Environ 7% des poissons pêchés sont infectés, bien qu'ils soient 30% dans l'estomac de l'hôte final, le cormoran (Van Dobben, 1952). Cela indique un prédation sélective des poissons ligulosés (Esch et Fernandez, 1991)

3. A STUDY ON CONSEQUENCES OF THE TAPEWORM *LIGULA INTESTINALIS* ON ITS TELEOST HOST, THE ROACH (*RUTILUS RUTILUS*)

3.1. Introduction

The tapeworm *Ligula intestinalis* is a common pseudophyllidean cestode which successively infests 3 different hosts during its parasite cycle. Teleost fish and particularly members of the Cyprinidae, correspond to the second intermediate host and are generally infested by the plerocercoid larvae of this pseudophyllidean cestode after eating parasitized zooplankton. During the infection of the fish, the tapeworm invades the abdominal cavity where it remains for the life of the host. The parasitized roach can be eaten by a piscivorous birds and complete the parasite cycle. Effects of this parasite on the fish were studied in several species including bream, *Abramis brama* (Barus and Prokes, 2002), white bream, *Blicca bjoerkna* (Barus and Prokes, 2002), gudgeon, *Gobio gobio* (Arme and Owen, 1968), tench, *Tinca tinca* (Yavuzcan et al, 2003), rudd, *Scardinius erythrophthalmus*, fathead minnow, *Pimephales promelas*, dace, *Leuciscus leuciscus* (Arme and Owen, 1968) and roach *Rutilus rutilus* (Arme and Owen, 1968; Kennedy et al, 2001). The roach appears to be the specific host of *L. intestinalis* according to the preponderance of infections recorded (Arme and Owen, 1968, Loot et al, 2002). Moreover, the prevalence of roach infected with the plerocercoids of *L. intestinalis*

Il est bien établi que les poissons sont les hôtes les plus affectés par *L. intestinalis* qui occupe la cavité abdominale du poisson pendant plusieurs années (Van Dobben, 1952; confiance, 1958, Wilson, 1971). Le premier effet morphologique apparaît après la croissance rapide du parasite dans la cavité du corps du poisson détendant la région abdominale. Dans une grande variété d'espèces, l'infection par *L. intestinalis* induit une réaction inflammatoire (Taylor et Hoole, 1995). De plus, le parasite semble être en mesure d'inhiber la production endocrinienne et de réprimer la croissance des gonades des poissons infectés (Hecker et Karbe, 2005). Des effets sur l'hypophyse ont également été signalés, tels que les changements cytologiques et la réduction de la synthèse de gonadotrophines (Arme et Owen, 1968; Carter et al, 2005).

L'objectif de cette étude était d'identifier les effets de *L. intestinalis* sur la fonction endocrine du gardon par l'évaluation de marqueurs de la santé de la reproduction tels que les niveaux plasmatiques des stéroïdes, l'induction de vitellogénine et la maturation des gonades

3.2. Méthodes

L'échantillonnage et les méthodes utilisées sont celles décrites dans les précédents chapitres.

Pour quantifier le taux d'infection des gardons, l'indice de parasitisation (PI) décrit par Hoole (1994) a été calculé: $PI (\%) = \frac{\text{masse des parasites}}{\text{masse du poisson}} \times 100$.

corresponds to 7% of the population while 30% of the roach found in stomachs of the final hosts, cormorant, were infected (Van Dobben, 1952). This indicates a selective predation of ligulosed-fish and the capacity of the parasite to escape from immune responses (Esch and Fernandez, 1991).

It has been well established that from a pathogenic point of view, the second host is the most affected because *L. intestinalis* occupy the body cavity of the fish for several years and is responsible for harmful effects on the fish (Van Dobben, 1952; Dence, 1958, Wilson, 1971). The first morphological effect the distention of the fish's body cavity. In a large variety of species, infection by *L. intestinalis* induces an inflammatory response (Taylor and Hoole, 1995). The parasite appears to be able to inhibit endocrine production and suppress the gonad growth of the infected fish resulting in immature reproductive tissues associated with the inability to reproduce (Hecker and Karbe, 2005). Effects on the pituitary gland have also been reported such as cytological changes and reduction of gonadotroph synthesis (Arme and Owen, 1968; Carter et al, 2005).

The aim of this study was to identify the effects of *L. intestinalis* on the infected roach endocrine function by assessing markers of reproductive health such as plasma steroid levels, induction of vitellogenin and gonad maturation

3.2. Methods

Sampling and methods are those already described in previous chapters.

To quantify the infection of each roach, the

3.3. Résultats

Paramètres biologiques

Aucune corrélation n'a été trouvée entre la présence d'un parasite et de la taille des poissons. L'indice de parasitisme était similaire chez les deux sexes, et variait de 3 à 13,5%. Pour la majorité des poissons infectés, un seul ténia a été trouvé dans la cavité abdominale, mais jusqu'à 10 parasites ont été observés dans certains individus (fig.1). Sur 41 gardons ligulosés (9% de la population), le pourcentage des males était égal à 48,8% et donc conforme au sex-ratio de population (43,4%). Aucune différence significative n'a été observée entre la longueur moyenne, le poids et la masse des gonades des poissons parasités par rapport à ceux non infectés. En outre, des valeurs similaires d'indice de condition ont été observées chez les 2 populations. Toutefois, la valeur du GSI était nettement plus faible pour les gardons infectés et, ce pour les 2 sexes ($p = 0,0012$, $p = 0,002$, respectivement) (fig.2).

Les observations histologiques ont révélé que pour les deux sexes, la majorité des poissons présentaient des gonades avec des cellules immatures, ovocytes primaires ou spermatogonies indépendamment de la saison (fig.3).

parasitisation index (PI) was calculated as described by Hoole (1994): $PI (\%) = (\text{weight of parasite}) / (\text{total fish weight}) \times 100$.

3.3. Results

Biological parameters

No correlation was found between the occurrence of a parasite and the length of roach. The parasitization index was similar in both female and male and ranged from 3 to 13.5%. For the majority of infected fish, only one *L. intestinalis* was found in the abdominal cavity but up to 10 parasites were observed inside some roach (fig.1). On 41 ligulosed-roach sampled (9% of the population) the percentage of male was equal to 48.8% conforming to the sex-ratio of the healthy population (43.4%). No significant difference was observed between the mean length, weight and gonad mass of parasitized roach compared to uninfected ones. Moreover, similar CF values were observed between ligulosed and healthy roach of both sexes. However, the GSI value was significantly lower for the infected roach than the healthy fish for both male and female fish ($p=0.0012$; $p=0.002$ respectively) (fig.2).

The histological observations revealed that for both sexes, the majority of fish exhibited only immature cells, primary oocytes or spermatogonia respectively in females and males independently of the season (fig.3).



Figure 1: Gardons parasites par 10 *L. intestinalis* resident dans la cavité abdominale
Roach parasitized by ten residing in its abdominal cavity, external and internal view (A and B)

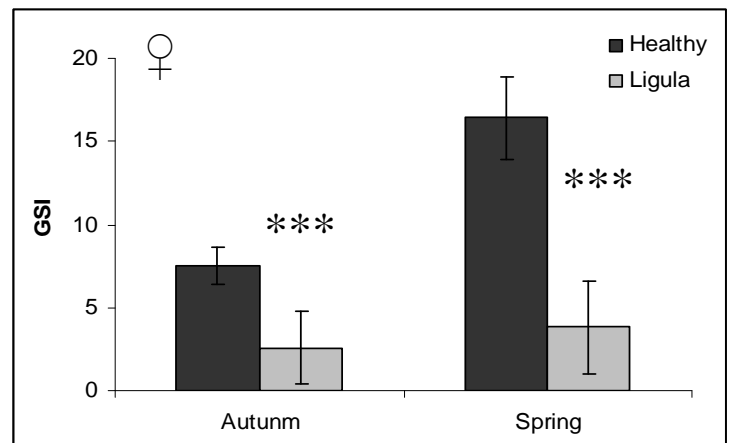
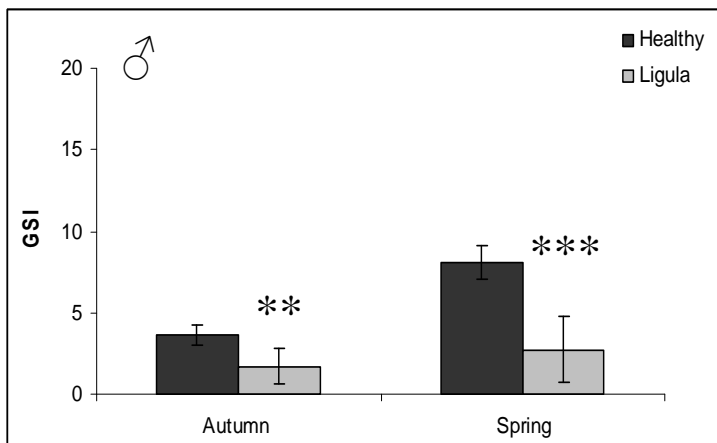


Figure 2: Indice gonadosomatique (GSI) chez les gardons mâles (graphique de gauche) et femelles (graphique de droite) infectés (barres grises) et non infectés (barres noires), par *L. intestinalis*. Les barettes représentent les intervalles de confiance à 95%. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques.
Gonadosomatic index (GSI) in male (left graph) and in female (right graph) roach that were infected (gray bars) and uninfected (black bars) with the plerocercoid of *L. intestinalis*. Results are given as mean \pm C.I. Significant mean differences are indicated by stars (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$).

Vitellogénine et stéroïdes sexuels

Les concentrations de vtg chez les gardons males étaient très faibles (fig. 4). Pour les deux sexes, aucune différence n'a été observée entre population saine et infectée quelque soit la saison. Les niveaux de progestérone (P) plasmatiques étaient similaires chez les deux sexes (fig. 5). Pour les deux sexes, une diminution significative des concentrations en P a été trouvée chez les poissons infectés à l'automne. De même, les concentrations de 11-KT étaient significativement plus faibles dans les poissons infectés en automne avec une forte réduction de l'ordre de 6 et 2 fois respectivement chez les mâles et les femelles (fig. 6). Les valeurs en E2 étaient sensiblement plus élevées dans les femelles en bonne santé et chez les mâles mais seulement à l'automne (Fig.7).

Vitellogenin and sex steroids

The VTG concentrations recorded in male plasma were very lower (fig. 4). For both sexes, no difference was observed parasitized and healthy fish whatever the season.. The P plasmatic levels were similar in both male and female roach (fig. 5). For both sexes, a significant decrease of the P concentrations was found in infected fish in autumn. Furthermore, 11-KT plasma concentration was reduced 6 and 2 times respectively in males and females in infected fish in autumn (fig 6). Plasma E2 values were significantly higher in healthy females and in males in autumn (fig.7).

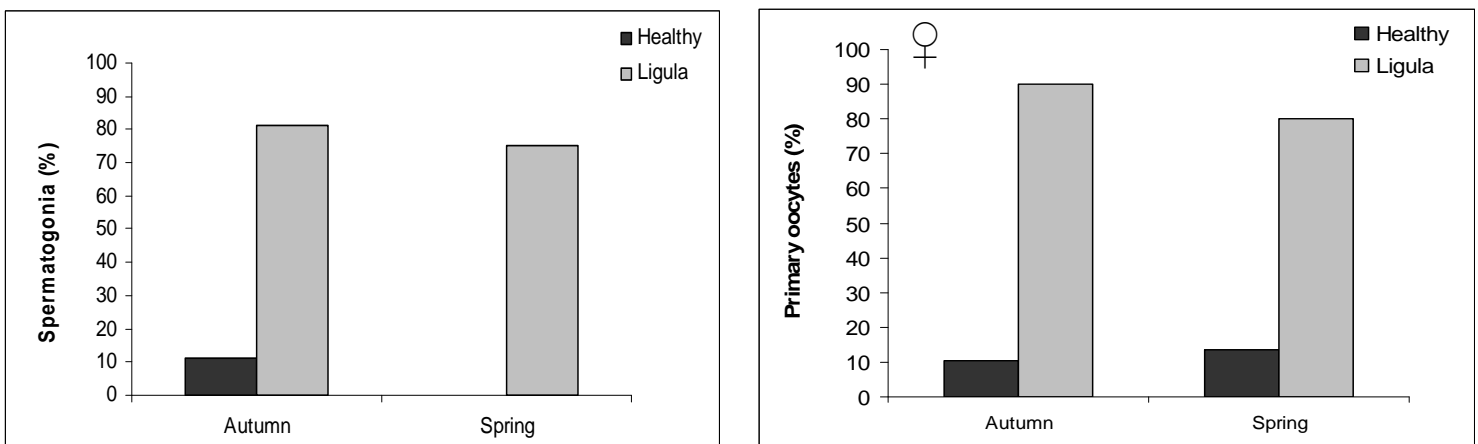


Figure 3: Pourcentage de spermatogonies ou ovocytes primaires chez les gardons mâles (gauche) et femelles (droite) sain et infectés par *L. intestinalis*.

Percentage of early stages of sexual maturity, spermatogonia in male (left graph) and primary oocytes in female (right graph) roach that were infected (gray bars) and uninfected (black bars) with the plerocercoid of *L. intestinalis*.

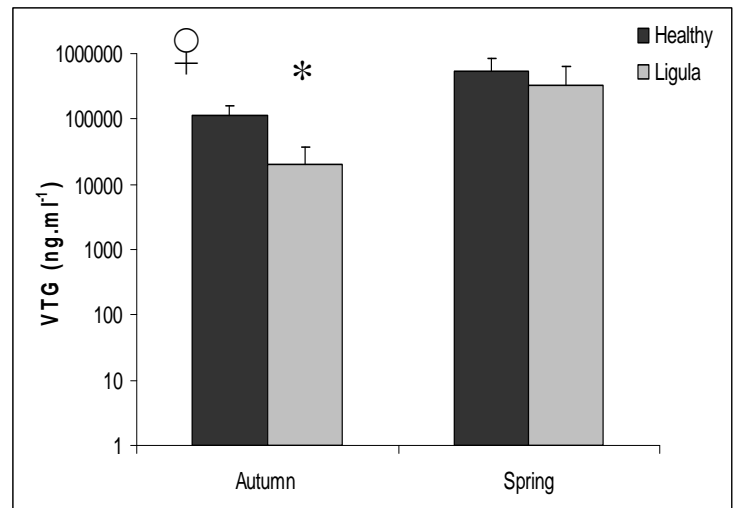
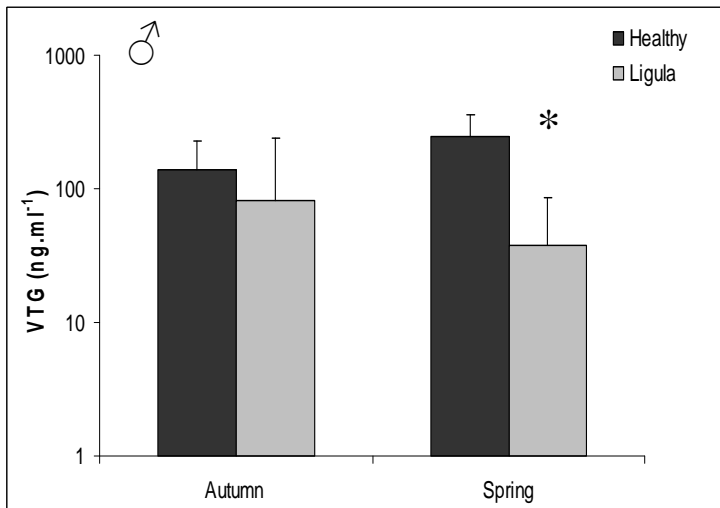


Figure 4: Vitellogénine plasmatique de gardons mâles (gauche) et femelles (droite) sains ou infectés par *L. intestinalis*. Les barres représentent les intervalles de confiance à 95%. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques.

Plasma vitellogenin in male (left graph) and in female (right graph) of healthy (black bars) or infected (gray bars) roach. Results are given as mean \pm C.I. Significant mean differences are indicated by stars (*: $p < 0,05$).

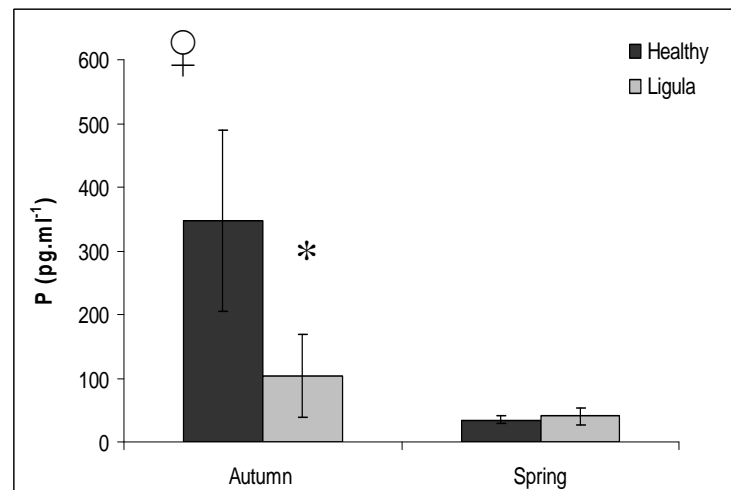
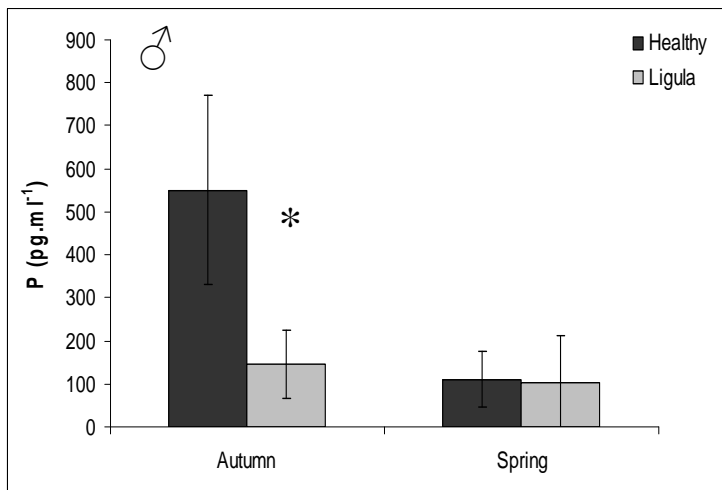


Figure 5: Concentration plasmatique en progestérone chez des gardons mâles (gauche) et femelles (droite) sains ou infectés par *L. intestinalis*. Les barres représentent les intervalles de confiance à 95%. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques.

Plasma progesterone concentration in male (left) and female (right) roach either infected (gray bars) or uninfected (black bars) with the cestode *L. intestinalis*. Results are given as mean \pm C.I. Significant mean differences are indicated by stars (*: $p < 0,05$).

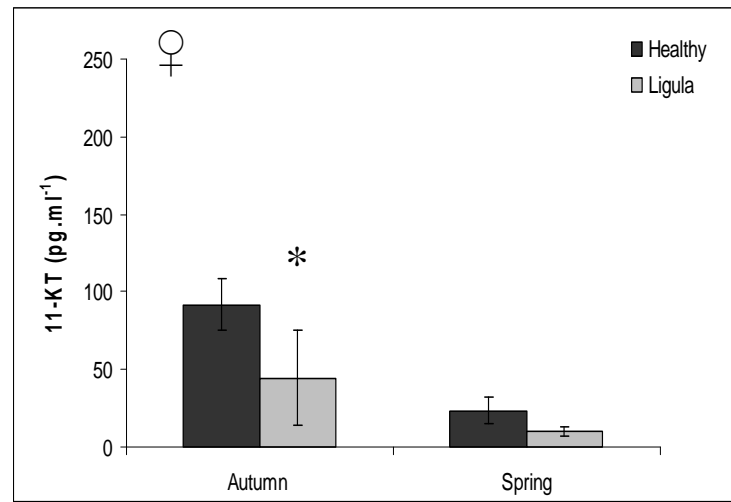
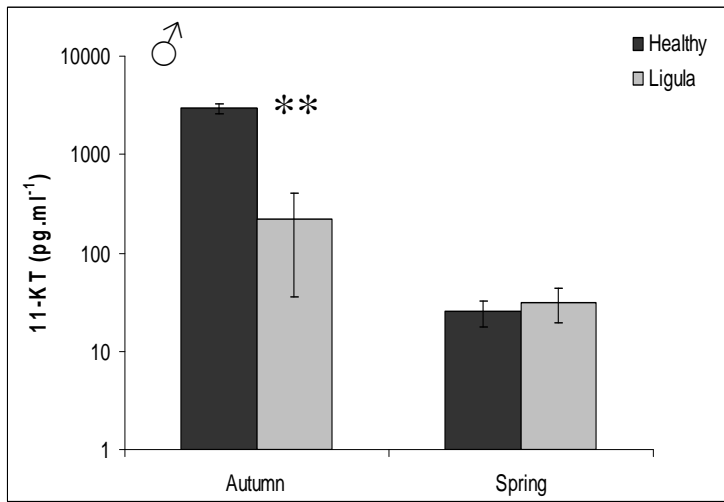


Figure 6: Concentration plasmatique en oestradiol chez des gardons mâles (gauche) et femelles (droite) sains ou infectés par *L. intestinalis*. Les barres représentent les intervalles de confiance à 95%. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques.
 Plasma estradiol concentrations of male (left) and female (right) roach that were infected (gray bars) or uninfected (black bars) with the cestode *L. intestinalis*. Results are given as mean \pm C.I. Significant mean differences are indicated by stars (*: $p < 0,05$).

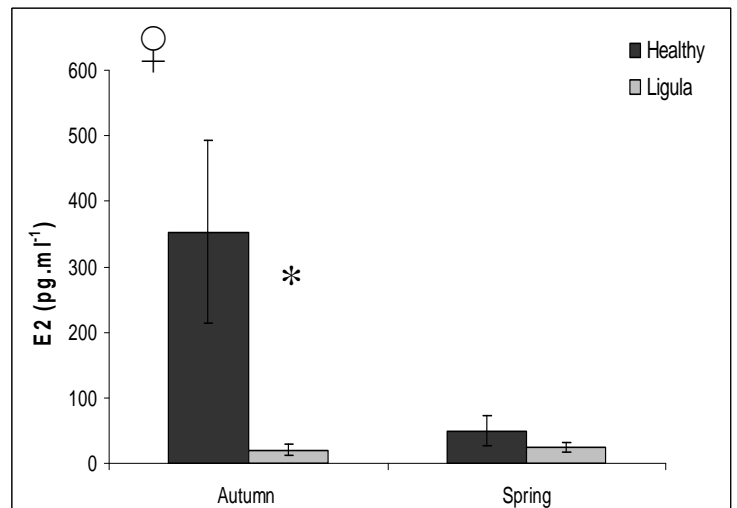
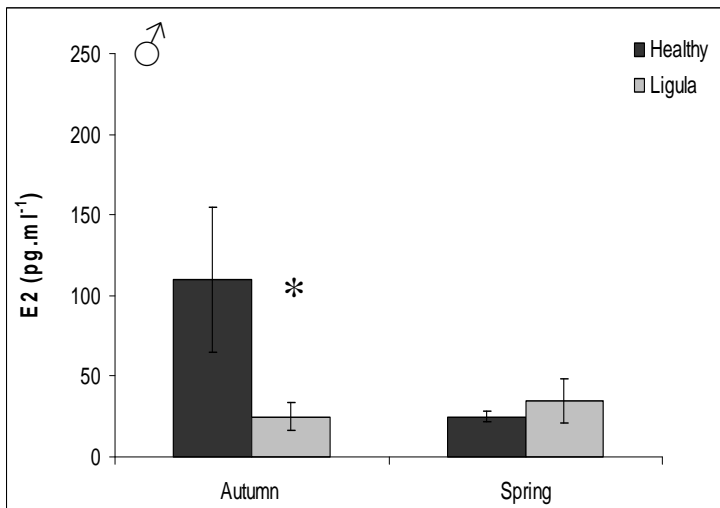


Figure 7: Concentration plasmatique en 11-céto-testostérone chez des gardons mâles (gauche) et femelles (droite) sains ou infectés par *L. intestinalis*. Les barres représentent les intervalles de confiance à 95%. Les différences significatives sont indiquées par des astérisques.
 Plasma 11-keto-testosterone concentrations of male (left) and female (right) roach that were infected (gray bars) or uninfected (black bars) with the cestode *L. intestinalis*. Results are given as mean \pm C.I. Significant mean differences are indicated by stars (*: $p < 0,05$).

3.4. Discussion

La proportion de poisson ligulosés à Venables était de 9% sans distinction de sexe et l'impact de parasitisation allait de 3 à 13%. La faible prévalence de parasite pourrait indiquer que le site est faiblement contaminé. En effet, Lafferty en 2005 a montré que les polluants peuvent contribuer à l'augmentation du parasitisme en accroissant la sensibilité ou par une augmentation de l'abondance des hôtes intermédiaires et de vecteurs. Hecker et al, (2005) ont observé que la prévalence de brème ligulosée dans plusieurs sites pollués pouvait atteindre 82% par rapport à un site de référence où seulement 7,9% de poissons étaient parasités. Les effets conjugués de la pollution et des parasites pourraient avoir de graves conséquences sur la reproduction de la population.

Les concentrations de P étaient réduites chez les poissons parasités des deux sexes. Une diminution significative de 11 KT et E2 a aussi été notée mais restreinte à l'automne et conduisant à une inhibition de la maturation la synthèse de vtg et le développement des gonades. Karbe et Hecker (2005) ont montré des effets similaires sur la brème (*Abramis brama*), avec de faibles niveaux de stéroïdes sexuels et une inhibition de la croissance des gonades des poissons ligulosés.

Le taux d'œstradiol semble être le paramètre le plus affecté par le parasitisme avec notamment une réduction d'un facteur 17 chez les femelles par rapport aux témoins. Cette suppression sélective pourrait indiquer que la CYP 19 aromatasase est particulièrement inhibée comme cela a été démontré par Hecker et al, 2007 chez la brème.

Plusieurs études ont suggéré un effet

3.4. Discussion

The occurrence of ligulosed-fish reached 9% of the roach population studied with a similar ratio for both sexes and an impact of parasitisation ranging from 3 to 13%. The low prevalence of the *L. intestinalis* on the population studied may indicate that the studied site is low contaminated. Indeed, Lafferty showed in 2005 that pollutants may increase parasitism by increasing host susceptibility or by increasing the abundance of intermediate hosts and vectors. Hecker et al, (2005) observed an increase of the prevalence of ligulosed-bream in several polluted sites reaching 82% compared to a reference site where only 7.9% of parasitized fish were observed. Synergic effects of both pollution and parasitisation could induce serious impact on the reproductive success of the population.

The decrease in plasma P concentration in parasitized fish was similar for both sexes whereas ligulosed roach showed a more important decrease in 11-KT and E2 respectively in males and females during autumn leading to the inhibition of vtg synthesis and gonad development. Hecker and Karbe (2005) demonstrated similar effects on the bream (*Abramis brama*) with an inhibition of sex steroids levels and gonad growth in ligulosed fish.

Estradiol appeared to be the most affected steroid by the parasitism with, in particular, levels 17 times lower compared to the healthy females. This selective suppression of estrogen synthesis could indicate that the steroidogenic enzyme CYP 19 aromatasase was more affected by *L. intestinalis* as was demonstrated by Hecker et al, 2007 in wild bream infected.

Several studies suggested a specific effect

spécifique de l'infection parasitaire sur l'hypophyse (Arme et Owen, 1968, Carter et al, 2005, Hecker et Karbe, 2005) aboutissant à la suppression de la production de stéroïdes et de maturation des gonades. Carter et al, 2005, ont montré que l'hypophyse de gardon ligulosé avait une activité de transcription et de synthèse de l'hormone lutéinisante (LH) réduite de 50%. En outre, des extraits et des sécrétions de *L. intestinalis* peuvent inhiber la production de LH *in vitro* suggérant que le parasite pourrait produire un composé estrogéno-mimétique (Arme, 1997).

3.5. Conclusion

La présente étude a démontré des effets négatifs importants sur la fonction de reproduction du gardon. Toutes les synthèses de stéroïdes sont affectées par le parasite chez les deux sexes. Cette étude a révélé que, même sur le site de référence, des facteurs écologiques tels que le parasitisme peuvent modifier la fonction de reproduction de poissons sauvages. En outre, ces résultats indiquent que le parasitisme pourrait agir en synergie avec les perturbateurs endocriniens dans les sites pollués et intensifier les effets négatifs sur la reproduction.

of the parasitic infection on the pituitary gland (Arme and Owen, 1968, Carter et al, 2005, Hecker and Karbe, 2005) resulting in the suppression of steroid production and gonad maturation. Carter et al, 2005, showed that the pituitary gland of ligulosed-roach could still synthesis the luteinizing hormone (LH) but with a reduction of 50% in both expression and activity. Moreover, *L. intestinalis* extracts and secretions were shown to inhibit *in vitro* LH production in the pituitary suggesting that *L. intestinalis* could produce a sex steroid mimetic which could lead to an inhibition of gonadotropin synthesis (Arme, 1997).

3.5. Conclusion

The present study demonstrated significant negative effects on the reproductive function of wild roach. All steroid production was affected by the parasite in both sexes. This study revealed that even at the reference site, ecological factors such as parasitism could alter the reproductive function of wild fish. Moreover, these results indicated that parasitism could act in synergy with endocrine disruptors in polluted sites and intensify the negative effects on reproduction.

4. ANALYSE DE L'EXPRESSION DES GÈNES *CYP19A* ET *CYP19B* CHEZ LE GARDON (*RUTILUS RUTILUS*)

4.1 Introduction

Il est aujourd'hui admis que certains composés chimiques tels que la dioxine ou les PCBs (polychlorobiphényles), présents dans l'environnement, sont capables d'engendrer, chez les individus exposés, des perturbations du système endocrinien. L'aromatase est une enzyme clef de la voie de biosynthèse des oestrogènes. Cette enzyme, majoritairement localisée dans les gonades et le cerveau, pourrait constituer un biomarqueur de choix pour l'étude des effets des polluants sur le système reproducteur (Crain et al., 1997 ; Orlando et al., 2002 ; Lavado et al., 2004).

Dans ce contexte, l'étude de l'expression de l'aromatase par RT-PCR quantitative en temps réel chez le gardon *Rutilus rutilus* a été entreprise au laboratoire. Chez cette espèce, il existe deux isoformes codées par des gènes distincts, *cyp19A* (ou P450aromA) et *cyp19B* (ou P450aromB), majoritairement exprimés respectivement dans les gonades et le cerveau. L'objectif de l'étude était, dans un premier temps, de définir le profil d'expression des gènes au cours du cycle saisonnier chez des poissons prélevés sur le site de référence de Venables. Dans un second temps, ces résultats ont été comparés à l'expression des gènes chez des individus prélevés sur différents sites pollués en Seine (Elbeuf, Don, Erquinghem) et dans un de ses affluents (Gournay-en-Bray).

4. *CYP19A* AND *B* GENE EXPRESSION IN ROACH (*RUTILUS RUTILUS*)

4.1 Introduction

It is now generally accepted that chemical compounds such as dioxins or PCBs, present in the environment and especially in streams, are acting as endocrine disrupting chemicals (EDCs) in exposed living organisms. Aromatase is a key enzyme involved in steroid biosynthesis. This enzyme is located in gonads and brain and could be used as a biomarker of choice to study pollutant effects on the reproductive system (Crain et al., 1997 ; Orlando et al., 2002 ; Lavado et al., 2004).

In this context, the study of aromatase expression by RT-PCR (real time quantitative PCR) in roach *Rutilus rutilus* has been undertaken in our laboratory. In this species, two isoforms are encoded by two different genes, *cyp19A* (or P450arom A) and *cyp19B* (or P450arom B). They are expressed in gonads and brain respectively. The aim of this study was, at first, to define the gene expression profile during the seasonal cycle of fish collected from the reference site of Venables. And secondly, these results were compared to gene expression in fish collected from different contaminated sites in the Seine River (Elbeuf, Don, Erquinghem) and in one of its affluent (Gournay-en-Bray).

4.2 Matériels et méthodes

4.2.1. Echantillonnage

Les campagnes de prélèvement de gardons ont été réalisées mensuellement sur le site de Venables (01°17'47"/49°12'00", ED50) et annuellement, sur les autres sites (Elbeuf, 01°00'33"/49°17'12" ; Don, 02°55'14"/50°32'54" ; Erquinghem, 02°55'57"/50°36'49" ; Gournay-en-Bray, 01°43'29"/49°28'53") entre juin 2006 et juin 2007. Le site de Venables correspond à une ancienne carrière de sable dont l'exploitation a conduit à la formation d'un bras isolé dans la Seine. Distant de toute activité agricole et industrielle, il a été considéré comme site de référence. Les gardons (8 individus par pêche) ont été capturés au filet. Les tissus ont été prélevés sur le terrain et immédiatement congelés dans la carboglace. L'analyse histologique des gonades et le calcul de l'index gonado-somatique au cours du cycle ont permis de déterminer le sexe ainsi que la période de ponte des individus.

4.2.2. PCR quantitative en temps réel

L'étude de l'expression de l'aromatase a été effectuée par RT-PCR quantitative en temps réel. La première étape du travail a consisté à identifier, chez le gardon, des gènes de référence stables pour la normalisation de l'expression des gènes d'intérêt. L'analyse des banques de données (GenBank) a conduit à définir deux gènes candidats codant respectivement pour la β -actine (n° d'accèsion DQ061948) et l'ARN ribosomique 18-s (n° d'accèsion AY770580). Des amorces spécifiques des gènes β -actine, *ARNr 18s*, *CYP19A* (n° d'accèsion AB190292) et *CYP19B* (n° d'accèsion AB190291) ont été

4.2 Materials and methods

4.2.1. Sampling

Campaigns for roach collection were performed monthly on Venables site (01°17'47"/49°12'00", ED50) and annually on other sites (Elbeuf, 01°00'33"/49°17'12" ; Don, 02°55'14"/50°32'54" ; Erquinghem, 02°55'57"/50°36'49" ; Gournay-en-Bray, 01°43'29"/49°28'53") between June 2006 and June 2007. The site of Venables is a former sand quarry which running led to the formation of an isolated arm of the Seine River. Since it is far away from any agricultural or industrial activity, it has been considered as a reference site. Roaches were caught with a net (n=8 for each collection). Tissues were sampled and stocked in carbo Ice before subsequent processing. Sex was determined histologically and the gonado somatic index was calculated in order to determine the spawning period of individuals.

4.2.2. Real Time quantitative PCR

Aromatase gene expression has been studied using real-time quantitative PCR. First, reference genes were identified and two candidates were obtained from the gene Bank data base, using the Primer3 tool (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). These two reference genes are the β -actine gene (accession number: DQ061948) and the gene encoding the ribosomic RNA 18-s (accession number: AY770580).

For each gene, two sets of primers were designed in order to clone the gene or to amplify

déterminées à l'aide du logiciel Primer3 (<http://fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm>).

Pour chaque gène, deux couples d'amorces ont été choisis, l'un permettant de réaliser le clonage du gène dans un vecteur plasmidique, l'autre l'amplification par PCR en temps réel. Les paramètres de sélection étaient la longueur de l'amplicon (96 à 418 pb), la température de fusion (60°C) et la faible capacité à former des dimères et des structures secondaires. Les caractéristiques des amorces ont été répertoriées dans le tableau 1

Les ARN totaux de cerveaux et de gonades ont été extraits par la technique classique au guanidine-isothiocyanate (RNeasy Mini kit, Qiagen). Après vérification de leur intégrité par électrophorèse sur gel d'agarose 1% et coloration au BET, les ARN ont été rétrotranscrits à l'aide d'un mélange d'oligodT et d'amorces aléatoires (SuperScript III, Invitrogen) et les cDNA cibles ont été amplifiés par PCR semi-quantitative (Mastercycler® epGradient, Eppendorf ; DyNAzyme II master mix, Finnzymes). Les amplicons ont été purifiés (QIAquick PCR purification kit, QIAGEN), clonés dans pGEMt (Promega) et séquencés (MilleGen).

Les conditions d'amplification par PCR quantitative (i-cycler IQ Real-Time System, Biorad ; Verso QRT-PCR SYBRGreen Fluorescein kit, ABgene) ont ensuite été optimisées et une courbe de fusion a systématiquement été effectuée. Les résultats bruts ont été analysés à l'aide du logiciel Q-Base 1.3.5 (Hellemans et al., 2007).

4.2.3. Data Analysis and Statistics

Differences between groups and individuals

it. Selection was made on the basis of length (96 à 418 pb) and fusion temperature (60°C) and dimeric association. Characteristics are reported in table 1.

Total RNA was extracted using guanidine-isothiocyanate (RNeasy Mini kit, Qiagen). Quality was checked on 1% agarose gel and retrotranscription was performed using a mix of d'oligodT random primers (SuperScript III, Invitrogen). Genes were amplified using semi-quantified PCR (Mastercycler® epGradient, Eppendorf ; DyNAzyme II master mix, Finnzymes) and product were purified QIAquick PCR purification kit, QIAGEN), cloned in pGEMt (Promega) and sequenced (MilleGen).

Amplification protocol, was then optimized (i-cycler IQ Real-Time System, Biorad ; Verso QRT-PCR SYBRGreen Fluorescein kit, ABgene) and the specificity of the product was systematically checked by inclusion of a fusion step.

Results were analysed using Q-Base 1.3.5 (Hellemans et al., 2007).

4.2.3. Data Analysis and Statistics

Differences between groups and individuals were analyzed for statistical significance with ANOVA coupled with Student-Newman-Keuls (SNK) or with a Student test (SigmaStat 3.1). Differences between groups were considered to be significant if $P < 0.05$.

were analyzed for statistical significance with ANOVA coupled with Student-Newman-Keuls (SNK) or with a Student test (SigmaStat 3.1). Differences between groups were considered to be significant if $P < 0.05$.

Tableau 1 : caractéristiques des amorces utilisées pour l'amplification des gènes cibles. /
Characteristics of the primers used to amplify the selected genes

Gènes	Amorces	Séquences	Amplicons (pb)
Clonage	CYP19B R-B-Aromatase-S1 R-B-Aromatase-AS1	5'-TGTGTGCTGGAGATGGTGAT-3' 5'-GGATGAGGTTTGTCCCCTTT-3'	292
	CYP19A R-G-Aromatase-S1 R-G-Aromatase-AS1	5'-CTTCCCTAAACCGAATGAGTTC-3' 5'-GTTTGCGGGATGCTTTCTAC-3'	204
	β actine R-actin-S1 R-actin-AS1	5'-AAGGCCAACAGGGAAAAGAT-3' 5'-CACACCATCCACACATCCAT-3'	292
	ARNr 18s R-18s-S1 R-18s-AS1	5'-CCGCAGCTAGGAATAATGGA-3' 5'-GAGCTTTCCCGTGTTGAGTC-3'	418
Q PCR	CYP19B R-B-Aromatase-S2 R-B-Aromatase-AS2	5'-GCCGTGGAAGAGCAGATAGT-3' 5'-ACCGGATGGTACCTCAGAGA-3'	128
	CYP19A R-G-Aromatase-S2 R-G-Aromatase-AS2	5'-TCGTTTCTTCCAGCCGTTC-3' 5'-CGGAGAAACGAGACAACAGC-3'	107
	β actine R-actin-S2 R-actin-AS2	5'-TCACTTCCTCCAGGCTTTGT-3' 5'-GTGCAGGAGACTGCAAAACA-3'	107
	ARNr 18s R-18s-S2 R-18s-AS2	5'-CGAAAGCATTGCAAGAAT-3' 5'-CATCGTTTACGGTTCGGAAC-3'	96

Tableau 2 : Evaluation de la stabilité des gènes de référence par GeNorm
Characteristics of the primers used to amplify the selected genes

Gènes	CV	M
ARNr18s	45,2 %	2,6198
Actine	172,3 %	2,6198

4.3 Résultats

4.3.1. Mise au point de la technique de PCR quantitative en temps réel chez le gardon

La stabilité des gènes de référence a été analysée à l'aide du module GeNorm de l'application Q-Base. Le coefficient de variation (CV) et le facteur M correspondent respectivement à la variation des quantités relatives normalisées d'un gène de référence donné pour tous les échantillons et à la moyenne arithmétique des variations observées pour un gène de référence donné par rapport à l'ensemble des gènes de référence de l'étude : plus ces facteurs sont faibles, plus les gènes de référence sont stables. Les facteurs calculés ont été répertoriés dans le tableau 2. Le facteur M, d'une valeur de 2,6198, a été considéré trop élevé pour que les 2 gènes de référence soient utilisés pour la normalisation. L'analyse des coefficients de variation a permis de sélectionner le meilleur gène candidat i.e. *ARNr 18s*.

4.3.2. Expression cérébrale et gonadique de l'aromatase au cours du cycle de reproduction du gardon sur le site de référence de Venables

L'analyse des variations saisonnières de l'expression de *CYP19B* et *CYP19A* par individu en triplicat a permis de montrer que les résultats obtenus étaient reproductibles (amplitude correcte des écart-types ; figures 1A et 3A).

Les quantités relatives d'ARNm *CYP19B* versus ARNr 18s dans le cerveau des gardons prélevés sur le site de référence de Venables entre juin 2006 et juin 2007 ont été représentées

4.3 Results

4.3.1. Optimisation of the real-time quantitative PCR technique

Gene stability was checked the GeNorm (Q-Base). Coefficient variation (CV) and M factor corresponding respectively to variation of relatives and normalised quantities of the reference gene assessed for all samples and the arithmetic mean of observed variations for a given in relation to all reference genes studied. The more these values are weak, the more the references genes are stables.

Calculation results are reported in table 2. Value obtained for the M factor (2.6198) is too high to use both reference genes for normalisation. Analysys of variation coefficients allow to choose the best gene candidat i.e. *ARNr 18s*.

4.3.2. Aromatase expression in the brain and the gonad during the reproduction cycle of roaches collected from the reference site

Seasonal variations of *CYP19B* and *CYP19A* expression for each individual (in triplicate), showed that the results were reproducible (good SD ; figure 1A and 3A).

Levels of ARNm *CYP19B* versus ARNr 18s in the brain of roaches collected from the reference site (Venables) between june 2006 and june 2007 were shown in figure 1 and 2. The normalized mean expression was maximal (18.8

figures 1 et 2. L'expression moyenne normalisée était maximale et de $18,8 \pm 2,4$ (\pm SD) entre septembre et avril (Figure 1B). Après avril, l'expression diminuait progressivement pour atteindre son niveau minimal en juin. Ce minimum d'expression était similaire à celui détecté en juin 2006.

L'analyse de l'expression en fonction du sexe pour un mois donné n'a révélé aucune différence significative entre mâles et femelles excepté au mois d'avril, pour lequel l'expression était supérieure chez les mâles (figure 2). De plus, les profils d'expression par sexe au cours du cycle présentaient des similitudes à savoir une expression minimale en juin et une expression stable pendant les mois d'hiver jusqu'à la période de ponte (mars). Toutefois, la diminution après la ponte intervenait dès le mois d'avril chez les femelles alors qu'il était différé d'un mois chez les mâles. Par ailleurs, l'expression était stable chez les femelles dès le mois de septembre alors qu'elle était précédée d'une augmentation progressive entre septembre et décembre chez les mâles. Inversement, contrairement aux mâles, la diminution de l'expression après la ponte jusqu'à son niveau d'expression minimal était progressive chez les femelles entre mars et juin. Enfin, chez les femelles, une augmentation était détectée au moment de la ponte.

Les quantités relatives d'ARNm CYP19A versus ARNr 18s dans les gonades des gardons prélevés sur le site de référence de Venables entre juin 2006 et juin 2007 ont été représentées figures 3 et 4. Aucune variation significative de l'expression moyenne normalisée du gène *CYP19A* dans les gonades des poissons n'a été mise en

+ 2.4) between September and april (figure 1B). After april, the expression was gradually inhibited to a minimal level in june that was similar to that measured in june 2006.

The analysis of expression showed that there was no significant difference between males and females except for april where the expression was higher in males (figure 2). Moreover, expression profiles during the cycle presented similarities between males and females as the expression was minimal in june and constant during winter until the spawning period in march.

However, after spawning, the diminution began in early april in females and a month later in males. Besides, the expression was constant in females as soon as september while it was gradually increasing between September and December in males. Conversely, and unlike males, the expression after spawning was gradually decreasing between march and june, reaching a minimal level. Finally, an increase was observed in females at laying eggs.

Levels of ARNm CYP19A versus ARNr 18s in the gonads of roaches collected from the reference site (Venables) between june 2006 and june 2007 were shown in figure 3 and 4. No significant variation of the normalized mean gene expression CYP19A was evidenced in roach gonads during the studied period (figure 3B). The comparison between mean expression in the brain (14.7 ± 2.5) and in the gonads (25.7 ± 3.16) over the whole cycle showed that the aromatase transcript rates were higher in gonads compared to brain (Student Test, $p < 0.001$)

évidence pour la période étudiée (figure 3B). La comparaison des expressions moyennes cérébrale ($14,7 \pm 2,5$) et gonadique ($25,7 \pm 3,16$) sur l'ensemble du cycle a montré que les taux de transcrits aromatasase étaient plus élevés dans les gonades que dans le cerveau (Test de Student, $p < 0,001$), y compris dans la période au cours de laquelle l'expression était apparue maximale et stable dans le cerveau.

Toutefois, l'étude de l'expression de *CYP19A* en fonction du sexe a permis de définir des patrons d'expression différents chez les mâles et les femelles (figure 4). Chez les mâles, après une phase d'augmentation progressive jusqu'à janvier, l'expression était stable et maximale jusqu'en avril. Comme dans le cerveau, la diminution de l'expression intervenait un mois après la ponte (figure 4A). Chez les femelles, les taux d'expression, plus faibles que chez les mâles excepté en mai, étaient maximaux en octobre et mai, chaque pic étant précédé et suivi respectivement d'une augmentation et d'une diminution progressives (figure 4B).

including when expression was maximal and constant in the brain.

However, different trends in *CYP19A* expression were evidenced between males and females (figure 4). For males, the expression increased gradually until January, then it was constant and maximal until april. Like in the case of brain, the expression decrease took place a month after spawning (figure 4A). For females, expression rates, lower than those of males except in may, were maximal in october and may; each peak being preceded and followed by a rise and a gradual decrease respectively (figure 4B).

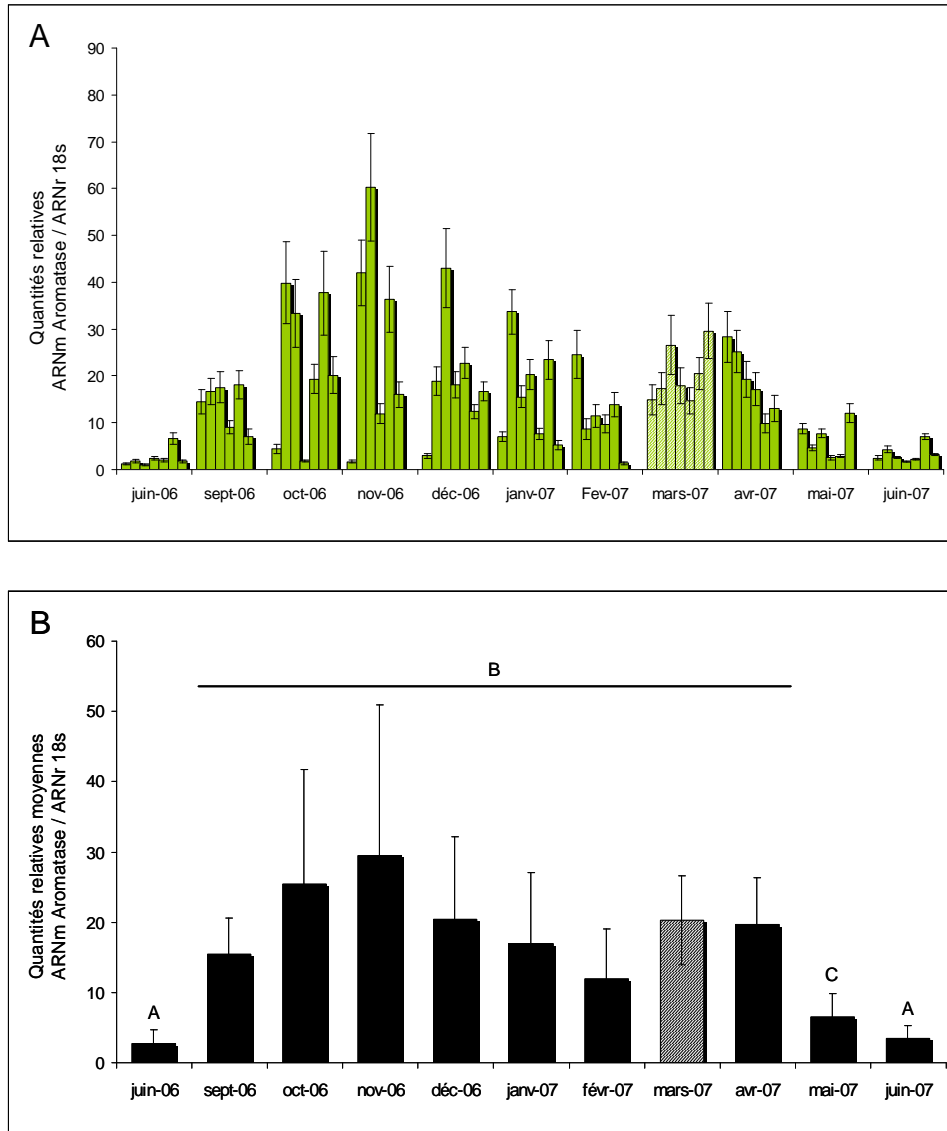


Figure 1. Variations saisonnières de l'expression du gène CYP19B dans le cerveau de gardons prélevés sur le site de Venables. A : Variations individuelles (n=3) ; B : Moyennes mensuelles (6<n<7). Chaque barre représente l'écart-type / Seasonal variations of CYP19B gene expression in brain of roach sampled in Venables. A: Individuals measurements (n=3) ; B : Mean monthly values (6<n<7). Bars indicate standard deviation.

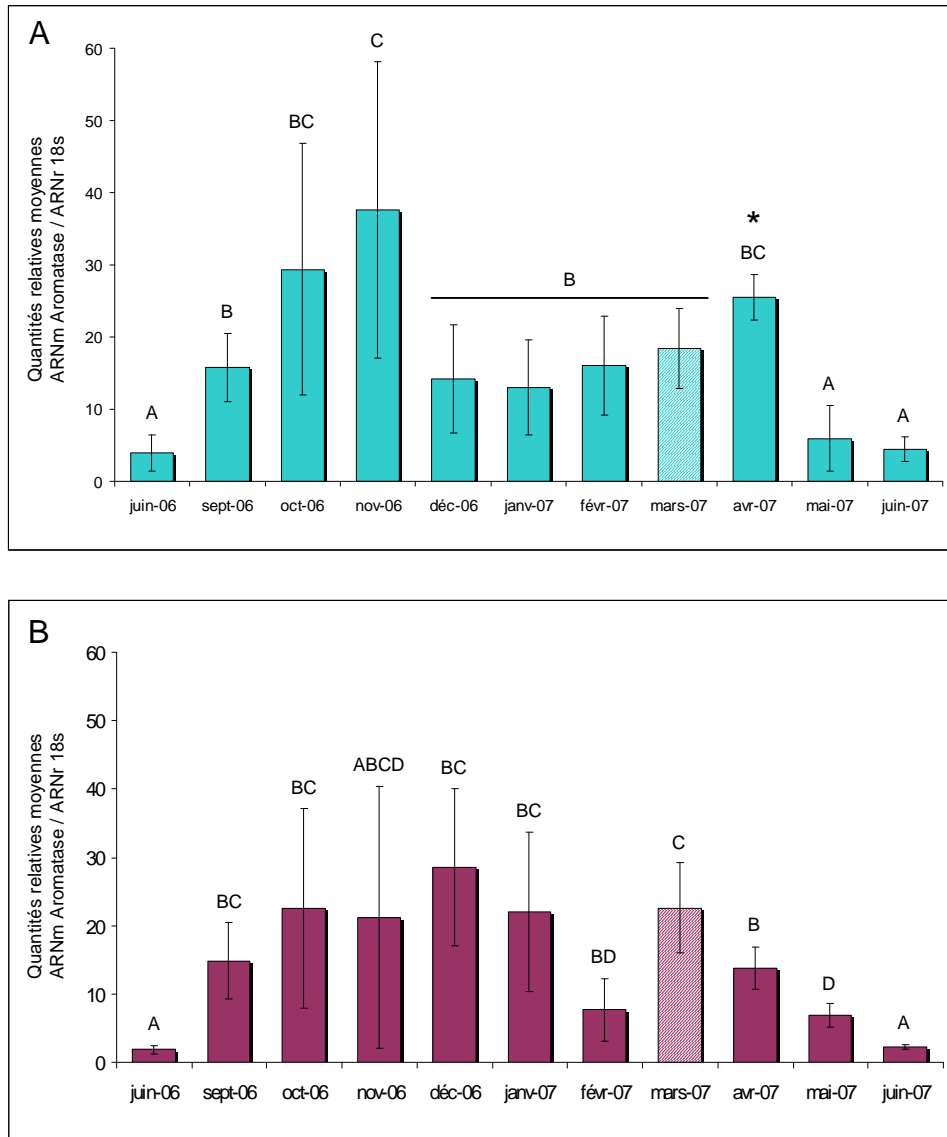


Figure 2. Variations saisonnières de l'expression du gène CYP19B dans le cerveau de gardons. A : individus mâles ; B : individus femelles. Chaque barre représente l'écart-type ($3 < n < 5$) / Seasonal variations of CYP19B gene expression in brain of roach. A: males) ; B: females. Bars indicate standard deviation ($3 < n < 5$).

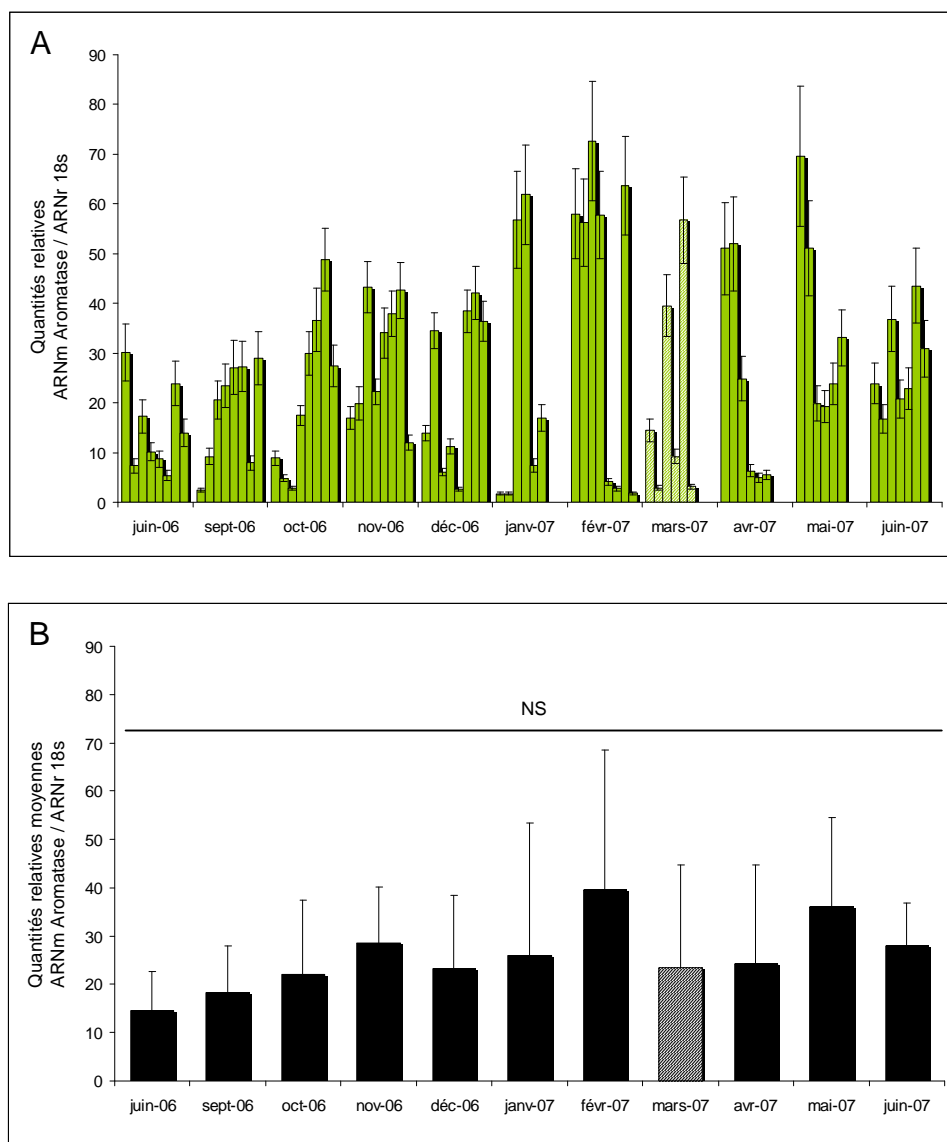


Figure 3. Variations saisonnières de l'expression du gène CYP19A dans le cerveau de gardons. A : Variations individuelles (n=3) ; B : Moyennes mensuelles (6<n<8). Chaque barre représente l'écart-type / Seasonal variations of CYP19A gene expression in brain of roach sampled in Venables. A: Individuals measurements (n=3) ; B : Mean monthly values (6<n<7). Bars indicate standard deviation.

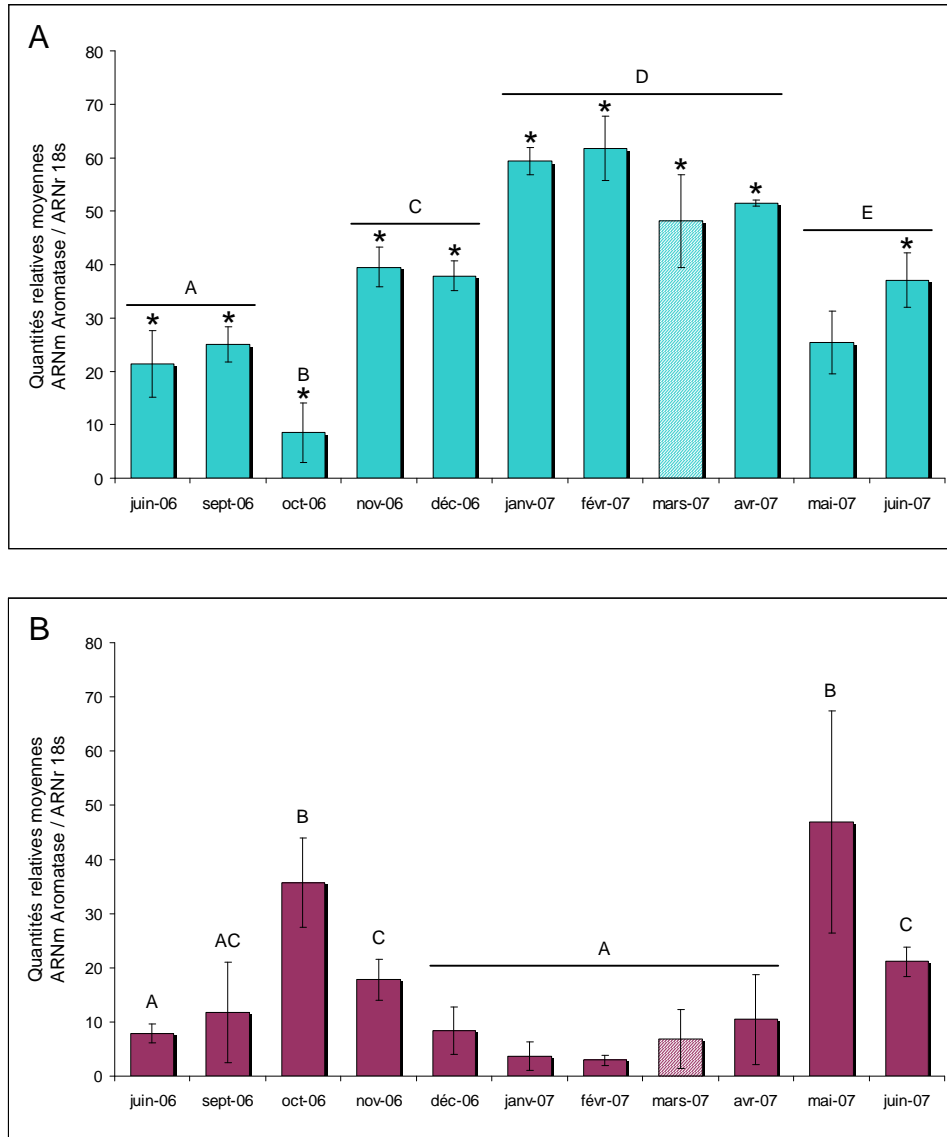


Figure 4. Variations saisonnières de l'expression du gène CYP19A dans le cerveau de gardons. A : individus mâles ; B : individus femelles. Chaque barre représente l'écart-type ($3 < n < 5$) / Seasonal variations of CYP19B gene expression in brain of roach. A: males) ; B : females. Bars indicate standard deviation ($3 < n < 5$).

4.3.4. Expression de l'aromatase cérébrale et gonadique chez des gardons prélevés sur différents sites pollués

L'expression de l'aromatase dans le cerveau et les gonades de gardons prélevés sur différents sites pollués de la Seine (Don, Erquinghem, Elbeuf) et de l'un de ses affluents (Gournay-en-Bray) a été comparée à celle mesurée chez des poissons prélevés à la même période sur le site de référence de Venables.

Une diminution de l'expression de l'aromatase dans le cerveau a été détectée chez les poissons prélevés sur 2 des 4 sites pollués étudiés (figure 5A). Plus précisément, l'expression de *CYP19B* était significativement moins élevée chez les individus mâles prélevés sur 2 des 4 sites pollués et chez les individus femelles prélevés sur 3 des 4 sites pollués (Tab. 3).

Par contre, aucune différence significative d'expression de *CYP19A* dans les gonades n'a été mise en évidence entre les poissons prélevés sur les sites pollués et ceux prélevés sur le site de référence (figure 6A). Toutefois, en tenant compte du sexe des individus, une augmentation et une diminution ont pu être respectivement détectées chez les mâles et les femelles prélevés sur le site d'Elbeuf (Tab. 4).

4.3.4. Aromatase expression in the brain and the gonad of roaches collected from contaminated sites

The aromatase expression in the brain and the gonads of roaches collected from different contaminated sites of the Seine River (Don, Erquinghem, Elbeuf) and one of its affluent (Gournay-en-Bray) was compared to that of fish collected at the same period from the reference site of Venables.

The aromatase expression in the brain was shown to decrease from 2 over the 4 studied contaminated sites (figure 5A). More precisely, the expression of *CYP19B* was significantly lower in males from 2 over 4 contaminated sites and in females from 3 over 4 contaminated sites (Tab 3).

On the opposite, *CYP19A* expression in roach gonads showed no significant differences between fish from contaminated sites and those from the reference site (figure 6A). Nevertheless, an increase and a decrease were evidenced in males and females collected from Elbeuf respectively (Tab 4).

Tableau 3 : Expression du gène CYP19A dans les sites pollués.

CYP19A expression in polluted sites

DON = Don sur la Deule; ERQ = Erquinghem sur la Lys ; GOU= Gournay-en-Bray sur l'Epte ; ELB = Elbeuf sur la Seine

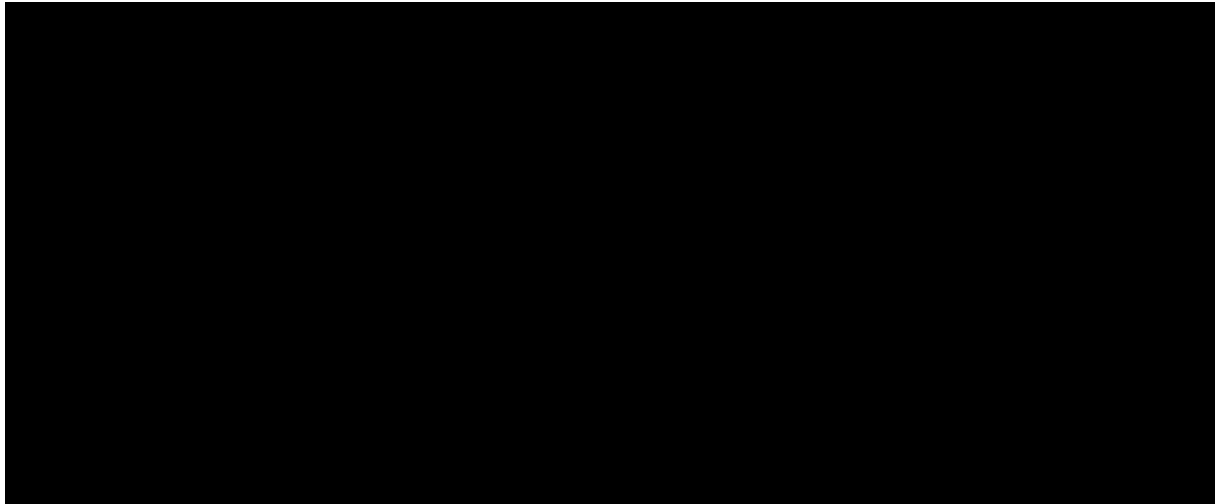
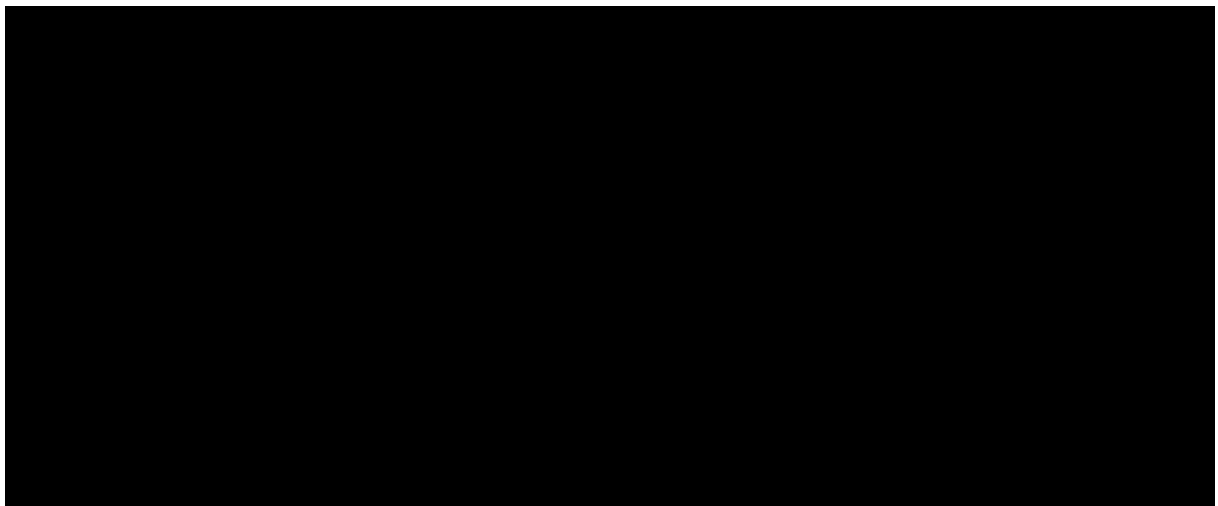


Tableau 4 : Expression du gène CYP19B dans les sites pollués.

CYP19B expression in polluted sites

DON = Don sur la Deule; ERQ = Erquinghem sur la Lys ; GOU= Gournay-en-Bray sur l'Epte ; ELB = Elbeuf sur la Seine



4.4 Discussion

L'approche que nous avons développée a permis de définir les profils d'expression de l'aromatase cérébrale et gonadique chez le gardon au cours de son cycle de reproduction sur un site de référence. D'une façon générale, l'expression du gène *CYP19B* dans le cerveau était maximale avant la période de reproduction et minimale à l'issue de la ponte. Ce profil a également été mis en évidence pour le gène *CYP19A* dans les gonades des individus mâles. Le maintien de l'expression de l'aromatase dans les gonades mâles après la ponte suggère que la production de transcrits est assurée par le tissu interstitiel i.e. cellules de Leydig à cette période du cycle. Chez les femelles, les taux gonadiques les plus élevés étaient détectés en octobre et mai. De plus, en accord avec les données de la littérature, pour chaque mois, les taux d'expression moyens dans le cerveau étaient sensiblement identiques chez les mâles et les femelles (Sawyer et al., 2006) alors qu'une différence significative entre les 2 sexes a été mise en évidence dans les gonades.

Par ailleurs, l'analyse de l'expression a révélé une grande variabilité entre individus, y compris de même sexe en particulier pour l'aromatase cérébrale. De telles variations ont été décrites chez d'autres cyprinidés, notamment chez les mâles (Kallivretaki et al., 2006). Elles pourraient refléter des différences

4.4 Discussion

This study allowed us to define gene expression profiles of brain and gonad aromatase in roach during its reproduction cycle collected from a reference site. Generally, *cyp19B* gene expression in the brain was maximal before the reproduction period and minimal after spawning. The same profile was evidenced for the gene *cyp19A* in male gonads. The continuous aromatase expression in male gonads after spawning suggests that the transcripts are produced by interstitial tissue (i.e. Leydig cells) at that period of cycle as Kotula-Balak *et al.* (2008) showed the presence of aromatase in this type of tissue in trouts. In females, the highest gonadic rate expression was recorded in october and may. Furthermore, as found in literature, mensual mean rate expression in the roach brain were nearly identical in males and females (Sawyer *et al.* 2006) while a significant difference between the two sexes was evidenced in gonads.

Moreover, the analysis of aromatase expression showed a great variability among individuals, including those of the same sex, in particular for the aromatase in the brain. Such variations have been reported in other cyprinides, especially in males (Kallivretaki et al., 2006) and could reflect inter-individual differences among population in particular concerning mating strategies (Spence et al, 2006).

Seasonal variations and the great inter-individual variability of *CYP19B* and *CYP19A* expression suggests that no use of aromatase

comportementales inter-individus au sein d'une population, notamment en ce qui concerne les stratégies d'accouplement (Spence et al, 2006).

Les variations saisonnières et la grande variabilité inter-individus de l'expression de *CYP19B* et *CYP19A* indiquent que, pour que l'utilisation du taux de transcrits aromatasé comme biomarqueur soit rigoureuse, l'analyse de l'expression doit tenir compte d'une part, de la période de prélèvement et d'autre part, du sexe des individus afin de minimiser la variabilité. Concernant la période de prélèvement, il conviendra en effet de privilégier les mois pendant lesquels l'expression est la plus forte ou au contraire la plus faible afin de détecter plus aisément respectivement une diminution ou une augmentation de l'expression.

La comparaison de l'expression des gènes *CYP19B* et *CYP19A* chez des poissons prélevés sur sites pollués versus site de référence a montré des variations de l'expression cérébrale et gonadique. En effet, pour les sites de Don et Erquinghem, seule une diminution de l'expression cérébrale chez les femelles a été mise en évidence. Pour le site de Gournay-en-Bray, des variations des taux de transcrits ont été détectées uniquement dans le cerveau des deux sexes. Enfin, pour le site d'Elbeuf, des variations des expressions cérébrale et gonadique ont été mises en évidence à la fois chez les mâles et les femelles. Les différences de profil d'expression pour un même site entre mâles et femelles i.e. augmentation chez les mâles et diminution chez les femelles prélevés

transcript rates as a biomarker can be made unless the expression is analyzed with caution. In deed, collection time as well as the sex must be considered in order to minimize variability.

As for collection time, months of highest or lowest expression should rather be chosen in order to detect more easily a diminution or an augmentation respectively of the expression.

The comparison of *CYP19B* and *CYP19A* gene expression in fish collected from contaminated sites versus reference site showed variations of the expression in the brain and in the gonads.

As a matter of fact, for the sites of Don and Erquinghem, a diminution of the expression was found only in the female brain. For the site of Gournay-en-Bray, transcript rates variations were detected only in the brain of both males and females. Finally, for the site of Elbeuf, expression variation in brain and gonads were evidenced in both males and females. The differences in expression profile for the same site between males and females i.e. augmentation in males and diminution in females collected from Elbeuf, suggest a different sensitivity of individuals to a cocktail of pollutants.

In a general manner, variations of aromatase expression observed between contaminated and references sites could be reflected on estrogen rates in gonads and brain. A modification in steroids rates could result in the disruption of gamete maturity or in the disorganization of the social life of individuals among the group and in particular at the moment of the reproduction.

However, we must keep in mind that the regulation of the transcript rate is not the only

sur le site d'Elbeuf suggère une sensibilité différente des individus à une mixture de contaminants.

D'une façon générale, les variations de l'expression de l'aromatase observées entre sites pollués et site de référence pourraient se répercuter sur les taux d'oestrogènes gonadiques et cérébraux. Une modification des taux de stéroïdes pourrait être à l'origine de perturbations de la maturation des gamètes ou d'une désorganisation de la vie sociale des individus dans le groupe notamment au moment de la période de reproduction. Il convient toutefois de tenir compte du fait que la régulation du taux de transcrits n'est pas le seul niveau de régulation de l'aromatase, celle-ci pouvant également intervenir au cours de la traduction, après la traduction via les modifications post-traductionnelles ou directement via l'activité enzymatique.

4.5. Conclusions

En conclusion, cette étude a permis la mise au point du dosage, par PCR quantitative en temps réel, de l'expression de l'aromatase chez le gardon. L'identification du gène *ARNr 18s* en tant que gène de référence de qualité permettra, en outre, d'élargir les champs d'investigation pour la mise en évidence de biomarqueurs innovants en réalisant le dosage de l'expression de tout gène d'intérêt chez cette espèce.

Par ailleurs, pour la première fois, les profils d'expression des gènes *CYP19B* et *CYP19A* dans le cerveau et les gonades de gardon ont été identifiés sur un site de référence, montrant,

level of aromatase regulation as this regulation can also take place during translation, after traduction via post-traductional modification or directly via enzymatic activities.

4.5. Conclusions

In conclusion, this study allowed perfecting a method to measure aromatase expression by Real Time- quantitative PCR in roaches. The identification of *ARNr18s* as a quality reference gene would broaden research fields to bring out innovative biomarkers by measuring the expression of any gene of interest in this species.

Moreover, and for the first time, the *CYP19B* and *CYP19A* gene expression in the brain and the gonads of roach have been identified in a reference site and showed a general tendency to raise transcript rates before spawning and a basal expression after the reproduction period.

Finally, differences in aromatase transcript rates have been found between contaminated sites and the reference one in the brain and in the gonads of both males and females. Measuring gene expression seems to be a reliable exposure biomarker to hormono-mimetic agents present in the environment.

d'une façon générale, une augmentation des taux de transcrits avant la ponte et une expression basale à l'issue de la période de reproduction.

Enfin, des différences des taux transcrits aromatase entre sites pollués et site de référence ont été mises en évidence à la fois dans le cerveau et les gonades et chez les mâles et les femelles. Le dosage de l'expression des gènes constitue donc, chez le gardon, un biomarqueur fiable d'exposition aux agents hormono-mimétiques présents dans l'environnement.

4.6. References

- Crain DA, Guillette LJ Jr, Rooney AA, Pickford DB, 1997. Alterations in steroidogenesis in alligators (*Alligator mississippiensis*) exposed naturally and experimentally to environmental contaminants. *Environ. Health Perspect.* 105 : 528-33.
- Hellemans J., Mortier G., De Paepe A., Speleman F., Vandesompele J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8(2):R19.
- Kallivretaki E, Eggen R, Neuhauss S, Alberti M, Kausch U, Segner H., 2006. Aromatase in zebrafish: a potential target for endocrine disrupting chemicals. *Mar. Environ. Res.* 62 : S187-S190.
- Kotula-Balak M, Zielińska R, Glogowski J, Kowalski RK, Sarosiek B, Bilińska B., 2008. Aromatase expression in testes of XY, YY, and XX rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. - Part A: Molecular & Integrative Physiology.* 149(2) : 188-196
- Lavado R, Thibaut R, Raldúa D, Martín R, Porte C., 2004. First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 196 : 247-57
- Orlando EF, Davis WP, Guillette LJ Jr., 2002. Aromatase activity in the ovary and brain of the eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) exposed to paper mill effluent. *Environ. Health Perspect.* 110 (suppl.) : 429-33.
- Sawyer SJ, Gerstner KA, Callard GV. 2006. Real-time PCR analysis of cytochrome P450 aromatase expression in zebrafish: gene specific tissue distribution, sex differences, developmental programming, and estrogen regulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 147(2) : 108-117.
- Spence R, Jordan WC, Smith C. 2006. Genetic analysis of male reproductive success in relation to density in the zebrafish, *Danio rerio*. *Front Zool.* 5 : 3-5.

**5. ETUDE DE LA CONTAMINATION
ŒSTROGENIQUE EN ESTUAIRE DE SEINE
ET IDENTIFICATION DES COMPOSES
ACTIFS DANS LA BILE DE FLET
(*PLATICHTHYS FLESUS*)**

5.1 Résumé

La contamination œstrogénique et ses effets associés ont été étudiés sur des flets capturés en baie de Seine. Quatre pour cent des poissons mâles étaient intersexués. De fortes concentrations de vitellogénine plasmatique ont été mesurées dans les poissons mâles avec une valeur moyenne de 104 µg/ml. L'œstrogénicité de la bile, évaluée à l'aide du test YES, a révélé que les valeurs mesurées chez les mâles peuvent atteindre le niveau observé chez des femelles matures. L'œstrogénicité moyenne des mâles était de 5,5 nmol E2eq/ml. Les composés œstrogéniques trouvés dans la bile et identifiés par GC-MS incluent l'œstradiol, l'estrone, l'éthinylestradiol, le nonylphenol et différents alkylphénols polyéthoxylates. Un certain nombre de composés non identifiés étaient également présents. Bien que généralement prépondérant dans la réponse œstrogénique, les stéroïdes naturels n'ont jamais atteint les concentrations des poissons femelles. La forte variabilité des composés œstrogéniques suggère qu'un mélange de composés contribue aux effets observés.

**5. INVESTIGATION OF ESTROGENIC
CONTAMINATION IN THE SEINE
ESTUARY: PLASMA VITELLOGENIN AND
ESTROGENICITY IDENTIFICATION
EVALUATION OF FLOUNDER
(*PLATICHTHYS FLESUS*) BILE CONTENT**

5.1. Abstract

Estrogenic contamination and associated effect have been investigated on flounder captured in the Seine Bay. Four percent of intersex fish were identified in the population. High level of plasma vitellogenin concentrations were measured in male fish with mean value of 104 µg/ml. Total bile estrogenicity assessed using the yeast estrogen screen (YES) revealed that values measured in male flounder could reach those found in females with mature oocytes. Mean male estrogenicity was 5.5 nmol E2eq/ml. Estrogenic compounds found in the bile and identified using GC-MS included estradiol, estrone, ethinylestradiol, nonylphenol and nonylphenol-polyethoxylates. A number of unidentified compounds were also present. Although generally predominant in the estrogenic response, concentration of natural steroids never reached concentrations achieved in female bile fish. High variability of relative concentrations suggests that a mixture of compounds was altogether contributing to the observed effects.

5.1 Introduction

Le flet (*Platichthys flesus*) a été largement utilisé comme bioindicateur lors d'études de l'environnement. De nombreux rapports issus de travaux *in situ* (Scott et al. 2006, Kirby et al. 2006 et 2004, Vethaak et al. 2005 et 2002, Kleinkauf et al. 2004, George et al. 2004, Matthiesen 2002, Allen et al. 1999) ou de laboratoire (Madsen et al. 2006, 2003 et 2002, Craft 2004, Korsgaard et al. 1983, Emmerson et al. 1979) ont montré que la contamination des cours d'eau et des côtes est responsable de la production de vitellogénine chez les flets. Pourtant, seuls quelques sites ont révélé la présence de flets intersexués. L'analyse histologique des gonades des poissons des grands estuaires européens tels que la Tamise, l'Escault, le Rhin et le Douro n'a pas permis l'identification de ce phénomène (Vethaak et al. 2005, Ferreira et al. 2004). Ce n'est que dans la Mersey, la Clyde, le Tyne et la Seine que ces flets intersexués ont été signalés (Minier et al., 2000; Kirby et al. 2004).

La situation spécifique de la Seine est une motivation particulière pour explorer et analyser la nature des composés responsables des modifications physiologiques des flets. L'estuaire de la Seine est l'exutoire d'un bassin versant de près de 80 000 km². Le bassin combine plusieurs sources de polluants, tels que les effluents urbains, industriels et les ruissellements issus de l'agriculture intensive. Des études récentes ont montré des concentrations élevées de métaux, d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et de composés génotoxiques dans les moules d'eau douce (*Dreissena polymorpha*) dans la partie supérieure de l'estuaire (Minier et al.

5.2. Introduction

European Flounder (*Platichthys flesus*) has been extensively used as biomonitor in environmental studies. Numerous reports both derived from field work (Scott et al. 2006, Kirby et al. 2006 and 2004, Vethaak et al. 2005 and 2002, Kleinkauf et al. 2004, George et al. 2004, Matthiesen 2002, Allen et al. 1999) or laboratory exposure (Madsen et al. 2006, 2003 and 2002, Craft 2004, Korsgaard et al. 1983, Emmerson et al. 1979) showed that European rivers and coast contamination is responsible for vitellogenin production in males flounders. Yet, only few sites revealed the presence of intersex flounder. Histological analysis of fish gonads from large European estuaries such as the Thames, the Escault, the Rhine and the Douro did not allow the identification of such phenomenon (Vethaak et al. 2005, Ferreira et al. 2004). Only in the Mersey, the Clyde, the Tyne and the Seine have intersex flounders been reported (Minier et al., 2000; Kirby et al. 2004).

The specific situation of the River Seine is a particular motivation to analyze and explore the nature of compounds responsible for physiological modification of flounders in its estuary. The Seine river estuary receives water and effluent from nearly 80,000 km² of the French territory. The catchment area combine multiple potential sources of pollutants, such as urban effluents and runoffs from intensive agriculture and industrial activities. Recent studies showed elevated concentrations of metals, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and genotoxic compounds in freshwater mussels

2006) et dans des moules marines (*Mytilus edulis*) dans la partie marine de l'estuaire (Cachot et al., 2006). Le réseau français de surveillance (Réseau national d'observation, RNO) comprend plusieurs sites proches de la Seine. Les résultats montrent l'estuaire comme l'un des sites les plus contaminés des côtes françaises. Notamment des niveaux élevés de polychlorobiphényles (PCB), de métaux lourds, de retardateurs de flammes, et de pesticides ont été mesurés. Les alkylphénols ont aussi été détectés dans l'eau et les sédiments (Cailleaud et al., 2007).

L'objectif de cette étude était d'utiliser une combinaison d'analyses biologiques et chimiques afin de relier la contamination aux effets. L'histologie des gonades et la mesure de la concentration plasmatique en vitellogénine ont été réalisées tandis que des analyses chimiques ont été menées dans la bile. Parmi la vaste gamme de polluants présents, et de manière à identifier les composés potentiellement responsables de l'induction de vitellogénine, l'étude des composés éliminés par le foie via l'excrétion biliaire est une opportunité intéressante. Deux approches complémentaires ont déjà été utilisées par les scientifiques: l'analyse chimique (Vigano et al. 2006, Labadie et Hill 2006, Vermeirssen et al. 2005, Petterson et al. 2006, George et al. 2004) et la détection de molécules actives à l'aide d'un test fonctionnel (Vigano et al. 2006, Vermeirssen et al. 2005, Vine et al. 2005, Gibson et al. 2005, Tyler et al. 2005, Houtman et al. 2004, Allard et al. 2004, Legler et al. 2002, Ferreira-Leach et Hill 2001). L'approche de la chimie analytique donne des résultats quantitatifs et précis, mais suppose le choix a priori des composés analysés (pour des

Dresseina polymorpha) in the upper part of the estuary (Minier et al. 2006) and in blue mussels (*Mytilus edulis*) in the marine part of the estuary (Cachot et al., 2006). The French "mussel watch" program (Réseau National d'Observation, RNO) includes several sites from the Seine. This long term survey indicates this estuary as one of the most contaminated along the French coasts. Especially high levels of polychlorobiphenyls (PCBs), heavy metals, flames retardants, and pesticides were recorded. Alkylphenols have been detected in water and sediment (Cailleaud et al., 2007).

The aim of this study was to use a combination of biological and chemical analyses in order to relate effects to xenobiotic exposure. Gonad histology and plasma vitellogenin concentration were assessed while chemical analysis were conducted in the fish bile. Among the wide range of pollutants present, a way to identify the compounds potentially responsible for vitellogenin induction is to investigate the compounds eliminated from plasma by liver through biliary excretion. Several studies already used bile for fish contamination evaluation. Two complementary approaches were used: chemical analysis (Vigano et al. 2006, Labadie and Hill 2006, Vermeirssen et al. 2005, Petterson et al. 2006, George et al. 2004) and detection of estrogenic molecules using a functional assay (Vigano et al. 2006, Vermeirssen et al. 2005, Vine et al. 2005, Gibson et al. 2005, Tyler et al. 2005, Houtman et al. 2004, Allard et al. 2004, Legler et al. 2002, Ferreira-Leach and Hill 2001). The analytical chemistry approach gave accurate and quantitative results but suppose an *a priori*

raisons techniques et économiques) et ne peut pas refléter la contribution effective aux effets biologiques. L'approche fonctionnelle est plus ouverte (avec certaines restrictions techniques) et permet la détection de composés inattendus. Une démarche d'évaluation-identification de l'œstrogénicité (EIE) a été entreprise pour identifier les composés interagissant avec les récepteurs de l'œstradiol et permettant l'activation de la transcription des gènes associés à l'élément de réponse. L'objectif était de quantifier l'activité œstrogénique totale dans la bile, puis d'isoler les molécules actives pour finalement les identifier et les quantifier individuellement. Nous avons utilisé une association entre le test YES pour détecter l'activité (Routledge et Sumpter, 1996), la RP-HPLC pour la séparation des composés et la GC-MS pour l'identification des composés actifs isolés. Cette approche méthodologique a déjà été décrite dans les précédents rapports et appliquée avec succès sur le gardon (*Rutilus rutilus*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) par Gibson et al. (2005) et Tyler et al. (2005).

5.3. Vitellogénine et œstrogénicité chez les flets femelles

La concentration plasmatique moyenne de vitellogénine (VTG) était de 7249 (\pm 11351) mg / ml. Bien qu'évaluée sur des poissons de plus de trois ans (longueur > 24 cm), cette valeur moyenne était basée sur un échantillon de poissons prélevés à différents moments au cours du cycle de reproduction, c'est-à-dire, à différentes étapes de maturation des gamètes. Deux groupes de poissons affichant différentes

choice of analyzed compounds (for technical and economical reasons) and can not reflect the actual contribution to biological effects. The functional approach is more open (with some technical restrictions) and allows the detection of unexpected compound that may stay unconsidered by *a priori* chemical analysis. An estrogenicity identification evaluation (EIE) approach was undertaken to identify compounds interacting with the estradiol receptor and then activating transcription of genes associated to the estrogen response element. The aim was to quantify the total estrogenic activity in the bile, then to isolate the active molecules to finally identify and quantify them individually. We used an association of the yeast estrogen screen (YES) assay for functional analysis (Routledge and Sumpter 1996), RP-HPLC for separation and GC-MS for identification of the active compounds isolated. This approach and methodology has already been described in previous reports and applied successfully on roach (*Rutilus rutilus*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by Gibson et al. (2005) and Tyler et al. 2005.

5.3. Vitellogenin concentration and bile estrogenicity in female flounder

Mean plasmatic vitellogenin (VTG) level in female flounder was 7,249 (\pm 11,351) μ g/ml. Although assessed on fish of more than three year old (length > 24 cm), this mean value was based on flounder sampled at different time points during the reproductive cycle, *i.e.*, with very different maturation stages of the gametes. Two fish groups displaying different oocytes sizes could be clearly distinguished (figure 1). Oocytes diameter

tailles d'ovocytes pouvaient être clairement distingués (figure 1). Les ovocytes de diamètre de moins de 150 μm sont des ovocytes primaires (immatures), tandis que les cellules de diamètre plus élevé correspondent aux ovocytes secondaires. Pour le groupe de poissons aux gonades immatures, la concentration en VTG moyenne était de 435 (\pm 1186) $\mu\text{g/ml}$, avec un minimum sous la limite de détection et un maximum de 4176 $\mu\text{g/ml}$. Une forte variabilité a donc été trouvée au sein de ce groupe avec des valeurs couvrant plus de 7 ordres de grandeur. De façon quelque peu surprenante, environ 50% des femelles analysées présentaient des concentrations en VTG anormalement hautes, supérieures à 10 mg/ml , bien qu'elles ne montraient aucun signe histologique de vitellogénèse. Les poissons ayant des diamètres ovocytaires supérieurs à 150 μm (ovocytes vitellogéniques) présentaient une gamme étroite de VTG, avec une moyenne de 13657 (\pm 13497) $\mu\text{g/ml}$, un minimum de 420 $\mu\text{g/ml}$ et un maximum de 48.903 $\mu\text{g/ml}$. Les variations de concentration en VTG semblent liées à la maturation des ovocytes comme on l'a vu sur les sections histologiques (données non présentées).

Des résultats similaires ont été obtenus par analyse du potentiel estrogénique de la bile (figure 1). Deux groupes ont été clairement discriminés. L'oestrogénicité moyenne des femelles était de 21979 (\pm 67064) pmol E2eq/ml . Cette valeur était de 141 (\pm 65) pmol E2eq/ml pour les poissons présentant des ovocytes $< 150\mu\text{m}$ (min 63 pmol E2eq/ml , max 259 pmol E2eq/ml), et de 42175 (\pm 91688) pmol E2eq/ml (min 780 pmol E2eq/ml , 369947

under 150 μm were primary oocytes (previtellogenic stage) while cells of higher diameter corresponded to secondary oocytes. For the fish group with immature gonads, mean VTG level was 435 (\pm 1,186) $\mu\text{g/ml}$ with a minimum under detection limit and a maximum at 4176 $\mu\text{g/ml}$. High variability was thus found among this group with values spanning over 7 orders of magnitude. It could be argued that only low plasmatic VTG concentration should be present in female showing only primary oocytes, but approximately 50% of the analyzed females had plasma VTG concentration higher than 10 $\mu\text{g/ml}$. This thus showed evidence of VTG synthesis while their oocytes were still poorly developed with no sign of vitellogenesis based on histochemical analysis. Fish with oocytes diameters higher than 150 μm (vitellogenic stages) showed different levels of vitellin accumulation. This second group had a narrow range of VTG level with a mean of 13,657 (\pm 13,497) $\mu\text{g/ml}$, a minimum of 420 $\mu\text{g/ml}$ and a maximum of 48,903 $\mu\text{g/ml}$. Difference in VTG concentration appeared related to the maturation stage of the oocytes as seen on histological sections (data not shown).

A similar picture was obtained considering bile estrogenic potential (figure 1). Two groups were clearly discriminated. The mean estrogenicity of all female bile was 21,979 (\pm 67,064) pmol E2eq/ml . This value was only 141 (\pm 65) pmol E2eq/ml for fish showing oocytes $< 150\mu\text{m}$ (min 63 pmol E2eq/ml , max 259 pmol E2eq/ml) while the concentration was 42,175 (\pm 91,688) pmol E2eq/ml (min 780 pmol E2eq/ml , max 369,947 pmol E2eq/ml) in bile

pmolE2eq/ml max) pour les poissons avec des ovocytes de diamètre > 150µm. Les taux de VTG et l'oestrogénicité biliaire n'étaient pas linéairement corrélés ensemble. L'oestrogénicité restait très faible (<500 pmol E2eq/ml) jusqu'à ce que le taux de VTG atteigne 1 mg/ml (figure 2). Cela était généralement le cas pour les femmes avec des gonades ne contenant que des ovocytes immatures. Au contraire, les femmes en fin d'ovogenèse avaient généralement des concentrations en VTG beaucoup plus importantes (> 1 mg/ml) et un haut potentiel oestrogénique (> 1000 pmol E2eq/ml). Néanmoins, de façon notable, un petit nombre de poissons ne se conformait pas à ce schéma général (figure 2).

from fish with oocytes diameter > 150µm. VTG and bile estrogenicity were not linearly correlated together. Bile estrogenicity remained very low (<500 pmol E2eq/ml) until plasma VTG concentration reached 1 mg/ml (figure 2). This was generally the case for female with gonads containing only immature oocytes. On the contrary, female in late stage of oogenesis had generally high plasma VTG concentration (>1 mg/ml) and high bile estrogenic potential (>1000 pmol E2eq/ml). Nevertheless a few individuals did not conform to this scheme (figure 2).

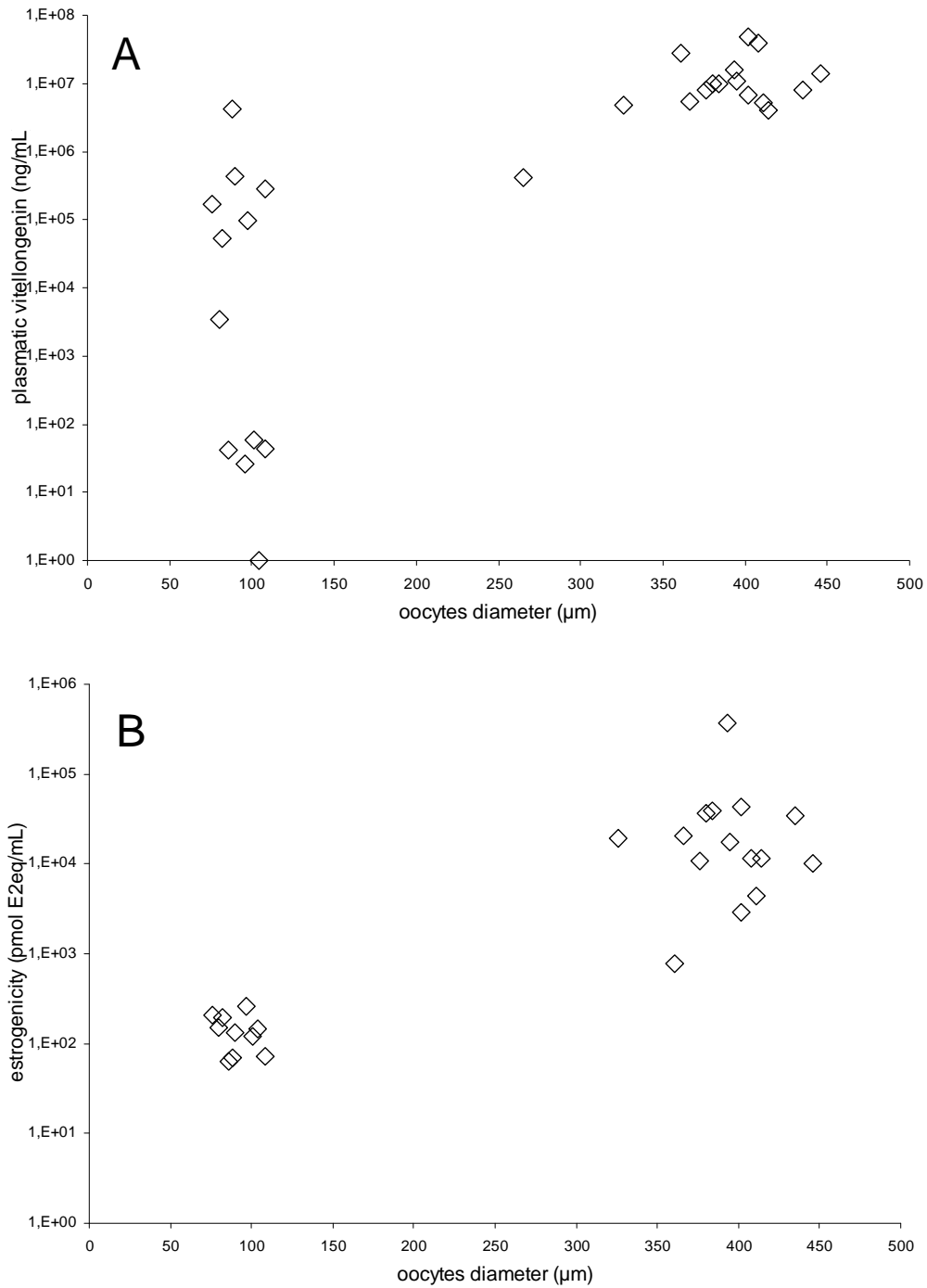


Figure 1. Scatterplot of VTG plasma concentration (A) and bile estrogenicity (B) by oocytes diameter for female flounders collected in 2004-2005.

Concentrations plasmatiques en vitellogénine et oestrogénicité de la bile en fonction du diamètre ovocytaire des flets femelles échantillonnées en 2004-2005.

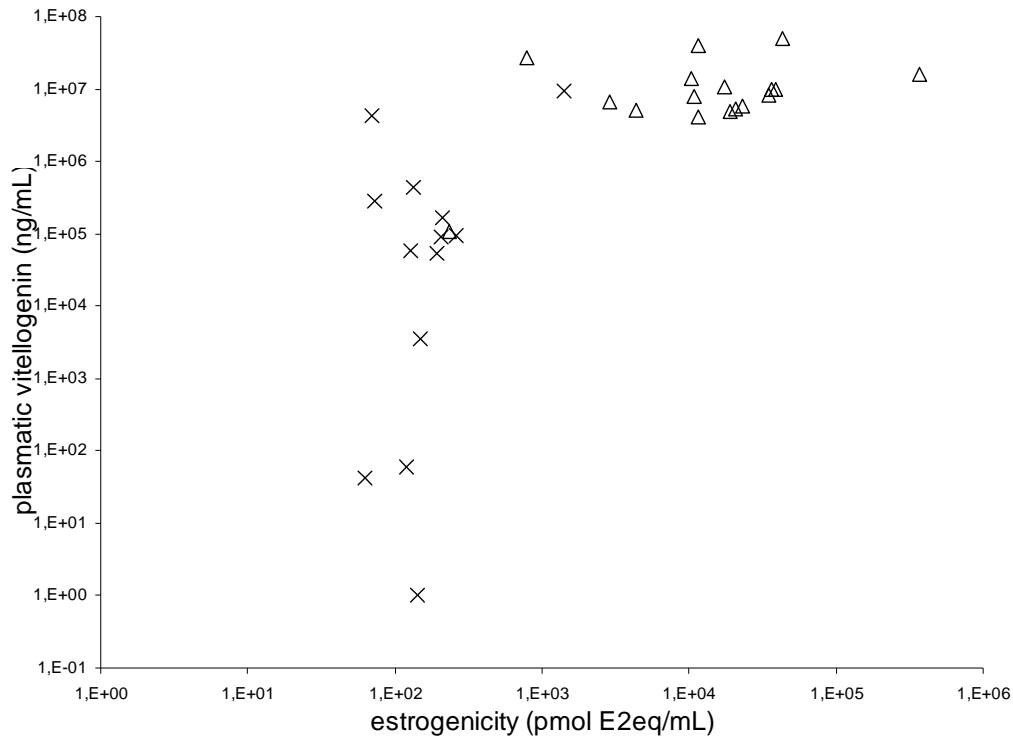


Figure 2. Scatterplot of VTG plasma concentration by bile estrogenicity for female flounders collected in 2004-2005. × previtellogenic, Δ vitellogenic

Relation concentrations plasmatiques en vitellogénine - oestrogénicité de la bile des flets femelles échantillonnées en 2004-2005

5.4. Vitellogénine et oestrogénicité chez les flets mâles

La concentration plasmatique moyenne en VTG chez les mâles était de 104 (\pm 240) μ g/ml. 49% des échantillons dépassaient 1 μ g/ml, une valeur seuil indiquant une perturbation du système endocrinien (Allen et al., 1999). À l'inverse des résultats obtenus avec les femelles, même les poissons à faible concentration en VTG montraient une oestrogénicité biliaire élevée (5503 \pm 8836 pmol E2eq/ml en moyenne). Aucune corrélation entre ces deux paramètres n'a pu être observée, les poissons à faible oestrogénicité ayant indifféremment de basses ou de fortes concentrations en VTG. De façon

5.4. Vitellogenin and bile estrogenicity in male flounder

Mean male plasmatic vitellogenin concentration was 104 (\pm 240) μ g/ml. 49% of the samples were above 1 μ g/ml, a threshold value signifying a clear disruption of the endocrine system (Allen et al., 1999). Conversely to the results obtained with females, even fish with low plasma VTG concentration could show high bile estrogenicity (mean estrogenicity in bile was 5503 \pm 8836 pmol E2eq/ml). No correlation between these two parameters could be observed, fish with low estrogenicity having indiscriminately low or high VTG concentration and conversely. Overall, while VTG

générale, alors que les concentrations en VTG étaient de l'ordre de celles mesurées chez les femelles immatures, l'oestrogénicité biliaire pouvait être de l'ordre de celles mesurées chez les femelles en fin de maturation gonadique et inversement.

Des différences significatives ont pu être observées entre les différentes périodes d'échantillonnage 2000-2001 et 2004-2005 (figure 3). Une nette diminution de la concentration moyenne en vitellogénine est observée dans des échantillons pris en 2004-2005. En 2000-2001, le taux moyen de VTG était de 124 (\pm 43) $\mu\text{g/ml}$, avec un maximum de 1203 $\mu\text{g/ml}$ et 67% des mâles avaient des niveaux supérieurs à 1 $\mu\text{g/ml}$. En 2004-2005, cette proportion est tombée à 17% avec une concentration moyenne en VTG de 0,8 (\pm 2,1) $\mu\text{g/ml}$. L'oestrogénicité biliaire était également plus élevée en 2000-2001 qu'en 2004-2005, respectivement 8350 (\pm 10597) contre 1613 (\pm 2536) pmol E2eq/ml.

concentration was in the range of those measured in immature females, bile estrogenicity could be in the range of those of females in the late stage of gonad development.

A closer look at the period of sampling pinpointed differences between 2000-2001 and 2004-2005 (figure 3). A marked decrease in mean vitellogenin concentration could be assessed in samples caught in 2004-2005. In 2000-2001, mean VTG level was 124 (\pm 43) $\mu\text{g/ml}$ with a maximum of 1,203 $\mu\text{g/ml}$. For this period 67% of males had VTG levels above 1 $\mu\text{g/ml}$. In 2004-2005 this proportion decreased to 17% with a mean vitellogenin concentration of 0.8 (\pm 2.1) $\mu\text{g/ml}$. Bile estrogenicity was also higher in 2000-2001 than in 2004-2005, respectively 8,350 (\pm 10,597) and 1,613 (\pm 2,536) pmol E2eq/ml.

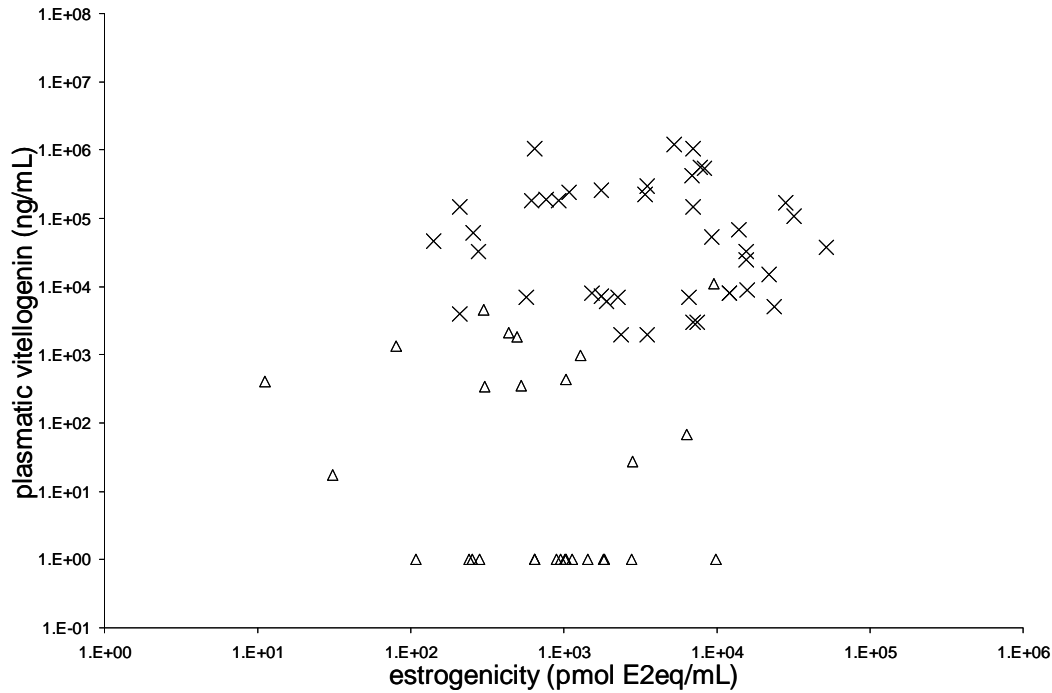


Figure 3. Scatterplot of VTG plasma concentration by bile estrogenicity for male flounders collected in 2000-2001 (x) and 2004-2005 (Δ).

Relation concentrations plasmatiques en vitellogénine - oestrogénicité de la bile des flets males échantillonnées en 2000-2001 (x) et 2004-2005 (Δ).

5.5. Identification des composés oestrogéniques

Flet femelles

Des poissons présentant différents stades de maturation ovocytaires ont été analysés (figure 4). Les profils d'oestrogénicité ont montré que les principaux composés responsables de l'activité étaient l'estrone et l'estradiol quel que soit le stade de développement des tissus gonadiques. L'identification par les temps de rétention (27-28 min pour l'estradiol et 40-41min pour l'estrone) a été confirmée par GC-MS pour les deux composés. Une petite quantité d'éthynylestradiol était sans doute présente comme indiquée par le petit pic présent à 38 min

5.5. Identification of estrogenic compounds

Females

Biles from fish with different oocytes maturation and different total estrogenicity potential have been analyzed (figure 4). Estrogenic profiles showed that major compounds responsible for estrogenicity in females were estradiol and estrone whatever the development stage of the gonadal tissues. Identification by retention time (27-28 min for estradiol and 40-41min for estrone) was confirmed by GC-MS for both compounds. A small amount of ethynylestradiol might be present as indicated by the small peak at 38 min

mais la confirmation GC-MS n'a pas été obtenue. Le rapport estrone / estradiol variait de 0,165% à 7,876%, l'estradiol étant clairement dans tous les échantillons. Un troisième composé non identifié, représentant moins de 8 % du total oestrogénicité a été trouvé dans quelques échantillons (pic d'éluion à 10 minutes).

Flets mâles

Une forte variabilité des profils d'oestrogénicité a été enregistrée chez les flets mâles. Les profils représentatifs sont présentés dans la figure 5. Les principaux composés oestrogéniques observés et confirmés par GC-MS sont l'E2, l'E1 et l'EE2. La concentration biliaire maximale était de 1850 ngE₂eq/ml pour l'E2, de 800 ngE₂eq/ml pour l'E1 et de 780 ngE₂eq/ml pour l'EE2. Au niveau individuel, les ratios entre les composés actifs ont été très variables (données non présentées), chacun des stéroïdes pouvant même être absent des profils analysés. Dans des échantillons de poissons capturés en 2000-2001, la plus forte oestrogénicité était associée à une plus grande variété de composés actifs présents sur les profils HPLC. L'identité de plusieurs de ces composés n'a pas pu être établie. La fraction élue à 102 min a été identifiée comme du nonylphénol en se basant sur le temps de rétention. Cependant, si l'analyse en GC-MS a confirmé la présence de faibles quantités de nonylphénol, ce composé était associé à de nombreux polyéthoxylates de NP1EO à NP7EO (figure 6). Les concentrations totales de ces composés dépassaient les 100 µg/ml.

but GC-MS confirmation was not performed. The ratio estrone/estradiol varied from 0,165% to 7,876%, estradiol being clearly prevalent in all samples. A third unidentified compound, accounting for less than 8 % of the total estrogenicity was found in a few samples (peak at 10 minutes of elution).

Males

High variability in bile male estrogenicity profiles was recorded between samples. Representative profiles are presented in figure 5. Major estrogenic compounds observed in HPLC profiles and subsequently confirmed by GC-MS were E2, E1 and EE2. Maximum individual bile concentration was 1850 ngE₂eq/ml for E2, 800 ngE₂eq/ml for E1 and 780 ngE₂eq/ml for EE2. At the individual level, ratios between active compounds were highly variable (data not shown). E1, E2 or EE2 could even be absent from the analysed profiles. In samples from fish caught in 2000-2001, higher total bile estrogenicity was associated with a higher variety of active compounds recorded on HPLC profiles. Identity of several of these compounds could not be resolved. The fraction eluted at 102 min was identified as nonylphenol based on retention time. GC-MS analysis confirmed the presence of low quantities of nonylphenol but this compound was associated with numerous polyethoxylates from NP1EO to NP7EO (figure 6). Total concentration of these compounds was above 100 µg/ml.

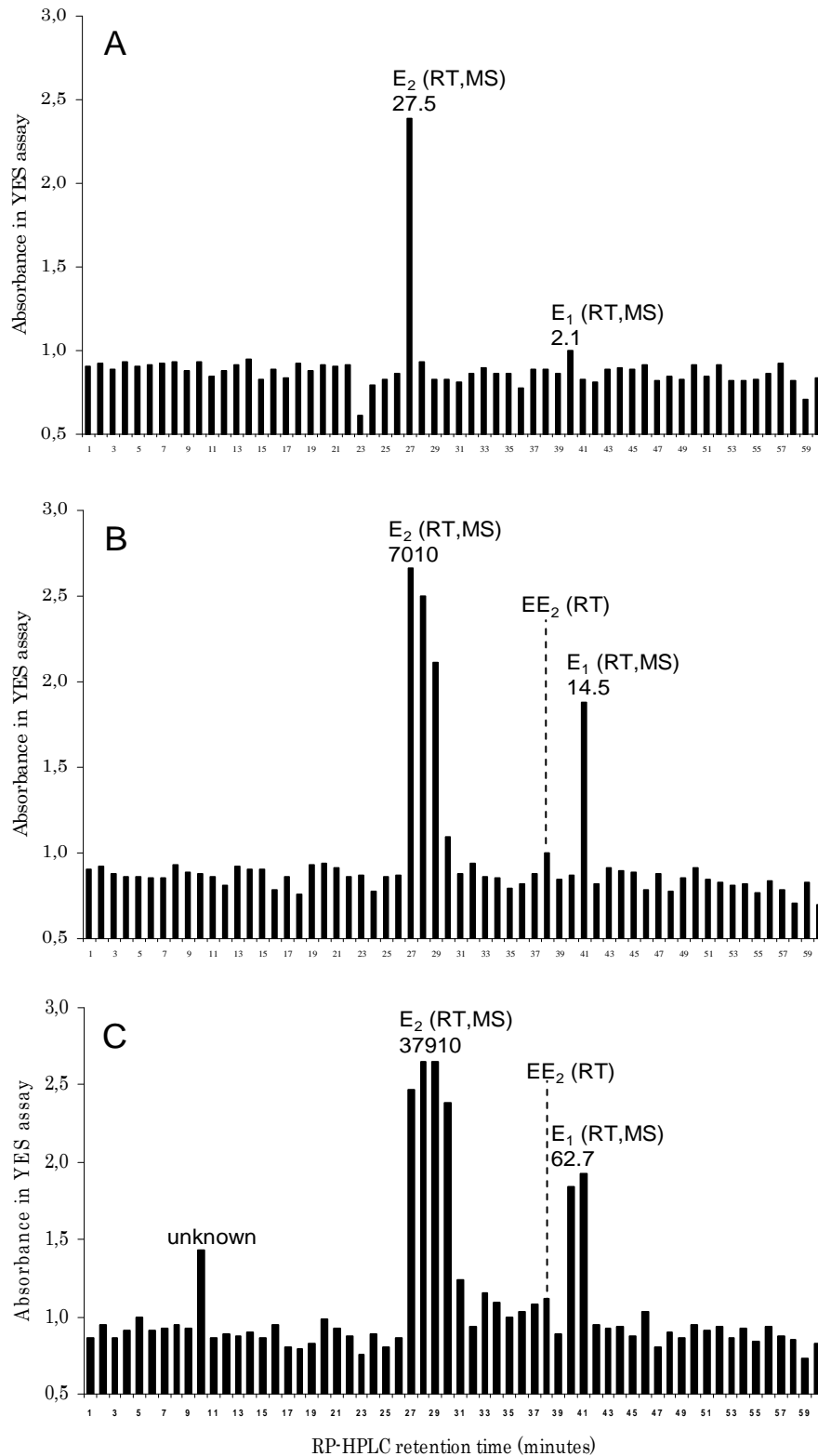


Figure 4. Representative profiles of female deconjugated bile with compounds identified by retention time in RP-HPLC (RT) and GC-MS (MS). Values are in ng E₂eq/mL. **A** previtellogenic, **B** vitellogenic with low estrogenicity, **C** Vitellogenic with high estrogenicity. **E₂** estradiol, **EE₂** ethynylestradiol, **E₁** estrone.

Profils HPLC représentatifs des biles femelles et composés identifiés (concentrations en ngE₂eq/mL)

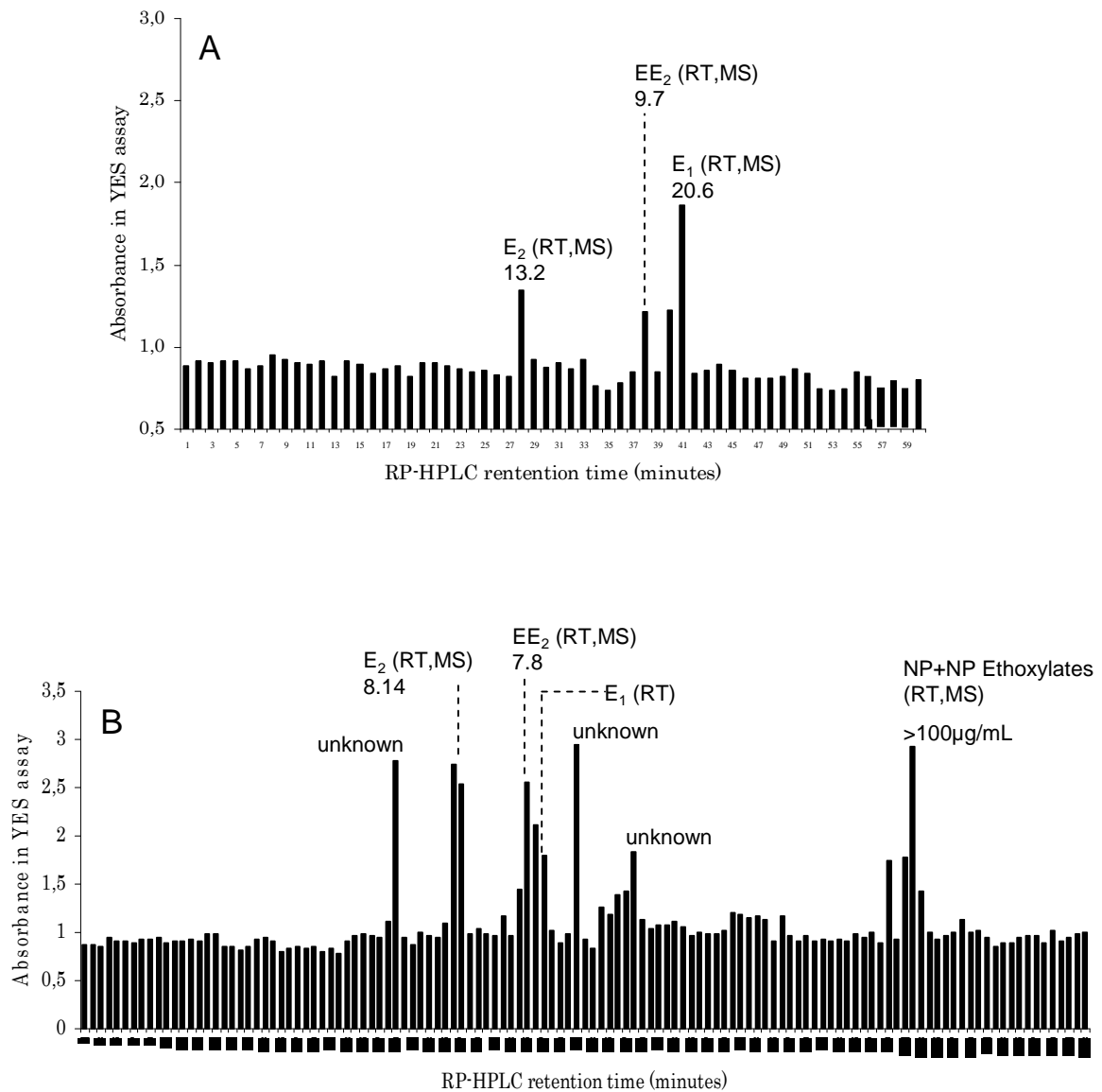


Figure 5. Representative estrogenic profiles of male deconjugated bile with compounds identified by retention time in RP-HPLC (RT) and GC-MS (MS). Values are in ng E₂eq/mL except for NP and ethoxylates. **A** 2004-2005, **B** 2000-2001 **E₂** estradiol, **EE₂** ethynylestradiol, **E₁** estrone, **NP** nonylphenol.

Profils HPLC représentatifs des biles males et composés identifiés (concentrations en ngE₂eq/mL). A : échantillons de 2000-2001. B : échantillons de 2004-2005.

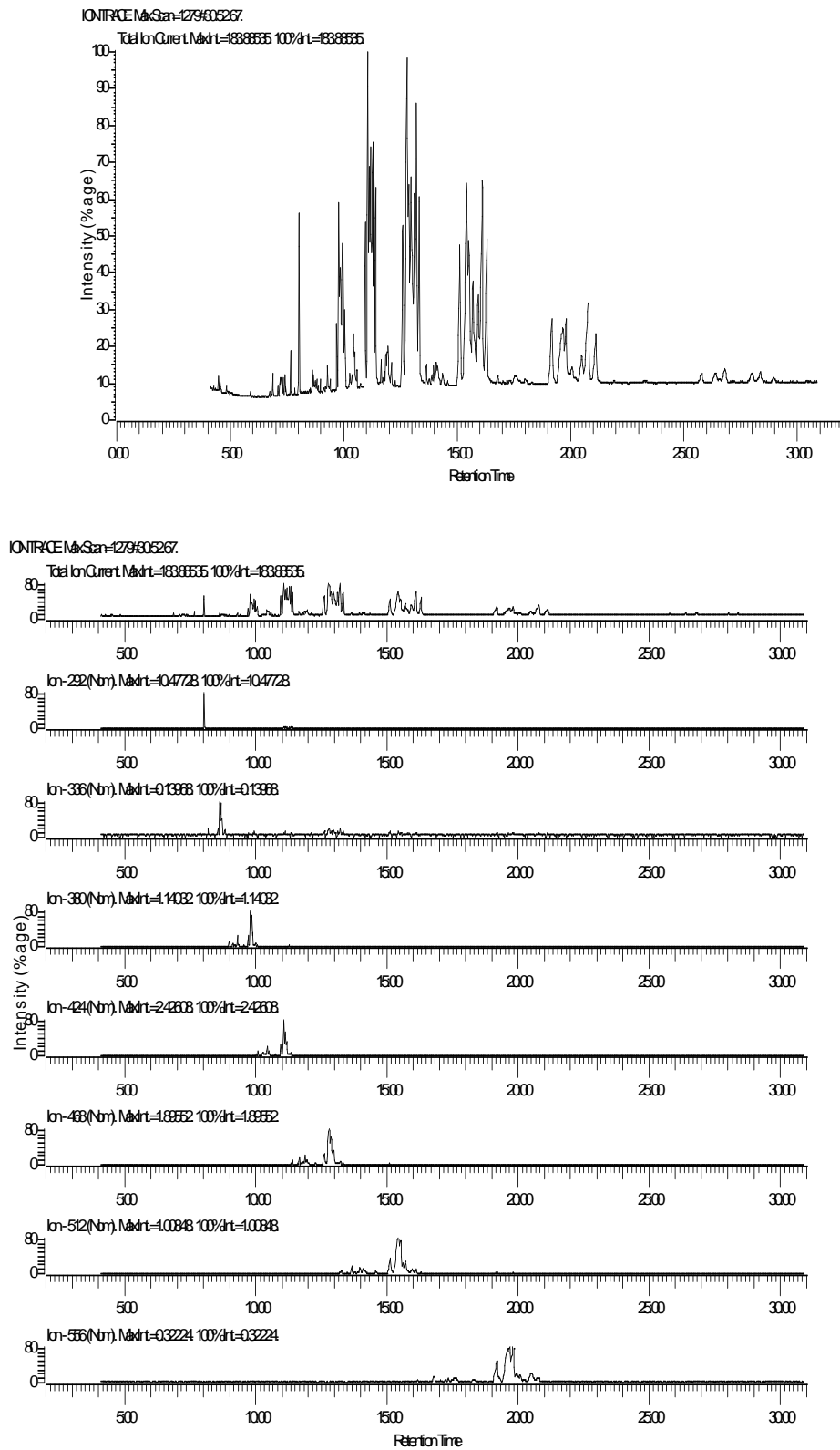


Figure 6. GC-MS profile of fraction 102. Content: Nonylphenol and Nonylphenol-ethoxylates

Profil GC-MS de la fraction 102 contenant les alkylphénols éthoxylés.

5.6. Discussion

Effets œstrogéniques

L'indice de féminisation le plus largement utilisé est la présence de VTG dans le plasma des poissons mâles. Les études sur les éventuels effets œstrogéniques dans l'environnement marin et estuarien ont montré que ce biomarqueur robuste peut être détecté chez le flet (*Platichthys flesus*) et que les niveaux de plasma VTG sont plus élevés dans les estuaires associés à une activité industrielle ou d'importants effluents urbains (Matthiessen et al, 1998). Les résultats de cette étude ont montré que cette phospholipoprotéine était présente à des concentrations très élevées dans le plasma des flets de l'estuaire de la Seine. En effet, la concentration moyenne était de 104 µg/ml, une valeur qui a été uniquement dépassée dans des cours d'eau du Royaume-Uni telles que le Tees, le Tyne et la Mersey (Kirby et al., 2004; Kleinkauf et al. 2004). Ce niveau est plus élevé d'un ordre de grandeur que ceux rapportés dans les estuaires, tels que la Tamise, l'Escaut ou le Rhin (Allen et al, 1999, Vethaak et al, 2005) et trois ordres de grandeur plus élevé que le niveau basal (Allen et al., 1999). Fait intéressant, même les femelles immatures (échantillonnées au cours de la phase initiale du cycle de reproduction) présentaient des taux plasmatiques en VTG élevés (450 µg/ml).

La comparaison entre les différentes périodes d'échantillonnage indique que le taux de VTG a vraisemblablement diminué entre 2000 et 2004. En 2000-2001, 67% des flets mâles avaient des niveaux de vitellogénine supérieurs à 1 µg/ml tandis qu'ils n'étaient plus que 17% en 2004-2005. Cette diminution a peu de chances d'être en

5.6. Discussion

Estrogenic effects

The most widely used feminization biomarker is the presence of VTG in male blood plasma. Investigations on potential estrogenic effects in marine and estuarine environments showed that this sensitive and robust biomarker could be detected in the flounder (*Platichthys flesus*) and that the levels of plasma VTG were highest in estuaries associated with industrial activity or high input of domestic sewage effluent (Matthiessen et al, 1998). Results from this study showed that this phospholipoprotein was present at very high concentrations in plasma of flounder sampled in the Seine estuary. Indeed, mean male plasma VTG concentration was 104 µg/ml, a value that has been only reported in UK rivers such as the Tees, the Tyne and the Mersey (Kirby et al., 2004; Kleinkauf et al. 2004). It is more than an order of magnitude higher than those reported in the estuaries such as the Thames, the Scheldt or the Rhine (Allen et al, 1999, Vethaak et al, 2005) and three orders of magnitude higher than background level (Allen et al., 1999). Interestingly, female sampled during the early stage of the reproductive cycle had similar mean plasma VTG (450 µg/ml). Despite these high plasma VTG levels, these females had ovaries with only primary oocytes which did not show any sign of vitellin accumulation.

Comparison between sample times indicated that plasma VTG has decreased in fish captured from 2000 to 2004. In 2000-2001, 67% of the males had vitellogenin levels over 1 µg/ml. In 2004-2005, VTG levels fell under this limit for most males sampled (only 17% were over 1

raison de problèmes méthodologiques puisque la même méthode (ELISA) a été utilisée tout au long de l'étude en utilisant des anticorps commerciaux stables et que toutes les mesures ont été effectuées dans les 6 mois suivant l'échantillonnage. Seule la dégradation du standard pourrait modifier les analyses. Toutefois, cela aurait conduit à une augmentation apparente de la concentration en VTG avec le temps. En outre, la répétition de mesures d'échantillons déjà utilisés après 2 ans de conservation a été effectuée périodiquement et n'a pas montré de changement significatif dans la concentration mesurée initialement.

Identification évaluation de l'œstrogénicité

De forts niveaux d'œstrogénicité mesurés par le test YES étaient associés aux concentrations les plus élevées en VTG chez les flets mâles. L'œstrogénicité moyenne de la bile était de 5,5 nmol E2eq/ml, une valeur qui est supérieure à celle enregistrée pour les poissons femelles avec des ovocytes primaires. Pour les femelles en de vitellogénèse (c'est-à-dire ayant des ovaires avec des ovocytes secondaires), l'œstrogénicité biliaire était plus élevée (42 nmol E2eq/ml). L'identification des composés actifs a indiqué que les stéroïdes naturels E1 et E2 représentaient plus de 95% de la réponse mesurée chez ces femelles. Seul un composé non identifié et vraisemblablement similaire à celui trouvé par Gibson (Gibson et al., 2005) a pu être mesuré dans quelques échantillons. Les concentrations en E1 et E2 étaient clairement liées aux développement gamétogénétique, les poissons avec des ovocytes matures ayant les plus fortes concentrations de stéroïdes bile et des niveaux

µg/ml). This decrease in VTG concentration is unlikely to be due to methodological problems as the same method (ELISA) was used throughout the study using commercial antibodies of steady efficiency and all measurements were performed within 6 months following the sampling. Only degradation of the batch of standard could alter the analyses. However this would actually have led to an apparent increase in VTG concentration with time. Furthermore, reassay of samples already used after one to 2 years of storage were periodically performed and did not led to significant change in the concentration originally measured

Estrogenicity identification evaluation

Associated with high VTG level, male flounder showed high bile estrogenicity as assessed using the yeast screen assay (YES). Mean bile estrogenicity was 5.5 nmol E2eq/ml, a value that was higher than the activity recorded for female fish with primary oocytes. For female in late stage of vitellogenesis (*i.e.* having ovaries with secondary oocytes), bile estrogenicity was higher with a mean value of 42 nmol E2eq/ml. Estrogenicity identification evaluation of female bile samples indicated that natural steroids E2 and E1 were accounting for more than 95% of the measured response in the YES assay. Only in a few samples, an unidentified and more apolar compound which may correspond to the one also found by Gibson could be measured (Gibson et al., 2005). E2 and E1 bile concentrations were clearly related to gametogenesis stages, fish with mature oocytes having the highest bile steroids concentration with levels similar to those measured in the Dee and the Mersey estuaries

similaires à ceux mesurés dans la Dee ou la Mersey (Royaume-Uni) pour les femelles de plus de 24 cm (Kleinkauf et al. 2004). Cela indique clairement que l'oestrogénicité était due à des hormones naturelles synthétisées par les poissons femelles. Au contraire, l'analyse de la bile des mâles, a conduit à l'identification de plusieurs composés dans des proportions différentes. Cela comprend l'E1 et l'E2, mais aussi l'EE2, certains composés non identifiés et le NP et ses éthoxylates. Le niveau d'oestrogénicité de certains échantillons était plus élevé que celui constaté dans les femelles matures en dépit de la concentration beaucoup plus faible de stéroïdes. La présence de composés exogènes, tels que le NP ou l'EE2 indique clairement que les poissons ont été exposés à ces composés dans via l'environnement malgré que l'analyse des eaux de l'estuaire de la Seine en 2002 ait indiqué que l'E1, l'E2 et l'EE2 étaient en-dessous des limites de détection (c'est-à-dire 1.2, 1 et 1,5 ng / L pour E1 et E2, respectivement) à Honfleur à proximité de notre site d'échantillonnage (Labadie et Budzinski 2005). Ces stéroïdes naturels pourraient être associés aux sédiments ou aux particules en suspension. Puisque les concentrations en E1 et E2 des mâles étaient plus élevés que ceux trouvés chez les femelles immatures, un mélange de composés contribua vraisemblablement à la forte oestrogénicité totale. L'apparente disparition de nombreux composés des échantillons de bile en 2003-2004 et la diminution de l'oestrogénicité totale est en accord avec cette hypothèse. Les composés présents dans la bile sont souvent présents sous formes conjuguées (Labadie et Hill 2006, Pedersen et Hill 2000, 2002; Legler 2002).

(UK) for female flounder over 24cm length (Kleinkauf et al. 2004). This clearly suggests that bile estrogenicity was due to natural hormones synthesized by the female flounder. On the contrary, analysis of male bile flounder, led to the identification of several compounds in various proportions. This includes E1 and E2 but also EE2, some unidentified compounds and NP and NP ethoxylates. The total estrogenicity was in some samples as high as the level found in mature females despite the much lower concentration of steroids. Presence of exogenous compounds such as EE2 or NP clearly indicated that fish were exposed and concentrating these compounds from the environment. Chemical analysis undertaken on water from the Seine estuary in 2002 showed that E1, E2 and EE2 concentrations were below detection limits (*i.e.* 1.2, 1 and 1.5 ng/L for E1 and E2 respectively) at Honfleur close to our sampling site (Labadie and Budzinski 2005). Nevertheless, an exogenous origin of these natural steroids cannot be ruled out as they might be associated with sediment or suspended particles. E1 and E2 bile concentration in males was never higher than levels found in non-vitellogenic females. This clearly indicates that a mixture of compounds contributed to the total estrogenicity. The apparent disappearance of numerous compounds from the bile in 2003-2004 and associated decrease in total bile estrogenicity is in accordance with this assumption. Compounds present in the bile are often present as conjugated forms (Labadie and Hill 2006, Pedersen and Hill 2000, 2002; Legler 2002). An enzymatic cocktail was used to release free compounds able to respond in YES assay. This

Ainsi, un cocktail enzymatique a été utilisé pour libérer les composés en mesure de répondre au test YES. Cette méthode n'est peut-être pas efficace pour tous les métabolites et pourrait laisser certains composés non détectés contribuant ainsi à une sous-estimation des composés oestrogéniques présents. Le protocole de purification (extraction en phase solide, évaporation, HPLC) peut également contribuer à cette sous-estimation par l'exclusion de composés oestrogéniques ou d'autres composés pouvant potentialiser la réponse (Denier et al., 2008).

Relation entre oestrogénicité biliaire et induction de vitellogénine

Aucune corrélation n'a pu être trouvée entre l'oestrogénicité biliaire et l'induction de vitellogénine chez les flets mâles. Il convient de souligner que ces deux mesures n'intègrent pas une même échelle de temps d'exposition. Les niveaux de VTG sont indicatifs d'une exposition qui a eu lieu sur plusieurs jours à une semaine alors que le contenu biliaire est souvent libéré dans l'intestin lors de la digestion. D'autres études ont tenté d'établir un lien entre les niveaux de stéroïdes et de VTG plasmatiques. L'E2 semble se concentrer dans la bile plusieurs milliers de fois par rapport au plasma (2500 fois selon Scott et al. 2006, ou selon Labadie et Hill 2006). Pour des composés exogènes, il existe peu de données reliant les taux de bile et les concentrations plasmatiques. Smith et Hill (2004) ont montré un facteur de bioconcentration entre le plasma et la bile de 89 à 205 fois pour les NPEOs chez les gardons et Ferreira et Hill (2001), un facteur de près de 1000 pour le tert-octylphenol. Ces résultats indiquent que les composés oestrogéniques

method may not be efficient for all metabolites and may leave some compounds undetected thus contributing to an underestimation of actual estrogenic compounds concentration assessed in the bile. The purification protocol (solid phase extraction, evaporation, HPLC) can also contribute to this underestimation by probably excluding potential estrogens or other compounds that can potentiate the estrogenic response (Denier et al., 2008).

Relation between bile estrogenicity and vitellogenin induction

No correlation could be assessed between bile estrogenicity and vitellogenin induction in male flounder. It should be stressed that both measurements may not reflect the same time scale. VTG levels are indicative of exposure that occurred several days to a week while bile content is often released in the gut every day. Other studies trying to link steroids and VTG used plasmatic steroids measuring, not bile estrogenicity. Estradiol measured in bile appears to be concentrated several thousand times when compared to results obtained on plasma (2500x Scott et al. 2006, 2500x Labadie and Hill 2006). For exogenous compounds there are few data linking plasmatic and bile concentrations. Smith and Hill (2004) have shown a bioconcentration factor between plasma and bile from 89 to 205 fold for NPEOs in roach and Ferreira and Hill (2001) a factor around 1000 for tert-octylphenol. These results indicate that exogenous estrogenic compounds can behave differently than endogenous steroids leaving a large degree of uncertainty on their exact concentration at the site of effect.

exogènes peuvent se comporter différemment des stéroïdes endogènes laissant un grand degré d'incertitude sur leur concentration exacte au site d'effet.

Evolution de la contamination

L'oestrogénicité de la bile et la concentration en VTG des flets prélevés en 2004-2005 étaient inférieures à celle des poissons échantillonnés en 2000-2001. Bien que ce résultat doit être pris avec prudence, il suggère l'occurrence d'un changement dans le niveau de contamination de l'estuaire de la Seine. Cette hypothèse est soutenue par les mesures des polluants dans les moules (*Mytilus edulis*). Johansson et al. (2006) ont montré une diminution des polybromodiphényléthers (PBDE) de 1995 à 2003 et des biphényles chlorés (PCB) de 1980 à 2003. En outre, ils signalent une augmentation passagère des concentrations en 2000-2001 associées à une concentration importante en matières en suspension et à des précipitations exceptionnelles. Ces événements ont pu aussi toucher les flets en 2000-2001. La diminution de la contamination au fil des ans, est également confirmée pour le PCB153, le DDT, les HAP et les métaux (Hg, Cd, Zn, Cu) par le réseau de surveillance côtier (RNO 2000,2005). La plupart de ces molécules sont en mesure d'agir comme des perturbateurs endocriniens. La baisse des concentrations a aussi été notée de façon spécifique pour les composés oestrogéniques. Une diminution des taux de VTG chez les flets mâles a été observée dans plusieurs estuaires du Royaume-Uni sur la période 1996-2001 (Kirby et al., 2004). Les auteurs décrivent une tendance à la baisse des niveaux de VTG, associée à une nette

Trends in estrogenic contamination

Flounder sampled in 2004-2005 had lower total bile estrogenic activity and lower plasma VTG than fish sampled in 2000-2001. Although this result should be taken with caution, this suggests that a change in the contamination level of the Seine river estuary occurred. This is supported by several long terms monitoring of pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). Johansson et al. (2006) have shown a decrease of polybrominated diphenyl ether (PBDE) from 1995 to 2003 and of chlorobiphenyls (PCBs) from 1980 to 2003. Moreover, they point the fact that unexpected increases were recorded in 2000-2001 and they linked it to an increase of suspended matter and water flow due to exceptional rainfall. A discharge of sediment-associated pollutants in 2000-2001 may have impacted flounders as well as mussels. The decrease of the contamination over the years is also confirmed for PCB153, DDT, PAHs and metals (Hg, Cd, Zn, Cu) by the French monitoring program for mussels' contamination (RNO 2000,2005). Most of these molecules have already been shown to be able to act as endocrine disrupters. Considering estrogenic compounds, improvement of water quality is noted in other European estuaries. Diminution of VTG induction in male flounders (*Platichthys flesus*) has been observed in several UK estuaries on the period 1996-2001 (Kirby et al., 2004). The authors describe a downward trend in VTG levels supported by a clear diminution of the proportion of males having abnormal VTG levels. One of the suggested factors is a general improvement of effluents treatment. Nevertheless, estrogenic

diminution de la proportion de poissons ayant des niveaux anormaux en VTG. L'un des facteurs suggéré pour expliquer cette évolution est une amélioration générale du traitement des effluents. Néanmoins, la contamination oestrogénique de l'estuaire de la Seine attestée par les mesures sur le flet reste élevée et reste susceptible d'engendrer des effets à long terme.

5.7. Conclusions

Cette étude montre que la contamination oestrogénique est élevée en estuaire de la Seine et conduit à des effets importants chez les flets mâles. Un mélange de stéroïdes naturels et synthétiques, de détergents (NP et NP-polyéthoxylates) mais aussi d'autres composés non identifiés semble être responsable des effets observés. Cette contamination s'ajoute à celle bien connue conduisant à la forte charge corporelle de polychlorobiphényles (PCB) ou de dichloro-diphényl-tetrachlorohexane (DDT) et de ses métabolites dans le flet (les concentrations moyennes sont respectivement de 1975 et 136 ng/g ww; Ifremer, 2007). Ainsi, ces toxiques de l'environnement peuvent affecter de façon importante le développement des poissons comme l'en atteste les index de condition et les taux de croissance réduits chez les adultes et jvénils de flets (Amara et al., 2007 ; Marchand et al., 2003 et 2004 ; chapitre suivant). Pris ensemble, ces données indiquent que les ressources biologiques pourraient être affectées durablement dans l'estuaire de la Seine.

contamination of the Seine estuary and Flounder living in the area remains high thus requiring further investigation to study long-term effects.

5.7. Conclusions

Estrogenic contamination revealed by this study was high in the Seine estuary and led to significant effects in male fish. A mixture of compounds including natural and synthetic steroids, detergents such as NP and NP-polyethoxylates but also other unidentified compounds seems to account for the observed results. The Seine estuary receive high amounts of contaminants as indicated by high body burden of polychlorobiphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyl-tetrachlorohexane (DDT) and its metabolites found in flounder living in the area (mean concentrations are respectively 1975 and 136 ng/g ww; Ifremer, 2007). Consequences from this contamination include reduced condition index and altered growth rate for both juvenile and adult flounder (Amara et al., 2007 Marchand et al., 2003 and 2004). Taken together these data indicate that living resources might be altered in the Seine estuary.

5.8. References

- Allard, A.-S., M. Gunnarsson and A. Svenson (2004). Estrogenicity in bile of juvenile rainbow trout as measure of exposure and potential effects of endocrine disruptors. *Environ Toxicol Chem* 23(5): 1187-1193.
- Allen, Y., P. Matthiessen, A. P. Scott, S. Haworth, S. Feist and J. E. Thain (1999). The Extent of Oestrogenic Contamination in the UK Estuarine and Marine Environments--Further Surveys of Flounder. *Sci Total Environ* 233(1-3): 5-20.
- Brion, F., F. Rogerieux, P. Noury, B. Migeon, P. Flammarion, E. Thybaud and J. M. Porcher (2000). Two-Step Purification Method of Vitellogenin from Three Teleost Fish Species: Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*), Gudgeon (*Gobio Gobio*) and Chub (*Leuciscus Cephalus*). *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 737(1-2): 3-12.
- Cachot, J., O. Geffard, S. Augagneur, S. Lacroix, K. Le Menach, L. Peluhet, J. Couteau, X. Denier, M. H. Devier, D. Pottier and H. Budzinski (2006). Evidence of Genotoxicity Related to High Pah Content of Sediments in the Upper Part of the Seine Estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79(3): 257-267.
- Cailleaud, K., J. Forget-Leray, S. Souissi, S. Lardy, S. Augagneur and H. Budzinski (2007). Seasonal Variation of Hydrophobic Organic Contaminant Concentrations in the Water-Column of the Seine Estuary and Their Transfer to a Planktonic Species *Eurytemora Affinis* (Calanoïd, Copepod). Part 2: Alkylphenol-Polyethoxylates. *Chemosphere* 70(2): 281-287.
- Craft, J. A., M. Brown, K. Dempsey, J. Francey, M. F. Kirby, A. P. Scott, I. Katsiadaki, C. D. Robinson, I. M. Davies, P. Bradac and C. F. Moffat (2004). Kinetics of Vitellogenin Protein and Mrna Induction and Depuration in Fish Following Laboratory and Environmental Exposure to Oestrogens. *Marine Environmental Research* 58(2-5): 419-423.
- De Metrio, G., A. Corriero, S. Desantis, D. Zubani, F. Cirillo, M. Deflorio, C. R. Bridges, J. Eicker, J. M. de la Serna, P. Megalofonou and D. E. Kime (2003). Evidence of a High Percentage of Intersex in the Mediterranean Swordfish (*Xiphias Gladius L.*). *Mar Pollut Bull* 46(3): 358-361.
- Denier, X., J. Couteau, M. Baudrimont, E. M. Hill, J. Rotchell and C. Minier (2008). In Vitro Study of the Effects of Cadmium on the Activation of the Estrogen Response Element Using the Yes Screen. *Mar Environ Res* 66(1): 108-110.
- Dick Vethaak, A., J. Lahr, R. V. Kuiper, G. C. M. Grinwis, T. R. Rankouhi, J. P. Giesy and A. Gerritsen (2002). Estrogenic Effects in Fish in the Netherlands: Some Preliminary Results. *Toxicology* 181-182: 147-150.
- Emmerson, J., B. Korsgaard and I. Petersen (1979). Dose Response Kinetics of Serum Vitellogenin, Liver DNA, Rna, Protein and Lipid after Induction by Estradiol-17 Beta in Male Flounders (*Platichthys Flesus L.*). *Comp Biochem Physiol B* 63(1): 1-6.
- Ferreira, M., P. Antunes, O. Gil, C. Vale and M. A. Reis-Henriques (2004). Organochlorine Contaminants in Flounder (*Platichthys Flesus*) and Mullet (*Mugil Cephalus*) from Douro Estuary, and Their Use as Sentinel Species for Environmental Monitoring. *Aquatic Toxicology* 69(4): 347-357.
- Ferreira-Leach, A. M. and E. M. Hill (2001). Bioconcentration and Distribution of 4-Tert-Octylphenol Residues in Tissues of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). *Mar Environ Res* 51(1): 75-89.
- George, S., M. Gubbins, A. MacIntosh, W. Reynolds, V. Sabine, A. Scott and J. Thain (2004). A Comparison of Pollutant Biomarker Responses with Transcriptional Responses in European Flounders (*Platichthys Flesus*) Subjected to Estuarine Pollution. *Marine Environmental Research* 58(2-5): 571-575.
- George, S., M. Gubbins, A. MacIntosh, W. Reynolds, V. Sabine, A. Scott and J. Thain (2004). A Comparison of Pollutant Biomarker Responses with Transcriptional Responses in European Flounders (*Platichthys Flesus*) Subjected to Estuarine Pollution. *Mar Environ Res* 58(2-5): 571-575.
- Gibson, R., M. D. Smith, C. J. Spary, C. R. Tyler and E. M. Hill (2005). Mixtures of Estrogenic Contaminants in Bile of Fish Exposed to Wastewater Treatment Works Effluents. *Environ Sci Technol* 39(8): 2461-2471.
- Gibson, R., C. R. Tyler and E. M. Hill (2005). Analytical Methodology for the Identification of Estrogenic Contaminants in Fish Bile. *J Chromatogr A* 1066(1-2): 33-40.

- Hashimoto, S., H. Bessho, A. Hara, M. Nakamura, T. Iguchi and K. Fujita (2000). Elevated Serum Vitellogenin Levels and Gonadal Abnormalities in Wild Male Flounder (*Pleuronectes Yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environmental Research* 49(1): 37-53.
- Hecker, M., C. R. Tyler, M. Hoffmann, S. Maddix and L. Karbe (2002). Plasma Biomarkers in Fish Provide Evidence for Endocrine Modulation in the Elbe River, Germany. *Environ Sci Technol* 36(11): 2311-2321.
- Houtman, C. J., A. M. Van Oostveen, A. Brouwer, M. H. Lamoree and J. Legler (2004). Identification of Estrogenic Compounds in Fish Bile Using Bioassay-Directed Fractionation. *Environ Sci Technol* 38(23): 6415-6423.
- Ifremer (Institut Français pour l'Exploitation de la Mer) 2007. Niveaux de concentration dans les produits de la pêche côtière française atlantique. Data available at <http://www.ifremer.fr/envlit/>.
- Johansson, I., K. Heas-Moisan, N. Guiot, C. Munsch and J. Tronczynski (2006). Polybrominated Diphenyl Ethers (Pbdes) in Mussels from Selected French Coastal Sites: 1981-2003. *Chemosphere* 64(2): 296-305.
- Kirby, M. F., Y. T. Allen, R. A. Dyer, S. W. Feist, I. Katsiadaki, P. Matthiessen, A. P. Scott, A. Smith, G. D. Stentiford, J. E. Thain, K. V. Thomas, L. Tolhurst and M. J. Waldock (2004). Surveys of Plasma Vitellogenin and Intersex in Male Flounder (*Platichthys Flesus*) as Measures of Endocrine Disruption by Estrogenic Contamination in United Kingdom Estuaries: Temporal Trends, 1996 to 2001. *Environmental Toxicology and Chemistry*: 748-758.
- Kirby, M. F., Y. T. Allen, R. A. Dyer, S. W. Feist, I. Katsiadaki, P. Matthiessen, A. P. Scott, A. Smith, G. D. Stentiford, J. E. Thain, K. V. Thomas, L. Tolhurst and M. J. Waldock (2004). Surveys of Plasma Vitellogenin and Intersex in Male Flounder (*Platichthys Flesus*) as Measures of Endocrine Disruption by Estrogenic Contamination in United Kingdom Estuaries: Temporal Trends, 1996 to 2001. *Environ Toxicol Chem* 23(3): 748-758.
- Kirby, M. F., A. J. Smith, J. Barry, I. Katsiadaki, B. Lyons and A. P. Scott (2006). Differential Sensitivity of Flounder (*Platichthys Flesus*) in Response to Oestrogenic Chemical Exposure: An Issue for Design and Interpretation of Monitoring and Research Programmes. *Mar Environ Res* 62(4): 315-325.
- Kleinkauf, A., A. P. Scott, C. Stewart, M. G. Simpson and R. T. R. T. Leah (2004). Abnormally Elevated Vtg Concentrations in Flounder (*Platichthys Flesus*) from the Mersey Estuary (UK)--a Continuing Problem. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 58(3): 356-364.
- Korsgaard, B., J. Emmersen and I. Petersen (1983). Estradiol-Induced Hepatic Protein Synthesis and Transaminase Activity in the Male Flounder, *Platichthys Flesus* (L.). *Gen Comp Endocrinol* 50(1): 11-17.
- Labadie, P. and H. Budzinski (2005). Development of an Analytical Procedure for Determination of Selected Estrogens and Progestagens in Water Samples. *Anal Bioanal Chem* 381(6): 1199-1205.
- Labadie, P. and H. Budzinski (2006). Alteration of Steroid Hormone Profile in Juvenile Turbot (*Psetta Maxima*) as a Consequence of Short-Term Exposure to 17alpha-Ethinylestradiol. *Chemosphere* 64(8): 1274-1286.
- Labadie, P. and E. M. Hill (2007). Analysis of Estrogens in River Sediments by Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Comparison of Tandem Mass Spectrometry and Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1141(2): 174-181.
- Labadie, P., M. Peck, C. Minier and E. M. Hill (2007). Identification of the Steroid Fatty Acid Ester Conjugates Formed in Vivo in *Mytilus Edulis* as a Result of Exposure to Estrogens. *Steroids* 72(1): 41-49.
- Legler, J., A. Jonas, J. Lahr, A. D. Vethaak, A. Brouwer and A. J. Murk (2002). Biological Measurement of Estrogenic Activity in Urine and Bile Conjugates with the in Vitro Er-Calux Reporter Gene Assay. *Environ Toxicol Chem* 21(3): 473-479.
- Lye, C. M., C. L. J. Frid, M. E. Gill and D. McCormick (1997). Abnormalities in the Reproductive Health of Flounder *Platichthys Flesus* Exposed to Effluent from a Sewage Treatment Works. *Marine Pollution Bulletin* 34(1): 34-41.
- Madsen, L. L., B. Korsgaard and P. Bjerregaard (2002). 4-Tert-Octylphenol and 17beta-Estradiol Applied by Feeding to Flounder *Platichthys Flesus*: Induction of Vitellogenin and Accumulation in Tissues. *Mar Environ Res* 54(3-5): 729-733.

- Madsen, L. L., B. Korsgaard and P. Bjerregaard (2003). Estrogenic Effects in Flounder *Platichthys Flesus* Orally Exposed to 4-Tert-Octylphenol. *Aquatic Toxicology* 64(4): 393-405.
- Madsen, L. L., B. Korsgaard and P. Bjerregaard (2006). Oral Single Pulse Exposure of Flounder *Platichthys Flesus* to 4-Tert-Octylphenol: Relations between Tissue Levels and Estrogenic Effects. *Mar Environ Res* 61(3): 352-362.
- Marchand, J., A. Tanguy, J. Laroche, L. Quiniou and D. Moraga. 2003. Responses of European flounder *Platichthys flesus* populations to contamination in different estuaries along the Atlantic coast of France. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 260: 273–284.
- Marchand, J., L. Quiniou, R. Riso, M.-T. Thebaut and J. Laroche (2004). Physiological Cost of Tolerance to Toxicants in the European Flounder *Platichthys Flesus*, Along the French Atlantic Coast. *Aquat Toxicol* 70(4): 327-343.
- Martin-Skilton, R., R. Lavado, R. Thibaut, C. Minier and C. Porte (2006). Evidence of Endocrine Alteration in the Red Mullet, *Mullus Barbatulus* from the Nw Mediterranean. *Environ Pollut* 141(1): 60-68.
- Matthiessen, P. and R. J. Law (2002). Contaminants and Their Effects on Estuarine and Coastal Organisms in the United Kingdom in the Late Twentieth Century. *Environ Pollut* 120(3): 739-57.
- Matthiessen, P. and J. P. Sumpter (1998). Effects of Estrogenic Substances in the Aquatic Environment. *Exs* 86: 319-35.
- Mills, L. J. and C. Chichester (2005). Review of Evidence: Are Endocrine-Disrupting Chemicals in the Aquatic Environment Impacting Fish Populations? *Sci Total Environ* 343(1-3): 1-34.
- Minier, C., A. Abarnou, A. Jaouen-Madoulet, A.-M. Le Guellec, R. Tutundjian, G. Bocquene and F. Leboulenger (2006). A Pollution-Monitoring Pilot Study Involving Contaminant and Biomarker Measurements in the Seine Estuary, France, Using Zebra Mussels (*Dreissena Polymorpha*). *Environ Toxicol Chem* 25(1): 112-119.
- Minier, C., F. Levy, D. Rabel, G. Bocquené, D. Godefroy, T. Burgeot and F. Leboulenger (2000). Flounder Health Status in the Seine Bay. A Multibiomarker Study. *Marine Environmental Research* 50(1-5): 373-377.
- Ohkubo, N., K. Mochida, S. Adachi, A. Hara, K. Hotta, Y. Nakamura and T. Matsubara (2003). Development of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Two Forms of Vitellogenin in Japanese Common Goby (*Acanthogobius Flavimanus*). *Gen Comp Endocrinol* 131(3): 353-364.
- Peck, M. R., P. Labadie, C. Minier and E. M. Hill (2007). Profiles of Environmental and Endogenous Estrogens in the Zebra Mussel *Dreissena Polymorpha*. *Chemosphere* 69(1): 1-8.
- Pedersen, R. T. and E. M. Hill (2000). Identification of Novel Metabolites of the Xenoestrogen 4-Tert-Octylphenol in Primary Rat Hepatocytes. *Chem Biol Interact* 128(3): 189-209.
- Pedersen, R. T. and E. M. Hill (2002). Tissue Distribution and Depuration of 4-Tert-Octylphenol Residues in the Cyprinid Fish, *Scardinius Erythrophthalmus*. *Environ Sci Technol* 36(15): 3275-3283.
- Puinean, A. M., P. Labadie, E. M. Hill, M. Osada, M. Kishida, R. Nakao, A. Novillo, I. P. Callard and J. M. Rotchell (2006). Laboratory Exposure to 17[Beta]-Estradiol Fails to Induce Vitellogenin and Estrogen Receptor Gene Expression in the Marine Invertebrate *Mytilus Edulis*. *Aquatic Toxicology* 79(4): 376-383.
- Routledge, E. J. and J. P. Sumpter (1996). Estrogenic Activity of Surfactants and Some of Their Degradation Products Assessed Using a Recombinant Yeast Screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 241-248.
- Scott, A. P., I. Katsiadaki, M. F. Kirby and J. Thain (2006). Relationship between Sex Steroid and Vitellogenin Concentrations in Flounder (*Platichthys Flesus*) Sampled from an Estuary Contaminated with Estrogenic Endocrine-Disrupting Compounds. *Environ Health Perspect* 114 Suppl 1: 27-31.
- Smith, M. D. and E. M. Hill (2004). Uptake and Metabolism of Technical Nonylphenol and Its Brominated Analogues in the Roach (*Rutilus Rutilus*). *Aquat Toxicol* 69(4): 359-369.
- Sumpter, J. P. (1995). Feminized Responses in Fish to Environmental Estrogens. *Toxicology Letters* 82-83: 737-742.
- Tyler, C. R., C. Spary, R. Gibson, E. M. Santos, J. Shears and E. M. Hill (2005). Accounting for Differences in Estrogenic Responses in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*: Salmonidae) and Roach (*Rutilus Rutilus*: Cyprinidae) Exposed to Effluents from Wastewater Treatment Works. *Environ Sci Technol* 39(8): 2599-2607.

- Vermeirssen E.L.M., O. Korner, R. Schonenberger, M. J. F. Suter and P. Burkhardt-Holm (2005). Characterization of Environmental Estrogens in River Water Using a Three Pronged Approach: Active and Passive Water Sampling and the Analysis of Accumulated Estrogens in the Bile of Caged Fish. *Environ Sci Technol* 39(21): 8191-8198.
- Vethaak, A. D., J. Lahr, R. V. Kuiper, G. C. M. Grinwis, T. R. Rankouhi, J. P. Giesy and A. Gerritsen (2002). Estrogenic Effects in Fish in the Netherlands: Some Preliminary Results. *Toxicology* 181-182: 147-150.
- Vethaak, A. D., J. Lahr, S. M. Schrap, A. C. Belfroid, G. B. J. Rijs, A. Gerritsen, J. de Boer, A. S. Bulder, G. C. M. Grinwis and R. V. Kuiper (2005). An Integrated Assessment of Estrogenic Contamination and Biological Effects in the Aquatic Environment of the Netherlands. *Chemosphere* 59(4): 511-524.
- Vigano, L., A. Mandich, E. Benfenati, R. Bertolotti, S. Bottero, E. Porazzi and E. Agradi (2006). Investigating the Estrogenic Risk Along the River Po and Its Intermediate Section. *Arch Environ Contam Toxicol* 51(4): 641-651.
- Vine, E., J. Shears, R. van Aerle, C. R. Tyler and J. P. Sumpter (2005). Endocrine (Sexual) Disruption Is Not a Prominent Feature in the Pike (*Esox Lucius*), a Top Predator, Living in English Waters. *Environ Toxicol Chem* 24(6): 1436-1443.

6. CROISSANCE ET CONDITION DES JUVENILES DU GROUPE-0 DE FLET, *PLATICHTHYS FLESUS* COMME INDICATEUR DE LA QUALITE DES HABITATS ESTUARIENS

6.1 Résumé

Le but de la présente étude est d'utiliser les taux de croissance, le rapport de RNA-DNA et l'indice morphométrique (K) de Fulton mesuré sur les juvéniles de flet du groupe 0, afin de comparer la qualité des habitats des nurseries estuariennes. L'estuaire de Seine, fortement anthropisé et l'un des plus pollués d'Europe, a été comparé à deux petits estuaires considérés comme peu anthropisés (peu d'effluents domestiques, agricoles et industriels). Des indicateurs de l'anthropisation (contaminants chimiques du sédiment) ainsi que des données biotiques (abondances de macrobenthos) ont été utilisés pour établir des différences inter-estuariennes de la qualité environnementale. L'abondance du macrobenthos (proies potentielles pour les juvéniles) est élevée et n'est pas significativement différente entre les trois estuaires, confirmant le rôle important joué par les estuaires en tant que zone d'alimentation. Les concentrations en métal du sédiment (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) étaient sensiblement plus élevées dans la Seine que dans les estuaires de la Canche et de l'Authie. La croissance de l'otolithe étant étroitement liée à la croissance somatique des poissons, nous avons employé la largeur des incréments journaliers de l'otolithe au cours des 10 derniers jours avant capture comme indicateur de la croissance récente des flets du groupe 0 (RG). RG n'a pas varié de manière significative entre les flets

6. GROWTH AND CONDITION OF 0-GROUP EUROPEAN FLOUNDER, *PLATICHTHYS FLESUS* AS INDICATOR OF ESTUARINE HABITAT QUALITY

6.1 Abstract

The purpose of the present study was to use the growth rates, RNA-DNA ratio and morphometric (Fulton's K) condition indices measured on 0-group juveniles European flounder, as a means of comparing the quality of estuarine nursery habitats. The Seine estuary, heavily impacted by manmade modifications and one of the most contaminated in Europe, was compared to two small estuaries considered as clean (low domestic, agricultural and industrial effluents). Indicators of human disturbance (sediment chemical contaminants) as well as biotic data (macrobenthos abundances) were used to establish between-site differences in environmental quality. The abundance of macrobenthos (potential preys for juvenile) was high and not significantly different among the three estuaries confirming the important role played by estuaries as feeding grounds. Sediment metal concentrations (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) were significantly higher in the Seine than in the Canche and Authie estuaries. Otolith growth was closely related to somatic fish growth, and we used daily otolith increments from the last 10 days before capture as an indicator of 0-group flounder recent growth (RG). RG did not vary significantly among flounders from the Canche and Authie estuaries and individuals from the Seine had slower RG. RNA-DNA and K values

des estuaires de la Canche et de l'Authie alors que les individus de la Seine ont présenté un RG plus faible. Les valeurs du rapport ARN-ADN et de K étaient également significativement inférieures chez les individus de la Seine comparés à ceux de l'Authie ou de la Canche. La pollution (par exemple la contamination métallique) est la cause la plus probable des différences de croissance et de condition observées entre les estuaires. Les résultats de cette étude renforcent l'hypothèse que la croissance et la condition des poissons peuvent être utiles pour évaluer la qualité des habitats aquatiques puisqu'elles intègrent l'effet de multiples facteurs.

6.1 Introduction

De nombreux auteurs ont souligné l'importance des estuaires et des habitats côtiers marins peu profonds comme nourriceries pour des poissons, ainsi que leur rôle à soutenir les stocks en mer d'espèces économiquement importantes (Beck et al., 2001, 2001 ; Gillanders et al., 2003 ; Amara et Paul, 2003). En dépit de leur importance écologique, les estuaires sont parmi les environnements aquatiques les plus modifiés et les plus menacés (Blaber et al., 2000). Avec 60% de la population mondiale vivant le long du littoral, ces secteurs sont soumis à une pression anthropique croissante, en particulier par des pollutions aiguës et chroniques induisant une pression croissante sur les organismes. La pollution dans les estuaires est considérée un problème environnemental critique en raison de la variation élevée de plusieurs facteurs abiotiques qui imposent des restrictions graves aux organismes vivant dans ces écosystèmes (Matthiessen & Law, 2002 ; Amado et al., 2006).

were also significantly lower in individuals from Seine compared to those of the Authie or the Canche. Pollution (e.g. metal contaminants) is the most likely cause of growth and condition differences among estuaries. The results of this study strengthen the hypothesis that habitat specific fish growth and condition can be considered as useful proxy for habitat quality since they integrate the effect of multiple factors.

6.2 Introduction

Many authors have emphasized the importance of estuaries and shallow marine coastal habitats as nursery for fish, and their role in supporting the offshore stocks of economically valuable species (Beck et al., 2001; Gillanders et al., 2003; Amara & Paul, 2003). Despite their ecological importance, estuaries are amongst the most modified and threatened aquatic environments (Blaber et al., 2000). With 60% of the worldwide population living along the coastline, these areas are submitted to a growing anthropogenic pressure, particularly through acute and chronic pollutions inducing an increasing pressure on organisms. Pollution in estuarine environments is considered a critical environmental issue because of the high variation in several abiotic factors that impose severe restrictions to organisms living in these areas (Matthiessen & Law, 2002; Amado et al., 2006). As a consequence, the essential nursery function

Par conséquent, la fonction essentielle de nourricerie des estuaires peut être réduite par ces perturbations anthropiques (Gibson, 1994 ; Cabral et al. 2001 ; Whitfield et Elliott, 2002 ; Le Pape et al., 2007). La nécessité de protéger ces habitats essentiels existe et il faut par conséquent développer des indicateurs pour estimer leur qualité.

Les gestionnaires de l'environnement intéressés par l'évaluation de la qualité des écosystèmes aquatiques ont approuvé des approches de gestion basées sur des indicateurs. Ces indicateurs incluent typiquement des mesures physiques, chimiques ou biologiques. Les indicateurs biotiques, en intégrant l'effet des changements à travers une grande sélection de facteurs environnementaux, sont de bons indicateurs de l'état de santé des écosystèmes aquatiques (Adams, 2002). Les études de poissons sont importantes pour l'évaluation de la qualité de l'eau et les évaluations des impacts humains en estuaires (Elliott et al., 1988 ; Whitfield et Elliott, 2002). Par exemple, en tant qu'éléments de la directive-cadre européenne de l'eau (WFD - 2000/60/EC directive), des poissons sont utilisés pour établir le statut écologique de qualité des eaux transitionnelles. On assume que des habitats de nourricerie de qualité sont ceux où la croissance, l'état et la survie des poissons juvéniles sont élevés (Gibson, 1994). Par conséquent, des évaluations de la croissance et l'état de condition de jeunes poissons ont été employés comme des moyens d'évaluer les effets des facteurs environnementaux sur des individus afin d'apprécier la qualité de leur habitat (Phelan et al., 2000 ; Amara et al., 2007 ; Vinagre et al., 2008). On a pu observer des différences dans des taux de croissance de poissons

of estuarine areas may be reduced by these anthropogenic disturbances (Gibson, 1994; Cabral et al., 2001; Whitfield & Elliott, 2002; Le Pape et al., 2007). The need, to protect these essential habitats exists and hence to develop indicators to estimate their quality.

Many policy and management authorities interested in evaluating the quality of aquatic systems have endorsed indicator-based approaches to management. Indicators have typically included physical, chemical or biological measures. Biotic indicators, by integrating the effect of changes across a wide array of environmental factors, are good indicators of aquatic ecosystem health (Adams, 2002). Fish studies are important for estuarine water quality evaluation and assessments of human impacts (Elliott et al., 1988; Whitfield & Elliott, 2002). For example, as part of the European Water Framework Directive (WFD – Directive 2000/60/EC), fish are used to establish the ecological quality status of transitional waters. High quality nursery habitats are assumed to be those where growth, condition and survival of juvenile fish are enhanced (Gibson, 1994). Hence, estimations of growth and condition of young fish have been used as a means to assess the effects of environmental stressors on individuals in order to appreciate their habitat quality (Phelan et al., 2000; Amara et al., 2007; Vinagre et al., 2008). Differences in fish growth rates have been observed along an anthropogenic gradient (Burke et al., 1993; Meng et al., 2001) and between coastal areas with differing levels of nutrients and human development (Able et al., 1999; Meng et al., 2000). Recently, the use of enclosures and

le long d'un gradient anthropogénique (Burke et al, 1993 ; Meng et al, 2001) et entre les régions côtières avec des niveaux différents de nutriments et de développement humain (Able et al , 1999 ; Meng et al, 2000). Récemment, l'utilisation des cages et de juvéniles de flet individuellement marqués a été utilisée avec succès pour estimer la croissance locale, à partir de laquelle la qualité de différents habitats a été estimée (Tarpgaard et al, 2005). L'évaluation de la qualité d'habitat pour les juvéniles de poissons inclus également souvent l'abondance de la nourriture en tant qu'une des variables principales, fondée sur l'hypothèse que les habitats avec une abondance élevée de proie soutiendront des taux de croissance élevés et mèneront généralement à meilleure survie (Gibson, 1994 ; Van der Veer et al, 1994). Seulement peu d'études ont comparé les taux de croissance des juvéniles de poissons dans divers habitats estuariens (Sogard, 1992 ; Phelan et al, 2000 ; Stunz et al, 2002), et ces études se sont concentrées sur les taux de croissance des poissons présents dans les habitats avec et sans végétation.

Le long de la côte de la Manche orientale se trouvent plusieurs estuaires mégatidaux. Ces estuaires fonctionnent comme des zones de nourriceries essentielles pour de nombreuses espèces de poissons commercialement importantes, (Selleslagh et Amara, 2008). Contrairement aux petits estuaires du secteur (par exemple Authie et Canche) qui sont considérés comme relativement propres (peu d'effluents domestiques, agricoles et industriels), l'estuaire de Seine est fortement affecté par des modifications anthropiques et est l'un des plus pollués en Europe (Dourou et al, 2007). Les analyses chimiques réalisées dans le sédiment et le

individuellement marqués juvéniles de flet ont été employées avec succès pour estimer la croissance locale, à partir de laquelle la qualité de différents habitats a été estimée (Tarpgaard et al., 2005). L'évaluation de la qualité d'habitat pour les juvéniles de poissons inclus également souvent l'abondance de la nourriture en tant qu'une des variables principales, fondée sur l'hypothèse que les habitats avec une abondance élevée de proie soutiendront des taux de croissance élevés et mèneront généralement à meilleure survie (Gibson, 1994; Van der Veer et al., 1994). Only limited data are available to compare the growth rates of juvenile fishes among various estuarine habitats (Sogard, 1992; Phelan et al., 2000; Stunz et al., 2002), and these studies have focused on growth rates between vegetated and non vegetated habitat types.

The coast of the eastern part of the English Channel in North-Western France is bordered by several megatidal estuaries. These estuaries function as vital nursery grounds for numerous commercially important fish species, (Selleslagh & Amara, 2008). In contrast to the small estuaries of the areas (e.g. Authie and Canche) which are considered as clean (low domestic, agricultural and industrial effluents), the Seine estuary is heavily impacted by manmade modifications and is one of the most contaminated in Europe (Dourou et al., 2007). Previous chemical analyses in sediment and biota confirm the contrast between these two groups of estuaries (Dourou et al., 2007). The Seine estuary environment is contaminated with a complex mixture of chemical compounds (Munsch et al., 1997).

The purpose of this paper is to examine whether or not marked differences in anthropogenic disturbance decreased the estuarine

biota confirment le contraste entre ces deux groupes d'estuaires (Durou et al, 2007). L'environnement de l'estuaire de la Seine est pollué avec un mélange complexe de composés chimiques (Munsch et al, 1997).

Le but de ce travail est d'examiner si les différences marquées de perturbation anthropogénique ont diminué la qualité des habitats estuariens pour les juvéniles de poissons. Nous avons employé 3 indices différents (taux de croissance, rapport RNA-DNA et indice morphométriques de condition) mesurés sur des juvéniles de l'année (YOY) pour déterminer des différences de qualité d'habitat parmi 3 estuaires (Seine, Authie et Canche). Le flet européen (*Platichthys flesus*) a été choisi pour l'étude parce qu'il est l'une des composantes la plus importante de l'assemblage de poissons démersal dans les estuaires européens. Le long de la côte française de la Manche orientale, pendant les premiers mois suivant leur métamorphose, les juvéniles de flet sont concentrés dans des eaux de faible salinité dans la partie amont de l'estuaire (Selleslagh et Amara, 2008). Le flet européen est l'une des espèces la plus utilisée pour le contrôle de la qualité environnement des milieux aquatiques en France et dans les eaux européennes (Minier et al, 2000 ; Marchand et al, 2003 ; Kirby et al, 2004). Les juvéniles de poissons plats qui utilisent les habitats peu profonds et les estuaires comme zones de nourriceries peuvent être particulièrement sensibles aux effets de la pollution et à divers types de dégradations d'habitat, puisqu'ils s'alimentent de proies benthiques et vivent en association étroite avec les sédiments, là où la plupart des contaminants chimiques s'accumulent (Adams,

habitat quality for juvenile fish. We used 3 different indices (growth rates, RNA-DNA ratio and morphometric condition indices) measured on young-of-the-year (YOY) juveniles to test for habitat quality differences among 3 estuaries (Seine, Authie and Canche). The European flounder (*Platichthys flesus*) was selected for the study because it is one of the most important component of the demersal fish assemblage in European estuarine waters. Along the French coast of the Eastern English Channel (EEC) flounder juveniles are concentrated in low salinity habitats in estuaries during the first months following their settlement (Selleslagh & Amara, 2008). These low salinity habitats have been described as nursery grounds for juveniles flounder (Bos & Thiel, 2006). The European flounder is a species commonly used for environmental monitoring and toxicology studies in France and northern European waters (Minier et al., 2000; Marchand et al., 2003; Kirby et al., 2004). Juvenile flatfishes that use nearshore habitats as nursery grounds may be particularly sensitive to the effects of pollution and other types of habitat degradation, since they feed on benthic organisms and live in close association with the bottom sediments, where most of the chemicals introduced into aquatic environments by human activities accumulate (Adams, 2002). At the same time, indices of environmental quality were used as indicators of human disturbance. Sediment were collected at and near the flounder sampling areas and analysed for metal pollutants and macrobenthos abundances (potential available food). The prey composition of juvenile flounder was compared among the 3

2002). En même temps, des indices de la qualité environnementale ont été utilisés comme indicateurs de la perturbation anthropique. Les teneurs en contaminants métalliques des sédiments et les abondances de macro-benthos (nourriture disponible potentielle) ont été analysées. La composition des proies des juvéniles de flet a été comparée entre les 3 estuaires.

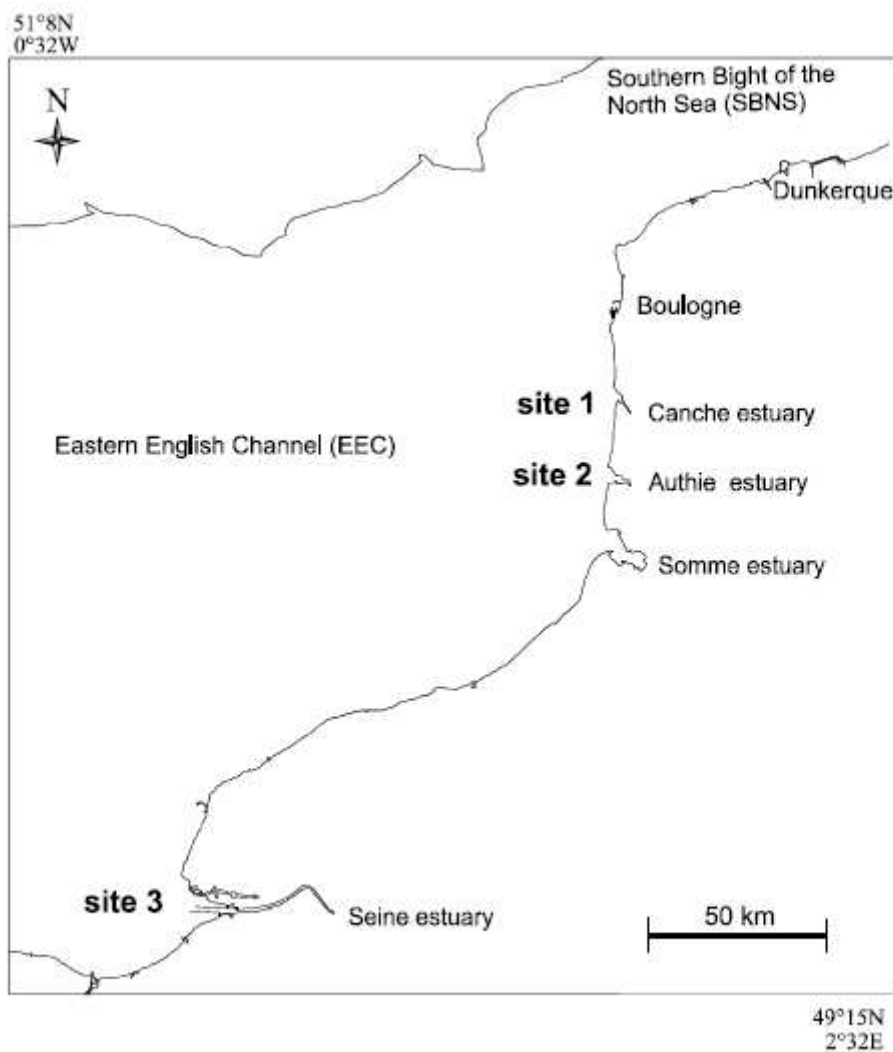


Figure 1. Localisation des 3 estuaires où les juvéniles du groupe-0 de flet ont été échantillonnés / Locations of the 3 estuarine sites where 0-group flounder were collected.

6.3. Méthodes

6.3.1. Zone d'étude et prélèvement

Le secteur d'études est situé le long de la côte française de la Manche orientale. Trois estuaires ont été étudiés : Seine, Authie et Canche (fig. 1). Ces estuaires sont caractérisés par une marée semi-diurne et un régime macrotidal avec une gamme de marée moyenne de 5-8m. L'Authie et le Canche sont des petits estuaires (12.8 et 7.8 km² respectivement) avec un faible apport d'eau douce (11 et 7 m³.s⁻¹ dans Authie et la Canche, respectivement). Ces deux estuaires ne sont affectés par aucune activité humaine importante et sont considérés comme estuaires propres (Durou et al, 2007 ; Amara et al, 2007). L'estuaire de Seine est le plus grand estuaire megatidale dans la Manche, couvrant approximativement 150 km² à marée haute. Les apports d'eau douce dans celui-ci (moyen : 500 m³.s⁻¹) viennent principalement du fleuve de la Seine et varient de façon saisonnière d'un maximum de 2200 m³.s⁻¹ en hiver à 50-100 m³.s⁻¹ au minimum en été. Avec une population de 16 millions d'habitants, dont 80% vivant en zones urbaines, le bassin de la Seine (78650 km²) concentre 40% de l'activité économique de la France et 50% du trafic de fleuve. Ainsi, les entrées de polluant sont très importantes dans l'estuaire de Seine. En plus des perturbations résultantes des modifications humaines (Dauvin et al, 2006), des niveaux élevés en polluants métalliques, en particulier cadmium et plomb, font de l'estuaire de Seine l'un des plus pollués en Europe (Chiffolleau, 2001).

Les juvéniles de flet ont été échantillonnés au

6.3. Materials and methods

6.3.1. Study area and sampling

The study area was located along the French coast of the eastern English Channel. Three estuaries were investigated: Seine, Authie and Canche (Fig. 1). These estuaries are characterized by a semi-diurnal and macrotidal regime with an average tidal range of 5-8 m. Hydrodynamics are heavily influenced by the tide, which can reach nearly 8-10 m in magnitude during the spring tides.

The Authie and the Canche are small estuaries (12.8 and 7.8 km² respectively) with small freshwater input (11 and 7 m³.s⁻¹ in Authie and Canche, respectively). These two estuaries are not impacted by any important human activity and are considered as clean estuaries (Durou et al., 2007; Amara et al., 2007). The Seine estuary is the largest megatidal estuary in the English Channel, covering approximately 150 km² at high tide. The freshwater discharge into the estuary (mean: 500 m³.s⁻¹) comes mainly from the Seine River and varies seasonally from a maximum of 2200 m³.s⁻¹ in winter to a minimum of 50-100 m³.s⁻¹ in summer. With a population of 16 million inhabitants, 80% of whom live in urban areas, the Seine basin (78650 km²) concentrates 40% of the economic activity of France and 50% of the river traffic. Thus, pollutant inputs are very important in the Seine estuary. In addition to the disturbances resulting from manmade modifications of the estuary (Dauvin et al., 2006), high levels of metal pollutants, particularly cadmium and lead, make the Seine

printemps (fin mai-juin) 2005 dans la zone oligohaline (salinité entre 0 et 5). Le prélèvement a été effectué en utilisant un chalut à perche de 1.5 m, avec une maille de 5 millimètres à l'extrémité, remorquée par un zodiaque contre le courant à 2 noeuds pendant 15 mn. Juste après le prélèvement, les flets du groupe 0 (100 individus de longueur totale entre 22 et 60 millimètres, TL) ont été triés à bord et individuellement isolés dans des fioles puis fixés dans de l'azote liquide pour des analyses ultérieures. Au laboratoire, les échantillons ont été transférés dans un congélateur à -80°C jusqu'à l'analyse.

6.3.2. *Variables environnementales et contamination chimique*

L'abondance du macrobenthos a été utilisée comme indicateur de l'environnement trophique pour chaque site étudié. Dans les estuaires d'Authie et de Canche, quatre stations situées dans les secteurs où des juvéniles de flet ont été capturées ont été prélevées au printemps 2007. À chaque station, des échantillons de sédiment ont été prélevés utilisant une benne Van Veen (prélevant une surface d'environ 250 cm² à une profondeur de sédiment de ~ 10cm). Les échantillons ont été préservés dans des sachets en plastique et transportés au laboratoire. Les échantillons de sédiment pour le macrobenthos ont été lavés et tamisés sur une maille de 1 millimètre. Tous les organismes retenus sur le tamis ont été rassemblés, colorés avec le Rose Bengale et préservés dans la solution tampon de formaldéhyde à 5 % pour l'identification des espèces. Les échantillons de macrobenthos ont été analysés

estuary one of the most contaminated in Europe (Chiffolleau, 2001).

Juveniles flounder were collected in spring (late May-June) 2005 in the oligohaline zone (salinity between 0 and 5). Sampling was performed using a 1.5 m beam trawl, with one tickler chain and 5 mm mesh size in the cod end, towed by a zodiac against the current at 2 knots for 15 min. Immediately after sampling, 0-group flounders (100 individuals between 22 and 60 mm total length, TL) were sorted alive on board and individually isolated in vials and fixed in liquid nitrogen for later analyses. In the laboratory, the samples were transferred to a -80°C freezer until analysis.

6.3.2. *Environmental variables and chemical contamination*

Macrobenthos abundance was used as a trophic indicator of the environment for each site studied. In the Authie and Canche estuaries, four stations located in the areas where flounder juveniles were caught were sampled in spring 2007 in each estuary. At each station, sediment samples were collected using a Van Veen grab (sampling an area of about 250 cm² to a sediment depth of ~ 10cm). Samples were preserved in plastic bags and transported to laboratory. Sediment samples for macrobenthos were washed and sieved through a 1 mm mesh in the laboratory. All organisms retained on the sieve were collected, stained with Rose Bengal and preserved in 5% formaldehyde buffer for subsequent identification. Macrobenthos samples were analyzed up to species level using a binocular microscope. Those organisms, which

jusqu'au niveau de l'espèce en utilisant un microscope binoculaire. Les organismes macrobenthiques ont été comptés et les abondances ont été exprimées en nombre d'individus par m². Pour l'estuaire de Seine, les données sur l'abondance de macrobenthos viennent d'une base de données appelée Macrobenthos (MABES) - (disponible auprès de l'administrateur des données du GIP Seine Aval : nbacq@seine-aval.fr). Les données que nous avons employées proviennent du prélèvement de 2006 réalisé avec une benne Smith McIntyre (voir Ruellet et Dauvin, 2007).

Les concentrations en polluants métalliques (Zn, Cu, Cd, Pb, Al, Cr, Fe, Mn, Ti) dans les sédiments de surface ont été mesurées. A marée basse les sédiments ont été prélevés en utilisant une spatule de teflon, précédemment lavée avec la solution diluée d'acide chlorhydrique et rincée abondamment avec de l'eau Milli-Q. Les échantillons de sédiment ont été mis dans des sacs en polyéthylène et stockés dans une boîte de glace. Au laboratoire, les sédiments ont été séchés à la température ambiante pendant 48 heures. 200 mg de sédiments secs ont été traités avec de l'acide fluorhydrique concentré de grande pureté (Prolabo, normapur) suivi d'un aqua regia d'acides hydrochlorhydric + nitriques [(ultrapur), 3:1 v:v]. Le mélange était une deuxième fois partiellement évaporé et les solutions récupérées ont été diluées dans un volume connu d'eau MilliQ et analysées utilisant la spectroscopie d'émission atomique inductivement couplée de plasma (pro, axiale vue d'ICP-AES, de Varian, de Vista) pour Al, Fe, Mn, Ti, Cu, Cr, et Zn, et l'usage du spectromètre de masse inductivement couplé de plasma (ICP-MS, élémentaire thermo de série de X) pour le Cd et le

cannot be identified to species level, were classified in the generic level or up to the lowest taxonomic level. Macrobenthic organisms were counted and abundances were expressed in number of individuals per m². For the Seine estuary the data on macrobenthos abundance come from a database called Macrobenthos of the Bay and Estuary of Seine (MABES); available via the data administrator of the GIP Seine Aval: nbacq@seine-aval.fr. From this database we chose five stations located near the flounder sampling. Data we used come from the 2006 sampling with a Smith McIntyre grab (see Ruellet & Dauvin, 2007).

In order to achieve the total concentrations of metal pollutants (Zn, Cu, Cd, Pb, Al, Cr, Fe, Mn, Ti) in the surface sediments, they were collected at low tide using a Teflon spatula, previously washed with diluted hydrochloric acid solution and rinsed abundantly with Milli-Q water. Sediment samples were afterwards put in polyethylene bags and stored in an ice box. In the laboratory, sediments were dried at room temperature in a laminar flow hood during 48 hours. 200 mg of dried sediments were treated with concentrated hydrofluoric acid of high purity (Prolabo, normapur) followed by an aqua regia [hydrochlorhydric + nitric acids (ultrapur), 3:1 v:v] attack, after the removal of HF by evaporation. The mixture was a second time partially evaporated and the recovered solutions were diluted at a known volume in MilliQ water and analyzed using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES, Varian, Vista Pro, axial view) for Al, Fe, Mn, Ti, Cu, Cr, and Zn, and using inductively coupled plasma

Pb. Les appareils ont été calibrés en utilisant les solutions étalons, des corrections blanches ont été appliquées au besoin, et les documentations de référence de norme internationale (MESS-3, HISS-1 et PACS-2) ont été analysées afin de contrôler la qualité.

6.3.3. *Analyses biologiques*

Au laboratoire, les juvéniles (100 individus) ont été décongelés, mesurés pour SL (longueur standard) et TL (longueur totale) à 0.5 millimètre près et pesés (poids humide) à 0.1 mg près.

6.3.4. *Indice de croissance*

L'indice de croissance récent (RG ; μm) a été déterminé en mesurant la largeur des accroissements journaliers périphériques des otolithes. Puisqu'il y avait une relation significative entre le diamètre de l'otolithe et la longueur du poisson (fig. 2), nous avons utilisé la largeur moyenne des 10 derniers jours avant capture comme indicateur de la croissance récente (distance moyenne entre la périphérie de l'otolithe et le 10^e accroissement). Les Sagittae ont été enlevées, nettoyées et montées sur des lamelles microscopiques, sulcus vers le haut, avec de la colle de cyanocrilate puis polies avec de la poudre d'aluminium jusqu'à ce que le primordia accessoire et les incréments du bord soient bien visibles. Les otolithes ont été analysés sous lumière transmise au grossissement 400. Toutes les mesures ont été faites le long du même axe en utilisant un système d'analyse d'image (TNPC).

mass spectrometer (ICP-MS, X series Thermo Elemental) for Cd and Pb. ICP apparatus were calibrated using standard solutions, blank corrections were applied if necessary, and international standard reference materials (MESS-3, HISS-1 and PACS-2) were analyzed for the purpose of quality control

6.3.3. *Biological analyses*

At the laboratory, juveniles (100 individuals) were defrosted, measured for SL (standard length) and TL (total length) to the nearest 0.5 mm and weighed (wet weight) to the nearest 0.1 mg.

6.3.4. *Growth index*

The recent growth index (RG; μm) was determined by measuring the width of the peripheral daily increments of the otoliths. Because there was a significant relationship between sagittal diameter and fish length (Fig. 2), we used daily otolith increments from the last 10 days before capture as an indicator of recent growth (mean distance between the margin of the otolith back to the 10th ring). Sagittae were removed, cleaned and mounted on microscopical slides, sulcus up, with cyanocrilate glue and polished with alumina powder until the accessory primordia and the increments at the outer edge were visible. Otoliths were analysed under transmitted light at 400 magnifications, using a video system fitted to a compound microscope. All measurement was done along the same axis using an Image Analysis System (TNPC).

6.3.5. Indices de condition

Nous avons estimé deux indices de condition : le rapport RNA-DNA comme indicateur de l'état nutritionnel et l'indice de condition K de Fulton comme indicateur du bien-être général du poisson. Ce dernier indice morphométrique suppose que les poissons plus lourds pour une longueur donnée sont en meilleure condition. Nous avons calculé l'indice de condition K de Fulton avec la formule $K = 100 (W/L^3)$, où W est la masse de corps (mg) et L est la longueur totale (millimètre).

La quantité d'acide ribonucléique (ARN) varie avec le taux de synthèse protéique, affecté en cas de stress, alors que celle d'acide désoxyribonucléique (ADN) est constante dans les tissus. De ce fait, le rapport ARN/ADN constitue un indice représentatif de l'état nutritionnel d'un individu. De nombreuses études ont montré que cet indice répondra de manière rapide aux variations des conditions de nutrition et de croissance des larves et juvéniles de poissons (Buckley et al., 1999; Clemmesen, 1988).

La méthodologie utilisée est basée sur le protocole de Clemmesen (1988), basé sur la méthode d'extraction et de quantification de Munro & Fleck (1966). La tête et les nageoires ont été coupées afin de faciliter les manipulations. De même, l'estomac a été enlevé afin qu'il ne contribue pas au rapport ARN / ADN. Les échantillons ont été homogénéisés dans une solution glacée de tampon Tris (0.05 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.2 mg/ml de protéinase K, pH = 7.5) à l'aide d'un Ultra-Turrax. 30 %l de SDS 20% ont été ajouté à l'échantillon qui est alors mélangé et centrifugé. 300 µl de phénol et

6.3.5. Condition indices

We estimated two condition indices: the RNA-DNA ratio as an indicator of nutritional status and Fulton's K condition index as an indicator of the general well-being. This latter morphometric index assumes that heavier fish for a given length are in better condition. We calculated Fulton's K condition index with the formula $K = 100 (W/L^3)$, where W is the body mass (mg) and L is the total length (mm). Nucleic acid quantification and subsequent RNA-DNA ratios has been used in numerous studies as indices for nutritional condition and growth assessment in larvae and juvenile fish (e.g. Buckley, 1984; Gwack & Tanaka, 2001). This biochemical index reflects variations in growth related protein synthesis, since the quantity of ribonucleic acid (RNA) varies with the rate of protein synthesis, while the amount of desoxyribonucleic acid (DNA) per cell is species-constant in somatic tissue (Buckley & Bulow, 1987). Procedure used to determine RNA and DNA concentrations in individual fish is based on Clemmesen method (1988). However, head and fins were discarded before analyzing fish and guts were excised to ensure that gut contents did not contribute to RNA-DNA ratio. Dissecting tools were rinsed with deionised water between sample dissections to avoid contamination. Fish muscle sample (± 15 mg) was homogenized in 300µl icecold (around 0°C) Tris-buffer (0.05 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, 0.2 mg/ml proteinase K, pH = 7.5) using an Ultra-Turrax. 30 µl 20% SDS was added and sample was mixed 15 min and centrifuged (15 min, 6000 rpm). Then, 300 µl of phenol and 300 µl of chloroform-

chloroforme isoamylalcool (24:1) chacun sont ajoutés au surnageant avant mélange et centrifugation. Cette étape est réalisée deux fois. Le surnageant est ensuite récupéré puis lavé deux fois au chloroforme isoamylalcool (24:1) avant d'être mélangé et centrifugé. Le surnageant, contenant les acides nucléiques, est récupéré et mélangé avec 200 µl de tampon Tris. 5 µl de bromure d'éthidium, marqueur fluorescent spécifique des acides nucléiques (Karsten & Wollenberger, 1977), sont ajoutés à 45 µl d'échantillon. L'intensité de fluorescence de ce marqueur varie linéairement avec la concentration d'acides nucléiques. La fluorescence des acides nucléiques totaux (ARN + ADN) est alors mesurée au spectrofluorimètre, sous longueur d'onde d'excitation de 360 nm et longueur d'onde d'émission de 590 nm. Un aliquot de l'échantillon est ensuite incubé à 37°C durant une heure avec 0.3 µl de ribonucléase A (10 mg/ml). Une seconde lecture au spectrofluorimètre détermine alors la fluorescence due aux ADN uniquement. Les fluorescences en ADN et en ARN (fluorescence totale - fluorescence ADN) sont ensuite converties en concentration (ng/µl) à l'aide de droites d'étalonnages préalablement établies à partir d'ADN standard de thymus de veau type I et d'ARN de levure type III:

$$\text{ADN : } y = 13.625 x, r = 0.87$$

$$\text{ARN : } y = 8.229 x, r = 0.91$$

6.3.6. Analyse de l'alimentation

Les estomacs et les intestins de juvéniles de flet ont été disséqués et analysés sous un stéréomicroscope. Les catégories principales de proies ont été identifiées et comptées et le

isoamylalcool (24:1) were added to the solution before mixing (10 min) and centrifugation (10 min, 6000 rpm). This was carried out twice. The supernatant was then collected, washed twice with chloroform-isoamylalcohol and mixed (1 min) and centrifuged (5 min, 6000 rpm) to eliminate the phenol traces. Finally 200 µl of Tris-buffer were added to the resulting purified nucleic acid solution (aqueous phase). 5 µl of ethidium bromide (EB, specific fluorophore of nucleic acids) was added to 45 µl of sample to determine both RNA and DNA fluorescence. The fluorescence was determined by exciting at 365 nm and reading the emission at 590 nm using a spectrofluorometer. An aliquot of the sample was then treated with 0.3 µl ribonuclease A (10 mg/ml), incubated at 37°C for one hour and the fluorescence measured, which is assumed to be due to DNA. The fluorescence due to RNA was then calculated as the difference between total nucleic acids fluorescence and fluorescence after ribonuclease treatment. Standard calibration curves (fluorescence = f [nucleic acid concentration]) for RNA and DNA were beforehand determined with a series of dilutions of pure calf thymus type I DNA and yeast type III RNA. The DNA and RNA calibration curves are presented in Figure 3. Both RNA and DNA concentrations indicated significant correlations with EB fluorescence ($p < 0.001$). The curves were fitted by linear regression as follows:

$$\text{DNA: } y = 13.625 x, r = 0.87$$

$$\text{RNA: } y = 8.229 x, r = 0.91$$

6.3.6. Feeding analysis

The guts (stomach + intestine) content of

pourcentage de contenu digestif vide calculé.

6.3.7. Analyses statistiques

Les relations entre la taille du poisson (TL) et les 3 indices ont été examinées en utilisant des corrélations de Pearson. Pour évaluer le lien entre les variables du poisson (croissance et indice de condition), des coefficients de corrélation ont été calculés. Les différences de conditions environnementales des estuaires et des différents indices ont été analysées utilisant le test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Une analyse hiérarchique a été employée pour regrouper des estuaires en fonction de leur similitude utilisant une matrice de similitude basée sur des distances euclidiennes pour le groupement.

juveniles flounder were dissected and analysed under a stereomicroscope. The main prey categories were identified and counted and the percentage of empty gut calculated.

6.3.7. Statistical analyses

Relationships between fish size (TL) and the 3 indices were first tested using Pearson correlations. To evaluate the link between fish variables (growth and condition indices), correlation coefficients were calculated. Differences in environmental parameters and fish growth and condition among estuaries were analysed using the non-parametric Kruskal-Wallis test and the Dunn test (joint ranking test) for post hoc pairwise comparisons. Hierarchical clustering was used to regroup estuaries as a function of their similarity using a similarity matrix based on Euclidian distances for clustering purposes.

Tableau 1: Concentrations métalliques moyennes (et écart-type) dans les sédiments des estuaires de la Canche, de l'Authie et de la Seine.

Mean (\pm SD) sediment metal concentrations in the Canche, Authie and Seine estuaries

	Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Pb	Ti	Zn	Total
	mg.kg ⁻¹	mg.kg ⁻¹	mg.kg ⁻¹	mg.kg ⁻¹	mg.kg ⁻⁰	mg.kg ⁻¹	mg.kg ⁻¹	mg.kg ⁻⁰	mg.kg ⁻¹	mg.kg ⁻¹
Canche	24 035	0,40	67	11	11 486	283	19	3025	55	38 981
Authie	14 642	3,48	28	20	12 226	221	23	376	76	27 616
Seine	36 450	0,81	85	44	26 100	506	54	2830	171	66 241

Fig.2

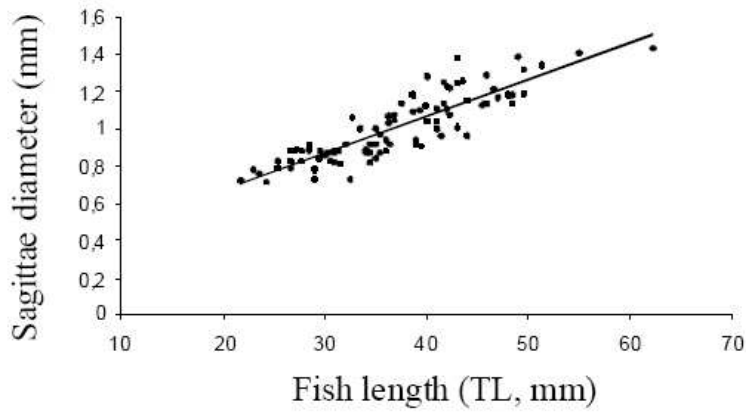


Fig.3

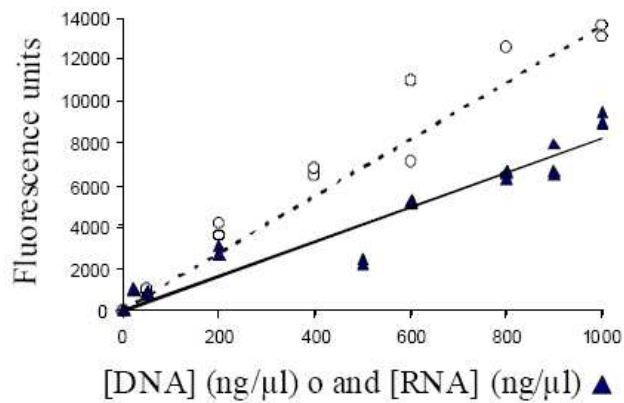


Figure 2. Relation entre la taille TL (mm) et le diamètre de l'otolithe (μm) chez le flet. /

The relationship between fish TL (mm) and the sagittal otolith diameter (μm) in European flounder.

Regression model: $\text{diameter} = 0.0199 + 0.269 (\text{TL})$; $n = 95$, $R^2 = 0.77$, $p < 0.001$

Figure 3. Courbes des standards d'ADN et d'ARN /

DNA and RNA standard curves.

6.4. Résultats

L'abondance du macrobenthos était élevée dans les trois estuaires et variait de 1224 ± 487 ind.m⁻² dans l'Authie à 1976 ± 371 ind.m⁻² dans la Seine (figure 4). Il n'y avait aucune différence significative dans l'abondance de macrobenthos entre les trois estuaires ($p = 0.257$). Les espèces macrobenthiques dominantes diffèrent entre les estuaires : les oligochaetes, les polychètes (*Hediste diversicolor*) et les amphipodes (*Bathyporeia sarsi* et *Gammarus duebeni*) étaient dominants dans le Canche et l'Authie tandis que les amphipodes (*Corophium insidiosum*), polychètes (*Neanthes succinea*, *Capitella* sp., *Polydora ciliata*) ont dominé le macrobenthos de l'estuaire de Seine.

Les concentrations en métaux du sédiment (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) étaient sensiblement plus élevées ($p = 0.030$) dans la Seine (5.2 ± 0.3 mg.kg⁻¹) comparées aux estuaires de la Canche et de l'Authie (2.4 ± 0.5 et 2.1 ± 0.5 mg.kg⁻¹ respectivement) (tableau 1). Pour tous les contaminants en métal analysés, la concentration dans le sédiment était plus haute dans la Seine (tableau 1).

Un total de 100 flets du groupe-0 ont été analysés (32 dans la Canche, 31 dans l'Authie et 37 dans la Seine), mais les valeurs simultanées des 3 indices (RG, K de Fulton et indice RNA-DNA) mesurés sur chaque poisson ont été obtenues seulement pour 53 individus. Nous ne rapportons pas le résultat de l'indice RNA-DNA et de K de Fulton des juvéniles attrapés dans le Canche et de quelques individus (15) de l'Authie suite à un problème de congélation des

6.4. Results

The abundance of macrobenthos was high in the three estuaries and varied from 1224 ± 487 ind.m⁻² in the Authie to 1976 ± 371 ind.m⁻² in the Seine (Fig 4). There was no significant difference in the abundance of macrobenthos between the three estuaries ($p = 0.257$). The dominant macrobenthic species differ between the estuaries: oligochaetes, polychaetes (*Hediste diversicolor*) and amphipods (*Bathyporeia sarsi* and *Gammarus duebeni*) were dominant in the Canche and Authie whereas amphipods (*Corophium insidiosum*), polychaetes (*Neanthes succinea*, *Capitella* sp., *Polydora ciliata*) dominated the macrobenthos of the Seine estuary.

Sediment metal concentrations (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) were significantly higher ($p = 0.030$) in the Seine (5.2 ± 0.3 mg.kg⁻¹) compared to the Canche and Authie estuaries (2.4 ± 0.5 and 2.1 ± 0.5 mg.kg⁻¹ respectively) (Table 1). For all metal contaminants analysed, the concentration in the sediment was higher in the Seine (Table 1).

A total of 100 0-group flounder were analysed (32 in the Canche, 31 in the Authie and 37 in the Seine), but simultaneous values of the 3 indices (RG, Fulton's K and RNA-DNA condition indices) measured on each fish were obtained only for 53 individuals. We do not report the result of RNA-DNA ratio and Fulton's K condition index of juvenile flounder caught in the Canche and from some individuals (15) of the Authie due to a freezing storage problem. However these individuals were used for growth estimates. The mean total length and weight of the flounders analysed were respectively $37.53 \pm$

échantillons. Cependant ces individus ont néanmoins été employés pour l'évaluation de la croissance. Les tailles et poids moyens des flets analysés étaient respectivement 37.53 ± 8.17 millimètres et 512.6 ± 436 g. Bien que statistiquement différente ($p < 0.05$), la taille des poissons analysés se recouvre sensiblement dans les 3 estuaires ; Les longueurs moyennes étaient de 37.5 ; 40.37 et 35.17 millimètres respectivement dans les estuaires de la Canche, de l'Authie et de la Seine.

Pour ce qui concerne le rapport entre les indices biologiques, seul le rapport de RNA-DNA et le K de Fulton était significativement corrélé ($p < 0.01$), bien que la valeur du coefficient de corrélation de Pearson ait été faible (0.25). Cela indique que ces indices de condition ont les mêmes tendances générales.

L'indice de croissance récente (largeurs moyennes des 10 derniers accroissements des otolithes) des flets analysés était de 5.28 ± 1.51 μm . RG a montré des différences significatives parmi les 3 estuaires ($p < 0.001$; Fig. 5). Les individus de la Seine ont eu un RG plus faible (4.40 ± 1.28 μm). RG n'a pas varié de manière significative parmi les flets des estuaires de la Canche et de l'Authie (RG moyen : 5.62 ± 1.29 μm et de 5.98 ± 1.47 μm respectivement).

Le rapport de RNA-DNA des individus de flets du groupe-0 analysé varie entre 0.24 à 2.74 (valeur moyenne = 1.14 ± 0.55). Les individus de la Seine ont des valeurs significativement plus faibles comparés ($p = 0.003$) (1.02 ± 0.55) à ceux de l'Authie (1.41 ± 0.45) (fig. 5).

Comme pour l'indice précédent, le K de Fulton a différencié également de manière

8.17 mm and 512.6 ± 436 g. Although statistically different ($p < 0.05$), the size range of fish analysed overlapped substantially among the 3 estuaries; the mean total length were 37.5; 40.37 and 35.17 mm respectively in the Canche, Authie and Seine estuaries.

Concerning the relationship between the biological indices, only RNA-DNA ratio and Fulton's K were significantly ($p < 0.01$) and positively linked to each other indicating, although the Pearson correlation coefficient value was moderate (0.25), that these condition indices followed the same general trends.

The mean recent growth index (mean otolith increment widths for the last 10 d) of flounder analysed was 5.28 ± 1.51 μm . RG showed significant differences among the 3 estuarine sites ($p < 0.001$; Fig. 5). Individuals from the Seine had slower RG (4.40 ± 1.28 μm). RG did not vary significantly among flounders from the Canche and Authie estuaries (mean RG: 5.62 ± 1.29 μm and 5.98 ± 1.47 μm respectively).

The RNA-DNA ratio of the individual 0-group flounder analysed varied between 0.24 and 2.74 (mean value = 1.14 ± 0.55). Individuals from the Seine had a significantly ($p = 0.003$) lowest RNA-DNA ratio (1.02 ± 0.55) compared to those of the Authie (1.41 ± 0.45) (Fig. 5).

As for the previous index, Fulton's K also differed significantly among estuaries ($p < 0.001$). Individual values of K varied from 0.73 to $1.20 \text{ mg}\cdot\text{mm}^{-3}$. K was significantly lowest in individuals from Seine ($0.89 \pm 0.1 \text{ mg}\cdot\text{mm}^{-3}$) compared to those of the Authie ($1.01 \pm 0.12 \text{ mg}\cdot\text{mm}^{-3}$) (Fig. 5). When the 3 indices were compared simultaneously, cluster analysis

significative entre les estuaires ($p < 0.001$). Les différentes valeurs de K ont varié de 0.73 à 1.20 mg.mm-3. K était sensiblement le plus bas chez les individus de Seine (0.89 ± 0.1 mg.mm-3) comparés à ceux de l'Authie (1.01 ± 0.12 mg.mm-3) (fig. 5). Lorsque les 3 indices ont été comparés simultanément, l'analyse a indiqué que la plupart des individus de l'estuaire de la Seine constituent un groupe différencié des individus de l'Authie.

Les flets du groupe-0 s'alimentent sur une grande catégorie de proies, la principale étant le copepode (fig. 6). Elles se nourrissent – dans des proportions différentes - des mêmes proies dans les 3 estuaires étudiés (principalement copepodes, larves d'insecte, polychètes, espèces de *Corophium*, crevette (crangon de Crangon). On a observé un cannibalisme vers des larves de flet seulement dans le Canche. Dans cet estuaire, le pourcentage d'intestin vide était plus élevé (37.5%) par rapport à l'Authie et à la Seine (3.3 et 10.8% respectivement). Il n'y avait aucun rapport clair entre le régime des poissons et la disponibilité de proies (macrobenthos) excepté dans l'estuaire de la Seine où l'importance des espèces de *Corophium* semble en rapport avec l'abondance de ces espèces dans le milieu.

revealed that most individuals from the Seine estuary form a differentiated group from the Authie individuals.

0-group flounders feed on a large category of preys but their main prey was the copepod (Fig. 6). Although not in the same proportion, they feed on the same preys in the 3 studied estuaries (mainly copepods, insect larvae, polychaetes, *Corophium* sp., shrimp (*Crangon crangon*). A cannibalism toward flounder larvae was observed only in the Canche. In this estuary, the percentage of empty gut was highest (37.5%) compared to Authie and Seine (3.3 and 10.8% respectively). There was no clear relationship between fish diet and prey availability (macrobenthos) except for the Seine estuary where the importance of *Corophium* sp. seems related to the abundance of this species in the field.

Fig.4

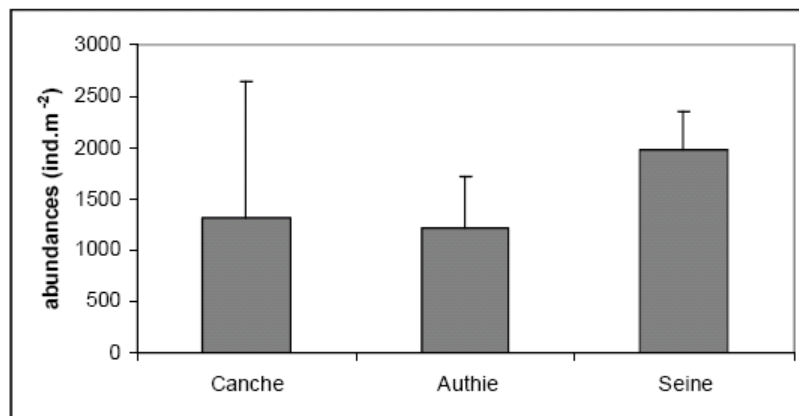


Figure 4. Abondance moyenne de macrobenthos (ind.m⁻²) dans les estuaires de la Canche, de l'Authie et de la Seine
Mean macrobenthos abundance (ind.m⁻²) in the Canche, Authie and Seine estuaries.

Fig 5.

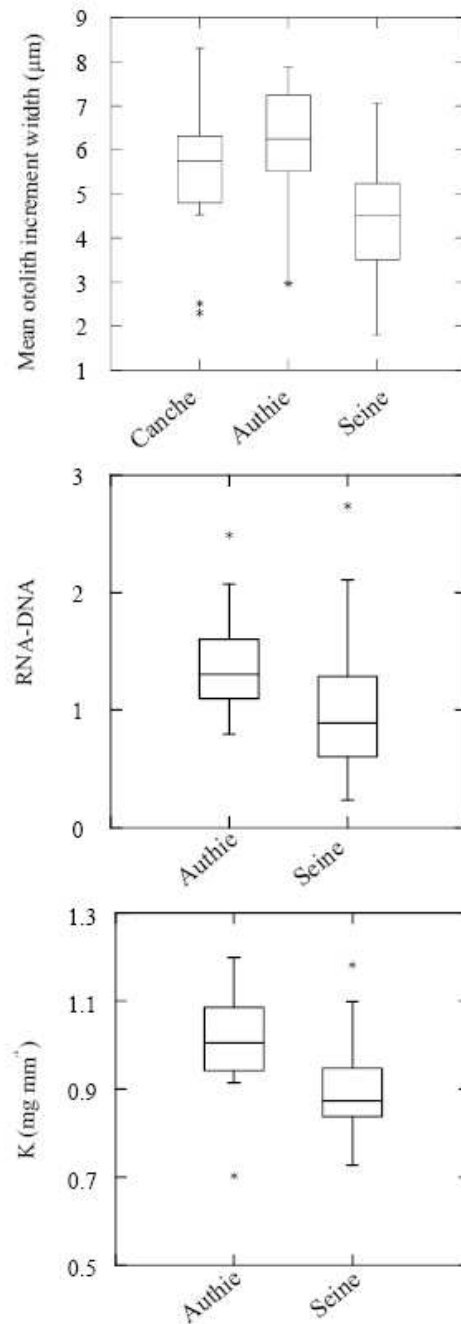


Figure 5. Croissance récente (largeur des 10 derniers accroissements de l'otolithe), du rapport ARN-ADN et de l'indice de condition K de Fulton des juvéniles du groupe-0 de flet capturés dans la Canche, l'Authie et la Seine. /

Differences in recent growth (mean otolith increment widths for the last 10 d), RNA-DNA ratio and Fulton's condition index (K) for 0-group juveniles flounder caught in the Canche, Authie and Seine estuaries. The whiskers extend to the highest and lowest values, excluding outliers. The line across the box indicates the median

Fig 6.

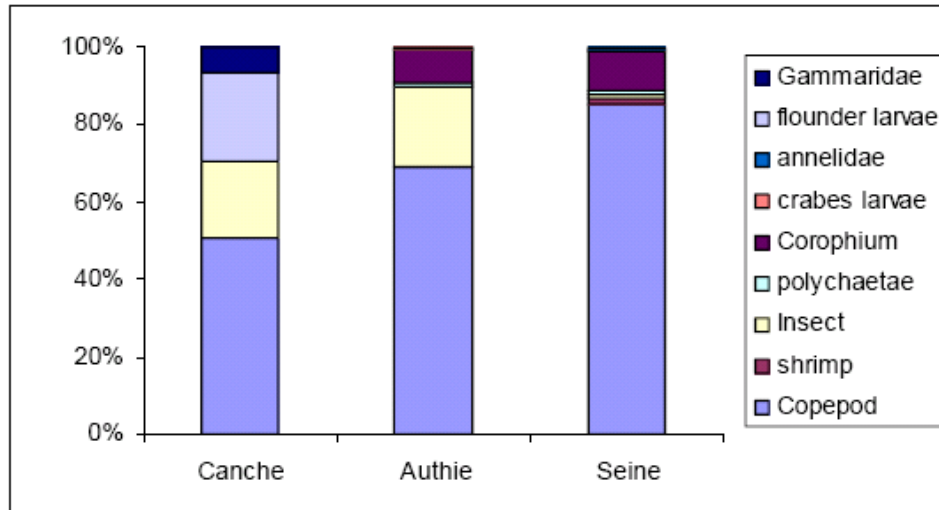


Figure 6. Composition du régime alimentaire des flets du groupe-0 capturés en Canche, Authie et Seine. / Composition of the diet (major prey taxa in percentage) of 0-group flounder caught in the Canche, Authie and Seine estuaries

6.5. Discussion

Ces dernières années, on a pu remarquer une préoccupation croissante concernant le rôle que les facteurs autres que l'exploitation par la pêche, tels que la destruction d'habitat et la pollution marine, pouvaient jouer dans le déclin des espèces de poissons de mer d'intérêt commerciale (Grosse et al, 1997). Le choix et le développement des indicateurs biologiques qui permettent de distinguer les effets de l'anthropisation de ceux de la variabilité naturelle est au coeur de l'évaluation de la qualité des habitats. Quand une différence de

6.5. Discussion

In recent years, there has been increasing concern about the role that factors other than fisheries exploitation, such as habitat destruction and marine pollution, might play in the declines of commercially marine fish species (Grosse et al., 1997). Selection and development of biological indicators that can distinguish anthropogenic effects from natural variability is at the heart of habitat quality assessment. When a difference in habitat quality is demonstrated, it is necessary to show that the observed differences

qualité d'habitat est démontrée, il est nécessaire de prouver que les différences observées sont liées aux changements induits par l'homme et non pas aux facteurs naturels. Les comparaisons entre habitats perturbés et habitats peu ou pas perturbés fournissent des indicateurs biologiques pertinents. Dans une étude récente effectuée en Manche orientale, Amara et al (2007) ont montré que les nourriceries côtières peu profondes avec des niveaux élevés de contaminants chimiques dans le sédiment présentent une mauvaise qualité d'habitat pour les poissons. Les juvéniles de sole (*Solea solea*) ont eu une croissance et des indices de condition plus faibles dans la baie de Seine et à proximité des grands ports industrialisés (Dunkerque, Calais et Boulogne) comparés à ceux des zones côtières de l'Authie, de la Canche et de la Somme. La présente étude confirme que les nourriceries situées dans les estuaires pollués ne fournissent pas des habitats de bonne qualité pour les juvéniles de poissons, comme cela est reflété par leur faibles croissance et leur état. L'utilisation combinée d'indices de croissance, biochimiques et morphométriques est un outil pertinent pour identifier le statut global du rôle de nourricerie d'un estuaire.

La croissance et l'état des juvéniles de poissons plats et d'autres poissons sont affectés par un certain nombre de facteurs dans la nourricerie (Gibson, 1994). La qualité et la quantité de nourriture est considérée comme un facteur critique de limitation de la croissance des poissons plats (Neill et al, 1994 ; Van der Veer et al, 1994) et peut être un élément affectant les différences de croissance ou de condition entre différentes zones (Sogard, 1992 ; Gibson, 1994). Les juvéniles de flet

are related to human-induced changes and not to natural factors. Comparisons of perturbed to unperturbed habitats provides a way to identify useful biological indicators. In a recent study carried out in the eastern English Channel, Amara et al. (2007) showed that shallow coastal nurseries with highest sediment chemical contaminants had the lowest habitat quality. Juvenile sole (*Solea solea*) had the slowest growth rate and lowest condition indices in the Bay of Seine and near industrialized harbour areas (Dunkerque, Calais and Boulogne) and highest condition indices at the Authie, Canche and Somme coastal areas. The present study confirms that the nurseries located in polluted estuaries do not provide high-quality habitats for juvenile fishes, as is reflected by their lower growth and condition. The combined use of growth, biochemical and morphometric indices is a useful tool for recognizing the overall nursery role status of an estuary.

Growth and condition of flatfish and other juvenile fish is affected by a number of factors in the nursery habitat (Gibson, 1994). Food quality and quantity is considered a critical limiting factor in flatfish growth (Neill et al., 1994; Van der Veer et al., 1994) and may be an element in estuarine and habitat-related differences in growth or condition (Sogard, 1992; Gibson, 1994). Small flounder juveniles feed on a large category of preys. Previous studies have found flounder juveniles to be opportunistic generalists, feeding on a variety of polychaetes, crustaceans and amphipods (e.g. Aarnio et al., 1996; Vinagre et al., 2005). More generally, it is recognized that juvenile flatfish consume the most abundant food

se nourrissent d'une grande catégorie de proies. Les études précédentes ont montré que les juvéniles de flet sont des généralistes opportunistes, se nourrissant de polychètes, crustacés et amphipodes (par exemple Aarnio et al, 1996 ; Vinagre et al, 2005). Plus généralement, on considère que les juvéniles de poissons plats consomment la nourriture la plus abondante disponible d'une façon opportuniste (par exemple Beyst et al, 1999 ; Amara et al, 2001), ce qui réduit les problèmes de compétition dans les systèmes fortement productifs tels que les estuaires. Nous avons constaté que l'abondance du macrobenthos était plus élevée dans l'estuaire de la Seine mais pas sensiblement différente des deux autres estuaires étudiés. Bien que l'estuaire de Seine soit l'un des plus pollués en Europe (Dourou et al, 2007), il continue à soutenir une biomasse benthique très élevée et reste tout à fait productif (Dauvin, 2008). L'absence de conditions anoxiques, particulièrement en été où les températures atteignent leur maximum (>20°C), pourrait expliquer les valeurs élevées d'abondance et de biomasse trouvées dans l'estuaire de Seine, en dépit du fort degré de pollution (Dauvin et Ruellet, 2008).

L'estuaire de la Seine est caractérisé par des concentrations élevées d'une série de contaminants, y compris des métaux et HAP. Par exemple, les concentrations en Cd dans les bivalves *Cerastoderma edule* et *Macoma balthica* étaient sept fois plus élevées dans l'estuaire de Seine que dans la Somme, et étaient semblables à ceux trouvés dans l'un des estuaires les plus pollués en Cd d'Europe, la Gironde en France (Gonzalez, 1999). Les biomarqueurs physiologiques mesurés sur une espèce clé du compartiment sédimentaire

resources in a generalist and opportunistic manner (e.g. Beyst et al., 1999; Amara et al., 2001), which strongly reduces the potential for competition in highly productive systems such as estuarine habitats. We found that the abundance of the macrobenthos was higher in the Seine estuary and not significantly different from the two others estuaries. Although the Seine estuary is one of the most polluted in Europe (Dourou et al., 2007), this estuary yet continues to support a very high benthic biomass and remains quite productive (Dauvin, 2008). The absence of anoxic conditions, especially in the summer when temperatures reach their maximum (>20°C), could explain the high abundance and biomass values found in the Seine estuary, despite the highly contaminated environment (Dauvin & Ruellet, 2008).

The Seine estuary is characterised by high concentrations of a variety of contaminants, including metals and PAHs. For example, the Cd concentrations in the bivalves *Cerastoderma*

edule and *Macoma balthica* were seven times higher in the Seine estuary than in the Bay of Somme, and were similar to those found in one of the most Cd-contaminated estuaries in Europe, the Gironde in France (Gonzalez, 1999). Physiological biomarkers measured on an estuarine key-species representative of the sedimentary compartment (*Hediste diversicolor*), have revealed a contrasting situation between the relatively clean Authie estuary and the multi-polluted Seine estuary (Dourou et al., 2007).

Fish growth rates and condition have been widely observed to relate inversely to exposure of the fish to contaminants (Rowe, 2003; Alquezar

(*Hediste diversicolor*), ont indiqué une situation contrastée entre l'estuaire relativement propre de l'Authie et l'estuaire très pollué de la Seine (Durou et al, 2007).

La croissance et la condition des poissons est souvent inversement corrélée à l'exposition des poissons aux contaminants (Rowe, 2003 ; Alquezar et al, 2006). Burke et al (1993) a montré que la condition et la croissance de *Micropogonias undulates* étaient diminués le long d'un gradient de pollution en estuaire. Chez les juvéniles de sole et de turbot, la croissance et la condition ont été sensiblement réduits après exposition à des hydrocarbures (Claireaux et al, 2004 ; Saborido-Rey et al, 2007). Chez les poissons, la tolérance au stress est soutenue par de nombreux mécanismes tels que la production de substrats antioxydants, la limitation de la prise, la biotransformation des xenobiotics (Newman et Unger, 2003) et de désintoxication en métal (Mason et Jenkins, 1995). Il est généralement considéré que combattre le stress (la défense) ou la réparation des dommages (altération) impliquent des coûts énergétiques responsables d'une redistribution des ressources favorisant la tolérance au stress (Postma et al, 1995). Toute l'énergie acquise de la nutrition et consacrée à la défense n'est plus disponible pour l'entretien, la croissance et la reproduction, suggérant des conséquences potentielles sur l'état de santé des individus et le destin des populations (Adams, 2002). Comme proposé par Marchand et al (2003) pour le flet des estuaires pollués de la Loire et de la Gironde, la diminution de la croissance et de l'indice de condition observés dans la présente étude dans l'estuaire pollué de Seine suggère une réponse des poissons à la

et al., 2006). Burke et al. (1993) showed that the condition and growth of Atlantic croaker *Micropogonias undulates* were depressed along an estuarine pollution gradient. In juvenile turbot and sole, growth rates and condition were significantly reduced after exposure to hydrocarbon (Claireaux et al., 2004; Saborido-Rey et al., 2007). In fish, tolerance to stress is supported by numerous mechanisms such as production of antioxidant substrates, limitation of uptake, biotransformation of xenobiotics (Newman & Unger, 2003) and metal detoxification (Mason & Jenkins, 1995). It is generally considered that combating against stress (defence) or repairing damages (alterations) implies energy costs responsible for a re-allocation of resources favouring tolerance to stress (Postma et al., 1995). All the energy acquired from nutrition and devoted to defence is no longer available for maintenance, growth and reproduction, suggesting potential consequences on the health status of individuals and the fate of populations (Adams, 2002). As suggested by Marchand et al. (2003) for flounder from the polluted Loire and Gironde estuaries, the reduced growth and condition index observed in the present study for the polluted Seine estuary suggests a fish response to chemical contamination through a limited accumulation of energy in muscles.

In conclusion, the present study, confirms the validity of physiological performance of juvenile fish as habitat quality indicators in highly variable environments such as estuarine nurseries. We found consistent declining growth and condition for juvenile flounder sampled in

contamination chimique par une accumulation limitée d'énergie dans les muscles.

En conclusion, la présente étude, confirme la validité de l'utilisation des performances physiologiques des juvéniles de poissons en tant qu'indicateurs de la qualité d'habitat dans les environnements fortement variables tels que les nourriceries estuariennes. Nous avons trouvé une diminution à la fois de la croissance et de l'état de condition des juvéniles de flet prélevés dans l'estuaire pollué de Seine. Cependant, en raison de la complexité des rapports entre les organismes, leur habitat et les nombreux facteurs potentiels de stress environnementaux, il est difficile d'identifier et de mesurer exactement les effets de la qualité de l'habitat sur les organismes (Phelan et al, 2000 ; Meng et al, 2001 ; Amara et al, 2007). Le flet européen est connu pour tolérer de grandes fluctuations des facteurs abiotiques (Lundgreen et Jensen, 2007). Néanmoins de nombreux facteurs indépendants de la pollution, par exemple la température ambiante, les apports de nutriments, les débits d'eau et le régime hydrodynamique, affectent probablement la croissance et la condition des poissons dans un estuaire. La compréhension des sources de variation de la croissance et de l'état de condition des juvéniles est un aspect important pour identifier le statut global de rôle de nourricerie d'un estuaire. Les études de laboratoire explorant les rapports entre les taux de croissance ou les indices de condition et l'influence de divers facteurs environnementaux sont importantes pour améliorer l'interprétation des résultats obtenus en milieu naturel.

La fonction des habitats côtiers peu profonds en tant que zone de nourricerie pour les poissons

the polluted Seine estuary. However, due to the complexity of the relationships between organisms, their habitat and the multiple potential environmental stressors, it appears to be difficult to identify and quantify exactly the effects of habitat quality on organisms (Phelan et al., 2000; Meng et al., 2001; Amara et al., 2007). European flounder is known to tolerate large fluctuations in abiotic factors (Lundgreen & Jensen, 2007). Nevertheless many non-pollution related variables, e.g. ambient temperature, nutrient inputs, water flow and hydrodynamic regime, likely also impact fish growth and condition in a specific estuary. Understanding sources of variation in juvenile growth and condition is an important aspect in recognizing the overall nursery role status of an estuary. Laboratory studies exploring relationships between growth rates or condition indices and the influence of various environmental factors are important assets towards improving the interpretation of field results.

The function of shallow coastal habitats as important nursery grounds for marine fish has become an accepted ecological concept (Beck et al., 2001). All coastal areas, however, are not equally important as nursery grounds (Le Pape et al., 2003; Pihl et al., 2005; Gilliers et al., 2006). The use of estuaries by juvenile fish usually presents several advantages such as high prey availability, refuge from predators and good conditions for a rapid growth (Lenanton & Potter, 1987; Beck et al., 2001). However, due to pollution, poor growth and nutritional status of juveniles may weaken overall conditions, potentially making these individuals more

marins est devenue un concept écologique admis ((Beck et al., 2001). Toutes les zones côtières, cependant, ne sont pas d'égale importance en tant que nourricerie (Le Pape et al, 2003 ; Pihl et al, 2005 ; Gilliers et al, 2006). L'utilisation des estuaires par les juvéniles de poissons présente habituellement plusieurs avantages tels que la disponibilité élevée en proies, le refuge contre les prédateurs et les bonnes conditions pour une croissance rapide (Lenanton et potier, 1987 ; Beck et al., 2001). Cependant, en raison de la pollution, une croissance faible et un mauvais état nutritionnel des juvéniles peuvent diminuer leur condition générale et, rendre potentiellement ces individus plus vulnérables à la prédation, aux stress physiologiques et à la maladie (Adams, 2002). Par conséquent les faibles taux de croissance et d'état de condition observés chez les juvéniles de flet peuvent fortement affecter la survie post-hivernale des juvéniles vivant dans les estuaires pollués, et par conséquent diminuer le recrutement aux stocks commercialement exploitables.

vulnerable to predation, physiological stress and disease (Adams, 2002). Hence the observed low growth rates and condition of juvenile flounder could dramatically lower over-winter survival of the juveniles living in polluted estuaries, and thereby reduce recruitment to marine commercially exploitable stocks

6.6. References

- Aarnio, K., Bonsdorff, E. & N. Rosenback, 1996. Food and feeding habits of juvenile flounder *Platichthys flesus* (L) and turbot *Scophthalmus maximus* (L) in the Aland archipelago northern Baltic Sea. *Journal of Sea Research* 36:311-320.
- Able, K.W., Manderson, J.P. & A.L. Studholme, 1999. Habitat quality for shallow water fishes in an urban estuary: the effects of man-made structures on growth. *Marine Ecology Progress Series* 187:227-235.
- Adams, S.M., 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. American Fisheries Society Bethesda, Maryland 621pp.
- Alquezar, R., Markich, S.J. & D.J. Booth, 2006. Effects of metals on condition and reproductive output of the smooth toadfish in Sydney estuaries, south-eastern Australia. *Environmental Pollution* 142:116-122.
- Amado, L.L., Robaldo, R.B., Geracitano, L., Monserrat, J.M. & A. Bianchini, 2006. Biomarkers of exposure and effect in the Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Teleostei: Paralichthyidae) from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil). *Marine Pollution Bulletin* 52: 207-213.
- Amara, R., Meziane, T., Gilliers, C., Hermel, G. & P. Laffargue, 2007. Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Marine Ecology Progress Series* 351:201-208.
- Amara, R. & C. Paul, 2003. Seasonal patterns in the fish and epibenthic crustaceans community of an intertidal zone with particular reference to the population dynamics of plaice and brown shrimp. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 56: 807-818.
- Amara, R., Laffargue, P., Dewarumez, J.M. & C. Maryniak, 2001. Feeding ecology and growth of 0-group flatfishes (sole, dab and plaice) on a nursery ground (Southern Bight of the North Sea). *Journal of Fish Biology* 58:788-803.
- Beck, M.W., Heck, K., Able, K., Childers, D., Egglestone, D., Gillanders, B., Halpern, B., Hays, C., Hoshino, K., Minello, T., Orth, R., Sheridan, P. & M. Weintein, 2001. The identification, conservation and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *Bioscience* 51:633-641.
- Beyst, B., Cattrijsse, A. & J. Mees, 1999. Feeding ecology of juvenile flatfishes of the surf zone of a sandy beach. *Journal of Fish Biology* 55:1171-1186.
- Blaber, S.J.M., Cyrus, D.P., Albaret, J.J., Ching, C.V., Day, J.W., Elliott, M., Fonseca, M.S., Hoss, D.E., Orensanz, J., Potter, I.C. & W. Silvert, 2000. Effects of fishing on the structure and functioning of estuarine and nearshore ecosystems. *ICES Journal of Marine Science* 57:590-602.
- Bos, A.R. & R. Thiel, 2006. Influence of salinity on the migration of postlarval and juvenile flounder *Pleuronectes flesus* L. in a gradient experiment. *Journal of Fish Biology* 68:1411-1420.
- Buckley, L.J., 1984. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in the sea. *Mar Biol* 80:291-298 Buckley LJ, Bullow FJ (1987) Techniques for estimation of RNA, DNA and protein in fish. In Summerfelt, R.C. & G.E. Hall (eds), Age and growth of fish, Iowa State University Press, Ames, Iowa 345-354.
- Burke, J.S., Peters, D.S. & P.J. Hanson, 1993. Morphological indices and otolith microstructure of Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*, as indicators of habitat quality along an estuarine pollution gradient. *Environmental Biology of Fishes* 36:25-33.
- Cabral, H.N., Costa, M.J. & J.P. Salgado, 2001. Does the Tagus estuary fish community reflect environmental changes? *Climate Research* 18:119-126.
- Chiffolleau, J.F., 2001. La contamination métallique. Programme Scientifique Seine Aval, fascicule 8, Editions IFREMER, 39 pp.
- Claireaux, G., Désaunay, Y., Akca, F., Aupérin, B., Bocquené, G., Budzinski, H., Cravedi, J.P., Davoodi, F., Galois, R., Gilliers, C., Goanvec, C., Guérault, D., Imbert, N., Mazéas, O., Nonotte, G., Nonotte, L., Prunet, P., Sébert, P. & A. Vettier, 2004. Influence of oil exposure on the physiology and ecology of the common sole *Solea solea*: experimental and field approaches. *Aquatic Living Resource* 17:335-351.
- Clemmesen, C.M., 1988. A RNA and DNA fluorescence technique to evaluate the nutritional condition of individual marine fish larvae. *Meeresforschung, Reports on Marine Research* 32:134-143.
- Dauvin, J.C., 2008. Effects of heavy metal contamination on the macrobenthic fauna in estuaries: The case of the Seine estuary. *Marine Pollution Bulletin* 57:160-169.
- Dauvin, J.C. & T. Ruellet, 2008. Macrozoobenthic biomass in the Bay of Seine (eastern English Channel). *Journal of Sea Research* 59:320-326.
- Dauvin, J.C., Desroy, N., Janson, A.L., Vallet, C. & S. Duhamel, 2006. Recent changes of estuarine benthic and suprabenthic communities in response to harbour infrastructural development. *Marine Pollution Bulletin* 53:80-90.

- Durieux, E.D.H., 2007. Ecologie du système hôte-parasite, juvéniles G0 de sole-métacercaires de Digènes: dynamique et effets de l'infestation. PhD thesis, La Rochelle University.
- Durou, C., Poirier, L., Amiard, J.C., Budzinski, H., Gnassia-Barelli, M., Lemenach, K., Peluhet, L., Mouneyrac, C., Roméo, M. & C. Amiard-Triquet, 2007. Biomonitoring in a clean and a multi-contaminated estuary based on biomarkers and chemical analyses in the endobenthic worm *Nereis diversicolor*. *Environmental Pollution* 148:445-458.
- Elliott, M., Griffiths, A.H. & C.J.L. Taylor, 1988. The role of fish studies in estuarine pollution assessment. *Journal of Fish Biology* 33:51-61.
- Gibson, R.N., 1994. Impact of habitat quality and quantity on the recruitment of juvenile flatfishes. *Netherlands Journal of Sea Research* 32:191-206.
- Gilliers, C., Le Pape, O., Désaunay, Y., Morin, J., Guérault, D. & R. Amara, 2006. Are growth and density quantitative indicators of essential fish habitat quality? An application to the common sole *Solea solea* nursery grounds. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 69:96-106.
- Gillanders, B.M., Able, K.W., Brown, J.A., Eggleston, D.B. & P.F. Sheridan, 2003. Evidence of connectivity between juvenile and adult habitats for mobile marine fauna: an important component of nurseries. *Marine Ecology Progress Series* 247:281-295.
- Gonzalez, J.L., 1999. Le Cadmium: comportement d'un contaminant métallique en estuaire. Programme Scientifique Seine Aval, fascicule 10. Editions IFREMER, 31 pp.
- Grosse, D.J., Scholz, P.M., Hirshfield, M.F., Meaburn, G.M. & M. Fletcher, 1997. Fisheries and pollution: A conference overview. *Transactions of the American Fisheries Society* 126:504-505.
- Gwack, W.S. & M. Tanaka, 2001. Developmental changes in RNA:DNA ratios of fed and starved laboratory-reared Japanese flounder larvae and juveniles, and its application to assessment of nutritional condition for wild fish. *Journal of Fish Biology* 59:902-915.
- Johnson, L.L., Landahl, J.T., Kubin, L.A., Horness, B.H., Myers, M.S., Collier, T.K. & J.E. Stein, 1998. Assessing the effects of anthropogenic stressors on Puget Sound flatfish populations. *Journal of Sea Research* 39:125-137.
- Kerstan, M., 1991. The importance of rivers as nursery grounds for 0-group and 1-group flounder (*Platichthys flesus* L.) in comparison to the Wadden Sea. *Netherlands Journal of Sea Research* 27:353-366.
- Kirby, M.F., Neall, P., Bateman, T.A. & J.E. Thain, 2004. Hepatic ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity in flounder (*Platichthys flesus*) from contaminant impacted estuaries of the United Kingdom: continued monitoring 1999-2001. *Marine Pollution Bulletin* 49:71-78.
- Lambert, Y. & J.D. Dutil, 1997. Can simple condition indices be used to monitor and quantify seasonal changes in the energy reserves of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54:104-112.
- Lenanton, R.C.J. & I.C. Potter, 1987. Contribution of estuaries to commercial fisheries in temperate Western Australia and the concept of estuarine dependence. *Estuaries* 10:28-35.
- Le Pape, O., Gilliers, C., Riou, P., Morin, J. & R. Amara, 2007. Convergent signs of degradation of both the capacity and the quality of an essential fish habitat: synthesis on the Seine estuary (France), a highly anthropised estuary of which flatfish nursery function is altered. *Hydrobiologia* 588:225-229.
- Le Pape, O., Holley, J., Guérault, D. & Y. Désaunay, 2003. Coastal and estuarine essential fish habitat quality. Estimations based on the size of juvenile common sole (*Solea solea*, L.). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 58:793-803 .
- Lundgreen, K. & F. Jensen, 2000. Physiological adaptations of European flounder (*Platichthys flesus*) to variable salinity and oxygen conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part A: Molecular & Integrative Physiology* 146:180-180.
- Marchand, J., Tanguy, A., Laroche, J., Quiniou, L. & D. Moraga, 2003. Responses of European flounder *Platichthys flesus* populations to contamination in different estuaries along the Atlantic coast of France. *Marine Ecology Progress Series* 260:273-284.
- Mason, A.Z. & K.D. Jenkins, 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. In Tessier A. & D.R. Turner (eds), *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, Wiley, Chichester 479-608.
- Matthiessen, P. & R.J. Law, 2002. Contaminants and their effects on estuarine and coastal organisms in the United Kingdom in the late twentieth century. *Environmental Pollution* 120:739-757.
- Meng, L., Gray, C., Taplin, B. & E. Kupcha, 2000. Using winter flounder growth rates to assess habitat quality in Rhode Island's coastal lagoons. *Marine Ecology Progress Series* 201:287-299.
- Meng, L., Powell, J.C. & B. Taplin, 2001. Using winter flounder growth rates to assess habitat quality across an anthropogenic gradient in Narragansett Bay, Rhode Island. *Estuaries* 24:576-584.

- Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquene, G., Godefroy, D., Burgeot, T. & F. Le Boulenger, 2000. Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research* 50:373-377.
- Munsch, C., Mosan, K., Truquet, I. & J. Tronczynski, 1997. Caractérisation chimique de la contamination organique dans l'estuaire de la Seine. Rapport Seine-Aval 1996/FIN-3, Agence de l'eau Seine-Normandie, France.
- Neill, W.H., Miller, J.M., Van Der Veer, H.W. & K.O. Winemiller, 1994. Ecophysiology of marine fish recruitment: a conceptual framework for understanding interannual variability. *Netherlands Journal of Sea Research* 32:135-152.
- Newman, M.C. & M.A. Unger, 2003. *Fundamentals of Ecotoxicology*. Lewis Publishers, London, New York, Washington, DC.
- Phelan, B.A., Goldberg, R., Bedja, A.J., Pereira, J., Hagan, S., Clark, P., Studholme, A.L., Cablabrese, A. & K.W. Able, 2000. Estuarine and habitat-related differences in growth rates of young-of-the-year winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) and tautog (*Tautoga onitis*) in the 3 north-eastern US estuaries. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 247:1-28.
- Pihl, J., Modin, J. & H. Wennhage, 2005. Relating plaice (*Pleuronectes platessa*) recruitment to deteriorating habitat quality: effects of macroalgal blooms in coastal nursery grounds. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 62:1184-1193.
- Postma, J.F., Mol, S., Larsen, H. & W. Admiraal, 1995. Life-cycle changes and zinc shortage in cadmium-tolerant midges, *Chironomus riparius* (Diptera), reared in the absence of cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 14:117-122.
- Rowe, C.L., 2003. Growth responses of an estuarine fish exposed to mixed trace elements in sediments over a full life cycle. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54:229-239.
- Ruellet, T. & J.C. Dauvin, 2007. Base de Données MABES – Macrobenthos de la Baie et de l'Estuaire de Seine – version 2 : Données de Serge Simon acquises pour le Port autonome du Havre. GIP Seine-Aval, Rouen. Consultable sur le site <http://ftp-sa.crihan.fr/webGIPSA/>.
- Saborido-Rey, F., Dominguez-Petit, R., Tomas Morales-Nin, B. & A. Alonso-Fernandez, 2007. Growth of juvenile turbot in response to food pellets contaminated by fuel oil from the tanker 'Prestige'. *Marine Ecology Progress Series* 245:271-279.
- Sogard, S.M., 1992. Variability in growth rates of juvenile fishes in different estuarine habitats. *Marine Ecology Progress Series* 85:35-53.
- Selleslagh, J. & R. Amara, 2008. Environmental factors structuring fish composition and assemblages in a small macrotidal estuary (eastern English Channel). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (in press).
- Stunz, G.W., Minello, T.J. & P.S. Levin, 2002. Growth of newly settled red drum *Sciaenops ocellatus* in different estuarine habitat types. *Marine Ecology Progress Series* 238:227-236.
- Tarpgaard, E., Mogensen, M., Grønkjær, P. & J. Carl, 2005. Using short-term growth of enclosed 0-group European flounder, *Platichthys flesus*, to assess habitat quality in a Danish bay. *Journal of Applied Ichthyology* 21:53-63.
- Van der Veer, H.W., Berghahn, R. & A. Rijnsdorp, 1994. Impact of juvenile growth on recruitment in flatfish. *Netherlands Journal of Sea Research* 32:153-173.
- Vinagre, C., Cabral, H.N. & M.J. Costa, 2005. Selection of prey by flounder, *Platichthys flesus*, in the Douro Estuary, Portugal. *Journal of Fish Biology* 67:293-293.
- Vinagre, C., Fonseca, V., Maia, A., Amara, R. & H. Cabral, 2008. Habitat specific growth rates and condition indices for the sympatric soles *Solea solea* (Linnaeus, 1758) and *Solea senegalensis* (Kaup 1858) in the Tagus estuary, Portugal, based on otolith daily increments and RNA-DNA ratio. *Journal of Applied Ichthyology* 24:163-169.
- Whitfield, A.K., & M. Elliott, 2002. Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions for the future. *Journal of Fish Biology* 61:229-250.

Partie / part

IV

MESURES SUR SITES

/

ENVIRONMENTAL SURVEY

1 EVALUATION DE LA QUALITE DES EAUX DANS LA RIVIERE OUSE ET SES AFFLUENTS

1.1 Introduction

Les objectifs de ce projet étaient de procéder à une enquête de l'état de la qualité de l'eau dans le bassin versant du fleuve Ouse, afin de fournir des informations pour les futurs travaux de restauration et d'identifier des sites plus spécifiques nécessitant des enquêtes plus détaillées.

1.2 Analyses chimiques

Des bénévoles de l'association Sussex Ouse Conservation (SOCS) ont recueillis des échantillons d'eau sur des sites choisis dans le bassin versant chaque mois afin de mesurer:

- l'oxygène dissout
- l'ammonium
- les phosphates
- les nitrates

(Périodiquement, des lectures de pH ont également été effectuées)

D'après les données qui ont été accumulées au cours de la période 2007-2008, et en comparaison avec les données de 2005-2007, certaines tendances sont apparues à partir desquelles les conclusions ci-après peuvent être tirées.

1. Oxygène dissous

Comme on pouvait s'y attendre, les niveaux d'oxygène dissous ont tendance à baisser au cours de l'été, avec la réduction des flux et des températures plus élevées. Cela ne pose de problème que dans les cours d'eau où la vitesse d'écoulement est très faible et où des quantités importantes de matières

1 MONITORING OF WATER QUALITY IN THE SUSSEX RIVER OUSE AND ITS TRIBUTARIES

1.1 Introduction

The aim of this project was to undertake an investigation of the status of the water quality in the River Ouse catchment, which would provide information for future remediation work and which would identify sites requiring more specific detailed investigations.

1.2 Chemical analyses

Volunteers from the Sussex Ouse Conservation (S.O.C.S.) collected water samples from designated sites in the catchment every month and these were tested for:

- Dissolved Oxygen
- Ammonia
- Phosphate
- Nitrate

(Periodically pH readings are also taken)

From the data that has been accrued over the period 2007-2008, and in comparison with datasets from 2005-2007, certain trends were apparent from which the following conclusions may be drawn

1 Dissolved Oxygen

As would be expected, dissolved oxygen levels tend to fall during the summer, with reduced flows and higher temperatures. This only presents a problem in streams where the flow velocity is very low and significant amounts of decaying organic matter are present. The middle section of

organiques en décomposition sont présentes. Le milieu de la section Longford Stream a ces caractéristiques, les points de prélèvement étant Cinder et Ridgeland Hill Lane. (Tableau 1)

2. *Ammoniaque*

Les pics d'ammoniaque semblent se produire dans deux circonstances, soit en crue ou pendant les périodes de décharge très faibles.

Des valeurs élevées ont été trouvées dans de nombreux endroits sans caractéristiques particulières et sont probablement dues à des ruissellements agricoles, ou à des surcharges des installations de traitement des eaux usées, en particulier lorsque l'épuration combinée des eaux usées est en opération.

En revanche, il y a souvent un schéma particulier associé à de fortes concentrations d'ammoniaque lors de faibles débits. Ils ont tendance à se produire sur des points de prélèvement situés en aval de stations de traitement des eaux usées (STEP) (Tableau 2). Ceci est probablement dû à l'absence de dilution de l'effluent dans de telles circonstances.

3. *Phosphate*

Il est reconnu que les phosphates entrent dans le cours d'eau à partir de sources agricoles diffuses. Des niveaux très élevés ont été trouvés associés à des rejets de STEP, devenant éventuellement très importants en période de faible débit et, par conséquent, en absence de dilution. (Tableau 2)

4. *Nitrate*

Les niveaux de nitrates présentent une variation saisonnière, étant plus élevés au printemps. Cela pourrait être associé à l'épandage d'engrais, mais davantage de données sont nécessaires pour conclure en ce sens. (les mesures pour les nitrates n'ont commencé qu'en Septembre 2007).

the Longford Stream has these characteristics, the sampling points being Cinder Hill and Ridgeland Lane. (Table 1)

2. *Ammonia (recorded as N)*

Peaks of ammonia appear to occur in two circumstances; either in spate conditions or during times of very low discharge.

High readings during spate conditions have been found in many locations, with no demonstrable pattern and are probably due to either agricultural (stockyard) run off, or overloaded sewage treatment facilities, particularly when Combined Sewage Outflows come in to operation.

Conversely, there are often perceived patterns associated with high ammonia in low flow conditions and they tend to occur at sampling points below Sewage Treatment Works, (STW) outfalls. (Table 2). This is probably due to the lack of effluent dilution in such circumstances.

3. *Phosphate*

Whilst it is recognised that phosphate will enter the watercourse from diffuse agricultural sources, very high levels have been found associated with STW discharges, becoming greatly elevated in times of low flow and consequent lack of dilution. (Table 2).

4. *Nitrate*

Levels of nitrate appear to have a seasonal variation, being higher in the spring than at other times. This could be associated with fertiliser spreading, but more data is required to establish this (the Society only started testing for nitrate in September 2007).

1.3 Mesures biologiques

La Société a établi un programme de surveillance des invertébrés en utilisant le standard BMWP.

Méthode

Dans la mesure du possible, les enquêtes d'invertébrés sont effectuées dans les mêmes endroits que les mesures chimiques. Ceci permet de comparer les données recueillies. Considérant que les mesures chimiques fournissent de l'information sur la qualité de l'eau à un seul point dans le temps, les invertébrés permettent d'intégrer une période de temps. Parallèlement, les caractéristiques du site d'échantillonnage ainsi que la vitesse d'écoulement et le débit sont notées (Tableaux 3 et 4).

Des enquêtes invertébrés sont aussi menées sur d'autres sites à travers le bassin et, si les résultats indiquent qu'il y a un problème avec la qualité de l'eau, de nouveaux sites peuvent être ajouté au programme de mesures chimiques.

1.3 Biological Monitoring

The Society has established a programme of invertebrate monitoring utilising the standard Biological Monitoring Working Party (BMWP).

Method

Where possible, invertebrate surveys are carried out at the same locations as the chemical testing. This provides a facility for comparing the data collected. Whereas the chemical testing provides information on water quality at a single point in time, the invertebrate assessment gives some clue to the conditions that have pertained over a period of time. At the same time, notes are made on the characteristics of the sampling site together with flow velocity and discharge rate (Tables 3 & 4).

Invertebrate surveys are also undertaken at other sites throughout the catchment and if the results suggest that there is a problem with water quality, the location can be added to the chemical testing programme.

Table 1 : Qualité de l'eau. Mesures du 6 juillet 2008. Les chiffres en rouge indiquent les valeurs inacceptables
 Water quality test results for 6th July 2008. Figures in red indicate unacceptable limits

Site		NH ₃ (as N) mg/l	PO ₄ mg/l	Dissolved O ₂ mg/l	NO ₃ (as N)	Temp °C
BEVERN STREAM						
1	Spatham Lane	0.27	20.02	7.0	1.6	16.5
2	Swansyard Farm	0.77	2.4	5.8	1.8	16.0
3	Stoneywish	0.23	0.29	5.0	2.0	16.3
4	Holmans Rail Br.	0.33	26.5	8.1	3.0	17.0
Plumpton Mill Stream						
5	Old Mill (North)	0.09	0.03	8.7	2.4	16.8
6	Old Mill (South)	0.04	0.06	8.1	3.0	17.0
Longford Stream						
7	Cinder Hill	0.33	0.35	2.9	0.0	16.4
8	Ridglands lane	0.18	0.10	2.7	0.0	17.0
Northend Stream						
9	Cooksbridge	0.21	0.50	7.0	0.1	16.0
10	Hamsey Road	0.07	0.03	8.1	0.0	16.4
RIVER OUSE						
11	Scaynes Hill	0.11	1.08	7.8	0.5	16.4
12	East Mascalls	0.01	2.16	9.6	0.2	17.2
13	Sheffield Mill	0.05	1.67	8.4	0.7	16.7
14	Barcombe Mills	0.08	1.43	8.1	0.0	17.2
River Uck						
15	Owlsbury Farm	0.06	1.34	7.8	0.3	16.9
Shortbridge Stream						
16	Underhill	0.01	0.8	9.2	0.4	15.8
17	Shortbridge Road	0.13	0.07	8.0	0.0	16.8
Glynde Reach						
18	Glynde Bridge	0.06	0.94	6.2	0.0	18.7

Table 2: Mesures de la qualité de l'eau du 2 septembre 2006. Les conditions de faible débit permettent des valeurs élevées d'ammoniac et de phosphates dans les sites en aval des émissaires de STEP.
 Water quality test results for 2nd September 2006. Low flow conditions showing high ammonia and phosphate levels at sites below STW outfalls.

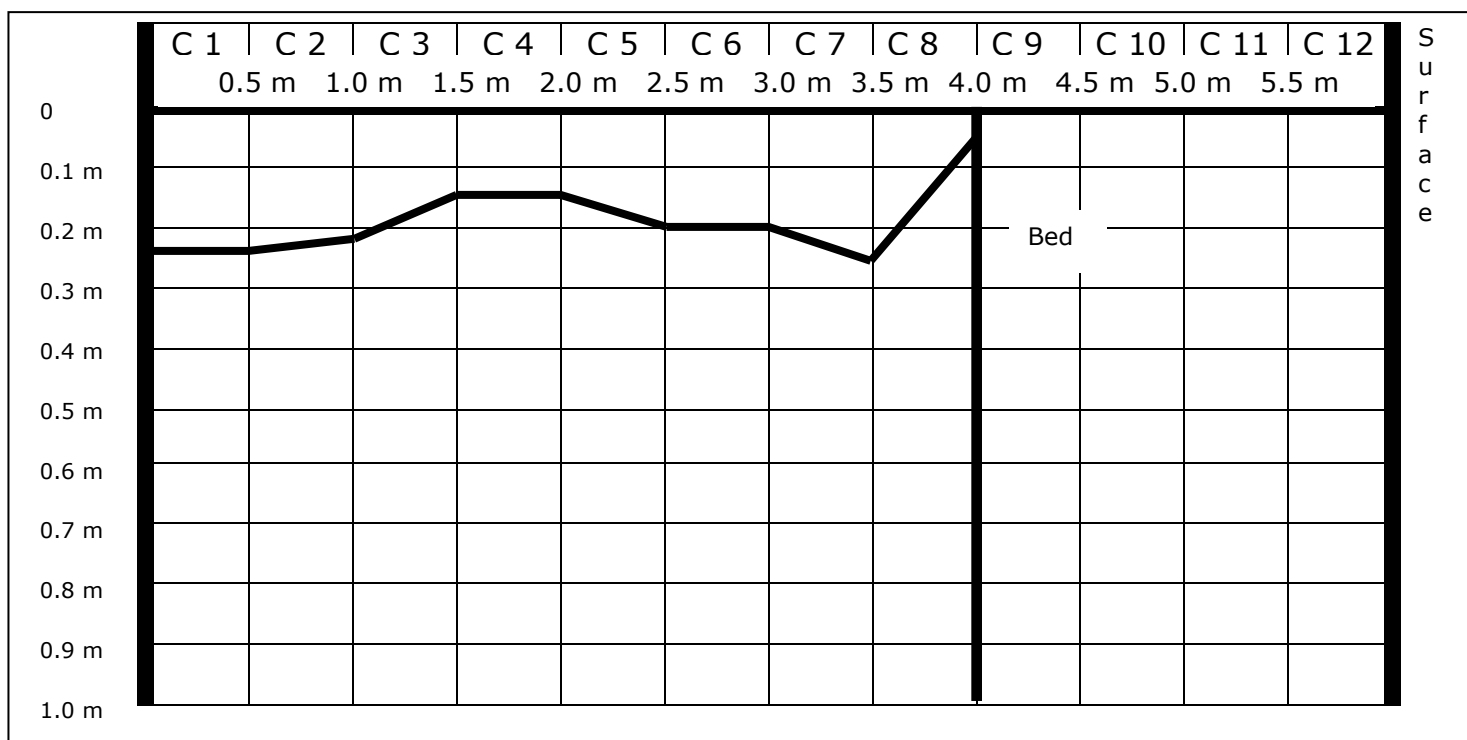
Site		NH ₃ (as N) mg/l	PO ₄ mg/l	Dissolved O ₂ mg/l	Temp °C
BEVERN STREAM					
1	Spatham Lane	0.41	24.3	7.8	16.6
2	Swansyard Farm	1.83	4.6	6.0	18.0
3	Streat Lane	0.44	15.8	6.3	17.3
4	Clappers Bridge	0.26	2.34	5.7	17.8
Plumpton Mill Stream					
5	Old Mill (North)	0.00	0.47	7.4	17.3
Longford Stream					
6	Ridgelands Lane	0.26	0.12	3.9	17.1
7	Longford Bridge	0.11	0.11	5.7	15.9
Northend Stream					
8	Cooksbridge	0.00	0.23	6.7	17.8
9	Hamsey Road	0.04	1.41	6.4	17.7
RIVER OUSE					
10	Scaynes Hill	0.13	1.85	7.2	18.1
11	Scaynes Hill Cut	0.12	3.37	5.4	17.0
12	Sheffield Mill	0.00	2.15	7.4	17.0
13	Barcombe Mills	0.00	2.11	6.5	17.2
River Uck					
14	Owlsbury Farm	0.00	1.42	7.5	17.3
Shortbridge Stream					
15	Underhill	0.00	0.10	8.6	15.8
Glynde Reach					
17	Glynde Bridge	0.19	14.1	1.5	16.9
18	Moor Lane	0.59	22.0	4.0	20.1

Table 3. Exemple de mesures des invertébrés. Données du site de Balcombe sur la rivière Ouse
 Example of invertebrate monitoring data from the Balcombe site on the River Ouse

Location		River Ouse, Cherry Lane, Balcombe		
Date		25/11/08		
Grid Reference		TQ 305 281		
Local Conditions		Riffle/glide over clay/fine gravel substrate with scattered large boulders and clumps of starwort. Open aspect moderate flow		
Water Velocity		0.26 m/sec		
Discharge Volume		0.20 m ³ /sec		
Also Netted		Water mites		
Biological Quality Rating		Good		
Water Quality Rating		Very good		
Type		Family	Score	Abundance
1.	Mayfly nymphs	Leptophlebiidae – <i>paraleptophlebia sp.</i>	10	2
2.	Mayfly nymph	Ephemeridae	10	1
3.	Cased caddis	Sericostomatidae – <i>S. personatum</i>	10	20
4.	Cased caddis	Odontoceridae – <i>O. albicorne</i>	10	15
5.	Cased caddis	Goeridae	10	14
6.	Cased caddis	Limnephilidae - <i>Limnephilus sp.</i>	7	1
7.	Caseless caddis	Polycentropodidae	7	1
8.	Shrimp	Gammaridae – <i>G. pulex</i>	6	30+
9.	Caseless caddis	Hydropsychidae	5	30+
10.	Crane fly larvae	Tipulidae	5	7
11.	Riffle beetles	Elminthidae – <i>E. aenea (adult)</i> , <i>Limnius volckmari (larvae)</i> , <i>Oulimnius sp. (adult)</i>	5	6
12.	Blackfly larvae	Simuliidae	5	15
13.	Diving beetle larva	Dytiscidae	5	1
14.	Flatworm	Dendrocoelidae – <i>D. lacteum</i>	5	1
15.	Mayfly larvae	Baetidae	4	2
16.	Leech	Glossiphoniidae – <i>G. complanata</i>	3	1
17.	Leech	Erpobdellidae – <i>E. octoculata</i>	3	1
18.	Hog louse	Asellidae	3	4
19.	Bivalves	Sphaeriidae	3	6

20.	Snails	Hydrobiidae – <i>Potamopyrgus jenkinsi</i>	3	6
21.	Snail	Lymnaeidae – <i>L. peregra</i>	3	1
22.	Midge larvae	Chironomidae	2	20+
23.	Worms	Oligochaetae - <i>Tubifex</i>	1	5
Total			12	
			5	
ASPT			5.	
			43	

Table 4. Exemple de mesures physiques effectuées sur chaque site d'échantillonnage. Les profondeurs sont mesurées à 0,5 m d'intervalle, sur la rive gauche, la largeur du ruisseau est de 4,0 m.
 Example of physical data collected from each sampling site. Depths measured at 0.5 m intervals across stream from left bank facing downstream, total stream width 4.0 m.



A : Les différentes colonnes d'eau sont divisées en rectangles (zone 1) et triangles (zone 2). Elles sont ensuite additionnées pour obtenir la section totale.

The individual water columns are divided into rectangles Area 1 and triangles Area 2 as appropriate; these are then added together to obtain total cross-sectional area

V : Vitesse d'écoulement (m / s) mesurée à environ 0,6 de la surface. Résultats arrondi à 2 décimales.

Flow velocity (m/s) measured at depth from surface approximately 0.6 of total depth. Results rounded to 2 decimal places.

Q : La décharge Q (m³ / s) est l'aire totale des colonnes d'eau multipliée par la vitesse d'écoulement V. La moyenne de la vitesse d'écoulement est de 0,26 m / s. La décharge totale par section est de 0,20 m³ / s

Discharge (m³/s) is the total cross-sectional area of the individual water column multiplied by the flow velocity V. Mean flow velocity through section is 0.26 m/s. Total discharge through section is 0.20 m³/s.

Données du 25 novembre 2008. Ouse, Cherry Lane, site TQ 305 281.

Stream Cross-Section and Flow Data for 25th November 2008. Ouse, Cherry Lane, site TQ 305 281

	Col 1	Col 2	Col 3	Col 4	Col 5	Col 6	Col 7	Col 8	Col 9	Col 10	Col 11	Col 12	Cols 1-12
A1	0.125	0.11	0.075	0.075	0.075	0.1	0.1	0.025					
A2	0.0	0.0075	0.0175	0.0	0.0125	0.0	0.0125	0.05					
1+2	0.125	0.1175	0.0925	0.075	0.0875	0.1	0.1125	0.075					0.79 m ² total
V	0.11	0.22	0.20	0.24	0.27	0.40	0.35	0.33					0.26 m/s mean
Q	0.01	0.03	0.02	0.02	0.02	0.04	0.04	0.02					0.20m ³ /s

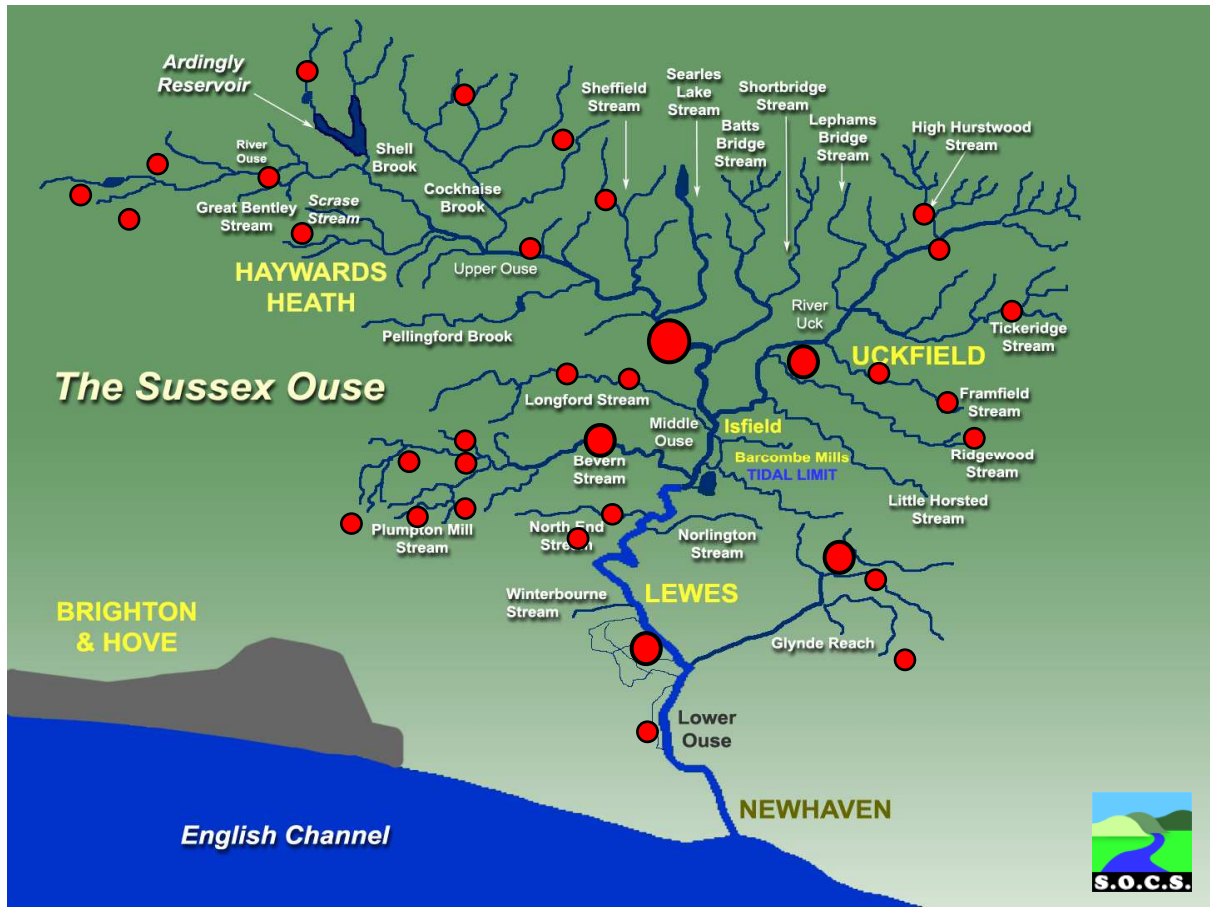


Figure 1. Taille des stations de traitement des eaux usées en fonctionnement sur le bassin de la rivière Ouse. Les points rouges indiquent les sites des plus grandes STEP du bassin versant ($m^3/jour$).

Size of sewage treatment works in the River Ouse catchment.

The red dots show the locations of the larger Sewage Treatment Works in the River Ouse catchment (m^3/day).

- = > 10,000
- = > 1,000
- = > 300

1.4 Conclusions

Aucun problème grave de qualité de l'eau n'a été identifié dans le cours principal de la rivière Ouse et une diversité satisfaisante des espèces d'invertébrés a généralement été trouvée. Bien que la rivière soit soumise à d'importants effluents, (fig. 1), la situation s'est améliorée au cours de l'été grâce

1.4 Conclusions

We have not identified any serious problems with water quality in the main stem of the River Ouse and a satisfactorily diverse population of invertebrate species is generally found. Whilst the river is subject to a heavy effluent load, (see fig. 1), the situation is

à la libération d'eau du réservoir d'Ardingly, maintenant artificiellement de hauts débits. Le flux compensé permet les prélèvements à Barcombe Mills pour l'alimentation en eau potable.

Des problèmes de qualité d'eau et de perte de biodiversité sont évidents dans certains affluents de la rivière Ouse. Les deux principales raisons semblent être le très faible débit d'été avec des assèchements dans certains endroits et le manque de dilution des effluents. La pollution diffuse, les événements orageux, l'envasement, la prolifération d'algues et d'autres facteurs jouent également un rôle. Un problème particulier a été identifié dans la partie supérieure du cours Bevern. On peut voir dans la figure 1 que ce cours d'eau reçoit un important rejet provenant de plusieurs STEP. Néanmoins, une faible diversité biologique d'invertébrés a aussi été notée en amont des émissaires et à proximité de la source de la South Downs (Tableau 5). Les raisons de cet état de faits ne sont pas claires.

Toutes les données relatives à la Société, les essais chimiques et les résultats de la surveillance des invertébrés sont publiés sur le site. www.sussex-ouse.org.uk

ameliorated during the summer by the release of water from Ardingly Reservoir, thus maintaining an artificially high flow. The compensated flow allows abstraction at Barcombe Mills for potable water supply.

Problems with water quality and consequent loss of biodiversity are apparent in some of the tributaries of the River Ouse. Two of the principal reasons appear to be very low summer flows with dry back in some locations and lack of effluent dilution. Diffuse pollution, severe spates from surface run off, siltation, algal blooms and other factors may also play a part. A particular problem has been identified in the upper reaches of the Bevern Stream. It can be seen in fig. 1 that this stream receives a considerable amount of effluent from several STWs in this area. Nevertheless, low invertebrate biodiversity has been noted in locations upstream of the outfalls and close to the source springs from the South Downs chalk block, (Table. 5). The reasons for this state of affairs are not clear.

All the data relating to the Society's chemical testing and invertebrate monitoring are published on its web site. www.sussex-ouse.org.uk

2. CARTOGRAPHIE DES COMPOSES ET PERTURBATIONS ESTROGENIQUES EN MANCHE ORIENTALE

2. MAPS OF ESTROGENIC COMPOUNDS AND EFFECTS IN THE MANCHE ORIENTALE REGION

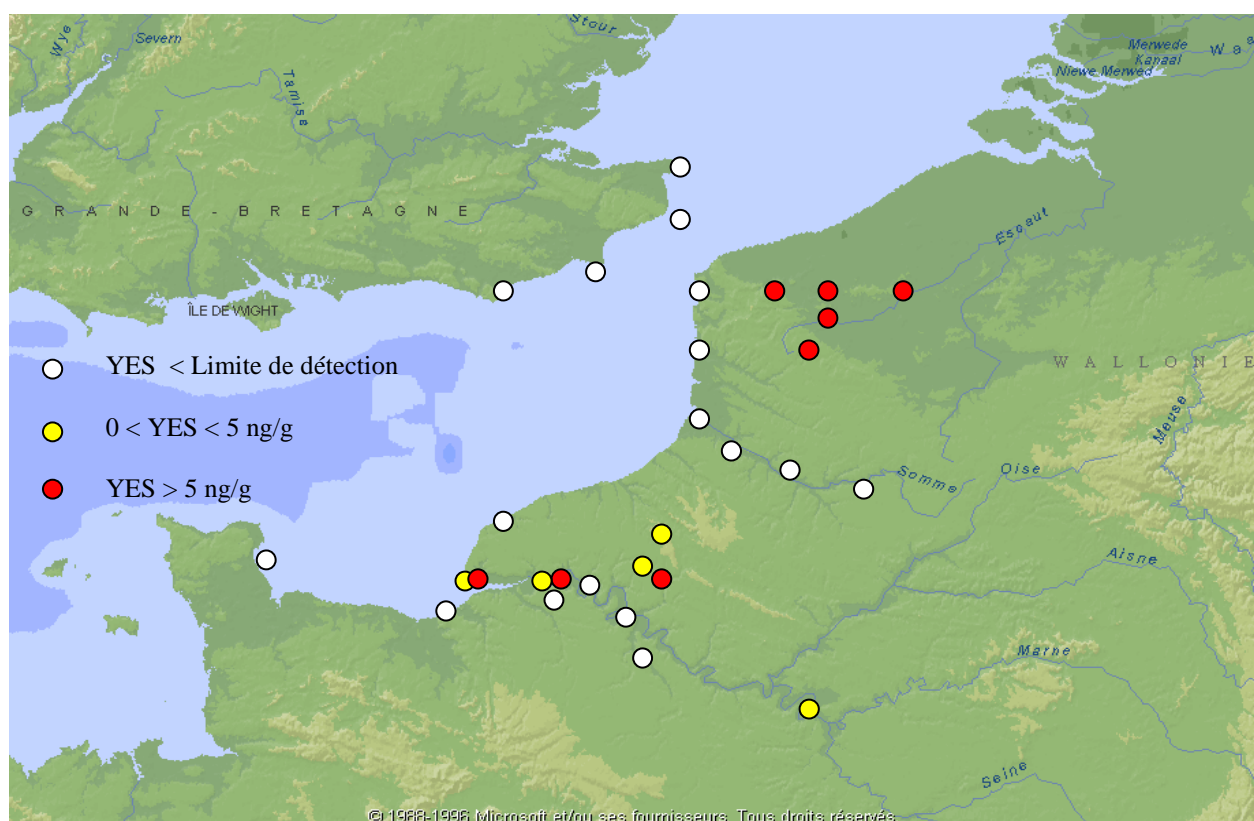


Figure 1 : Cartographie des activités œstrogéniques détectées sur extraits de sédiments.
Map of estrogenic activities of sediments extracts as assessed by the yeast estrogen screen (YES).

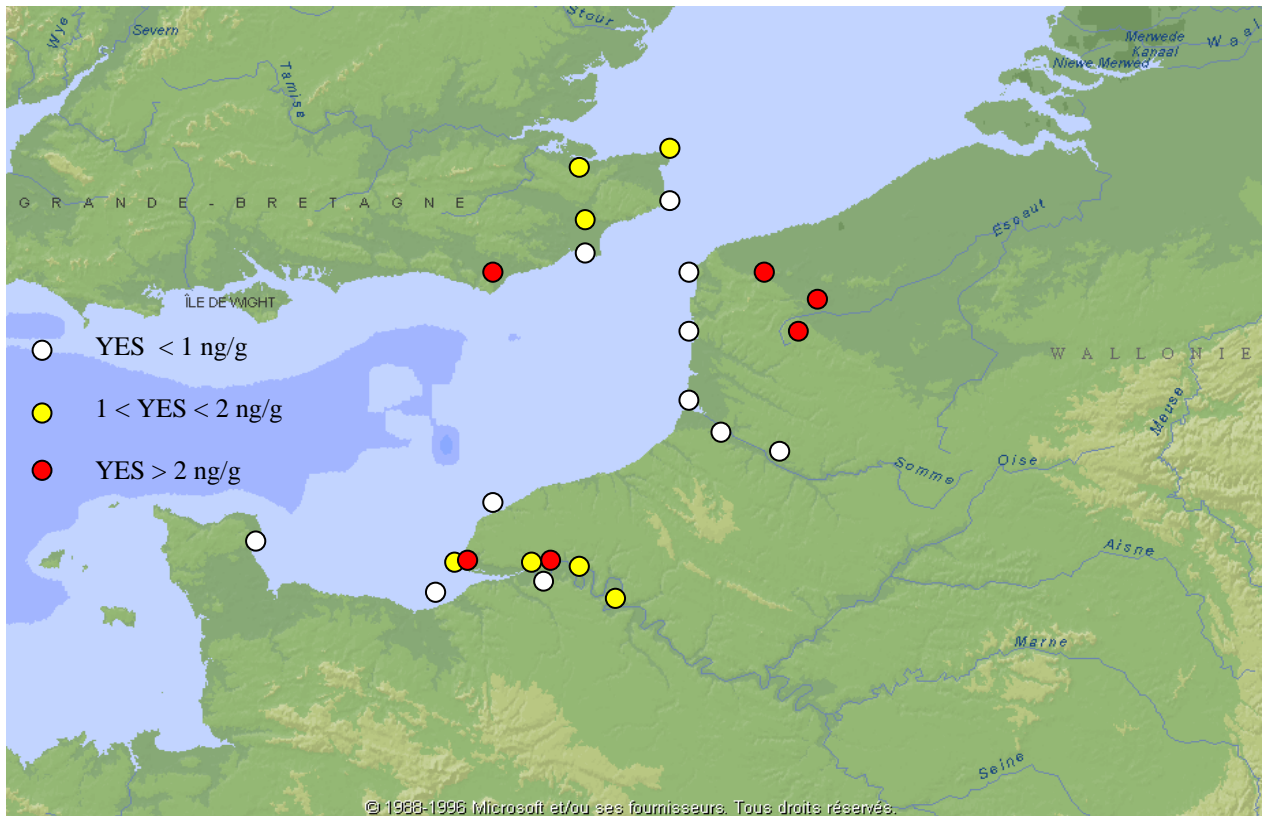


Figure 2 : Cartographie des activités œstrogéniques détectées sur extraits de moules.
 Map of estrogenic activities of mussel extracts as assessed by the yeast estrogen screen (YES).

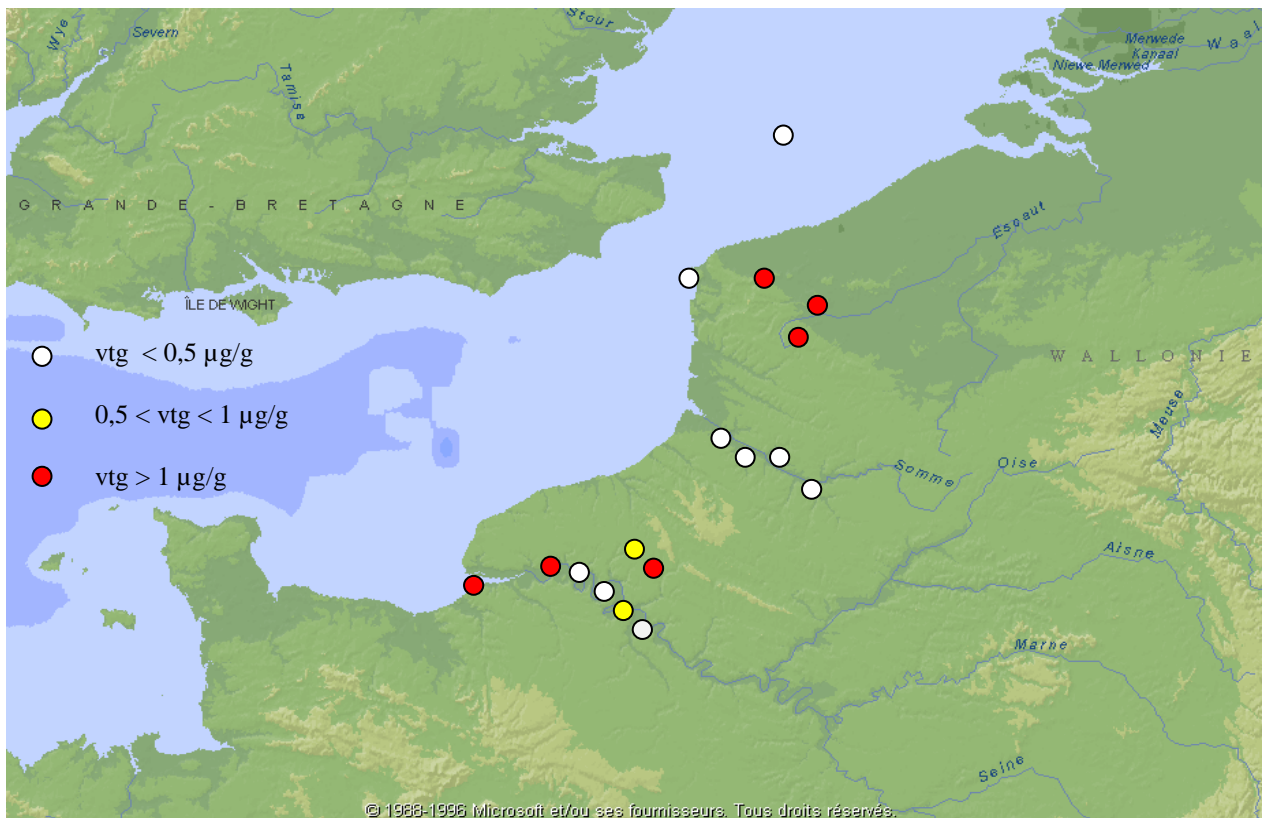


Figure 3 : Cartographie des concentrations de vitellogénine (vtg) détectés dans le plasma de gardons et de flet.
 Map of plasma vitellogenin (vtg) concentrations in roach and flounder.

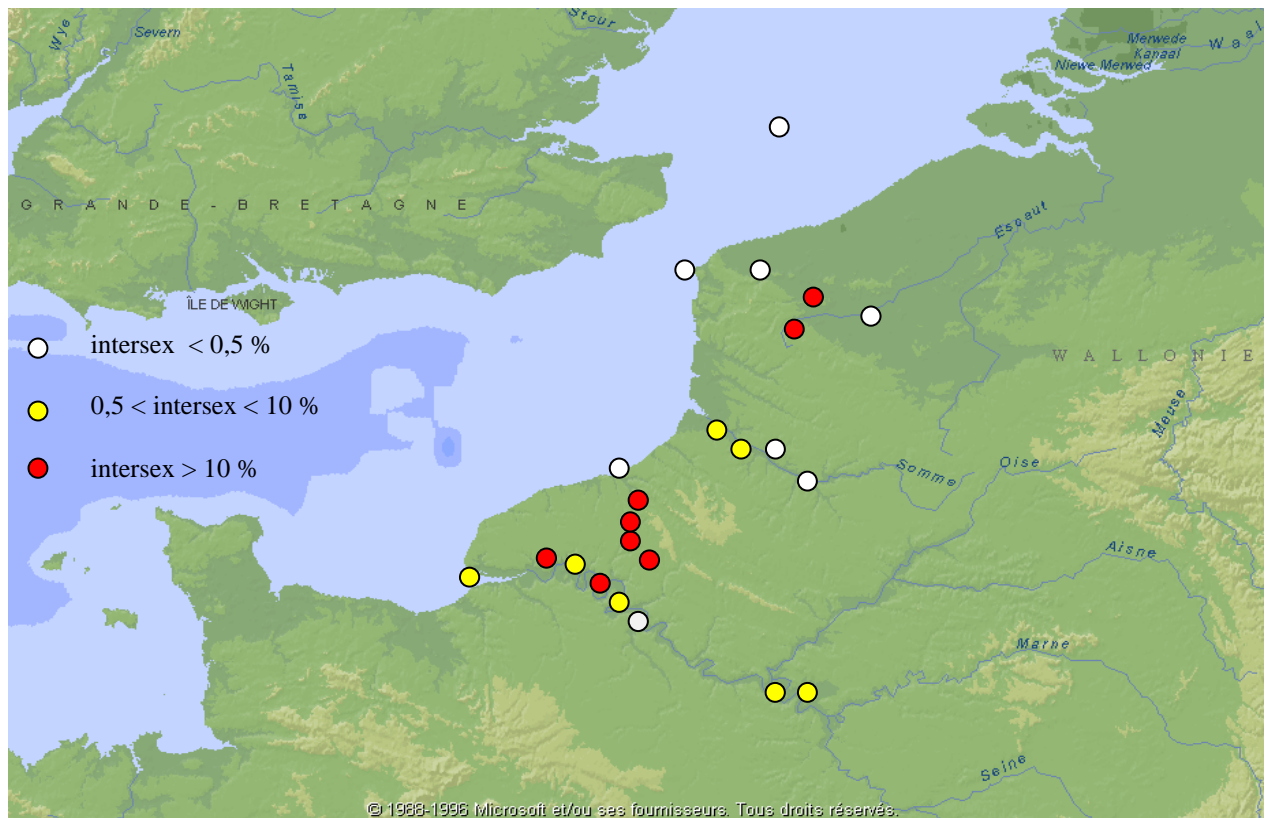


Figure 4 : Cartographie des pourcentages de poissons males intersexués (gardons et flets).
 Map of the occurrence of intersex roach and flounder.

Partie / part

V

COMMUNICATION DES RESULTATS

/

DISSEMINATION OF RESULTS

1 Introduction

Conformément aux objectifs inscrits dans le projet, les chercheurs ont investi beaucoup de leur temps pour communiquer sur les travaux réalisés. Cela implique tout d'abord des échanges entre chercheurs du projet au cours de prélèvements sur le terrain, expériences en laboratoire et réunions spécifiques. Les résultats et l'expérience acquis ont ensuite pu être disséminés vers différents publics :

- les institutions publiques au travers de réunions avec les partenaires du projet ou de réunions thématiques organisées par des tiers ;
- la communauté des pêcheurs grâce aux opérations de pêches ;
- les industriels au cours de congrès et réunions;
- le public par des participations à des opérations « grand public » ou des interviews télévisées ;
- les étudiants des universités car les résultats servent d'illustrations aux cours délivrés ;
- la communauté scientifique lors de congrès nationaux et internationaux.

Les rapports écrits sont de plus largement distribués et le site Internet du programme est disponible.

2 Conférences scientifiques

Communications orales

- E Hill: Investigating mechanisms of aquatic ecotoxicology using LC-MS based metabolomics. British Ecological Society workshop on Environmental Metabolomics, London October 2008
- E Hill: The Sexual Chemistry of Endocrine Disruption in Fish. University of Sussex, November 2008.
- E Hill: Unravelling toxicity responses in aquatic organisms using mass spectrometry based metabolomics. University of Birmingham, December 2008.

1 Introduction

In accordance with the objectives written in the project, researchers involved in the ARPE program have invested much of their time to communicate the results. Exchanges between researchers of the project took place during field samplings, experiments in laboratory and specific meetings. The results and expertise then could be disseminated towards different publics:

- public institutions through meetings with the partners of the projects or other meetings organized by thirds;
- fishermen during field samplings;
- industrials during congress and meetings;
- general public by participations in operations “general public” or by giving interviews to journalists;
- students of the universities because the results are used as illustrations when giving lectures;
- researchers during national and international congresses.

Reports are widely distributed and some results are available on the web.

2 Scientific meetings

Oral communications

- Knigge T., Monsinjon T., Denier X., Labadie P., Peck M., Puinean A-M., Rotchell J.M., Hill E.M., Minier C. Estrogenic active compounds in bivalve molluscs: physiological role in reproductive development and potential for endocrine disruption? World Congress of Malacology. Antwerp, Belgium, 15-20 July 2007.
- Minier C., Denier X., Géraudie P., Baudrimont M., Hill E.M. *In vitro* study of the effects of selected metals on the activation of the estrogen response element using the yes screen. PRIMO 14 symposium (Pollutant responses in marine organisms). Florianopolis, Brazil, May 6-9, 2007.
- Minier C., Cachot J., Law M., Pottier D., Schleis J., Peluhet L., Norris M., Budzinski H., Winn R. The use of embryos of the lambda *cii* transgenic medaka to assess short and long term effects of sediment-sorbed pollutants: application to sediments of the Seine Estuary (Normandy, France). PRIMO 14 symposium (Pollutant responses in marine organisms). Florianopolis Brazil, May 6-9, 2007.
- Minier C., Letendre J., Budzinski H., Durand F. Pgp expression in blue mussel during the tidal cycle. ABC transport proteins in environmental health and toxicology, Siena, Italy, 18-21 October 2007.
- Amara R., Selleslagh J., Minier C. Growth and condition of 0-group flounder, *Platichthys flesus*, in different estuarine habitat types: effects of anthropisation. ECI XII European Congress of Ichthyology Cavtat (Dubrovnik), Croatia 9-13 September 2007.
- Knigge T., Monsinjon T., Denier X., Labadie P., Peck M., Puinean A-M., Rotchell J.M., Hill E.M., Minier C. Estrogenic active compounds in bivalve molluscs: physiological role in reproductive development and potential for endocrine disruption? Workshop "Pearl Mussels in Upper Franconia and Europe", University of Bayreuth, 09 December - 11 December 2007.
- Minier C. Assessment of the effects of endocrine disrupters in the aquatic fauna. Workshop PRNPE, Angers, France, 10 mars 2008.
- Géraudie P., Hill E.M., Rotchel J.R., Ciocan C.M., Minier C. Intersex fish in wild populations of roach in French rivers. SETAC Europe annual meeting, Varsaw, Poland, 25-29 May 2008.
- Minier C., Géraudie P., Boulangé-Lecomte C., Gerbron M., Brion F., Hinfray N., Porcher J.-M., Hill E.M., Rotchell J. 2008. CYP19A and B gene expression and activity in Roach (*Rutilus rutilus*). 25th congress of the European Society of Comparative Biochemistry and Physiology. Ravenna, Italy, 7-11, 2008.

3 Communication au public

Les membres du programme communiquent volontiers avec toute personne intéressée. Certaines rencontres spécifiques avec le public et des journalistes ont conduit à une large diffusion des résultats.

Présentations orales à des meetings

- J Rotchell: 'Aquatic organisms on the pill?' Presentation to public at Café Scientifique, Brighton, May 2008.

3 Dissemination to the general public

Members of the ARPE program have participated in meetings and have given interviews to explain their results.

Oral presentations at meetings

- E Hill: 'Perturbations endocriennes dans les milieux aquatiques au Royaume - Uni.' Colloque « Les perturbateurs endocriniens et la qualité des milieux aquatiques » organisé par l'Agence de l'eau Artois-Picardie Lille, le mardi 23 octobre 2007
- C. Minier. « *Les effets des perturbateurs endocriniens sur la faune aquatiques en Manche Orientale* ». Colloque « Les perturbateurs endocriniens et la qualité des milieux aquatiques » organisé par l'Agence de l'eau Artois-Picardie, Lille, 23 novembre 2007.
- C. Minier « *Les effets des perturbateurs endocriniens sur la faune aquatiques* ». Les journées de l'environnement – Ecoconception dans les bioindustries. Ecole de Biologie Industrielle, Cergy-Pontoise, 17 janvier 2008
- E Hill: 'Investigating mechanisms of aquatic ecotoxicology using LC-MS based metabolomics'. British Ecological Society workshop on Environmental Metabolomics, London October 2008.
- C. Minier. « *Les perturbations endocriniennes* ». L'écotoxicologie. Action nationale de formation du CNRS. Saint-Valéry-sur-Somme, 29 septembre-2 octobre 2008.
- E Hill: *The Sexual Chemistry of Endocrine Disruption in Fish*. University of Sussex, November 2008.
- E Hill: 'Unravelling toxicity responses in aquatic organisms using mass spectrometry based metabolomics'. University of Birmingham Dec 2008

Participation à des émissions télévisées nationales *National television programs*

- Santé et environnement, Enquête de santé (France 5), 15 mai 2008
- « Comme un poison dans l'eau », Envoyé spécial (France 2), 22 mai 2008

8.4 Publications scientifiques

8.4 Publications

Articles scientifiques

Scientific articles

1. Denier, X.; Couteau, J.; Baudrimont, M.; Hill, E. M.; Rotchell, J.; Minier, C. 2008. In vitro study of the effects of cadmium on the activation of the estrogen response element using the YES screen, *Marine Environmental Research*, 66, 108-110.
2. Labadie, P., Cundy, A.B., Stone, K., Andrews, M., Valbonesi, S., and Hill, E.M. 2007 Evidence for the migration of steroidal estrogens through river bed sediments. *Environ. Sci. and Technol.* 41 4299-4304.
3. Peck, M.R. Labadie, P., Minier C., and Hill, E.M. 2007. Profiles of endogenous and exogenous estrogens in the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere.* 69 1-8.
4. Labadie, P. and Hill, E.M. 2007. Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography- electrospray ionisation mass spectrometry: Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1141 174-181.

5. Labadie, P., Peck, M. R. Minier, C. and Hill, E.M. 2007. Identification of steroid fatty acid conjugates formed in the blue mussel *Mytilus edulis* as a result of exposure to estrogens. *Steroids*. 72 : 41-49.
6. Puinean, M. Labadie, P. Hill, E. M. Osada, M. Kishida, M. Nakao, R Callard, I. P. Rotchell J. M. 2006. Laboratory exposure to 17 β estradiol fails to induce vitellogenin and estrogen receptor gene expression in the marine invertebrate *Mytilus edulis*. *Aquatic Toxicol.* 79 376-383.
7. Denier X., Hill E.M., Gallien-Landriau I., Brion F., Porcher J.M., Minier C. Investigation of estrogenic contamination in the Seine estuary: Plasma vitellogenin and estrogenicity identification evaluation of flounder (*Platichthys flesus*) bile content. *Aquat. Toxicol.* soumis
8. Denier X., Hill E.M., Rotchell J., Minier C. Estrogenic activity of cadmium, copper and zinc in the yeast-estrogen screen. *Toxicol. In Vitro.* Sous presse.
9. Maltret-Géraudie P., Gerbron M., Minier C. 2008. Estrogenic response of wild roach from the Seine River (France). *Cybiurn* 32(2): 256-257.
10. Amara R., Selleslagh J., Billon G., Minier C. Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia*. Sous presse.
11. Minier, C., Amara R. 2008. From pollution to altered fish physiological performance; the case of flatfish in the Seine estuary. In Amiard-Triquet *A comprehensive methodology for the assessment of the health status of estuarine ecosystems*. Taylor and Francis. Soumis.

Résumés de conférences

Conference abstracts:

- Labadie, P., Cundy, A.B., Andrews, M., and Hill, E.M. 2007. Evidence for the migration of steroidal estrogens through river bed sediments. 17th European Meeting SETAC, Porto.
- Labadie, P., Andrews, M., Cundy, A.B., and Hill, E.M. 2006. Determination of environmental estrogens in river sediments using LC-MS/MS, LC-TOF analyses and receptor assay screening. 16th European Meeting SETAC, Hague.
- Evans, K., Valbonesi, S., Mckechnie, E., Cundy, A.B., and Hill, E.M. 2005. Depth profiles of estrogenic contaminants in river bed sediments. 15th European Meeting SETAC, Lille.
- Evans, K., and Hill, E.M. 2005. Occurrence of (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities in effluents of UK wastewater treatment works. 15th European Meeting SETAC, Lille.
- Geraudie P., Hinfray N., Brion F., Denier X., Hill EM., Porcher J-M. & Minier C. 2008. Cytochrome P450 expression in roach: potentials as biomarker of endocrine disruption. *Mar. Environ. Res.* 66 : 123.
- Geraudie P., Gerbron M., Hill EM., Rotchel JR. & Minier C. 2008. Intersex fish in wild populations of roach in French rivers. SETAC Europe 18th Annual Meeting. ET03A-3: 111-112.
- Minier C., Géraudie P., Boulangé-Lecomte C., Gerbron M., Brion F., Hinfray N., Porcher J.-M., Hill E.M., Rotchell J. 2008. CYP19A and B gene expression and activity in Roach (*Rutilus rutilus*). *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Biochem. Physiol.* A151: S4.

Thèses soutenues

PhD thesis

Xavier DENIER. 2008. Occurrence et étiologie de perturbations endocriniennes chez les organismes aquatiques ; Application du test fonctionnel « Yeast estrogen screen ». Université du Havre. Thèse avec label européen.

Jonathan Selleslagh. 2008. Fonctionnement des nourriceries intertidales et estuariennes : Influence de l'environnement sur la dynamique et les performances physiologiques de l'ichtyofaune. Université du Littoral – Côte d'Opale.

Partie / part

VI

CONCLUSIONS

Les objectifs du projet ont été majoritairement atteints.

- Des informations pertinentes ont été générées afin de décrire les effets de la pollution par les xéno-estrogènes dans la région éligible.
- De nouveaux outils ont été testés et validés pour l'évaluation de l'état de santé de l'environnement. Un effort particulier a été fourni pour utiliser les mollusques.
- La compétence des partenaires chercheurs et étudiants s'est accrue grâce aux échanges importants entre les groupes représentant différentes disciplines.
- Une dissémination importante des résultats a été effectuée, montrant l'importance des travaux et l'implication des organismes financeurs.

Major objectives of the project have been completed.

- Relevant information has been generated to describe the effects of pollution and especially xeno-estrogènes in the eligible region.
- New tools have been tested and validated for assessment of the health of the environment. A special effort has been made toward the use mollusc species.
- The competence of researchers and students has increased through intensive exchanges between groups from different scientific disciplines.
- A significant dissemination of the results has been achieved, showing the importance of the work and the involvement of funding agencies.