



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES DES ORGANISMES ET ÉCOLOGIE

Étude de l'efficacité d'élimination des xénoestrogènes par différents types de stations d'épuration Wallonnes et de l'impact de leurs effluents par une approche combinée in vitro et in vivo

Depiereux, Sophie

Award date:
2009

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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

Université catholique de Louvain
Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix
Départements de biologie



Étude de l'efficacité d'élimination des xénoestrogènes par différents types de stations
d'épuration Wallonnes et de l'impact de leurs effluents par une approche combinée
in vitro et *in vivo*

Depiereux Sophie

Mémoire présenté en vue de l'obtention
du Master en biologie des organismes et écologie

Promoteur(s) : Patrick Kestemont (FUNDP)

2008-2009

NOTE IMPORTANTE

Deux articles ont été rédigés (et le premier soumis) sur base de ce mémoire :

1. Performance of the flow cytometric E(strogenicity)-screen in compound screening and evaluation of estrogen removal efficacy of sewage treatment plants

Caroline Vanparys^{1*}, Sophie Depiereux², Stéphanie Nadzialek², Johan Robbens¹, Ronny Blust¹, Patrick Kestemont², Wim De Coen^{1,3}

¹Laboratory of Ecophysiology, Biochemistry and Toxicology, University of Antwerp, Antwerp, Belgium

²Research Unit in Organismal Biology (URBO), University of Namur (FUNDP), Namur, Belgium

³European Chemicals Agency (ECHA), Helsinki, Finland

2. Impact of sewage treatment plant on wild fish population, a survey in Walloon region

Stéphanie Nadzialek, Sophie Depiereux, Robert Mandiki and Patrick Kestemont

The University of Namur (FUNDP), Unité de Recherche en Biologie des Organismes (URBO), 61 rue de Bruxelles, B-5000 Namur, Belgium. patrick.kestemont@fundp.ac.be, Tel: 0032(0)81724363, Fax: 0032(0)81724362.

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Étude de l'efficacité d'élimination des xénoestrogènes par différents types de stations d'épuration Wallonnes et de l'impact de leurs effluents par une approche combinée *in vitro* et *in vivo*

DEPIEREUX Sophie

Résumé

Les xénoestrogènes (eEDC) sont des composés connus pour les perturbations qu'ils induisent chez les poissons. Les effluents domestiques et industriels constituent leur voie d'entrée majeure dans l'environnement aquatique et les stations d'épuration (STEP), si elles les éliminent mal, sont susceptibles de les concentrer ponctuellement, voire de les transformer en substances plus actives. Afin de comparer l'efficacité de l'élimination des eEDC par différents processus épuratoires, nous avons testé *in vitro* l'activité oestrogénique de l'influent et de l'effluent de dix STEP sélectionnées en Région Wallonne. Les résultats indiquent que, malgré une élimination quantitative élevée de l'oestrogénicité (60-98%), des quantités non négligeables de xénoestrogènes sont rejetées dans l'environnement (0,5-8 ng/L). Une représentation graphique originale des performances des STEP permet leur classement en fonction de leurs qualités d'élimination quantitative et qualitative des xénoestrogènes.

Deux STEP nous ont permis de récolter le matériel nécessaire à une approche *in vivo*. Des goujons ont été prélevés en amont et en aval des rejets, et différents biomarqueurs du contact avec les xénoestrogènes ont été mesurés chez les mâles. Bien qu'aucune différence significative n'apparaisse entre l'amont et l'aval pour l'expression de la vitellogénine et le RGS ($p > 0,05$), l'analyse histopathologique révèle la présence de mâles intersexes sur les deux stations et les deux sites. Dans les limites de cette étude, nous ne pouvons cependant pas affirmer qu'il y ait un impact des ces deux STEP sur la population de goujon.

Au terme de ce travail, j'aimerais remercier tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à sa réalisation.

Tout d'abord je tiens à remercier monsieur Kestemont, promoteur de ce mémoire, de m'avoir intégrée dans son laboratoire.

Je remercie également Stéphanie Nadzialek pour son investissement et son aide sur le terrain et au laboratoire.

Merci également à André Evrard et Yves Mine pour m'avoir aidée à organiser les pêches électriques réalisées au cours de cette étude. Merci à Stéphanie, Neil (désolée pour tes bras !), Emilie, Sophie et Jessica, courageux volontaires sans qui ces pêches n'auraient pas été possibles. Jessica, je te remercie aussi pour tes bons conseils donnés avec patience et pour toute l'aide que tu m'as apportée. Je tiens également à remercier Bernard Grolinger, détourné de sa cueillette aux champignons pour nous venir en aide et qui s'est avéré être le porte-bonheur de ces pêches.

Je remercie aussi les autres membres du labo (Robert, Sylvain, Marie-Claire, Fabien, Frédérique...) pour les différents conseils et les encouragements durant la réalisation de ce mémoire.

Je remercie également le département d'écophysiologie, de biochimie et de toxicologie d'Anvers de m'avoir accueillie lors de la réalisation des tests cellulaires, et particulièrement Caroline Vanparys pour toute son aide, son énergie et son efficacité.

Merci à l'équipe du professeur Poumay, et particulièrement à Daniel, de m'avoir accueillie et conseillée lors de la réalisation des coupes histologiques.

Merci à Remy Frere de la SPGE pour son efficacité et son aide.

Merci à Guillaume et Pépit (quand même !), sur qui j'ai toujours pu compter pendant toutes mes années d'études et sans qui elles n'auraient pas été aussi amusantes.

Je tiens enfin à remercier particulièrement mon père pour sa disponibilité, sa patience (qui a ses limites !) et ses bons conseils. Merci également à toute ma famille, maman, mes frères et sœurs et mon petit Sam, pour leur soutien quotidien et pour m'avoir supportée pendant tous les blocus et ce mémoire.

LEXIQUE

AP : alkylphenol
APEC : alkylphenol carboxylates
APEO : alkylphenol polyéthoxylate
BA: boues activées
BN : bactéries nitrifiantes
BPA : Bisphenol A
CDFBS: Charcoal-dextran fetal bovine serum
DBO₅ : demande biochimique en oxygène en 5 jours
DCO: demande chimique en oxygène
DES: diéthylstilboestrol
E1 : Estrone
E2 : 17b-estradiol
E3 : Estriol
EC50 : concentration effective pour 50% de réponse
EDC: endocrine disrupting compounds
EE2 : 17a-éthinyloestradiol
Effluent: eau épurée sortant du système épuratoire
EO : éthoxylates
ER: récepteur oestrogénique
ERE : estrogen-responsive elements
HRT: temps de rétention hydraulique
Influent: eau usée entrant dans un système épuratoire
IP: iodure de propidium
MF: microfiltration
NF:nanofiltration
NP : Nonylphenol
NP1EC : nonylphénols carboxylates
NP1EO : nonylphénols monoéthoxylates
NP2EC : nonylphénols éthoxycarboxylates
NP2EO : nonylphénols diéthoxylates
NPEO : Nonylphénol ethoxylate
OP : octylphénol
OP1EC : octylphénol carboxylates
OP2EC : octylphénol éthoxycarboxylates
OPEOs : octylphénol éthoxylates
PAH: hydrocarbures aromatiques polycycliques
PBDE : polybromodiphényl éther
PCB: Polychlorobiphényles
RO: osmose inverse (reverse osmosis)
RPE : effet prolifératif relatif à E2
SRT: âge des boues (sludge retention time)
STEP: station d'épuration
T: testostérone
UF: ultrafiltration

TABLE DES MATIERES

1	CADRE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE	2
2	SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	3
2.1	<i>Les xénoestrogènes</i>	3
2.1.1	Perturbateurs endocriniens	3
2.1.2	Xénoestrogènes	3
2.1.3	Effet des xénoestrogènes	6
2.2	<i>Les stations d'épuration</i>	11
2.2.1	Définition	11
2.2.2	Composition des effluents de station d'épuration	13
2.2.3	Potentiel oestrogénique des effluents	13
2.2.4	Effets des effluents de STEP sur les poissons situés en aval du rejet	14
2.2.5	Efficacité d'élimination des xénoestrogènes	15
2.3	<i>Méthodes de détermination de l'activité oestrogénique</i>	19
2.3.1	Méthodes chimiques	19
2.3.2	Méthodes biologiques	19
3	MATERIEL ET METHODES	23
3.1	<i>Analyse de l'oestrogénicité de l'eau par méthode in vitro</i>	23
3.1.1	Échantillonnage sur le terrain	23
3.1.2	Traitement de l'eau (adaptation du protocole de Leush et al. (2006))	24
3.1.3	Mesure du potentiel oestrogénique	24
3.2	<i>Analyse de l'oestrogénicité de l'eau par méthode in vivo</i>	26
3.2.1	Choix des sites de pêche	26
3.2.2	Échantillonnage sur le terrain	26
3.2.3	Prélèvement du matériel biologique	27
3.2.4	Analyse des biomarqueurs d'exposition des poissons aux xénoestrogènes	28
3.3	<i>Analyses statistiques</i>	31
3.3.1	Efficacité d'élimination des xénoestrogènes par les STP	31
3.3.2	Analyse des biomarqueurs d'exposition aux xénoestrogènes	33
4	RESULTATS	34
4.1	Efficacité d'élimination des substances oestrogéniques	34
4.1.1	Test du bloquant	34
4.1.2	Analyse de l'oestrogénicité	34
4.2	<i>Analyse des bioindicateurs de contact avec les xénoestrogènes</i>	36
4.2.1	Expression du gène de la vitéllogénine dans le foie de goujon	36
4.2.2	Rapport gonado-somatique ou RGS	37
4.2.3	Histologie des gonades	37
5	DISCUSSION	39
5.1	<i>Efficacité d'élimination des Xénoestrogènes par les STEP</i>	39
5.2	<i>Impact des STEP sur le vivant</i>	43
5.2.1	Paramètres morphologiques : RGS	43
5.2.2	Expression de la vitéllogénine	44
5.2.3	Paramètres histologiques	45
6	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	47

CADRE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

1 CADRE ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Depuis quelques années, l'occurrence, le devenir et l'impact des perturbateurs endocriniens dans l'environnement aquatique est un sujet important traité par les scientifiques. En effet, il a été mis à jour qu'un grand nombre de composés anthropogéniques libérés dans l'environnement peuvent agir comme des perturbateurs du système endocrinien (EDCs : endocrine disruptive compounds) des invertébrés et des vertébrés. Les milieux aquatiques sont les plus touchés, étant de manière générale les réceptacles ultimes des pollutions humaines. Les EDCs ont la propriété d'imiter les hormones endogènes en ayant des modes d'action similaires et, de cette façon, sont à même d'altérer le bon fonctionnement du système endocrinien (ensemble de processus biologiques assurant la régulation de nombreuses réactions vitales au sein d'un organisme). Parmi ceux-ci, les xénoestrogènes sont capables de perturber l'activité oestrogénique du vivant.

Durant les cinquante dernières années, la consommation d'oestrogènes synthétiques par la médecine humaine et animale a beaucoup augmenté. On s'est également rendu compte que beaucoup de déchets industriels présentaient des effets oestrogéniques non négligeables. Ces composés se regroupent sous le nom de xénoestrogènes. Différents effets de perturbation oestrogénique ont été observés chez les poissons de rivière, notamment une féminisation des poissons mâles adultes et juvéniles (production de protéine femelle, intersexe).

L'installation de stations d'épurations (STEP) afin de limiter le phénomène d'eutrophisation des cours d'eau permet également d'éliminer certains polluants présents en trace. Néanmoins, leur limitation quant à l'élimination de certaines substances, telles que les xénoestrogènes, en font des sources ponctuelles de pollution. En effet, n'étant pas intercepté dans les processus d'épuration, ces composés sont rejetés de façon concentrée dans les rivières et peuvent atteindre des valeurs capables d'induire des effets délétères sur le vivant. Il a été clairement établi depuis une dizaine d'années que les perturbations endocrines observées chez des poissons sauvages sont associées aux effluents d'eaux usées et aux substances biologiquement actives contenues dans celles-ci.

Les objectifs de ce travail sont (i) de comparer l'efficacité d'élimination des xénoestrogènes par différents types de station d'épuration Wallonnes et (ii) de voir si certains processus d'épuration représentent une source de pollution pour les poissons sauvages.

Dans un premier temps, nous avons mesuré le potentiel oestrogénique de l'eau avant et après traitement, sur 10 stations d'épuration sélectionnées en Région Wallonne. Sur base de ces résultats, des pêches électriques ont été réalisées en amont et en aval direct des effluents de trois de ces stations afin d'analyser différents biomarqueurs (histologiques et biomoléculaire) du contact des poissons avec des xénoestrogènes. Le goujon (*Gobio gobio*), espèce positive à ces biomarqueurs, a été sélectionné pour cette seconde partie du travail.

Ce travail est subdivisé en quatre parties. La première partie consiste en une synthèse bibliographique des connaissances actuelles sur les xénoestrogènes (origine, devenir et impact), sur les stations d'épuration (avec une présentation des différents types existant et leur efficacité à éliminer les xénoestrogènes), et enfin les différentes méthodes de détermination de l'activité oestrogéniques (chimiques et biologiques, *in vivo et in vitro*). La seconde partie détaille le matériel et les méthodes utilisés lors de cette recherche. La troisième partie décrit les résultats obtenus, qui sont ensuite interprétés dans la quatrième partie.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

Table 1
Structures and characteristics of selected endocrine disrupting compounds.

Name	Structure	Nonylphenol ^a	4-Octylphenol ^a	Bisphenol A ^b	Estrone ^c	17 β -Ethinyl-estradiol ^d	Genistein
Molecular weight		220.35	206.42	228.28	230.37	296.41	230.24
Molecular Formula		C ₁₅ H ₃₂ O	C ₁₄ H ₂₂ O	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	C ₁₈ H ₁₆ O ₂	C ₂₇ H ₄₂ O ₂	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
Solubility (mg/l)		1.66	4.52	139.6-296.8	0.8-12.4	19.1	28 ^d
LogK _{ow} ^e		5.76	5.83	2.20	3.43	3.67	3.04 ^f
pK _a ^g		10.25	10.24	9.59	10.34	10.21	9.5 ^h

^a From Holbrook et al. (2004); ^b From Sharsel et al. (2006); ^c K_{ow} = octanol-water partitioning coefficient; ^d From Kneer et al. (1989); ^e From Rothwell et al. (2005); ^f From Muleed and Shepherd (2000).

Figure 2.1 : structure moléculaire des principaux xénoestrogènes, Lee *et al.* (2007). Les composés oestrogéniques présentent une grande diversité structurale, mais ont tous en commun les cycles phénols lipophiles et d'autres composants hydrophobes, caractéristique qu'ils partagent avec les hormones stéroïdes et les composés activant les récepteurs nucléaires.

2 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 Les xénoestrogènes

2.1.1 Perturbateurs endocriniens

Selon Kavlock *et al.* (1996), un perturbateur endocrinien (EDC : endocrine disrupting compounds) peut être défini comme un agent exogène qui interfère avec la synthèse, la libération, le transport, la liaison, l'action ou encore l'élimination d'hormones corporelles naturelles responsables du maintien de l'homéostasie et de la régulation des processus de développement. Selon une étude menée par l'Union Européenne (2001), 124 substances variées (médicaments, pesticides, hormones synthétiques, surfactants, composés industriels divers,...) ont été reconnues comme des perturbateurs endocriniens. Il reste 435 substances supposées qui sont à évaluer. On compte 3 classes principales d'EDCs : les EDCs oestrogéniques (ou anti- oestrogéniques), androgéniques (ou anti- androgéniques) et les EDCs thyroïdiens (Snyder *et al.*, 2007). Dans ce travail, nous allons nous pencher sur les EDCs oestrogéniques (eEDC), ou xénoestrogènes.

2.1.2 Xénoestrogènes

Les xénoestrogènes font partie de la grande famille des perturbateurs endocriniens. Ils peuvent être répartis en 4 classes principales à savoir les *oestrogènes naturels* [estrone (E1), 17 β -oestradiol (E2), estriol(E3)], les *oestrogènes synthétiques* [éthynyloestradiol (EE2), mestranol, diéthylstilboestrol (DES)], les *phyto- et myco-oestrogènes* (genistein, β -sitostérol, coumestrol - zearalenol) et les *composés chimiques industriels* [surfactants non-ioniques : alkylphenols ethoxalate (APEO), et ses métabolites 4-nonylphénol (NP) et 4-octylphénol (OP) ; pesticides tels que atrazine, DDT, endosulfan, dieldrine et toxaphene ; bisphénol A (BPA), chlordecone et phtalates]. Ce sont des molécules chimiques dont la structure s'apparente aux oestrogènes naturels et qui entraînent des effets similaires sur le vivant (**Figure 2.1**). Les composés oestrogéniques présentent une grande diversité structurale, mais ont tous en commun les cycles phénols lipophiles et d'autres composants hydrophobes (Watson *et al.*, 2007). D'autres EDCs peuvent agir comme *anti-oestrogènes*, c'est le cas des dioxines chlorées, des furanes, divers congénères de Polychlorobiphényles (PCB), des hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAH), ainsi que des antagonistes des récepteurs oestrogéniques (tamoxifène et hydroxytamoxifène) (Carballa *et al.*, 2004 ; Gutendorf and Westendorf, 2001).

2.1.2.1 Origine

Les EDCs sont abondants et peuvent se disperser rapidement dans l'environnement. Ils sont libérés dans l'atmosphère par les activités d'incinération (micropolluants industriels : PCB, PAH, dioxines), dans les sols par pulvérisation de pesticides organochlorés et déposition atmosphérique des particules et aérosols, dans l'eau par rejet via les systèmes d'égouttages (station d'épuration, effluents urbains ou industriels) ou par la pluie et les ruissellements en provenance du bassin versant. De même, une fraction importante des

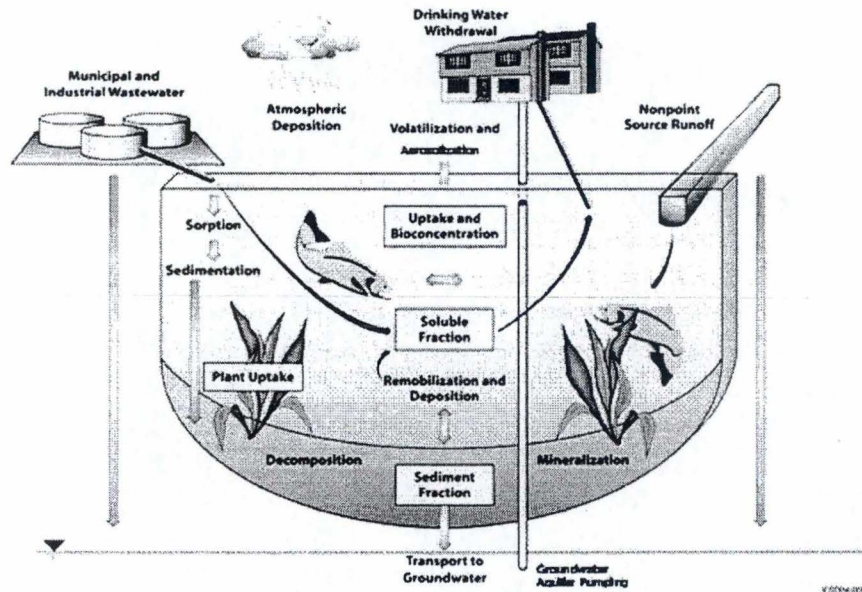


Figure 2.2 : représentation du transfert et de la répartition des eEDC dans les différents compartiments de la biosphère. Le « Non point source run-off » représente les rejets provenant de l'agriculture, de l'excrétion par le bétail non traitée, des pesticides et engrais contenant des surfactants oestrogéniques lessivés lors de pluies (Campbell *et al.*, 2006).

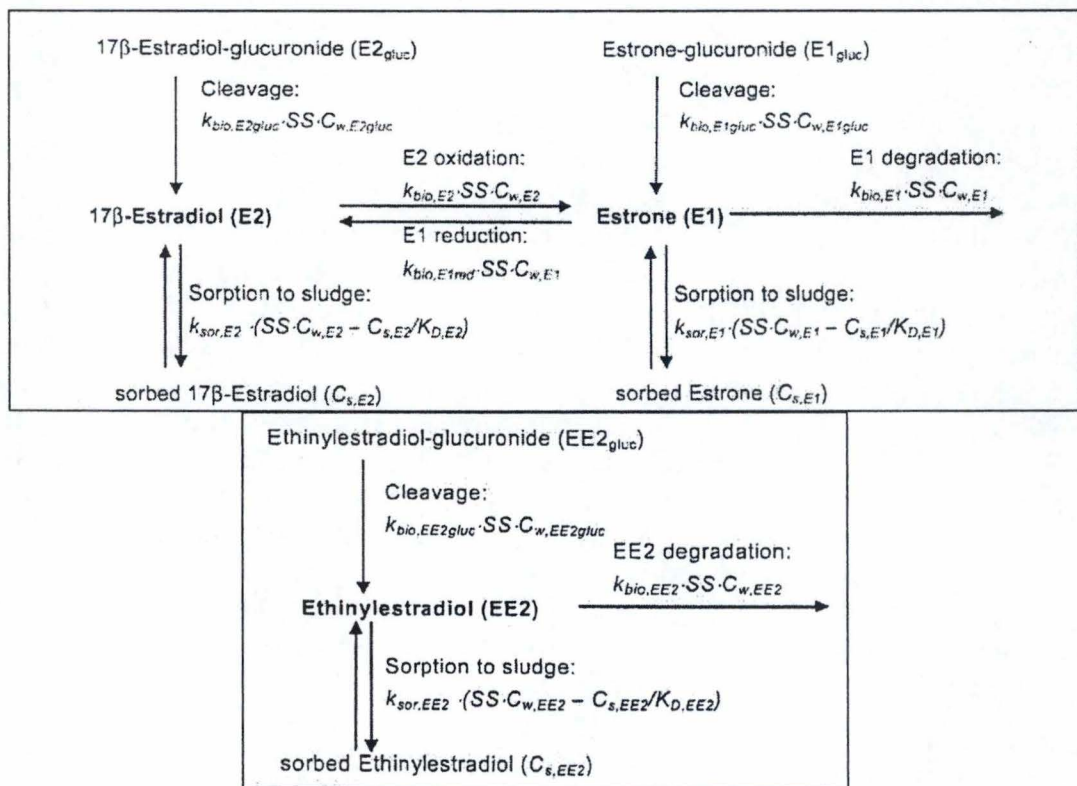


Figure 2.3 et 2.4 : modèle de la dégradation biologique et de la sorption des oestrogènes naturels E1 et E2 ainsi que de l'oestrogène synthétique éthinyloestradiol (EE2) (Joss *et al.*, 2004). K_{bio} , K_{sor} : constantes du taux de réaction de premier ordre; SS : solides en suspension; C_w : concentration dans la phase aqueuse; C_s : concentration dans la phase solide; K_D : coefficient de sorption.

médicaments ingérés n'est pas métabolisée et est excrétée par l'urine et les fèces. Ces substances sont alors émises dans les eaux usées brutes et, si elles ne sont pas interceptées lors du traitement des eaux, se retrouvent dans les eaux de surface, principal réservoir des EDCs. Plus particulièrement, les xénoestrogènes proviennent des composés chimiques naturels et synthétiques excrétés dans l'urine humaine et des élevages de bétail, ainsi que des rejets industriels contenant un grand nombre de composés chimiques. En effet, E1, E2 et E3 sont excrétés par les femmes à raison de 10 à 100 µg par jour et jusqu'à 30 mg par jour par les femmes enceintes (Johnson *et al.*, 2000). De plus, seulement 3% des 25 à 50 µg par jour de EE2 ingéré comme contraceptif reste dans le plasma, tandis que plus de 60% sont excrétés dans les urines (Turan *et al.*, 1995 in Auriol *et al.* 2006). C'est pourquoi les effluents d'eaux usées urbaines sont considérés comme une des principales sources de xénoestrogènes dans les milieux aquatiques (Nakada *et al.*, 2004). De plus, les boues primaires résultant du traitement des eaux usées présentent de fortes concentrations en certains composés oestrogéniques (Birkett *et al.*, 2003); leur récente valorisation pour la fertilisation des champs agricoles en font des sources importante de pollution des sols.

2.1.2.2 Devenir dans l'environnement

Les composés chimiques ont différentes durées de vie dans l'écosystème récepteur. Leur fréquence d'utilisation et leur stabilité dans l'environnement ont comme conséquence d'augmenter la contamination des rivières et les risques de bioaccumulation dans la chaîne trophique. Néanmoins, toute molécule chimique est susceptible de se dégrader, par des processus physiques, chimiques et/ou biologiques. Selon leur nature, ces modifications conduisent à des molécules inertes ou au contraire plus actives, certains composés présentant des produits de dégradation plus toxiques que la molécule initiale, et conditionnent leur biodisponibilité ainsi que leur persistance dans l'environnement. C'est pourquoi il est important de connaître les comportements des composés toxiques dans l'environnement afin de mesurer le risque environnemental. La **Figure 2.2** propose une représentation du transfert et de la répartition des eEDC dans les différents compartiments de la biosphère.

a. Dégradation environnementale et biotransformation

L'activité biologique présente dans les eaux usées, les eaux de rivière recevant les effluents des stations d'épuration et le métabolisme biotique peuvent transformer les EDCs en des produits de dégradation ou des métabolites plus ou moins actifs que la molécule de départ (Gomes *et al.*, 2003). Par exemple, les métabolites de méthylchlore et de polybromodiphényl éther (PBDEs) sont plus oestrogéniques que leur molécules de base, alors que l'inverse est observé pour les produits de dégradation de E2, NP et BPA (Legler *et al.*, 2002). Les surfactants non ioniques APEOs et leurs produits de dégradation, NP et OP sont tous oestrogéniques (Routledge, 1998). De plus, ces derniers présentent une plus grande toxicité que leur précurseur, sont plus hydrophobes et récalcitrants et s'accumulent dans les sédiments (Gonzalez *et al.*, 2007).

En ce qui concerne les oestrogènes naturels et synthétiques, leur devenir est résumé dans les **Figures 2.3 et 2.4**. Ils sont excrétés dans l'urine humaine ou animale sous une forme conjuguée inactive, principalement les dérivés glucoronides et sulfates, plus solubles dans l'eau. Cependant, il a été démontré que des processus de déconjugaison microbienne se produisent dans les eaux de surface et les STEP, qui rendent à nouveau ces composés libres et actifs en solution (Jürgens *et al.*, 2002). Selon D'Ascenzo (2003), les oestrogènes

glucoronides sont déjà déconjugués dans les eaux usées domestiques, à cause de la grande quantité d'enzyme glucuronidase produites par les bactéries fécales.

Dans les rivières, E2 est rapidement converti en E1 avec un temps de demi-vie d'environ 4 jours. E2 peut également être convertis en 17- α -oestradiol, mais il semble qu'aucun autre métabolite majeur ne résulte de sa dégradation (Lee and Liu, 2002 ; Czajka *et al.*, 2006). E1 est seulement un sous-produit transitoire, qui est lui-même rapidement dégradé en CO₂ en passant par des intermédiaires inconnus (Jürgens *et al.*, 2002). EE2, quant à lui, est beaucoup plus résistant à la dégradation dans les eaux de rivières qu'E2. En effet, la biodégradation aérobie de EE2 est plus lente que celle de E2, dans les mêmes conditions, avec un temps de demi-vie 10 fois plus élevé (environ 40 jours). En ce qui concerne les composés industriels, toutes les classes de surfactants subissent une biodégradation sous conditions aérobiques, mais leur produit de dégradation présentent une plus grande persistance. Par exemple, les APEOs sont transformés en APEC et finalement en AP avec une cinétique de dégradation décroissante due aux propriétés hydrophobes de ces composés ce qui mène à une plus grande accumulation dans l'environnement (González *et al.*, 2007). Le temps de dégradation des principaux eEDC est influencé par les conditions environnementales. Par exemple, la dégradation d'E2 se produit plus vite en été, tandis les temps de demi-vie sont 2 fois plus longs lorsque la température diminue de 10°C (Jürgens *et al.*, 2002). À la fois E2, EE2, NP et NPOE sont sensibles à la photodégradation (Ahel *et al.*, 1994) et les transformations biologiques des xénoestrogènes sous conditions anaérobiques sont limitées. En effet, EE2 n'est pas du tout dégradé et E2 est transformé en E1, ce qui résulte en aucune perte totale en oestrogènes. De même les taux de dégradation des OP et NP sont beaucoup plus faibles (Langston *et al.* 2005).

b. Solubilité et adsorption

De manière générale, les composés hydrophobes présentant une forte capacité à interagir avec les particules solides auront tendance à s'adsorber sur la matière organique en suspension et dès lors à s'accumuler dans les sédiments, tandis que les composés polaires possédant un faible coefficient d'adsorption tendent à rester dans la phase aqueuse, ce qui favorise leur mobilité à travers l'environnement récepteur (Ohlenbush *et al.*, 2000 in Carballa *et al.*, 2004). Le degré de sorption dépend de la quantité de solides en suspension ainsi que des caractéristiques de ces particules (densité, taille, capacité de floculation) (Gomes *et al.*, 2003). En ce qui concerne le comportement de partition entre les phases solide et liquide des xénoestrogènes, la situation n'est pas aussi simple que décrite ci-dessus. En effet, les valeurs des coefficients de partition entre les phases lipidique et aqueuse (log Kow), ainsi que les valeurs de solubilité pour les principaux xénoestrogènes (**Figure 2.1**), indiquent que ces composés sont de nature non-polaire. En conséquence, ils devraient préférentiellement s'adsorber sur les sédiments et les boues résiduelles des stations d'épuration, de façon significative pour E2 et EE2 et modérée pour les AP et OP (Ternes *et al.*, 2002 ; Langston *et al.*, 2005). Ceci se confirme par les quantités non négligeables de xénoestrogènes mesurées dans les sédiments aquatiques continentaux et marins, de l'ordre du ng/g pour les oestrogènes et du mg/g pour les composés industriels (Langston *et al.*, 2006). Néanmoins, ces composés ont également été identifiés dans des échantillons d'eau de différentes provenances (effluents de stations, eaux de surface, eau de mer), collectés dans différentes régions du monde. De plus, les publications se contredisent sur la prévalence de ces composés dans les phases dissoute et particulaire (Gomes *et al.*, 2003 ; Nakada *et al.*, 2004). Il y a différentes

hypothèses pour expliquer ce phénomène dont (1) ces composés présentent des précurseurs ou des métabolites plus solubles, (2) les colloïdes facilitent leur transport, (3) ces composés présentent une plus grande solubilité sous pH élevé (cfr pKa, figure 2.1) et (4) la formation de micelles (Campbell, 2006). La seconde hypothèse semble la plus probable étant donné que la formation de particules colloïdales a été démontrée pour E1, E2, EE2, OP, NP et BPA (Liu *et al.*, 2005). Ces constatations indiquent que les mécanismes dominants de la partition des xénoestrogènes ne sont pas strictement contrôlés par leurs propriétés physico-chimiques et que l'on ne peut pas considérer les sédiments comme unique réceptacle de ces composés après leur libération dans l'environnement. La présence de xénoestrogènes dans les 2 phases de façon imprévisible implique que les sédiments prolongent la persistance des xénoestrogènes dans l'environnement aquatique et peuvent agir comme des sources secondaires de contamination (par ingestion directe par les organismes benthiques ou par resuspension des sédiments dans la colonne d'eau et leur transport, susceptible de contaminer des zones non affectées). D'autre part, leur solubilisation entraîne une contamination potentielle de tout organisme aquatique par respiration et une dispersion dans des limites beaucoup plus vastes. Dans l'environnement d'une station d'épuration, les eaux usées domestiques contiennent des graisses, des huiles minérales, des lubrifiants et des surfactants. Dès lors, en plus de la sorption sur des solides en suspension, il est possible que ces composés se séparent dans la phase non-polaire lipidique des eaux usées brutes (Auriol *et al.*, 2006). En effet, les propriétés lipophiles d'E2 facilitent son élimination dans la fraction lipidique (Carballa *et al.*, 2004).

2.1.3 Effet des xénoestrogènes

Étant donné la complexité du système endocrinien, il n'est pas étonnant qu'une large gamme de composés chimiques miment les effets des hormones naturelles et provoquent des perturbations endocriniennes. Les xénoestrogènes ciblent l'ensemble des espèces exprimant les récepteurs aux oestrogènes, ce qui regroupe un grand nombre de phyla.

2.1.3.1 Activité oestrogénique

L'activité oestrogénique des composés chimiques est une quantification de l'effet d'un composé oestrogénique sur le vivant, c'est-à-dire sa capacité à activer le récepteur oestrogénique et à induire une réponse moléculaire, cellulaire, tissulaire ou systémique similaire à l'E2. Ainsi, l'activité oestrogénique des xénoestrogènes est fonction de la similarité de structure de la molécule exogène avec l'hormone endogène, le 17 β -oestradiol (**Figure 2.1**). Elle se mesure par différents types de tests et peut être quantifiée (cfr § 2.3). Généralement, cette activité est exprimée sous forme de *puissance oestrogénique*, qui permet d'évaluer les activités relatives des composés les uns par rapport aux autres. Pour les échantillons complexes, on parlera de *potentiel oestrogénique*, expression qui comprend les interactions agonistes et antagonistes des différents composés entre eux.

a. Expression de la puissance oestrogénique

La puissance oestrogénique d'un composé est exprimée en EC-50 (concentration effective pour 50% de réponse), soit la concentration à laquelle le composé testé induit 50% de la réponse maximale. Cette valeur peut être obtenue mathématiquement, mais est habituellement estimée graphiquement au moyen de la courbe logistique. Elle s'exprime en

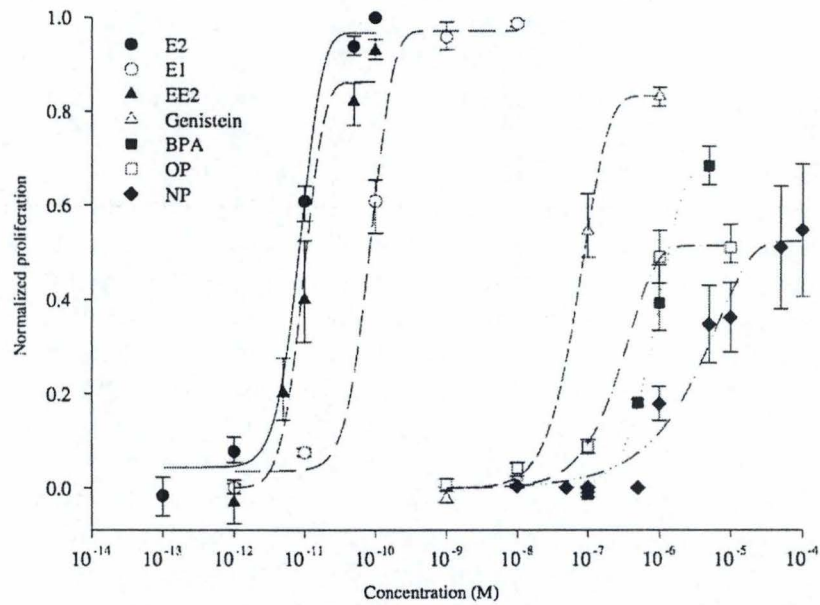


Figure 2.5 : courbe concentration-réponse des principaux EDC oestrogéniques obtenue en utilisant le test E-screen. Les points représentent la moyenne de triplicats pour chacun des composés. Les équations de régression ont été déterminées en utilisant $Y = Y_0 + a(1 - \exp^{-bx})^c$ pour E1 et E2 et $Y = a(1 - \exp^{-bx})^c$ pour EE2, genistein, BPA, p-octylphénol et NP. La prolifération cellulaire est plus élevée pour des concentrations plus faibles en E2, E1 et EE2 (Lee *et al.*, 2007).

unité de concentration, généralement le ng/L. La puissance oestrogénique d'un composé est souvent exprimée par rapport à celle de l'œstrogène de référence E2. Dans ce cas, la puissance d'E2 est égale à 1 et les puissances relatives sont des nombres sans unité. Pour les composés antagonistes, on utilise généralement l'IC-50, qui mesure la concentration nécessaire d'un composé pour inhiber 50% de la réponse cellulaire initiale. Dans le cas des tests *in vivo*, on parlera en ED-50 (dose effective pour 50% de réponse), qui est la dose qui induit une réponse chez 50% des individus testés. Il est important de noter que la puissance du composé n'est pas directement reliée à son effet sur les organismes, la quantité présente dans l'environnement et leur persistance étant des facteurs tout aussi importants pour l'estimation du risque environnemental.

➤ Puissance oestrogénique des xénoestrogènes

Par ordre de puissance oestrogénique décroissant, nous avons les oestrogènes stéroïdes naturels, les oestrogènes synthétiques et ensuite les composés chimiques industriels et les phyto-oestrogènes (Spengler, 2001). De nombreuses études expérimentales sont arrivées à cette même conclusion, en utilisant différentes méthodes de mesures *in vitro* (Suzuki *et al.*, 2002 ; Aerni *et al.*, 2004, Korner *et al.*, 2000 ; Snyder *et al.*, 2001 ; Nakamuro *et al.*, 2002 et Nakada *et al.*, 2004). Par exemple, les résultats obtenus par l'équipe de Lee (2007) basés sur un test E-screen (cfr § 4) sont illustrés dans la **Figure 2.5**. Les valeurs d'EC-50 pour E1, E2 et EE2 sont environs 10^6 fois plus faibles que celles pour NP, BPA et OP. E2 présente une activité oestrogénique de 3 à 5 ordres d'amplitude plus élevée par rapport aux autres xénoestrogènes (Routledge, 1996 ; Gutendorf and Westendorf 2001 ; Aerni, 2004). Parmi les oestrogènes naturels E1 et E3 présentent une activité de 2 ordres de grandeur (10^{-2}) inférieure à celle d'E2 (Gutendorf and Westendorf, 2001). De même, les puissances oestrogéniques des formes conjuguées des oestrogènes sont beaucoup plus faibles que celles des composés libres ($5,3 \cdot 10^{-5}$ pour E2-3S, $5,9 \cdot 10^{-7}$ pour E2-D-glucuronide, comparé à E2) (Matsui *et al.*, 2000).

Néanmoins, lorsque l'on se base sur des tests *in vivo*, EE2 apparaît être 10 à 100 fois plus puissant que E2, ce qui s'explique par une plus forte affinité au récepteur, ce qui était recherché par les concepteurs de cette molécule (Thorpe *et al.*, 2003 ; Langston *et al.*, 2005). Cette constatation se révèle être d'une grande importance dans l'évaluation du risque de cette molécule pour le vivant.

b. Expression du potentiel oestrogénique

Le potentiel oestrogénique des échantillons complexes, tels que les effluents de station sont généralement exprimés en équivalent oestradiol (EEq), qui exprime l'activité oestrogénique d'un échantillon comparée à l'activité de l'œstrogène naturel E2, en unité de concentration (ng/L) (Kinnberg, 2003). La contribution des différents composés présents dans ces mélanges est donnée par l'équation suivante :

$$EEq = \sum x_i c_i$$

Où x_i représente la puissance relative de chaque composé par rapport à E2 et c_i la concentration de ces composés dans le mélange (Gutendorf et Westendorf, 2001). Les valeurs de EEq peuvent donc être calculées sur bases de données d'analyse chimique quantitative, ou mesurée par différents tests *in vitro* ou *in vivo*.

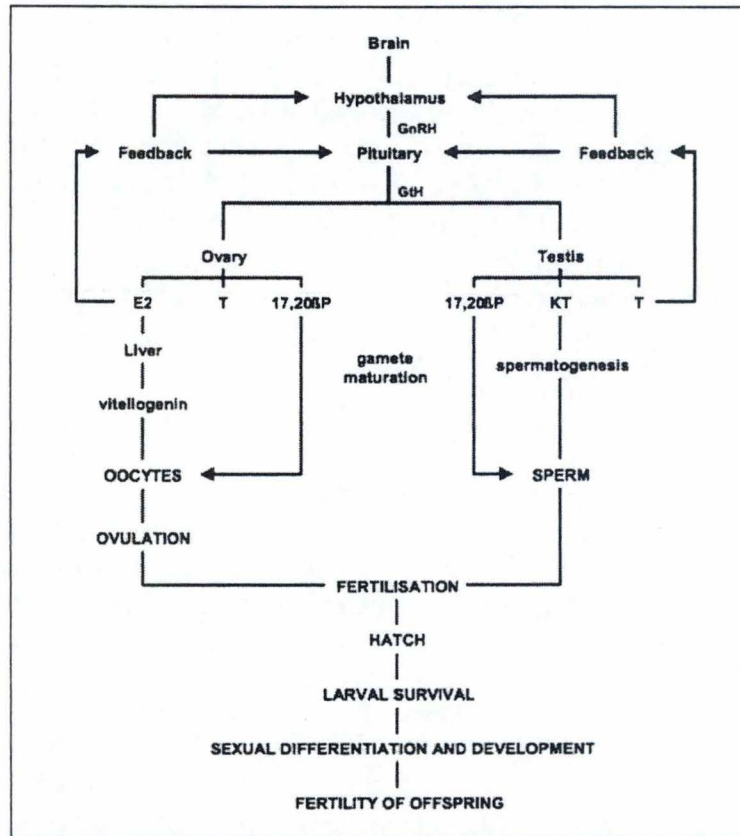


Figure 2.6: Système reproducteur des poissons téléostéens et cibles d'action des xénoestrogènes. GnRH: gonadotrophin-releasing hormone; GtH: gonadotropine; E2: estradiol; T: testostérone; KT: 11-ketotestostérone; 17,20βP: 17,20βP-dihydroxy-4- pregnen-3-one (Kime, 1998).

REM : En réponse à des signaux environnementaux tels que la photopériode, la température, la nutrition ou des facteurs sociaux, la GnRH est libérée par l'hypothalamus et stimule la libération de GtH de la glande pituitaire. Deux formes de GtH ont été isolées chez les poissons (GtH I et II) et sont analogues à la FSH (follicle stimulating hormone) et la LH (luteinizing hormone) des mammifères, respectivement. GtH I est impliquée dans la gamétogenèse et la stéroïdogénèse, tandis que GtH II est impliquée dans les stades de maturation finale de la gamétogenèse, dont l'incorporation de la Vitéllogénine dans les ovocytes. Les gonadotropines sont responsables de la stimulation de la synthèse des stéroïdes sexuels qui agissent sur des tissus cibles pour réguler la gamétogenèse, la reproduction, le phénotype sexuel et les caractéristiques comportementales liées à la reproduction.

2.1.3.2 Absorption par les organismes et bioconcentration

L'absorption des composés oestrogéniques par les organismes aquatiques se fait principalement au travers des branchies lors de la respiration, mais également par ingestion d'aliments contaminés (dont les sédiments) et par les téguments. Ils sont normalement éliminés par le foie mais peuvent s'accumuler dans les graisses, à une concentration supérieure à celle du milieu environnant (bioconcentration). Le niveau auquel une substance donnée est bioconcentrée dépend du taux et du mode d'absorption et d'élimination, de la transformation par les processus métaboliques, du contenu lipidique de l'organisme, de l'hydrophobicité de la substance ainsi que de facteurs environnementaux, biologiques et physiologiques. Ainsi, la bioaccumulation d'une substance est corrélée à son K_{ow} . En règle générale, l'augmentation de l'hydrophobicité (lipophilicité) d'une molécule correspond à une plus grande propension à s'accumuler dans les organismes, tels que les poissons. Au vu des valeurs de K_{ow} des principaux xénoestrogènes (**Figure 2.1**), ceux-ci devraient montrer une tendance à se bioconcentrer. En effet, des truites arc-en-ciel encagées en aval d'une STEP présentent une accumulation d'E2 dans la bile à des niveaux 10^6 fois plus élevés que l'eau (Larsson *et al.*, 1999). De même, une bioaccumulation de NP a été observée chez les poissons et les algues, avec des facteurs de concentration de 1-300 chez les poissons et jusqu'à 10 000 chez les algues (Ahel *et al.*, 1994). L'équipe de Lai (2002) a établi un modèle de prédiction réaliste des facteurs de bioaccumulation de E2 et EE2 qui indique que ce phénomène se produit chez tous les organismes aquatiques, avec néanmoins une sous-estimation par rapport aux observations faites sur le terrain. Les patterns de bioaccumulation des composés industriels sont beaucoup plus variables avec, de façon générale un plus faible taux de concentration, hormis pour les AP. Le phénomène de bioamplification a été observé chez des larves de lompe (*Cyclopterus lumpus*) nourries avec des *Artemia* contaminées à l'E2, avec comme conséquence 100% de féminisation des mâles (Martin-Robichaud *et al.*, 1994). Néanmoins ce phénomène ne semble pas s'étendre aux organismes des niveaux trophiques supérieurs, les mammifères présentant une excrétion efficace de ces substances, notamment les AP. La bioconcentration est à prendre en compte dans l'évaluation du risque des xénoestrogènes sur le vivant car la mobilisation des graisses (lors de la ponte ou gestation, de la lactation) remet en circulation les composés qui y sont stockés, ce qui provoque des pics de contaminations. Ce phénomène peut mener à une exposition transgénérationnelle si la mère contaminée transmet les composés au travers de la nutrition. D'autre part, si les AP présentent un potentiel oestrogénique plus faible qu'E2, leur forte aptitude à se bioconcentrer chez les organismes aquatiques, couplée à une abondance supérieure dans les cours d'eau peut mener à un niveau de toxicité équivalent (Langston *et al.*, 2005). C'est pourquoi des niveaux très faibles en xénoestrogènes dans l'environnement peuvent malgré tout représenter une menace sérieuse pour le vivant, avec des effets à long terme sur les organismes.

2.1.3.3 Mécanismes d'action

L'hormone stéroïde sexuelle endogène E2, bien connue pour son rôle important au niveau de l'appareil reproducteur (ovaires, utérus, glandes mammaires, prostate), est également impliquée dans de nombreuses réponses physiologiques variées dans différents tissus (tissus osseux, système circulatoire et nerveux). Cette hormone est produite par les gonades, en réponse aux gonadotropines (GtH I et II) libérées par l'hypophyse (**Figure 2.6**). Les effets des oestrogènes sont médiés par 2 sous-types de récepteurs oestrogéniques $ER\alpha$ et $ER\beta$, présentant des patterns de distribution cellulaires et tissulaires distincts et spécifiques (Weihua *et al.*, 2000). Ces récepteurs sont des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes cibles (Truss et Beato, 1993). Leur activation par le stéroïde va ainsi moduler la

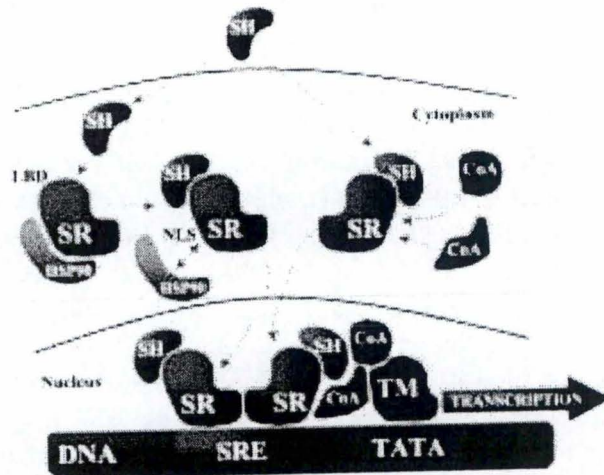


Figure 2.7 : action génomique des récepteurs stéroïdiens (Simoncini *et al.*, 2003). Les récepteurs inactifs se trouvent sous forme de complexes associés à des protéines chaperonnes Hsp (Heat shock protein). La liaison d'une hormone stéroïde (par exemple E2) au récepteur stéroïdien (SR) induit une modification conformationnelle de celui-ci par séparation d'une protéine chaperonne cytoplasmique (Hsp90), interaction avec un co-activateur (CoA) et exposition d'une séquence de localisation nucléaire. Ceci induit une dimérisation du récepteur et sa translocation dans le noyau, où il se lie aux éléments de réponse stéroïdien (SRE ; ERE pour ceux spécifiques aux oestrogènes) localisés sur la région promotrice des gènes ciblés, ce qui régule l'expression de ces gènes en interférant avec la machinerie de transcription (TM).

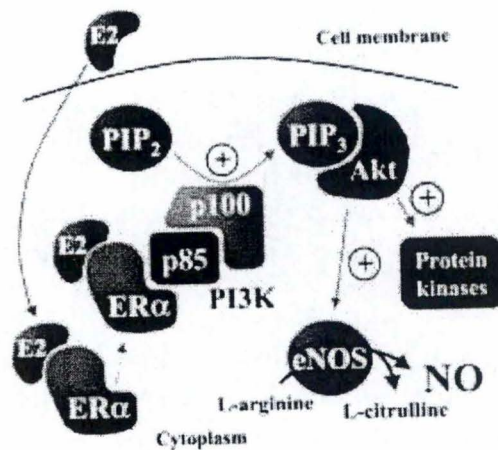


Figure 2.8 : exemple de voie non génomique ER et PI3K (Simoncini *et al.*, 2003). Le complexe ER-E2 formé en membrane interagit avec la sous-unité régulatrice p85 de PI3K, ce qui active sa sous-unité catalytique p100. Celle-ci va alors phosphoryler le phosphoinositide PIP2 en PIP3. PIP3 est ensuite reconnu par des sites spécifiques de protéines kinases Akt. Enfin, Akt régule, via la phosphorylation, plusieurs enzymes intracellulaires, dont la NO synthase (eNOS), menant à une augmentation de la synthèse de monoxyde d'azote (NO).

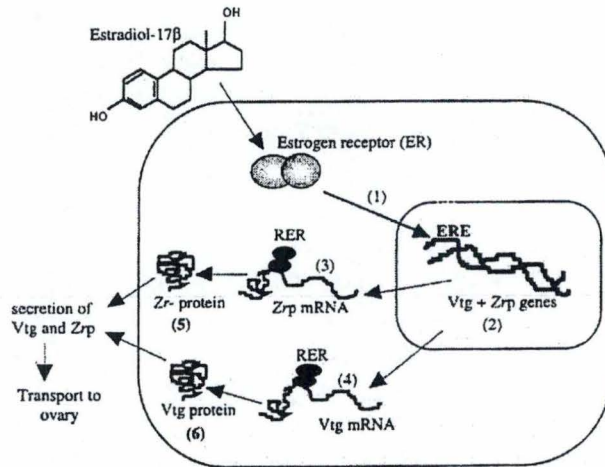


Figure 2.9: représentation schématique simplifiée de l'induction hépatique des protéines de réserve VTG et de la paroi Zr (*zona radiata*) de l'ovocyte chez les poissons téléostéens femelle (Arukwe *et al.*, 2001). (1) E2 produit par les follicules ovariens en réponse à GtHI entre dans la cellule par diffusion et se lie au ER ; (2) Le complexe hormone-récepteur se lie aux éléments de réponses oestrogénique (ERE) dans le noyau, active la transcription des gènes de la VTG et des Zrp et stabilise les ARNm produits ; (3) Les précurseurs VTG et Zrp sont traduits et modifiés dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) ; (5) Les protéines résultantes sont sécrétées dans le sang pour être transportées dans les ovaires, où elles sont incorporées dans les ovocytes via une endocytose récepteur-dépendante.

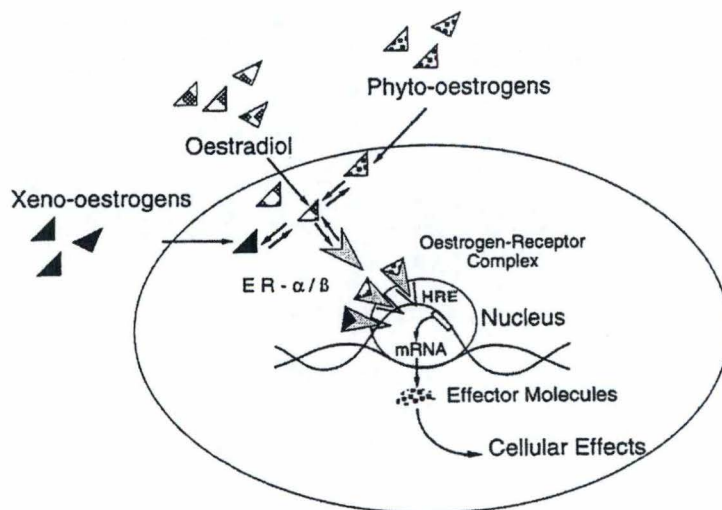


Figure 2.10 : modèle d'action des xénoestrogènes (Rosselli *et al.*, 2000). Grâce à leur forte similarité structurale, les xénoestrogènes peuvent entrer en compétition avec E2 pour le récepteur oestrogénique et influencer sa réponse biologique. Selon la nature chimique du xénoestrogènes, il peut induire un effet oestrogénique en activant directement les molécules effectrices ou anti-oestrogénique en inhibant la génération des molécules induites par E2. ER- α/β : récepteurs oestrogéniques alpha et bêta ; HRE : élément de réponse hormonal ; mRNA : ARN messager.

THE AROMATASE ENZYME COMPLEX

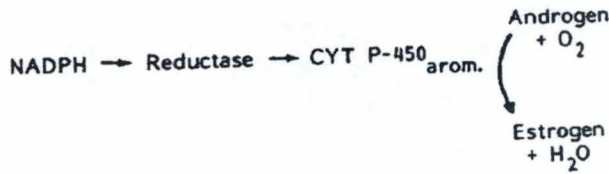


Figure 2.11 : diagramme de l'activité de la P-450 aromatasase (Simpson *et al.*, 1994).
 Androgen : androstenedione ou testostérone ; Estrogen : estrone ou 17 \rightarrow oestradiol.

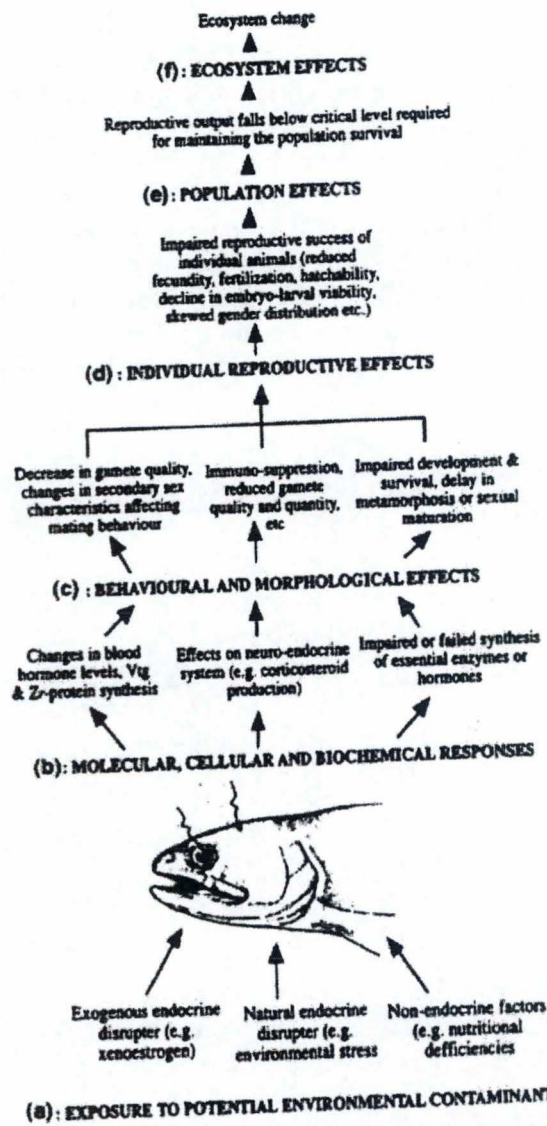


Figure 2.12 : visualisation de la cascade par laquelle les modulateurs endocriniens peuvent affecter la reproduction et la survie des populations aquatiques. Une perturbation quelle qu'elle soit induit un stress chez un organisme, qui pour se défendre réalloue son énergie au détriment de la reproduction. Ce coût métabolique induit une diminution de son fitness et peut avoir un impact sur les communautés (Campbell et Hutchinson, 1998).

synthèse d'ARN messager et de protéines, conduisant à des modifications physiologiques. On distingue 2 voies par lesquelles les oestrogènes peuvent réguler la transcription génique : une *voie génomique* lente, basée sur des mécanismes génomiques directs impliquant des récepteurs nucléaires ; et une *voie non-génomique* (ou non-nucléaire) rapide, basée sur des mécanismes génomiques indirect incluant des récepteurs membranaires (**Figures 2.7 et 2.8**). La conséquence d'une double voie d'activation est importante pour l'évaluation du risque d'un composé, étant donné la découverte que différents xénoestrogènes considérés comme faiblement oestrogéniques apparaissent être puissants dans des voies non-génomiques et peuvent dès lors contribuer à perturber les fonctions endocrines (Watson *et al.*, 2007). Par exemple, le NP et le BPA sont faiblement actifs dans la réponse génomique, mais activent fortement certaines voies non génomiques, dont l'ouverture de canaux Ca^{++} menant à la libération de prolactine (PRL). Une étude récente indique que les xénoestrogènes montrent entre eux différents patterns de cinétique et de doses d'activation, qui diffèrent également de ceux de E2 (Watson *et al.*, 2007). De plus, leurs effets seront différents selon l'état physiologique de l'organisme contaminé, et particulièrement en fonction du statut développemental et reproducteur, lorsque les niveaux endogènes d'oestrogènes sont particulièrement élevés ou faibles. Chez les poissons femelles, E2 agit au niveau des gonades pour stimuler le développement des ovocytes. Il contrôle également l'expression du gène de la vitellogénine (VTG) par un processus récepteur-dépendant (**Figure 2.9**). La VTG est une phospho-glyco-lipoprotéine, précurseur des protéines de réserve des ovocytes, synthétisée au niveau du foie des femelles et transportée jusqu'à l'ovaire par le système sanguin. Elle est ensuite incorporée dans l'ovocyte grâce à une gonadotropine produite par l'hypophyse (GtH II), où elle sert de source d'énergie durant le développement de la larve.

L'inconvénient des ER est qu'ils ne sont pas spécifiquement sélectifs, ce qui engendre qu'une large gamme de composés de différentes formes structurales peuvent mimer l'action des oestrogènes naturels (Lye *et al.*, 1997 ; Routledge *et al.*, 2000). Le fait que les ER ont évolué à partir de protéines régulatrices ligand-dépendantes les plus primitives pourrait expliquer leur faible spécificité (Baker *et al.*, 2004). Ainsi, les xénoestrogènes peuvent agir comme des ligands du ER et moduler les voies endocrines de façon inappropriée (**Figure 2.10**). De même, étant donné la complexité de la synthèse et du mécanisme d'action des oestrogènes endogènes et le grand nombre d'agents moléculaires impliqués, une altération du processus par les xénoestrogènes peut mener à une modification profonde des réponses biologiques et physiologiques. Ainsi, les composés oestrogéniques sont capables de perturber le système endocrinien en agissant sur les enzymes clé de la stéroïdogénèse. Parmi celles-ci, la P450-aromatase catalyse l'étape finale de conversion des androgènes en oestrogènes (**Figure 2.11**). Il est important de savoir qu'un ratio E2/T spécifique est nécessaire pour la différenciation sexuelle des poissons et, dès lors, une altération de ce ratio peut conduire à un développement des gonades incomplet ou inapproprié (Lavado *et al.*, 2004). Enfin, les xénoestrogènes peuvent agir de façon indirecte en perturbant les régulations en feedback du processus, en altérant l'élimination des hormones endogènes par le catabolisme hépatique, ou encore en entrant en compétition avec les oestrogènes naturels pour leur transporteur plasmatique (SHBP, sex hormone-binding protein) ce qui augmente l'E2 libre, disponible pour se lier aux ER (Folmar *et al.*, 2001).

Nous verrons que les mécanismes moléculaires de l'action des oestrogènes sont la base des tests *in vitro* pour la détermination du potentiel oestrogénique de molécules ou échantillons complexes. Les effets induits *in vivo* peuvent également servir de marqueurs du contact avec des xénoestrogènes.

Tableau 2.1 : principales études sur l'induction de la Vtg suite à l'exposition aux eEDCs.

Organisme étudié	Composé étudié	Résultats	Références
<i>Cyprinus carpio</i>	Effluent STEP	-Induction de la Vtg chez le mâle -Altération de la Vtg chez la femelle	Solé <i>et al.</i> , 2001
<i>Danio rerio</i> juvéniles	EE2	-Induction de la Vtg	Orn <i>et al.</i> , 2003
<i>Danio rerio</i>	E2	-Induction de la Vtg	Brion <i>et al.</i> , 2004
<i>Gobio gobio</i>	Effluent STEP	-Induction de la Vtg chez les mâles et les intersexes exposés	Van aerle <i>et al.</i> , 2001
<i>Gobio gobio</i>	Effluent STEP	-Induction de la Vtg chez les mâles et les intersexes exposés	Jobling <i>et al.</i> , 1998
<i>Lepomis megalotis</i>	Effluent STEP	-Induction de la Vtg chez le mâle	Porter et Janz, 2003
<i>Oryzias latipes</i>	E2	-Induction de la Vtg chez le mâle	Kang <i>et al.</i> , 2002
<i>Oryzias latipes</i>	Effluent STEP	-Induction de la Vtg chez le mâle	Ma <i>et al.</i> , 2005
<i>Pimephales promelas</i> mâle	E2 et oestrone	-Induction de la Vtg	Panter <i>et al.</i> , 1998
<i>Pimephales promelas</i>	E2	-Induction de la Vtg chez les 2 sexes	Halm <i>et al.</i> , 2002
<i>Platichthys flesus</i>	Effluent STEP	-Induction de la Vtg chez le mâle	Lye <i>et al.</i> , 1997
<i>Rutilus rutilus</i>	Effluent STEP	-Induction de la Vtg	Jobling <i>et al.</i> , 2002

2.1.3.4 Perturbations établies

Des effets néfastes dus à la présence de xénoestrogènes dans l'environnement ont été identifiés chez de nombreuses espèces, avec de grandes différences observées entre les divers groupes taxonomiques. En effet, différentes études ont mis en évidence que des oiseaux, reptiles, amphibiens et mammifères dans des régions polluées subissent des altérations du système endocrine reproducteur (Preziosi, 1998). Par exemple, Guillette *et al.* (1994) ont détecté un développement anormal du système reproducteur chez les alligators du lac Apopka, lié à la présence de substances oestrogéniques. De même, l'occurrence des composés oestrogéniques dans l'environnement et particulièrement dans la nourriture peut être un risque pour la santé humaine (Degen and Bolt, 2000). Malgré leur système hormonal primitif, les invertébrés sont également touchés, avec entre autre une inhibition de la mue et de la croissance chez *Daphnia magna* exposés au NP (Langston *et al.*, 2005). Dans le cadre de cette étude, nous nous pencherons plus particulièrement sur les effets observés chez les poissons.

Les poissons peuvent être touchés à plusieurs niveaux d'organisation par la présence d'EDC dans l'environnement (**Figure 2.12**). En effet, les altérations physiologiques individuelles causées par les xénoestrogènes peuvent conduire à des perturbations biochimiques au niveau moléculaire et cellulaire. Celles-ci peuvent par la suite engendrer des anomalies morphologiques, par une perturbation de l'appareil reproducteur, et comportementales, en altérant la communication des organismes en période de reproduction. Tout cela pourra ensuite avoir des répercussions sur les niveaux d'organisations biologiques supérieurs, c'est-à-dire les populations, les communautés voire l'écosystème dans son ensemble. Ce point sera explicité au § 2.2.4. La manifestation la plus évidente de l'exposition des poissons à des composés oestrogéniques est l'induction de la production de vitellogénine (VTG) par les poissons mâles juvéniles ou adultes et ce chez de nombreuses espèces. Cette protéine n'étant pas transférée dans les ovocytes chez les mâles, elle s'accumule et peut être mesurée en forte concentration dans le plasma. Actuellement, de nombreux cas d'induction de VTG chez les poissons mâles de rivière sont reportés dans différents pays industrialisés d'Europe, d'Amérique du Nord, d'Asie et d'Australie (**Tableau 2.1**). Ce phénomène a été clairement corrélé à la présence de stations d'épuration ou de complexes industriels qui augmentent localement les concentrations en composés oestrogéniques, atteignant des niveaux délétères pour le vivant. Nous en reparlerons au § 2.2.2. D'autres effets se manifestant souvent de façon concomitante incluent un grossissement du foie ainsi qu'un développement anormal des gonades. De nombreuses altérations histopathologiques ont été reportées, notamment chez les poissons femelles une atrophie folliculaire et une accélération du développement et de la ponte (Jobling *et al.*, 2002 ; Höger *et al.*, 2006). On a également découvert chez les mâles une fibrose et une inhibition de la croissance des testicules, un arrêt de la spermatogenèse, ainsi qu'une atrophie de l'épithélium germinale (Lavado *et al.*, 2004, Jobling *et al.*, 2002). L'anormalité la plus manifeste est cependant l'apparition d'ovocytes dans les testicules des poissons mâles (ovotestis). Cette nouvelle condition a été baptisée « intersexe » et s'observe chez des poissons mâles juvéniles et adultes soumis à des xénoestrogènes. De plus, une féminisation des poissons a également été observée, la différenciation sexuelle des poissons étant sensible durant une période étroite de 10 jours avant et après leur éclosion (Sumpter, 1995 ; Hansen *et al.*, 1998). Durant cette période critique, le sexe phénotypique est labile et toute exposition aux hormones et aux xénoestrogènes peut affecter la différenciation sexuelle (Sumpter, 1995). On observe également une perturbation de la stéroïdogenèse chez des poissons soumis à des xénoestrogènes avec notamment une inhibition de l'activité de la P450 aromatasase (Lavado *et al.*, 2004).

Tableau 2.2 : Principaux paramètres analytiques des eaux usées urbaines, (Canler, 2004).

Paramètres	Signification	Valeurs usuelles d'une eau usée domestique normalement concentrée	Seuil de détection	Méthode AFNOR
Potentiel d'hydrogène (pH)	Caractérise le degré d'acidité ou de basicité d'un milieu pH $\times 7$: milieu acide pH $\times 5,7$: milieu basique	7,5 à 8,5 (Unité pH)		AFNOR NF T 90-008
Conductivité (Ω)	Indique l'aptitude d'une eau à conduire le courant électrique. Celle-ci dépend de la teneur en sels dissous dans l'eau. Si les sels dissous augmentent, la conductivité augmente.	1100 $\mu\text{S/cm}$ (Microsiemens/cm)		AFNOR NF EN 27888
Demande chimique en oxygène (DCO)	Caractérise la quantité de matière organique biodégradable ou non, mesurée par dosage chimique. Attention à la valeur en présence de chlorures.	700 – 750 $\text{mg d'O}_2\text{L}^{-1}$	30 (O ₂)	AFNOR NF T 90-101
Demande biochimique en oxygène en 5 jours (DBO ₅)	Caractérise la quantité de matière organique biodégradable en 5 jours. Attention à la valeur en cas de carbonates N ou P ou pH anormal.	300 $\text{mg d'O}_2\text{L}^{-1}$	3	AFNOR NF EN 1899-1
Matières en suspension (MES)	Caractérise les matières en suspension constituées de matière organique et de matière minérale.	250 mg de MES.L^{-1}	2	AFNOR NF EN 872
Matières Volatiles en Suspension (MVS)	Correspond à la fraction organique des matières en suspension.	225 mg de MVS.L^{-1}		AFNOR NF T 90-105
Azote Kjeldahl (N-NK)	Caractérise l'azote qui comprend l'azote organique et l'azote ammoniacal.	75 mg de N-NK.L^{-1}		AFNOR NF T
Azote ammoniacal (N-NH ₄ ⁺)	Constitue une étape du cycle de l'azote en minéralisation de la matière organique. Il est issu de l'ammonification de l'azote organique présent dans les eaux usées. Il correspond à la forme assimilable pour l'activité bactérienne nécessaire au traitement biologique.	50 – 55 $\text{mg de N-NH}_4^+\text{L}^{-1}$	0,02 (N)	NF T 90-015-2 (2000)
Nitrites (N-NO ₂)	Produit de la 1 ^{ère} étape de nitrification du cycle de l'azote. C'est une forme peu stable et leur présence en quantité significative est un indicateur de blocage de l'activité biologique.	0 $\text{mg de N-NO}_2\text{L}^{-1}$	0,005 (N)	AFNOR EN 26777
Nitrates (N-NO ₃)	Produit final de la nitrification.	0 $\text{mg de N-NO}_3\text{L}^{-1}$		AFNOR NF T
Phosphore total (PT)	Représente le phosphore dans toutes ses formes : particulaire, dissous, organique et minéral.	15 – 20 mg de PT.L^{-1}		AFNOR NF T
Ortho-phosphates (P-PO ₄ ³⁻)	Représente la forme minérale dominante du phosphore soluble dans l'eau. Il s'agit de la forme assimilable pour l'activité bactérienne.	10 – 15 $\text{mg de P-PO}_4^{3-}\text{L}^{-1}$	0,01 (P)	NF EN 1189 (1997)
Oxygène dissous (O ₂)	Donne une information sur la quantité d'O ₂ dissous dans le milieu. La solubilité de l'O ₂ est fonction de la température et de la pression. Si la température augmente, la solubilité de l'O ₂ diminue tandis que la pression augmente.	-	0,2 (O ₂)	AFNOR NF T
Alcalinité (TAC titre alcalimétrique complet)	Correspond à la mesure des bicarbonates (HCO ₃ ⁻), des carbonates (CO ₃ ²⁻) et des hydroxydes (OH ⁻). Elle permet d'apprécier la teneur en carbone minéral pour répondre aux besoins de la nitrification.	0 à 30 °F	0,4 mmol.L^{-1}	AFNOR NF EN ISO 9963-1 (1996)

Les xénoestrogènes sont nocifs à de très faibles concentrations. Plus particulièrement, des concentrations en E2 et EE2 aussi faibles que 1 ng/L et 0,1 ng/L respectivement peuvent induire la production de VTG chez les truites mâles (Purdom *et al.*, 1994 ; Hansen *et al.* 1998, Pawlowski *et al.*, 2004). Les AP peuvent avoir des effets oestrogéniques chez les poissons à des concentrations de 1 à 10 µg/L (Routledge *et al.*, 1998). De façon générale, Nakada *et al.* (2004) ont déterminé les concentrations seuil au-delà desquelles une perturbation endocrine est attendue chez les poissons sauvages : 10 µg/L pour NP, 3 µg/L pour OP, 50 ng/L pour E1 et 10 ng/L pour E2. De plus, un effet d'additivité a clairement été observé. Ainsi, un mélange de xénoestrogènes (E2, EE2, NP, OP et BPA) montre une plus grande activité oestrogénique que les composés isolés (Brian *et al.*, 2005). Cette considération met en lumière que les mélanges complexes de xénoestrogènes peuvent avoir un impact sur le vivant, malgré des concentrations individuelles inférieures à la dose toxique (Brian et Sumpter, 2007). Par contre, aucun effet d'interaction synergique n'a été mis en évidence (Nakada *et al.*, 2004).

Il va sans dire que ces perturbations peuvent avoir un effet direct sur la capacité de reproduction des espèces touchées. En plus d'une diminution du calcium osseux, d'une hyperplasie du foie et de dommages aux reins, la synthèse de VTG par les poissons mâles est un gaspillage d'énergie qui réduit leur fitness. Pour les femelles, la présence de xénoestrogènes induit la formation d'ovocytes anormaux, de moindre qualité et présentant un plus faible potentiel de survie (Arukwe *et al.* 2001). De plus, les conséquences d'un sex-ratio biaisé peuvent être profondes sur les capacités reproductives d'une population piscicole.

En conclusion, nous pouvons dire que les conséquences immédiates de l'exposition des poissons aux xénoestrogènes peuvent être très délétères, altérant la sexualité des animaux (et principalement des poissons) de différentes manières et menaçant leur capacité de reproduction.

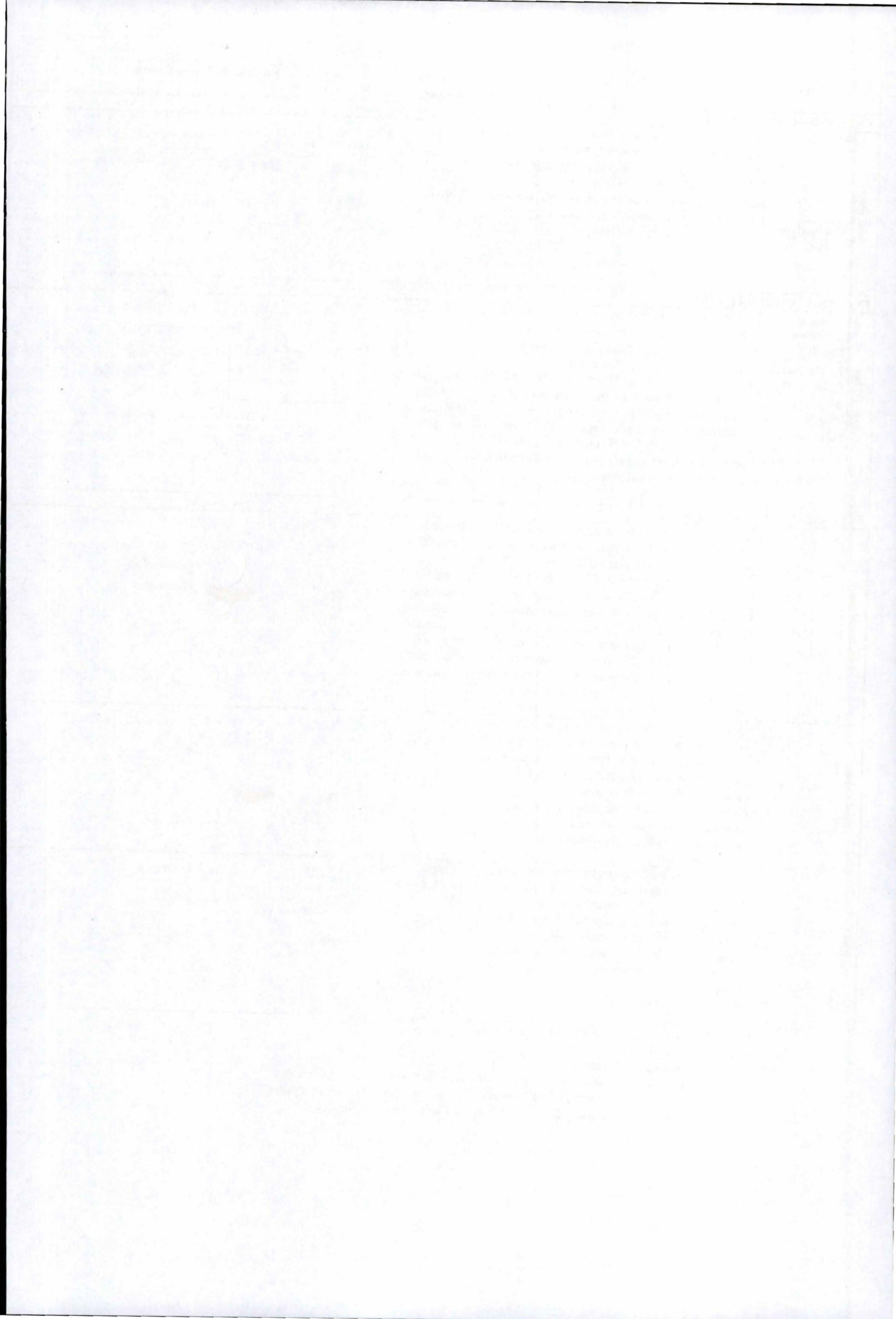
2.2 Les stations d'épuration

2.2.1 Définition

Une station d'épuration peut être définie comme une usine de dépollution des eaux usées avant leur rejet dans une rivière naturelle. Ces stations traitent les eaux usées de différentes provenance : les eaux résiduaires urbaines, contenant de la matière organique ainsi que différents produits chimiques ménagers ; les eaux de ruissellement, étant principalement les eaux pluviales chargées en matières végétales et minérales en provenance du bassin versant et susceptibles de contenir également des charges polluantes d'origine principalement agricole ; les eaux résiduaires industrielles, contenant différents polluants, selon la nature de l'installation industrielle dont elles proviennent. L'inquiétude face à l'eutrophisation des lacs et rivières a mené à l'aménagement de stations d'épuration dont l'objectif est principalement de limiter la charge en carbone (C), azote (N) et phosphore (P) des eaux rejetées en rivières. Les normes actuelles établies (**Annexe 1**) deviennent de plus en plus strictes quant à la teneur en certains composés toxiques dans les effluents de stations d'épuration, c'est pourquoi il est important de mettre au point des procédés d'élimination spécifiques les plus efficaces possibles.

Tableau 2.3: Filière conventionnelle suivie par les eaux usées dans une station d'épuration. Il est important de noter que, conventionnellement, on parle de traitement secondaire pour l'élimination du carbone par des processus biologiques et de traitement tertiaire pour l'élimination de l'N et du P par des procédés biologiques ou physico-chimiques. Le traitement quaternaire est typiquement physique ou chimique et est employé pour les eaux à destination de zones de baignade ou dans le traitement des eaux potabilisables.

Phase		Déchets traités	Traitement	Déchets associés
Prétraitement	Dégrillage	Gros déchets	Grilles de dimensions variées	
	Dessablage	Sables > 200 μ	Sédimentation	
	Déshuilage	Huiles et graisses	Microbulles d'air qui augmentent la flottaison	
Traitement primaire		Matières solides en suspension	Décantation Amélioration par adjonction de produits chimiques : flocculants (sels d'alumine, ...) et coagulants (sels métalliques)	Boues primaires
Traitement secondaire ou biologique	Différents types (Cfr Tableau 2.4)	Matière organique	- Accumulation/Dégradation par micro-organismes - Amélioration par adjonction d'oxygène (aération)	CO ₂
	Clarification		Séparation des phases solides et liquides	Boues secondaires
Traitement tertiaire		Azote	a. Processus biologique 1. Nitrification $\text{NH}_4^+ + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{NO}_3^- + \text{H}_2\text{O}$ 2. Dénitrification $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2$	N ₂
		Phosphore	a. Processus biologique - Traitement bactérien aérobie et anaérobie b. Processus physico-chimique - Coagulation-floculation	
Traitement quaternaire		Micro-organismes	Désinfection par chloration, ozonation ou photolyse (rayon UV)	



Type	Principe	Temps de séjour	Schéma de l'installation	
EXTENSIF- CULTURE LIBRE				
Lagunage	Microphytes	Dégradaion de la charge polluante par différentes espèces animales (bactéries aérobies, zooplancton) et végétales (algues et plantes aquatiques) en culture libre. Les différents processus de dégradation se réalisent dans un même bassin. L'oxygène est apporté par la photosynthèse réalisée par les algues.	Variable ≈ 2 mois	
	Macrophytes			
	Mixtes			
INTENSIF- CULTURE LIBRE				
Boues activées	Aération prolongée $C_m < 0,1$	Dégradaion de la matière organique basé sur l'activité métabolique de cultures bactériennes maintenues en suspension dans un bassin d'aération alimenté en eau à épurer. La biomasse se développe à partir des éléments nutritifs de l'effluent. Le traitement du P et de l'N nécessite l'installation de bassins en condition anaérobie, anoxique et aérobie en enfilade. La séparation boue-eau traitée par sédimentation est assurée par le clarificateur. La biomasse est recirculée.	Variable ≈ 5-20h (Johnson et al., 2000)	
	Faible charge $0,1 < C_m < 0,2$			
	Moyenne charge $0,2 < C_m < 0,5$			
	Forte charge $C_m > 0,5$			
INTENSIF- CULTURE FIXEE				
Lits bactériens	Même principe de dégradation que le système de boue activée. La culture bactérienne se développe en pellicule (biofilm) sur un matériaux-support inerte (40 à 80 mm) qui ménage des espaces libres sur lesquels se forme le biofilm. Les eaux à épurer ruissellent par gravité sur le biofilm. La zone superficielle du biofilm est en condition aérobie (0,2mm) tandis qu'en profondeur (2,5m) nous sommes en condition anaérobie. La séparation boue-eau traitée par sédimentation est assurée par le clarificateur. La biomasse est recirculée.	Variable ≈ 24h00 Temps de contact de l'eau avec la biomasse beaucoup plus court ≈ 1 minute		
Biodisques	Même principe de dégradation que le système de boue activée. La culture bactérienne se développe sur des disques enfilés sur un tronc animé d'un mouvement de rotation (1-6 tour/min). La culture se trouve donc en alternance de phases aérobie et anoxique. La séparation boue-eau traitée par sédimentation est assurée par le clarificateur. La biomasse est recirculée.			
Biofiltres	Même principe de dégradation que le système de boue activée. L'eau usée traverse un massif filtrant (2-4 m de hauteur) recouvert d'un biofilm bactérien. La séparation des boues et de l'eau est directe et ne nécessite pas de clarificateur. Il n'y a pas de recirculation de biomasse. La charge volumique appliquée est beaucoup plus grande qu'en boues activées classique (facteur 5).	Court ≈ 30 min à 5h		

C_m : charge massique, kg DBO5/kg de MSV.jour.

BN : bactéries nitrifiantes

NBN : nouvelles bactéries nitrifiantes

Définition des termes anoxie et anaérobie propre au domaine du traitement des eaux usées :

- L'anoxie se caractérise par l'absence d'oxygène et la présence de nitrates.
- L'anaérobie se caractérise par l'absence d'oxygène et de nitrates.

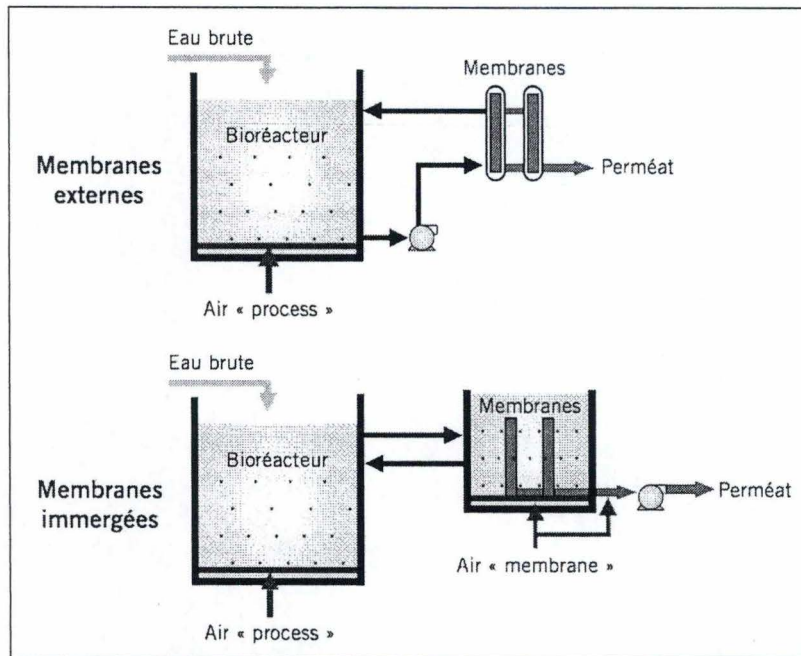
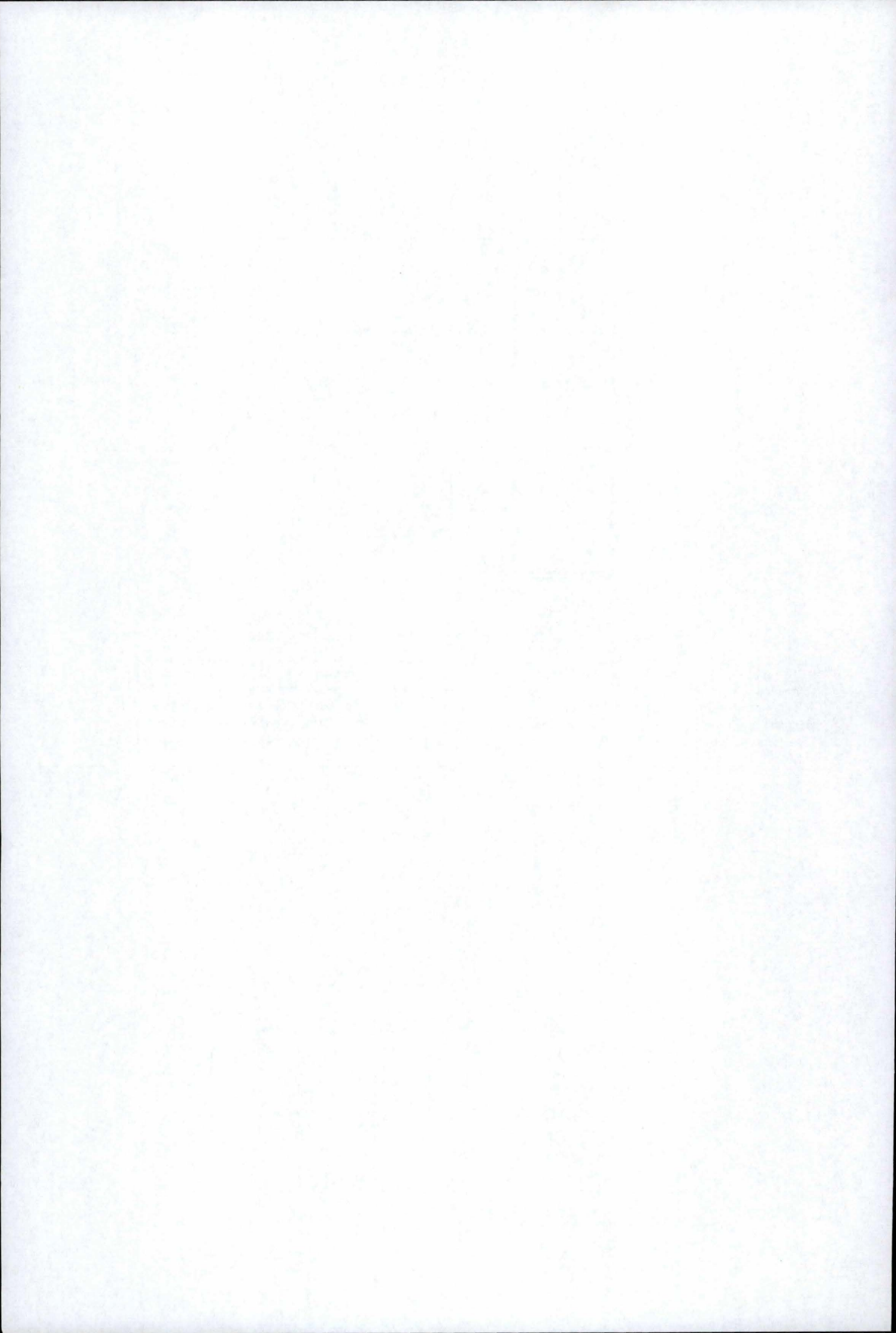


Figure 2.13 : représentation schématique du bioréacteur membranaire (Cemagref, 2004)

REM : Les bioréacteurs membranaires font partie des processus de traitement des eaux usées de dernière génération. Ce procédé combine le traitement par boues activées avec un processus de séparation solide-liquide, non pas par bassin de sédimentation comme c'est le cas dans les boues activées, mais par un système de membranes d'ultrafiltration (UF). Celles-ci peuvent être immergées dans un bassin d'aération, ou montées à l'extérieur d'un bioréacteur. Ce montage permet de séparer la biomasse et les particules de la phase aqueuse purifiée, à l'échelle microscopique.



2.2.1.1 Processus de traitement conventionnel

Ce qui nous intéresse particulièrement ici est l'efficacité environnementale des stations d'épuration d'eaux résiduaires urbaines (ERU). L'élimination de la pollution organique fait appel à des procédés physiques (décantation) pour éliminer la pollution particulaire, à des procédés physico-chimiques pour les fractions particulaire, colloïdale et soluble précipitable ainsi qu'à des procédés biologiques pour l'ensemble des fractions (Canler and Perret, 2007). Néanmoins, une élimination partielle d'autres composés nuisibles, dont les perturbateurs endocriniens, est souvent réalisée simultanément, avec plus ou moins d'efficacité selon les procédés utilisés. Les principaux paramètres caractérisant les eaux usées urbaines sont repris dans le **Tableau 2.2**. Ils permettent de caractériser la charge polluante à traiter et indiquent le type de filière à suivre pour correspondre aux normes de rejets imposées. La filière type du traitement des eaux usées comporte différentes phases résumées dans les **Tableaux 2.3 et 2.4**. Nous allons nous pencher plus particulièrement sur les types de traitements que l'on rencontre dans ces stations. L'efficacité de ces différents traitements selon les différents types de stations sera discutée au point *d* de ce même paragraphe.

a. Traitement physico-chimique

Les filières physico-chimiques utilisent des moyens physiques (décantation, flottation, filtres et membranes) et/ou chimiques, consistant en l'ajout de coagulants (chlorure ferrique, sulfate d'ammonium) et de floculants (polymères) pour agglomérer les particules en suspension et faciliter leur sédimentation. Les systèmes de filtration consistent en des procédés de purification de l'eau par passage à travers des membranes de diamètre variable, via l'application d'une pression. On distingue les membranes de microfiltration (MF), d'ultrafiltration (UF), de nanofiltration (NF) et le procédé d'hyperfiltration ou osmose inverse, en fonction de la taille des pores. Ce dernier se base sur le principe de l'osmose, ou l'eau seule traverse une membrane semi-perméable vers le compartiment le plus dilué grâce à une inversion de la pression osmotique par l'application d'une pression hydraulique sur le compartiment le plus concentré. Le charbon actif est également utilisé comme filtre qui permet l'adsorption de nombreux composés.

b. Traitement biologique

Le traitement biologique consiste en une élimination de la charge carbonée, azotée et phosphorée par génération de biomasse bactérienne. Différents types de bactéries cohabitent dans la biomasse épuratoire et permettent de traiter spécifiquement la pollution organique, azotée ou phosphorée (informations complémentaires en **Annexe 2**). Afin de procéder à tous les types de traitement, les installations épuratoires doivent comprendre différents bassins présentant les conditions d'aérobie, d'anoxie ou d'anaérobie avec un système de recirculation de l'eau, nécessaires pour les différents processus de dégradation. Il existe un grand nombre de variantes de ces installations, qui diffèrent sur plusieurs points. Nous allons décrire les principaux types existant : le lagunage, les boues activées, les lits bactériens, les biodisques et les biofiltres (**Tableau 2.4**). Il est important de bien visualiser ces différences, car elles auront un impact sur l'élimination des composés en trace, comme les xénoestrogènes. Notons qu'il existe un procédé récent, le bioréacteur membranaire, qui combine le traitement des boues activées avec un processus de séparation solide-liquide par membrane (ultrafiltration ou nanofiltration) (**Figure 2.13**). Bien qu'il ne soit pas encore répandu en région wallonne, nous verrons que ce procédé est prometteur en matière d'élimination des EDC. Le **tableau 2.4** résume les points essentiels de ces différents types de stations d'épuration.

Tableau 2.5 : Composés organiques identifiés par GC/MS dans 7 effluents de STEP (près de Madrid en Espagne) et leur pourcentage d'apparition. Le type d'effet sur les organismes est aussi indiqué : toxique (T), perturbateur endocrinien (ED), carcinogène (C), mutagène (M), tératogène (Ter). Les composés sont également classés selon l'importance de leur toxicité : très toxique (VT), toxique (T), dangereux (H) et non toxique (NT) lorsque les valeurs de toxicité égalaient : 0-1 mg/l, 10-100 mg/l, et plus de 100 mg/l, respectivement (Aguayo *et al.*, 2004).

Compounds	CAS	% Apparition	Effects
Bisphenol A (BPA)	80-05-7	100	T/ED
Octilphenol (OP)	140-66-9	100	VT/ED
Di-isobutyl-phthalate (DIBP)	84-69-5	86	T/ED
<i>N,N</i> -Dimethyl-benzenamine	121-69-7	86	T/C
Di-ethylhexyl-phthalate (DEHP)	117-81-7	86	VT/C/ED/M
2,6-Bis(1,1-dimethylethyl)-phenol	128-39-2	57	T/C
Di-ethyl phthalate (DEP)	84-66-2	57	H/M
3-(1-methyl-2-pyrrolidinyl)-(5)-pyridine	54-11-5	43	VT
17 β Estradiol (E2)	50-28-2	43	ED
9-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	1120-25-8	43	-
Hexadecanoic acid, methyl ester	112-39-0	43	-
Phenol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	128-37-0	29	-
Phenol, 4-(2,2,3,3-tetramethylbutyl)	54932-78-4	29	VT
Estra, 1,3,5(10)-trien-17-one, 3-methoxy-	1624-62-0	29	-
Phenol, (1,1-dimethylethyl)-4-methoxy-	25013-16-5	29	C
Phosphoric acid, tributyl ester	126-73-8	29	T
Pyridine, 2,3-dimethyl-	583-61-9	29	-
Ethynil estradiol (EE2)	57-63-6	29	ED/M
7-Methoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzothipyan	86778-101	14	-
Benzene, 1,2,3-trimethoxy-5-methyl-	6443-69-2	14	T
Galaxolide	-	14	-
1,2,7,8,8a,9,10a-Octahydro-2,2,7,7-tetramethylphenanthrene	81478-79-7	14	-
1,2-Benzenedicarboxylic acid, 3-nitro-	603-11-2	14	-
Di-butyl-phthalate (DBP)	84-74-2	14	T/ED/Ter
1-Butanamine, <i>N,N</i> -dibutyl-	102-82-9	14	T
2-Propanol, 1-(2-methoxy-1-methylethoxy)-	20324-32-7	14	-
3-Eicosene, (E)-	74685-33-9	14	-
7-Hexadecenoic acid, methyl ester, (Z)-	56875-67-3	14	-
Benzenamine, <i>N,N</i> -diethyl-	91-66-7	14	T
1,3-dimethyl Benzene	108-38-3	14	T
Benzene, trimethyl(1-methylethyl)-	33991-29-6	14	-
Benzothiazole, 2-(methylthio)-	615-22-5	14	-
Cyclohexanone, 4-(1,1-dimethylethyl)-	98-53-3	14	-
Diazinon	333-41-5	14	VT/Ter
Diphosphoric acid, tetraethyl ester	107-49-3	14	VT
Estra-1,3,5(10)-trien-17-one, 3-hydroxy-1-methyl	4011-48-7	14	-
Estra-1,3,5(10)-trien-17-one, 3-methoxy-, (9b,13a)-	58072-52-9	14	-
Ethanol, 2-phenoxy-	122-99-6	14	H
Ethanone, 1,1'-(1,4-phenylene) bis	1009-61-6	14	-
Ethanone, 1-[4-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl]-	54549-72-3	14	-
<i>N</i> -Formyl-2-(2,5-dimethylphenyl)-piperidine	80574-60-3	14	-
Octadecene, (E)-	7206-21-5	14	-
Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	5129-60-2	14	-
Phenol	108-95-2	14	T/M
Phenol, 3-(1-methylethyl)	618-45-1	14	-
Triethyl phosphate	78-40-0	14	-
Pyridine, 2,3,5-trimethyl-	695-98-7	14	-
Pyridine, 2,3,6-trimethyl-	1462-84-6	14	-
Tertio butyl hydroxy anisole	121-00-6	14	-

Les installations épuratoires actuelles regroupent les différents types de procédés (biologiques et physico-chimiques).

2.2.1.2 Processus de traitement avancés : chlorination, ozonation et photolyse

Ces processus, classés dans le traitement quaternaire, sont utilisés pour éliminer les agents pathogènes de l'eau. Cette étape de désinfection est principalement utilisée dans le traitement de l'eau potable, mais est également obligatoire pour les effluents rejetés dans des zones de baignade. Les composés chlorés sont de puissants oxydants capables de détruire les agents infectieux (bactéries, virus, amibes) (Moriyama *et al.*, 2004). Néanmoins, leur utilisation mène à la formation de sous-produits de désinfections pouvant être toxiques (Nakano *et al.*, 2000) et confère à l'eau une odeur et un goût caractéristiques. C'est pourquoi leur remplacement par l'Ozone, agent oxydant tout aussi puissant, présente les avantages de ne pas être persistant dans l'eau et d'avoir une action rapide (Ternes *et al.*, 2003). Une autre alternative est la photolyse, processus qui utilise les rayons UV (253,7 nm) pour inactiver les agents pathogènes (Liu et Liu, 2004).

2.2.2 Composition des effluents de station d'épuration

En plus d'une charge polluante carbonée, azotée et phosphorée, les eaux usées domestiques et industrielles contiennent une multitude de composés organiques persistants dérivés d'utilisation domestiques et industrielles. Étant donné que cette charge polluante en trace n'est pas éliminée dans les processus conventionnels, les effluents de stations d'épuration restent des mélanges complexes de composés naturels et synthétiques et représentent dès lors des sources majeures et ponctuelles de xénoestrogènes dans l'environnement. Un exemple de composition d'effluents de 7 stations d'épuration en Espagne est représenté dans le **tableau 2.5** (Aguayo *et al.*, 2004). La composition des effluents varie fortement en fonction de la provenance des eaux traitées ainsi que du traitement suivi, qui peut conduire à la formation de composés intermédiaires, pour la plupart encore inconnus. De plus, on observe une variation de la composition des effluents en fonction de la période de l'année, les stations présentes dans des régions touristiques devant faire face à de fortes variations de charges durant la période estivale (Canler *et al.*, 2007). De même, des différences marquées dans les concentrations trouvées peuvent être observées entre différentes régions géographiques (Heberer, 2002). Les niveaux de concentration caractéristiques de différents xénoestrogènes dans les effluents STEP sont repris dans le **tableau 2.6**. Bien que les principaux xénoestrogènes présents dans les effluents de stations d'épuration ont été mis en évidence, il a été démontré expérimentalement que d'autres composants non identifiés contribuent à leur activité oestrogénique. Ceux-ci présentent une polarité similaire à celle des alkylphénols (Nakada *et al.*, 2004). De plus, on retrouve des concentrations mesurables en xénoestrogènes dans les eaux de surface (**Tableaux 2.7a et b**).

2.2.3 Potentiel oestrogénique des effluents

Le potentiel oestrogénique d'un effluent dépend de la composition en xénoestrogènes présents mais également des nombreux paramètres qui peuvent faire varier leur biodisponibilité (cfr §2.1.3.2). Aerni *et al.* (2004) ont mis en évidence que, sur 90 échantillons analysés, les plus fortes concentrations trouvées correspondent à E1, suivi de E3 puis de E2.

Tableau 2.6 : exemple de gamme de concentrations des composés oestrogéniques principaux mesurées dans les effluents de STP (Langston *et al.*, 2003).

Compound	Concentration range
17 β -oestradiol (E2)	1–50 ng l ⁻¹ (a,b) up to 64 ng l ⁻¹ (c)
17 α -ethinyloestradiol (EE2)	0.2–7 ng l ⁻¹ (a,b) up to 42 ng l ⁻¹ (c)
Alkylphenol polyethoxylates (APEO)	8.8–77.8 ng l ⁻¹ (d) up to 45 μ g l ⁻¹ (e)
Nonylphenol (NP)	<0.2–5.4 μ g l ⁻¹ (f) up to 3 μ g l ⁻¹ (e)
Octylphenol (OP)	0.4–1.82 μ g l ⁻¹ (g) 0.12–1.7 μ g l ⁻¹ (h)

Tableau 2.7a : Concentration en œstrogène dans l'eau des rivières (Auriol *et al.*, 2006).

Sampling site	Concentration (ng/L)						Analysis method
	Estrone	17 β -Estradiol	17 α -Estradiol	Estriol	17 α -Ethinyloestradiol	Mestranol	
France	1.1–3.0	1.4–3.2	–	1.0–2.5	1.1–2.9	–	SPE/GC-MS
Netherlands	<0.1–3.4	<0.3–5.5	<0.1–3	–	<0.1–4.3	–	SPE/GC-MS-MS
England	0.2–10	<LOD ^a –7.1	–	<LOD ^b –3.1	<LOD ^c	–	SPE/GC-NCI-MS
Germany	<LOD ^d	<LOD ^d	–	–	<LOD ^d	<LOD ^d	SPE/GC-MS-MS
Italy	1.5	0.11	–	0.33	0.04	–	SPE/LC-ESI-MS-MS
Spain (NE)	4.3	6.3	–	8	–	–	SPE/LC-MS
Japan	–	<LOD ^e	–	–	–	–	SPE/ELISA
Tokyo, Japan	–	32	–	5.5	–	–	SPE/TR-FIA
Japan	0.2–6.6	0.6–1.0	–	–	–	–	SPE/LC-MS-MS
California, USA	–	0.05–0.8	–	–	<0.05–0.07	–	SPE/ELISA

TR-FIA: time-resolved fluoroimmunoassay.

^a 0.03 ng/L.

^b 0.06 ng/L.

^c 0.05 ng/L.

^d 0.5 ng/L.

^e 1 ng/L.

Tableau 2.7b : Concentration des alkylphénols et leur ethoxykates dans l'eau des rivières (Auriol *et al.*, 2006).

Sampling site	Concentration (μ g/L)				Analysis method
	NP	NP1EO	NP2EO	OP	
Germany	0.0067–0.134	–	–	0.0008–0.054	SPE/HRGC-MS
Spain	LOD ^a –644	–	–	–	SPE/LC-MS
Japan	0.05–1.08	0.04–0.81	–	0.01–0.18	SPE/GC-MS
Taiwan	1.8–10	–	–	–	SPE/GC-MS
Canada	<0.01–0.92	–	–	<0.005–0.084	GC-MS
	–	<0.02–7.8	<0.02–10	–	SPE/HPLC
USA	LOD ^b –1.19	–	–	LOD ^c –0.081	SPE/HPLC
	12–95	–	–	–	SPE/GCMS
	0.077–0.416	0.056–0.326	0.038–0.398	0.00156–0.007	SPE/LC-MS

^a 0.15 μ g/L.

^b 11 ng/L.

^c 2 ng/L.

La combinaison et la contribution relative des différents oestrogènes naturels et synthétiques à l'activité oestrogénique sont variables, du à l'hétérogénéité et à la complexité des effluents de stations d'épuration. D'autre part, les eaux usées contiennent un grand nombre d'agonistes et d'antagonistes. Des interactions d'additivité, antagonistes ou synergiques parmi les différentes substances oestrogéniques peuvent masquer l'activité oestrogénique réelle, et ce en interférant avec les tests *in vitro* par un effet toxique ou antagoniste sur les récepteurs oestrogéniques (Murk *et al.*, 2002 ; Lee *et al.*, 2007). Une comparaison, effectuée par l'équipe de Lee (2007), entre l'EEQ calculé par méthode chimique (GC/MS) et l'EEQ réel mesuré par le test E-screen (cfr §2.3.2.1.) montre que l'EEQ calculé pour l'influent est significativement 2 fois supérieur à celui mesuré *in vitro* (**Figure 2.14**). Ceci indique la présence d'une plus grande part de composés oestrogéniques antagonistes et d'inhibiteurs dans l'influent que dans l'effluent de station d'épuration. Ces interactions peuvent mener à une mauvaise identification des contributeurs majeurs de l'activité oestrogénique. Les mêmes résultats ont été obtenus en utilisant d'autres tests *in vitro*, avec des EEQ calculés 2 à 10 fois supérieurs à ceux mesurés *in vitro* (Korner *et al.*, 2001 ; Murk *et al.*, 2002). Sun (2008) indique que l'utilisation du fractionnement par chromatographie ou HPLC peut résoudre ce problème en séparant les polluants en fonction de leur polarité, ce qui permet d'isoler les composés responsables de l'activité oestrogénique des interférences. Il met ainsi en évidence que les principaux composés contribuant à l'activité oestrogénique des effluents et des cours d'eau récepteurs sont les oestrogènes naturels (E1, E2) et synthétique (EE2). Cette constatation est soutenue par différentes études (Aerni *et al.*, 2004 ; Nakada *et al.*, 2004). C'est pourquoi il est important de se pencher sur les rejets d'eaux usées urbaines, susceptibles de contenir de fortes doses d'oestrogènes naturels et synthétiques. Les composés chimiques industriels tels que le NP, OP, BPA et les phtalates ne comptent que pour une petite partie de l'activité oestrogénique, compte tenu de leur faible puissance oestrogénique (Sun, 2008). De même une contribution insignifiante a été obtenue pour NP₁EO et NP₂EO (Aerni *et al.*, 2004).

Un grand nombre d'études utilisant des tests *in vitro* ont déterminé l'activité oestrogénique des eaux usées et de surface dans différents pays. L'activité oestrogénique totale des influents et effluents de station d'épuration ainsi que dans les eaux de surface (exprimée en EEQ) est respectivement de 0,6-153 ng/L, <25 ng/L (avec cependant des valeurs jusqu'à 150 ng aux USA) et <1-15 ng/L (avec des valeurs jusqu'à 80 ng/L) (**Tableau 2.8**) (Kinnberg, 2003). Ainsi, si l'on se réfère aux valeurs indiquées au §2.1.3.4, les niveaux de EEQ ou de concentration en composés oestrogéniques trouvés actuellement dans les écosystèmes aquatiques sont suffisants pour induire des effets oestrogéniques chez les poissons.

2.2.4 Effets des effluents de STEP sur les poissons situés en aval du rejet

Un grand nombre d'études dans la littérature ont mené à l'établissement d'une corrélation claire entre les perturbations observées chez les poissons et la présence d'effluent de station d'épuration. Pour illustrer ceci, nous pouvons citer Jobling, Tyler et Routledge (1998, 2002) qui ont observé des conditions « intersexe » chez des gardons (*Rutilus rutilus*) et des goujons (*Gobio gobio*) encagés en aval de STEP dans différentes rivières en Angleterre. Mais également Aerni *et al.* (2004), qui ont observé l'induction de la vitellogénine chez les truites arc-en-ciel mâles exposées à des effluents de station d'épuration en Espagne et en France. De même, plusieurs études montrent que la féminisation des poissons mâles est liée à l'occurrence des composés oestrogéniques dans les effluents de STEP : en aval de Berlin, 70% de la population de poissons sont des femelles (Hansen *et al.*, 1998) et certains effluents de stations d'épuration contiennent suffisamment d'E2 pour complètement féminiser les

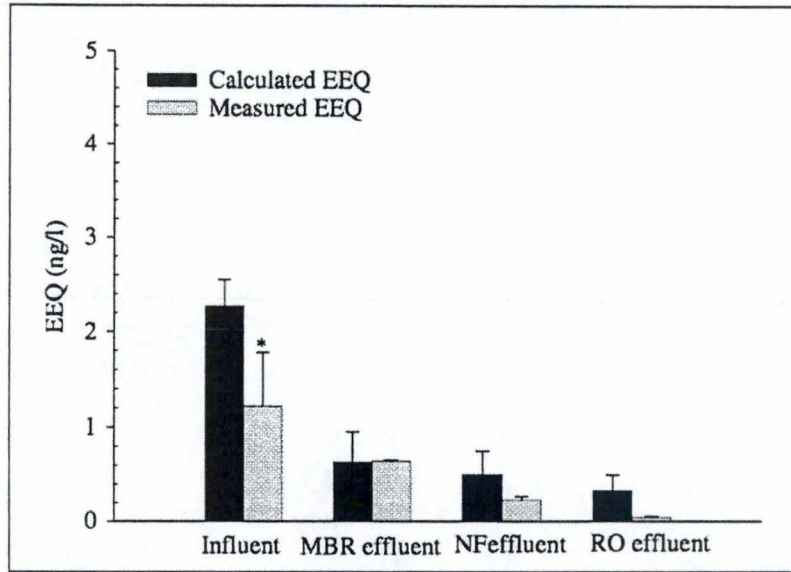


Figure 2.14 : comparaison entre le EEQ calculé et mesuré de l'affluent, et le processus de traitement d'eaux usées, comprenant un système MBR, couplé avec une membrane NF ou RO. Les valeurs de EEQ calculées et mesurées représentées sont les moyennes +_ SD de 9 échantillons d'influent et d'effluent pour chaque processus de traitement (Lee et al., 2007).

Tableau 2.8 : niveaux de EEQ mesurés dans différentes matrices environnementales (sédiments, eau), de différents pays en utilisant des tests *in vitro* (Kinnberg, 2003).

Matrix	EEQ (ng/l)	Country	In vitro assay	Reference
Wastewater influent	120	The Netherlands	ER-CALUX	Murk <i>et al.</i> , 2002
	0.6-153	The Netherlands	ER-CALUX	Vethaak <i>et al.</i> , 2002
	35-72	Japan	YES	Onda <i>et al.</i> , 2002
Wastewater effluent	2-25	Germany	E-screen	Körner <i>et al.</i> , 1999
	0.2-7.8	Germany	E-screen	Körner <i>et al.</i> , 2001
	6	Germany	E-screen	Körner <i>et al.</i> , 2000
	16	The Netherlands	ER-CALUX	Murk <i>et al.</i> , 2002
	0.05-2.6	The Netherlands	ER-CALUX	Vethaak <i>et al.</i> , 2002
	<d.l.-4.46	Belgium	YES	Witters <i>et al.</i> , 2001
	≤1-15	USA	YES	Huggett <i>et al.</i> , 2003
	1.90-14.9	USA	MVLN	Snyder <i>et al.</i> , 2001
	21-147	USA	YES	Tilton <i>et al.</i> , 2002
4-35	Japan	YES	Onda <i>et al.</i> , 2002	
Surface water	0.5	The Netherlands	ER-CALUX	Murk <i>et al.</i> , 2002
	0.02-0.04	The Netherlands	ER-CALUX	Vethaak <i>et al.</i> , 2002
	<d.l.-81.4	Belgium	YES	Witters <i>et al.</i> , 2001
	<24	United Kingdom	YES	Thomas <i>et al.</i> , 2001
	0.86-10.9	USA	MVLN	Snyder <i>et al.</i> , 2001
	2.2-12.1	China	MVLN, HGELN	Shen <i>et al.</i> , 2001
	0.5-7.4	Korea	E-screen	Oh <i>et al.</i> , 2000
	3.5	Japan	E-screen	Behnish <i>et al.</i> , 2001
	10	Japan	YES	Tashiro <i>et al.</i> , 2003
	<d.l.-23.5	South Africa	YES	Arijs <i>et al.</i> , 2002

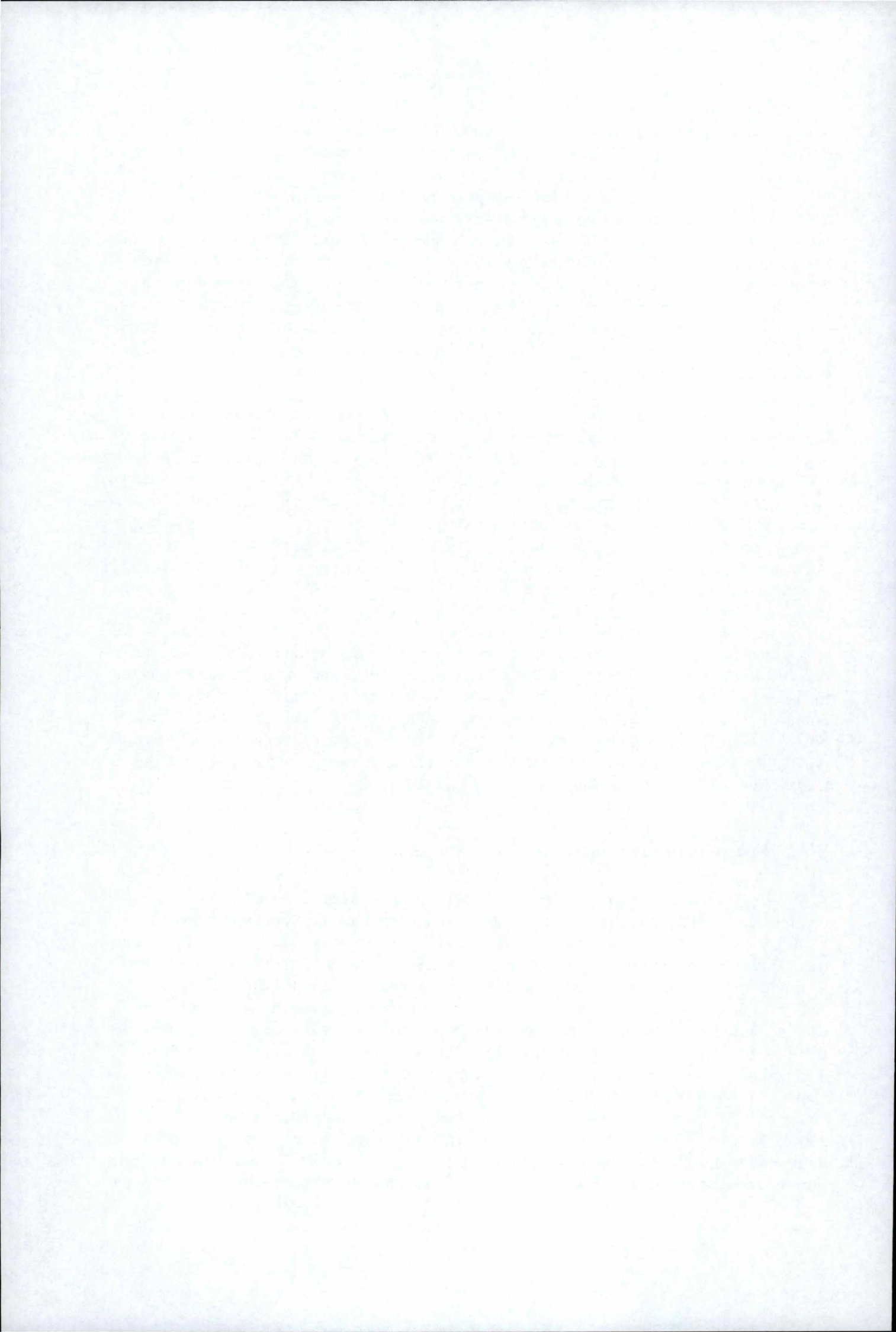
<d.l.: below detection limit

populations de medaka japonais (*Oryzias melastigmus*) s'ils sont exposés aux oestrogènes durant le début de leur vie (Nimrod et Benson, 1998). Lavado *et al.* (2004) ont mis en évidence une faible activité aromatasase au niveau des ovaires et une diminution de la glucuronidation de la T et de E2 chez des carpes mâles (*Cyprinus carpio*) prélevées en aval d'STEP en Espagne, ce qui suggère une diminution de la synthèse d'oestrogènes et une plus faible excrétion des stéroïdes sexuels, ce qui prolonge leur séjour dans le plasma en tant que composés actifs. En région Wallonne, Mayon *et al.* (2006) ont mis en évidence des niveaux de vitellogénine plasmatique chez des chevaines mâles (*Leuciscus cephalus*) aussi élevés que ceux des femelles en aval de STEP. De même, des signes de perturbations endocrine (biochimique et morphologique) ont été établis chez des loches franches femelles (*Barbatula barbatula*) et des gougeons mâle (*Gobio gobio*) en aval de différentes stations d'épurations (Doux fils *et al.*, 2007).

En ce qui concerne les effets des effluents de STEP au sein des niveaux d'organisation supérieurs (populations, communautés, écosystème), peu d'études se sont penchées sur le sujet, à cause notamment de la grande difficulté d'établir des relations de cause à effet avec les polluants présents. Néanmoins, une étude menée par Porter et Janz (2003) met en évidence des perturbations à tous les niveaux d'organisation biologique des Crapet à Longues Oreilles (*Lepomis megalotis*) exposés à des effluents de stations d'épuration aux USA. De même, Smith et ses collaborateurs (1999, Australie) ont découvert que l'abondance et la richesse des populations de poissons en aval des effluents de STEP étaient moins grandes que dans les sites pris comme référence, avec une diminution de 33% de la richesse spécifique des poissons. Plus récemment, l'équipe de Höger (2006) indique une perturbation générale des paramètres physiologiques et endocrines de la reproduction chez des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) exposées de façon chronique à des effluents de STEP. Ils en concluent néanmoins qu'une exposition à long terme à ces effluents ne représente pas une menace pour le développement reproducteur de ces poissons ni pour l'intégrité des populations naturelles. En ce qui concerne le goujon (*Gobio gobio*), une étude menée en Suisse sur des goujons prélevés en amont et en aval de 2 STEP indique une structure de population perturbée en aval d'une des stations étudiées, sans pouvoir confirmer que la présence de la STEP en est la cause (Faller *et al.*, 2003).

2.2.5 Efficacité d'élimination des xénoestrogènes

Les stations d'épuration urbaines reçoivent des eaux usées contenant un grand nombre de composés polluants en trace, pour lesquels les technologies de traitement conventionnel n'ont pas été spécifiquement conçues. Ainsi, les composés chimiques contenus dans les eaux usées traversent les systèmes de traitement des eaux sans, pour la plupart, être interceptés. Ils se retrouvent dès lors dans les effluents finaux et sont rejetés dans les eaux de surface. Les stations d'épuration actuelles sont conçues, dans le meilleur des cas, pour l'élimination du carbone (C), de l'azote (N), et du phosphore (P). Néanmoins, une élimination partielle des EDC est souvent réalisée simultanément. En effet, des processus de transformation et/ou de dégradation peuvent éliminer les composés oestrogéniques des eaux usées, et ce à différentes étapes du traitement. Actuellement, une grande ambiguïté existe quant aux processus d'élimination qui se produisent et surtout à quelles étapes du traitement (Carballa *et al.*, 2004). Dans une filière conventionnelle de traitement biologique secondaire des eaux usées, l'élimination des composés oestrogéniques organiques peut être due à une adsorption sur les flocs microbiens et leur élimination via les boues. L'élimination peut également se faire par



dégradation biologique ou chimique, par transformation ou encore par volatilisation durant la phase d'aération (Auriol *et al.*, 2006).

Le problème majeur auquel on doit faire face pour traiter la question de l'élimination des EDCs dans les filières de traitements des eaux usées est l'hétérogénéité des structures de traitement. En effet, on observe sur le terrain une large gamme de combinaison des différents procédés, si bien qu'aucune station n'est identique à une autre. Cela rend les comparaisons entre les différentes études très ardues. De plus, l'efficacité d'élimination des STEP est influencée par les propriétés chimiques spécifiques des composés mais également par l'activité microbienne et les conditions environnementales, ce qui devrait nous obliger à traiter chaque composé séparément, pour chaque type de traitement et dans différents environnements (DBO, température, saison,...). Malgré ces difficultés, suffisamment d'études ont été faites à ce jour pour permettre de ressortir les grandes tendances de l'efficacité d'élimination des EDCs.

2.2.5.1 Processus de traitement conventionnel

a. Traitement physique

Les STEP munies d'un traitement primaire sans traitement secondaire ne présentent aucune élimination des oestrogènes stéroïdes, ni d'autres composants en trace (Desbrow *et al.*, 1998 ; Johnson *et al.*, 2005 ; Ying *et al.*, 2007). Il semblerait dès lors que les processus physiques de précipitation, coagulation et flocculation, ainsi que les processus de sédimentation n'éliminent pas les contaminants organiques dissous, dont les oestrogènes stéroïdes (Ternes *et al.*, 2002). Ceci indique également que l'adsorption sur particule n'est pas un processus important pour l'élimination des oestrogènes naturels. À l'inverse, les membranes sont un moyen efficace pour diminuer la concentration de différents EDC durant le traitement des eaux usées. Le degré d'élimination est directement relié aux caractéristiques de membranes et aux propriétés moléculaires des contaminants (Snyder *et al.*, 2007). Les membranes à MF (microfiltration) et UF (ultrafiltration) présentent un bon potentiel d'élimination des oestrogènes stéroïdes, mais sont beaucoup moins efficaces pour la majorité des contaminants organiques. L'UF fonctionne très bien pour l'élimination de E2 et EE2 et dans une moindre mesure pour E1 et E3. Les processus de filtration membranaire utilisant la RO (osmose inverse) ou la NF (nanofiltration) sont très efficaces et montrent des taux d'élimination de plus de 95% pour la majorité des composés en traces testés, ce qui diminue les concentrations à des niveaux inférieurs au seuil de détection (Kim *et al.*, 2007). Snyder *et al.* (2007) ont obtenu des résultats similaires avec 99% d'élimination des hormones stéroïdes naturelles et synthétiques par la RO. Kim *et al.*, (2007) ont mis en évidence que la combinaison de ces membranes avec une irradiation aux UV n'améliore pas le taux d'élimination des membranes seules. De plus, ils ont démontré que la RO n'est pas plus efficace que la NF, bien qu'il soit beaucoup plus coûteux. Snyder *et al.* (2007) ont également mis en évidence qu'une approche multi-membrane s'avère plus efficace pour l'élimination des contaminants en trace, et particulièrement la combinaison d'une MF avant la NF ou la RO. Néanmoins, ces processus de traitement, conventionnellement utilisés pour la potabilisation de l'eau, sont difficilement envisageables dans les stations d'épuration, où le volume d'eau traitée est beaucoup plus important.

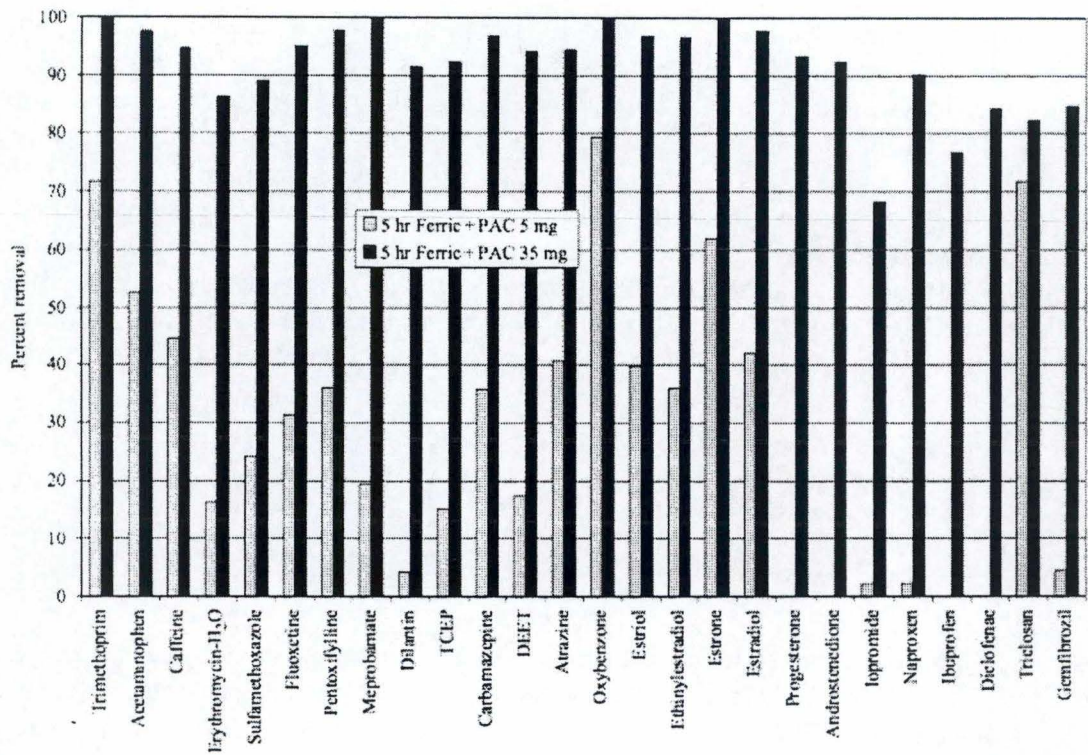


Figure 2.15 : élimination des EDC par le charbon actif en poudre (Snyder *et al.*, 2007).

b. Traitement chimique

Le charbon actif peut éliminer presque tous les contaminants organiques ; cependant, la capacité d'élimination est limitée par le temps de contact, la compétition avec les composés organiques naturels, la solubilité du contaminant ainsi que la dose et le type de charbon (Snyder *et al.*, 2006 ; Schafer and Waite, 2002). En effet, l'utilisation de charbon actif en poudre (PAC) ou en granule (GAC) permet d'éliminer une large gamme de composés en trace des effluents à un taux supérieur à 90%. On observe une relation dose-réponse évidente, avec une meilleure élimination des EDC lorsque la quantité de PAC augmente (**Figure 2.15**). De même, l'élimination est meilleure lorsque l'on augmente le temps de contact avec le PAC. Néanmoins, l'efficacité du charbon actif est fortement réduite par la présence de MO naturelle, en compétition pour les sites de liaison et peuvent bloquer les pores dans la structure du charbon actif (Snyder *et al.*, 2007). Par contre, l'utilisation de coagulants tels que l'aluminium et les sels ferreux ne permettent aucune élimination des EDC (Auriol *et al.*, 2006). Leur utilisation est également coûteuse et donc difficilement applicable pour le traitement des eaux usées à grande échelle.

c. Traitement biologique

Le traitement biologique secondaire est l'étape la plus efficace pour diminuer l'activité oestrogénique des eaux usées, avec néanmoins de grandes variabilités en fonction du type de traitement (Sheanan *et al.*, 2002 ; Leusch *et al.*, 2006 ; Johnson *et al.*, 2007 ; Pothitou et Voutsas, 2008). D'une manière générale, il apparaît que le processus conventionnel de boues activées est très efficace pour l'élimination des composés oestrogéniques. En effet, pour 46 STEP en processus de BA étudiées dans différents pays, les taux d'élimination sont de 91% pour E2, 78% pour E1 et 76% pour EE2 (Johnson *et al.*, 2007). De même, Ying (2007) reporte une élimination de 92% des phénols par ce procédé. Néanmoins, les données relatives à l'élimination de E1 sont assez hétérogènes, avec des données dans la littérature allant de 45 à 99% (Johnson et Sumpter, 2001).

Les processus responsables de l'élimination de ces oestrogènes n'ont pas été encore clairement définis, mais l'on pense que, parmi ceux-ci, de plus longs temps de rétention hydraulique (HRT) et âges des boues (SRT) (Johnson *et al.*, 2005 ; Andersen *et al.*, 2003 in Johnson 2007), ainsi qu'une charge organique (BOD) réduite (Onda *et al.*, 2003) contribuent à améliorer cette élimination. Ce phénomène a notamment été observé pour E1 et peut être élargi aux autres stéroïdes biodégradables (Johnson *et al.*, 2005). De plus, il a été mis en évidence expérimentalement que des communautés microbiennes nitrifiantes à croissance lente associées à un âge de boue élevé sont des paramètres importants dans la dégradation des oestrogènes stéroïdes (Vader *et al.*, 2000 ; Andersen *et al.*, 2003 ; Shi *et al.*, 2004). Ces constatations sont cohérentes si l'on considère que, pour les composés biodégradables, un plus long HRT permet une plus grande chance d'élimination. De même, un plus long SRT est corrélé à une plus grande concentration de biomasse dans la boue activée, donc plus de bactéries disponibles pour la biodégradation.

Selon une étude menée par Johnson (2004), le procédé de BA élimine plus d'oestrogènes stéroïdes qu'aucune autre forme de traitement des eaux. Plus récemment, on s'est aperçu que le bioréacteur membranaire (MBR) est considéré comme un processus de traitement meilleur pour l'élimination de EDCs par rapport aux processus conventionnels de BA seules (Lee *et al.*, 2007 ; Terzic *et al.*, 2005). En effet, le procédé de MBR présente de bonnes performances pour les oestrogènes naturels et certains composés pharmaceutiques (98-99%) mais est

Tableau 2.9 : pourcentage d'élimination de différents surfactants et leurs produits de dégradation par les processus de boues activées (BA) et bioréacteur membranaire (MBR) (basé sur les données de Lee *et al.*, 2007).

Composés	BA (%)	MBR(%)
NP3-15 EO	87	97
NP1EO	46	90
NP2EO	54	90
NP1-2EC	-	73
NP	96	96
OP1EC	50	85
OP2EC	23	66
OP	83	83

Tableau 2.10 : élimination des œstrogène par les processus de traitement avancé (Auriol *et al.*, 2006).

Compound	Concentration	Removal (%)	Reaction time	Added dose
Ozonation				
Estrone	0.015 µg/L ^c	>80	18 min	5 mg O ₃ /L
Estrone, 17β-estradiol	9.7–28 ng/L ^d 3.0–21 ng/L ^d	95	10 min	5 mg O ₃ /L
Chlorination				
17β-Estradiol	50 µg/L ^c	100	10 min	1.46 mg/L of sodium hypochlorite
17β-Estradiol	10 ⁻⁷ M ^e	100 ^a	36 h	1.5 mg/L of chlorine
17α-Ethinylestradiol	0.2 mmol/L ^e	100	5 min	1 mmol/L of chlorine
MnO ₂				
17α-Ethinylestradiol	15 µg/L ^c	81.7	1.12 h	-
TiO ₂				
17β-Estradiol	0.05–3 µmol/L ^c	98	3.5 h	-
TiO ₂ + UV				
17β-Estradiol	10 ⁻⁶ M ^e	99 100 ^b	30 min 3 h	1.0 g/L of TiO ₂ in suspension

^a Complete removal of estrogenic activity.

^b Decomposed completely into CO₂.

^c Municipal STP effluent.

^d Wastewater from secondary treatment.

^e Synthetic water.

beaucoup moins efficace pour EE2 et est limité dans l'élimination d'autres composés en trace (Kim *et al.*, 2007 ; Johnson *et al.*, 2007). De même, les MBR sont très efficaces pour l'élimination des composés alkylphénols, ainsi que des autres surfactants ioniques et non-ioniques (**Tableau 2.9**). En effet, l'équipe de González (2007) a mis en évidence que les MBR retiennent et dégradent les surfactants avec une efficacité globale de 94%, ce qui est bien supérieur aux performances obtenues en BA classiques qui atteignent seulement 54% d'élimination globale de ces composés. Les meilleures performances de dégradation des MBR seraient dues à la forte concentration de biomasse, qui forcerait les bactéries à minéraliser également les composés organiques faiblement dégradables, ainsi qu'à l'âge élevé des boues qui permettrait aux bactéries à croissance lente de s'adapter à ces substances (Joss *et al.*, 2004 ; González *et al.*, 2007 ; De Wever *et al.*, 2007). Par ailleurs, les biofiltres (BFP) présentant un court HRT sembleraient être moins efficaces que les BA. On rapporte des données de taux d'élimination des oestrogènes pour ce procédé de 90% pour E2, 67-90% pour E1 et plus faible pour EE2 (64-69%). De même, la technique du lagunage présente des limitations dans l'élimination des xénoestrogènes des eaux usées. Selon une étude menée par Ying *et al.*, (2007), le lagunage est le procédé le moins efficace pour l'élimination des xénoestrogènes. Cette constatation est corrélée aux faibles paramètres de performance des stations d'épuration limitées à ce système (BOD, solides en suspension et ammonium élevés dans l'effluent).

d. Processus de traitement avancés

Le **tableau 2.10** donne les efficacités d'élimination des oestrogènes naturels par les processus de traitement avancé. On remarque directement une efficacité nettement supérieure à celle obtenue par les processus de traitement conventionnel, avec des pourcentages d'élimination proches de 100%. Cependant, l'inconvénient majeur de ces procédés est qu'ils conduisent à la formation de sous-produits de dégradation dont l'oestrogénicité est inconnue ou dans certains cas supérieure ou similaire à celle de leur précurseurs (Auriol *et al.*, 2006). La plupart de ces sous-produits ne sont pas encore identifiés et peuvent être encore plus nocifs que les composés de départ. Par exemple, le processus de chlorination mène à la formation de sous-produits chlorés tels que le trihalométhane et l'acide holoacétique, lesquels présentent des activités carcinogènes et/ou mutagènes (Moriyama *et al.*, 2004). De même, les dérivés chlorés du BPA sont plus persistants et plus puissants que le BPA (Kuruto-Niwa *et al.*, 2002 in Moriyama, 2004) et EE2 est dégradé par ce processus en sous-produits oestrogéniques, avec des puissances néanmoins plus faibles (Moriyama *et al.*, 2004). Cependant, Lee (2004) démontre que le traitement au chlore est très efficace pour éliminer l'activité oestrogénique des effluents, avec la combinaison du temps de réaction et de la dose de chlore à optimiser. Le procédé le plus inoffensif semble être l'irradiation aux UV, qui élimine efficacement E2 et E1 sans générer d'intermédiaires préoccupants (Ohko *et al.*, 2002). En effet, les résultats de Liu (2004) indiquent que E2 et E1 subissent une photolyse directe rapide sous les radiations des lampes de désinfections UV ($\lambda = 365$ nm). La photolyse de ces deux oestrogènes cause la dégradation et l'oxydation des cycles benzéniques pour produire des composés contenant des groupes carbonyles, peu susceptibles d'être oestrogéniques ou toxiques. Ces processus de traitement avancés sont prometteurs en termes d'élimination des micropolluants, néanmoins ils sont assez coûteux et ne sont pas envisageables pour un traitement des eaux usées à large échelle.

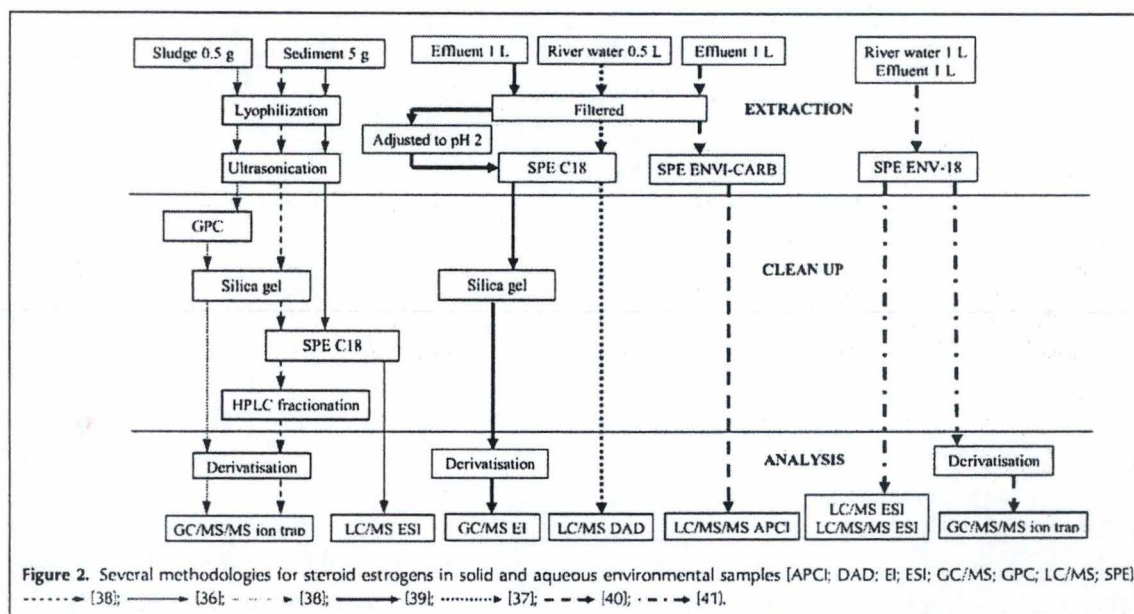


Figure 2.16 : différentes méthodologies pour l'analyse des oestrogènes stéroïdes à partir d'échantillons solides et aqueux (Gomes et al., 2003).

APCI : atmospheric pressure chemical ionisation ; DAD : Diode array detection ; EI : Electron impact ; ESI : electrospray ionisation ; GC/MS(MS) : gas chromatography/mass spectrometry (tandem) ; GPC : gel permeation chromatography ; LC/MS (MS) : liquid chromatography/mass spectrometry (tandem) ; SPE : solid phase extraction

Tableau 2.11 : limites de détection des principales méthodes analytiques et tests in vitro utilisés pour mesurer les composés oestrogéniques. Les valeurs proviennent de mesures effectuées sur des matrices solides, ou des échantillons d'affluents ou d'effluent de STP (Campbell et al., 2006). Les limites de détection sont des valeurs EC50 en ng/l.

Method	Detection limit (ng/l)
E-Screen	0.27
ER-CALUX	0.14
YES	0.3-30
ELISA	20-40
LC-MS/MS	0.08-33
GC-MS	0.2-2
GC-MS/MS	0.05-2.4
SPME-HPLC	0.064-1.2
HPLC/ESI-MS/MS	0.2-1
MEKC	44-89

Tableaux 2.12 : durée de mise en oeuvre des principaux tests in vitro utilisés pour mesurer l'oestrogénicité (d'après Kinnberg, 2003 *Vanparys et al., 2007)

Test	Cellules	Durée (jours)
ER binding		1
ER callux	T47D	3
YES	Levure	2-10
E-Screen	MCF-7	5-8
E-Screen+ cytométrie de flux*	MCF-7	1

2.3 Méthodes de détermination de l'activité oestrogénique

Les très faibles concentrations en xénoestrogènes dans l'environnement requièrent des techniques analytiques sophistiquées pour leur mesure et l'évaluation de leur effet sur les organismes aquatiques. De plus, étant donné que de nombreux composés chimiques de nature variée peuvent potentiellement perturber les systèmes endocriniens des animaux sauvages, des méthodes analytiques couvrant une large gamme de composés chimiques sont requises pour l'identification des EDCs. Actuellement, deux méthodologies sont possibles pour estimer le potentiel oestrogénique d'un effluent : biologique ou chimique. La différence fondamentale entre les 2 approches est que les méthodologies biologiques mettent en évidence le potentiel oestrogénique d'un composé chimique ou d'un échantillon, tandis que les techniques chimiques identifient des composés chimiques connus et quantifient leur concentration dans cet échantillon (Gomes *et al.*, 2003). Pour pouvoir faire un lien de cause à effet, c'est-à-dire pouvoir identifier le ou les composé(s) chimique(s) responsables d'une activité oestrogénique, il est nécessaire de combiner les 2 approches (Zacharewski, 1997). Nous allons décrire brièvement ces méthodes, leurs avantages et inconvénients.

2.3.1 Méthodes chimiques

Cette méthodologie est très intéressante pour détecter la présence et la concentration d'EDC d'intérêt dans l'environnement. Différentes méthodologies chimiques sont utilisées pour analyser les composés oestrogéniques d'échantillons environnementaux aqueux et solides. Les principales sont représentées dans la **Figure 2.16**.

Les chromatographies [solide (SPE), aqueuse (LC) ou gazeuse (GC)] suivies d'un spectromètre de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS) sont des méthodes efficaces pour la séparation, l'identification et la quantification des EDCs présents dans un échantillon (Gomes *et al.*, 2003). Différentes étapes d'extraction et de purification sont également indispensables. L'utilisation de différents assortiments de techniques (HPLC, GC/MS, GC-MS/MS, LC-MS/MS) a été optimisée selon leur sensibilité pour les molécules ciblées, reposant sur leur comportement chimique (volatilisation, stabilité thermique...).

2.3.2 Méthodes biologiques

Les méthodes biologiques sont utilisées pour déterminer l'activité oestrogénique d'un composé chimique ou d'un échantillon complexe et leurs effets potentiels sur les organismes. Ces méthodes incluent des tests *in vitro* ou *in vivo*. Les tests *in vitro* utilisent du matériel biologique isolé comme des anti-corps ou les récepteurs oestrogéniques, ou des cellules modifiées génétiquement ou non ; tandis que les tests *in vivo* se basent sur des organismes. Ces méthodes peuvent fournir des réponses qualitative ou quantitative. Les récentes découvertes de l'effet des xénoestrogènes sur le vivant ont mené à l'élaboration de tests de plus en plus sensibles et spécifiques pour un dépistage rapide du potentiel oestrogénique des échantillons d'eau usée et de surface.

2.3.2.1 Tests *in vitro*

Trois grands types de tests *in vitro* permettent de mesurer l'activité oestrogénique d'une substance ou d'un échantillon complexe, à savoir :

- Les tests de liaison aux récepteurs oestrogéniques (ER-binding assay), qui quantifient la capacité d'un composé testé à concurrencer l'E2 marqué radioactivement ($^3\text{HE2}$) pour la liaison au ER ;
- Les tests de prolifération cellulaire, typiquement le E-screen et la culture d'hépatocytes de poissons, qui mesurent la prolifération de cellules dont la croissance est sensible aux oestrogènes et dès lors aux substances xénoestrogéniques ;
- Les tests de gènes rapporteurs, basés soit sur cellule de levure (YES, Yeast estrogen) soit sur cellules de mammifères (ER-Callux), qui se basent sur la capacité d'un composé à stimuler l'activité transcriptionnelle dépendante du ER, sur base de cellules cancéreuses humaines (Pons *et al.* 1990) ou de cellules de levures transgéniques (Routledge and Sumpter, 1997). Les cellules sont transfectées avec des éléments de réponses oestrogéniques (ERE) liés à un gène rapporteur.

Des points de comparaison importants entre les différents types de tests sont leur limite de détection ainsi que le temps nécessaire à leur réalisation. Les **Tableau 2.11 et 2.12** reprennent ces différents paramètres pour les principales méthodes abordées ci-dessus. La sensibilité des différents tests est représentée par les valeurs d'EC-50.

Etant donné la grande sensibilité du test de prolifération cellulaire, l'intégration d'un niveau d'organisation élevé et la possibilité de mesurer l'oestrogénicité d'échantillons complexes, il sera utilisé dans le cadre de ce travail. C'est pourquoi, une description détaillée de ce test, ses avantages et inconvénients est décrite ci-dessous. Une description plus détaillée des autres types de test est fournie en **annexe 3**.

a. Tests de prolifération cellulaire : E-screen (MCF-7)

Ce test, mis au point par Soto *et al.* (1992), mesure la prolifération de cellules cancéreuses humaines de la lignée MCF-7, en réponse aux oestrogènes. La lignée cellulaire a été initialement établie par Soule *et al.* (1973), à partir de cellules métastasées d'un carcinome canalaire infiltrant du sein. Différents stocks présentant des sensibilités variables ont été développés durant les 20 dernières années.

Le test E-screen se base sur 3 prémices : (1) un facteur inhibant la prolifération des cellules MCF-7 est ajouté dans le sérum de culture, (2) les oestrogènes induisent la prolifération cellulaire en désactivant cet effet inhibiteur, (3) les substances non oestrogéniques ne neutralisent pas le signal inhibiteur présent dans le sérum. Après quelques jours d'incubation dans un milieu de culture contenant les composés à analyser, les cellules sont lysées et les noyaux sont comptés sur un compteur Coulter. On compare ensuite le nombre de cellules présentes après incubation, en absence ou en présence du composé testé (Soto *et al.*, 1992, 1993 in Kinnberg, 2003). Korner *et al.* (1998) utilisent quant à eux une méthode colorimétrique plutôt que de compter les noyaux cellulaires. Bien que ce test soit l'un des tests *in vitro* les plus sensibles pour mesurer l'oestrogénicité, une période d'exposition de 6 jours est requise pour obtenir des résultats, ce qui limite son utilisation pour une évaluation à grande échelle. Une variante du test E-screen, l'analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux, est depuis peu utilisé comme test *in vitro* pour la mesure de

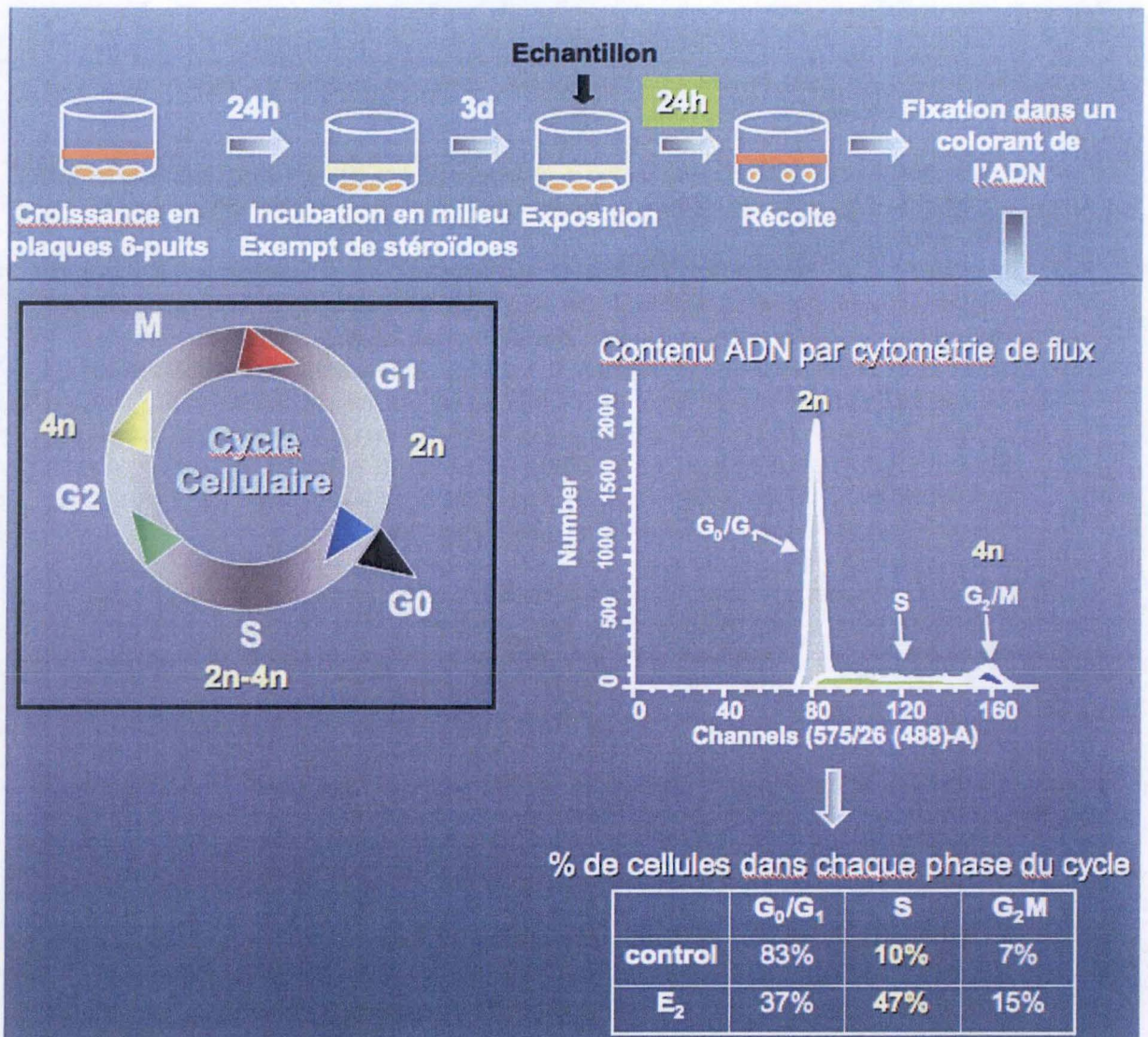


Figure 2.17: Analyse du cycle cellulaire par cytométrie de flux. Les cellules à croissance oestrogéno-dépendante sont cultivées en absence d'oestrogène, ce qui les synchronise dans la phase G_0 du cycle cellulaire. L'échantillon est mis en contact pendant 24h00. On compte ensuite le nombre de cellules en phase S, pourcentage proportionnel à l'oestrogénicité de l'échantillon. E_2 est le contrôle positif.

REM : La cytométrie de flux permet de discriminer les cellules se trouvant à différents stades du cycle cellulaire, basé sur le contenu en ADN des noyaux. Concrètement, les cellules sont cultivées en présence de 17β -oestradiol dans le milieu de croissance. Avant l'analyse, on enlève cet oestradiol afin d'arrêter la croissance des cellules et de les coordonner toutes en phase G_0 du cycle cellulaire. L'échantillon est alors mis en présence des cellules pendant 24h00. Si celui-ci est oestrogénique, cela va induire le passage des cellules vers la phase S et ce de façon dose-dépendant. La cytométrie de flux permet alors de mesurer le nombre de cellules en phase S par une mesure du contenu en ADN du noyau. connaissant le pourcentage de cellules passant en phase S en présence de E_2 et en présence d'un contrôle non oestrogénique, ce test permet de définir le potentiel oestrogénique d'un échantillon complexe (comme les eaux de stations d'épuration). Le grand avantage de la cytométrie de flux comparé au test de E-screen classique est sa rapidité. La mesure du potentiel oestrogénique s'obtient en 24h00 seulement, comparé à 6 jours pour le test E-screen classique.

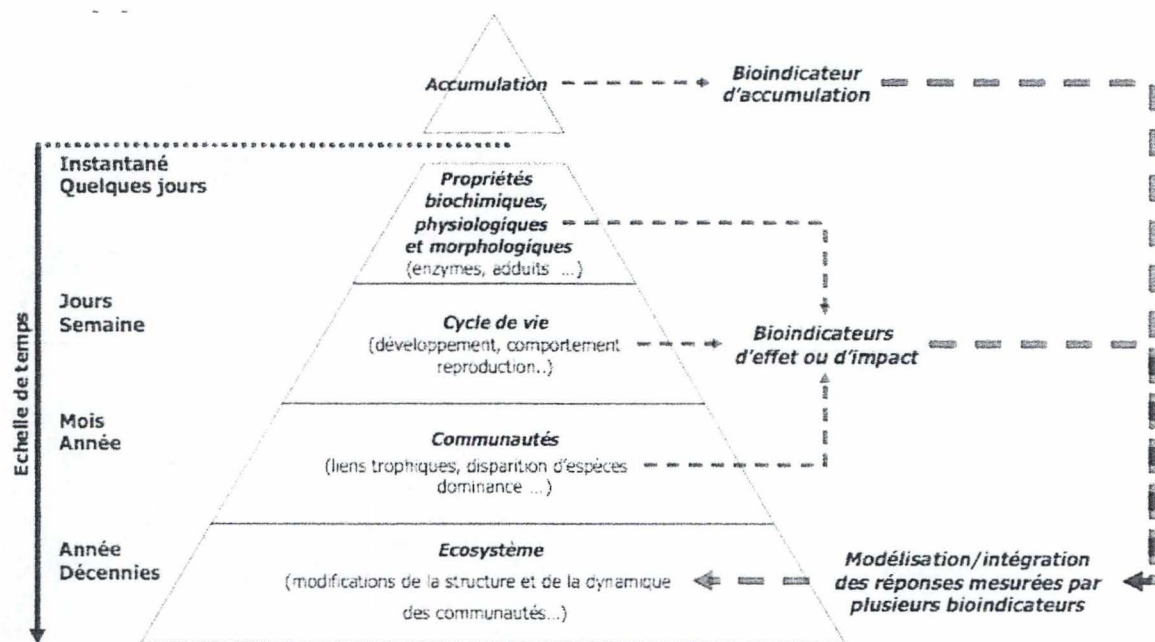


Figure 2.18 : représentation schématique des différents niveaux de réponse des bioindicateurs. (ADEME, 2004).

Tableau 2.13 : exemples d'organismes étudiés comme indicateurs d'une perturbation endocrine oestrogénique (traduit de Campbell *et al.*, 2006).

Espèce	Nom commun	Effets de l'EDC
<i>Rana pipiens</i>	Grenouille léopard	Anomalies des gonades
<i>Chrysemys picta</i>	Chrysemyde	Induction de la Vitellogénine
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Truite arc-en-ciel	Insuffisance de la reproduction, des œufs et de la progéniture, et induction de la vitellogénine
<i>Pimephales promelas</i>	Vairon américain	Développement des gonades ; insuffisance de la reproduction, et du développement ; induction de la vitellogénine
<i>Cyprinodon variegatus</i>	Vairon de Sheepshead	Induction de la Vitellogénine
<i>Danio rerio</i> / <i>Brachydanio rerio</i>	Poisson zèbre	Développement des gonades ; Développement physiologique ; induction de la vitellogénine, luciférine
<i>Oryzias latipes</i>	Médaka japonais	Développement des gonades ; succès reproducteur ; GFP
<i>Platichthys flesus</i>	Flet	Induction de la vitellogénine ; développement des gonades ; développement physiologique
<i>Salmo salar</i>	Saumon de l'atlantique	Induction de la vitellogénine et des protéines de la <i>zona radiata</i>
<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	Aigle chauve	Effets sur la reproduction et effet tératogène
<i>Coturnix japonica</i> and <i>Colinus virginianus</i>	Caille du Japon et Colin de Virginie	Comportement sexuel ; développement de l'embryon ; épaisseur de la coquille des oeufs
<i>Gallus domesticus</i>	Poulet domestique	Développement de l'embryon ; épaisseur de la coquille des oeufs
<i>Daphnia magna</i>	Daphnie	Perturbations physiologiques et biochimiques
<i>Tisbe battagliai</i>	Copépode marin	Fécondité, longévité et taux de développement

Tableau 2.14 : Résultats sur l'histopathologie des gonades sur différentes espèces de poissons soumises à des xénoestrogènes.

Organisme étudié	Composé étudié	Résultats	Références
<i>Gobio gobio</i>	Effluent STEP	- Apparition d'un ovotestis - Anomalies hépatiques	Faller <i>et al.</i> , 2003
<i>Gobio gobio</i>	Effluent STEP	- Apparition d'un ovotestis de stade avancé	Van Aerle <i>et al.</i> , 2001
<i>Cyprinus carpio</i>	Effluent STEP	- Intersexes	Solé <i>et al.</i> , 2001
<i>Danio rerio</i> juvéniles	EE ₂	- Réversion sexuelle femelle	Orn <i>et al.</i> , 2003
<i>Danio rerio</i>	E ₂	- Atteinte à la différenciation sexuelle chez les jeunes - Inhibition de la production d'oeufs - Ovotestis	Brion <i>et al.</i> , 2004
<i>Oryzias latipes</i>	E ₂	- Diminution du poids de la gonade à dose élevée	Kang <i>et al.</i> , 2002
<i>Pimephales promelas</i>	17β-E ₂	- Inhibition de la croissance testiculaire	Halm <i>et al.</i> , 2002
<i>Pimephales promelas</i>	E ₂ et EE ₂	- Atrésie Moins de follicules matures	Leino <i>et al.</i> , 2005
<i>Platichthys flesus</i>	Effluent STEP	- Anomalies testiculaires (diminution lobules, paroi testiculaire épaissies)	Lye <i>et al.</i> , 1997
<i>Rutilus rutilus</i>	Effluent STEP	- Augmentation de l'intersexualité aval de STEP - Inhibition de la croissance testiculaire - Intersexe	Jobling <i>et al.</i> , 1998
<i>Rutilus rutilus</i>	Effluent STEP	- Diminution du volume et de la densité de sperme - Atrésie chez les femelles - Inhibition de la spermatogenèse chez les intersexes	Jobling <i>et al.</i> , 2002

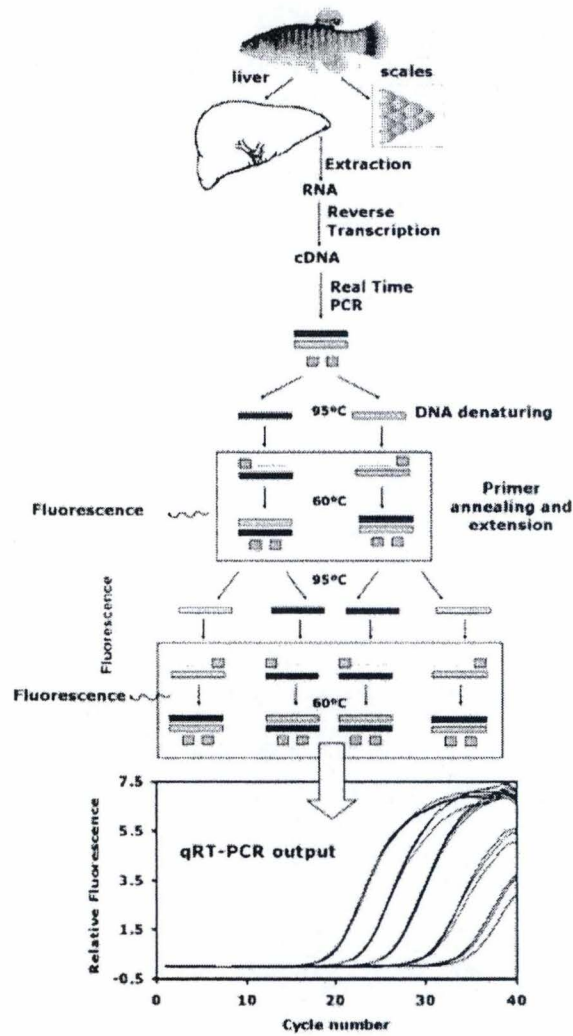


Figure 2.19 : processus de quantification de l'ARNm par qRT-PCR (quantitative real time PCR). L'ARN total est extrait de tissus variés (par exemple le foie et les écailles) et rétro-transcrit en ADNc. Les molécules d'ADNc spécifiques sont sélectivement amplifiées par une réaction de polymérisation en chaîne, dont les étapes d'amplification sont mesurées en temps réel par fluorescence. Le nombre de cycles requis pour la détection des produits d'amplification est inversement proportionnel au nombre initial de molécules d'ARNm au départ (Pina *et al.*, 2007).

l'oestrogénicité. Ce test mesure la distribution des cellules dans les différents stades du cycle cellulaire, par mesure du contenu en ADN du noyau (signal fluorescent). La prolifération des cellules est mesurée comme le pourcentage de cellules en phase S du cycle cellulaire. Dès lors, ce test permet l'évaluation de la prolifération cellulaire en détail (**Figure 2.17**). Les grands avantages de cette technique sont le peu de temps requis pour les tests, la possibilité de mesurer des mélanges complexes et sa facilité d'utilisation (Vanparys *et al.*, 2006). De plus, en se basant sur une action spécifique des œstrogènes qui est d'induire la prolifération cellulaire, il intègre un niveau élevé de l'organisation cellulaire (notamment la voie d'absorption dans la cellule). Ce test est donc très réaliste du point de vue des effets des xœstrogènes et est plus sensible étant donné que le comptage se fait sur un très grand nombre de noyaux cellulaires (10-20 000 cellules). Étant donné que nous l'utiliserons pour l'évaluation de l'oestrogénicité de nos échantillons, cette technique sera plus amplement détaillée dans la partie matériel et méthode ainsi que dans la discussion de ce travail.

2.3.2.2 Tests in vivo

La meilleure preuve de l'activité des xœstrogènes sont les effets qu'ils induisent sur le vivant. Depuis quelques années, la recherche en gestion environnementale se penche sur la détermination de biomarqueurs comme indicateurs précoces de perturbations au niveau des organismes et des populations. Un biomarqueur est un changement biologique (réponse moléculaire, cellulaire, physiologique ou comportementale) qui peut être corrélé à l'exposition à un ou plusieurs composés environnementaux et à leurs effets toxiques (Lam et Gray, 2003). Il existe deux types de biomarqueurs : d'accumulation ou d'effet/exposition, représentés à la (**Figure 2.18**). Actuellement, différentes espèces ont été étudiées comme indicateurs de l'oestrogénicité dans les eaux naturelles (**Tableau 2.13**). Chez les poissons, les principaux biomarqueurs corrélés à l'exposition aux xœstrogènes validés par la communauté scientifique sont des changements phénotypiques tels que l'expression protéique (niveau de vitellogénine plasmatique, activité de l'aromatase dans les gonades), les niveaux de stéroïdes sexuels plasmatiques ou des anomalies morphologiques (intersexe).

En pratique, les niveaux de VTG plasmatiques peuvent être mesurés par différentes méthodes : tests radioimmunologique (Radioimmunoassay : RIA), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) et Western blot (Gomes *et al.*, 2003). Une perturbation de la stéroïdogénèse peut être évaluée par le ratio 17β -estadiol/11-KT présent dans le plasma des poissons, par la méthode RIA, tandis que l'activité aromatase peut être établie par radiométrie (production d'eau tritiée). Enfin, les perturbations morphologiques sont déterminées par analyse histologique des gonades. Le **tableau 2.14** présente les données de quelques études sur l'histopathologie de gonades affectées par les xœstrogènes et les effluents de STEP.

Récemment, la mise au point d'une nouvelle technologie basée sur la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), la reverse transcription PCR (RT-PCR), pour quantifier des molécules d'ARN messager spécifiques a permis le développement d'une nouvelle famille de biomarqueurs, basés sur l'analyse de l'expression des gènes (Pina *et al.*, 2007). Cette technique permet d'amplifier de façon sélective, à l'aide d'amorces sélectionnées, les ARNm d'un gène cible au sein d'un tissu animal. À l'aide d'un composé intercalant fluorescent, le contenu en amplicons peut être mesuré pour chaque cycle d'amplification PCR. Dès lors, il est possible de déterminer la concentration en ARNm de départ (Bustin, 2000). Cette technique nécessite plusieurs étapes, dont une reverse transcription de l'ARNm en ADNc (**Figure 2.19**). Elle sera décrite en détail dans la partie matériel et méthode de ce travail. Les

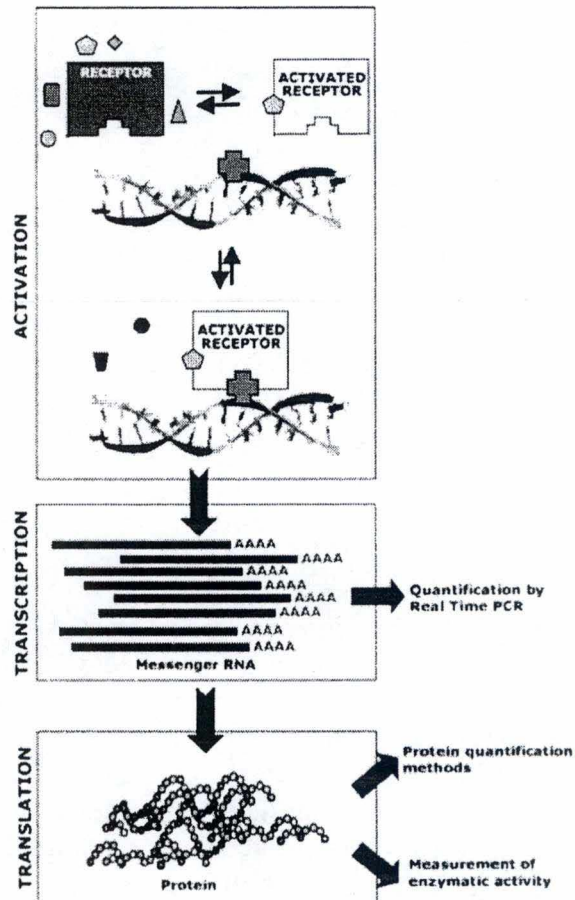


Figure 2.20 : Schématisation de la réponse génomique à des effecteurs (endogènes ou exogènes). L'information concernant l'interaction entre le récepteur et un polluant spécifique est transférée à l'ensemble du mécanisme de transcription/traduction. Cette interaction peut être évaluée au niveau des transcrits mRNA ou au niveau de l'expression protéique.

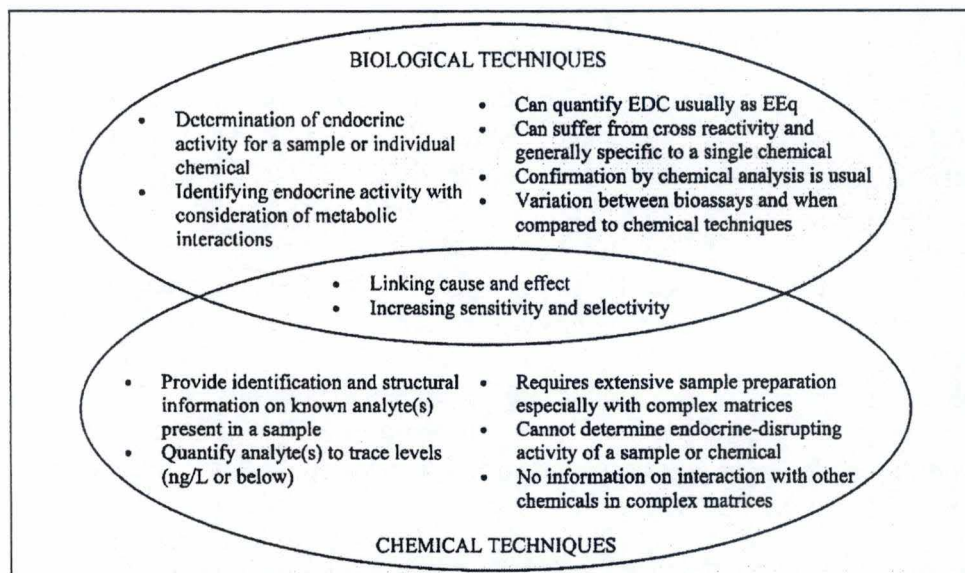


Figure 2.21 : résumé des différents avantages et inconvénients de la détermination des EDC par les méthodologies chimiques et biologiques (Gomes et al., 2003).

avantages de cette technique sont sa rapidité, sa très haute sensibilité et le peu de matériel biologique nécessaire (de l'ordre du mg). De plus, cette technique est facilement transférable d'une espèce à l'autre en créant le couple d'amorces approprié et peut s'appliquer à une série de gènes d'intérêt (Garcia *et al.*, 2004). Néanmoins, ce procédé nécessite la connaissance de la séquence du gène à amplifier et surtout une validation de la corrélation entre l'expression du gène et celle de la protéine. En règle générale, la quantité de protéine reflète la concentration relative de l'ARNm correspondant, dont le taux de transcription dépend de l'activation d'un récepteur, déterminée par la présence et la concentration effective de l'effecteur (**Figure 2.20**). Mais la situation inverse n'est pas toujours vraie. Ainsi, il est important de valider des mesures d'expression génique avec des mesures d'expression protéique (Pina *et al.*, 2007). À ce jour, une corrélation entre l'expression génique et l'expression protéique a été validée par différentes méthodes pour une série de gènes, chez différentes espèces (Pina *et al.*, 2007).

La mesure de l'expression du gène de la Vtg a été valorisée comme biomarqueur de contact avec les xénoestrogènes par différentes études. Par exemple, une corrélation a été démontrée entre l'exposition de truite arc-en-ciel (*oncorhynchus mykiss*) à l'E2 et l'expression des ARNm de la vitéllogénine (Celius *et al.*, 2000). Cette corrélation est également vraie pour l'exposition de truites arc-en-ciel, de Saumon atlantiques (*salmo salar*) et de truite fardées (*oncorhynchus clarkii*) à des effluents urbains (Roberts *et al.*, 2005).

L'inconvénient majeur de cette approche *in vivo* est la spécificité de réponse des organismes aux différents xénoestrogènes, qui rend difficile la mise en place de biomarqueurs « universels » de l'exposition à ces composés. Ces tests sont néanmoins particulièrement pertinents dans l'étude de l'impact des effluents de station d'épuration dans les eaux de surface, car ils permettent d'estimer directement l'impact de concentrations environnementales réelles de xénoestrogènes sur le vivant.

En guise de conclusion pour le § 2.3., nous pouvons dire que lors de l'analyse d'échantillons complexes tels que les effluents de stations d'épuration, il est important de lier les méthodes biologiques et chimiques afin d'une part d'estimer le potentiel oestrogénique de l'échantillon et d'autre part de déterminer les molécules impliquées ainsi que leur concentration dans l'échantillon. Un résumé des avantages et inconvénients des 2 approches est repris dans la **Figure 2.21**.

MATERIEL ET METHODES

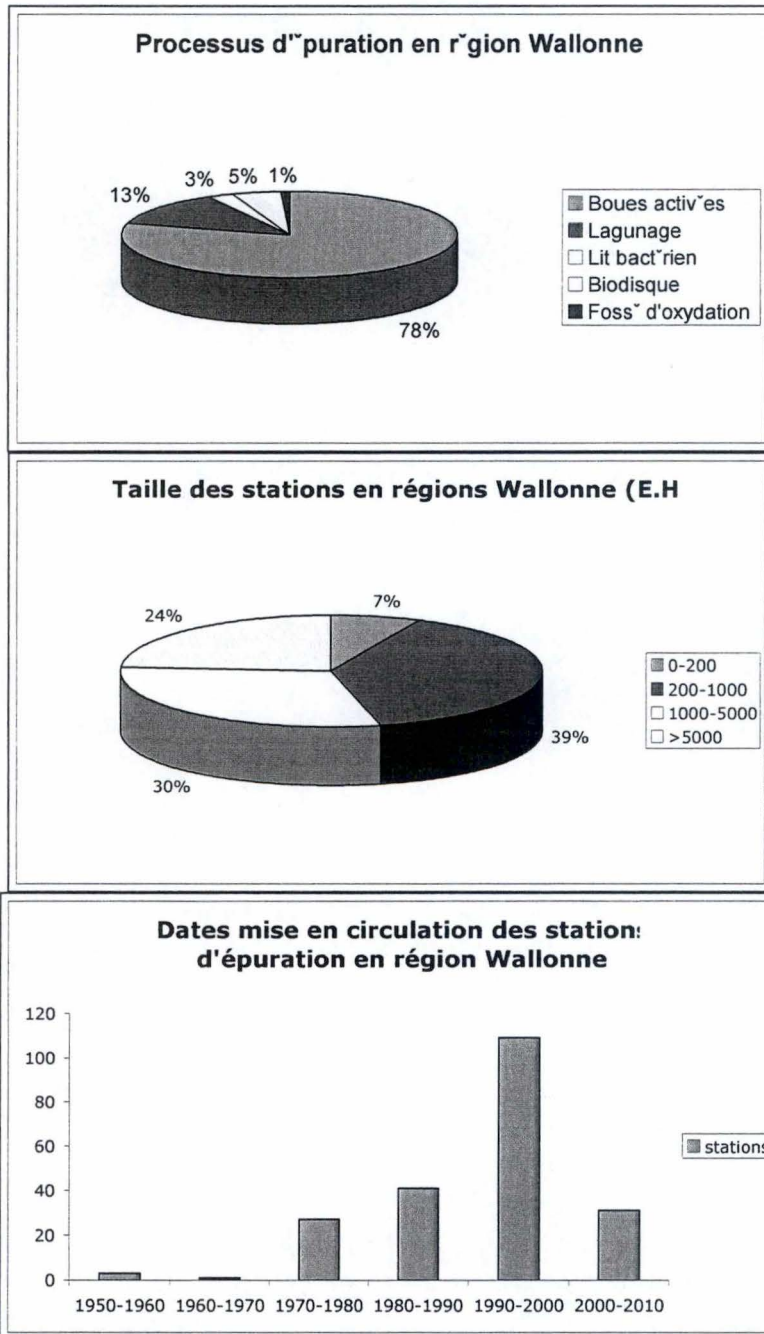


Figure 3.1 : situation de l'épuration en Région Wallonne. Ces graphes ont été conçus à l'aide de données fournies par la Société Publique de la Gestion de l'Eau (SPGE). Il y a 350 stations actuellement en activité.

3 MATERIEL ET METHODES

3.1 Analyse de l'oestrogénicité de l'eau par méthode *in vitro*

3.1.1 Échantillonnage sur le terrain

3.1.1.1 Situation de l'épuration en Région Wallonne

La première partie de ce mémoire a consisté en la récolte et au traitement des données relatives à l'épuration en Région Wallonne. Ces données ont été fournies par l'Annuaire de l'environnement de la région Wallonne (<http://environnement.wallonie.be/>), mises à jour par les données de la Société Publique de la Gestion de l'Eau (SPGE) et complétées par les intercommunales en charge de ces stations. La **Figure 3.1** nous donne un résumé de la situation de l'épuration en région Wallonne. Cette vue d'ensemble a été utile pour le choix des stations d'épuration à investiguer dans notre étude.

3.1.1.2 Choix des stations d'épuration

Les stations d'épuration à investiguer ont été choisies selon différents critères bien définis, à savoir :

- a. *Nombre d'équivalent habitant* : les stations doivent présenter une capacité suffisamment élevée pour avoir un impact éventuel sur le milieu aquatique récepteur. Pour que la comparaison entre les stations soit plus facile, nous avons homogénéisé les capacités en sélectionnant des stations entre 10 000 et 30 000 E.H.
- b. *Date de mise en activité* : les stations doivent être suffisamment âgées pour pouvoir présenter un impact sur la faune aquatique, voire même sur différentes générations. Nous nous sommes fixé une limite de 6 ans minimum d'activité.
- c. *Type de traitement* : les stations doivent représenter différents types de traitements. Parmi les traitements choisis, nous couvrons les principaux types utilisés en Région Wallonne (boues activées, lagunage et lits bactériens). De plus, nous couvrirons des stations avec uniquement un traitement secondaire, des stations avec un traitement tertiaire supplémentaire, ainsi qu'une station avec un traitement quaternaire.
- d. *Cours d'eau récepteur* : celui-ci doit être suffisamment grand pour contenir des poissons et permettre une pêche électrique. Les stations sont choisies en priorité lorsque l'on a de l'information sur les poissons présents dans le cours d'eau récepteur. Ces informations ont été fournies par le Centre de la Nature, des Forêts et du Bois (CRNFB).
- e. *Réplicats* : nous avons sélectionné 2 réplicats pour chaque type de station.
- f. *Proximité géographique* : dans la mesure du possible, nous avons sélectionné les stations les plus proches géographiquement.

Suite à des difficultés rencontrées sur le terrain (stations fermées pour cause de vandalisme, en sous-exploitation ou en travaux), nous avons dû modifier quelque peu le premier choix théorique optimal des stations. Finalement, nous n'avons pu investiguer qu'une seule station de type lit bactérien et de type boue activée avec un traitement quaternaire.

Tableau 3.1 : stations sélectionnées pour l'étude, leur localisation, le cours d'eau récepteur de leurs effluents, leur capacité ainsi que leur traitement épuratoire.

Stations	Localisation Coordonnées Lambert (m)		Cours d'eau récepteur (sous-bassin hydrographique)	E.H.	Traitement
	X	Y			
Rochefort	209275	93603	La Lomme (La Lesse)	23 700	S : Boues activées
Bastogne Rhin	247632	78203	La Wiltz (Le Rhin)	17 500	S : Boues activées
Trivières	133010	126002	La Haine (La Haine)	19 000	S : Boues activées T : Déph. PC
Ciney	201415	110044	Le Bocq (Le Bocq)	16 000	S : Boues activées T : Déph. PC et B
Plombières (La Gueule Aval)	262244	160530	La Gueule (Meuse aval)	24 750	S : Boues activées T : Déph. PC T : Dén. B
Marche-en-Famenne	220023	103816	La Marchette (L'Ourthe)	24 400	S : Boues activées T : Déph. PC T : Dén. B
Malmedy	265493	123522	La Warche (L'Amblève)	20 000	S : Lagunage
Bertrix	212800	58816	Ru des Munos (La Semois)	8 500	S : Lagunage
Morlanwelz	139866	127126	La Haine (La Haine)	18 000	S : Lit bactérien T : Déph. PC T : Dén. B
La Roche	235211	97411	L'Ourthe (L'Ourthe)	11 500	S : Boues activées T : Déph. B T : Dén. B Q : Désinfection UV

E.H. : équivalent habitant ; S : type de traitement secondaire ; T : type de traitement tertiaire ; Q : type de traitement quaternaire ; Déph. : déphosphatation ; Dén. : dénitrification ; PC : physico-chimique ; B : biologique.

Tableau 3.2 : caractéristiques des stations sélectionnées. Les performances épuratoires en terme de DBO₅, DCO, MES, Nkj, NNH₄ et PPO₄ ont été calculés sur base des données du contenu de l'influent et de l'effluent des stations pour ces paramètres. Le temps de rétention hydraulique (HRT) a également été calculé sur base des données de débit moyen et de taille des bassins des stations. Ces données sont des moyennes annuelles pour l'année 2007.

Stations	Performances épuratoires (%)						HRT (h)	Débit (m ³ /J)
	DBO ₅	DCO	MES	Nkj	NNH ₄	PPO ₄		
Rochefort	96,2	88	91	85,7	88,5	43,5	7,5	6316
Bastogne Rhin	91,6	91,3	95,8	86,2	83,4	62,7	/	4967
Trivières	96	80,3	87,8	94	/	80,4	15	7490
Ciney	96	90,4	95	86	79,8	62,7	12,3	5335
Plombière	97	95	98	96	98	90	29,5	5616
Marche-en-Famenne	95	93	93	87	89	62	/	9408
Malmedy	93,5	89,5	97	48,8	17,2	52,1	197	6327
Bertrix	92,4	88,9	96,2	69,2	-25	62,8	/	3894
Morlanwelz	94	76,7	85,7	73	/	53	/	7872
La Roche	91,8	90,5	92,6	82,5	90	78,6	/	3987

DBO₅ : demande biochimique en oxygène en 5 jours, DCO : demande chimique en oxygène, MES : matières en suspension, Nkj : azote Kjeldahl, NNH₄ : azote ammoniacal, PPO₄ : ortho-phosphates, HRT : temps de rétention hydraulique.

Néanmoins, nous avons des duplicats pour tous les autres types de traitement. Pour chaque station, les performances épuratoires (%) ont été calculées sur base des données de qualité de l'influent et de l'effluent fournies par la SPGE. Dans la mesure du possible, les temps de rétention hydrauliques ont été calculés grâce aux données de taille des bassins et de débit, récoltées chez les exploitants. Sur base des différents critères décrits ci-dessus, et en vue de représenter de la meilleure façon l'épuration en région wallonne, nous avons sélectionné 10 stations à investiguer dans notre étude, représentant 6 processus épuratoires différents. Leurs principales caractéristiques sont reprises dans le **Tableau 3.1**. Les performances épuratoires et les temps de rétention hydraulique calculés, ainsi que et le débit de chaque station, sont repris dans le **Tableau 3.2**. Il est important de noter que la station de Plombière présente les meilleures performances épuratoires, pour tous les paramètres considérés. Le **Tableau 3.3** reprend les caractéristiques de température et de pH de l'influent et de l'effluent des stations, au moment du prélèvement des échantillons.

3.1.1.3 Échantillonnage de l'eau

Pour chaque station, nous avons échantillonné 2l d'eau brute entrant dans le système d'épuration (influent), ainsi que 2l d'eau ressortant de la station après avoir été épurée (effluent). La température de l'eau ainsi que son pH ont été mesurés. L'eau a été mise dans des bouteilles opaques et conservée à 4°C jusqu'au retour au laboratoire. L'entièreté des échantillonnages a été effectuée entre le 20 et le 30 mai 2008. Dès le retour au laboratoire, l'eau a été portée à pH 2 avec de l'H₂SO₄ concentré (vérification du pH à l'aide de bandelettes colorées). Les bouteilles ont ensuite été stockées en chambre froide à 4°C, jusqu'à l'extraction.

3.1.2 Traitement de l'eau (*adaptation du protocole de Leush et al. (2006)*)

3.1.2.1 Prétraitement

Les échantillons d'eau les plus troubles ont été centrifugés à 4500 rpm à 4°C pendant 30 minutes, afin d'éliminer les grosses particules en suspension. Ils ont ensuite été pré-filtrés sur des filtres **Milipore Glass fibre prefilters AP2004700**.

3.1.2.2 Extraction des molécules oestrogéniques

Nous avons procédé à l'extraction des molécules oestrogéniques sur des cartouches SPE (Solid Phase-Extracted) (Oasis[®], Waters corporation Milford, MASS U.S.A.). Les cartouches sont pré-conditionnées avec 2 fois 3 ml de méthanol suivis par 2 fois 3 ml d'eau bidistillée. L'eau passe ensuite sur les cartouches au goutte à goutte par aspiration sous vide. Nous avons extrait un litre d'eau par cartouche. Après extraction, les cartouches sont séchées, fermées avec du parafilm et stockées à -20 °C jusqu'à l'élution. Les molécules sont éluées des cartouches avec 2 fois 3 ml de méthanol. L'éluat est ensuite évaporé dans un Speed Vac (RC1010, VWR International) à 50°C et resuspendu dans 250 µl de méthanol. L'oestrogénicité de l'échantillon est ensuite évaluée par un test in-vitro.

3.1.3 Mesure du potentiel oestrogénique

La mesure du potentiel oestrogénique est une adaptation de la méthode utilisée par Vanparys *et al.* (2006) en collaboration avec le département d'écophysiologie, de biochimie et

Tableau 3.3 : mesures ponctuelles de la température et du pH de l'eau de l'influent et de l'effluent des stations étudiées, au moment de l'échantillonnage.

Stations	Influent		Effluent	
	T°	pH	T°	pH
Rochefort	14,5	7,42	16,6	7,3
Bastogne Rhin	14,8	7,61	15,5	6,3
Trivières	15,5	7,65	17	7,35
Ciney	13,2	7,58	14,3	7,43
Plombière	/	/	/	/
Marche-en-Famenne	17,9	7,8	19,2	7,5
Malmedy	16,5	7,1	21,1	7,04
Bertrix	13	7,7	17,8	7,5
Morlanwelz	16,8	7,65	17,1	7,8
La Roche	14,3	7,67	15,1	7,78

de toxicologie d'Anvers (Prof. W. De Coen, UA). Le principe se base sur une mesure de prolifération de cellules cancéreuses du sein humain (MCF-7) dont la croissance est oestrogéno-dépendante. La mesure de cette prolifération se fait par cytométrie de flux, dont le principe se base sur le cycle cellulaire (cfr § 2.3.2.1.b).

3.1.3.1 Culture des cellules MCF-7 (Vanparys *et al.*, 2006)

Les cellules de la lignée MCF-7 (ECACC No. 86012803) sont mises en culture monocouche dans des plaques à 6 puits à une densité de ± 100.000 cellules par puit dans un milieu de croissance standard DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium) supplémenté avec du phénol rouge comme indicateur de pH, 100 mM de pyruvate de sodium, 2 mM de L-glutamine, 1% d'acides amines non-essentiels, 50 IU/ml de pénicilline, 50 mg/l de streptomycine et 5% de sérum bovin foetal inactivé. Les cellules croissent dans des conditions stériles à 37°C et sous une atmosphère contenant 5% de CO₂. Pour chaque expérience, l'exposition est réalisée dans des conditions à faible teneur en stéroïdes avec du CDFBS (Charcoal-dextran fetal bovine serum) dans le but de minimiser l'activité oestrogénique du sérum, ce qui inhibe la croissance des cellules et les synchronise dans la phase G₀/G₁ du cycle cellulaire. En pratique, après une incubation de 24h dans le milieu de croissance, les cellules sont nettoyées avec du tampon PBS⁺ (avec Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) pour enlever tous les composés oestrogéniques. Ensuite, le milieu de croissance est remplacé par le milieu d'exposition, qui consiste en du DMEM sans phénol rouge, avec les mêmes suppléments que dans le milieu de croissance mais également 5% de CDFBS. Après une incubation de 72h, le milieu d'exposition est rafraîchi et les échantillons y sont ajoutés. Chaque exposition est réalisée en triplicat.

3.1.3.2 Préparation des cellules pour la cytométrie de flux

Après 24h d'exposition aux échantillons, les cellules sont récoltées par une trypsinisation (2ml trypsine/puit) et nettoyées au PBS⁺. Les cellules sont alors resuspendues dans 0,5 ml d'une solution de colorant à l'iodure de propidium (IP) contenant 0,1% de Triton X-100, 0,1% de citrate de sodium, 50 µg/ml d'iodure de propidium et 10 µg/ml de RNaseA dans du PBS⁺, selon la méthode de Krishan (1975). Enfin, les cellules sont incubées dans le noir à 4°C, entre 1h et toute la nuit avant l'analyse par cytométrie de flux. Le protocole complet de cette analyse est fourni en **annexe 4**.

3.1.3.3 Test du bloquant

Ce test consiste à utiliser un inhibiteur du récepteur cellulaire aux oestrogènes, le Faslodex, afin de vérifier si l'oestrogénicité observée est bien due à un processus récepteur-dépendant. Les cellules sont traitées selon le protocole décrit ci-dessus (§ 3.1.3.2-3-4), avec ajout de Faslodex (2 µm) dans le milieu de culture.

3.1.3.4 Analyse de la croissance cellulaire par cytométrie de flux

Les mesures de prolifération cellulaire ont été faites à l'aide d'un cytomètre de flux LSR II (BD Biosciences, Erembodegem, Belgique), équipé d'un laser argon-ion 15 mW émettant à 488 nm. La fluorescence IP est mesurée après une amplification linéaire grâce à un filtre de 575/25 nm [fluorescence orange-rouge (FL2)]. On recueille pour chaque mesure

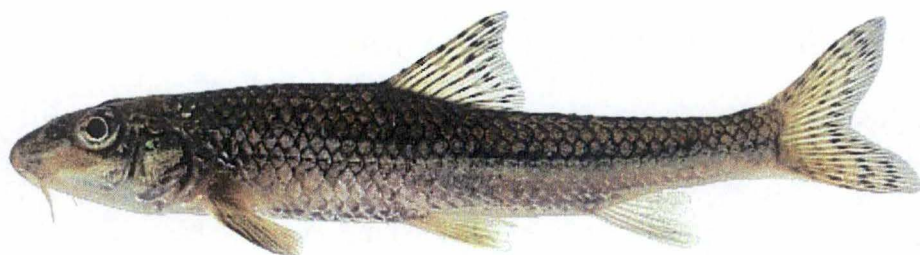


Figure 3.2 : photo représentant le goujon, *Gobio gobio*
(http://www.vol.be.ch/site/fr/fischerei-angelfischerei_gewaesser-fischarten-gruendling-gruendling.jpg).

10 000 à 20 000 événements cellulaires. Les doublets et agrégats sont éliminés en utilisant un histogramme à 2 paramètres FL2-superficie et FL2-largeur.

L'analyse des histogrammes de cycle cellulaire obtenus par le cytomètre de flux (cfr § 2.3.2.1.b) est réalisée à l'aide du logiciel ModFit LT™ 3.0 (Verity Software House Inc., Topsham, ME, USA). Le logiciel construit 2 courbes de Gauss autour des pics G₀-G₁ et G₂-M et par la suite calcule la phase S intermédiaire. Il fournit des valeurs de G₀-G₁ avec un coefficient de variation (CV), des valeurs de cellules en phase G₂-M et les valeurs de cellules en phase S calculées, avec des valeurs de Chi-carré réduit (RCS) associées. Le CV et le RCS sont des paramètres indiquant la fiabilité du modèle basé sur un Chi-carré, statistique qui mesure des différences entre fréquences. Uniquement les cycles cellulaires avec de faibles coefficients de variation du pic G₀-G₁ (CV<5) et de faible RCS (RCS<3) ont été utilisés pour les analyses statistiques ultérieures.

3.2 Analyse de l'oestrogénicité de l'eau par méthode *in vivo*

3.2.1 Choix des sites de pêche

Le choix des sites de prélèvement des poissons était basé sur la présence de rejet de station d'épuration contenant un potentiel oestrogénique non négligeable. Sur base des premiers résultats obtenus par le test *in-vitro*, nous avons constaté que toutes les stations étudiées présentaient cette caractéristique. En conséquence, toutes les stations investiguées étaient intéressantes à sélectionner pour la partie *in-vivo*. Nous nous sommes limités à 3 stations : Rochefort (la Lomme), La Roche (l'Ourthe) et Plombière (la Gueule). Pour chaque station d'épuration, nous avons échantillonné un site en amont (référence) et un site en aval du rejet (contaminé), ce qui nous donne 6 sites de pêche au total. De cette manière, des comparaisons pourront être réalisées entre l'aval et l'amont de chaque effluent afin d'évaluer l'impact de ces rejets sur les poissons exposés.

3.2.2 Échantillonnage sur le terrain

3.2.2.1 Espèce ciblée

Le goujon, *Gobio gobio* (Linné, 1758), est un Poisson téléostéen benthopélagique faisant partie de l'ordre des Cypriniformes et de la famille des Cyprinidés (**Figure 3.2**). Il vit dans les rivières, les fleuves, les lacs, les canaux et les étangs sur substrat graveleux ou sableux, évitant les eaux trop froides et restant aux faibles profondeurs. Le goujon est une espèce répandue dans toute l'Europe à l'exception de la Norvège, du Nord de la Suède et de la Finlande. En Belgique, le goujon est largement répandu dans les cours d'eau et on le retrouve dans tous les bassins hydrographiques de la Région Wallonne. La durée de vie de l'espèce est de 4-5 ans avec une maturité sexuelle atteinte vers 2 ans. La reproduction s'étend d'avril à juillet, avec un pic en mai-juin, lorsque la température dépasse les 15°C. C'est une espèce à pontes multiples et fractionnées. La fécondité est variable et dépend notamment de l'âge. Il n'y a pas de dimorphisme sexuel. Un grand nombre d'études indiquent que la présence de VTG chez les poissons mâles a été acceptée en tant que biomarqueur d'exposition aux xénoestrogènes (Ankley *et al.*, 1998, Kime, 1999 ; Arukwe *et al.*, 2000 ; Solé *et al.*, 2001 ; Pait et Nelson, 2002). Plus particulièrement, le goujon peut être utilisé comme espèce sentinelle pour indiquer la présence d'oestrogénicité dans un milieu aquatique de part la mise en évidence d'une perturbation sexuelle (présence d'ovotestis et expression de la VTG chez



Figure 3.3 : prise de sang sur un goujon.



Figure 3.4 : dissection d'un goujon.

Encadré 1 : Aspects morphologiques de la spermatogenèse chez le Goujon (Kestemont, 1989)

- **Les spermatogonies A** (primaires) : cellules de grandes taille plus ou moins isolées, présentant un gros noyau dont le diamètre atteint environ 9-13 μm .
- **Les spermatogonies B** (secondaires) : cellules de petite taille, groupées en cystes, présentant un noyau de diamètre nettement inférieur (7-9 μm).
- **Les spermatocytes** : cellules présentant noyau de diamètre encore inférieur (5-7 μm) et regroupant les spermatocytes primaires ainsi que tous les stades de transformation jusqu'au spermatocyte secondaire. Les stades zygotène (accouplement longitudinal des chromosomes homologues, avec image en parapluie) et pachytène (chromatine condensée en paquets) sont facilement reconnaissables.
- **Les spermatides** : cellules possédant un noyau de petite taille (3 μm) très caractéristique.

les mâles et juvéniles) chez des populations sauvages soumises à des xénoestrogènes (Van Aerle, 2001) (Angleterre). C'est pourquoi notre choix s'est porté sur cette espèce en particulier.

3.2.2.2 Échantillonnage

Les poissons ont été échantillonnés aux différents sites par la technique de la pêche électrique à pied. Un générateur (groupe électrogène DEKA) a été utilisé afin de produire un courant redressé de 300 à 600 volts et possédant une intensité de 2 à 6 ampères. Une anode fixe est plongée dans l'eau et une cathode mobile (manche isolant terminé par un anneau d'acier inoxydable) permet de fermer le circuit électrique en constituant un champ électrique sphérique qui influence le comportement des poissons se trouvant à l'intérieur. Les poissons subissent une nage forcée vers la cathode et un phénomène d'électronarcose qui permet une capture aisée à l'aide d'épuisettes. Une fois qu'il n'est plus soumis au champ électrique, l'animal recouvre sa mobilité très rapidement et ne garde aucune séquelle. Tout poisson capturé, autre que l'espèce ciblée, était immédiatement remis à l'eau. Les goujons capturés ont été ramenés au laboratoire pour dissection, dans des bacs oxygénés contenant de l'eau du lieu de prélèvement. Les prélèvements ont eu lieu entre le 7 et le 24 octobre 2008.

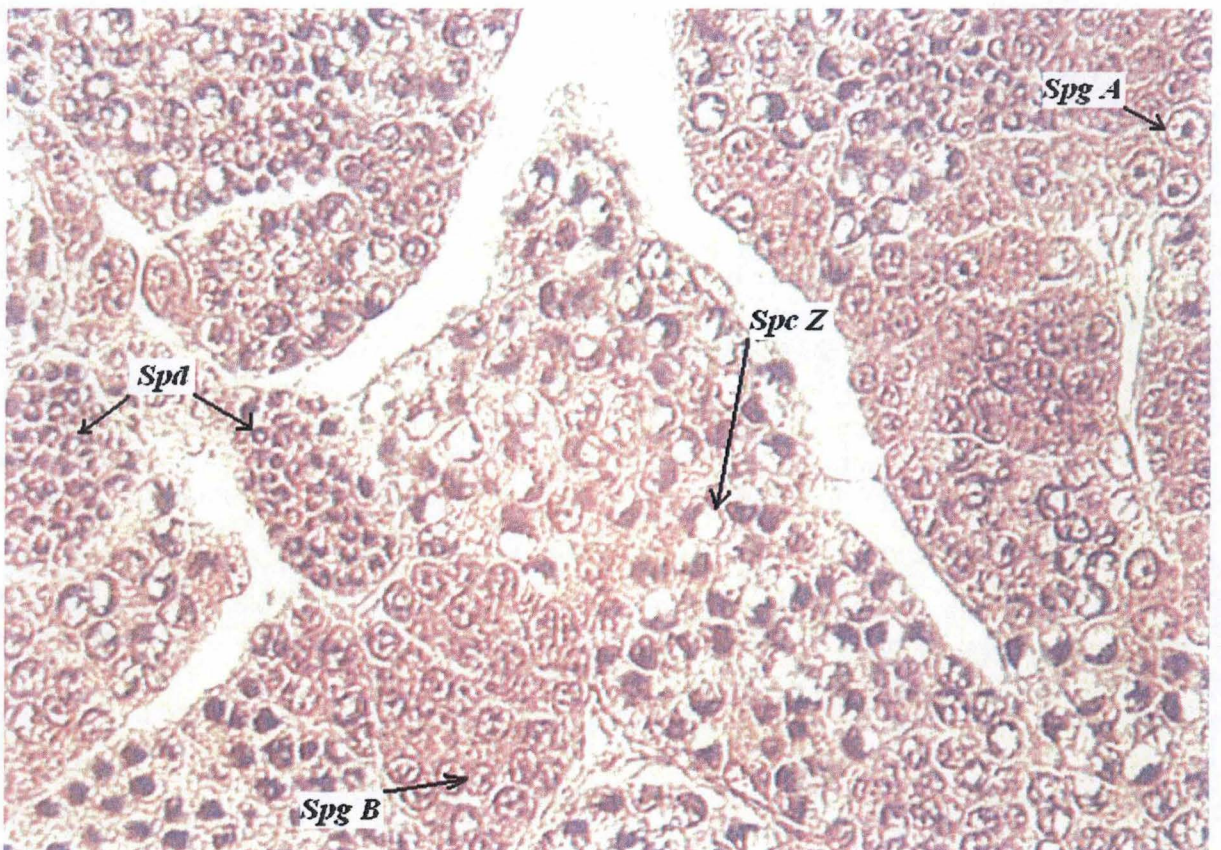
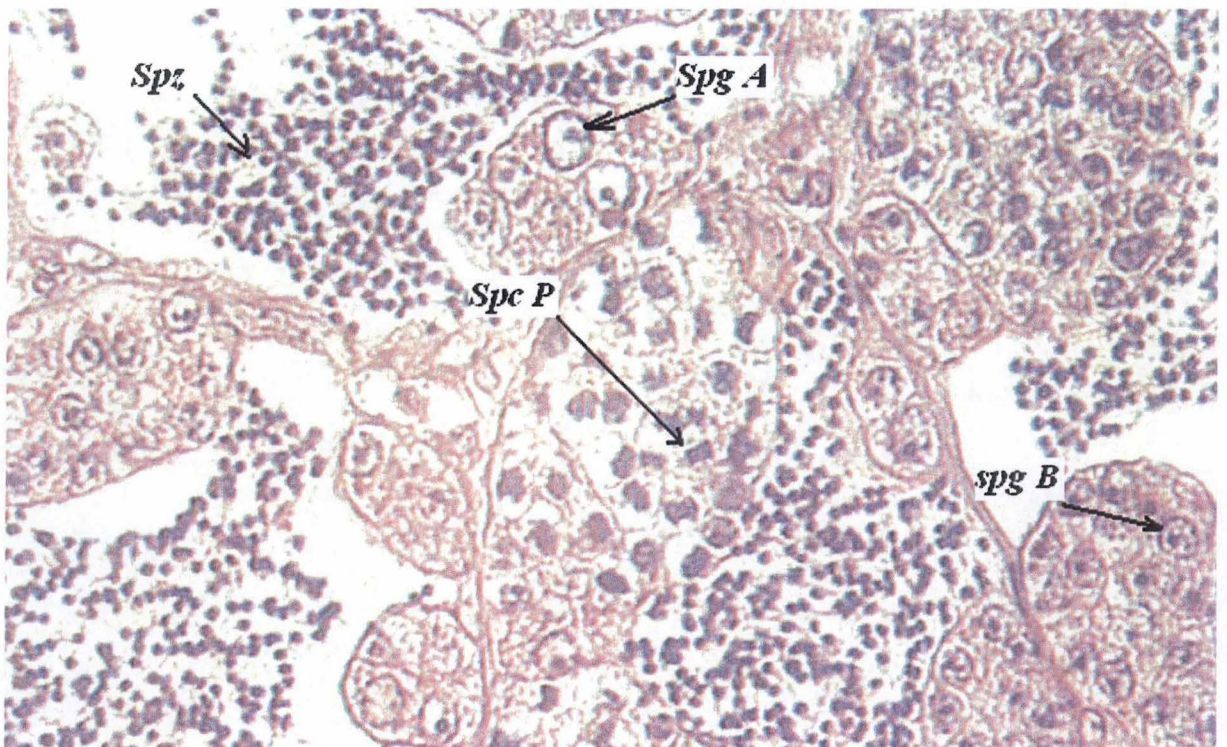
3.2.3 Prélèvement du matériel biologique

Pour chaque site de pêche, dans la mesure du possible, 10 mâles et 5 femelles ont été utilisés afin de prélever le matériel biologique nécessaire aux mesures de biomarqueurs d'exposition aux xénoestrogènes. Étant donné que l'espèce ne présente aucun dimorphisme sexuel, le sexe est déterminé après dissection. Les poissons sont prélevés, mesurés (longueur totale en mm) et pesés au dixième de gramme. Ils sont ensuite anesthésiés à l'éthyl-3-aminobenzoate (120 mg/L) avant d'effectuer les différents prélèvements.

Plasma sanguin : une prise de sang a été effectuée sur chaque individu pour obtenir du plasma sanguin qui sera ensuite utilisé pour le dosage de la vitellogénine (**Figure 3.3**). Le prélèvement a été réalisé à l'aide d'une seringue de 1 ml couplée à une aiguille de 0,5 mm. La seringue était préalablement citratée (citrates de sodium : 10 g/L d'eau distillée) afin d'éviter la coagulation du sang. Le sang a été récolté dans la portion de la veine caudale située en arrière de la nageoire anale et le long de la colonne vertébrale (figure). Le sang prélevé a ensuite été centrifugé pendant 5 minutes à 9000 rpm (4°C). Le surnageant (plasma) est ensuite récupéré et conservé à -20°C.

Organes : après la prise de sang, les poissons sont mis à mort de façon instantanée par décapitation. Une incision de l'abdomen à partir de l'orifice uro-génital jusqu'à la tête permet de prélever les différents organes d'intérêt : le foie et les gonades (**Figure 3.4**). La tête est ensuite ouverte pour en prélever le cerveau. Les gonades ont été pesées au milliègne de gramme afin de calculer le Rapport Gonado-Somatique (RGS, calculé comme le rapport entre le poids des organes sexuels et celui du reste du corps). Le foie, le cerveau et une gonade sont directement placés dans des cryotubes annotés et plongés dans de l'azote liquide. Ils sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. La seconde gonade est placée dans un pilulier étanche contenant du Bouin afin de fixer les tissus pour l'analyse histologique ultérieure.

- Les spermatozoïdes : cellules disposées dans la lumière des lobules et des canaux déférents.



Figures 3.5 : Représentation des différents stades de maturation des cellules germinales au sein du tissu testiculaire. spermatogonies A (*Spg A*); spermatogonies B (*Spg B*); spermatocytes zygotènes (*Spc Z*) et pachytènes (*Spc P*); spermatides (*Spd*); spermatozoïdes (*Spz*).

Tableau 3.4 : Description des différents stades de maturation des Ovocytes chez le goujon (Rinchard *et al.*, 1996).

Stade de l'ovaire	Stades ovocytaires présents dans l'ovaire	Description des ovocytes les plus avancés
Immature	Ovocytes protoplasmiques	Ovocytes sans substance vitellogénique
Prévitellogenèse précoce	Ovocytes protoplasmiques et ovocytes en prévitellogenèse précoce	Apparition de vésicules de glycoprotéines sur 2 à 3 rangées en périphérie du cytoplasme
Prévitellogenèse avancée	Ovocytes protoplasmiques et ovocytes à différents stades de la prévitellogenèse	Ovocyte avec cytoplasme rempli de vésicules glycoprotéiques, différenciation des membranes folliculaires
Vitellogenèse précoce	Ovocytes protoplasmiques, ovocytes à différents stades de la prévitellogenèse et ovocytes en vitellogenèse précoce	Les globules de vitellus (lipoprotéines) apparaissent et occupent le centre de l'ovocyte, autour du noyau
Vitellogenèse avancée	Ovocytes protoplasmiques, ovocytes à différents stades de la prévitellogenèse et de la vitellogenèse	Le cytoplasme est rempli de globules de vitellus qui repoussent en périphérie les vésicules de glycoprotéines. Apparition du micropyle et migration du noyau vers celui-ci.
Maturation finale	Ovocytes protoplasmiques et ovocytes à différents stades de la prévitellogenèse et de la vitellogenèse, Apparition de GVBD (Germinal Vesicle BreakDown) et ovules	Accolement et éclatement du noyau près du micropyle. Reprise de la méiose jusqu'à la métaphase II (bloqué jusqu'ici en prophase I) et ovulation
Interponte	Ovocytes protoplasmiques et ovocytes à différents stades de la prévitellogenèse et de la vitellogenèse, apparition de follicules postovulatoires	Hypertrophie des cellules granulaires et thécales et ensuite, apparition d'autophagocytose
Postponte	Ovocytes protoplasmiques et follicules pré et post ovulatoires	Les cellules de la granulosa s'hypertrophient et la substance vitelline dégénère

Figures se rapportant au tableau 3.4

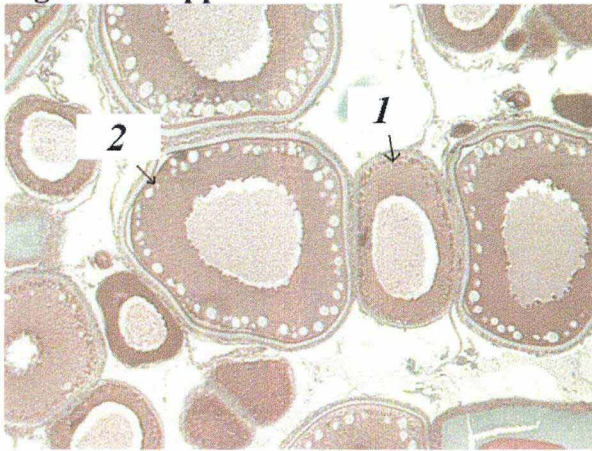


Figure : ovocyte protoplasmique (1) et ovocyte au stade d'alvéoles corticales précoces

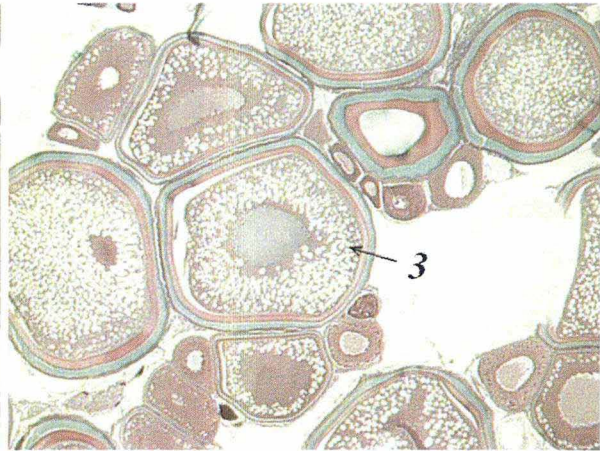


Figure : ovocyte au stade d'alvéoles corticales avancés (3)



Figure : ovocyte en vitellogénèse exogène

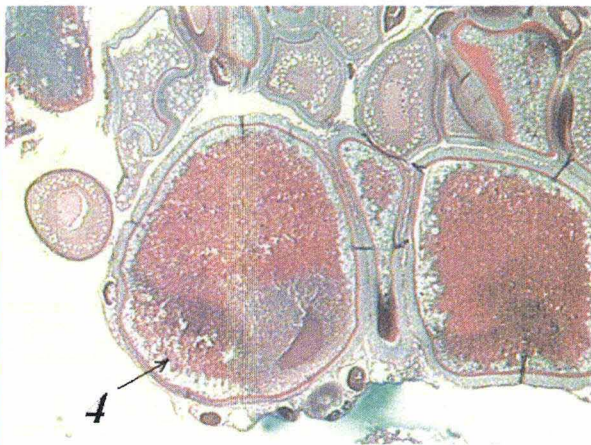


Figure : ovocyte en maturation finale (4)

3.2.4 Analyse des biomarqueurs d'exposition des poissons aux xénoestrogènes

3.2.4.1 Analyse histologique des gonades

a. Préparation des coupes histologiques

Après dissection, une gonade de chaque poisson a été directement placée dans un pilulier étanche contenant du Bouin (liquide fixateur de tissus : 75% acide picrique, 20% formol, 5% acide acétique), à température ambiante pendant minimum 24 heures. Cette étape est absolument nécessaire afin d'éviter une autolyse des tissus ainsi que la prolifération de germes et de bactéries responsables de la putréfaction, phénomènes destructeurs se produisant inévitablement suite à la mort de l'organisme vivant. La quantité de fixateur à utiliser dépend de la température de la pièce, de l'épaisseur du tissu et du type d'organe étudié. Dans le cadre de ce travail, le volume de fixateur utilisé était en moyenne 20 fois plus important que le volume de l'échantillon.

Les coupes et les colorations ont été réalisées au laboratoire Cellules et Tissus de la faculté de médecine (Prof. Y. Poumay, URPHYM, FUNDP). La réalisation des lames histologiques peut être résumée en 7 étapes. Les gonades sont tout d'abord *imprégnées à la paraffine*, par différents bains réalisés dans une « citadelle » (Leica TP 1020). Les gonades imprégnées sont ensuite *enrobées dans des blocs de paraffine* de 3 cm sur 2 cm. Une fois les blocs formés, un *dégrossissement* au microtome est nécessaire pour mettre à nu les gonades sur toute leur section. La *coupe des blocs de paraffine* est réalisée au microtome (Leica RM 2145). Des coupes sériées de 6 µm d'épaisseur ont été réalisées pour chaque bloc de paraffine contenant une gonade. Idéalement il faudrait faire des coupes plus fines (3-5 µm), mais nous avons rencontré de grosses difficultés à couper les tissus (dureté trop élevée), ce qui nous a contraint à augmenter l'épaisseur des coupes. Pour chaque gonade, 5 coupes ont été *étalées sur des lames « Superfrost »*, à raison d'une coupe tous les 60 µm. Les testicules et les ovaires sont ensuite *colorés* avec un HES (hématoxyline-éosine-safran) à l'aide du Tissue Stainer COT 20. Cette coloration dite « topographique » permet de mettre en évidence les noyaux (violet) et le cytoplasme (rouge) des cellules, ainsi que les fibres de collagène (jaune-orangé). Cette coloration de base est suffisante dans la présente étude, où le but est de mettre en évidence la présence de différents types cellulaires. Enfin, les lames sont *montées*, ce qui consiste en l'ajout de DPX sur la lame colorée et le recouvrement de celle-ci par une lame couvre-objet. Le DPX maintient la qualité de la coupe et présente le même indice de réfraction que le verre. Il facilite ainsi la conservation des lames et leur analyse au microscope. L'entièreté du protocole se trouve en **annexe 5**.

b. Analyse des coupes histologiques

Les coupes de gonades ont été analysées de manière qualitative et quantitative. Pour chaque individu, l'évaluation du stade de maturité ainsi que la présence d'intersexe chez les mâles ont été effectuées. Lorsqu'il y avait présence d'ovotestis, le nombre et le stade de l'ovule ont été déterminés. Le diamètre des ovotestis ont été mesurés au centième de micromètre, à l'aide du logiciel AxioVision (Allied High Tech Products, Californie, USA). Les gonades femelles ont été analysées qualitativement pour la présence d'atrésie pré-ovulatoire. Les aspects morphologiques de la spermatogenèse chez le goujon sont repris dans l'**encadré 1** et la **figure 3.5**. La description des différents stades de maturation des ovocytes chez le goujon est quant à elle reprise dans le **tableau 3.4** (et figures associées). Ces

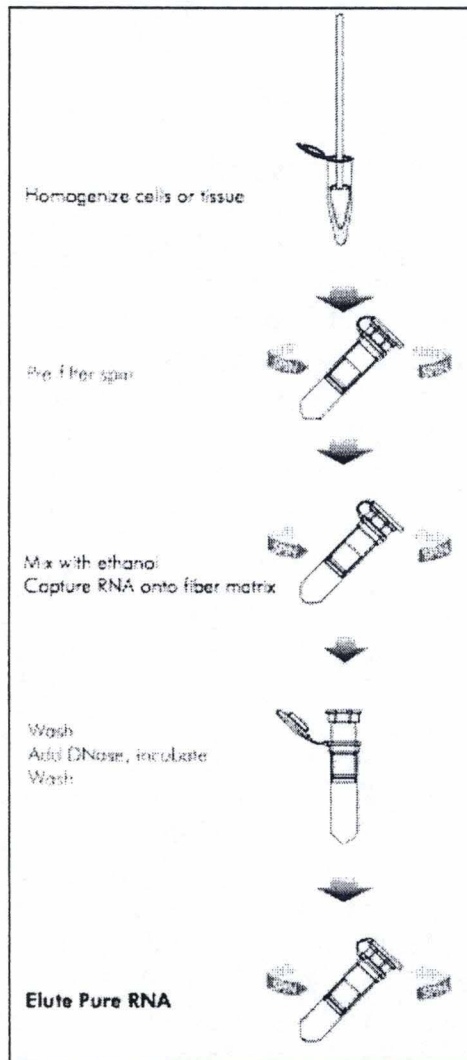


Figure 3.6 : méthodes d'extraction de l'ARN du Kit Absolutely RNA miniprep.

photographies proviennent d'un mémoire précédent (Doux fils Jessica, 2006) sur des coupes en coloration trichrome vert. Les photographies des gonades ont été effectuées à l'aide du logiciel KS 300.

3.2.4.2 Mesure de l'expression de la vitellogénine par PCR en temps réel (RT-PCR)

Nous avons mesuré l'expression du gène de la vitellogénine dans le foie des goujons, organe de synthèse de cette protéine. Cette mesure est possible par la technique de PCR en temps réel. Les différentes étapes nécessaires pour extraire l'ARN du tissu, et l'amplifier de façon spécifique sont reprises ci-dessous.

a. *Extraction de l'ARN total à l'aide du kit Absolutely RNA® Miniprep Kit, Stratagene, La Jolla, Canada.*

Les cellules sont lysées et homogénéisées en présence d'isothiocyanate de guanidium, un inhibiteur des RNases, ce qui permet de lyser les cellules en protégeant l'ARN des RNases endogènes. On ajoute ensuite de l'éthanol 70% à l'homogénat et le mélange est traité à travers une mini colonne d'extraction (RNA binding spin cup). Différents traitements (lavages, traitement à la DNase afin d'éviter toute contamination par de l'ADN génomique) permettront à l'ARN de se lier sur la membrane de silice dans la colonne, les autres constituants seront élués grâce à des solutions de lavage. Pour terminer, l'ARN lui-même sera élué dans 50 µl d'un tampon adéquat. Le schéma de l'extraction est illustré à la **Figure 3.6**. Le protocole complet est détaillé en **annexe 6**.

b. *Dosage des acides nucléiques par spectrophotométrie*

La PCR nécessite une mesure précise des ARN totaux à l'aide d'un spectrophotomètre. Le dosage au spectrophotomètre est basé sur le principe que les acides nucléiques absorbent les ultra-violets à une longueur d'onde de 260 nm. De cette façon, nous pouvons obtenir la concentration en acide nucléique d'une solution sachant que la mesure de 1 DO d'ARN correspond à une concentration de 40 µg/µl. Une mesure à 280 nm est également effectuée afin de contrôler une éventuelle contamination par les protéines. Ainsi, le quotient DO_{280}/DO_{260} permet de déduire la qualité de la préparation d'ARN, il doit être égal à 2.

c. *Real time Reverse Transcription Chain Reaction (RT-PCR)*

La RT-PCR, ou réaction d'amplification en chaîne, permet l'amplification exponentielle et sélective d'une séquence d'ADN cible. Le fragment d'ADN à amplifier est délimité par un couple d'amorces qui lui sont spécifiques, choisies de part et d'autres de la séquence cible. Le protocole de cette technique comprend 2 étapes, à savoir la transcription inverse (RT), qui permet la synthèse d'ADN complémentaire à partir d'ARN, et la PCR proprement dite.

a) Transcription inverse

Le principe de la reverse transcription (RT) est de synthétiser de l'ADN complémentaire à partir d'ARN, grâce à des transcriptases inverses. Ici l'enzyme utilisée est la M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas). La transcription inverse des ARN totaux a été réalisée à l'aide du kit *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis* (Fermentas, Burlington Canada). Les cDNA sont produits à partir d'une concentration initiale élevée en

Tableau 3.5 : caractéristiques des amorces sélectionnées pour l'amplification du gène de la vitéllogénine.

Type	Séquence	Tm (°C)	% GC	Longueur
Forward (sens)	CAG AGA GCT GCC GTG ATA CCA	60	57	21
Reverse (Anti-sens)	AAT AGC TTG CTT CTC CAA CTT CAC A	59	40	25

ARN (4 µg/µl). Nous partons d'une grande quantité d'ARN étant donné que l'on recherche les transcrits d'un gène qui ne devrait pas être exprimé chez le goujon mâle. Il nous faut donc un maximum de matériel afin d'être sûr de voir si le transcrit est présent ou non au sein du tissu étudié. La reverse transcription est réalisée avec le protocole suivant : on ajoute 1 µl d'Oligo dT (0,5 µg/µl) à l'ARN extrait afin de sélectionner spécifiquement les queues poly-A des ARN messagers. Le mélange est incubé 5 min à 70°C pour assurer la sélection. Ensuite, on ajoute le mix de reverse transcription (4 µl de Reaction Buffer, 2 µl de dNTP mix (10 mM) et 1 µl de RiboLock Ribonuclease inhibitor) et on incube le mélange 5 min à 37°C. Enfin, on ajoute 1 µl de Reverse Transcriptase et la réaction se produit durant une incubation d'une heure à 42°C. La réaction est arrêtée par une brève incubation (10 min) à 70°C. Les ADNc formés sont ensuite conservés au congélateur à -20°C, jusqu'à la réaction de PCR. Le détail du protocole est repris en **annexe 7**.

b) RT real time PCR

Par cycle successif, la PCR consiste en une amplification d'un fragment d'ADN de petite taille par action de la Taq polymérase, d'amorces spécifiques et de nucléotides. Les différentes étapes suivies pour la réalisation de la PCR real time sont décrites ci-dessous.

i. Recherche du couple d'amorces appropriées

Le programme Primers Express (Applied Biosystems, Pays-Bas) permet de choisir des couples d'amorces répondant aux contraintes inhérentes à la PCR en temps réel. En effet, la longueur de l'amplicon doit être comprise entre 50 et 150 paires de bases (pb) afin d'obtenir une amplification optimale, celle des amorces peut varier entre 15 et 30 pb et leur contenu en G/C doit représenter 20 à 70% de la séquence nucléotidique. De plus, les amorces ne peuvent contenir au maximum que 2 G et/ou C parmi les 5 derniers nucléotides à l'extrémité 3', et ce afin de minimiser l'hybridation entre eux. Enfin, la température de melting (T_m) des 2 amorces doit se situer entre 58 et 60°C et celle-ci ne peut différer que de 1 ou 2°C entre les 2 amorces. Les deux amorces employées dans le cadre de ce travail sont illustrées dans le **tableau 3.5**. La conception de ces amorces a été possible grâce au clonage et au séquençage préalable du gène de la vitélogénine du goujon au sein de notre laboratoire (PubMed nucleotides, Vtg *Gobio gobio*, accession number FJ517604, Nadzialek *et al.* 2008).

ii. Amplification du gène

Le cDNA est mis en présence du Mix PCR [2,5 µl d'amorce sens (3µM), 2,5 µl d'amorce anti-sens (3 µM), 2,5 µl d'eau stérile et 12,5 µl de Syber-Green PCR master mix 2x (applied biosystems, Pays-Bas)]. Le mélange est ensuite déposé sur une plaque 96 puits et placé dans l'appareil Real-time PCR (ABI RISM 7000). L'amplification est réalisée durant 40 cycles. La réaction de PCR commence par deux phases : une étape de 2 minutes pour détruire, grâce à la présence d'Uracil N-glycosylase, d'éventuels contaminants issus des PCR précédentes et une phase d'activation de la TAQ polymérase de 10 minutes à 95°C. Ensuite, les 40 cycles se déclinent de la façon suivante : 95°C pendant 15 secondes (dénaturation), 60°C pendant 40 secondes (hybridation-élongation). Enfin, une cinétique de dénaturation des produits de PCR (courbe de dissociation) est réalisée en augmentant toutes les 10 secondes la température de 0.5°C, de 55°C jusqu'à 95°C, afin de vérifier la spécificité des produits d'amplification.

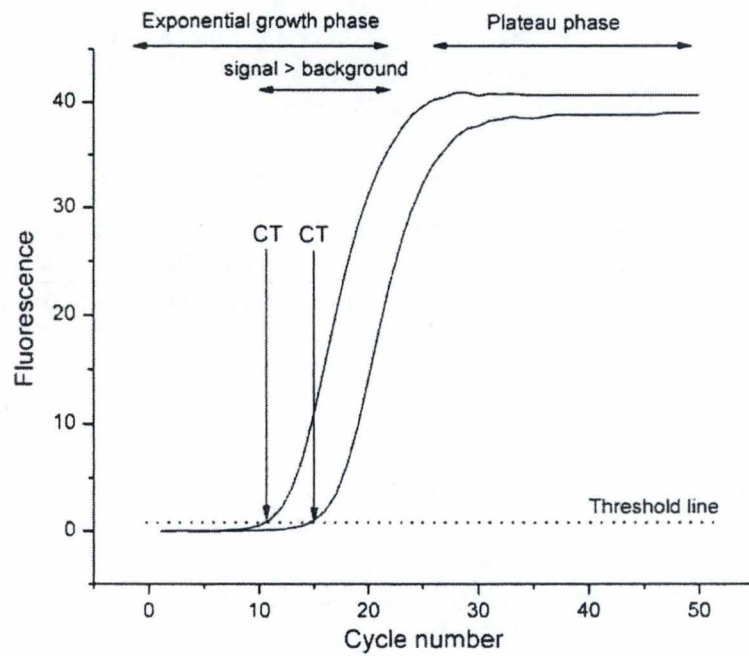


Figure 3.7 : Représentation de l'amplification exponentielle des produits PCR par rapport au seuil de détection, au cours des cycles PCR d'une PCR en temps réel. Un niveau seuil est fixé suffisamment au delà du bruit de fond et le nombre de cycles nécessaires pour atteindre ce seuil, Ct, sont enregistrés (Kubista *et al.*, 2006).

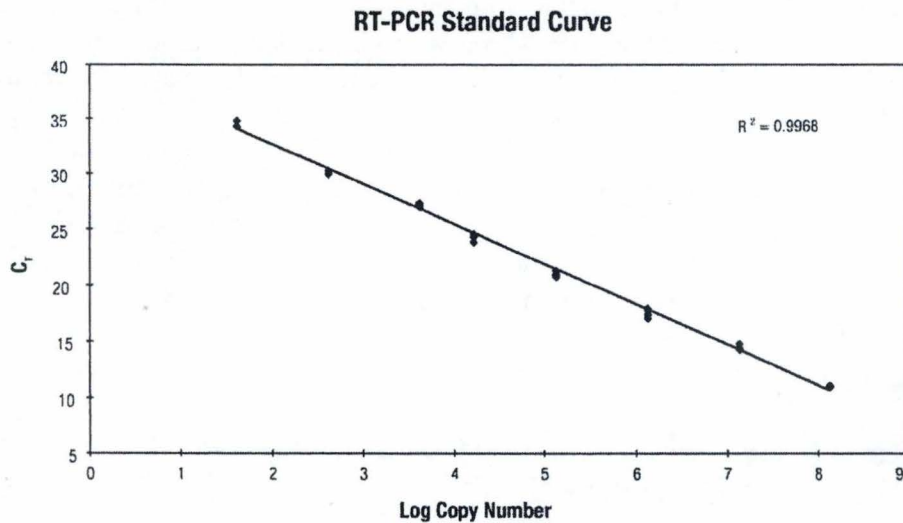


Figure 3.8 : Représentation de la relation linéaire inverse entre le treshhold cycle (Ct) et le log de quantité d'ADNc (Kubista *et al.*, 2006).

iii. Quantification de l'expression des gènes et analyse des résultats

Ce qui différencie la real-time PCR de la PCR classique, c'est que la détection des amplicons se fait cycle après cycle, au fur et à mesure de la réaction, plutôt qu'en fin de réaction uniquement. La quantité d'amplicons présents à chaque cycle est déterminée par l'intensité de la fluorescence d'un agent intercalant qui est ajouté au mix PCR de départ (ici le Syber Green). La lecture de l'intensité de fluorescence est possible grâce au couplage d'un fluorimètre à un thermocycleur (ABI PRISM 7000, Applied Biosystems, CA, USA) au sein de l'appareil PCR. Etant donné que la fluorescence émise par le Syber Green est mesurée tout au long de chaque cycle PCR, cette fluorescence est donc proportionnelle à la quantité d'ADN nouvellement synthétisée. Au cours de la réaction de PCR, une courbe de forme sigmoïde, représentant les variations de cette fluorescence, est tracée par le logiciel d'exploitation « I-cycler » (Biorad). À partir de cette représentation graphique, le cycle seuil (threshold cycle ou Ct) est calculé. Il correspond au nombre de cycles à partir duquel le signal émis est supérieur au bruit de fond et s'inscrit dans la phase exponentielle d'amplification (**Figure 3.7**). Or, pendant cette phase, la quantité d'ADN est multipliée par deux à chaque cycle. Ce cycle seuil est donc inversement proportionnel à la quantité initiale d'ADN cible présent dans l'échantillon (**Figure 3.8**). Dès lors, il est possible de calculer la quantité d'ADN initiale et d'en déduire l'abondance des transcrits avant la reverse transcription. Pour cela, une gamme de dilutions est réalisée à partir d'un mélange des produits de RT des échantillons testés (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320). Cette gamme permet d'obtenir une relation linéaire entre les Ct et le logarithme de la dilution de l'échantillon. L'efficacité de réaction, qui représente le rendement de la PCR (pourcentage de molécules répliquées à chaque cycle) est alors calculée, sur base de la pente de la droite rapportée à une pente théorique optimale. L'efficacité PCR doit être comprise entre 80 et 110% pour que la PCR soit jugée acceptable. La quantité de transcrits, exprimée en dilution (expression relative des échantillons les uns par rapport aux autres), est ensuite normalisée par rapport aux ARN d'un gène de référence, dont le niveau d'expression reste stable dans la situation physiologique considérée (housekeeping gene), ici le gène ribosomal 28s.

3.3 Analyses statistiques

3.3.1 Efficacité d'élimination des xéoestrogènes par les STP

La puissance proliférative d'un échantillon est indiquée par le pourcentage de cellules dans la phase S du cycle cellulaire. Les échantillons ont été testés sur une gamme de 6 dilutions, réalisées en triplicats. Les résultats utilisés sont donc des moyennes de triplicats par dilution. La normalité des données a été testée sur une série de 15 réplicats et est vérifiée. La croissance des cellules MCF-7 en présence d'oestrogènes est dépendante de la dose. C'est pourquoi leur réponse est toujours caractérisée par une courbe logistique. Ces courbes ont été calculées pour chaque échantillon en utilisant un modèle de régression non linéaire via le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, USA). L'ajustement d'une courbe logistique aux points expérimentaux a été réalisé à l'aide d'une équation logistique à 4 paramètres exprimée par l'équation suivante (régression de Hill) :

$$Y = Min + \frac{(Max - Min)}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X) \times Hillslope}}$$

où Y est la prolifération cellulaire, Max la réponse maximale et Min la réponse minimale, log EC50 correspond au logarithme de la concentration à laquelle on observe la moitié de l'effet maximum, HillSlope quantifie la raideur de la courbe et est également appelé le facteur de pente et X est la concentration de l'échantillon (Fent *et al.*, 2006). Selon ce modèle de régression, les valeurs de EC-50 ont été calculées pour chaque échantillon. D'autre part, l'activité oestrogénique des échantillons a été évaluée en pourcentage relatif au contrôle positif, le 17β-oestradiol (E2). Cette mesure correspond à l'effet prolifératif relatif (RPE : relative proliferative effect). L'effet de prolifération (PE) est calculé comme le ratio entre le rendement cellulaire le plus élevé obtenu avec l'échantillon, sur le rendement cellulaire du contrôle négatif (blanc). Le RPE (%) est alors calculé comme suit :

$$\frac{100 \times (PE - 1)_{test}}{(PE - 1)_{E2}}$$

Le RPE peut être défini comme l'effet prolifératif maximum de l'échantillon testé relatif à l'effet maximum atteint par 17β-oestradiol, avec un RPE de 100% indiquant un agoniste parfait.

Ces paramètres ont permis le calcul des EEQs des échantillons, selon la démarche suivante :

$$[PE_{50\%E2}] \times [PE_{50\%éch}]$$

soit la concentration du 17β-oestradiol pour 50% d'effet de prolifération multipliée par la concentration des échantillons à 50% d'effet de prolifération de E2.

Une régression multiple a été effectuée afin de rechercher une relation entre l'efficacité d'élimination des composés oestrogéniques par les stations et les performances épuratoires de celles-ci, en termes de pourcentage. Celle-ci se base sur la formule

$$b = (X'X)^{-1}XY$$

où Y est une matrice de genre (10,1), reprenant les log de EC50, exprimés selon l'équation suivante :

$$\frac{\log EC50_{influent} - \log EC50_{effluent}}{\log EC50_{influent}}$$

et représente les performance ^rdépuration des xénoestrogènes. X est une matrice d'ordre (10,7) reprenant les pourcentages d'élimination de DBO₅, DCO, Nkj, MES et PPO₄ (calculés selon les valeurs de l'influent moins les valeurs de l'effluent), ainsi que le débit (m³/J) des stations, X' est la transposée de la matrice X d'ordre (7,10). Cette méthode provient du site de biostatistique du prof. E.Depiereux (<http://webapps.fundp.ac.be/biostats/>) et a été réalisée sur Excell.

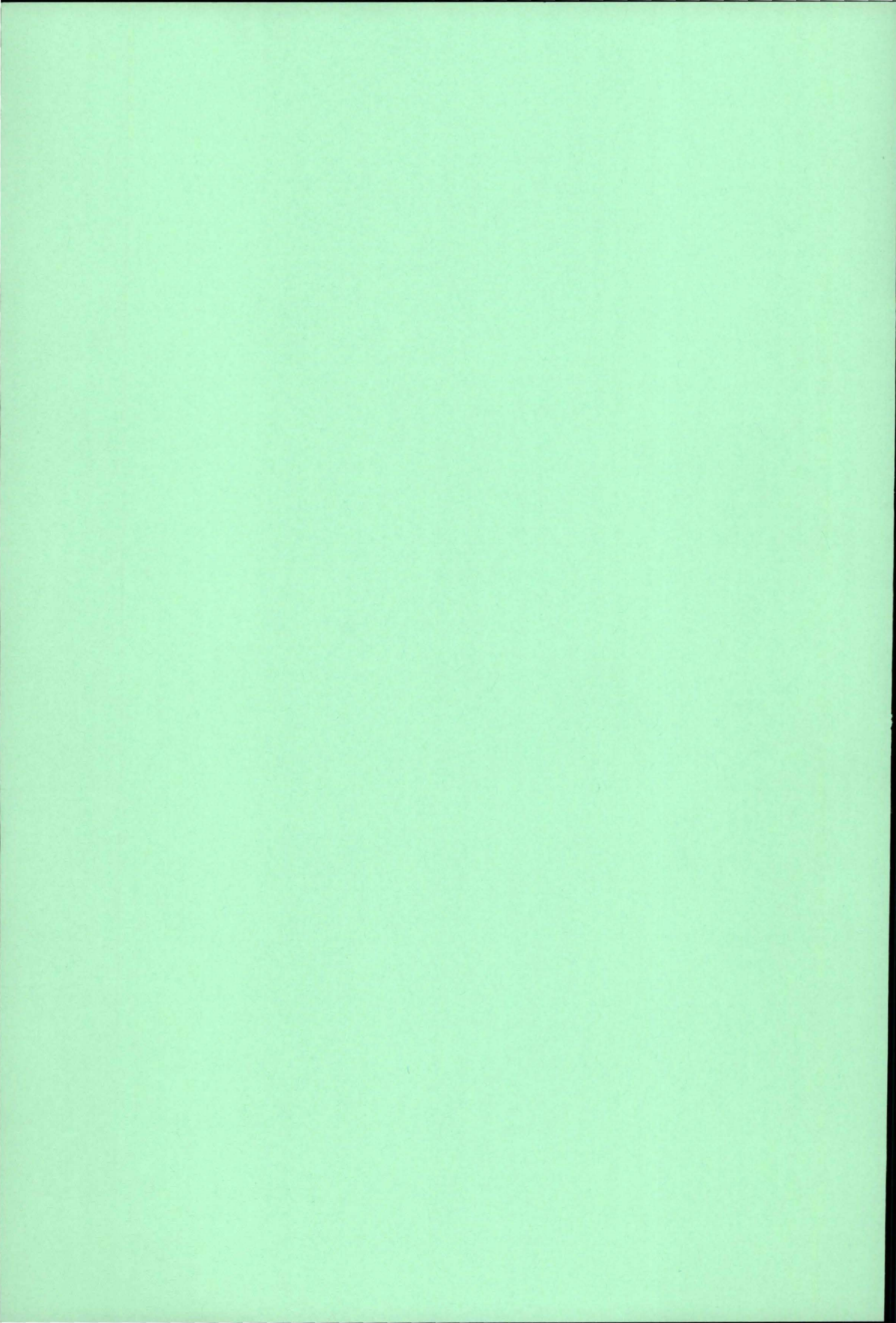
3.3.2 Analyse des biomarqueurs d'exposition aux xénoestrogènes

Les résultats concernant la station de Plombière n'ont pas été pris en compte dans les analyses statistiques, dû au faible nombre d'individus récoltés durant la campagne de pêche pour cette station. Une analyse séparée des mâles et des femelles s'impose étant donné que les différents paramètres mesurés au cours de cette étude dépendent naturellement du sexe des individus.

Les données concernant l'expression du gène de la vitéllogénine, le RGS et les diamètres d'ovocytes au sein des ovotestis ont été traitées en ANOVA à un critère de classification fixe non ordonné, soit le site (amont ou aval). Nous avons groupé les deux stations afin d'avoir une plus grande puissance de test. Chaque jeu de données a premièrement été confronté au test de normalité de la variable métrique, soit le test de Kolmogorov-Smirnov ou test de K-S. La distribution des données est dite « normale » lorsque le test de K-S est non significatif ($p > 0,05$). Lorsque la normalité n'était pas établie, une transformation de variable LOG ($x + 1$) a été effectuée. Un deuxième test précède l'ANOVA proprement dite, il s'agit du test d'homoscédasticité des variances. Le test de Bartlett a été réalisé à cette fin. Selon Vorapongsathorn et ses collaborateurs (2004), le test de Bartlett possède une puissance élevée dans bon nombre de cas et constitue un test précis, à condition que la condition de normalité des variables considérées soit satisfaite. De plus, le test ne nécessite pas un nombre identique d'individus pour chaque échantillon. Une analyse complémentaire des diamètres d'ovocytes par une ANOVA à un critère aléatoire a été effectuée, afin de calculer le nombre d'individus et de mesures par individu nécessaire pour mettre en évidence une différence de 10%.

Les barres d'erreurs représentées sur les graphiques sont des erreurs standard calculées par la formule suivante $2 \frac{\sqrt{CMR}}{n}$ où CMR est le carré moyen résiduel et n le nombre d'observations. Lorsque la variance n'a pas lieu d'être considérée comme homogène, ce sont les déviations standards qui sont représentées.

RESULTATS



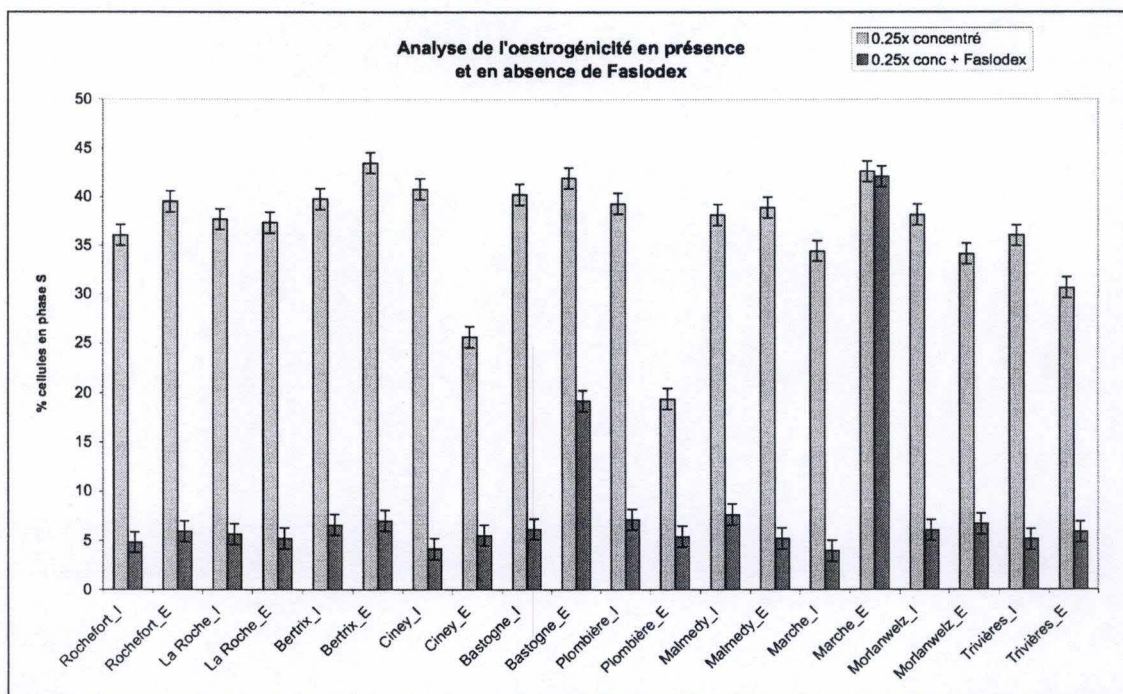


Figure 4.1 : variation de la croissance cellulaire en présence (gris clair) et en absence (gris foncé) de l'inhibiteur des récepteurs oestrogéniques (Faslodex) dans l'influent (I) et l'effluent (E) des stations étudiées.

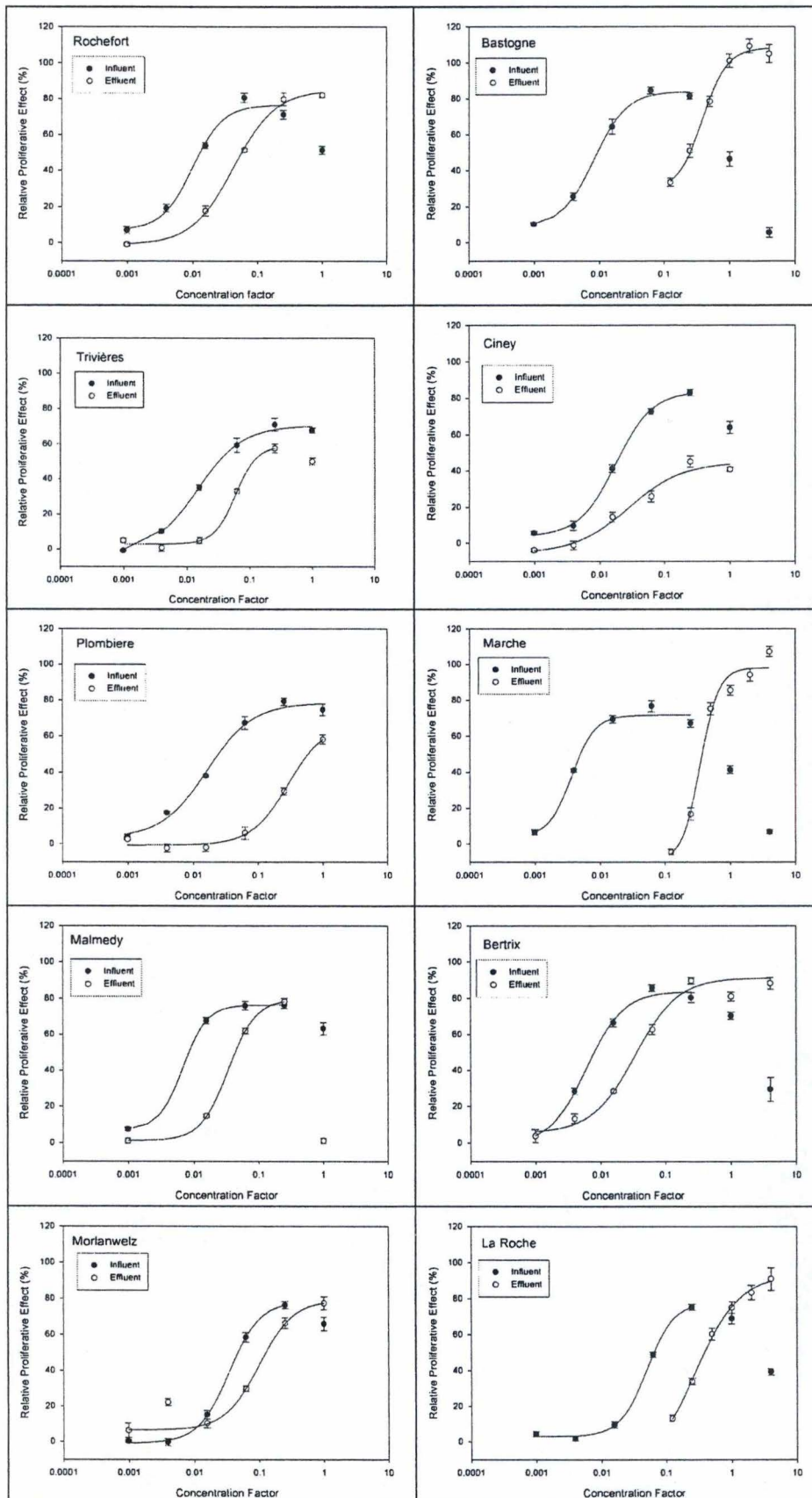


Figure 4.2 : courbes logistiques représentant l'effet prolifératif relatif à E2 en fonction de la concentration de l'échantillon, pour l'influent et l'effluent des stations d'épuration.

4 RESULTATS

4.1 Efficacité d'élimination des substances oestrogéniques

4.1.1 Test du bloquant

Le test du bloquant consiste en une inhibition des récepteurs oestrogéniques des cellules MCF-7 afin de vérifier si la croissance cellulaire observée est bien due à un phénomène récepteur-dépendant. Les résultats du test du bloquant sont repris dans la **Figure 4.1**. Ce graphique représente la variation de la croissance cellulaire en présence (gris clair) et en absence (gris foncé) d'un inhibiteur des récepteurs oestrogéniques (Faslodex) dans l'influent (I) et l'effluent (E) des stations étudiées. L'inhibition de croissance des cellules en présence de l'inhibiteur des récepteurs oestrogéniques indique que la prolifération cellulaire observée en absence de cet inhibiteur est bien due à l'action de xénoestrogènes, par un processus récepteur-dépendant. Une croissance cellulaire en présence de l'inhibiteur est induite par d'autres mécanismes et n'est pas représentative de la présence de composés oestrogéniques dans l'échantillon. Hormis pour les stations de Bastogne_E et Marche_E, l'ajout de l'inhibiteur des récepteurs oestrogénique dans le milieu de culture inhibe la croissance cellulaire (en moyenne 16% de croissance). Cela signifie que la prolifération cellulaire observée dans l'ensemble est induite par des xénoestrogènes. Il faut rester prudent sur l'analyse des résultats de Bastogne_E et Marche_E, pour lesquels il y a respectivement 45% et 98% de la croissance cellulaire qui est atteinte en présence de l'inhibiteur. Les pourcentages ont été calculés sur les valeurs brutes représentées dans l'**annexe 8**.

4.1.2 Analyse de l'oestrogénicité

La mesure de l'oestrogénicité est réalisée par l'étude de la croissance cellulaire de cellule de tumeur du sein (lignée MCF-7) par cytométrie de flux. Les courbes logistiques, provenant de l'ajustement par régression de l'équation de Hill (Fent *et al.*, 2006) sur les valeurs de prolifération cellulaire en fonction de la concentration en échantillon sont représentées dans la **Figure 4.2**. Les valeurs brutes sont représentées en **annexe 9**.

Sur base de cette modélisation, 2 paramètres important permettent de caractériser l'oestrogénicité des échantillons : l'EC50 (concentration effective pour 50% de réponse) et le RPE (effet prolifératif relatif à E2). L'EC50 indique la concentration à laquelle l'échantillon induit la moitié de la réponse maximale. Plus cette valeur est élevée, moins l'échantillon est puissant. D'autre part, le RPE indique l'effet maximum induit par l'échantillon, sur une échelle standardisée à l'effet minimum (0%) et maximum (100%) induit par E2.

Cette représentation graphique indique de façon claire que, pour toutes les stations, l'échantillon de l'effluent (E) est moins puissant que l'échantillon de l'influent (I). Il y a donc bien une épuration de composés oestrogéniques. Cependant, pour certaines stations (Bastogne, Marche et La Roche), l'effluent contient des substances qui, à faible dilution, sont plus actives que le standard (17- β estradiol). Cet effet est probablement dû à la présence de xénoestrogènes non éliminés voire concentrés par le processus d'épuration.

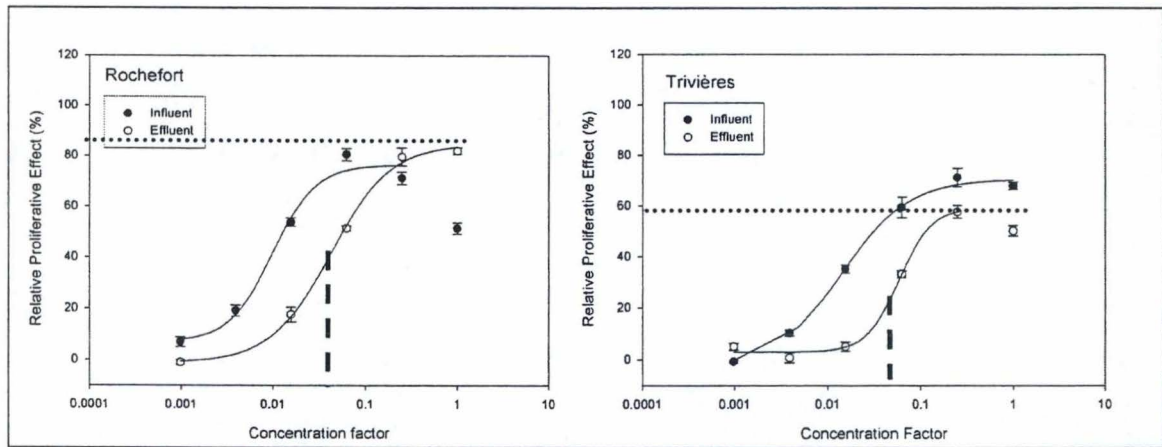


Figure 4.3 : illustration des courbes logistiques des échantillons de Rochefort et Trivières, présentant le même EC₅₀ (---) pour des effets en terme de RPE_{max} très différents (.....).

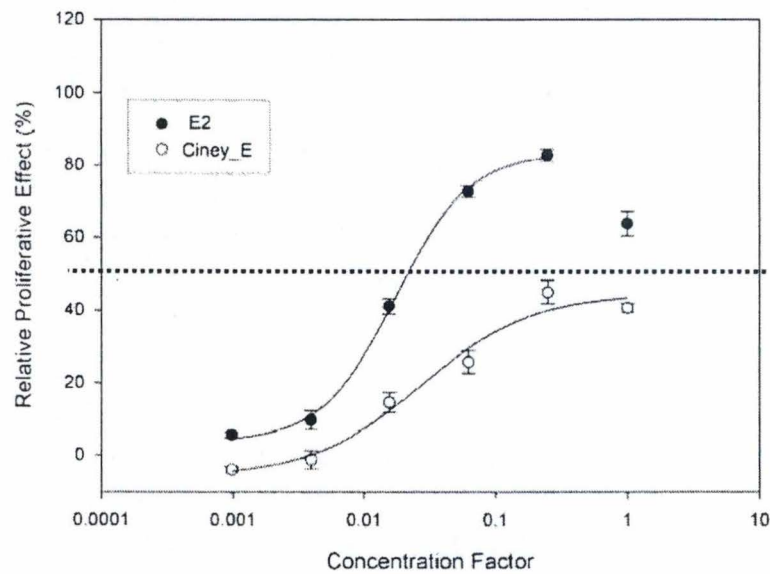


Figure 4.4 : illustration de la courbe logistique de l'échantillon de Ciney présentant un faible RPE_{max}, n'étant pas prise en compte par la concentration atteinte par l'échantillon pour 50% de RPE de E2 (...). E2 : courbe de la référence (17 b-oestradiol) ; Ciney_E : courbe de l'effluent de Ciney.

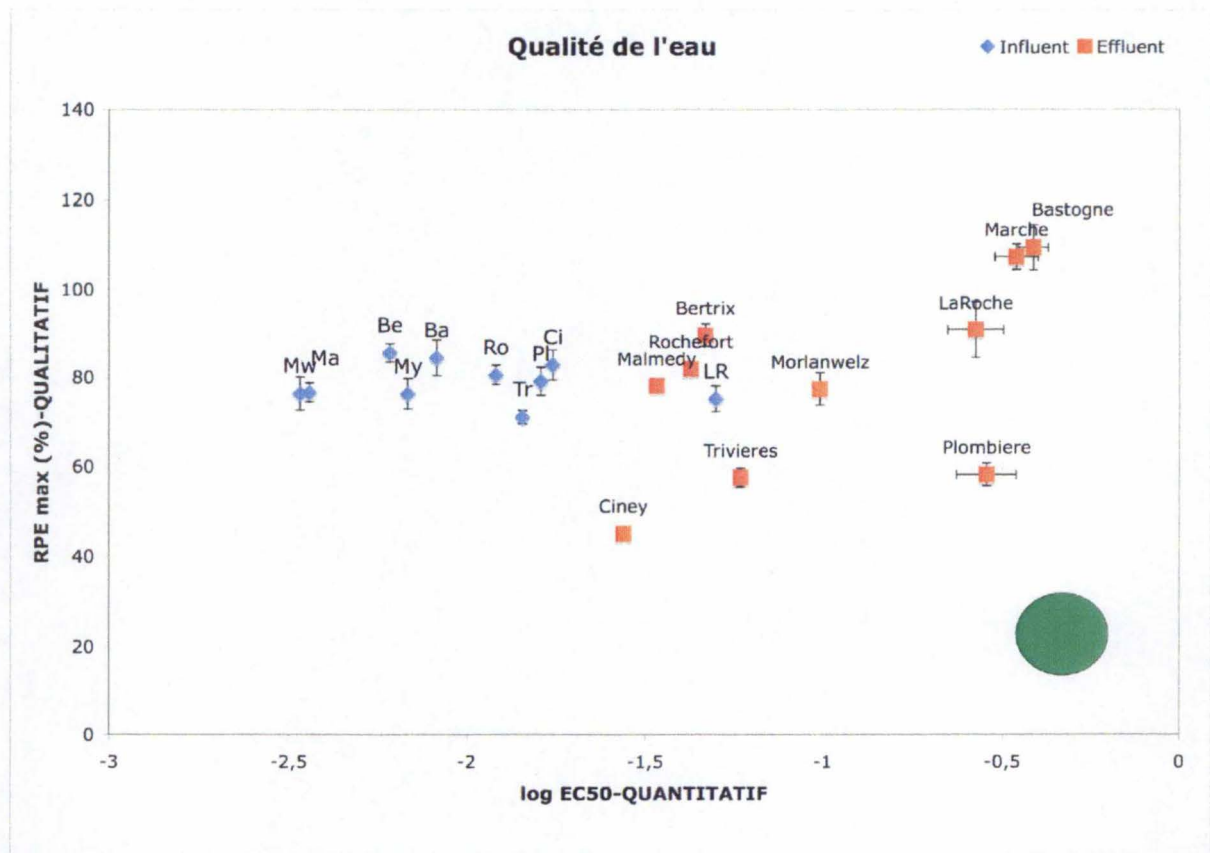


Figure 4.5 : Figure de mérite représentant les variations des effets prolifératifs relatifs maximum (RPE) en fonction du log de la concentration à laquelle on observe 50% de prolifération cellulaire (EC50) pour les échantillons provenant de l'influent (bleu) et de l'effluent (rouge) des stations d'épuration. L'axe des ordonnées est qualifié de « qualitatif » car il se réfère à l'effet induit par les échantillons sur la croissance cellulaire. L'axe des abscisses est qualifié de « quantitatif » car il se réfère à la concentration nécessaire en xénoestrogènes pour induire cet effet. Ce graphe s'intitule « Qualité de l'eau » car il permet d'évaluer sur base des deux paramètres utilisés la qualité de l'eau entrant et sortant des systèmes d'épuration du point de vue oestrogénique. Le rond vert indique la zone de meilleure qualité de l'eau. Les barres d'erreurs représentées sont les déviations standard. Ba : Bastogne ; Be : Bertrix ; Ci : Ciney ; LR : La Roche ; My : Malmédy ; Ma : Marche ; Mw : Morlanwelz ; Pl : Plombière ; Ro : Rochefort ; Tr : Trivières.

Efficacité de l'épuration

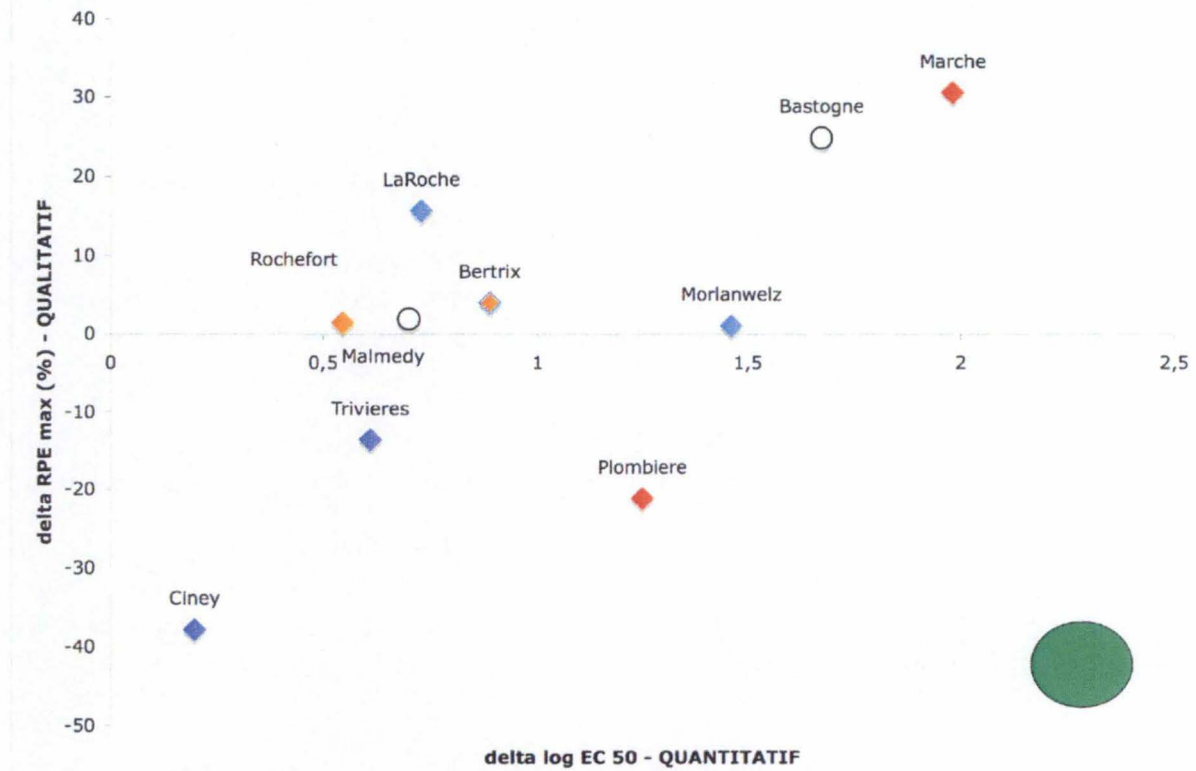


Figure 4.6 : variations des delta RPE (RPE effluent – RPE influent) en fonction du delta log EC50 (log EC50 effluent – log EC50 influent) pour les stations d'épuration. L'axe des ordonnées est qualifié de « qualitatif » car il se réfère à l'effet induit par les échantillons sur la croissance cellulaire. L'axe des abscisses est qualifié de « quantitatif » car il se réfère à la concentration nécessaire en xénoestrogènes pour induire cet effet. Ce graphe s'intitule « Efficacité de l'épuration » car il permet d'évaluer sur base des deux paramètres utilisés l'efficacité d'épuration des substances oestrogéniques par les différents traitements. Le rond vert indique la zone de meilleure qualité de l'épuration. Les symboles des points correspondent aux duplicats de traitement.

La particularité de notre analyse est précisément d'avoir à analyser un mélange complexe de substances par une méthodologie prévue pour analyser une substance pure. De ce fait, des courbes présentant le même EC50 peuvent correspondre à un effet de l'échantillon très différent, comme par exemple entre Rochefort_E et Trivières_E (**Figure 4.3**) et d'autre part le plateau d'une courbe peut se trouver en dessous du seuil de RPE de 50%, comme par exemple Ciney E (**Figure 4.4**).

Cette situation nous a amené à représenter les stations dans une figure de mérite (cfr. Discussion) prenant en compte les deux paramètres simultanément, soit en représentant les échantillons influent et effluent individuellement (**Figure 4.5**), soit en représentant la différence entre l'influent et l'effluent (**Figure 4.6**). Pour les 2 graphiques, l'axe des ordonnées représente le RPE_{max} (%) et l'axe des abscisses le log de la concentration EC50 relative. L'axe RPE est qualifié d'axe qualitatif car il se réfère à l'effet maximal de prolifération cellulaire induit par les échantillons. De même, l'axe EC50 est qualifié d'axe quantitatif puisqu'il se réfère à la concentration de l'échantillon pour induire un effet donné (50%). Dans ces figures, l'épuration idéale (EC50 élevé et RPE faible) se situerait dans le coin inférieur droit (indiqué par un symbole vert). Dans cette représentation, on distingue que tous les effluents sont de puissance plus faible que les influents, mais que les effluents de certaines stations contiennent des substances qui sont plus actives que le standard. La station de Plombière apparaît comme la plus efficace (**Figure 4.6**). Nous allons décrire individuellement les tendances d'efficacité épuratoires des stations indiquées par ces 2 graphes.

Qualité de l'eau (figure 4.5)

Sur le plan *quantitatif*, à l'exception de La Roche, tous les échantillons **influent** présentent une plus forte oestrogénicité et tous les **effluents** présentent une moindre oestrogénicité que l'influent correspondant. Sur le plan *qualitatif*, les différences entre **influent** sont négligeables. En ce qui concerne les **effluents**, une plus grande hétérogénéité est observée. L'eau de moindre qualité entrant dans un système épuratoire semble être l'influent de Morlanwez. À l'inverse, l'influent de La Roche semble être celui de meilleure qualité. Les eaux les moins bonnes sortant des systèmes épuratoires apparaissent être celles de Bertrix, Malmedy et Ciney. En ce qui concerne les effluents de La Roche, Marche et Bastogne, on a bien une diminution du point de vue quantitatif, mais une augmentation du point de vue qualitatif, c'est-à-dire qu'à une concentration plus élevée, l'effet maximal atteint est plus élevé. L'effluent de Ciney présente une faible diminution d'EC50 par rapport à l'influent, par contre son effet diminue beaucoup. La meilleure qualité d'eau épurée est observée à la station de Plombière.

Efficacité de l'épuration (Figure 4.6)

Du point de vue de l'efficacité de l'épuration, la station de Plombière est la plus proche de la zone favorable. C'est donc celle qui apparaît être la plus efficace dans l'épuration des substances oestrogéniques. La station de Ciney est bien placée du point de vue quantitatif mais pas sur l'axe qualitatif. A l'opposé, la station de Marche semble être efficace du point de vue qualitatif et non du point de vue quantitatif. Les duplicats ne sont pas regroupés, ce qui indique qu'ils présentent des efficacités épuratoires différentes.

Tableau 4.1 : EEQ (ng/L) calculés selon la formule $[PE_{50\%} E2] \times [RPE_{50\%} éch]$ pour l'influent et l'effluent des stations d'épuration étudiées ainsi que le pourcentage d'élimination de l'activité oestrogénique par ces stations (EEQeff/EEQinf).

Station d'épuration	Type épuratoire	EEQs (ng/L)		
		Influent	Effluent	% Elimination
Rochefort	Boues Activées	23.8	5.4	77.32
Bastogne	Boues Activées	33.3	1.2	96.32
Trivières	Boues Activées Déphosphatation	9.7	2.7	72.08
Ciney	Boues Activées Déphosphatation	12.1*	0.7*	93.84*
Plombière	Boues Activées Déphosphatation Dénitrification	12.7	0.5	95.89
Marche	Boues Activées Déphosphatation Dénitrification	62.1	0.8	98.68
Malmedy	Lagunage	36.5	7.0	80.69
Bertrix	Lagunage	38.8	8.5	78.04
Morlanwelz	Lit bactérien Déphosphatation Dénitrification	6.5	2.4	62.61
La Roche	Boues Activées Déphosphatation Dénitrification DésinfectionUV	4.8	0.8	83.15

* Pour Ciney, les valeurs de 40% d'activité ont été utilisées, étant donné que les 50% d'activité du 17 β -estradiol n'ont pas été atteints.

Tableau 4.2 : résultats de la régression multiple susceptible de prédire l'efficacité d'élimination des xénoestrogènes en fonction d'autres mesures de leur efficacité épuratoires.

Paramètres	DBO ₅	DCO	MES	Nkj	PPO ₄	Débit	Général
R ²	9,0%	6,6%	0,6%	6,4%	7,6%	4,9%	71,5%

DBO₅ : demande biochimique en oxygène en 5 jours, DCO : demande chimique en oxygène, MES : matières en suspension, Nkj : azote Kjeldahl, PPO₄ : ortho-phosphates.

Le paramètre utilisé par la majorité des chercheurs pour comparer l'efficacité des stations à éliminer une substance est l'EC50 exprimé en équivalent oestradiol (EEQ) (ng/L). C'est pourquoi les EEQs des échantillons d'influent et d'effluent des stations, ainsi que le pourcentage d'élimination de ces stations (EEQ effluent / EEQ influent) ont été calculés, afin d'avoir une donnée chiffrée des efficacités épuratoires, comparables avec les données de la littérature (**Tableau 4.1**). Il est indispensable de noter que l'EEQ est utilisé en majorité pour des échantillons dont la concentration des différents composés oestrogéniques est déterminée. Dans notre cas, l'échantillon est un mélange complexe dont les composés restent indéterminés et l'activité oestrogénique est comparée à la seule activité de l'oestrogène naturel E2, ce qui produit un EEQ biaisé, mais néanmoins comparable. Les pourcentages d'élimination se situent entre 62,61% et 98,68%. Néanmoins, les stations rejettent des quantités non négligeables de xénoestrogènes, avec des valeurs comprises entre 0,5 et 8,5 ng/L.

Régression multiple

Les **figures 4.5 et 4.6** ne montrent pas de façon évidente que l'efficacité de l'épuration des xénoestrogènes dépendent du type de station. Nous avons procédé à une régression multiple susceptible de prédire l'efficacité d'élimination des xénoestrogènes en fonction d'autres mesures de leur efficacité épuratoires. Les caractéristiques épuratoires utilisées pour cette régression sont celles disponibles pour toutes les stations dans le **tableau 3.2**. Un résumé des résultats obtenus est représenté dans le **tableau 4.2**. L'analyse complète est fournie en **annexe 10**. Individuellement, chaque paramètre présente un R^2 très faible (<10%) et donc aucun n'est lié à l'efficacité d'élimination des xénoestrogènes. Une régression multiple prenant en compte globalement l'ensemble des paramètres permet d'expliquer 72% de la variation. Cependant, le faible nombre de stations par rapport au nombre de paramètres considérés rend l'interprétation de cette analyse discutable (cfr discussion).

4.2 Analyse des bioindicateurs de contact avec les xénoestrogènes

4.2.1 Expression du gène de la vitéllogénine dans le foie de goujon

Afin de mesurer l'éventuel impact des xénoestrogènes sur le métabolisme du goujon, nous avons mesuré par RT-PCR (cft Matériel & Méthodes) l'expression du gène de la vitéllogénine, biomarqueur reconnu du contact des poissons mâles avec les xénoestrogènes.

Nous avons obtenus de très bonnes efficacités pour la RT-PCR et une spécificité d'amplification du gène de la vitéllogénine.

De manière générale, un Ct de 20 représente une expression très forte du gène, un Ct de 25 est une expression moyenne, un Ct de 30 représente une expression faible et, au delà de 35, le gène est quasiment indétectable. Sur base de ceci, les Ct que nous avons obtenus sont tous très élevés dans l'ensemble (supérieurs à 35), ce qui signifie que le gène de la Vtg n'est pratiquement pas exprimé. Sans analyse statistique élaborée, on remarque une nette différence entre les mâles et les femelles, du point de vue de l'expression du gène de la Vtg (**Figure 4.7**). Si l'on ne considère que l'expression chez les mâles, malgré une très faible expression, on peut remarquer une variabilité dans la réponse, ceci grâce à une très grande sensibilité de la RT-PCR. Néanmoins, une analyse des moyennes par une ANOVA à un critère de classification (amont ou aval), n'indique pas de différence de moyenne significative ($p=0,11$).

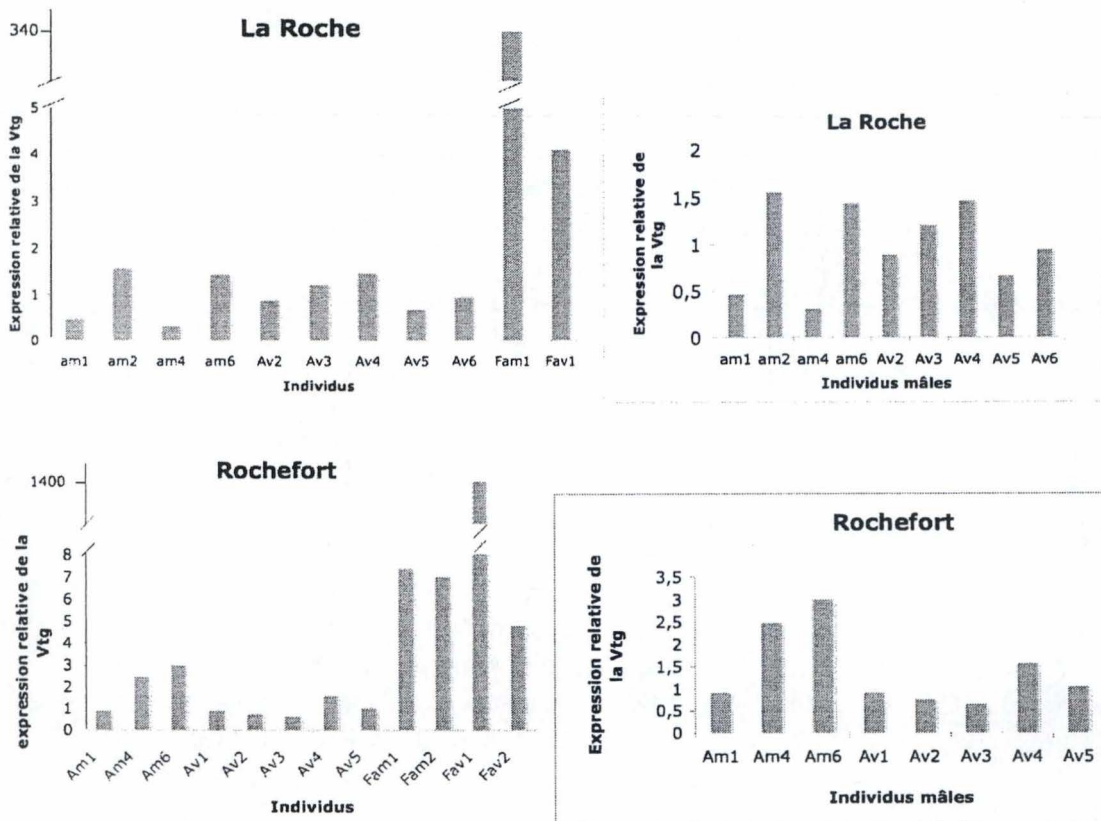


Figure 4.7 : variations de l'expression du gène de la vitélogénine dans les foies de goujons, en amont et en aval des stations de La Roche et Rochefort. am : mâles pêchés en amont de la station, Av : mâles pêchés en aval de la station, Fam : femelles pêchées en amont de la station, Fav : femelles pêchées en aval de la station.

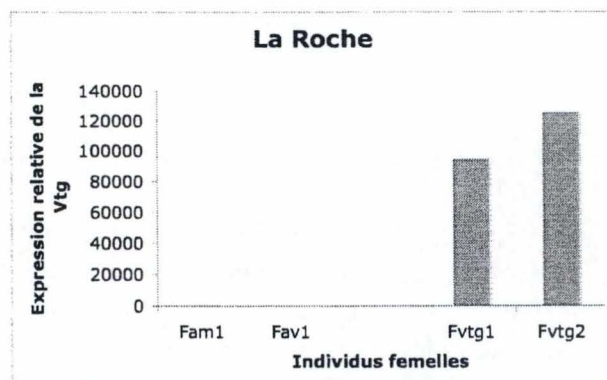


Figure 4.8 : variations de l'expression du gène de la vitélogénine dans les foies de femelles goujons, en amont et en aval des stations de La Roche et Rochefort. Fam : femelles pêchées en amont de la station, Fav : femelles pêchées en aval de la station, Fvtg : femelles en vitélogénèses, R : Rochefort, LR : La Roche.

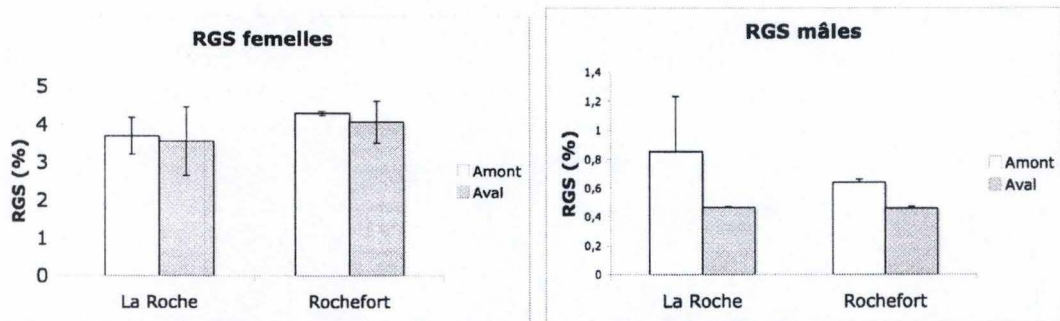


Figure 4.9 : variations du rapport gonadosomatique (RGS) chez les goujons en amont et en aval des stations de Rochefort et La Roche. Les barres d'erreurs représentées sont les déviations standards originales, l'ANOVA étant réalisée sur le LOG(RGS).

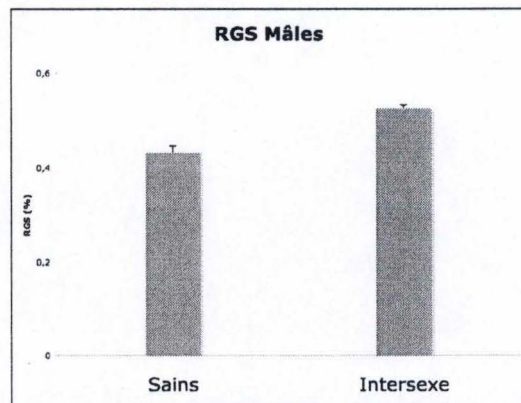


Figure 4.10 : variations du rapport gonadosomatique (RGS) chez les goujons mâles sains et intersexes pour les deux stations confondues. Les barres d'erreurs représentées sont les déviations standards originales, l'ANOVA étant réalisée sur le LOG(RGS).

Nous avons également testé des femelles goujon en vitéllogénèse, récoltées dans une étude précédente durant le mois de mai. La **figure 4.8** illustre l'expression de Vtg chez ces femelles en comparaison avec celles de l'étude actuelle. La différence de plusieurs ordres de grandeur observée ne requiert pas d'analyse statistique. On remarque une nette augmentation de l'expression chez les femelles en vitéllogénèse. Le faible niveau d'expression de la Vtg chez les femelles de notre étude serait dû à leur état physiologique de repos sexuel.

4.2.2 Rapport gonado-somatique ou RGS

Nous avons calculé les rapports gonadosomatiques (RGS) pour les mâles et les femelles goujons utilisés dans notre étude en amont et en aval de 2 STEP (La Roche et Rochefort). Les moyennes du RGS pour les mâles d'une part et les femelles d'autre part, aux 4 sites investigués (Rochefort et La Roche, Amont et Aval) sont représentées à la **figure 4.9**. La **figure 4.10** représente les moyennes RGS entre les mâles sains et les mâles intersexes. Ce rapport permet d'avoir une indication de la maturation des gonades par rapport à la taille de l'individu. Pour les mâles, on observe des RGS moyens pour les sites de La Roche amont, Rochefort amont, La Roche et Rochefort aval, de respectivement 0,85%, 0,63% et 0,46%. Les femelles présentent quant à elle des moyennes de RGS de 3,54% et 3,69% pour les sites de La Roche aval et amont ; et 4,05% et 4,28% pour les sites de Rochefort aval et amont. En ce qui concerne les goujons mâles, on observe une diminution du RGS chez les mâles provenant du site aval, pour les deux stations. Il n'y a par contre aucune différence nette visible pour les RGS femelle, également pour les deux stations. Nous avons procédé à des comparaisons de moyennes des RGS entre les sites amont et aval des deux stations, séparément pour les mâles et les femelles, par une ANOVA à 1 critère de classification (site amont-aval) réalisée sur le LOG(RGS) afin de rendre les variances homogènes. Il n'y a pas de différence significative de moyenne observée, ni pour les femelles ($p = 0,7$), ni pour les mâles ($p = 0,44$). Il n'y a également pas de différence significative observée entre les moyennes des RGS mâles et des mâles intersexes ($p=0,13$).

4.2.3 Histologie des gonades

Une analyse histologique des gonades a été effectuée. Pour chaque individu, 5 coupes de gonades ont été visionnées, à raison de une coupe tous les 60 μm . Cette analyse permet de détecter d'éventuelles anomalies causées par la présence de xénoestrogènes, notamment la présence d'ovotestis chez les mâles ou d'atrésie pré-ovulatoire chez les femelles.

Histologie des gonades femelles

L'analyse histologique des ovaires a été réalisée de façon qualitative. La **figure 4.11** illustre l'histologie de l'ovaire. Le stade le plus mûre observé sont des ovocytes au stade d'alvéoles corticaux avancés. On remarque une plus grande proportion de stade précoces (ovocytes protoplasmiques et ovocytes au stade d'alvéoles corticaux précoces) par rapport aux alvéoles corticaux avancés. Le développement ovocytaire ne semble pas montrer de différences entre les sites « amont » et « aval » pour chacune des STEP considérées. Aucun signe d'atrésie pré-ovulatoire n'a été observé.



Figure 4.11 : coupe histologique d'ovaire de goujon en coloration HES.

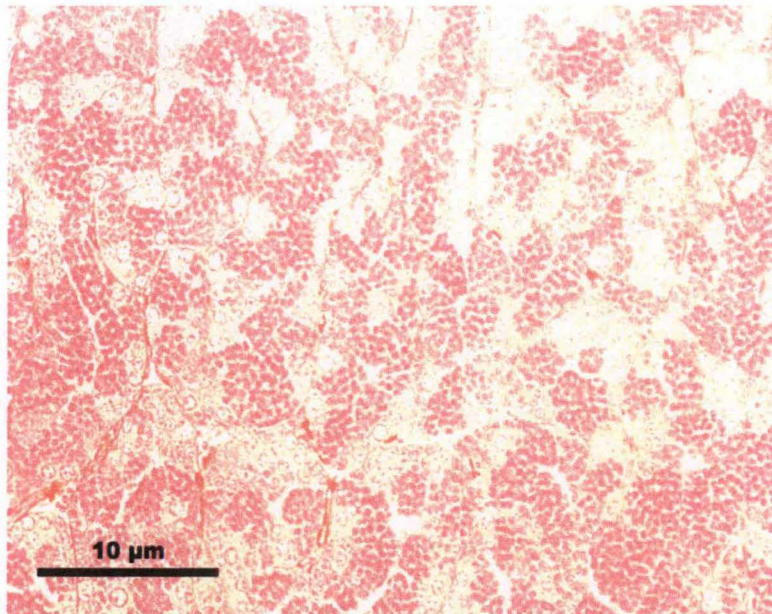


Figure 4.12 : coupe histologique de testicule de goujon en coloration HES.

Tableau 4.3 : analyse de la présence d'ovotestis dans les testicules de goujons prélevés en amont et en aval des stations d'épuration de La Roche et Rochefort.

Site de pêche	Nombre d'individus mâles récoltés	Nombre d'individus présentant un ovotestis	Nombre moyen d'ovules observés (5 coupes)	Diamètre moyen des ovocytes (μm)
La Roche AMONT	8	2	3	36,1
La Roche AVAL	7	5	11	29,7
Rochefort AMONT	10	2	7	29,5
Rochefort AVAL	10	/	/	/

Histopathologie des gonades mâles

L'analyse histologique des testicules a été réalisée de façon qualitative. La **figure 4.12** illustre l'histologie du testicule. Les testicules présentent une majorité de spermatogonies A et B, pour tous les sites investigués. Le développement testiculaire ne semble pas montrer de différences entre le site « amont » et « aval » pour les deux STEP considérées.

L'apparition d'ovotestis a été détectée chez plusieurs individus mâles et analysée de façon quantitative. La présence d'ovotestis a été évaluée par un comptage du nombre d'ovocytes présents chez les individus touchés ainsi qu'une mesure de leur diamètre. Le **tableau 4.3** synthétise les observations effectuées. La présence d'ovotestis a été mise en évidence sur 3 des sites investigués, La Roche amont et aval, ainsi que Rochefort amont (**Figures 4.13, 4.14 et 4.15**). Le site de La Roche aval est particulièrement touché avec près de la moitié des individus présentant des ovotestis. En moyenne 11 ovocytes ont été découverts chez les mâles touchés par un ovotestis, avec l'un des individus présentant un maximum de 35 ovocytes sur une des lames. Il y a également présence d'ovotestis en amont de la station de La Roche, mais dans une moindre mesure, avec seulement un quart des individus touchés. Ces individus présentent également moins d'ovocytes en moyenne (3). Le site Amont de Rochefort présente 13% des individus atteint d'ovotestis, avec en moyenne 7 ovocytes observés. Par contre, en aval de la station, aucun des dix individus ne présente d'anomalie. Un test d'analyse de fréquence a été effectué pour la station de La Roche afin de mettre en évidence une différence de fréquence d'apparition d'ovotestis entre les sites amont et aval. Le test exact de Fisher est non significatif ($p = 0,13$). Le test non paramétrique de Wilcoxon a été également effectué car il tolère mieux les différences de nombre d'individus des échantillons mais s'avère également non significatif ($p = 0,095$). Etant donné le faible nombre d'effectif évalué, nous sommes à la limite des tests statistiques. On ne peut dès lors pas affirmer qu'il y a une différence de fréquence d'apparition d'ovotestis entre le site amont et le site aval de la station de La Roche.

Les ovocytes présents au sein des testicules ne dépassent pas le stade protoplasmique. Ils sont, de façon générale, dispersés au sein du testicule (**Figure 4.13**) mais peuvent être localisés (**Figure 4.14**) voire même groupés en grappes (**Figure 4.15**). Nous avons mesuré les diamètres de ces ovotestis afin de mieux les caractériser et éventuellement de mettre en lumière une différence entre le site amont et aval de La Roche. Sur les moyennes de ces données, nous avons effectué une ANOVA à un critère de classification fixe non ordonné. Le test se révèle non significatif ($p = 0,12$). Nous ne pouvons dès lors pas mettre en évidence une différence de moyenne des tailles d'ovocytes trouvés sur les 2 sites. Quoi qu'il en soit, il faut rester prudent face à ces résultats étant donné qu'une partie seulement des gonades a été analysées (cfr discussion).

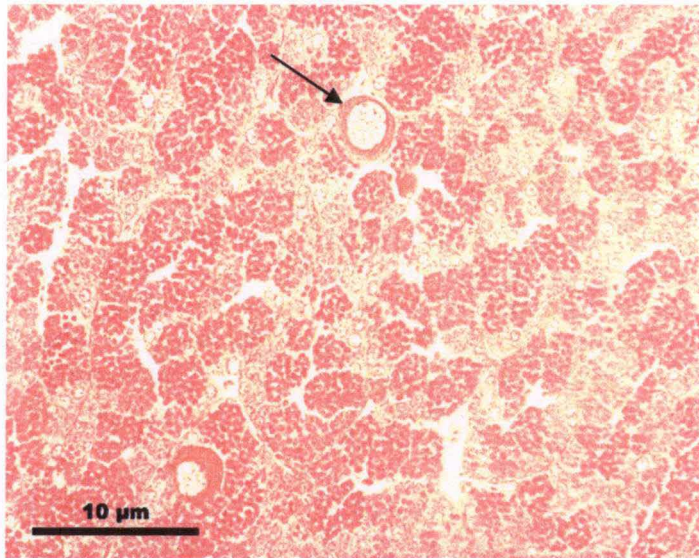


Figure 4.13 : présence d'ovocytes isolés au sein d'un testicule de goujon mâle en amont de la STEP de La Roche.

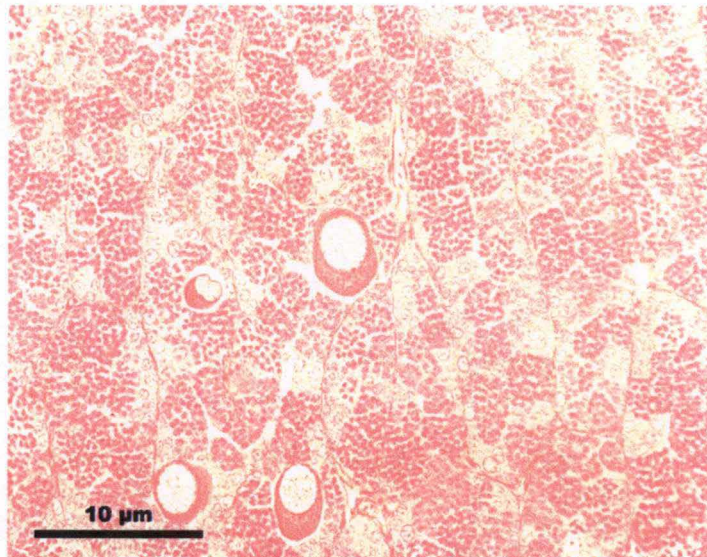


Figure 4.14 : présence d'ovocytes groupés au sein d'un testicule de goujon mâle en aval de la STEP de La Roche.

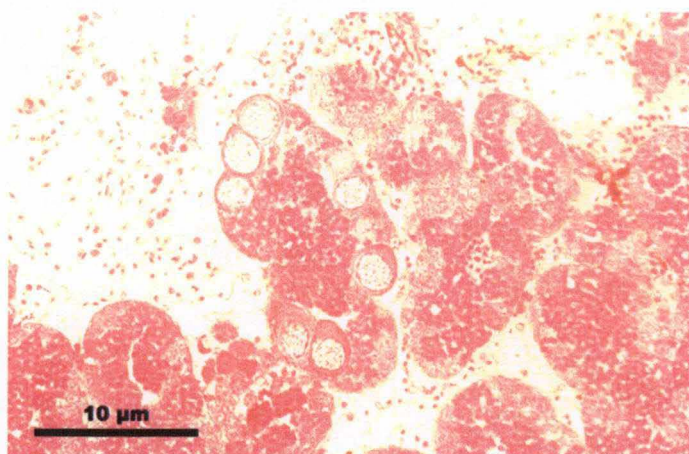


Figure 4.15 : présence d'ovocytes en grappe au sein d'un testicule de goujon mâle en amont de la STEP de Rochefort.

DISCUSSION

5 DISCUSSION

5.1 Efficacité d'élimination des Xénoestrogènes par les STEP

Dix stations d'épurations implantées en Région Wallonne et présentant différents processus d'épuration ont été étudiées du point de vue de leur efficacité à éliminer les xénoestrogènes. À cette fin, l'oestrogénicité de l'eau entrant (influent) et ressortant (effluent) du système d'épuration a été mesurée *in vitro*. Les résultats peuvent être modélisés par des courbes logistiques (régression de Hill). Sur base de cette modélisation, deux paramètres importants permettent de caractériser l'oestrogénicité des échantillons : l'EC50 et le RPE. Chacun de ces paramètres permet de comparer les échantillons *quantitativement* (EC50, en concentration ou EEQ en équivalent oestradiol) ou *qualitativement* (RPE).

L'analyse des résultats de ce type de tests n'étant pas standardisée parmi les chercheurs, la question se pose encore de quel paramètre est le plus représentatif pour comparer les résultats d'échantillons environnementaux complexes. La discussion ci-dessous commence par reprendre la méthode la plus communément utilisée afin de situer notre étude par rapport à la littérature, en décrit les limitations et propose une représentation alternative propre à cette problématique.

Equivalent oestradiol (EEQ)

L'EEQ représente l'EC50 exprimé en équivalent oestradiol (ng/L). Il est utilisé par la majorité des chercheurs dans des échantillons dont la concentration des différents composés oestrogéniques est déterminée. Le pourcentage d'élimination des stations peut alors être calculé précisément comme étant le rapport du EEQ influent/effluent. Dans notre cas, l'échantillon est un mélange complexe dont les composés restent indéterminés et l'activité oestrogénique est comparée à la seule activité de l'oestrogène naturel E2, ce qui produit un EEQ biaisé. Cette donnée reste intéressante pour les mélanges complexes car elle intègre la contribution des différents composés présents dans ces mélanges. Cependant elle ne prend en compte que l'élimination quantitative de l'oestrogénicité présente dans l'eau, sans tenir compte des effets spécifiques potentiels des différents xénoestrogènes. L'utilisation des EEQ n'est donc intéressante que pour comparer l'efficacité des stations aux données de la littérature.

Nos résultats indiquent que les stations éliminent une quantité non négligeable de substances oestrogéniques, avec des efficacités comprises entre 62,6% et 98,68%. Le processus de boues activées avec traitement tertiaire de déphosphatation et de dénitrification (Marche et Plombière) présente les pourcentages d'élimination les plus élevés (respectivement 98,68% et 95,89%) et ce, indépendamment de l'activité initiale de l'influent. En effet l'EEQ influent à Marche est deux fois plus élevé que celui de Plombière. Ce processus d'épuration apparaît dès lors être le plus efficace pour diminuer la puissance de l'échantillon. Inversement, le processus de lit bactérien (Morlanwelz) et les deux processus de lagunages (Bertrix et Malmedy), présentent les plus faibles performances épuratoires, avec respectivement 62,6%, 78% et 80,7% d'élimination. Les résultats sont plus contrastés en ce qui concerne les processus de boues activées simples et avec un traitement secondaire de déphosphatation. Pour les deux types de traitement, une station présente un bon taux

d'élimination, l'autre non. A La Roche, le processus de boues activées avec traitement tertiaire complet (dénitrification et déphosphatation) suivi d'un traitement quaternaire de désinfection ne présente qu'un taux moyen d'élimination (83,15%). Ces résultats ne sont pas surprenants, étant donné que le processus de boues activées est reconnu comme le meilleur dans l'élimination des composés oestrogéniques (Johnson *et al.*, 2007). Le processus de dénitrification a été reconnu comme un facteur important de l'élimination des substances oestrogéniques (Shi *et al.*, 2004), ce qui est visible ici par une efficacité supérieure des processus présentant un traitement tertiaire de dénitrification complémentaire à une déphosphatation. La moindre efficacité des traitements de lagunes et filtres bactériens correspond également à la littérature (Ying *et al.*, 2007). Plus étonnante est l'efficacité moyenne de la station présentant un traitement quaternaire, ce traitement ayant été jugé très efficace dans l'élimination des substances oestrogéniques (Auriol *et al.*, 2006). La variabilité rencontrée pour les processus de boues activées simple et avec déphosphatation peut être due à plusieurs facteurs et sera discutée à la fin de ce paragraphe.

Il est important de noter que, malgré des taux d'élimination des substances oestrogéniques élevés, des valeurs de EEQ non négligeables sont mesurées dans les effluents des STEP (jusqu'à 8,5 ng/L). Pour rappel, des concentrations en E2 et EE2 aussi faibles que 1 ng/L et 0,1 ng/L respectivement peuvent induire la production de VTG chez les truites mâles (Pawlowski *et al.*, 2004). Néanmoins, cela ne prédit en rien la concentration effective dans le cours d'eau récepteur, un facteur de dilution et des phénomènes de sorption et dégradation étant à prendre en compte (cfr introduction). Malgré tout cela n'exclut pas des concentrations susceptibles de causer des perturbations chez le vivant à proximité directe de l'effluent.

Figures de mérite EC50 vs RPE_{max}

Comme décrit dans la partie résultats de ce travail, l'EC50 ne permet pas d'avoir une vue complète de l'oestrogénicité d'un échantillon. En effet, trois problèmes se posent, dus au fait que l'échantillon contient un cocktail de substances à effet oestrogénique, tandis que le standard est de l'oestradiol pur. (i) Le processus d'épuration peut enrichir le mélange de xénoestrogènes en substances qui, à forte concentration, ont un effet supérieur au plateau observé pour le standard E2 (figure 4.3 : par exemple La Roche et Marche) . (ii) La variation des proportions du mélange de xénoestrogènes au cours du processus d'épuration peut faire qu'un même EC50 corresponde à des valeurs RPE_{max} sensiblement différentes (figure 4.4, Rochefort versus Rivière). (iii) Le classement d'un ensemble de stations suivant l'intersection de la valeur de EC50 déterminée sur le standard E2 avec leurs courbes respectives ne prendra pas une station en considération lorsque la valeur de EC50_{E2} sera supérieure à la valeur RPE_{max} d'une station (figure 4.5).

Dissocier ces deux paramètres pour l'efficacité d'élimination de l'oestrogénicité de l'eau par les stations d'épuration entraîne donc une perte d'information. La solution imaginée dans le cadre de ce mémoire pour répondre du mieux possible à la question posée est d'utiliser une figure de mérite prenant en compte simultanément les 2 paramètres (Figures 4.6 et 4.7).

Pour rappel, les échantillons sont représentés dans un plan dont l'abscisse représente l'EC50 en échelle logarithmique et l'ordonnée le RPE en % de E2. On peut associer l'abscisse à un indice qualitatif de l'effet oestrogénique des substances présentes et l'ordonnée à un indice quantitatif de la puissance de l'échantillon. La zone du graphique correspondant à la

meilleure qualité de l'eau (Figure 4.6), ou de l'épuration (Figure 4.7) se situe donc dans le coin inférieur droit de la figure, et est représentée par un symbole vert. Cette analyse en deux dimensions a été considérée comme très intéressante et apportant une « fresh approach » à la problématique par nos partenaires qui cherchaient une solution à ce problème (Caroline Vanparys et ses collaborateurs, de l'université d'Anvers).

Qualité de l'eau

Nous pouvons remarquer que, en ce qui concerne la répartition des influents, il n'y a pas de grande hétérogénéité du point de vue du RPE qui se situe pour tous entre 70 et 90% (sur une échelle de 40 à 110). Par contre, on observe une beaucoup plus grande variabilité de RPE dans les effluents. Ceci traduit une variation de la composition des xénoestrogènes au sein des systèmes épuratoires, reflétée par une différence d'effet relatif des échantillons sur la prolifération cellulaire. Ceci peut s'expliquer par les processus de biodégradation et d'activations auxquels sont soumis les xénoestrogènes. En effet, l'activité biologique présente dans les eaux usées, et les processus de traitement épuratoires peuvent transformer les xénoestrogènes en des produits de dégradation ou des métabolites plus ou moins actifs que la molécule de départ (Gomes *et al.*, 2003). Alors que l'on attend de l'épuration d'une substance unique et non transformée un RPE faible pour un EC50 élevé, cette figure révèle que certains effluents présentent un RPE élevé pour un EC50 élevé (par exemple l'effluent de Marche). Cela peut être expliqué par un effet d'additivité de l'activité des molécules oestrogéniques (Brian *et al.*, 2005). En effet, l'effluent peut présenter une concentration en composés oestrogénique plus faible que l'influent, mais un effet global plus élevé suite à la modification qualitative de ce mélange par le processus d'épuration.

Efficacité de l'épuration

La figure 2.7 met en évidence deux tendances opposées. La station de Marche est bien placée du point de vue quantitatif mais pas sur l'axe qualitatif. A l'inverse, la station de Ciney semble être efficace du point de vue qualitatif et non du point de vue quantitatif. Ces tendances indiquent que la station de Ciney laisse passer beaucoup de molécules qui sont peu actives, tandis que la station de Marche semble laisser passer peu de substances, mais qui ont un effet oestrogénique élevé. Le processus épuratoire entraînerait donc une concentration de substances actives, ou une activation de substances moins actives dans l'influent. L'analyse de la composition des influents et des effluents en composés oestrogénique devrait permettre de discuter cette hypothèse. La station de Plombière apparaît comme étant la plus efficace. Contrairement à ce qu'indique les EEQ, la station de Morlanwelz présente une bonne position sur le graphe et apparaît être la seconde station la plus efficace après Plombière. Ceci la place avant les autres stations, présentant des efficacités d'élimination sur base du EEQ seul plus élevée.

L'information supplémentaire que l'on peut retirer de ce graphique est que les stations de même type de traitement épuratoire ne se comportent pas de la même façon. Cela signifierait que le type d'épuration pourrait ne pas influencer l'efficacité d'élimination des composés oestrogéniques par les stations. En tout cas, cet effet éventuel n'est pas mis en évidence dans notre étude. Cette constatation a déjà été mise à jour, notamment dans le cas de l'élimination de E1 (Johnson *et al.*, 2007).

Nous pouvons constater que ces représentations donnent une vue plus intégrée de l'élimination des xénoestrogènes par le STEP. En effet, l'oestrogénicité de l'eau n'est plus

considérée qu'en terme de concentration mais également en terme de l'effet oestrogénique réel de ces échantillons. Le classement des performances des STEP est modifié par cette représentation, par rapport à celui basé sur les EEQ.

La variabilité visible entre les stations présentant le même traitement peut être due à plusieurs facteurs. Tout d'abord, les processus épuratoires dans leur ensemble ne sont jamais identiques. Deux stations de même type peuvent avoir des tailles de bassin différentes et donc des temps de rétention différents, caractéristique susceptible de faire varier leur efficacité d'élimination des xénoestrogènes. De même, de nombreuses conditions environnementales, propres aux stations (charge traitée, taille des particules en suspension, pH de l'effluent,...) ou extérieures (température, concentration du composé dans l'eau usée brute,...) peuvent influencer leur efficacité d'élimination des xénoestrogènes.

Par ailleurs, pour estimer l'efficacité d'élimination des composés oestrogéniques par les stations d'épuration, il est important de considérer quel est le procédé principal sous-jacent à cette élimination. Il apparaît que deux mécanismes peuvent expliquer l'élimination des xénoestrogènes : la dégradation du composé et l'adsorption sur les particules en suspension ou les boues résiduelles. Malheureusement, une ambiguïté persiste quant à la prévalence de la sorption aux particules en suspension ou de la biodégradation bactérienne comme processus d'élimination. En effet, selon Matsurp *et al.* (2001), moins de 10% des oestrogènes naturels et synthétiques sont éliminés par les processus de biodégradation, et bien qu'une quantité considérable soit adsorbée dans la boue, la majorité des composés restent solubles dans l'effluent. À l'inverse, Korner *et al.*, (2000) et Pothitou et Voutsas (2008) indiquent que la plupart de l'activité oestrogénique dans les eaux usées est biodégradée durant le traitement plutôt qu'adsorbée sur les solides en suspension. Cette variabilité est due en partie aux propriétés contradictoires de partition des xénoestrogènes (cfr introduction). Tous ces facteurs augmentent l'hétérogénéité des résultats obtenus et impliquent un grand nombre de variables à prendre en compte dans l'évaluation du devenir des xénoestrogènes dans les stations d'épuration, et dans l'environnement en général.

Ces constatations ont des conséquences importantes car elles illustrent la grande difficulté de prédire l'efficacité des stations dans l'élimination des xénoestrogènes, sur base des types d'épuration. Cela nous a mené à rechercher s'il y avait un lien entre d'autres caractéristiques épuratoires des stations considérées et leur capacité à éliminer l'oestrogénicité des influents. La régression multiple est un outil statistique adéquat pour répondre à cette question.

Régression multiple

Etant donné que le graphe montre qu'il n'y a pas d'association claire entre le type de station et l'élimination des oestrogènes, et que, tout en ayant un débit moyen, la station de Plombière présente les meilleurs paramètres d'élimination d'un point de vue général, nous avons tenté de voir si d'autres caractéristiques des stations pourraient être liées à cette épuration. Cela nous a mené à analyser par une régression multiple la possibilité de prédire l'efficacité des stations à éliminer les xénoestrogènes par d'autres caractéristiques épuratoires (DBO₅, DCO, MES, Nkj, PPO₄).

Individuellement, aucun de ces paramètres ne présente un R² considérable (<10%). Par ailleurs, la régression multiple réalisée sur l'ensemble des dix stations disponibles présente un R² de 72%, ce qui peut mener à penser qu'il serait éventuellement possible de lier les

paramètres d'efficacité d'élimination des stations et leur élimination des composés oestrogéniques. Cependant, ne disposant que de 10 stations pour évaluer 6 paramètres, nous sommes dans une situation où le R^2 sera toujours relativement élevé (trivialement, par 2 points passe toujours une droite, par 3 points passe toujours un plan,...). Ainsi, le calcul du R^2 est surestimé. Nous pouvons conclure de cette analyse que, en intégrant à l'analyse un plus grand nombre de stations, cette méthodologie pourrait, le cas échéant, permettre de prédire l'efficacité d'élimination des xénoestrogènes sur base des paramètres épuratoire des stations.

5.2 Impact des STEP sur le vivant

Pour rappel, différents biomarqueurs morphologique, biomoléculaire et histologique reconnus du contacts des poissons avec les xénoestrogènes ont été étudiés de façon à mettre en évidence un éventuel impact des effluents de stations d'épuration sur le vivant. Les analyses ont été effectuées sur des poissons récoltés en amont et en aval de deux STEP en Région Wallonne (La Roche et Rochefort). Nous avons utilisé le goujon comme modèle car il a été étudié dans cette problématique et s'avère positif pour différents biomarqueurs de contact avec les xénoestrogènes. De plus, c'est une espèce relativement bien répartie sur le réseau hydrographique wallon.

5.2.1 Paramètres morphologiques : RGS

Nous avons calculé les RGS (poids des gonades/poids du corps*100) pour tous les individus analysés. Ainsi, nous pouvons comparer ces valeurs pour les différents sites étudiés, indépendamment pour les mâles et les femelles. L'intérêt du RGS réside dans le fait qu'il s'agit d'un paramètre hautement intégratif étant donné qu'il n'est pas spécifique à un mécanisme particulier.

Les valeurs de RGS calculées chez les goujons mâles provenant des sites contrôles (en moyenne 0,7 %) sont inférieures à celles obtenues par Kestemont (1989) pour le mois d'octobre, soit 0,9%. De plus, la différence de moyenne, non significative, va dans le sens d'une diminution du RGS des mâles provenant du site aval (0,46%). Cette constatation est importante étant donné que plusieurs études, menées sur différentes espèces de poissons, font mention d'une diminution de RGS chez des poissons soumis à des effluents de STEP (Carballo et al., 2005, Ma et al., 2005, Douxfils, 2006). Cependant, deux études basées spécifiquement sur le goujon indiquent des valeurs similaires à celles que nous avons obtenues, soit un RGS de 0,5% (Van Aerle, 2001) et de 0,58% (Faller, 2003) chez des mâles provenant du site contrôle. La différence observée avec Kestemont (1987) peut être expliquée par le conditionnement différents des poissons, les goujons provenant d'élevage en mares pour cette étude, ce qui implique des températures plus clémentes. Nous ne pouvons dès lors pas mettre en évidence un impact sur la taille des testicules en aval des STEP.

Le fait qu'il n'y a pas de différence significative entre les RGS des mâles sains et des mâles intersexes a été également observé par Van Aerle (2001), qui en conclut qu'il s'agit d'un argument renforçant l'hypothèse que les poissons intersexes proviennent d'une féminisation des mâles et non l'inverse. Cette hypothèse a également été confirmée par l'augmentation de production de vitéllogénine par les mâles (Jobling et Sumpter, 1995). Jobling *et al.* (2002) ont pu quant à eux mettre en évidence une inhibition de la croissance gonadale chez les mâles intersexes, mais uniquement chez les individus sévèrement atteints.

Les valeurs de RGS rencontrées chez les goujons femelles (en moyenne 3,8%) correspondent à celles mesurées par Rinchar et al. (1993), avec une valeur moyenne de 3,1% en octobre. Cette valeur est néanmoins légèrement supérieure à celle observée par Faller (2005), ayant obtenu un RGS moyen de 3% pour le site contrôle. Cette différence n'est néanmoins pas interpellante, étant donné que la tendance observée dans les variations de RGS chez les poissons femelles (loches franches et gardons (*Rutilus rutilus*) en aval de STEP va vers une diminution du RGS (Doux fils *et al.*, 2006 ; Minier *et al.*, 2000). De plus, les valeurs de RGS peuvent être très variables, même pour une période identique, en fonction des conditions de température. Nous n'avons observé aucune différence de RGS entre les sites amont et aval des 2 stations d'épuration, ce qui rejoint les données de la littérature chez le goujon (Van Aerle *et al.*, 2001 ; Faller *et al.*, 2003 ; Doux fils *et al.*, 2006).

5.2.2 Expression de la vitellogénine

L'expression du gène de la vitellogénine chez les poissons mâles est un biomarqueur reconnu de l'exposition des poissons à des xénoestrogènes (Celius *et al.*, 2000). Le foie étant le site principal de synthèse de la vitellogénine, cet organe a été choisi pour mesurer l'expression de cette protéine (Mc Clain *et al.*, 2002, Roberts *et al.*, 2005).

Les résultats obtenus pour l'expression du gène de la vitellogénine par RT-PCR indiquent une très faible expression de ce gène, autant chez les mâles que chez les femelles. Ce résultat n'est pas surprenant étant donné que les poissons récoltés sont en période de repos sexuel. Les femelles ne sont pas en période de vitellogenèse et dès lors expriment peu le gène de la vitellogénine. En effet, chez le goujon, bien que la croissance ovocytaire soit un phénomène continu, la vitellogenèse commence à partir du mois de novembre mais reste bloquée durant les périodes fraîches de l'hiver. Une recrudescence de la vitellogenèse intervient vers le début du mois d'avril, avec l'augmentation de la température. La reproduction a lieu au mois de mai, après laquelle les poissons entrent en phase de repos sexuel. Au mois d'octobre, période de notre échantillonnage, les poissons se situent au début de la phase de recrudescence gonadale (Kestemont, 1987). Cette constatation est confirmée par les taux d'expression bien plus élevés mesurés chez des femelles du mois de mai, en période de vitellogenèse.

En ce qui concerne les mâles, la présence de transcrits du gène de la vitellogénine en si faible concentration indique une transcription basale, vraisemblablement causée par la présence d'oestrogènes endogènes, plutôt que par la présence de xénoestrogènes. En effet, les goujons mâles possèdent des récepteurs à l'E2, notamment au niveau de leurs hépatocytes, et sont dès lors capables de synthétiser de la vitellogénine (Pait et Nelson, 2002). Différentes études sur le goujon mâle indiquent une concentration en vitellogénine plasmatique de l'ordre du ng/ml chez des poissons contrôles *in situ*. (Van Aerle *et al.*, 2001 ; Faller *et al.* 2003). Cette protéine est donc bien présente chez le mâle de façon naturelle. Cette concentration est très faible relativement à la concentration plasmatique basale des femelles, de l'ordre du mg/ml (Faller *et al.*, 2003). Malgré des valeurs très faibles, on observe tout de même une variation du taux d'expression du gène de la vitellogénine chez les mâles. Il n'y a cependant aucune différence significative entre les sites amont et aval des stations d'épuration étudiées.

L'analyse de ce biomarqueur biomoléculaire nous indique qu'il n'y a pas d'altération de l'expression du gène de la vitellogénine chez les goujons mâles pour les sites amont ou

aval des STEP de Rochefort et La Roche. Cependant, nous devons rester prudent face à ces résultats. En effet, bien que l'utilisation de biomarqueur d'expression génique est très sensible et a été démontrée efficace pour la détection d'une exposition aux xénoestrogènes chez les poissons, la validation de ces résultats par une méthode complémentaire de mesure d'expression protéique reste fortement recommandée (Celius *et al.*, 2000 ; Pina *et al.*, 2007). Une étude de Burki (2006) sur des truites (*salmo trutta*) sauvages et encagées en aval de STEP met notamment en lumière que les résultats des biomarqueurs de la vitéllogénine varient avec la méthode de détection analytique et avec le mode d'exposition. Ils en concluent que, pour les situations environnementales avec une contamination oestrogénique faible et variable, une approche multibiomarqueurs est nécessaire pour évaluer l'exposition des poissons aux oestrogènes. Notre étude étant limitée à la mesure de l'expression du gène de la vitéllogénine, notamment par l'absence d'une méthode fiable de mesure de la vitéllogénine plasmatique chez le goujon, nous ne pouvons donc conclure en une absence de perturbation chez les poissons sur base de ces seuls résultats. D'autre part, il est important d'indiquer qu'un phénomène d'atténuation a été observé chez des poissons en milieu naturel (exposés aux substances oestrogéniques à long terme) par rapport aux poissons encagés durant une courte période (Seki *et al.*, 2005 ; Nash *et al.*, 2004, Jobling *et al.*, 2006). Il y a donc bien un facteur « mode d'exposition » des poissons à prendre en compte lorsque l'on effectue cette mesure.

5.2.3 Paramètres histologiques

En ce qui concerne les gonades femelles, une plus grande proportion d'ovocytes protoplasmiques et d'ovocytes au stade d'alvéoles corticaux précoces par rapport aux alvéoles corticaux avancés est habituelle chez les goujons au mois d'octobre (Kestemont, 1987). Cette proportion se maintient durant toute la période hivernale jusqu'au début du printemps, dû à une évolution lente et progressive de la gamétogenèse (Kestemont, 1987). Le développement ovocytaire ne semble pas montrer de différences entre les sites « amont » et « aval » pour chacune des STEP considérées. Aucun signe d'atrésie pré-ovulatoire n'a été observé, ce qui est un signe de bonne santé de la gonade. Ces constatations doivent néanmoins être considérées de façon prudente car les observations se sont limitées à 2 individus femelles par site, et sur une partie seulement de la gonade. Néanmoins, l'absence de signes de perturbation a limité nos observations.

Du point de vue du stade de développement, l'histologie des gonades mâles est également habituelle, Kestemont (1987) indiquant que les testicules à la période du mois d'octobre présentent une majorité de spermatogonies A et B, ce qui correspond à nos observations. Cependant, l'apparition d'ovotestis a été détectée chez plusieurs individus mâles. Cette anomalie est une preuve d'une altération du système reproducteur mâle, probablement dû au contact des poissons avec des substances oestrogéniques exogènes. Étant donné le nombre important d'ovocytes présents au sein des testicules touchés (en moyenne 11) et leur présence sur des poissons provenant de 3 des sites investigués, dont un site amont et aval d'une STP (La Roche amont et aval, ainsi que Rochefort amont), nous avons pu analyser ce paramètre de façon quantitative. Malgré l'apparence d'une différence entre le site amont et aval de La Roche (un plus grand nombre d'individus en amont présentant en moyenne un plus grand nombre d'ovocytes), aucune différence significative n'a été observée, ni pour le nombre, ni pour la taille des ovocytes ($p = 0,095$). Aucune corrélation entre la fréquence d'apparition d'ovotestis et la présence de la STEP ne peut donc être mise en évidence par ces résultats. La présence d'ovotestis uniquement en amont du site de Rochefort

est interpellante, d'autant plus qu'une étude préliminaire menée par notre laboratoire a mis en évidence la présence d'ovotestis en aval de cette station.

L'observation d'ovotestis aux sites contrôles (La Roche et Rochefort amont) n'est pas un phénomène isolé. En effet, différentes études ciblées sur le goujon indiquent la présence d'ovotestis sur les sites contrôles, avec toujours une prévalence plus faible mais néanmoins jamais significative (Van Aerle *et al.*, 2001 ; Faller *et al.*, 2005 ; Minier *et al.*, 2000). De même, une faible intersexualité au site contrôle a été reportée de façon similaire chez d'autres cyprinidae, incluant le gardon (*Rutilus rutilus*) et la brème (*Abramis brama*) (Jobling *et al.*, 1998 et 2002 ; Slooff *et al.*, 1982) avec cependant une apparition significativement plus faible par rapport aux sites contaminés. Une explication plausible à ce phénomène est la présence d'une proportion de mâles intersexes dans les populations de poissons sauvages. En Belgique, Kestemont (1987), reporte une incidence d'intersexe de 1% chez des populations de goujons élevées en marres. Néanmoins, ne connaissant pas cette proportion chez les goujons de rivière, nous ne pouvons pas savoir si les faibles niveaux d'intersexualité chez les goujons sauvages observés dans notre étude est un phénomène naturel ou le résultat d'une exposition à des composés chimiques. Quoiqu'il en soit, dans le contexte de notre étude, nous n'avons pas recensé la population de goujon aux sites investigués. Nous ne sommes dès lors pas en mesure de calculer le pourcentage d'apparition d'intersexe au niveau de la population. Néanmoins, la faible prévalence des mâles intersexes découverts aux sites contrôles est proche de ce qui a été observé dans la littérature. Nous ne pouvons dès lors pas exclure l'hypothèse de prévalence naturelle d'intersexe chez les populations sauvages de goujon.

Van Aerle *et al.* (2003) indiquent que la grande différence entre sites est le degré plutôt que l'incidence de l'intersexualité. Ils ont pu mettre cela en évidence par l'observation de différents degrés de sévérité de féminisation chez les mâles intersexes, en corrélation avec le taux de pollution des sites. Nous n'avons pu mettre ce phénomène en évidence dans notre étude, ni du point de vue de la maturation des ovocytes, ni pour la taille des ovotestis en fonction des sites (amont et aval).

Nous pouvons conclure que cette étude montre une incidence et une sévérité des ovotestis plus faibles dans les rivières belges (Lomme et Ourthe) que dans certaines rivières européennes. Dans l'ensemble, les biomarqueurs étudiés ne montrent pas d'altération chez les mâles liés à une exposition à des composés oestrogéniques. Néanmoins, il faut rester très prudent face à ces résultats, étant donné que nous n'avons pas fait un inventaire sur les communautés de goujons, et que notre étude porte sur un nombre de poissons trop peu élevé. En effet, il est important de noter que dans chaque analyse effectuée, nos tests sont proches de la limite de la significativité ($p < 0,15$) et que la différence est presque systématiquement dans le sens de l'hypothèse de départ. Malgré des efforts de pêches intensifiés pour atteindre un nombre suffisant de poissons à analyser, nos effectifs restent insuffisants pour mettre en évidence une différence significative. En tenant compte approximativement du rapport de temps nécessaire pour récolter les poissons et pour réaliser les mesures sur coupes, une ANOVA à un critère de classification aléatoire sur les moyennes des diamètres d'ovotestis nous indique qu'il faudrait idéalement 7 poissons par site et 13 mesures par poisson pour mettre en évidence une différence de diamètre de l'ordre de 10%.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

6 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le premier objectif de ce travail était de comparer l'efficacité d'élimination des xénoestrogènes par différents types de station d'épuration Wallonnes.

1. Parmi les 10 stations de six types que nous avons choisies, la station de Plombière apparaît être la plus efficace dans l'élimination qualitative et quantitative des composés oestrogéniques. Cette station est caractérisée par un traitement de boues activées avec traitement tertiaire de déphosphatation et dénitrification.
2. La station de Marche qui est du même type que Plombière ne présente pas la même efficacité sur le plan qualitatif. Cela pourrait être imputé à d'autres facteurs comme l'architecture de la station, les conditions environnementales ou la qualité des xénoestrogènes des influents.
3. Malgré une efficacité d'élimination quantitative élevée dans l'ensemble, des quantités non négligeables de xénoestrogène, présentant des effets relatifs variables, sont rejetés dans l'environnement par la plupart des stations.
4. Une représentation des stations dans une figure de mérite prenant en compte l'aspect quantitatif et qualitatif de l'élimination des xénoestrogènes par les STEP produit un classement de leurs performances différent de celui basé exclusivement sur les EEQ.
5. De façon générale, nous n'observons pas de corrélation entre les six types de traitement et l'efficacité des stations à éliminer les xénoestrogènes.
6. Nous n'avons pas pu expliquer l'efficacité des stations à éliminer les xénoestrogènes par d'autres caractéristiques épuratoires.

Le deuxième objectif de ce travail était de voir si certains processus d'épuration représentent une source de pollution pour les poissons sauvages.

1. De façon irréfutable, nous avons mis en évidence la présence d'ovotestis chez les goujons mâles, en amont et en aval de STEP, sans mettre en évidence de différences significatives entre l'amont et l'aval de la fréquence des intersexués ni du diamètre des ovocytes.
2. Les autres biomarqueurs du contact avec les xénoestrogènes étudiés (expression du gène de la vitellogénine et RGS) ne révèlent pas de perturbation chez les goujons mâles et femelles.

Les perspectives de ce travail intègrent la complémentarité des approches *in vitro* et *in vivo*, car il nous semble essentiel de maintenir cette double approche de l'évaluation de l'oestrogénicité et de ses effets.

L'analyse *in vitro* semble être un bon outil pour comparer l'efficacité d'élimination de composés oestrogéniques par différents types de traitement épuratoires. La première amélioration du protocole serait de pratiquer des échantillonnages réguliers de l'eau sur une période déterminée, afin d'avoir une meilleure estimation de la variation de l'oestrogénicité au cours du temps. Celle-ci peut en effet varier avec différents facteurs, dont la charge de l'influent et les conditions climatiques. Le test de prolifération cellulaire étant assez coûteux, le budget reste le facteur limitant de l'étude.

Il serait également utile de déterminer la composition spécifique en composés oestrogéniques dans l'influent et l'effluent. En ayant recours à la chromatographie suivie d'une détection spécifique des composés à l'aide d'un spectromètre de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS), d'autres laboratoires expliquent les phénomènes de dégradation/activation des molécules de façon plus fine que nous avons pu le faire. Dans nos laboratoires, la technique demande encore une mise au point pour la détection des oestrogènes naturels.

L'approche *in vivo* requiert un meilleur contrôle des paramètres environnementaux, comme des mesures complémentaires du facteur de dilution de l'effluent dans le cours d'eau récepteur, afin d'estimer la concentration effective en xénoestrogènes présente dans l'eau, ainsi que l'analyse de l'oestrogénicité de la rivière en amont, pour déterminer le rôle effectif de la STEP. Nous pourrions également envisager d'encager les poissons en amont et en aval de la station pour éviter les flux migratoires.

De façon étonnante, nos efforts répétés de captures du goujon se sont révélés relativement infructueux. Ceci pourrait être lié aux contraintes de terrain dépendant des choix systématiques des types de STEP, indépendants des biotopes favorables au développement du goujon. Si cette limite devait se confirmer, il serait intéressant d'envisager le Chabot (*Cottus gobio*) en tant qu'espèce sentinelle car cette espèce s'est avérée bien plus présente et abondante que le goujon durant nos efforts de pêche.

L'analyse de la concentration protéique en vitellogénine (ELISA, Western Blot), devrait compléter la mesure de l'expression du gène, ce qui n'a pas été matériellement possible dans le cadre de ce travail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Aerni H.R., Kobler B., Rutishauser B.V., Wettstein F.E., Fischer R., Giger W., et al., 2004, Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Anal Bioanal Chemistry*, 378 : 688-96.

Aguayo S., Muñoz M.J., de la Torre A., Roset J., de la Peña E., Carballo M., 2004, Identification of organic compounds and ecotoxicological assessment of sewage treatment plants (STP) effluents. *Science of The Total Environment*, 328 (1-3) : 69-81.

Ahel M., Giger W., Koch M., 1994, Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment : Occurrence and transformation in sewage treatment, *Water Research*, 28 : 1131-1142.

Ankley G., Mihaich E., Stahl R., Tillitt D., Colborn T., McMaster S., Miller R., Bantle J., Campbell P., Denslow N., Dickerson R., Folmar L., Fry M., Giesy J., Gray L.E., Guiney P., Hutchinson T., Kennedy S., Kramer V., LeBlanc G., Mayes M., Nimrod A., Patino R., Peterson R., Purdy R., Ringer R., Thomas P., Touart L., Van Der Kraak G., Zacharewski T., 1998, Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17 (1) : 68-87.

Arukwe A., Celius T., Walther B.T., Goksøyr A., 2000(a), Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*, 49 (3) : 159-170.

Arukwe A., 2001, Cellular and Molecular Responses to Endocrine-Modulators and the Impact on Fish Reproduction, *Marine Pollution Bulletin*, 42 (8) : 643-655.

Auriol M., Filali-Meknassi Y., Tyagi R.D., Adams C.D., Surampalli R.Y., 2006, Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge. *Process Biochemistry*, 41 : 525-539.

Baker A.E., Brautigam V.M., Watters J.J., 2004, Estrogen Modulates Microglial Inflammatory Mediator Production via Interactions with Estrogen Receptor β , *Endocrinology*, 145 (11) : 5021-5032.

Birkett J.W., Lester J.N., 2003, Endocrine disrupters in wastewater and sludge treatment processes, *London, UK : IWA Publishing*, 280.

Brian J.V., Harris C.A., Scholze M., Backhaus T., Booy P., Lamoree M., Pojana G., Jonkers N., Runnalls T., Bonfa A., Morcomini A., Supter J.P., 2005, Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals, *Environmental Health Perspective*, 113 : 221-228.

Brian J.V., Sumpter J.P., 2007, Mixtures of chemicals in water : implications for chemical regulation and environmental policy, *Water Law : National report*, 18 : 62-65.

- Brion F., Tyler C.R., Palazzi X., Laillet B., Porcher J.M., Garric J., Flammarion P.,** 2004, Impacts of 17-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 68 (3) : 193-217.
- Burki R., Vermeirssen E., Körner O., Joris C., Burkhardt-Holm P., Segner H.,** 2006, Assessment of estrogenic exposure in brown trout (*Salmo trutta*) in a Swiss midland river : integrated analysis of passive samplers, wild and caged fish and vitellogenin mRNA and protein, *Environmental toxicology and chemistry*, 25 (8) : 2077-2086.
- Bustin S.A.,** 2000, Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *Journal of Molecular Endocrinology*, 25 (2) : 169-193.
- Campbell C.G., Hutchinson,** 1998, Wildlife and endocrine disrupters : requirements for hazard identification, *Environmental toxicology and chemistry*, 17 : 127-135.
- Campbell C.G., Borglin S.E., Green F.B., Grayson A., Wozel E., Stringfellow W.T.,** 2006, Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water : a review, *Chemosphere*, 65 : 1265-80.
- Canler JP.,** 2004, Dysfonctionnements des stations d'épuration : origines et solutions, *Document technique FNDAE*, 33 : 80.
- Canler JP., Perret JM., Choubert JM.,** 2007, Le traitement du carbone et de l'azote pour des stations d'épuration de type boue activée confrontées à des fortes variations de charge et à des basses températures, *Document technique FNDAE*, 34 : 107.
- Carballa M., Omil F., Lema J.M. Llompert M., Garcia-Jares C., Rodriguez I., Gómez M., Ternes T.,** 2004, Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant, *Water Research*, 38 : 2918-2926.
- Carballo M., Aguayo S., de la Torre A., Muñoz M.J.,** 2005, Plasma vitellogenin levels and gonadal morphology of wild carp (*Cyprinus carpio* L.) in a receiving rivers downstream of Sewage Treatment Plants. *Science of The Total Environment*, 341 (1-3) : 71-79.
- Celius T., Matthews J.B., Giesy J.P., Zacharewski T.R.,** 2000, Quantification of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), zona radiata and vitellogenin mRNA levels using real time PCR after in vivo treatment with estradiol-17 β or α -zearalenol, *Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 75 : 109-119.
- Commission of the European communities.,** 2001, The implementation of the Community strategy for endocrine disrupters : A range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife. *COM*, 706 : 45.
- Cravedi J.P., Boudry G., Baradat M., Rao D., Debrauwer L.,** 2001, Metabolic fate of 2,4-dichloroaniline, prochloraz and nonylphenol diethoxylate in rainbow trout: a comparative in vivo/in vitro approach. *Aquatic Toxicology*, 53, 3-4, 159-172.
- Czajka CP, Londry KL.,** 2006, Anaerobic biotransformation of estrogens. *Science of the Total Environment*, 367 : 932-941.

D'Ascenzo G., Di Corcia A., Gentili A., Mancini R., Mastropasqua R., Nazzari M., Samperi N., 2003, Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities, *The Science of The Total Environment*, 302 (1-3) : 199-209.

Degen G.H., Bolt H.M., 2000, Endocrine disruptors : update on xenoestrogens. *Int Arch Occup Environ Health*, 73 : 433-441.

Desbrow C., Routledge E.J., Brighty G.C., Sumpter J.P., Waldock M., 1998, Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1: Chemical Fractionation and in vitro biological screening. *Environmental science & technology*, 32 (11) : 1549.

De Wever H., Weiss S., Reemtsma T., Vereecken J., Müller J., Knepper T., Rörden O., Gonzalez S., Barcelo D., Hernando M., 2007, Comparison of sulfonated and other micropollutants removal in membrane bioreactor and conventional wastewater treatment. *Water Research*, 41 : 935-945.

Doux fils J., Mandiki R., Sylvestre F., Bertrand A., Leroy D., Thomé J.P., Kestemont P., 2007, Do sewage treatment plants discharges substantially impaired fish reproduction in polluted rivers ?, *Science of the total environment*, 372 : 497-514.

Faller P., Kobler B., Peter A., Sumpter J.P., Burkhardt-Holm P., 2003, Stress status of gudgeon (*Gobio gobio*) from rivers in Switzerland with and without input of sewage treatment plant effluent, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22 (9) : 2063-2072.

Fent K., Escher C., Caminada D., 2006, Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system, *Reproductive Toxicology*, 22 : 175-185.

Folmar L.C., Denslow N.D., Kroll K., Orlando E.F., Enblom J., Marcino J., Metcalfe C., Guillette L.J.Jr., 2001, Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in Walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40 : 392-98.

Garcia-Reyero N., Raldua D., Quiros L., Llaveria G., Cerda J., Barcello D., Grimalt J.O., Pina B., 2004, Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 378 : 670-75.

Gomes R.L., Scrimshaw M.D., Lester J.N., 2003, Determination of endocrine disrupters in sewage treatment and receiving waters. *Trends in Analytical Chemistry*, 22 (10) : 697-707.

Gonzalez S., Petrovic M., Barcelo D., 2007, Removal of a broad range of surfactants from municipal wastewater - Comparaison between membrane bioreactor and conventional activated sludge treatment. *Chemosphere*, 67 : 335-343.

Guillette L.J. Jr., Gross T.S., Masson G.R., Matter J.M., Percival F., Woodward A.R., 1994, Developmental Abnormalities of the Gonad and Abnormal Sex Hormone Concentrations in Juvenile Alligators from Contaminated and Control Lakes in Florida, *Environmental Health Perspectives*, 102 (8) : 680-688.

Gutendorf B., Westendorf J., 2001, Comparaison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology*, 166 : 79-89.

Halm S., Pounds N., Maddix S., Rand-Weaver M., Sumpter J.P., Hutchinson T.H., Tyler C.R., 2002, Exposure to exogenous 17-oestradiol disrupts P450aromB mRNA expression in the brain and gonad of adult fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquatic Toxicology*, 60, 3-4, 285-299.

Hansen P.D., Dizer H., Hock B., Marx A., Sherry J., McMaster M., et al., 1998, Vitellogenin-a biomarker for endocrine disruptors. *Trends Analytical Chemistry*, 17 (7) : 448-451.

Heberer T., 2002, Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water, *Journal of Hydrology*, 266 : 175-189.

Höger B., Taylor S., Hitzfeld B., Dietrich D.R., Van Den Heuvel M.R., 2006, Stimulation of reproductive growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following exposure to treated sewage effluent, *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 (10) : 2753-2759.

Jobling S., Nolan M., Tyler C.R., Brighty G., Sumpter J.P., 1998, Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental Science and Technology*, 32, (17) 2498-2506.

Jobling S., Beresford N., Nolan M., Rodgers-Gray T., Brighty G.C., Sumpter J.P., Tyler C.R., 2002, Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biology of Reproduction*, 66 (2) : 272-281.

Jobling S., Williams R., Johnson A., Taylor A., Gross-Sorokin M., Nolan M., Tyler C.R., van Aerle R., Santos E., Brighty G., 2006, Predicted Exposures to Steroid Estrogens in U.K. Rivers Correlate with Widespread Sexual Disruption in Wild Fish Populations, *Environmental Health Perspectives*, 114 : 1.

Johnson A.C., Belfroid A., Di Corcia A., 2000, Estimating steroid estrogen inputs into activated sludge treatment works and observation on their removal from the effluent. *The Science of the total environment*, 256 : 163-73.

Johnson A.C., Sumpter J.P., 2001, Removal of Endocrine-Disrupting Chemicals in Activated Sludge Treatment Works. *Environmental Science & Technology*, 35 : 4697-4703.

Johnson A.C., Aerni H.R., Gerritsen A., Gibert M., Giger W., Hylland K., Jürgens M., Nakari T., Pickering A., Suter M.J., Svenson A., Wettstein F.E., 2005, Comparing steroid estrogen and nonylphenol content across a range of european sewage plants with different treatment and management practices. *Water Research*, 39 : 47-58.

Johnson A.C., Williams R.J., Simpson P., Kanda R., 2007, What difference might sewage treatment performance make to endocrine disruption in rivers, *Environmental Pollution*, 147 : 194-202.

Joss A., Andersen H., Ternes T., Richle P.R., Siegrist H., 2004, Removal of Estrogens in Municipal Wastewater Treatment under Aerobic and Anaerobic Conditions: Consequences for Plant Optimization, *Environnemental Science and Technology*, 38(11) : 3047-3055.

Jürgens M.D., Holthaus K.I., Johnson A.C., Smith J.J., Hetheridge M., Williams R.J., 2002, The potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in english rivers. *Environnemental Toxicology and Chemistry*, 21 : 480-488.

Kang I.J., Yokota H., Oshima Y., Tsuruda Y., Yamaguchi T., Maeda M., Imada N., Tadokoro H., Honjo T., 2002, Effect of 17-estradiol on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 47, 1, 71-80.

Kavlock R.J., Ankley G.T., 1996, A Perspective on the Risk Assessment Process for Endocrine-Disruptive Effects on Wildlife and Human Health, *Risk Analysis*, 16, 6 : 731 – 739.

Kestemont P., 1987, Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio* L. 1. Variations saisonnières dans l'histologie de l'ovaire. *Sonderdruck aus journal of Applied Ichthyology*, 3 (4) : 145-157.

Kestemont P., 1989, Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio* L. 2. Variations saisonnières dans l'histologie des testicules. *Journal of Applied Ichthyology*, 5 : 111-121.

Kim S.D., Cho J., Kim I.S., Vanderford B.J., Snyder S.A., 2007, Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters, *Water Research*, 41 : 1013-1021.

Kime D.E., 1999, A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction, *The Science of The Total Environment*, 225 : 1-2, 3-11.

Kinnberg K., 2003, Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment, *Danish Environmental Protection Agency, Working Report 43* : 49.

Körner W., Hanf V., Schuller W., Kempter C., Metzger J., Hagenmaier H., 1998, Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluent. *The Science of The Total Environment*, 12 : 33-48.

Körner W., Bolz U., Süßmuth W., Hiller G., Schuller W., Hanf V., Hagenmaier H., 2000, Input/Output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany, *Chemosphere*, 40 : 1131-1142.

Kubista M., Andrade J.M., Bengtsson M., Forootan A., Jonák J., Lind K., Sindelka R., Sjöback R., Sjögreen B., Strömbom L., Stahlberg A., Zoric N., 2006, The real-time polymerase chain reaction, *Molecular aspects of medicine*, 27 : 95-125.

Lai, K. M., Scrimshaw, M. D. and Lester, J. N., 2002. Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems, *Science of the Total Environment*, 289: 159-168.

Lam P.K.S., Gray J.S., 2003, The use of biomarkers in environmental monitoring programmes, *Marine Pollution Bulletin*, 46 (2) : 182-186.

Langston W.J., Burt G.R., Chesman B.S., Vane C.H., 2005, Partitioning, bioavailability and effects of oestrogens and xeno-estrogens in the aquatic environment, *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 85 : 1-31.

Larsson D.G.J., Adolphsson-Erici M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg A.H., Olsson P.E., Forlin L., 1999, Ethinyloestradiol - An undesired fish contraceptif? *Aquatic Toxicology* 45 : 91-97.

Lavado R., Thibat R., Raldua D., Martin R., Porte C., 2004, First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro river. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 196 : 247-257.

Lee H.B., Liu D., 2002, Degradation of 17 β -Estradiol and its metabolites by sewage bacteria, *Water, Air, & Soil Pollution*, 54 : 351-366.

Lee B.C., Kamata M., Akatsuka Y., Takeda M., Ohno K., Kamai T., Magara Y., 2004, Effect of chlorine on the decrease of estrogenic chemicals. *Water Research*, 38 : 733-739.

Lee J., Lee B.C., Ra J.S., Cho J., Kim I.S., Chang N.I., Kim H.K., Kim S.D., 2007, Comparison of the removal efficiency of endocrine disrupting compounds in pilot scale sewage treatment processes, *Chemosphere*, in press.

Legler J., Van den Brink C.E., Brouwer A., Murk A.J., Van der Saag P.T., Vethaak A.D., Van der Burg B., 1999, Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line, *Toxicological Sciences*, 48 : 55-66.

Legler J., Dennekamp M., Vethaak A.D., Brouwer A., Koeman J.H., van den Burg B., Murk A.J., 2002, Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays, *The Science of the Total Environment*, 293 : 69-83.

Leino R.L., Jensen K.M., Ankley G.T., 2005, Gonadal histology and characteristic histopathology associated with endocrine disruption in the adult fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19, 1, 85-98.

Leusch F., Van Den Heuvel M.R., Chapman H.F., Gooneratne S.R., Eriksson A., Tremblay L.A., 2006, Development of methods for extraction and in vitro quantification of estrogenic and androgenic activity of waste waters samples, *Comparative Biochemistry and Physiology*, C, 143 : 117-126.

Liu B., Liu X., 2004, Direct photolysis of estrogens in aqueous solutions, *The Science of the total environment*, 320 : 269-274.

Liu Y., Zhang T., Herbert H.P., 2005, Microbial community analysis and performance of a phosphate-removing activated sludge, *Bioresource Technology*, 96(11) : 1205-1214.

Lye C.M., Frid C.L.J., Gill M.E., Mc Cormick D., 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.

Ma T., Wan X., Huang Q., Wang Z., Liu J., 2005, Biomarker responses and reproductive toxicity of the effluent from a Chinese large sewage treatment plant in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 59, 281-288.

Martin-Robichaud D.J., Peterson R.H., Benfey T.J., Crim L.M.,1994, Direct feminization of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) using 17β -oestradiol-enriched *Artemia* as food, *Aquaculture*, 123 : 137-151.

Matsui S., Takigami H., Tatsuda T., Taniguchi N., Adachi J., Kawami H., Shimizu Y., 2000, Estrogen and estrogen mimics contamination in water and the role of sewage treatment, *Water science and technology*, 42, 173-179.

Mastrup M., Jensen R.L., Schafer A.I., Khan S., 2001, Fate modeling—an important tool for water recycling. In: Schafer AI, Sherman P, Waite TD, *Recent advances in water recycling technologies*. Australia: Brisbane, p. 103–12.

Mayon N., Bertrand A., Leroy D., Malbrouck C., Mandiki S.M.N., Sylvestre F., Goffard A., Thomé J.P., Kestemont P., 2006, Multiscale approach of fish responses to different types of environmental contaminations : a case study, *Science of the Total Environment*, 367 : 715-731.

Mc Clain J.S., Oris J.T., Burton G.A., Lattier D., 2002, Laboratory and field validation of multiple molecular biomarkers of contaminant exposure in rainbow trout (*Oncorhynchus mychiss*), *Environmental toxicology and chemistry*, 22 (2) : 361-370.

Minier C., Levy F., Rabel D., Bocquené G., Godefroy D., Burgeot T., Le Boulenger F., 2000, Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study, *Marine Environmental Research*, 50, 1-5, 373-377.

Moriyama K., Matsufuji H., Chino M., Takeda M., 2004, Identification and behavior of reaction products formed by chlorination of ethynylestradiol. *Chemosphere*, 55 : 839-847.

Murk A.J., Legler J., van Lipzig M.H., Meerman J.H.N., Belfroid A.C., Spenkeliink A., van der Burg B., Rijs G.B.J., Vethaak D., 2002, Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21 : 16-23.

Nakada N., Nyunoya H., Nakamura M., Hara A., Iguchi T., Takada H., 2004, Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* ; 23 :2807-2815.

Nakamuro K., Ueno H., Okuno T., Sakazaki F., Kawai H., Kamei T., Ugawa M., 2002, contribution of Endocrine-Disrupting Chemicals to Estrogenicity of Environmental Water, *Journal of Japan Society on Water Environment*, 25(6) : 355-360.

Nakano K., Suyama K., Fukazawa H., Uchida N., Wakabayashi K., Shiozawa T., Terao Y., 2000, Chlorination of Harman and norharman with sodium hypochlorite and co-mutagenicity of the chlorinated products, *Mutat. Res.*, 470 : 141-146.

Nakashima T., Ohkoba Y., Kubota Y., 2003, Fujishima A., Photocatalytic decomposition of estrogens in aquatic environment by reciprocating immersion of TiO₂-modified polytetrafluoroethylene mesh sheets, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 160 : 115-120.

Nimrod A.C., Benson W.H., 1998, Reproduction and development of Japanese medaka following an early life stage exposure to xenoestrogens, *Aquatic Toxicology*, 44 :141-156

Nash P., Kime D.E., Van der Ven L.T.M., Wester P.W., Brion F., Maack G., Stahlschmidt-Allner P., Tyler C.R., 2004, Long-Term Exposure to Environmental Concentrations of the Pharmaceutical Ethynylestradiol Causes Reproductive Failure in Fish, *Environmental Health Perspective*, 112(17) : 1725-1733.

Ohko Y., Iuchi K.I., Niwa C., Tatsuma T., Nakashima T., Iguchi T., et al. 2002, 17Beta-estradiol degradation by TiO₂ photocatalysis as a means of reducing estrogenic activity. *Environmental Science and Technology*, 36 : 4175-81.

Onda K., Nakamura Y., Takatoh C., Miya A., Katsu Y., 2003, The behavior of estrogenic substances in the biological treatment process of sewage, *Water Science & Technology*, 47(9) : 109-116.

Örn S., Holbech H., Madsen T.H., Norrgren L., Petersen G.I., 2003, Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethynylestradiol and methyltestosterone. *Aquatic Toxicology*, 65, 4: 397-411.

Pait, A.S., Nelson J.O., 2002, Endocrine Disruption in fish: Assessment of Recent Research and Results. NOAA Tech. Memo. NOS NCCOS CCMA 149. Silver Spring, MD:NOAA, NOS, Center for Coastal Monitoring and Assessment, 55p.

Panter G.H., Thompson R.S., Sumpter J.P., 1998, Adverse reproductive effects in male fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to environmentally relevant concentrations of the natural oestrogens, oestradiol and oestrone. *Aquatic Toxicology*, 42, 4: 243-253.

Pawlowski S., Sauer A., Shears J.A., Tyler C.R., Braunbeck T., 2004, Androgenic and estrogenic effects of the synthetic androgen 17-methyltestosterone on sexual development and reproductive performance in the fathead minnow (*Pimephales promelas*) determined using the gonadal recrudescence assay. *Aquatic Toxicology*, 68 (3) : 277-291.

Pina B., Casado M., Quiros L., 2007, Analysis of gene expression as a new tool in ecotoxicology and environmental monitoring, *Trends in Analytical Chemistry*, 26 (11) : 1145-1154.

Pons M., Gagne D., Nicolas J.C., Mehtali M., 1990, A new cellular model of response to estrogens: a bioluminescent test to characterize (anti) estrogen molecules, *Biotechniques*, 9(4): 450-9.

Porter C.M., Janz D.M., 2003, Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54 (2): 199-206.

Pothitou P., Voutsas D., 2008, Endocrine disrupting compounds in municipal and industrial waste water treatment plants in northern Greece, *Chemosphere*, 73 : 1716-1723.

Preziosi P., 1998, Endocrine disruptors as environmental signalers : an introduction. *Pure and applied chemistry*, 70 : 1617-31.

Purdum C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R., Sumpter J.P., 1994, Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Journal of chemical ecology*, 8 : 275-85.

Rinchart J., Kestemont P., Kühn E.R., Fostier A., 1993, Seasonal changes in plasma levels of steroid hormones in an asynchronous fish the gudgeon *Gobio gobio* L. (Teleostei, Cyprinidae). *General and comparative endocrinology*, 92, 168-178.

Rinchart J., Kestemont P., Heine R., 1996, Comparative study of reproductive biology in single and multiple-spawner cyprinid fish. 1. Morphological and histological features. *Journal of Fish Biology*, 49, 1, 883-894.

Roberts A.P., Oris J.T., Burton G.A., Clements W.H., 2005, Gene expression in caged fish as a first tier indicator of contaminants exposure in streams, *Environmental toxicology and Chemistry*, 24 (12) : 3092-3098.

Rosselli M., Reinhart K., Imthurn, B., Keller P.J., Dubey R.K., 2000, Cellular and biochemical mechanisms by which environmental estrogens influence reproductive function, *Human Reproduction Update*, 6(4) : 332-350.

Routledge E.J., et Sumpter J.P., 1997, Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity, *The Journal of Biological Chemistry*, 272(6) : 3280-3288.

Routledge E.J., Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M, Sumpter J.P., 1998, Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science and Technology*; 32 : 1559-65.

Routledge E.J., Waldock M., Sumpter J.P., 1999, Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening. *Environmental Science and Technology* ; 33 : 371.

Routledge E.J., White R., Malcolm G., Sumpter J.P., 2000, Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) α and ER β , *The Journal of Biological Chemistry*, 275(17) : 35986-35993.

Schafer A.I., Waite T.D., 2002, Removal of endocrine disruptors in advanced treatment-the Australian Approach. In: *Proceedings of the IWA World Water Congress, Workshop Endocrine Disruptors, IWA Specialist Group on assessment and control of hazardous substances in water (ACHSW)* : 37-51.

Seki M., Yokota H., Maeda M., Kobayashi K., 2005, Fish full life-cycle testing for 17 β -estradiol on medaka (*Oryzias latipes*), *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(5) : 1259-1266.

Sheahan D.A., Brighty G.C., Daniel M., Jobling S., Harries J.E., HURST M.R., Kennedy J., Kirby S.J., Morris S., Routledge E.J., Sumpter J.P., Waldock M.J., 2002, Reduction in the estrogenic activity of a treated sewage effluent discharge to an English river as a result of a decrease in the concentration of industrially derived surfactants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21 : 515-519.

Shi J., Fujisawa S., Nakai S., Hosomi M., 2004, Biodegradation of natural and synthetic estrogens by nitrifying activated sludge and ammonia-oxidising bacterium *Nitrosomas europaea*, *Water Research*, 38 : 2323-2330.

Simoncini T. and Genazzani A.R., 2003, Non-genomic actions of sex steroid hormones, *European Journal of Endocrinology*, 148 : 281-292.

Simpson E.R., Mahendroo M.S., Means G.D., Kilgore M.W., Hinshelwood M.M., Graham-Lorence S., Amarnah B., Ito Y., Fisher C.R., Michael M.D., Mendelson C.R., Bulun S.E., 1994, Aromatase Cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis, *Endocrine Reviews*, 15(3) : 342-355.

Slooff W., 1982, Skeletal Anomalies in Fish from Polluted Surface Waters, *Aquatic Toxicology*, 2 : 157-173.

Smith A.K., Ajani P.A., Roberts D.E., 1999, Spatial and temporal variation in fish assemblages exposed to sewage and implications for management. *Marine Environmental Research*, 47, 3, 241-260.

Snyder S.A., Villeneuve D.L., Snyder E.M., Giesy J.P., 2001, Identification and quantification of estrogen receptor agonists in waste water effluents, *Environmental science and technology*; 35, 3620-3625.

Snyder S.A., Adham S., Redding A.M., Cannon F.S., DeCarolis J., Oppenheimer J., Wert E.C., Yoon Y., 2006, Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals, *Desalination*, 202, 1-3, 156-181.

Snyder S., Adham S., Redding A., Cannon, DeCarolis J., Oppenheimer J., Wert E., Yoon Y., 2007, Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals. *Desalination* ; 202 : 156-181.

Solé M., Porte C., Barceló D., 2001, Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in fish as a biomarker. *Trends in Analytical Chemistry*, 20, 9, 518-525.

Soto A.M., Sonnenschein C., Chung K.L., Fernandez M.F., Olea N., Olea Serrano F., 1995 The E-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants, *Environmental Health Perspectives*, 103, 113-122.

Soule H.D., Vazquez J., Long A., Albert S., Brennan M., 1973, A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma, *National Cancer Institut* 51(5):1409-16.

Spengler P., Körner W., Metzger J.W., 2001, Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 1. Chemical analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20 : 2133-41.

Sumpter J.P., 1995, Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicology Letters*, 82-83 : 737-742.

Sumpter, J.P., Jobling S., 1995, Vitellogenin as a biomarker of exposure to oestrogens. *Environmental Health Perspectives*, 103, 6, 173-178.

Sun Q., Deng S., Huang J., Shen G., Yu G., 2008, Contributors to estrogenic activity in wastewater from a large wastewater treatment plant in Beijing, China, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25 : 20-26.

Suzuki K., Hirai H., Murata H., Nishida T., 2002, Removal of estrogenic activities of 17 β -estradiol and ethinylestradiol by ligninolytic enzymes from white rot fungi. *Water Research*; 37 : 1972-1975.

Ternes T.A., Andersen H., Gilbert D., Bonerzet al., 2002, Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Analytical Chemistry*, 74 : 3498-3506.

Ternes T.A., Stüber J., Herrmann N., McDowell D., Ried A., Kampmann M., Teiser B., 2003, Ozonation : a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater ? *Water Research* ; 37 : 1976-1982.

Terzic S., Matosic M., Ahel M., Mijatovic I., 2005, Elimination of aromatic surfactants from municipal wastewaters : comparison of conventional activated sludge treatment and membrane biological reactor, *Water of science Technology*, 51 : 447-453.

Thorpe K.L., Hetheridge M.J., T.H. Hutchinson T.H., M. Scholze M., Sumpter J.P. and Tyler C.R., 2001, Assessing the Biological Potency of Binary Mixtures of Environmental Estrogens using Vitellogenin Induction in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Environnemental Sciences and Technology*, 35 (12) : 2476-2481.

Truss M., Beato M., 1993 Steroid hormone receptors : interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors, *Endocrine Reviews*, 14 : 459-479.

Tyler C.R., Routledge, E.J., 1998, Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appl Chem*. 70(9):1795-1804.

Vader J.S, Van Ginkel C.G., Sperlinga F. M. G. M., de Jonga J., de Boera W., de Graafa J.S., Van der Most M. and Stokmana P.G.W., 2000, Degradation of ethinyl estradiol by nitrifying activated sludge, *Chemospher*, 41(8) : 1239-1243.

Van Aerle R., Nolan M., Jobling S., Christiansen L.B., Sumpter J.P., and Tayler C.R., 2001, Sexual disruption in e second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in united kingdom freshwaters. *Environmental Toxicology and chemistry*, 20 (12): 2841-2847.

Vanparys C., Maras M., Lenjou M., Robbens J., Van Beckstaele D., Blust R., De Coen W., 2006, Flow cytometric cell cycle analysis allows for rapid screening of estrogenicity in MCF-7 breast cancer cells, *Toxicology in vitro*, 20 : 1238-1248.

Vorapongsathorn T., Tarjaroenkul S., Viwatwongkasem C., 2004, A comparison of type I error and power of Bartlett's test, Levene's test and Cochran's test under violation of assumptions, *Songklanakarin Journal Science Technology*, 26(4) : 537-547.

Watson C.S., Bulayeva N.N., Wozniak A.L., Alyea R.A., 2007, Xenoestrogens are potent activators of nongenomic estrogenic responses, *Steroids*, 72, 124-134.

Weihua Z., Saji S., Mäkinen S., Cheng G., Jensen E.V., Warner M., Gustaffson J.A., 2000, Estrogen receptor (ER) , a modulator of ER in the uterus, *PNAS*, 97 (11) : 5936-5941.

Ying G., Kookana R.S., Kumar A., 2007, Fate of estrogens and xenoestrogens in four sewage treatment plants with different technologies, *Environmental Technology and Chemistry*, 27 : 87-94.

Zacharewski T., 1997, In vitro bioassays for assessing estrogenic substances, *Environmental science and technology*, 31(3) : 613-623.

- ANNEXES -

Annexe 1 : extraits de « l'Arrêté du Gouvernement Wallon relatif au traitement des eaux urbaines résiduaires » du 25 février 1999 sur base de la directive européenne 91/271/CEE.

Annexe I

Conditions sectorielles d'émission relatives aux rejets des stations d'épuration collective provenant d'agglomérations dont la charge polluante est supérieure à 2.000 EH.

La valeur de la concentration ou le pourcentage de réduction seront appliqués.

Paramètres	Concentration	Pourcentage minimal de réduction (1)	Méthode de mesure de référence (2)
Demande biochimique en oxygène (DBO5 à 20 °C) sans nitrification (3)	25 mg/l (2)	70 — 90	Echantillon homogénéisé, non filtré, non décanté. Détermination de l'oxygène dissous avant et après une incubation de 5 jours à 20 °C ± 1 °C dans l'obscurité complète. Addition d'un inhibiteur de nitrification.
Demande chimique en oxygène (DCO)	125 mg/l (2)	75	Echantillon homogénéisé, non filtré, non décanté. Bichromate de potassium.
Total des matières solides en suspension	35 mg/l (4)	90 (4)	- Filtration d'un échantillon représentatif sur une membrane de 0,45µm séchage à 105 °C et pesée. - Centrifugation d'un échantillon représentatif (pendant 5 minutes au moins avec accélération moyenne de 2.800 à 3.200 g) séchage à 105 °C pesée.

Notes

(1) Réduction par rapport à l'entrée.

(2) Les analyses relatives aux rejets provenant du lagunage doivent être effectuées sur des échantillons filtrés : toutefois, la concentration du total des matières solides en suspension dans les échantillons d'eau non filtrée ne doit pas dépasser 150 mg/l.

(3) Ce paramètre peut être remplacé par un autre : carbone organique total (COT) ou demande totale en oxygène (DTO) si une relation peut être établie entre la DBO5 et le paramètre de substitution.

(4) Cette exigence est facultative.

Vu pour être annexé à l'arrêté du Gouvernement wallon du 25 février 1999 relatif au traitement des eaux urbaines résiduaires.

Namur, le 25 février 1999.

Annexe III

Conditions sectorielles d'émission relatives aux rejets d'eaux urbaines résiduaires provenant d'agglomérations dont la charge polluante est égale ou inférieure à 2.000 EH.

La valeur de la concentration moyenne ou encore le pourcentage de réduction seront appliqués.

Le débit d'eau à traiter en temps de pluie est limité à deux fois le débit d'eaux usées en temps sec, calculé sur base de 180 l/H et par jour.

Paramètres	Concentration	Pourcentage minimal de réduction (1)	Méthode de mesure de référence (2)
Demande biochimique en oxygène (DBO5 à 20 °C) sans nitrification (3)	30 mg/l (2) (5) ou 50 mg/l (2) (6)	70	Echantillon homogénéisé, non filtré, non décanté Détermination de l'oxygène dissous avant et après une incubation de 5 jours à 20 °C ± 1 °C dans l'obscurité complète. Addition d'un inhibiteur de nitrification
Demande chimique en oxygène (DCO)	125 mg/l (2) (5) 190 mg/l (2) (6)	75	Echantillon homogénéisé, non filtré, non décanté. Bichromate de potassium

- ANNEXES -

Paramètres	Concentration	Pourcentage minimal de réduction (1)	Méthode de mesure de référence (2)
Total des matières solides en suspension	60 mg/l (4)	90 (4)	- Filtration d'un échantillon représentatif sur une membrane de 0,45µm séchage à 105 °C et pesée. - Centrifugation d'un échantillon représentatif (pendant 5 minutes au moins avec accélération moyenne de 2.800 à 3.200 g) séchage à 105 °C pesée.

Notes

(1) Réduction par rapport à l'entrée.

(2) Les analyses relatives aux rejets provenant du lagunage doivent être effectuées sur des échantillons filtrés : toutefois, la concentration du total des matières solides en suspension dans les échantillons d'eau non filtrée ne doit pas dépasser 150 mg/l.

(3) Ce paramètre peut être remplacé par un autre : carbone organique total (COT) ou demande totale en oxygène (DTO) si une relation peut être établie entre la DBO5 et le paramètre de substitution.

(4) Cette exigence est facultative.

(5) En moyenne sur 24 heures.

(6) Maximum.

Vu pour être annexé à l'arrêté du Gouvernement wallon du 25 février 1999 relatif au traitement des eaux urbaines résiduaires.

Namur, le 25 février 1999.

Le Ministre-Président du Gouvernement wallon,
chargé de l'Economie, du Commerce extérieur, des P.M.E. et du Tourisme,

R. COLLIGNON

Le Ministre de l'Environnement, des Ressources naturelles et de l'Agriculture,
G. LUTGEN

Annexe 2 : complément d'information sur le traitement du C, de l'N et du P dans les STP.

➤ Traitement du carbone

Il est assuré par des bactéries hétérotrophes aérobies strictes. 2 processus sont impliqués dans l'élimination de la charge carbonée : l'adsorption des colloïdes et particules sur la paroi bactérienne et l'absorption des composés solubles et hydrolysés dans la biomasse bactérienne. Des bactéries hétérotrophes aérobies facultatives permettent la transformation de la matière organique en acides gras volatiles (AGV) par fermentation en conditions d'anaérobiose.

➤ Traitement de l'azote

Le traitement de l'azote est assuré en 2 phases. La première phase, la nitrification, consiste en la transformation de l'ammonium en nitrate. Elle est assurée par des bactéries autotrophes aérobies. La seconde phase, la dénitrification, est la transformation des nitrates en azote gazeux et est assurée par une biomasse hétérotrophe aérobie facultative. Ce dernier processus n'est donc possible qu'en condition d'anoxie et en présence de carbone.

➤ Traitement du phosphore

Le *traitement biologique* du phosphore est basé sur un processus de suraccumulation du phosphore par des bactéries déphosphatantes aérobies. Il se déroule également en 2 phases (**Figure a**). En condition d'anaérobiose, les bactéries synthétisent un produit de réserve, les PHA (poly- β -alcanoates), à partir des AGV provenant de la dégradation du carbone par fermentation. Il en résulte un relargage de phosphate dans le milieu externe. En condition d'aérobiose, les bactéries oxydent les PHA et la matière organique des eaux usées, régénèrent leurs stocks de polyphosphates et croissent. Il y a donc une réabsorption du phosphate du milieu externe. Il y a suraccumulation du P (et donc élimination des eaux usées) lorsque la réabsorption est supérieure au relargage (Deronzier et Choubert, 2004).

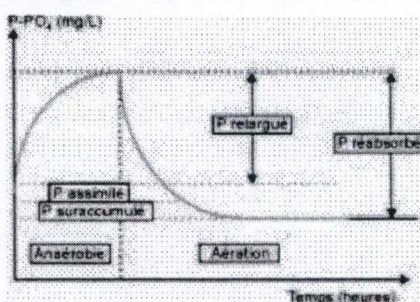


Figure a : courbe de relargage et de réabsorption du phosphore.

Le *traitement physico-chimique* du phosphore consiste à précipiter le phosphore dissous sous forme particulaire par l'apport de réactifs physico-chimiques (Deronzier et Choubert, 2004). Ce changement de phase est possible grâce à un contact avec des cations (Ca^{++} , Mg^{++} ou Fe^{+++}) présents dans les eaux usées (précipitation naturelle) ou ajoutés dans la station par des réactifs à base de fer, d'aluminium ou de chaux (précipitation forcée). Trois mécanismes sont impliqués dans ce processus : la précipitation chimique de complexes hydroxo-métalliques, l'adsorption sélective d'espèces phosphorées dissoutes sur la surface de complexes déjà précipités et la floculation de matières colloïdale finement dispersées.

Annexe 3 : principe, avantages et inconvénients des tests *in vitro* utilisés dans la mesure du potentiel oestrogénique de substances individuelles ou d'échantillons complexes.

Tests de liaison aux récepteurs oestrogéniques (ER-binding assay)

Ce test, développé par Kuiper *et al.* (1997), est le seul test *in vitro* basé sur du matériel biologique isolé, les récepteurs oestrogéniques (ER) α et β (Gutendorf, 2001). Le principe met en jeu une compétition de ligands pour le récepteur oestrogénique. Il quantifie la capacité d'un composé testé à concurrencer l'E2 marqué radioactivement ($^3\text{HE2}$) pour la liaison au ER. L'échantillon est ajouté avec un excès d'E2 marqué radioactivement sur des ER isolés, après quoi la quantité de radioactivité non liée est mesurée. Au plus la concentration du compétiteur est élevée dans l'échantillon, au plus $^3\text{HE2}$ est déplacé de son récepteur, et donc la radioactivité mesurée sera élevée. Les résultats sont exprimés en IC50 ou en « affinité de liaison relative » (ratio entre l'IC50 du composé testé et l'IC50 du E2 non marqué) (Soto *et al.* 1998).

L'avantage de ce test est qu'il est rapide. Néanmoins, il est significativement moins sensible que les autres tests *in vitro* et ne permet pas de différencier le ligand comme agoniste ou antagoniste. De plus, la technique est difficilement automatisable et nécessite un équipement de laboratoire spécialisé pour l'utilisation de substance radioactive. Enfin, la liaison d'une substance au ER indique uniquement qu'elle peut agir comme xénoestrogène, mais ne peut prédire les réponses plus complexes *in vitro* et *in vivo* (Kinnberg, 2003).

Tests de prolifération cellulaire

E-screen (MCF-7) → en introduction bibliographique

Culture d'hépatocytes de poissons

Des cellules de foie de poisson isolées sont capables de produire de la VTG de façon dose-dépendante sous l'action de composés oestrogéniques. C'est pourquoi des tests *in vitro* ont été mis au point à partir de ces cellules pour évaluer l'oestrogénicité de composés environnementaux, l'induction du gène de la VTG étant utilisée comme biomarqueur. Différentes espèces ont servi de donneur, parmi lesquelles on retrouve la carpe (*Cyprinus carpio*), le poisson-chat brun (*Ameiurus nebulosus*) et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Smeets *et al.*, 1999 ; Petit *et al.*, 1997 ; Toomey *et al.*, 1999). Les réponses sont identiques selon que l'on travaille sur cellules provenant de femelles ou de mâles. Néanmoins l'utilisation de cellules mâles est avantageuse car leur sécrétion basale de VTG est très faible mais peut être fortement induite. L'avantage majeur de ce test est qu'il prend en compte le phénomène de biotransformation. Ainsi, ce test mesure l'activité oestrogénique des xénoestrogènes et celle de leurs métabolites (Smeets *et al.*, 1999). D'autre part, ce test est également très spécifique et permet de détecter l'activité anti-oestrogénique d'un composé.

Tests de gènes rapporteurs

Ces tests mesurent l'activité transcriptionnelle et traductionnelle dépendante de la liaison au ER. Ils se basent sur la capacité d'un composé à stimuler l'activité transcriptionnelle dépendante du ER. Ces tests sont réalisés sur base de cellules cancéreuses humaines (Pons *et al.* 1990) ou de cellules de levures transgéniques (Routledge and Sumpter, 1997). Les cellules sont transfectées avec des éléments de réponses oestrogéniques (ERE) liés à un gène rapporteur. Les substances oestrogéniques contenues dans l'échantillon qui pénètrent dans la cellule se lient aux ER qui devient alors actif et se lient aux ERE. Ces liaisons initient l'expression du gène rapporteur et dès lors la synthèse de l'enzyme. Le substrat adéquat de l'enzyme, présent dans le milieu d'incubation, est alors métabolisé, résultant dans la synthèse d'un composé facilement détectable. L'expression du gène rapporteur est le résultat d'une cascade moléculaire d'événements impliqués dans l'activation du récepteur, il fournit dès lors une vision plus intégrée de l'activité oestrogénique d'un composé (Kinnberg, 2003).

Test basé sur cellules de levure : YES

Ce test in vitro a été décrit par Routledge and Sumpter (1997). Il se base sur des cellules de levure (*Saccharomyces cerevisiae*), transfectées avec un plasmide contenant le ERE qui contrôle le gène rapporteur *lac-Z* codant pour la β -galactosidase. Ces cellules sont également transfectées avec la séquence d'ADN codant pour les ER (humain ou poisson), étant donné que la levure ne possède pas d'ER endogène. La β -galactosidase est sécrétée dans le milieu de culture, où son substrat, le chlorophénol red- β -D-galactopyranoside, est présent. L'activité métabolique de l'enzyme induit un changement de couleur (de jaune à rouge) du milieu de culture. L'intensité de la coloration peut être mesurée par spectrophotométrie (540nm). Ce test permet également de déterminer si un composé présente un effet anti-oestrogénique. Dans ce cas E2 est ajouté au milieu de culture à une concentration qui produit une réponse maximale. On peut dès lors mesurer la capacité d'un composé à inhiber le changement de couleur (Routledge and Sumpter, 1997).

Les avantages de ce test sont sa simplicité (le produit du gène rapporteur est sécrété dans le milieu de culture et dès lors la lyse cellulaire n'est pas nécessaire), sa rapidité, sa facilité d'utilisation et sa robustesse (faible sensibilité aux effets cytotoxiques) (Coldham, 1997). Un autre avantage est qu'il peut mesurer un effet d'additivité, dû à la présence de différents EDC dans l'échantillon, même si la concentration individuelle de chaque composé est sous la limite de concentration effective (Aerni *et al.*, 2003). Ce test est limité par le fait que les cellules de levure présentent une paroi cellulaire et des mécanismes de transport actifs différents de ceux qui sont trouvés dans les cellules de mammifères (Legler *et al.*, 2002).

Test basé sur cellules de mammifères : ER-Calux

Dans ce test basé sur cellules humaines cancéreuse du sein (T47D), le gène rapporteur code pour la luciférase. On ajoute au milieu de culture la luciférine ce qui conduit à la production d'un composé lumineux détectable par luminomètre (Legler *et al.*, 1999). L'activité de transcription oestrogènes-dépendante d'un composé testé est directement proportionnelle à l'activité luciférase mesurée dans le lysat cellulaire des cellules traitées. Le principal inconvénient de cette technique comparée au test sur cellule de levure est que la culture de cellules humaines est plus difficile et coûteuse, et que les cellules sont plus sensibles aux effets cytotoxiques. De plus, il est capable de détecter les effets anti-

- ANNEXES -

oestrogéniques ce qui peut mener à une sous-estimation du potentiel oestrogénique d'un échantillon complexe. Son avantage est sa plus grande sensibilité (tableau x), qui permet de détecter des composés oestrogéniques présents à de plus faibles concentrations (Kinnberg, 2003). En effet, cette méthode est 20 fois plus sensible à E2 que le test YES (Legler *et al.*, 2002).

Il existe des variantes à ce test parmi lesquelles on retrouve le test MVLN, basé sur le même principe que le CALUX mais utilisant une autre lignée cellulaire dérivée des MCF-7 (MVLN), ainsi que les tests basés sur des récepteurs chimériques. Par exemple le test E2, qui consiste en un récepteur chimérique (récepteur contenant un domaine de liaison du ER et le domaine de liaison du facteur de transcription de la levure Gal4) et un gène rapporteur codant pour la luciférase régulé par Gal4. Les cellules transfectées par cette construction peuvent être des MCF-7 ou des HeLa. Dans ce dernier cas, on parlera de cellules HGELN (Gutendorf and Westendorf, 2001).

Annexe 4 : Protocole de culture des cellules MCF-7, adaptation de Vanparys et al., 2007

- Les cellules de la lignée MCF-7 sont mises en culture dans des plaques à 6 puits avec un milieu de croissance standard et à une densité de ± 100.000 cellules par puit (1mF/2.6).
 - *Milieu de croissance*: DMEM (Dulbecco's Minimum Essential Medium) avec du phénol rouge, supplémenté avec 100 mM de pyruvate de sodium, 2 mM de L-glutamine, 1% d'acides amines non-essentiels, 50 IU/ml de pénicilline, 50 mg/l de streptomycine et 5% de serum bovin foetal inactivé.
- Incubation toute la nuit.
- Remplacement du milieu de croissance par le milieu d'exposition. Nettoyer minutieusement avec du PBS⁺ (avec Ca⁺⁺/Mg⁺⁺).
 - *Milieu d'exposition*: DMEM sans phénol rouge, avec suppléments et 5% de CDFBS (charcoal dextran treated foetal bovine serum). Les cellules MCF-7 arrêtent de croître dans des conditions avec peu de stéroïdes.
- Incubation pendant 72h pour synchroniser les cellules dans la phase G₀/G₁ du cycle cellulaire.
- Changement du milieu de culture et exposition des cellules aux échantillons.
- Incubation pendant 24h
- Les cellules sont récoltées par une trypsinisation (2ml/puit).
- La trypsine est ensuite neutralisée avec 1,5 ml de milieu de croissance.
- Centrifuger 5 minutes à 1500 rpm, à température ambiante.
- Resuspendre les cellules dans 1 ml de PBS⁺
- Centrifuger 5 minutes à 1500 rpm, à température ambiante.
- Enlever le PBS
- Resuspendre les cellules dans 0,5 ml de tampon coloré à l'iodure de propidium (IP) et incubé toute la nuit à 4°C dans le noir.
 - Tampon IP : 0,1% Triton X-100, 0,1% citrate de sodium, 50 µg/ml d'iodure de propidium (IP) et 10 µg/ml de RNaseA dans du PBS⁺.
- Analyse des échantillons par cytométrie de flux.
 - Le cytomètre de flux est préchauffé pendant 30 minutes.
 - Ouvrir BD FACS Diva
 - La fluorescence IP est mesurée avec un filtre 575/25 nm (fluorescence orange-rouge).
 - On recueille pour chaque mesure 10 000 à 20 000 événements cellulaires. Les doublets et agrégats sont éliminés.

Annexe 5 : protocole d'histologie

Après prélèvement, les gonades sont fixées dans du bouin (75% d'acide picrique, 20% de formol et 5% d'acide acétique glacial). Minimum 24 heures, maximum 2 semaines.

Suit alors un rinçage dans une solution de méthanol à 70% (2 à 3 bains).

On place alors les échantillons dans de petites cassettes (*attention ne jamais les laisser se dessécher. Il faut donc les placer dans une cuve contenant du méthanol en attendant la déshydratation automatique*).

Les gonades sont imprégnées à la paraffine, selon les étapes décrites dans le tableau ci-dessous (réalisées automatiquement).

Bains	Durée	Nombre de bains	Action
Méthanol pur	1h15	3	Déshydratation complète des tissus.
Toluol pur	1h15	3	Remplacement de l'eau par un solvant de la paraffine.
Paraffine liquide (57°C)	1h15	3	Remplacement du toluol par de la paraffine. Imprégnation complète des tissus. Les gonades seront dès lors solides à T° ambiante et manipulables pour la coupe.

Ensuite, les gonades sont mises dans des blocs de paraffine et sont coupées à l'aide d'un microtome Leica RM2145.

*Les **ovaires** sont coupés à **4µm**.

*Les **testicules** sont coupés à **3µm**.

Etallement sur la lame « Super Frost » :

1. Placer (en parallèle, avec la partie colorée vers la droite) les lames (numérotées au crayon) sur le support en métal.
2. Ajouter 4 à 5 gouttes d'eau paraffinée filtrée avec un filtre 113 (250 ml d'H₂O distillée + 1/3 de gélatine).
3. Placer les tissus.
4. Placer quelque temps sur la plaque chauffante à 54°C.
5. Laisser sécher verticalement (> 1 minute).
6. Buvarder
7. Replacer sur la plaque chauffante à 54°C. PAS TROP LONGTEMPS.
8. Placer ensuite dans l'étuve « soufflante » à 48°C pendant 1 heure au minimum .

Les coupes sont ainsi prêtes à être colorées.

- ANNEXES -

*Les ovaires et les testicules sont colorés avec un HES.

Les différentes étapes, dans l'ordre, d'une coloration HES classique sont reprises dans le tableau ci-dessous. Chaque bain dure 2 minutes.

Bains	Nombre de bains	Action
Toluol pur	2	Déparaffiner
Méthanol absolu	2	Déparaffiner
Méthanol 70%	1	Déparaffiner
Eau courante	3	Blanchir
Hémalun	3	
Eau courante	1	
Ethanol/HCl (4 pour 1000 d'HCl fumant)	1	Différencier
Eau courante	2	Bleuir
Erythrosine	2	
Eau courante	1	Rincer
Ethanol 70%	1	Déshydrater
Isopropanol	3	Déshydrater
Safran	2	
Isopropanol	2	Déshydrater
Toluol	2	Déshydrater

Nettoyer les lames du surplus de colorant (attention de ne pas les laisser sécher). Monter la préparation au DPX, en évitant les bulles d'air. Poser ensuite les lames sur un support plane avec un petits poids sur la lame couvre-objet pendant minimum 24h. Le surplus de DPX est enlevé après séchage et les lames sont nettoyées au méthanol.

Annexe 6: protocole d'extraction de l'ARN, à l'aide du kit Absolutely RNA® Miniprep Kit, Stratagene, La Jolla, Canada.

Matériel

- Lysis Buffer
- @mercaptoéthanol (14.2 M)
- RNase free DNase I
- High-Salt Wash Buffer (1,67x)
- Low-Salt Wash Buffer (5 x)
- Elution Buffer
- Prefilter Spin cups and 2-ml receptacle tubes
- DNase digestion Buffer
- RNA Binding Spin Cups and 2-ml receptacle tubes
- 1,5 ml microcentrifuge tubes
- Homogénéiseur stérile
- Ethanol 70%
- Tips à filtres
- Eppendorfs stériles
- Azote liquide

Méthodes

A. Préparation du tissu

- Mettre le foie conservé à -80°C dans l'azote liquide pour pouvoir le fracturer et en prélever une portion de 25-40 mg.
- Ajouter 600 µl de Lysis Buffer et 4,2 µl de @mercaptoéthanol. Pour d'autres masses de foie, consulter le tableau 6.
- Homogénéiser l'échantillon à l'aide d'une tige stérile.

B. Isolation de l'ARN

- Transférer 600 µl d'homogénat sur un Préfilter Spin Cup, monté sur le portoir de 2 ml adéquat, et centrifuger à 13 000 x g (ALC microcentrifugette 4214) pendant 5 min à température ambiante.
- Garder l'éluat et y ajouter un volume équivalent d'éthanol 70% et vortexer pendant 5 secondes.
- Transférer 600 µl de cette mixture dans un RNA Binding Spin Cup placé dans un nouveau portoir de 2 ml et centrifuger à 13 000 x g pendant 30 sec à température ambiante. Jeter l'éluat et recommencer cette étape avec le reste de l'échantillon.
- Ajouter 600 µl de Low-Salt Wash Buffer sur le filtre et centrifuger à 13 000 x g pendant 30 sec à température ambiante. Jeter le filtrat et centrifuger à 13 000 x g pendant 2 min à température ambiante.
- Mélanger délicatement 50 µl de DNase Digestion Buffer avec 5 µl de RNase free DNase I et ajouter la solution directement sur la matrice du filtre. Laisser Incuber l'échantillon pendant 15 min à 37°C.
- Ajouter 600 µl de High-Salt Wash Buffer sur le filtre et centrifuger à 13 000 x g pendant 30 sec à température ambiante. Jeter l'éluat.
- Ajouter 600 µl de Low-Salt Wash Buffer sur le filtre et centrifuger à 13 000 x g pendant 30 sec à température ambiante.
- Ajouter 300 µl de Low-Salt Wash Buffer sur le filtre et centrifuger à 13 000 x g pendant 2 min à température ambiante.
- Transférer le filtre dans un 1,5 ml microcentrifuge tubes et y ajouter 50 µl d'Elution Buffer directement au centre du filtre.
- Laisser incuber 2 min à température ambiante puis centrifuger à 13 000 x g pendant 1 min à température ambiante.
- L'ARN se trouve dans l'éluat. Il peut être conservé à -80°C.

REM : les extraits d'ARN totaux sont traités avec une DNase afin d'éviter toute contamination par de l'ADN génomique.

Annexe 7 : transcription inverse à l'aide du kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, Burlington Canada).

Matériel

- Oligo dT (0,5 µg/µl)
- dH₂O RNase free
- Tampon (5x) reaction buffer (Fermentas)
- RevertAid H Minus M-MuLVReverse Transcriptase
- dNTP mix (10 mM)
- RiboLock Ribonuclease inhibitor
- DEPC-treated water
- Microtubes RNase free

Méthodes

- Mélanger l'ARN à 1 µl Oligo dT (0,5 µg/µl) et centrifuger brièvement. Une dilution à de l'eau stérile est nécessaire pour partir de 4 µg d'ARN total pour un mélange d'un total de 11 µl.
- Incuber le mélange 5 min à 70°C.
- Refroidir sur glace et centrifuger brièvement.
- Préparation du mix de réaction :
 - 4 µl de Reaction Buffer
 - 2 µl de dNTP mix (10 mM)
 - 1 µl de RiboLock Ribonuclease inhibitor
- Ajouter 7 µl de mix de réaction par tube et centrifuger brièvement.
- Incuber 5 min à 37°C.
- Ajouter 1 µl de Reverse Transcriptase, mélanger délicatement à l'aide d'un tips.
- Incuber 1h00 à 42°C.
- Stopper la réaction en incubant 15 min à 70°C .
- Ajouter 1 µl de RNase H (2U/µl) et centrifuger brièvement.
- Incuber 20 min à 37°C et centrifuger brièvement.
- Stocker les cDNA formés à -20°C.

Annexe 8 : valeurs brutes du test du bloquant

STEP	Moyennes sur triplicats				Normal
	G0G1	CV	G2M	S	S
Rochefort_I	89,49	2,68	5,68	4,82	36,09
Rochefort_E	88,42	2,88	5,65	5,94	39,52
La Roche_I	88,68	2,86	5,67	5,66	37,73
La Roche_E	91,12	2,82	3,67	5,21	37,38
Bertrix_I	87,23	2,93	6,17	6,60	39,78
Bertrix_E	87,42	2,63	5,57	7,01	43,49
Ciney_I	90,87	3,44	5,00	4,13	40,79
Ciney_E	89,54	2,94	4,95	5,51	25,61
Bastogne_I	88,20	2,86	5,65	6,14	40,24
Bastogne_E	74,60	4,38	6,25	19,16	41,94
Plombière_I	86,96	2,60	5,90	7,14	39,31
Plombière_E	88,83	2,39	5,78	5,40	19,36
Malmedy_I	86,01	2,60	6,34	7,65	38,17
Malmedy_E	88,92	2,61	5,87	5,21	38,93
Marche_I	89,96	2,69	6,10	3,94	34,43
Marche_E	50,64	2,78	7,23	42,13	42,64
Morlanwelz_I	87,89	2,58	6,07	6,03	38,19
Morlanwelz_E	87,07	2,65	6,23	6,70	34,12
Trivières_I	88,98	2,61	5,91	5,11	36,05
Trivières_E	88,60	2,62	5,54	5,87	30,63

- ANNEXES -

Annexe 9 : Valeurs brutes du test MCF-7

		Mean			Sdev					
		G0G1	CV	G2M	S	G0G1	CV	G2M	S	
SC	1	88,97	2,79	4,66	7,52	2,64	0,19	0,61	1,68	
Acetonitril-bl	2	85,96	2,67	5,18	8,06	0,92	0,02	0,39	0,82	
E2	1	42,90	3,14	11,37	45,73	0,68	0,29	0,56	0,77	
	2	42,72	3,56	9,62	47,66	0,72	0,71	0,55	0,81	
	3	50,33	3,17	7,88	41,99	1,15	0,02	0,49	0,71	
	4	75,43	3,22	6,44	18,12	1,17	0,21	0,20	1,38	
	5									
	6									
Rochefort_I	1	64,89	3,20	6,97	28,13	1,10	0,24	0,23	0,97	
	2	54,98	3,16	8,93	36,09	0,73	0,04	0,40	1,09	
	3	51,07	3,20	9,04	39,89	0,91	0,06	0,21	1,08	
	4	63,21	3,44	6,30	29,13	2,58	0,18	0,22	0,68	
	5	79,63	3,08	5,19	15,18	1,44	0,03	0,45	1,03	
	6	83,73	3,27	5,98	10,29	1,09	0,20	0,27	0,94	
Rochefort_O	1	50,33	3,28	9,21	40,47	0,92	0,21	0,89	0,33	
	2	52,74	3,11	8,02	39,52	1,84	0,03	1,75	1,63	
	3									
	4	79,88	2,94	5,73	14,59	1,26	0,04	0,43	1,39	
	5									
	6									
La Roche_I	1	87,18	2,98	5,87	7,14	0,24	0,03	0,22	0,45	
	2	59,06	2,95	6,97	35,20	2,47	0,03	0,61	1,32	
	3	53,80	2,98	8,48	37,73	0,76	0,05	0,11	0,66	
	4	66,20	2,91	6,89	27,11	0,79	0,03	0,25	0,66	
	5	82,74	2,84	5,91	11,35	1,00	0,07	0,27	0,79	
	6	85,97	2,83	5,80	8,23	0,48	0,04	0,14	0,60	
La Roche_O	1	84,95	2,72	5,80	9,25	0,60	0,06	0,32	0,68	
	2	60,59	3,24	6,15	33,26	1,95	0,21	1,09	3,05	
	3	60,13	3,25	5,36	34,51	1,07	0,02	0,27	1,09	
	4	58,91	3,33	5,32	35,77	1,81	0,03	0,42	1,64	
	5	55,37	3,19	5,75	38,88	4,37	0,17	0,44	4,20	
	6	58,23	3,27	6,21	35,56	0,41	0,05	0,52	0,55	
Bertrix_I	1	65,78	3,16	4,89	29,33	2,72	0,06	0,25	2,48	
	2	56,09	2,89	8,16	35,75	1,14	0,04	0,46	0,86	
	3	52,40	2,83	7,82	39,78	1,53	0,05	0,31	1,24	
	4	50,16	2,85	7,95	41,89	0,56	0,13	0,15	0,70	
	5	57,75	2,77	6,03	34,22	1,39	0,03	0,98	1,01	
	6	75,08	2,77	6,07	18,85	0,92	0,03	0,07	0,85	
Bertrix_O	1	86,20	2,88	4,75	9,05	2,17	0,06	0,64	1,67	
	2	48,97	2,98	10,98	40,05	1,30	0,08	0,32	1,10	
	3	48,60	3,07	7,92	43,49	1,24	0,06	1,02	0,67	
	4	60,33	2,99	6,98	32,69	2,26	0,02	0,98	1,30	
	5	74,73	2,90	6,36	18,91	0,25	0,04	0,09	0,32	
	6	80,48	2,93	6,72	12,81	1,52	0,03	0,61	1,22	
	6	85,66	2,93	5,32	9,02	2,09	0,05	0,70	1,67	
Marche_I	1	68,07	2,91	7,86	24,07	0,73	0,03	0,24	0,99	
	2	58,61	2,95	6,96	34,43	1,83	0,02	1,19	0,91	
	3	54,35	2,95	7,36	38,29	1,81	0,05	0,56	1,44	
	4	56,07	2,87	8,53	35,40	0,71	0,01	0,82	0,89	
	5	70,52	2,77	6,96	23,96	2,61	0,08	0,15	0,36	
	6	83,88	2,75	5,97	19,15	0,67	0,04	0,52	0,72	
Marche_O	1	51,05	3,89	6,30	42,84	0,95	1,24	0,82	0,74	
	2	56,68	3,03	4,88	38,43	2,07	0,10	0,94	1,21	
	3	59,39	3,09	4,99	35,62	2,01	0,07	1,30	0,86	
	4	61,78	2,96	5,90	32,32	0,80	0,12	0,44	1,22	
	5	80,99	3,26	5,48	13,53	1,79	0,16	0,50	1,33	
	6	89,14	3,13	4,17	6,88	0,88	0,17	0,29	0,64	
Morlanwelz_I	1	59,88	2,72	7,16	33,96	2,02	0,05	0,90	1,73	
	2	52,81	2,77	9,01	38,19	1,44	0,06	0,57	0,89	
	3	62,18	2,85	6,83	30,99	1,16	0,10	0,41	1,16	
	4	80,45	2,72	5,96	13,59	1,33	0,05	0,35	1,14	
	5	86,95	2,73	5,67	7,38	1,52	0,06	0,81	0,83	
	6	96,62	2,68	5,77	7,60	0,55	0,13	0,37	0,21	
Morlanwelz_O	1	51,88	2,77	8,78	38,61	1,18	0,03	0,66	1,67	
	2	59,19	2,78	6,68	34,12	2,25	0,03	0,88	1,37	
	3	74,39	2,74	6,10	19,51	1,21	0,01	0,54	0,70	
	4	82,14	2,58	6,22	11,84	1,19	0,20	0,42	1,13	
	5	75,55	2,71	8,02	16,43	0,92	0,03	0,89	0,96	
	6	93,81	2,70	6,34	10,05	2,37	0,03	0,67	1,95	
Trivières_I	1	57,08	2,66	8,19	34,73	1,31	0,20	0,75	0,56	
	2	56,58	2,56	7,37	36,05	2,14	0,02	0,65	1,70	
	3	61,46	2,99	7,21	31,32	2,45	0,11	0,59	1,91	
	4	71,39	2,85	6,99	21,62	0,51	0,02	0,21	0,72	
	5	81,90	2,82	6,47	11,63	0,71	0,03	0,23	0,54	
	6	98,85	2,77	6,13	7,21	0,89	0,04	0,59	0,19	
Trivières_O	1	66,00	2,75	6,37	27,63	1,43	0,04	0,64	0,91	
	2	62,33	2,66	7,04	30,63	1,53	0,08	0,41	1,12	
	3	72,20	2,56	7,90	20,80	0,78	0,06	0,38	0,58	
	4	84,36	2,58	6,11	9,52	1,14	0,10	0,32	0,85	
	5	85,80	2,50	6,40	7,80	1,45	0,03	0,71	0,90	
	6	84,11	2,61	6,35	9,54	0,71	0,06	0,19	0,60	

- ANNEXES -

Ciney_I	1	80,29	3,02	6,54	33,17	2,05	0,08	0,49	1,56	2,44
	2	50,20	3,09	9,02	40,79	0,43	0,07	0,47	0,61	0,37
	3	55,81	2,94	7,71	36,68	0,70	0,05	0,09	0,63	0,39
	4	69,94	2,97	6,02	24,04	1,22	0,34	0,25	1,00	1,00
	5	82,79	2,83	5,79	11,43	1,07	0,09	0,24	1,26	1,59
	6	84,26	2,81	5,96	9,78	0,48	0,06	0,09	0,39	0,15
Ciney_O	1	67,89	2,85	8,25	23,86	0,18	0,07	0,59	0,52	0,27
	2	87,32	2,89	7,07	25,61	0,87	0,03	0,60	1,47	2,17
	3	75,58	2,92	6,53	17,88	1,46	0,05	0,31	1,43	2,03
	4	79,86	2,86	6,74	13,40	1,20	0,14	0,14	1,32	1,75
	5	87,34	2,86	5,58	7,08	1,49	0,23	0,48	1,19	1,40
	6	89,40	3,09	4,63	5,97	0,56	0,16	0,34	0,42	0,18
Bastogne_I	1	67,62	3,10	6,24	26,14	2,24	0,04	0,37	1,91	3,63
	2	51,93	3,14	7,89	40,24	0,72	0,06	0,51	0,65	0,43
	3	49,30	3,08	8,94	41,45	0,81	0,05	0,48	0,77	0,60
	4	59,77	2,97	6,87	33,36	1,83	0,03	0,20	1,92	3,69
	5	75,88	3,21	6,37	17,75	0,88	0,14	0,36	0,97	0,95
	6	82,19	2,72	6,21	11,60	0,11	0,02	0,33	0,38	0,14
Bastogne_O	1	52,16	3,11	5,90	41,94	2,25	0,09	0,49	1,85	3,43
	2	48,92	3,14	7,77	43,32	1,45	0,08	1,06	1,28	1,63
	3	52,30	2,83	7,04	40,66	1,45	0,03	0,42	1,25	1,55
	4	61,80	2,81	4,80	33,40	0,79	0,02	0,19	0,93	0,87
	5	71,00	2,91	4,45	24,55	1,59	0,04	0,23	1,38	1,90
	6	76,32	3,49	4,75	18,93	0,25	1,03	0,56	0,81	0,66
Plombière_I	1	53,81	2,96	8,67	37,52	1,60	0,02	0,54	1,44	2,06
	2	53,15	2,95	7,54	30,31	1,37	0,04	0,81	0,84	0,71
	3	57,89	2,93	7,78	34,54	1,82	0,06	0,53	1,67	2,80
	4	70,18	2,91	7,05	22,76	0,47	0,06	0,42	0,24	0,06
	5	78,73	2,88	6,76	14,50	0,82	0,04	0,52	0,30	0,09
	6	85,44	2,92	5,48	9,08	0,72	0,02	0,05	0,71	0,51
Plombière_O	1	61,99	2,80	7,15	30,87	1,40	0,11	0,33	1,13	1,29
	2	73,85	2,90	6,99	19,36	1,36	0,03	0,44	0,96	0,93
	3	83,52	2,91	6,50	9,98	2,01	0,04	0,61	1,66	2,74
	4	86,75	2,92	6,51	6,74	1,22	0,07	0,18	1,07	1,15
	5	87,08	2,97	6,32	6,59	1,53	0,01	0,46	1,08	1,16
	6	85,53	2,87	5,93	8,54	0,44	0,04	0,68	0,27	0,07
Malmedy_I	1	58,56	2,70	8,54	32,90	1,60	0,03	0,34	1,60	2,56
	2	54,59	2,72	7,24	38,17	1,07	0,14	0,46	0,82	0,67
	3	54,70	2,72	7,28	38,02	1,35	0,15	0,41	1,06	1,11
	4	57,24	2,61	8,09	34,67	0,67	0,14	0,17	0,71	0,50
	5	56,97	2,51	8,48	34,55	1,22	0,06	1,06	0,19	0,04
	6	83,32	2,48	8,17	10,51	1,49	0,08	0,57	1,01	1,02
Malmedy_O	1	95,08	2,46	6,96	7,98	0,90	0,02	0,25	0,67	0,45
	2	52,63	2,56	8,44	36,93	1,09	0,14	0,39	0,71	0,50
	3	59,69	2,42	7,95	32,36	0,53	0,05	0,11	0,62	0,38
	4	80,43	2,42	6,18	13,39	0,85	0,12	0,61	0,42	0,18
	5	85,72	2,35	6,32	7,96	0,67	0,06	0,11	0,69	0,47
	6	84,97	2,67	6,59	8,43	0,62	0,59	0,21	0,73	0,54

