

METHODOLOGIE POUR LA VALIDATION DES BIOMARQUEURS DANS UN OBJECTIF D'UTILISATION EN BIOSURVEILLANCE

Mesure de l'intersexualité chez le poisson

Méthodes et technologies innovantes

Novembre 2015

Programme scientifique et technique
Année 2015

Document final

Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2015 dans le cadre du partenariat ONEMA - INERIS 2010, au titre de l'action G3a.

Les auteurs :

Edith CHADILI
INERIS
edith.chadili@ineris.fr

Jean-Marc PORCHER
INERIS
jean-marc.porcher@ineris.fr

Wilfried SANCHEZ
INERIS
wilfried.sanchez@ineris.fr

Référence INERIS : DRC-15-136927-12494A

Vérification du document :
Eric THYBAUD
INERIS
Eric.thybaud@ineris.fr

Les correspondants

Onema : Olivier PERCEVAL

INERIS : Jean-Marc PORCHER, jean-marc.porcher@ineris.fr

Référence du document : J-M. PORCHER - Méthodologie pour la validation des biomarqueurs dans un objectif d'utilisation en biosurveillance. Mesure de l'intersexualité chez le poisson. Méthodes et technologies innovantes. Rapport AQUAREF DRC-15-136927-12494A.

| | |
|---------------------------|--------------------------------|
| Droits d'usage : | <i>Accès libre</i> |
| Couverture géographique : | <i>International</i> |
| Niveau géographique : | <i>National</i> |
| Niveau de lecture : | <i>Professionnels, experts</i> |
| Nature de la ressource : | <i>Document</i> |

Sommaire

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUCTION..... | 5 |
| 2. CAS DE L'INTERSEXUALITÉ CHEZ LE POISSON | 7 |
| 2.1 Synthèse bibliographique | 7 |
| 2.2 Adaptation du protocole standard de validation..... | 9 |
| 3. PROTOCOLE DE VALIDATION..... | 9 |
| 3.1 Etape préalable d'acquisition des connaissances | 9 |
| 3.2 Méthodologies mises en place | 10 |
| 3.2.1 Prélèvements sur le terrain et conservation des échantillons | 10 |
| 3.2.2 Dissections et préparation des coupes histologiques | 10 |
| 3.2.3 Observation et analyse des lames..... | 11 |
| 3.3 Caractérisation du biomarqueurs en conditions de terrain | 14 |
| 4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES | 14 |
| 5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 14 |

Liste des annexes :

ANNEXE I : Préparation des coupes histologiques

1. INTRODUCTION

Depuis plusieurs décennies, de nombreux laboratoires d'écotoxicologie travaillent à l'identification et au développement de biomarqueurs dans un objectif d'utilisation à des fins de surveillance de l'environnement. En effet, ces outils biologiques qui sont définis comme des changements observables ou mesurables à différents niveaux d'organisation biologique (moléculaire, biochimique, physiologique, comportemental) permettant de renseigner sur l'exposition des organismes à un ou plusieurs stress environnementaux et sur les effets de ces derniers (National Research Council 1987; Huggett et al. 1992; Depledge 1993; Timbrell et al. 1994; Lagadic et al. 1997), sont présentés par différents auteurs comme des outils utilisables en complément ou en remplacement des approches chimiques et biocénologiques classiquement utilisées pour la surveillance des milieux aquatiques (Hagger et al., 2006, 2008 ; Sanchez et al., 2009). A ce jour, il existe un nombre important de biomarqueurs qui ont été développés pour renseigner sur l'exposition et les effets de certains polluants ou sur l'état d'une fonction physiologique d'intérêt (e.g. immunité, reproduction...). Si ces outils sont largement utilisés dans des travaux de recherche, force est de constater que leur utilisation dans un contexte de surveillance réglementaire reste sporadique (Sanchez, 2008). Plusieurs raisons sont classiquement mises en avant pour expliquer cela. Outre les questions relatives aux coûts de la surveillance environnementale, le manque de visibilité quant aux outils disponibles et à leur potentiel, la difficulté d'interprétation des données et la quasi absence de normalisation de ces outils figurent parmi les raisons invoquées. Ce même constat a été établi en 2010 lors du séminaire national sur le développement et la validation des biomarqueurs et bioessais pour la surveillance des milieux aquatiques qui avait été organisé par l'INERIS, l'IFREMER et l'ONEMA (INERIS et al., 2010).

Ce séminaire, qui avait rassemblé scientifiques, industriels, gestionnaires de l'environnement et donneurs d'ordres, avait pointé les différences dans l'organisation de la surveillance autour des outils biologiques en milieu marin et en milieu continental. En effet, il existe en milieu marin une structuration importante notamment grâce au Conseil International pour l'Exploitation de la Mer (CIEM) et plus particulièrement au Groupe de Travail sur les effets biologiques des contaminants chimiques qui développe et valide des méthodologies communes pour la mesure des biomarqueurs. Cette structuration a indéniablement contribué à la proposition d'un indicateur basé sur la mesure d'un ensemble de biomarqueurs pour définir le bon état des eaux marines dans le cadre de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM : 2008/56/CE). A contrario, il n'existe pas d'organisation similaire en milieu continental. Aussi, il a été proposé lors de ce séminaire de s'appuyer sur le laboratoire SQUAREF pour développer des actions dans le domaine de la validation des biomarqueurs et plus largement des outils de surveillance basés sur la mesure des effets biologiques (Sanchez et al., 2012).

Suite à cette recommandation, une action spécifique a été mise en place. Dans un premier temps, elle a consisté à définir un cadre conceptuel pour la validation des biomarqueurs (Sanchez, 2012). La stratégie proposée (Figure 1) s'articule autour de 3 étapes incluant :

- i) La validation interne d'une méthode de dosage. Cette étape inclut à la fois le développement d'une méthode de dosage adaptée au paramètre considéré puis sa validation reposant sur la détermination des limites de détection et de quantification, des zones de linéarité, des effets de matrice et des coefficients de variation intra et inter-essais (Caporal-Gautier, *et al.*, 1992a; b).

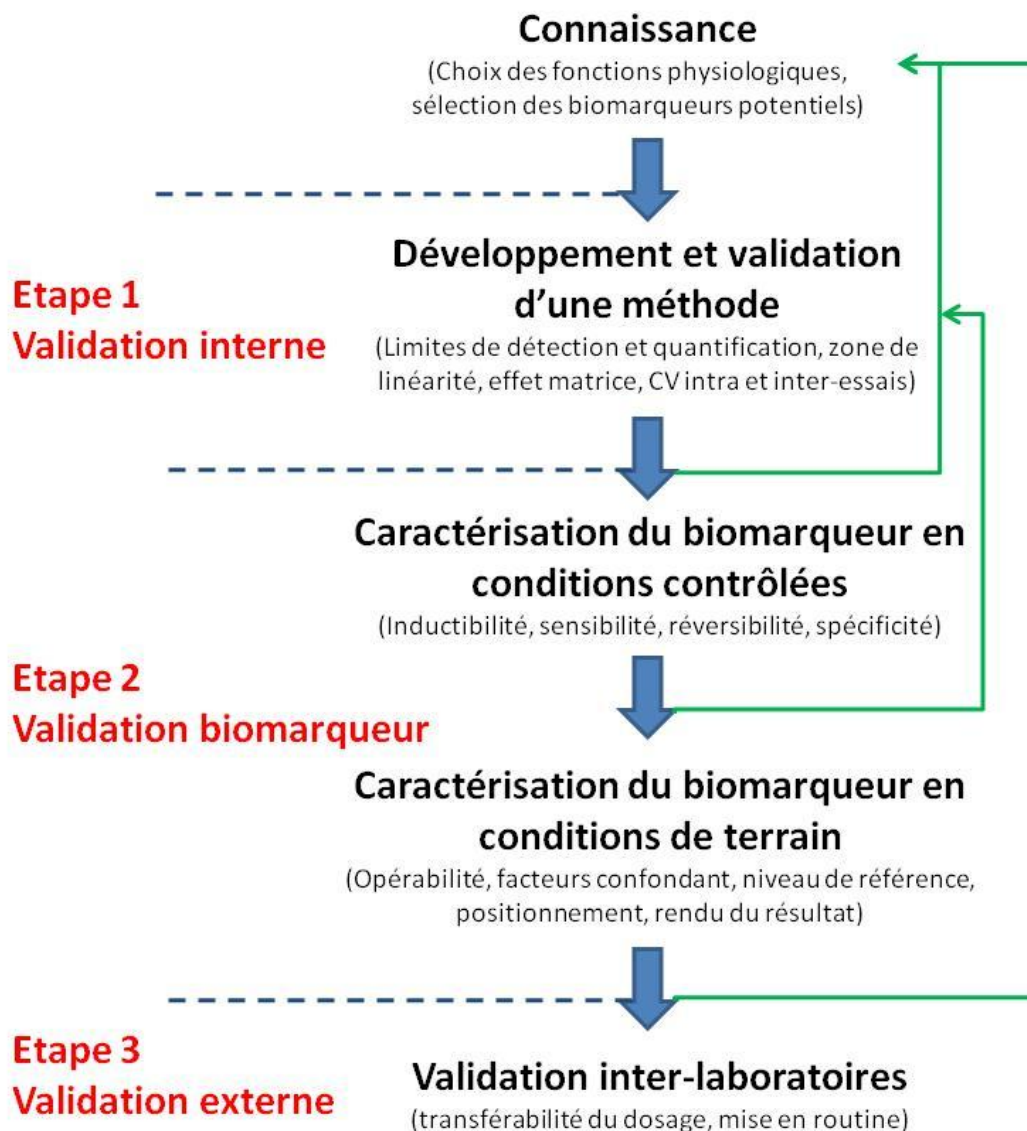


Figure 1 : Cadre conceptuel pour la validation des biomarqueurs dans un objectif de biosurveillance des milieux aquatiques (Sanchez, 2012).

- ii) La validation du biomarqueur. Cette étape s'articule en deux phases complémentaires. L'une réalisée en conditions contrôlées permet de déterminer l'inductibilité, la sensibilité, la réversibilité et la spécificité du biomarqueur sélectionné en utilisant différentes substances chimiques ou biologiques (Wu, et al., 2005). L'autre étape, réalisée *in situ*, consiste à tester l'opérabilité du couple biomarqueur/méthode sur le terrain, à déterminer l'effet des facteurs biotiques et environnementaux sur la réponse du biomarqueur, à établir un niveau de référence mais aussi à déterminer la place du biomarqueur considéré dans un processus de biosurveillance des milieux aquatiques.
- iii) La validation externe des méthodes de dosage ayant passé avec succès les deux premières étapes de validation. Cette dernière s'appuyant sur des laboratoires experts et d'autres structures techniques permettra d'évaluer respectivement la transférabilité des dosages ainsi que les possibilités d'utilisation en routine.

L'objectif du présent rapport est de proposer, en s'appuyant sur ce cadre conceptuel, une méthodologie permettant de valider la mesure de l'intersexualité chez le poisson dans un objectif de biosurveillance des milieux aquatiques.

2. CAS DE L'INTERSEXUALITÉ CHEZ LE POISSON

2.1 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

Depuis plus de 25 ans, des recherches sont menées sur les perturbateurs endocriniens (PE) en raison des dangers qu'ils représentent pour l'homme et pour l'environnement. Les mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens sont multiples puisqu'ils peuvent potentiellement agir sur l'ensemble des étapes de la régulation endocrine de la synthèse des hormones jusqu'à la réponse des cellules cibles. Face aux risques liés à l'exposition des organismes aquatiques aux perturbateurs endocriniens, en particulier sur la fonction de reproduction, il est nécessaire de mettre en place des outils pertinents capables de détecter les altérations de cette fonction avant l'apparition d'effets irréversibles sur les populations. Dans ce contexte, une conséquence possible de l'exposition des poissons à certains PE est l'apparition d'individus intersexués (Tyler and Jobling, 2008). L'intersexe consiste en la présence à la fois de tissu gonadique mâle et femelle chez des espèces gonochoriques (c'est-à-dire pour lesquelles les individus sont soit des mâles, soit des femelles et ne changent pas de sexe durant leur vie) (Bahamonde et al., 2013; Devlin et Nagahama, 2002). Il peut s'agir d'une féminisation ou d'une masculinisation anormale des individus (Hinck et al., 2007; Nolan et al., 2001). Il est possible de distinguer, chez le gardon (*Rutilus rutilus*), une forme d'intersexualité dite « multifocale » où les oocytes et les cellules spermatiques sont en contact direct et distribués de façon aléatoire, ainsi qu'une forme dite « focale » pour laquelle les deux types cellulaires forment de larges zones séparées par du tissu conjonctif (Bahamonde et al., 2013; Nolan et al., 2001). Dans le cas d'une distribution multifocale, l'organisation est semblable à la

structure retrouvée chez les hermaphrodites successifs (individus produisant des gamètes mâles ou femelles à des périodes différentes de leur cycle de vie) et certains hermaphrodites synchrones (individus étant simultanément mâles et femelles). Une distribution focale des deux types cellulaires est similaire à ce qui est observé chez les hermaphrodites synchrones (Devlin et Nagahama, 2002; Nolan et al., 2001). Indépendamment de la présence de deux types de gamètes, les individus intersexués peuvent présenter, simultanément, un canal spermatique et une cavité ovarienne (Nolan et al., 2001). D'autres facteurs, soit endogènes (variation dans la production d'hormones), soit exogènes (température, présence de xénobiotiques) sont également susceptibles d'avoir un rôle à jouer dans l'apparition de l'intersexe (Devlin and Nagahama, 2002). En laboratoire, une exposition à l'E₁, l'E₂, l'EE₂, l'estriol, l'octylphénol, le bisphénol A, la testostérone et la méthyltestostérone ont provoqué l'apparition de ce phénotype chez l'espèce étudiée (*Orizya latipes*, *Cyprinus carpio* ou *Danio rerio*) (Mills and Chichester, 2005). Néanmoins, les mécanismes d'apparition de gonades intersexuées ne sont pas connus (Bahamonde et al., 2013; Devlin et Nagahama, 2002).

L'intersexualité chez les individus mâles peut provoquer une diminution de la libération des gamètes si les canaux spermatiques sont affectés, une réduction du volume de spermatozoïdes produits ainsi que de leur densité et motilité (Jobling et al., 2002). Une absence de spermatocytes, traduisant une inhibition de la spermatogenèse a également été observée chez des gardons (*Rutilus rutilus*) intersexués, ce qui n'a néanmoins pas été reporté chez les goujons (*Gobio gobio*) de la même étude (Minier et al., 2000). L'intersexualité peut par conséquent mener à une diminution du succès reproducteur (Jobling et al., 2002). Kidd et al. (2007) observent par ailleurs un effondrement de la population de vairons (*Pimephales promelas*) après 2 ans d'exposition à 5-6 ng/l d'EE₂ (un œstrogène synthétique) lié à une absence de jeunes classes d'âge. Les individus présentaient de l'intersexualité et une production de vitellogénine (VTG) anormale (Kidd et al., 2007). Il a été montré, chez les poissons intersexués, une concentration en VTG intermédiaire entre celle présentée par les mâles d'une part et les femelles d'autre part. De plus, cette concentration augmenterait avec la sévérité de la féminisation (Jobling et al., 1998). Les observations sur le terrain, en particulier chez le gardon en Grande-Bretagne, suggèrent fortement une implication de substances œstrogéniques et anti-androgéniques dans l'apparition de l'intersexe, conséquence d'une féminisation des mâles (Tyler and Jobling, 2008).

En 2013, une revue bibliographique canadienne montrait la présence d'intersexualité chez 37 espèces piscicoles dans 24 pays (Bahamonde et al., 2013). Alors qu'il est clair que les xénoestrogènes et d'autres contaminants sont capables d'induire l'intersexualité dans certaines espèces de poissons, le débat est toujours ouvert sur l'incidence de l'intersexualité et les facteurs qui influencent son apparition. En particulier, il est difficile de séparer le fond naturel de

l'intersexualité, de l'intersexualité rapportée dans la plupart des études en raison des limites entourant la sélection de sites de référence pour la comparaison avec des environnements pollués.

2.2 ADAPTATION DU PROTOCOLE STANDARD DE VALIDATION

Un certain nombre d'adaptations sont nécessaires afin de tenir compte des particularités de la mesure de l'intersexualité par rapport à un dosage biochimique classique. Le mécanisme d'apparition des ovotestis au sein des gonades étant un phénomène complexe et très partiellement élucidé, son induction au laboratoire n'est pas possible de façon standardisée. Par conséquent, toute la phase de standardisation de la mesure ne peut pas être effectuée (répétabilité, reproductibilité, ...) au laboratoire, et seules les mesures effectuées *in situ* sont utilisables avec les contraintes associées à ce type d'étude (conditions non contrôlées).

Dans ce contexte, les premiers résultats obtenus dans le cadre du programme ONEMA de cartographie de l'intersexualité des Cyprinidés en France en lien avec la problématique perturbateurs endocriniens seront utilisés.

Le protocole d'échantillonnage et de traitement des échantillons mis en place lors de cette étude sert de base à l'élaboration du présent document.

L'analyse histologique des deux premières années d'échantillonnage sert de point de départ pour la discussion du paramètre « intersexe », mais devra être confronté aux résultats définitifs de l'étude.

3. PROTOCOLE DE VALIDATION

3.1 ETAPE PRÉALABLE D'ACQUISITION DES CONNAISSANCES

De façon à pouvoir interpréter correctement les résultats des études d'intersexualité, il est important d'acquérir préalablement des connaissances sur le niveau de base de l'intersexualité pour l'espèce considérée. Ce type d'information n'est que très rarement accessible dans la littérature. Certaines études permettent néanmoins de définir au moins partiellement, des valeurs d'intersexualité en milieu naturel pour différentes espèces (Bahamonde et al. 2013).

Les gardons sont une espèce qui a été largement étudié pour l'intersexualité en Europe, à savoir l'Angleterre (Jobling et al, 1998, 2006;.. Minier et al., 2000; Nolan et al, 2001)., la France (Maltret-Géraudie et al, 2008;. Minier et al, 2000), la Suède (Andersen et al, 2001), le Danemark (Bjerregaard et al, 2006) et l'Irlande (McGee et al, 2012). Les valeurs basales évoquées dans ces études varient de 4,5 à 8.7% (Jobling et al. 1998, Bjerregaard et al. 2006). Plus récemment, le gardon a été spécifiquement étudiée dans un site de référence en Normandie (France) qui a été choisi pour être exempt de toute influence anthropique (industriels, agricoles ou les effluents municipaux). Les chercheurs ont mesuré l'activité œstrogéniques et mutagène de sédiments (Geraudie et al. 2010). Plus de 470 gardons ont été prélevés sur 18 mois et aucun poisson intersexué n'a été observé. La possibilité que l'intersexualité puisse se produire spontanément à un certain degré dans certaines populations animales reçoit généralement moins d'attention que par le

passé. En effet, la fréquence de détection d'un intersexe spontané dans un environnement naturel non contaminé pourrait être très faible par rapport à celle des sites contaminés.

En ce qui concerne le goujon, les valeurs basales obtenues dans la littérature vont de 8.3 à 13.8 % (van Aerle et al. 2001, Faller et al. 2003). A noter que ces valeurs, particulièrement élevées, sont obtenues dans le cadre d'études de terrain sur les sites utilisés comme référence pour l'étude et qu'il n'est pas certain que ces sites soient préservés de toutes pollutions.

Un travail considérable doit encore être accompli pour définir réellement les valeurs basales d'intersexualité pour chacune des espèces utilisées dans les études de terrain.

3.2 MÉTHODOLOGIES MISES EN PLACE

PRÉLÈVEMENTS SUR LE TERRAIN ET CONSERVATION DES ÉCHANTILLONS

Les études réalisées à l'INERIS ont porté en priorité sur des cyprinidés (goujon, vairon et gardon). Tous les poissons échantillonnés doivent être sexuellement matures. Idéalement, leur taille ne doit pas excéder 30 cm. Sur chaque site, 20 à 30 poissons de la même espèce sont prélevés par pêche électrique, euthanasiés sur place et conservés dans des fûts étanches contenant du formaldéhyde à 4%.

L'INERIS se charge de la récupération des fûts et des fiches sur des sites convenus au préalable.

3.2.1 DISSECTIONS ET PRÉPARATION DES COUPES HISTOLOGIQUES

A leur arrivée au laboratoire, les organes d'intérêt sont prélevés

Les différentes étapes des analyses histologiques se décomposent selon les principes suivants :

- Prélèvement des organes
- Fixation : permet la conservation de la structure des organes. L'intérêt de la fixation est donc d'immobiliser les constituants tissulaires, de prévenir l'autolyse cellulaire et la putréfaction bactérienne post-mortem.
- Déshydratation et clarification : La paraffine étant hydrophobe, il est nécessaire de déshydrater puis de clarifier les tissus afin d'en permettre l'imprégnation.
- Inclusion en paraffine : permet la réalisation de coupes fines et régulières des organes. La paraffine, milieu d'inclusion utilisé au laboratoire, donnera aux tissus une consistance solide permettant la coupe.
- Coupe des tissus
- Coloration des tissus : permet l'observation des différentes structures cellulaires des tissus
- Lecture et analyse des lames histologiques

L'ensemble des procédures est détaillé en annexe.

3.2.2 OBSERVATION ET ANALYSE DES LAMES

Pour chaque individu, les coupes sont observées sur un microscope optique (Axio Lab A1 ; Carl Zeiss) à un grossissement de 100x.

Le sexe macroscopique noté lors de la dissection est confirmé ou corrigé lors de l'observation histologique afin d'établir le sexe-ratio de la population prélevée. Chaque individu présentant une intersexualité (tissu mâle présent dans un ovaire ou ovocytes présents dans un testicule) est analysé afin d'en évaluer la sévérité. Aucun des ovaires observé n'a présenté de tissu mâle en son sein, l'analyse de sévérité de l'intersexualité décrite ci-dessous ne concerne donc que les testicules présentant des ovocytes.

Calcul de l'indice de sévérité :

L'analyse des échantillons pour évaluer la sévérité de l'intersexualité repose sur la méthode préétablie par Bateman *et al.* (2004)¹ chez le flet, avec quelques modifications. Pour chaque gonade, une coupe entière est analysée pour chacun des quatre niveaux de coupe (soit 4 coupes au total pour les petites gonades et 12 coupes pour les grosses gonades ou encore 8 à 24 coupes par individu). Chaque coupe est ensuite artificiellement découpée en un nombre variable de champs d'observation dépendant de la taille de la gonade. Tous les champs d'observation, pleins ou non, sont pris en compte dans le calcul de l'indice de sévérité (OSI). Dans chaque champ d'observation, la présence d'ovocytes et leurs caractéristiques (stade de maturité, type de distribution) sont reportés, ce qui permet l'attribution des scores décrits ci-dessous.

(a) Attribution d'un score lié au stade de développement :

- Score 1 : présence d'ovogonies ou ovocytes primaires
- Score 2 : présence d'ovocytes en début de phase périnucléaire
- Score 3 : présence d'ovocytes en fin de phase périnucléaire
- Score 4 : présence d'ovocytes en phase d'alvéoles corticaux
- Score 5 : présence d'ovocytes secondaires en phase vitellogénique

(b) Attribution d'un score lié à la distribution des ovocytes :

- Score 1 : distribution focale (1 seul ovocyte) Figure 2A
- Score 2 : distribution diffuse (> 1 ovocyte, non associés) Figure 2B
- Score 3 : distribution groupée (> 1 mais < 5 ovocytes, associés) Figure 2C
- Score 4 : distribution zonale (> 5 ovocytes associés) Figure 2D.

(c) L'indice OSI (ovotestis severity index) est calculé comme suit :

$$OSI = \sum \frac{[(a) * (b)]}{X}$$

¹Bateman, K. S., G. D. Stentiford and S. W. Feist (2004). "A ranking system for the evaluation of intersex condition in european flounder (*Platichthys flesus*)." *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(12): 2831-2836.

Avec (a) étant l'indice représentant le stade de développement, (b) l'indice lié au type de distribution des oocytes, et X le nombre total de champs examinés pour une coupe.

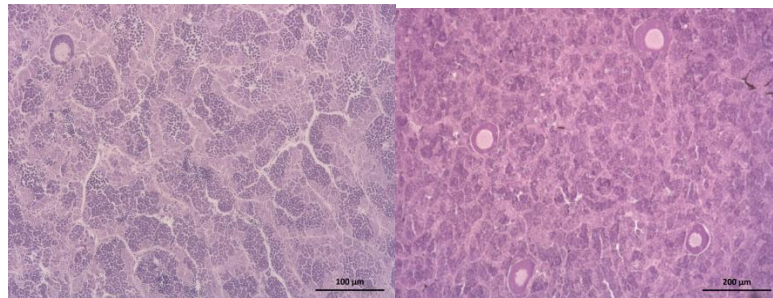


Figure 2 A

Figure 2 B

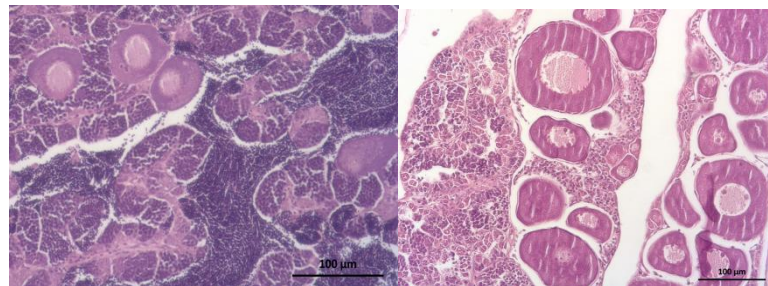


Figure 2 C

Figure 2 D

Figure 2 : Détermination des scores liés à la distribution des ovocytes

Au final, l'OSI d'un individu est une moyenne des OSI de l'ensemble des coupes analysées pour l'individu. La démarche suivie pour le calcul de cet OSI est résumée dans la Figure 3.

Cet indice, ainsi calculé, permet de déterminer 4 catégories de sévérité:

- Stade 0 : Un indice OSI égal à 0 signifie que le testicule est normal
- Stade 1 : Un OSI entre 0 et 5 indique que la majorité du testicule est normal mais un ou quelques oocytes, le plus souvent prévitellogéniques, sont présents.
- Stade 2 : Un OSI entre 5 et 10 montre que le testicule est altéré par des ovocytes prévitellogéniques en clusters avec présence possible d'ovocytes vitellogéniques
- Stade 3 : Un OSI entre 10 et 20 signifie que le testicule est très altéré par des ovocytes prévitellogéniques et/ou vitellogéniques le plus souvent en clusters.

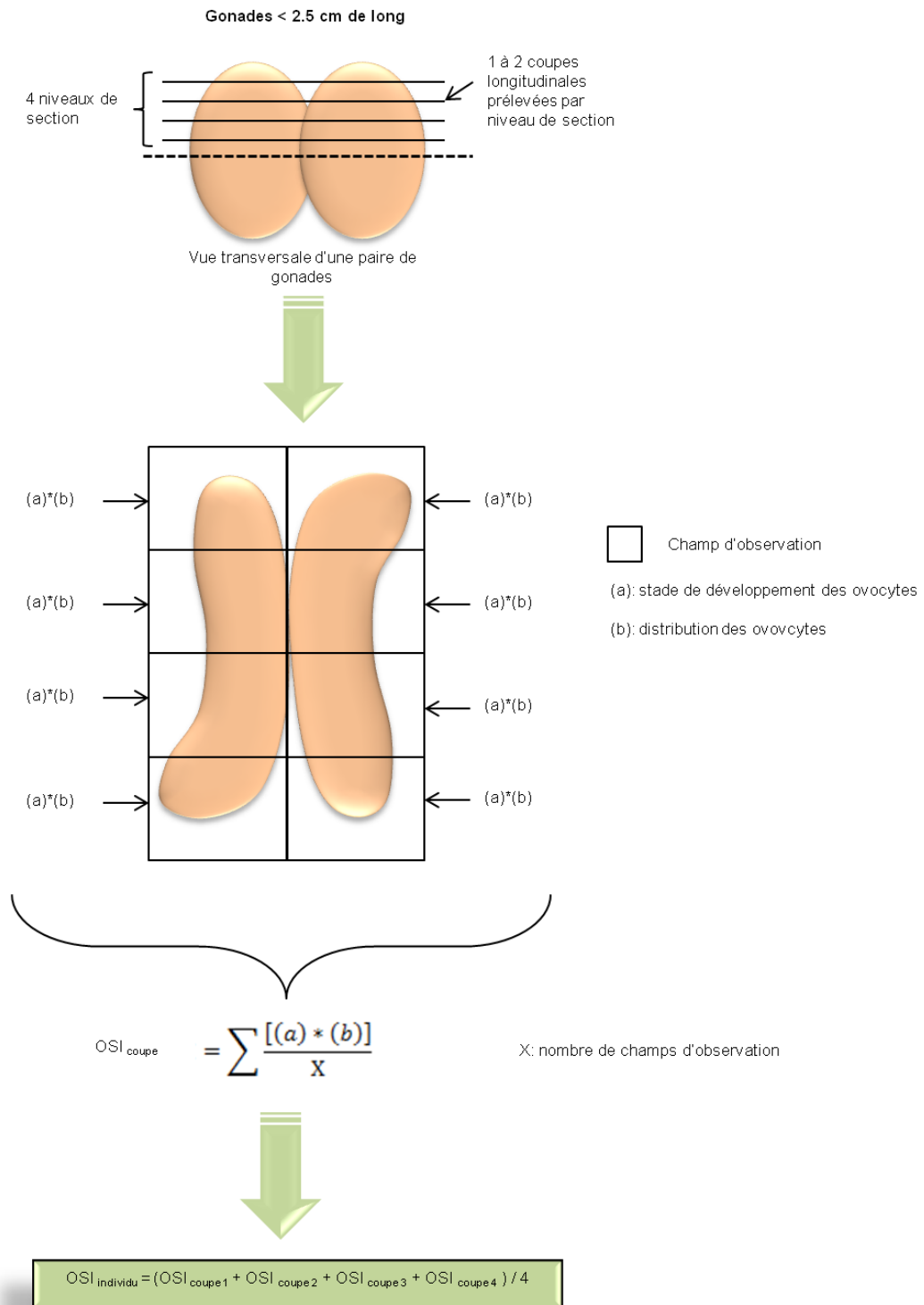


Figure 3 : Schéma conceptuel du calcul de l'OSI

3.3 CARACTÉRISATION DU BIOMARQUEURS EN CONDITIONS DE TERRAIN

Comme précisé dans l'introduction du document, la mesure de l'intersexualité chez les cyprinidés ne peut pas faire l'objet d'une mise en place et d'une validation biologique classique. Ceci étant principalement dû à la difficulté de reproduction du phénomène au laboratoire et /ou en condition contrôlées.

La mise en place du paramètre a donc été directement effectuée sur le terrain et est maintenant totalement opérationnelle.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les premiers résultats de la cartographie nationale de l'intersexualité chez les cyprinidés, ne permettent pas de fixer de façon absolue le seuil basal d'intersexe pour chacune des espèces puisque la contamination du milieu, en particulier par les perturbateurs endocriniens n'est pas documentée et encore moins maîtrisée. Néanmoins, une proportion importante des sites ne présentant pas de poisson intersexué, on peut raisonnablement penser que les valeurs basales pour les espèces ciblées soient proches de zéro.

Seule l'accumulation de données historiques nous permettra d'affiner pour chaque espèce les valeurs basales d'intersexualité, les fourchettes de variation de ce paramètre en fonctions des conditions rencontrées et les conséquences physiologiques prévisibles.

5. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bahamonde, P. A., K. R. Munkittrick and C. J. Martyniuk (2013). "Intersex in teleost fish: Are we distinguishing endocrine disruption from natural phenomena?" General and Comparative Endocrinology **192**: 25-35.
- Bjerregaard, L. B., B. Korsgaard and P. Bjerregaard (2006). "Intersex in wild roach (*Rutilus rutilus*) from Danish sewage effluent-receiving streams." Ecotoxicology and Environmental Safety **64**(3): 321-328.
- Caporal-Gautier, J., Nivet, J.M., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu, J.J., Russotto, R., 1992a. Guide de validation analytique. Rapport de la commission SFSTP. I. Méthodologie. S.T.P. Pharma Pratiques 2 4, 205-226.
- Caporal-Gautier, J., Nivet, J.M., Algranti, P., Guilloteau, M., Histe, M., Lallier, M., N'Guyen-Huu, J.J., Russotto, R., 1992b. Guide de validation analytique. Rapport de la commission SFSTP. II. Exemples d'application. S.T.P. Pharma Pratiques 2 4, 227-239.
- Depledge, M. H. (1993). *Nondestructive biomarkers in vertebrates*, Lewis Publisher, Boca Raton: 261-285.
- Devlin, R.H., and Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture **208**, 191-364.

- Faller, P., B. Kobler, A. Peter, J. P. Sumpter and P. Burkhardt-Holm (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.
- Geraudie, P., M. Gerbron, E. Hill and C. Minier (2010). "Roach (*Rutilus rutilus*) reproductive cycle: a study of biochemical and histological parameters in a low contaminated site." Fish Physiology and Biochemistry **36**(3): 767-777.
- Hagger, J. A., M. B. Jones, D. Lowe, D. R. P. Leonard, R. Owen and T. S. Galloway (2008). Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study. Marine Pollution Bulletin **56**(6): 1111-1118.
- Hagger, J. A., M. B. Jones, D. P. Leonard, R. Owen and T. S. Galloway (2006). Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? Integrated Environmental Assessment and Management **2**(4): 312-329.
- Hinck, J. E., V. S. Blazer, N. D. Denslow, K. R. Echols, T. S. Gross, T. W. May, P. J. Anderson, J. J. Coyle and D. E. Tillitt (2007). "Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from the Colorado River and its tributaries." Science of the Total Environment **378**(3): 376-402.
- Huggett, R., R. A. Kimerly, P. M. Mehrle and H. L. Bergmann (1992). Biomarkers : biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Boca Raton, FL, Lewis.
- INERIS, IFREMER, ONEMA (2010). Compte-rendu du séminaire national sur le développement et la validation des biomarqueurs et bioessais pour la surveillance des milieux aquatiques. 8 p.
- Jobling, S., M. Nolan, C. R. Tyler, G. Brighty and J. P. Sumpter (1998). "Widespread sexual disruption in wild fish." Environmental Science & Technology **32**(17): 2498-2506.
- Jobling, S., M. Nolan, C. R. Tyler, G. Brighty and J. P. Sumpter (1998). "Widespread sexual disruption in wild fish." Environmental Science & Technology **32**(17): 2498-2506.
- Jobling, S., R. Williams, A. Johnson, A. Taylor, M. Gross-Sorokin, M. Nolan, C. R. Tyler, R. van Aerle, E. Santos and G. Brighty (2006). "Predicted exposures to steroid estrogens in UK rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations." Environmental Health Perspectives **114**: 32-39.
- Jobling, S., S. Coey, J. G. Whitmore, D. E. Kime, K. J. W. Van Look, B. G. McAllister, N. Beresford, A. C. Henshaw, G. Brighty, C. R. Tyler and J. P. Sumpter (2002). "Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility." Biology of Reproduction **67**(2): 515-524.
- Kidd, K. A., P. J. Blanchfield, K. H. Mills, V. P. Palace, R. E. Evans, J. M. Lazorchak and R. W. Flick (2007). "Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(21): 8897-8901.
- Lagadic, L., T. Caquet and J. C. Amiard (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux. L. Lagadic, T. Caquet, J. C. Amiard and F. Ramade. Londres, Paris, New York, Masson: 241-285.
- Maltret-Geraudie, P., M. Gerbron and C. Minier (2008). "Estrogenic response of wild roach from the Seine River (France)." Cybiurn **32**(2): 256-257.

- McGee, C., C. Brougham, J. Roche and A. Fogarty (2012). "First report of intersex roach residing in Irish rivers downstream of several wastewater treatment plants" Biology and Environment-Proceedings of the Royal Irish Academy **112B**(1): 69-77.
- Minier, C., G. Caltot, F. Leboulanger and E. M. Hill (2000). "An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex regions." Analusis **28**(9): 801-806.
- National Research Council (1987). Biological markers in environmental health research. Environmental Health Perspectives 74: 3-9.
- Nolan, M., S. Jobling, G. Brighty, J. P. Sumpter and C. R. Tyler (2001). "A histological description of intersexuality in the roach." Journal of Fish Biology **58**(1): 160-176.
- Sanchez W (2008). Synthèse bibliographique : Expériences étrangères sur l'utilisation des biomarqueurs pour la surveillance des milieux aquatiques. Rapport INERIS DRC-08-95306-16133A, 22 p.
- Sanchez W (2012). Note de synthèse relative aux besoins et aux possibilités de mise en œuvre d'un processus de validation en vue de l'utilisation des biomarqueurs pour la surveillance des milieux aquatiques. Note INERIS DRC-12-118987-03048A, 3 p.
- Sanchez W, Burgeot T, Perceval O (2012). Perspectives from the French workshop on the development and validation of biomarkers and bioassays for the monitoring of aquatic environments. Environmental Science and Pollution Research, 19, 1345-1347.
- Sanchez, W. and J.-M. Porcher (2009). Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water framework Directive of the European Union. Trends in Analytical Chemistry 28(2): 150-158.
- Timbrell, J. A., R. Drapper and C. Waterfiel (1994). Biomarkers in toxicology: new uses for old molecules. Toxicology and Ecotoxicology News 1: 4-14.
- Tyler, C. R. and S. Jobling (2008). "Roach, Sex, and Gender-Bending Chemicals: The Feminization of Wild Fish in English Rivers." Bioscience **58**(11): 1051-1059.
- Van Aerle, R., M. Nolan, S. Jobling, L. B. Christiansen, J. P. Sumpter and C. R. Tyler (2001). "Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the Gudgeon, *gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(12): 2841-2847.
- Wu, R.S.S., Siu, W.H.L., Shin, P.K.S., 2005. Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring. Marine Pollution Bulletin 51, 623-634.

ANNEXE I

Préparation des coupes histologiques

1 - PRÉLÈVEMENT DES ORGANES

Chaque individu est disséqué, les gonades sont prélevées et placées dans des cassettes histologiques identifiées (Figure 4). Lorsque la taille des gonades est trop importante pour être étudiées entièrement, trois sections sont prélevées respectivement dans les parties antérieure, médiane et postérieure de chaque gonade.



Figure 4 : Illustration du prélèvement des gonades et de la mise en cassettes.

2 - FIXATION

Le fixateur utilisé pour nos échantillons est le formol tamponné à 4%. Les poissons ayant été plongés dans le fixateur dès l'euthanasie, il n'est plus nécessaire de fixer les gonades après la dissection.

3 - DÉSHYDRATATION ET LA CLARIFICATION

Ces étapes du traitement sont réalisées par bains successifs d'éthanol (déshydratation) et de toluène (clarification) à l'aide d'un automate (Sakura VIP). La dernière étape de traitement est une imprégnation par passage des échantillons dans quatre bains de paraffine.

4 - INCLUSION

Les organes ainsi infiltrés sont placés dans un moule et inclus dans la paraffine liquide afin d'obtenir, après refroidissement, un bloc pouvant être coupé au microtome (Figure 5).



Figure 5 : Illustration de l'inclusion en paraffine des gonades.

5 - COUPE

Des coupes de 5 μm sont réalisées au microtome. Sur les petites gonades (maximum 2.5 cm de long), une à deux coupes longitudinales sériées sont réalisées sur 4 niveaux dans la première moitié de l'organe (4 à 8 coupes au total par gonade, soit 8 à 16 coupes par individu). Sur les grosses gonades (> 2.5 cm de long), une à deux coupes longitudinales sériées sont réalisées sur 4 niveaux de chacun des morceaux de gonade prélevé (12 à 24 coupes au total par gonade, soit 24 à 48 coupes par individu). Ces coupes sont déposées sur des lames en verre. L'adhésion des coupes au support est obtenue grâce à un mélange d'eau et de colle permettant également leur étirement par chauffage sur plaque Figure 6.

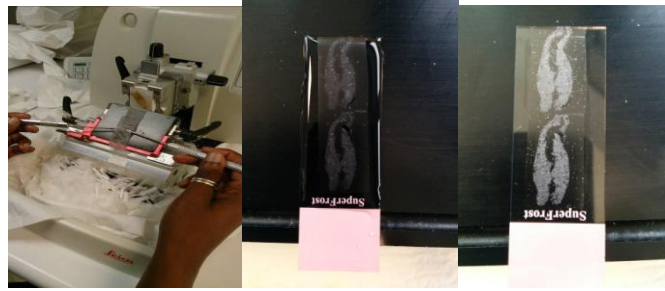


Figure 6 : Illustration de la coupe des gonades.

6 - COLORATION

Cette opération est réalisée par un automate (Leica Autostainer xl Figure 7). Les lames sont immergées dans des bains de toluène, d'éthanol (99 %) et d'eau afin d'éliminer la paraffine et de réhydrater les tissus, permettant ainsi la pénétration des colorants. La coloration des structures est réalisée à l'aide d'éosine (coloration du cytoplasme basophile en rose) et d'hématéine (coloration des noyaux, acidophiles, en violet). Afin de fixer les colorants, les coupes colorées sont à nouveau déshydratées par passage en bains d'éthanol 99 % et de toluène. Des lamelles en verre sont ensuite collées à l'aide d'une colle anhydre.

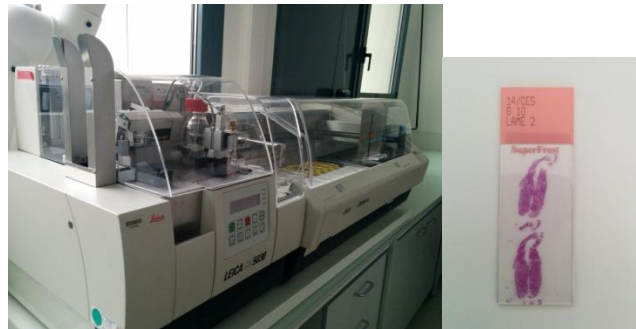


Figure 7 : Illustration de la coloration des lames.