

Université
de Liège



FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE

Département des Sciences des Denrées alimentaires

Section d'Analyse des Denrées alimentaires

**Contamination du marsouin commun
(*Phocoena phocoena*) de la Mer du Nord par
des perturbateurs endocriniens persistants**

***Persistent endocrine disruptors contamination
in North Sea harbour porpoises
(Phocoena phocoena)***

Pedro Henrique DIDIMO IMAZAKI

Mémoire présenté en vue de l'obtention
du Diplôme de Master Complémentaire en Médecine vétérinaire spécialisée
Option Santé publique vétérinaire : Sciences des Aliments

Année académique 2008 – 2009

Contamination du marsouin commun (*Phocoena phocoena*) de la Mer du Nord par des perturbateurs endocriniens persistants

Mots-clés : perturbateurs endocriniens, marsouin commun, Mer du Nord, composés organochlorés, chromatographie en phase gazeuse, spectrométrie de masse, gène rapporteur

Persistent endocrine disruptors contamination in North Sea harbour porpoises (Phocoena phocoena)

Keywords: endocrine disrupters, harbour porpoise, North Sea, organochlorine compounds, gas chromatography, mass spectrometry, reporter gene

Le Professeur Marie-Louise Scippo, promotrice de ce mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Master complémentaire en Médecine vétérinaire spécialisée / Option Santé Publique vétérinaire : Sciences des Aliments*, a accepté la publication de cet ouvrage. L'auteur et le promoteur autorisent sa consultation et sa photocopie pour usage personnel.

Toute utilisation doit se conformer aux dispositions sur les droits d'auteurs, en particulier l'obligation de mentionner la source lors de l'utilisation de résultats de cette étude.

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier le Prof. Marie-Louise Scippo pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, pour m'avoir donné l'occasion de réaliser ce mémoire et surtout pour sa patience et pour sa disponibilité.

Je voudrais ensuite remercier tout le personnel du Laboratoire d'analyses de denrées alimentaires pour leur encouragement, pour leur amitié et pour ces deux années de moments inoubliables.

Finalement, un grand merci à ma famille et à mes amis, qui m'ont soutenu tout au long de la réalisation de ce travail.

AVANT-PROPOS

« (...) on peut produire autrement, durablement, des denrées alimentaires de haute qualité sanitaire, en quantité suffisante, avec des performances économiques bien supérieures aux méthodes industrielles, pour peu que l'on cesse de remplacer les paysans sur la Terre par des molécules chimiques. »

(Philippe Desbrosses)

TABLE DES MATIERES

LISTE DE TABLEAUX.....	7
LISTE DE FIGURES	8
LISTE DES ABREVIATIONS.....	10
RESUME	12
SUMMARY	13
RESUMO.....	14
INTRODUCTION.....	15
1 Le marsouin commun.....	16
2 Le système endocrine	17
3 Les hormones stéroïdes.....	19
4 Les récepteurs aux hormones stéroïdes	22
4.1 Le récepteur aux hormones œstrogènes (ER)	23
5 Les perturbateurs endocriniens qui contaminent les mammifères marins.....	24
5.1 Le DDT	27
5.2 Le lindane	28
5.3 L'hexachlorobenzène.....	29
5.4 Les polychlorobiphényles	29
6 Méthodes d'étude des perturbateurs endocriniens.....	30
7 Objectifs	32
MATERIEL ET METHODES.....	34
1 Matériel, réactifs, solvants et milieux.....	34
2 Le test du type « gène rapporteur »	36
3 La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.....	42
4 Extraction et purification des perturbateurs endocriniens à partir de l'échantillon de graisse.....	45
4.1 Extraction du 17 β -œstradiol à partir de la graisse de bœuf	45

4.2	Extraction et purification des perturbateurs endocriniens à partir de la graisse de marsouin	47
	RESULTATS	49
1	Optimisation des tests cellulaires avec ligands de référence	49
1.1	Caractérisation des lignées cellulaires	49
1.2	Etude de l'influence de différents lots de réactifs	53
1.3	Etude de l'influence de la température de lecture de la luminescence	55
1.4	Paramètres de performance de la courbe d'étalonnage pour la lignée MCF-7-ERE	56
2	Evaluation de l'activité œstrogénique et anti-œstrogénique des substances d'intérêt	57
2.1	Etude de l'activité oestrogénique	57
2.2	Etude de l'activité anti-oestrogénique.....	62
3	Optimisation de la séparation et de la détection des substances d'intérêt par GC-MS	67
4	Optimisation de la méthode d'extraction et de purification des substances d'intérêt à partir de la graisse de marsouin	72
4.1	Extraction du 17β-œstradiol à partir de la graisse de bœuf	72
4.2	Extraction et purification des perturbateurs endocriniens à partir de la graisse de marsouin	74
4.2.1	Mesure du rendement de récupération par GC-MS	75
4.2.2	Mesure du rendement de récupération de l'activité hormonale à l'aide du test cellulaire du type « gène rapporteur »	76
5	Analyse d'échantillons de graisse de marsouin par GC-MS.....	80
6	Analyse d'échantillons de graisse de marsouin par test du type « gène rapporteur »	85
7	Corrélation entre les résultats obtenues par GC-MS et par test cellulaire	86
8	Données complémentaires sur les échantillons de graisse de marsouin	88
	DISCUSSION	90
1	Optimisation des tests cellulaire	90
2	Etude de l'activité hormonale des susbtances d'intérêt.....	91
3	Optimisation des paramètres des analyses par GC-MS.....	91
4	Analyse des échantillons de graisse de marsouin.....	92
	CONCLUSION	93
	BIBLIOGRAPHIE.....	94

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : concentrations de quelques substances organochlorées présentes dans la graisse de dauphin commun à bec court (Mössner et Ballschmiter, 1997) et dans le foie de marsouin commun (Covaci <i>et al.</i> , 2002) originaires de l'Atlantique Nord	17
Tableau 2 : les principaux organes endocriniens, les principales hormones, leurs fonctions et leurs structures chimiques (Guyton et Hall, 2006)	18
Tableau 3 : les différentes classes de perturbateurs endocriniens, les principaux perturbateurs endocriniens et leurs utilisations (Bila et Dezotti, 2007)	26
Tableau 4 : caractéristiques physico-chimiques des 13 polluants organochlorés étudiés dans ce mémoire selon leur fournisseur	32
Tableau 5 : matériels réactifs, solvants et milieux et leur fournisseur	34
Tableau 6 : composition de la solution de lyse, après avoir ajusté le volume à 1 L d'eau pour HPLC	40
Tableau 7 : composition de la solution contenant les substrats et les cofacteurs de la luciférase, après avoir ajusté le volume à 1 L d'eau pour HPLC	41
Tableau 8 : paramètres employés pour les analyses chromatographiques	43
Tableau 9 : valeurs de l'EC ₅₀ calculées pour quatre ligands de référence solubilisés dans des différents solvants, et exposés à la lignée cellulaire appropriée	52
Tableau 10 : paramètres de performances des courbes d'étalonnage pour la lignée MCF-7-ERE exposée au 17β-œstradiol solubilisé dans de l'acétonitrile (ACN) à 0,4 % ou à 0,8 % dans le milieu de culture	56
Tableau 11 : classement par ordre décroissant des composés étudiés dans ce mémoire selon leur activité œstrogénique	61
Tableau 12 : rapports masse/charge recherchés pour chaque composé lors des analyses par GC-MS	67
Tableau 13 : paramètres des analyses par spectrométrie de masse en mode SIM	70
Tableau 14 : concentrations (ppm) des substances d'intérêt présentes dans 12 échantillons de graisse de marsouin commun	83
Tableau 15 : expression de la luciférase par les cellules MCF-7-ERE exposées aux extraits de graisse de marsouin obtenus comme décrit dans la section 5 de ce chapitre, en absence ou présence de 17β-œstradiol	85
Tableau 16 : échantillons de graisse de marsouin avec leurs respectives valeurs de contamination globale par les 13 substances cibles de ce mémoire	86
Tableau 17 : activité œstrogénique attendue et mesurée pour trois échantillons de graisse de marsouin	88
Tableau 18 : année et lieu de collecte, âge et sexe des marsouins dont les échantillons utilisés dans ce mémoire sont issus	89

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : structures chimiques des molécules de cholestérol et de quelques hormones stéroïdes ...	20
Figure 2 : schéma simplifié de la stéroïdogenèse (White, 1994)	21
Figure 3 : structure des récepteurs nucléaires (Center for biomolecular modeling, sans date)	23
Figure 4 : structures chimiques des 13 polluants étudiés dans le cadre de ce mémoire	33
Figure 5 : mécanisme moléculaire d'action du 17 β -œstradiol et des agonistes du récepteur aux hormones œstrogènes dans le test cellulaire du type gène rapporteur en utilisant des cellules MCF-7-ERE développé par Willemsen et collaborateurs (2004)	38
Figure 6 : courbe de calibration pour un test du type gène rapporteur (exemple des cellules MCF-7-ERE)	42
Figure 7 : courbes dose-réponse pour la lignée TM-Luc exposée à la progestérone diluée dans des différents solvants	50
Figure 8 : courbes dose-réponse pour la lignée TARM-Luc exposée à la 5 α -dihydrotestostérone (5 α -DHT) diluée dans des différents solvants	50
Figure 9 : courbe dose-réponse pour la lignée TGRM-Luc exposée à la dexaméthasone diluée dans du méthanol (MeOH)	51
Figure 10 : courbes dose-réponse pour la lignée MCF-7-ERE exposée aux 17 β -œstradiol dilué dans des différents solvants	52
Figure 11 : courbes dose-réponse pour la lignée MCF-7-ERE, cultivée dans des milieux supplémentés avec du sérum fœtal bovin (FCS) provenant de deux lots différents et exposée au 17 β -œstradiol dilué dans de l'acétonitrile	53
Figure 12 : courbes dose-réponse pour la lignée MCF-7-ERE exposée au 17 β -œstradiol dilué dans de l'acétonitrile (ACN) et lysées à l'aide des solutions de lyse préparées avec des réactifs provenant des lots différents	54
Figure 13 : courbes dose-réponse pour la lignée MCF-7-ERE exposée au 17 β -œstradiol dilué dans de l'acétonitrile (ACN)	54
Figure 14 : courbes dose-réponse pour la lignée MCF-7-ERE exposée au 17 β -œstradiol dilué dans de l'acétonitrile (ACN)	55
Figure 15 : courbe dose-réponse pour la lignée MCF-7-ERE exposée à l' <i>o,p'</i> -DDT	57
Figure 16 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées au DDT et ses métabolites dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits	58
Figure 17 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées à l'HCH et ses isomères, et à l'HCB dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits	59
Figure 18 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées à trois congénères des PCB dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits	59
Figure 19 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées à quatre différents mélanges dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits	60
Figure 20 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées simultanément au 17 β -œstradiol (E2) à une concentration de 1 pg/puits et au DDT et ses métabolites dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits	63

Figure 21 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées simultanément au 17β-œstradiol (E2) à une concentration de 1 pg/puits et à l'HCH et ses isomères dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits	64
Figure 22 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées simultanément au 17β-œstradiol (E2) à une concentration de 1 pg/puits et à trois congénères des PCB dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits	65
Figure 23 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées simultanément au 17β-œstradiol (E2) à une concentration de 1 pg/puits et à quatre différents mélanges dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits	66
Figure 24 : chromatogramme d'un mélange de solutions standards des 13 polluants étudiés réalisé en mode balayage	68
Figure 25 : programme de température utilisé dans les analyses par chromatographie gazeuse	69
Figure 26 : chromatogramme d'un mélange de solutions standards des 13 polluants étudiés et du standard interne PCB 80 ¹³ C réalisé en mode SIM	71
Figure 27 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées aux extraits obtenus après la réalisation de la première méthode d'extraction de la section 4.1 du chapitre « Matériel et méthodes »	73
Figure 28 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées aux extraits obtenus après la réalisation de la deuxième méthode d'extraction de la section 4.1 du chapitre « Matériel et méthodes »	74
Figure 29 : rendements d'extraction obtenues par l'application de la méthode décrite dans la section 4.2 du chapitre « Matériel et méthodes » à partir d'une solution contenant les 13 polluants étudiés dans ce mémoire	76
Figure 30 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées aux extraits obtenus après l'application de la méthode d'extraction décrite dans la section 4.2 du chapitre « Matériel et méthodes » à une solution contenant les 13 polluants cibles de ce mémoire, à une concentration de 400 ng/puits lors de l'exposition cellulaire	77
Figure 31 : expression réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées au 17β-œstradiol à une concentration de 1 pg/puits et aux extraits obtenus après l'application de la méthode d'extraction décrite dans la section 4.2 du chapitre « Matériel et méthodes » à une solution contenant les 13 polluants cibles de ce mémoire à une concentration de 400 ng/puits lors de l'exposition cellulaire	78
Figure 32 : expression réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées aux extraits obtenus après l'application de la méthode d'extraction décrite dans la section 4.2 du chapitre « Matériel et méthodes » à 100 μL d'une solution de 17β-œstradiol (E2) à une concentration de 0,1 ng/μL	79
Figure 33 : chromatogramme de tous les composés obtenus lors de l'analyse de l'échantillon 01/805 par GC-MS	81
Figure 34 : partie du chromatogramme comprenant le temps de rétention correspondant au PCB 138 à partir de l'analyse d'une solution standard de PCB 138 (gauche) et de l'échantillon A03/1517 (droite)	82
Figure 35 : corrélation entre la réponse relative obtenue par six échantillons de graisse de marsouin ayant les activités œstrogéniques les plus accentués et leur valeur de contamination globale par les 13 polluants cibles de ce mémoire correspondante	87
Figure 36 : corrélation entre la réponse relative obtenue par six échantillons de graisse de marsouin ayant les activités anti-œstrogéniques les plus accentuées et leur valeur de contamination globale par les 13 polluants cibles de ce mémoire correspondante	87

LISTE DES ABREVIATIONS

- ACN** : acétonitrile
- ADH** : *antidiuretic hormone* (hormone antidiurétique)
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- CDTA** : *1,2-diaminocyclohexanetetraacetic acid* (acide 1,2-diaminocyclohexanetétracétique)
- CYP** : cytochrome P450
- DBD** : *DNA binding domaine* (domaine de liaison à l'ADN)
- DDD** : dichlorodiphényldichloroéthane
- DDE** : dichlorodiphényldichloroéthylène
- DDT** : dichlorodiphényltrichloroéthane
- DES** : diéthylstilbestrol
- DMEM** : *Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium* (milieu essentiel minimum d'Eagle modifié par Dulbecco)
- DMSO** : diméthylsulfoxyde
- DNA** : *deoxyribonucleic acid* (acide désoxyribonucléique)
- DTT** : 1,4-dithiothréitol
- EC₅₀** : concentration en hormone requise pour obtenir 50 % de la réponse maximale
- EDTA** : *ethylenediaminetetraacetic acid* (acide éthylènediaminetétracétique)
- EPA** : *U.S. Environmental Protection Agency* (Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis)
- ER** : *estrogen receptor* (récepteur aux œstrogènes)
- ERE** : *estrogen response element* (élément de réponse aux œstrogènes)
- EtOH** : éthanol
- FCS** : *fetal calf serum* (sérum de veau foetal)
- FSH** : *follicle-stimulating hormone* (hormone folliculo-stimulante)
- GC-MS** : *gas chromatography-mass spectrometry* (chromatographie en phase gazeuse couplé à la spectrométrie de masse)
- GH** : *growth hormone* (hormone de croissance)
- GnRH** : *gonadotropin-releasing hormone* (gonadolibérine)
- hAR** : *human androgen receptor* (récepteur aux androgènes humain)
- HBSS** : *Hank's balanced salt solution* (solution saline équilibrée de Hank)
- HCB** : hexachlorobenzène
- HCH** : hexachlorocyclohexane
- hGR α** : *human glucocorticoid receptor* (récepteur aux glucocorticoïdes humain)
- HPLC** : *high-performance liquid chromatography* (chromatographie en phase liquide à haute performance)
- LBD** : *ligand binding domaine* (domaine de liaison au ligand)
- LH** : *luteinizing hormone* (hormone lutéinisante)

LOQ : limite de quantification
Luc : gène codant pour la luciférase
LTR : *long terminal repeat sequence* (séquence terminale longue répétée)
m/z : rapport masse/charge
MeOH : méthanol
MMTV : *mouse mammary tumor virus* (virus de la tumeur mammaire murine)
mRNA : *messenger ribonucleic acid* (acide ribonucléique messenger)
n/d : non déterminé
OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques
PBDE : polybromodiphényléthers
PBS : *phosphate buffered saline* (tampon phosphate salin)
PCB : polychlorobiphényles
POP : polluants organiques persistants
PTH : parathormone
R² : coefficient de détermination
RLU : *relative light unit* (unité relative de luminescence)
s/o : sans objet
SIM : *selected ion monitoring*
T3 : triiodothyronine
T4 : tétraiodothyronine
TBT : tributylétain

RESUME

Les perturbateurs endocriniens sont des substances largement distribuées dans l'environnement, capables d'entraîner un dérèglement du système endocrinien. Le premier but de ce travail est d'étudier l'activité œstrogénique d'un nombre limité de ces substances à l'aide de tests du type « gène rapporteur ». Les molécules choisies sont également des polluants organiques persistants (POP), qui ont la capacité de se bioaccumuler dans divers organismes. Ensuite, la présence de ces substances a été étudiée dans la graisse de marsouin commun (*Phocoena phocoena*) de la Mer du Nord, qui est un bon témoin de la contamination environnementale et donc des denrées alimentaires d'origine marine par ces POP. Le dosage de ces POP a été réalisé par GC-MS et aussi par des tests du type « gène rapporteur ». Pour l'achèvement de ces objectifs, différentes méthodes analytiques ont dû être mises au point. Le classement suivant est proposé pour les composés étudiés selon leur activité œstrogénique : o,p' -DDT > o,p' -DDD > β -HCH > p,p' -DDT > p,p' -DDD > p,p' -DDE > δ -HCH > PCB 138 > γ -HCH > α -HCH > PCB 153 > HCB > PCB 180. Aucune de substances étudiés n'est anti-œstrogénique. Les échantillons analysés présentaient un taux élevé de POP, associé pour certains d'entre eux à une activité œstrogénique, ce qui confirme la présence de perturbateurs endocriniens dans ces animaux marins.

SUMMARY

*Endocrine disruptors are molecules able to interfere with the endocrine system and are largely spread in the environment. The evaluation of the estrogenic activity of some of these substances by reporter gene assays was the first aim of this paper. The substances chosen are also persistent organic pollutants (POP), which are capable to bioaccumulate in several organisms. Then, the occurrence of these substances was evaluated in the blubber tissue of North Sea harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). Harbour porpoises are good indicators of the environmental contamination and therefore of seafood by POP. These POP were quantified by GC-MS and also by reporter gene assays. For the achievement of these aims, different analytical methods were developed. The following ranking is proposed for the studied substances, according to their estrogenic activity: o,p'-DDT > o,p'-DDD > β -HCH > p,p'-DDT > p,p'-DDD > p,p'-DDE > δ -HCH > PCB 138 > γ -HCH > α -HCH > PCB 153 > HCB > PCB 180. None of them presented anti-estrogenic activity. The analysed samples presented high levels of POP, sometimes associated with estrogenic activity, confirming the occurrence of endocrine disruptors in these animals.*

RESUMO

*Os desreguladores endócrinos são substâncias largamente distribuídas no meio ambiente, capazes de alterar uma ou várias funções do sistema endócrino. O primeiro objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade estrogênica de algumas destas substâncias através de ensaios de gene repórter recombinante. As substâncias escolhidas são igualmente poluentes orgânicos persistentes (POP), que são capazes de se bioacumular em diversos organismos. Em seguida, a presença destas substâncias foi avaliada em amostras de tecido adiposo proveniente de toninhas-comuns (*Phocoena phocoena*) do Mar do Norte. Estes animais são bons indicadores da contaminação ambiental e, portanto, de produtos da pesca pelos POP. A quantificação dos POP foi feita através da CG-EM e ensaios do tipo gene repórter recombinante. Para a realização dos objetivos, diferentes metodologias analíticas foram desenvolvidas. A seguinte classificação é proposta para as substâncias estudadas, de acordo com a atividade estrogênica de cada uma: o,p'-DDT > o,p'-DDD > β -HCH > p,p'-DDT > p,p'-DDD > p,p'-DDE > δ -HCH > PCB 138 > γ -HCH > α -HCH > PCB 153 > HCB > PCB 180. Nenhuma destas substâncias apresentou atividade anti-estrogênica. As amostras analisadas apresentaram altos índices de POP, acompanhados, em algumas amostras, de atividade estrogênica. Tal fato confirma a presença de perturbadores endócrinos nestes animais marinhos.*

INTRODUCTION

Durant ces dernières décennies, le développement anthropique a provoqué une utilisation croissante de produits chimiques qui s'avèrent, pour certains, être des substances à activité hormonale. Ces substances, appelées « perturbateurs endocriniens », sont largement distribuées dans l'environnement, ainsi que dans les denrées alimentaires d'origine animale.

Les perturbateurs endocriniens contaminent l'environnement et sont fréquemment trouvés dans les eaux des lacs et rivières. Ils ont comme réceptacle final les océans, et s'accumulent dans les espèces aquatiques (Baker *et al.*, 2009). Parmi les espèces aquatiques, ce sont les mammifères marins qui sont les meilleurs indicateurs de la pollution globale de l'environnement car ils occupent les niveaux les plus élevés de la chaîne trophique et possèdent une espérance de vie relativement longue (Mössner et Ballschmiter, 1997).

Des nombreuses études dans les domaines de l'écologie, de l'épidémiologie, de la pathologie et de la toxicologie ont montré que certaines altérations de la santé humaine et animale comme une croissance anormale, des troubles de reproduction et une augmentation de l'incidence de certains types de cancers peuvent être liées à l'exposition chronique aux perturbateurs endocriniens, même quand ils sont présents à de faibles concentrations (Masuda, 2001 ; Arukwe et Goksoyr, 2003 ; Ribeiro *et al.*, 2006).

Malgré une littérature abondante allant dans ce sens, il n'y a pas encore de consensus dans la communauté scientifique sur la relation entre l'exposition aux perturbateurs endocriniens et les possibles conséquences sur la santé humaine.

Tenant compte de toutes les incertitudes autour de ce sujet, il est important de faire le bilan du niveau de contamination environnementale et des effets toxiques de ces composés.

1 Le marsouin commun

Le marsouin commun (*Phocoena phocoena*) est un mammifère appartenant à l'ordre des cétacés. Il s'agit, en fait, de l'espèce de cétacés la plus abondante en Mer du Nord (Hammond *et al.*, 2002).

Sa taille moyenne se situe entre 1,4 m et 1,7 m et son poids varie de 40 kg à 60 kg, les femelles étant légèrement plus grandes que les mâles. Sa coloration est un dégradé qui va du gris foncé dans le dos jusqu'au blanc au niveau du ventre. Les accouplements ont lieu en période estivale et le temps de gestation est de 11 mois. Le marsouin se nourrit principalement de harengs et de maquereaux, mais aussi de quelques poissons de fond, céphalopodes et crustacés (Dupuis, 2007).

Il y a une préoccupation croissante concernant la survie des populations de marsouins communs dans la Mer du Nord (Das *et al.*, 2004). Depuis 1998, on a observé une augmentation du nombre d'échouages des mammifères marins, les marsouins communs étant particulièrement touchés, dans des zones comprenant les côtes française, belge et néerlandaise (Jauniaux *et al.*, 2002). Comme les mammifères marins sont les derniers maillons de la chaîne alimentaire dans la Mer du Nord, les différents polluants marins persistants se bioaccumulent dans leur organisme et ont un impact négatif potentiel sur leur santé (Chu *et al.*, 2003 ; Das *et*

al., 2003). Le tableau 1 compile le niveau de contamination en substances organochlorées pour le dauphin commun à bec court (au niveau de la graisse) et pour le marsouin commun (au niveau du foie) originaires de l'Atlantique Nord (Mössner et Ballschmiter, 1997 ; Covaci *et al.*, 2002).

Tableau 1 : concentrations de quelques substances organochlorées présentes dans la graisse de dauphin commun à bec court (Mössner et Ballschmiter, 1997) et dans le foie de marsouin commun (Covaci *et al.*, 2002) originaires de l'Atlantique Nord. Les données sont exprimées en ppm dans la matière grasse.

Composé	Dauphin commun	Marsouin commun
PCB 28	n.d.	n.d.
PCB 52	1,3	n.d.
PCB 101	1,4	n.d.
PCB 118	1,4	n.d.
PCB 138	6,0	n.d.
PCB 153	6,5	8,5
PCB 180	3,0	n.d.
HCB	n.d.	0,7
α -HCH	0,0	0,1
β -HCH	0,0	0,1
γ -HCH	0,0	0,2
<i>p,p'</i> -DDT	1,8	0,2
<i>p,p'</i> -DDD	2,7	0,8
<i>p,p'</i> -DDE	14,7	2,3
<i>o,p'</i> -DDT	n.d.	0,1
<i>o,p'</i> -DDD	0,2	0,2
<i>o,p'</i> -DDE	0,1	n.d.

n.d. : non disponible

2 Le système endocrine

Le système endocrine est, avec le système nerveux, l'un des systèmes de communication de l'organisme. Il fonctionne au moyen de messagers chimiques, les hormones, qui circulent via le sang vers toutes les parties du corps, ou via le fluide tissulaire vers les cellules adjacentes (Sjaastad *et al.*, 2003). Il est constitué de

différentes glandes et tissus, qui secrètent des hormones, tels que l'hypothalamus, l'hypophyse, l'épiphyse, la thyroïde, les parathyroïdes, l'estomac, le pancréas, l'intestin grêle, le tissu adipeux, les reins, les glandes surrénales, les ovaires et les testicules.

Le tableau 2 reprend les principales hormones de l'organisme, les glandes et tissus qui les secrètent, leurs fonctions majeures et leurs structures chimiques, selon Guyton et Hall (2006).

Tableau 2 : les principaux organes endocriniens, les principales hormones, leurs fonctions et leurs structures chimiques (Guyton et Hall, 2006).

Glande/tissu	Hormones	Fonctions majeures	Structure chimique ¹
Hypothalamus	Gonadolibérine (GnRH)	Provoque la sécrétion de LH et FSH	Peptidique
Hypophyse	Hormone de croissance (GH)	Stimule la croissance	Peptidique
	Hormone folliculo-stimulante (FSH)	Entraîne la croissance de follicules et la maturation du sperme	Peptidique
	Hormone lutéinisante (LH)	Stimule l'ovulation chez les femelles et la synthèse de testostérone dans les testicules	Peptidique
	Prolactine	Stimule la sécrétion de lait	Peptidique
	Hormone antidiurétique (ADH)	Augmente la réabsorption d'eau, la vasoconstriction et la tension sanguine	Peptidique
Thyroïde	Thyroxine (T4) et triiodothyroxine (T3)	Augmentent le métabolisme basal	Aminée
	Calcitonine	Augmente le stockage de calcium dans les os	Peptidique
Surrénales	Cortisol	Régule le métabolisme et agit comme anti-inflammatoire	Stéroïde
	Aldostérone	Augmente la réabsorption rénale de sodium	Stéroïde
	Epinéphrine	Produit les mêmes effets qu'une stimulation sympathique	Aminée
Pancréas	Insuline	Entraîne l'entrée du glucose dans les cellules	Peptidique
	Glucagon	Stimule la synthèse et la libération de glucose par le foie	Peptidique
Parathyroïdes	Parathormone (PTH)	Entraîne l'hypercalcémie	Peptidique (continue)

¹ Les hormones peptidiques, protéiques et glycoprotéiques sont ici groupées dans la classe des hormones de structure peptidique.

(continuation)

Glande/tissu	Hormones	Fonctions majeures	Structure chimique ¹
Testicules	Testostérone	Intervient dans le développement des organes sexuels et caractères sexuels secondaires	Stéroïde
Ovaires	Œstrogènes	Intervient dans le développement des organes sexuels et caractères sexuels secondaires	Stéroïde
	Progestérone	Stimule l'endomètre	Stéroïde
Reins	Rénine	Catalyse la conversion d'angiotensinogène en angiotensine I	Peptidique
	1,25-alphadihydroxycholéciférol	Augmente l'absorption intestinale de calcium et minéralisation des os	Stéroïde
Estomac	Gastrine	Stimule la sécrétion d'acide par les cellules pariétales	Peptidique
Intestin grêle	Sécrétine	Stimule la sécrétion de bicarbonate et d'eau par le pancréas	Peptidique
Adipocytes	Leptine	Inhibe l'appétit et stimule la thermogenèse	Peptidique

Les concentrations d'hormones requises dans la circulation pour qu'elles exercent leurs fonctions sont extrêmement faibles, de l'ordre du picogramme au microgramme par millilitre de sang (Melvin et Luttge, 1982).

3 Les hormones stéroïdes

Les hormones stéroïdes sont des molécules synthétisées à partir du cholestérol dans les glandes surrénales et dans les glandes sexuelles (testicules et ovaires). Elles sont impliquées dans divers processus biologiques tels que la reproduction, la croissance ou encore l'homéostasie (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Les

structures chimiques des molécules de cholestérol et de quelques hormones stéroïdes sont représentées à la figure 1.

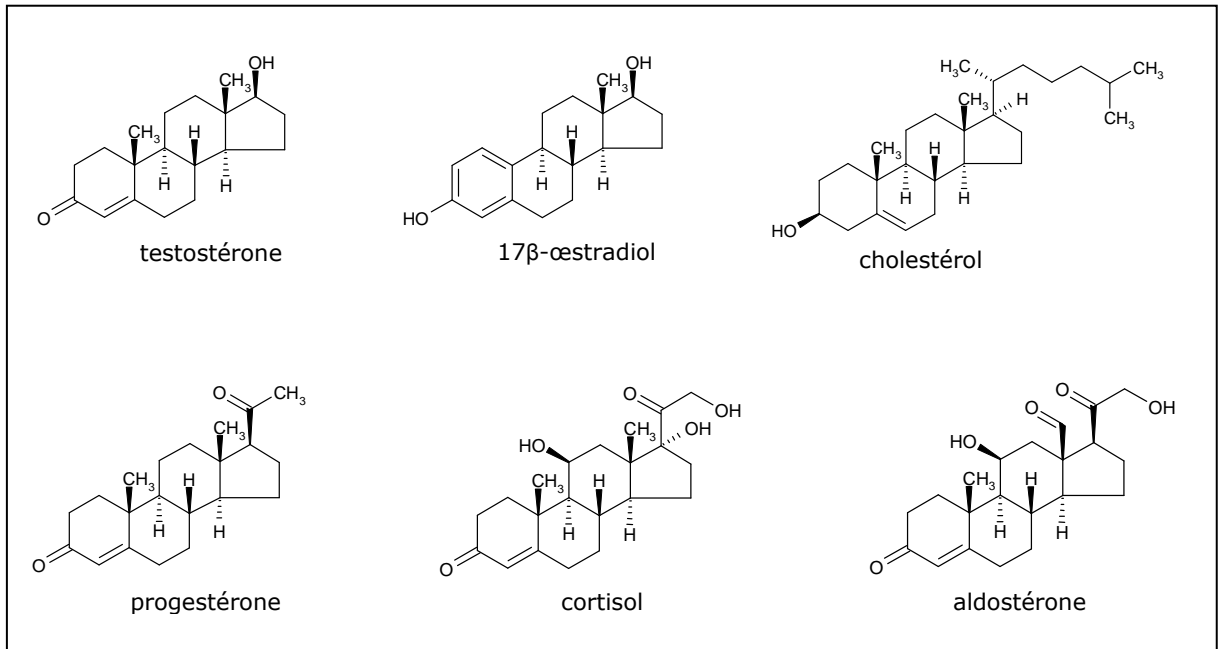


Figure 1 : structures chimiques des molécules de cholestérol et de quelques hormones stéroïdes.

Les hormones stéroïdes peuvent être divisées en trois groupes principaux :

- les hormones sexuelles féminines, tels que les œstrogènes et la progestérone ;
- les hormones sexuelles mâles, tels que les androgènes ;
- les corticostéroïdes, tels que la cortisone et l'aldostérone.

Les enzymes responsables de la biosynthèse des hormones stéroïdes sont des cytochromes P450 (CYP), indispensables au bon fonctionnement du système endocrine. Une activité enzymatique réduite ou absente occasionnerait des déficits hormonaux, qui engendreraient de graves conséquences comme la stérilité, la féminisation ou masculinisation, des maladies auto-immunes ou même des cancers (Chetrite *et al.*, 2000).

La conversion du cholestérol en prégnénolone est la première étape et aussi l'étape limitante de la biosynthèse de toutes les hormones stéroïdes. La prégnénolone peut être convertie par une réaction de déshydrogénation en progestérone qui peut ensuite être transformée en aldostérone par plusieurs étapes

d'hydroxylation et une étape d'oxydation. La prégnénolone peut être aussi convertie par une réaction d'hydroxylation en 17-hydroxyprégnénolone qui peut par la suite être transformée en cortisol par une réaction de déshydrogénation et deux étapes d'hydroxylation. Par un clivage de la liaison C17–C20, la 17-hydroxyprégnénolone peut encore être transformée en déhydroépiandrostérone, qui est convertie en testostérone après une réaction de déshydrogénation et une étape d'hydroxylation. La testostérone peut être convertie en 17 β -œstradiol au moyen d'une réaction d'aromatisation (White, 1994). Un schéma simplifié de la stéroïdogénèse est repris dans la figure 2.

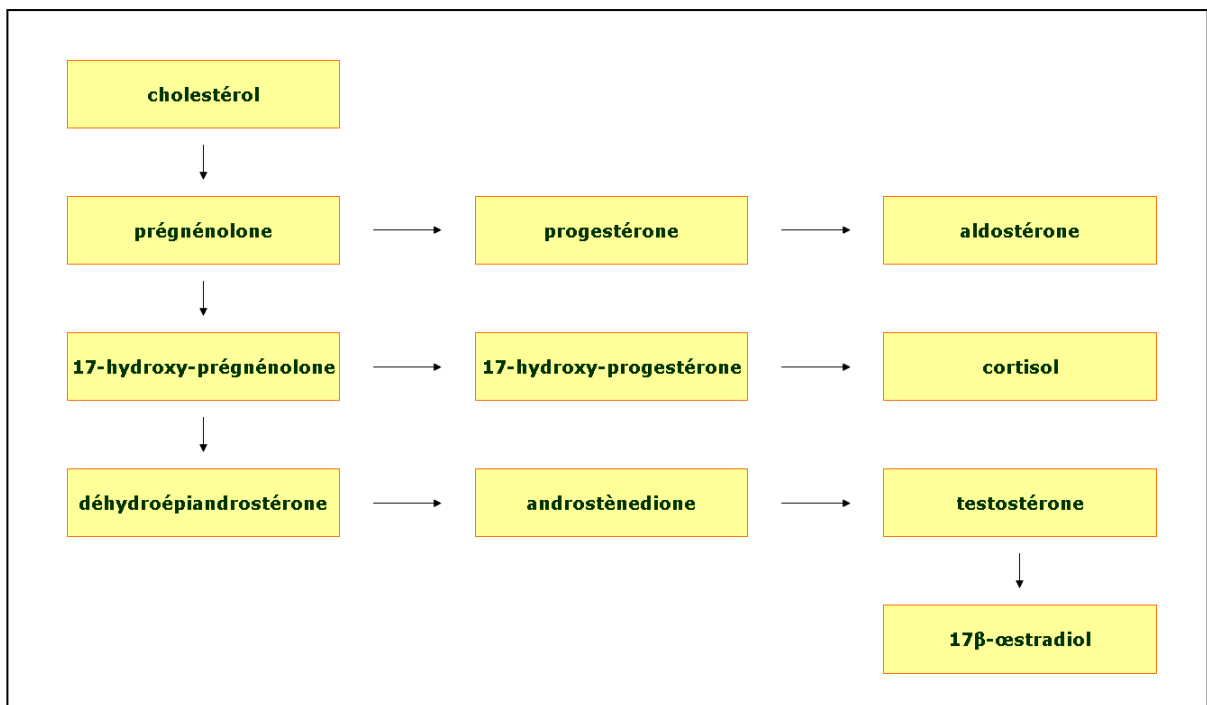


Figure 2 : schéma simplifié de la stéroïdogénèse (White, 1994).

Les hormones stéroïdes doivent se complexer avec des protéines plasmatiques de transport comme l'albumine ou certaines globulines de manière à être transportées dans la circulation sanguine. La fraction non liée (1 % – 10 % du total) représente la fraction biologiquement active des hormones, vu que le complexe protéine–hormone ne diffuse pas facilement dans les capillaires pour avoir accès aux cellules cibles (Guyton et Hall, 2006).

Le catabolisme des hormones stéroïdes est réalisé principalement dans le foie (Pikuleva, 2008), où des réactions d'hydroxylation, de conjugaison et d'oxydoréduction inactivent les hormones stéroïdes. Les réactions d'hydroxylation sont catalysées par une série d'hydroxylases de la famille CYP (catabolisme de phase I), tandis que les réactions de conjugaison sont catalysées principalement par de sulfotransférases et d'uridinediphosphoglucuronosyltransférases (catabolisme de phase II). Une fois que les métabolites des hormones stéroïdes atteignent la circulation sanguine, ils sont rapidement excrétés via la bile ou l'urine grâce à leur polarité élevée (You, 2004).

4 Les récepteurs aux hormones stéroïdes

Au niveau des capillaires sanguins qui irriguent les organes cibles, les hormones stéroïdes sont libérées des protéines de transport et traversent la paroi du capillaire en direction des cellules cibles. Les hormones stéroïdes, par leur caractère hydrophobe, sont capables de traverser librement la membrane plasmique afin de se lier à leurs récepteurs spécifiques intracellulaires (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Les récepteurs aux hormones stéroïdes font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires, et appartiennent à cette sous-famille le récepteur aux glucocorticoïdes, le récepteur aux minéralocorticoïdes, le récepteur aux androgènes, le récepteur aux œstrogènes et le récepteur aux progestagènes (Escriva *et al.*, 2000).

Les récepteurs de la superfamille des récepteurs nucléaires possèdent une structure commune (figure 3), comprenant :

- une partie N-terminale (domaines A/B) ;
- un domaine (C) de liaison au DNA (DBD) ;
- une région charnière (domaine D) ;
- une partie C-terminale (domaine E) possédant le domaine de liaison au ligand (LBD).

Une petite région variable (domaine F) peut être présente dans certains récepteurs, représentant dans ce cas particulier la partie C-terminale (Young et Hartl, 2002 ; Guerriero, 2009).

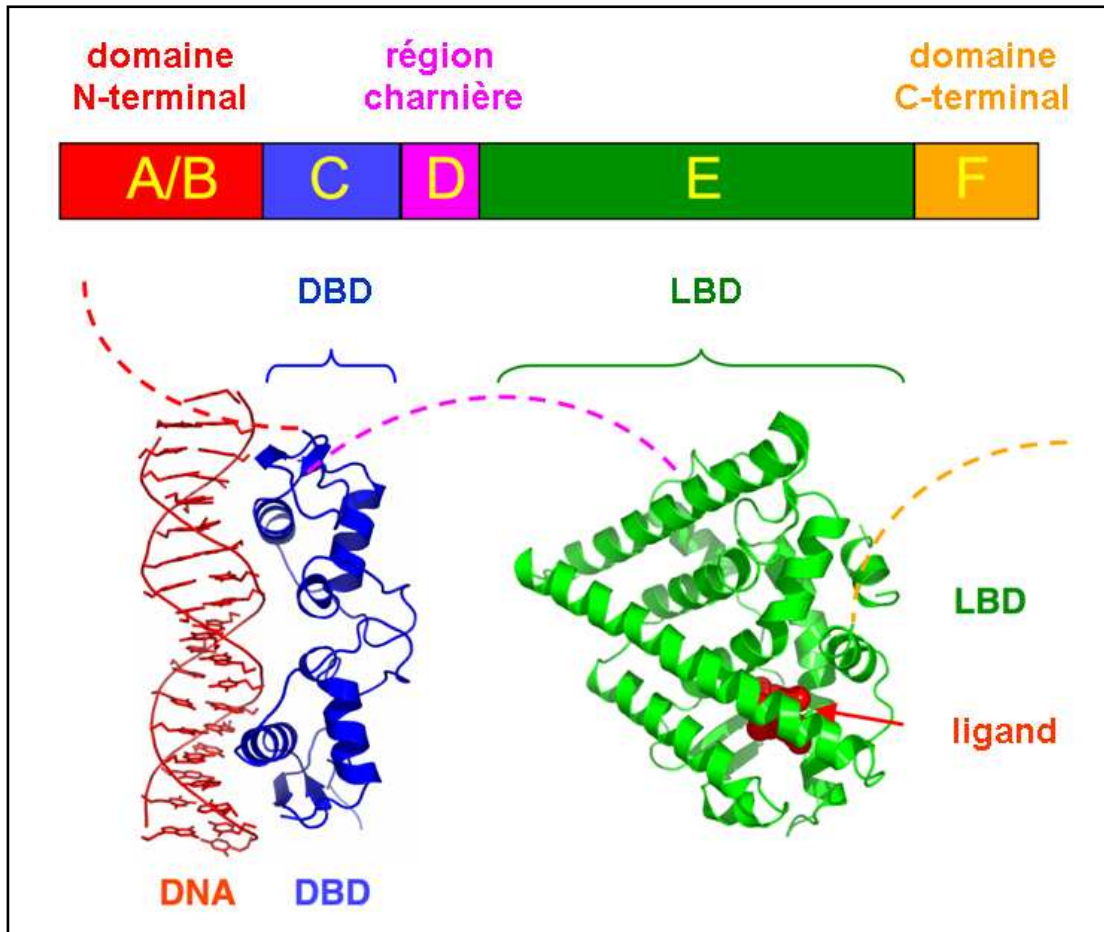


Figure 3 : structure des récepteurs nucléaires (Center for biomolecular modeling, sans date). DBD : *DNA binding domain* (domaine de liaison au DNA) ; LBD : *ligand binding domain* (domaine de liaison au ligand).

4.1 Le récepteur aux hormones œstrogènes (ER)

Les récepteurs aux hormones œstrogènes (ER) font partie de la famille des récepteurs aux hormones stéroïdes. Ils sont des facteurs de transcription ligand-inductibles, activés naturellement par les hormones œstrogènes. Ces récepteurs se

présentent sous deux formes différentes – ER α et ER β –, qui possèdent une structure en domaines similaire. Par contre, leurs distributions tissulaires et leurs activités transcriptionnelles sont distinctes (Jeanes *et al.*, 2008).

L'expression de l'ER α se fait principalement dans les organes sexuels féminins (ovaires, utérus, vagin et glandes mammaires), dans l'hypophyse et dans l'hypothalamus ; d'autre part l'ER β est plutôt exprimé dans les organes sexuels mâles et dans d'autres organes non-sexuels comme le cœur, les poumons ou encore les os (Couse *et al.*, 1997 ; Shughrue *et al.*, 1998 ; Muramatsu et Inoue, 2000 ; Yaghmaie *et al.*, 2005).

L'ER β semble être un inhibiteur compétitif de l'ER α , ainsi le rapport ER β /ER α est un facteur important à considérer dans la physiologie de l'œstradiol (Dieudonne *et al.*, 2004). Plusieurs études récentes démontrèrent que le rapport ER β /ER α pourrait influencer le fonctionnement de l'organisme et même prédire le développement des différentes maladies comme les cancers et l'obésité (Kalbe *et al.*, 2007 ; Konduri et Schwarz, 2007 ; Shin *et al.*, 2007 ; Yi *et al.*, 2008).

5 Les perturbateurs endocriniens qui contaminent les mammifères marins

Selon la Commission des Communautés européennes (2001), les perturbateurs endocriniens sont des « substances chimiques destinées être utilisées dans l'industrie, en agriculture et dans des produits de consommation » étant « suspectées d'entraîner un dérèglement du système endocrine des hommes et des animaux, et d'avoir des effets néfastes sur la santé en provoquant des cancers, des modifications du comportement et des anomalies de la reproduction ». Le 26 octobre 2000, le Parlement européen a adopté une résolution sur les perturbateurs endocriniens, qui encourage l'application du principe de précaution.

Plusieurs observations réalisées ces dernières années ont dirigé l'attention et l'inquiétude de la communauté scientifique vers le problème des perturbateurs endocriniens. Les événements historiques cités ci-dessous ont été de grande importance pour mettre en évidence le problème et lancer le débat sur ces substances.

Entre les années 1940 et 1970, le diéthylstilbestrol (DES) a été administré aux femmes enceintes comme un moyen sécuritaire de prévenir les avortements et les accouchements prématurés. Plusieurs années plus tard, il a été constaté que les filles exposées *in utero* au DES avaient un risque plus important de développer des malformations et des cancers génitaux (Bornstein *et al.*, 1988 ; Miyakoshi *et al.*, 2009).

Dans les années 1990, après une contamination accidentelle par le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), la population d'alligators du Lac Apopka (Etats-Unis) a subi une importante diminution. Aujourd'hui, il est connu qu'une exposition au DDT et ses métabolites entraîne chez les alligators une atrophie du pénis et une diminution de la quantité de testostérone, empêchant toute reproduction (Guillette *et al.*, 1996 ; Willingham et Crews, 1999 ; Milnes *et al.*, 2005).

Enfin, il est évident que la qualité spermatique de la population humaine a diminué drastiquement au cours du XX^e siècle. Plusieurs études menées dans les pays scandinaves essaient d'établir le lien entre l'exposition aux perturbateurs endocriniens et la diminution de la qualité spermatique chez l'homme (Skakkebaek, 2002 ; Bay *et al.*, 2006 ; Giwercman *et al.*, 2006).

Les perturbateurs endocriniens peuvent altérer le fonctionnement du système endocrine :

- en endommageant un organe endocrine ;
- en altérant directement la fonction d'un organe endocrine ;
- en mimant l'action d'une hormone endogène (effet agoniste) ;
- en bloquant les récepteurs aux hormones dans les cellules (effet antagoniste) ;

– en affectant la synthèse, le transport, le métabolisme, et l'excrétion des hormones (Bila et Dezotti, 2007 ; Scippo et Maghuin-Rogister, 2007).

Quelques substances capables de provoquer une perturbation endocrinienne sont regroupées, selon Bia et Dezotti (2007), dans le tableau 3 suivant leurs classes et leurs utilisations.

Tableau 3 : les différentes classes de perturbateurs endocriniens, les principaux perturbateurs endocriniens et leurs utilisations (Bila et Dezotti, 2007).

Classe	Perturbateur endocrinien	Utilisation
Substances naturelles	Phyto-œstrogènes	Composés non stéroïdaux produits naturellement par les plantes.
	Myco-œstrogènes	Stéroïdes produits par quelques espèces de champignons.
Substances synthétiques utilisées en agriculture et leurs sous-produits	Dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT)	Pesticide.
	Aldrine	Insecticide.
	Lindane	Insecticide.
	Vinclozolin	Fongicide.
Substances synthétiques utilisées en industrie ou qui en sont issues et leurs sous-produits	Dioxines	Sous-produits de la combustion de substances organochlorées.
	Polychlorobiphényles (PCB)	Lubrifiants et isolants électriques.
	Polybromodiphényléthers (PBDE)	Retardateurs de flamme dans les produits plastiques et textiles.
	Alkylphénols	Surfactants dans la fabrication d'agents tensioactifs, résines phénoliques et pesticides.
	Phtalates	Plastifiants de matières plastiques.
	Tributylétain (TBT)	<i>Antifouling</i> ² .
Hormones de synthèse	Ethinylestradiol	Formulation des pilules contraceptives.
	Diéthylstilbestrol (DES)	Prévention de fausses couches jusqu'aux années 1970.

Certains perturbateurs endocriniens sont persistants et peuvent être transférés dans l'atmosphère, l'eau, les sédiments, les sols et les aquifères. L'interaction avec les compartiments biologiques joue également un rôle important, tant pour la biodégradation des substances que pour leur bioconcentration dans les chaînes alimentaires. On retrouve par exemple des PCB, du DDT ou des dioxines dans la graisse des mammifères marins ou des animaux polaires qui vivent loin des lieux de pollution (Ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et

²Un *antifouling* est une peinture destinée à empêcher les organismes marins de se fixer sur la coque des navires.

de l'aménagement du territoire de France, 2003 ; Institut de formation en soins animaliers, 2004).

En dehors du DES et de situations accidentelles, une relation causale entre une exposition à une substance spécifique et des effets néfastes sur la santé humaine via un mécanisme de perturbation endocrinienne n'a pas encore été établie de façon certaine. L'étude des effets des perturbateurs endocriniens doit faire appel à des domaines divers de la biologie. L'absence d'une connaissance intégrée est l'une des causes des controverses scientifiques actuelles. Trois autres facteurs contribuent à cet état de controverse :

- la difficulté d'extrapoler à l'homme les résultats des tests réalisés sur des animaux ;
- l'ampleur du nombre de substances à tester, susceptibles de se comporter comme des perturbateurs endocriniens ;
- la difficulté qu'il y a à mener des études épidémiologiques capables de mettre en évidence des effets à faibles doses (Ministère de l'écologie, de l'énergie, du développement durable et de l'aménagement du territoire de France, 2003 ; Grandjean *et al.*, 2008).

5.1 Le DDT

Le DDT est l'insecticide le plus connu du groupe des organochlorés. Il figure parmi les substances synthétiques les plus étudiées et les plus utilisées au XX^e siècle, étant massivement employé en agriculture entre les années 1940 et 1970. De nos jours, malgré l'interdiction de son usage dans plusieurs régions, les programmes de combat des vecteurs de maladies tropicales dans les pays en voie de développement emploient toujours cet insecticide.

L'insecticide appelé DDT est un mélange du DDT proprement dit (*p,p'*-DDT), de son métabolite DDD (dichlorodiphényldichloroéthane) et de leurs isomères, et a

généralement la composition suivante : *p,p'*-DDT (77,1 %), *o,p'*-DDT (14,9 %), *p,p'*-DDD (0,3 %) et *o,p'*-DDD (0,1 %). La dégradation environnementale ou biologique du DDT est à l'origine du DDE (dichlorodiphényldichloroéthylène), qui est une molécule encore plus persistante que le DDT (d'Amato *et al.*, 2002).

Le DDT et ses métabolites sont suspectés de mimer l'action des hormones œstrogènes et de bloquer le récepteur aux hormones androgènes (Kelce *et al.*, 1995 ; Willemsen *et al.*, 2004). D'autres études ont encore suggéré que le DDT pourrait être associé à la diminution de la densité osseuse et au risque de développement des cancers mammaires (Beard *et al.*, 2000 ; Romieu *et al.*, 2000).

5.2 Le lindane

Le lindane est un insecticide à large spectre d'activité. En agriculture, il est utilisé contre les organismes suceurs et rongeurs. Il est également employé pour ses propriétés antiparasitaires dans les mesures d'hygiène humaine et vétérinaire. Son processus de fabrication entraîne la production de 80 % à 90 % d'isomères résiduels non désirables, car seul l'isomère γ possède des propriétés insecticides (Institut national de l'environnement industriel et des risques de France, 2007). Le produit appelé « hexachlorocyclohexane (HCH) technique » contient entre 60 % et 70 % de α -HCH, entre 5 % et 12 % de β -HCH, entre 10 % et 15 % de γ -HCH et entre 6 % et 10 % de δ -HCH. Ces isomères sont ceux qui ont le plus de répercussions environnementales. L'isomère γ purifié est commercialisé sous le nom de « lindane » (Commission de coopération environnementale, 2006). Son utilisation est interdite dans la plus grande partie des pays développés depuis les années 1970.

L'activité de perturbateur endocrinien du lindane est associée à sa capacité à dérégler des mécanismes hormono-dépendants, affectant les systèmes nerveux, immunitaire et reproducteur (Maranghi *et al.*, 2007).

5.3 L'hexachlorobenzène

L'hexachlorobenzène (HCB) était utilisé jusqu'aux années 1980, surtout en tant que fongicide pour l'enrobage des semences et le traitement des sols. Il était également utilisé dans plusieurs procédés industriels comme agent fondant dans la fusion de l'aluminium, comme régulateur de porosité dans la fabrication d'électrodes en graphite ou comme agent peptisant du caoutchouc. En Europe, il n'est plus ni produit intentionnellement, ni commercialisé depuis 1993. Il peut être produit de façon involontaire au cours de certaines fabrications, principalement dans l'industrie du chlore et des solvants chlorés, ou de l'incinération des déchets (Institut national de l'environnement industriel et des risques de France, 2005).

L'HCB peut produire des effets neurotoxiques et des troubles des systèmes immunitaire et reproducteur. Il est aussi connu pour altérer le fonctionnement de la thyroïde et pour induire le développement de certains types de cancers (Brucker-Davis *et al.*, 2008 ; Kumar *et al.*, 2008 ; Chiappini *et al.*, 2009).

5.4 Les polychlorobiphényles

Les polychlorobiphényles (PCB) sont des dérivés chimiques chlorés très utilisés dans l'industrie depuis les années 1930 pour leurs qualités d'isolation électrique, de lubrification et d'inflammabilité. On les retrouvait notamment comme isolants dans les transformateurs électriques et les condensateurs, comme lubrifiants dans les turbines et les pompes ou comme composants d'huiles, de soudures,

d'adhésifs, de peintures et de papiers autocopiants. Ils ont cessé d'être produits dans les années 1980. La directive 96/59/CE du Conseil de l'Union européenne (1996) conduit à l'établissement d'un inventaire puis d'un plan d'élimination progressif et de décontamination des appareils contenant des PCB.

Les PCB sont peu biodégradables, persistantes dans l'environnement et s'accumulent dans les organismes vivants, le long de la chaîne alimentaire (Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement durable et de l'Aménagement du territoire de France, 2008). En vertu de la directive 2000/60/CE du Parlement européen et de du Conseil de l'Union européenne (2000), toutes les eaux d'Europe doivent atteindre un « bon état écologique » avant 2015. Pour cela, des études sur la dépollution des fleuves et des cours d'eau touchés par la pollution aux PCB ont été déjà mises en place.

Les PCB agissent sur le métabolisme de la thyroxine, affectent le système reproductif (activités œstrogéniques et anti-androgéniques), et présentent des effets immunotoxiques (Smith et Gangolli, 2002).

6 Méthodes d'étude des perturbateurs endocriniens

Plusieurs tests *in vivo* et *in vitro* ont été développés pour détecter et pour analyser les mécanismes d'action et les effets des perturbateurs endocriniens ou des substances suspectées d'être des perturbateurs endocriniens. Par contre, aucune approche standardisée n'existe pour le moment. Cependant, l'Agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (EPA) et l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) mènent de recherches afin d'élaborer et de valider de lignes directrices pour les essais visant à étudier les perturbateurs endocriniens. Ces recherches ont également comme but d'harmoniser les méthodes de caractérisation des dangers et des risques liés à l'exposition aux perturbateurs

endocriniens (U.S. environmental protection agency, 2007 ; Organisation de coopération et de développement économiques, 2008).

Les tests *in vivo* permettent d'évaluer les effets globaux résultants d'une exposition aux perturbateurs endocriniens. Ils sont basés sur des paramètres comme la variation du poids des organes hormono-dépendants ou la différenciation cellulaire suite à une exposition aux substances étudiées. Ils permettent également d'étudier la bioaccumulation des différentes molécules et ses effets à long terme sur un organisme ou sur sa progéniture. Leur coût élevé, leur complexité et leur faible sensibilité les rendent trop lourds à utiliser en routine. Ils doivent donc être utilisés après une sélection par criblage (Zacharewski, 1997).

Les tests *in vitro* peuvent fournir des informations importantes liées aux mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens au niveau moléculaire, tout en étant limités quand à la production des données sur l'absorption, le métabolisme ou l'excrétion de la molécule en question. D'après Baker (2001), les principaux tests *in vitro* utilisés sont :

- les tests de liaison sur récepteur (mesurent l'affinité d'une substance pour les récepteurs aux hormonaux) ;
- les tests de prolifération cellulaire (analysent la capacité d'une substance à stimuler la prolifération des cellules sensibles aux hormones) ;
- les tests du type « gène rapporteur » (basé sur la capacité d'une substance à activer la transcription d'un gène rapporteur exogène inséré dans le génome des cellules).

Les méthodes physico-chimiques telles que la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) permettent d'identifier et de quantifier les substances individuellement dans un échantillon inconnu (Scippo et Maghuin-Rogister, 2007). Par contre, ce sont des méthodes plus coûteuses, plus lourdes à mettre en œuvre et qui nécessitent la connaissance préalable des résidus susceptibles d'être présents dans les échantillons.

7 Objectifs

Le but de ce travail est :

- d'évaluer l'activité hormonale de 13 polluants organochlorés majeurs (*p,p'*-DDT ; *o,p'*-DDT ; *p,p'*-DDD ; *o,p'*-DDD ; *p,p'*-DDE ; α -HCH ; β -HCH ; γ -HCH ; δ -HCH ; HCB ; PCB 138 ; PCB 135 ; PCB 180) présents dans la Mer du Nord au moyen de tests *in vitro* du type « gène rapporteur » ;

- de quantifier ces polluants dans des échantillons de graisse de marsouin commun en utilisant la GC-MS ;

- et finalement de mesurer l'éventuelle activité hormonale de ces échantillons également par des tests *in vitro* du type « gène rapporteur ».

Quelques caractéristiques physico-chimiques des 13 polluants organochlorés étudiés dans ce mémoire figurent dans le tableau 4.

Tableau 4 : caractéristiques physico-chimiques des 13 polluants organochlorés étudiés dans ce mémoire selon leur fournisseur.

Composé	Formule chimique	Masse moléculaire (g/mol)	Température de fusion (°C)	Température d'ébullition (°C)
<i>p,p'</i> -DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354	107 – 110	n.d.
<i>o,p'</i> -DDT	C ₁₄ H ₉ Cl ₅	354	73 – 75	n.d.
<i>p,p'</i> -DDD	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	320	109 – 111	n.d.
<i>o,p'</i> -DDD	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₄	320	77 – 48	n.d.
<i>p,p'</i> -DDE	C ₁₄ H ₈ Cl ₄	318	88 – 90	n.d.
α -HCH	C ₆ H ₆ Cl ₆	291	158 – 159	n.d.
β -HCH	C ₆ H ₆ Cl ₆	291	300 – 304	n.d.
γ -HCH	C ₆ H ₆ Cl ₆	291	113 – 114	n.d.
δ -HCH	C ₆ H ₆ Cl ₆	291	229	n.d.
HCB	C ₆ Cl ₆	285	230	323 – 326
PCB 138	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	361	79 – 80	n.d.
PCB 153	C ₁₂ H ₄ Cl ₆	361	103 – 104	n.d.
PCB 180	C ₁₂ H ₃ Cl ₇	395	109 – 110	n.d.

La figure 4 reprend les structures chimiques des 13 polluants cibles de cette étude.

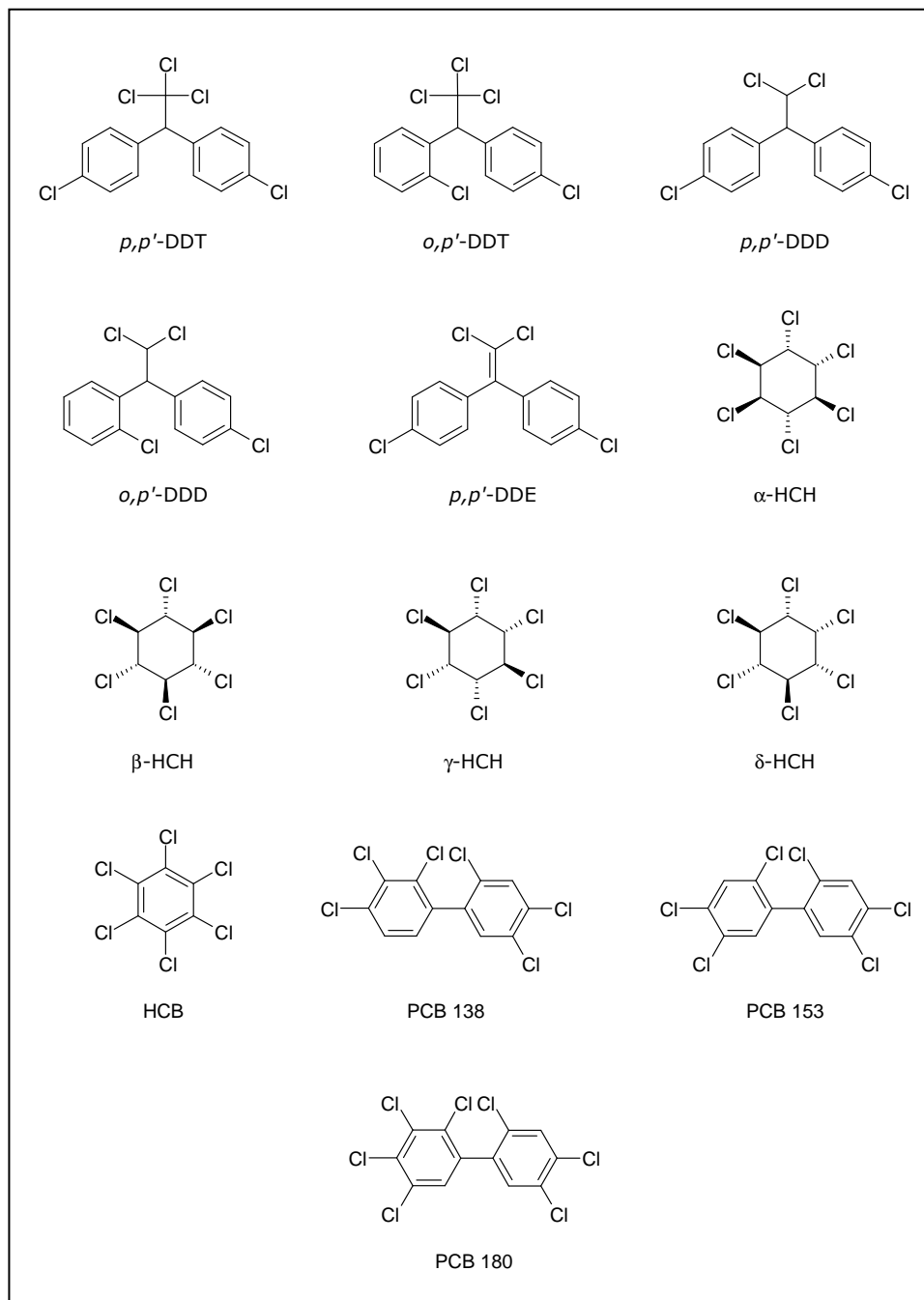


Figure 4 : structures chimiques des 13 polluants étudiés dans le cadre de ce mémoire.

Dans cette étude, la graisse de marsouin sera utilisée comme bioindicateur de la contamination par les perturbateurs endocriniens des milieux marins, et donc des denrées alimentaires d'origine marine.

MATERIEL ET METHODES

1 Matériel, réactifs, solvants et milieux

Le tableau 5 répertorie tout le matériel, les réactifs, les solvants et les milieux utilisés pour la réalisation de ce travail, ainsi que les coordonnées de leur fournisseur.

Tableau 5 : matériels réactifs, solvants et milieux et leur fournisseur.

Matériel, réactifs, solvants et milieux	Fournisseurs
Acétone	VWR (Louvain, Belgique)
Acétonitrile	Biosolve (Valkenswaard, Pays-Bas)
Acide sulfurique	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
Antibiotique (solution 10.000 U/mL de pénicilline G et 10.000 µg/mL de streptomycine)	Fisher Bioblock Scientific (Tournai, Belgique)
Blanc de bœuf	Carrefour (Belgique)
Carbonate basique de magnésium	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
CDTA	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
Charbon	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
Chromatographe en phase gazeuse Focus	Interscience (Louvain-la-Neuve, Belgique)
Colonne chromatographique HT8	VWR (Louvain, Belgique)
Dextrane	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
Diazote	Air Liquide (Liège, Belgique)
<i>o,p'</i> -DDD	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
<i>p,p'</i> -DDD	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)

(continue)

(continuation)

Matériel, réactifs, solvants et milieux	Fournisseurs
<i>p,p'</i> -DDE	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
<i>o,p'</i> -DDT	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
<i>p,p'</i> -DDT	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
Dichlorométhane	VWR (Louvain, Belgique)
DMEM	Fisher Bioblock Scientific (Tournai, Belgique)
DMEM sans rouge phénol	Fisher Bioblock Scientific (Tournai, Belgique)
DTT	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
Eau pour HPLC	VWR (Louvain, Belgique)
EDTA	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
Filtres Minisart 0,2 µm	Sartorius (Vilvorde, Belgique)
Flacons de culture cellulaire à bouchons ventilés de 75 cm ² de surface de culture	Greiner Bio-One (Wommel, Belgique)
Gaz carbonique	Air Liquide (Liège, Belgique)
Glycérol	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
HBSS	Fisher Bioblock Scientific (Tournai, Belgique)
HCB	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
α-HCH	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
β-HCH	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
γ-HCH	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
δ-HCH	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
Hélium	Air Products (Bruxelles, Belgique)
Hexane	LGC Standards (Molsheim, France)
Homogénéisateur de laboratoire Stomacher Lab-Blender 80	Seward Medical (Londres, Royaume-Uni)
Hotte à flux laminaire	VWR (Louvain, Belgique)
Incubateur à CO ₂	Laborimpex (Bruxelles, Belgique)
Insuline	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
D-Luciférine (sel de potassium)	Synchem OHG (Cassel, Allemagne)
Luminomètre Orion II	BRS (Drogenbos, Belgique))
Méthanol	VWR (Louvain, Belgique)
Nonane	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
17β-Œstradiol	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
Oxyde d'aluminium	VWR (Louvain, Belgique)
PBS	Oxoid (Tronchiennes, Belgique)
PCB 80 ¹³ C (40 ng/µL dans du nonane)	Promochem (Wesel, Allemagne)
PCB 138 (10 ng/µL dans de l'isooctane)	Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-la-Grande, France)
PCB 153 (10 ng/µL dans de l'isooctane)	Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-la-Grande, France)
PCB 180 (10 ng/µL dans de l'isooctane)	Cluzeau Info Labo (Sainte-Foy-la-Grande, France)
Plaque 96 puits	Greiner Bio-One (Wommel, Belgique)
Sac pour Stomacher	LED Techno (Hechtel-Eksel, Belgique)

(continue)

(continuation)

Matériel, réactifs, solvants et milieux	Fournisseurs
Sérum fœtal de bœuf	Fisher Bioblock Scientific (Tournai, Belgique)
Silice	VWR (Louvain, Belgique)
Spectromètre de masse Polaris Q	Interscience (Louvain-la-Neuve, Belgique)
Sulfate de sodium	Filter Service (Eupen, Belgique)
Tricine	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
Tris	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Bornem, Belgique)
Trypsine	Fisher Bioblock Scientific (Tournai, Belgique)

2 Le test du type « gène rapporteur »

Le principe du test du type « gène rapporteur » consiste à utiliser des lignées cellulaires génétiquement modifiées pour étudier la capacité biologique d'une substance ou d'un échantillon à activer ou inhiber le récepteur intracellulaire régulateur de la transcription du gène rapporteur. Un gène rapporteur sous le contrôle d'un élément de réponse est inséré dans l'ADN de la cellule. Suite à la liaison du ligand (naturel ou exogène) à son récepteur intracellulaire spécifique, le complexe ligand-récepteur se lie à l'élément de réponse et la transcription du gène rapporteur est initiée. Les gènes rapporteurs utilisés expriment des protéines exerçant une activité enzymatique dont la quantification est possible. Lorsque des récepteurs hormonaux sont impliqués, ce type de test permet de mettre en évidence l'activité hormonale de la substance ou de l'échantillon étudié.

Quatre lignées cellulaires ont été utilisées dans le cadre de ce mémoire, sensibles respectivement aux hormones progestagènes, androgènes, glucocorticoïdes et œstrogènes. Les lignées cellulaires ont été construites au laboratoire de génie génétique et de biologie moléculaire de l'Université de Liège (Willemsen *et al.*, 2004).

La lignée TM-Luc a été obtenue à partir de l'insertion d'un vecteur rapporteur (MMTV-Luc) contenant le gène codant pour la luciférase sous contrôle du promoteur MMTV-LTR – inductible par les hormones stéroïdes par l'intermédiaire de la liaison à leur récepteur – dans le génome des cellules T47D (de carcinome mammaire humain), qui expriment naturellement les récepteurs aux progestagènes.

Les cellules TARM-Luc ont été générées par transfection de la lignée TM-Luc avec un vecteur d'expression codant pour un hAR (récepteur aux androgènes humain) fonctionnel. Similairement, la lignée TGRM-Luc a été obtenue par transfection des cellules TM-Luc avec un vecteur rapporteur MMTV-Luc codant pour un hGR α (récepteur humain aux glucocorticoïdes)

Les cellules MCF-7-ERE sont issues de la lignée MCF-7 (cellules tumorales mammaires humaines œstrogéno-dépendants). Un vecteur rapporteur constitué du gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur de la vitellogénine – qui est sous le contrôle strict des œstrogènes – a été inséré dans le génome de ces cellules. Le mécanisme moléculaire d'action du 17 β -œstradiol et des agonistes du récepteur aux hormones œstrogènes dans le test cellulaire du type gène rapporteur utilisant des cellules MCF-7-ERE est repris à la figure 5. Les trois autres lignées cellulaires fonctionnent de manière similaire.

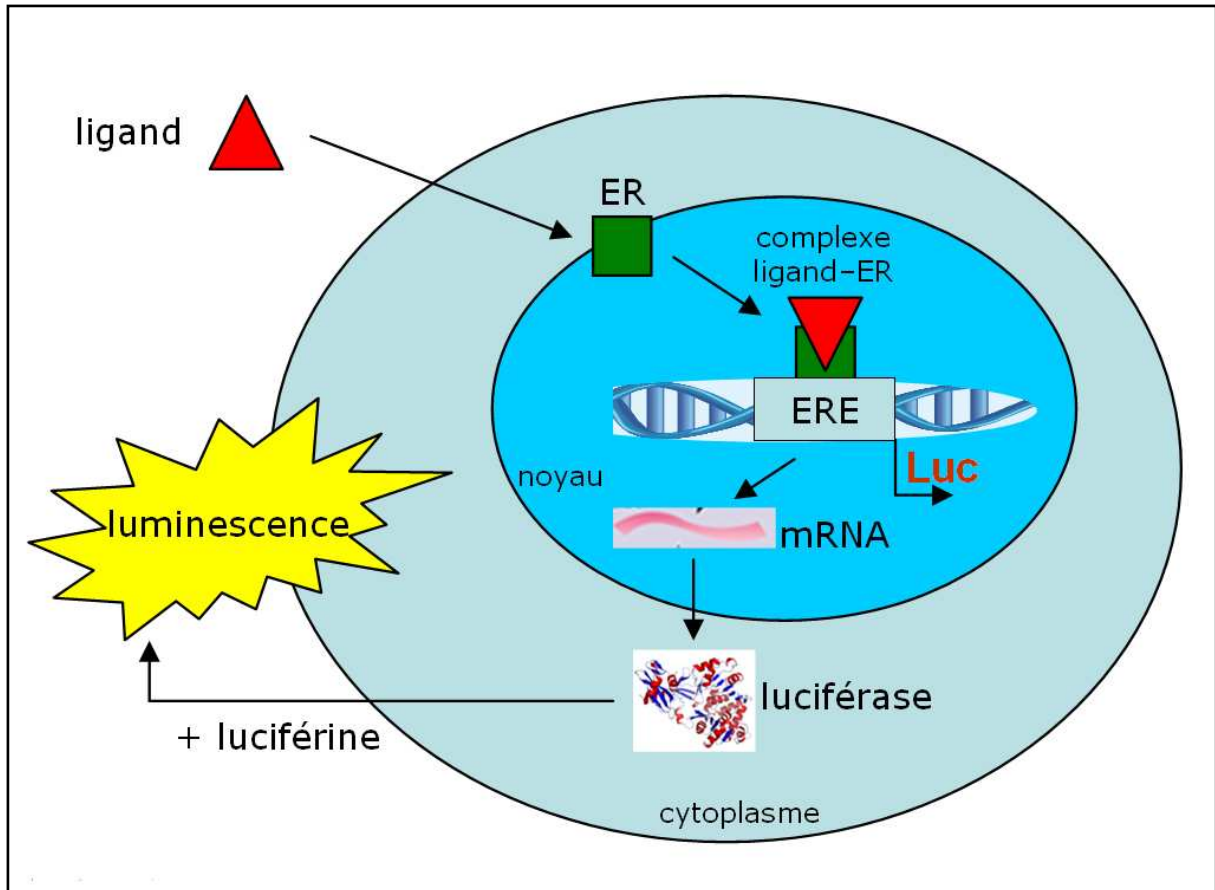


Figure 5 : mécanisme moléculaire d'action du 17 β -œstradiol et des agonistes du récepteur aux hormones œstrogènes dans le test cellulaire du type gène rapporteur en utilisant des cellules MCF-7-ERE développé par Willemssen et collaborateurs (2004). ER : récepteur aux hormones œstrogènes ; ERE : élément de réponse aux œstrogènes ; Luc : gène codant pour l'enzyme luciférase.

Toutes les lignées cellulaires décrites ci-dessus sont manipulés sous hotte à flux laminaire et cultivées dans 20 mL de milieu DMEM supplémenté (avec 10 % de FCS, 1 % d'antibiotiques – solution 10.000 U/mL de pénicilline G et 10.000 μ g/mL de streptomycine – et 0,01 % d'insuline) dans des flacons de culture cellulaire à bouchons ventilés de 75 cm² de surface de culture et incubées à 37 °C sous 5 % de CO₂ et 100 % d'humidité. Les cellules adhèrent à la surface du flacon et forment une couche monocellulaire. Lorsque les cellules atteignent une confluence de 80 % à 100 % on doit effectuer un passage cellulaire. Pour cela, le milieu est enlevé, et les cellules sont lavées avec 10 mL d'HBSS. Ensuite, afin de les décoller du fond du flacon, 3 mL d'une solution de trypsine sont ajoutés, et le flacon est remis dans l'incubateur à 37 °C pendant cinq à sept minutes pour laisser agir la trypsine. Les cellules sont récupérées dans 10 mL de milieu DMEM supplémenté frais, et une

partie de cette suspension est transférée dans un autre flacon contenant du milieu frais suivant la dilution souhaité (de deux à cinq fois).

Lorsque l'on souhaite évaluer l'activité hormonale d'une substance ou d'un échantillon, il faut transférer les cellules en plaques 96 puits comme suit : pour toutes les lignées (sauf MCF-7-ERE) la suspension obtenue lors d'un passage cellulaire est encore diluée d'un facteur deux (pour la lignée TARM-Luc) ou trois (pour les lignées TM-Luc et TGRM-Luc), et avec 100 µL de cette deuxième suspension chacun des 60 puits intérieurs d'une plaque 96 puits est rempli. Pour la lignée MCF-7-ERE, un jour avant la trypsinisation le milieu DMEM supplémenté est enlevé et remplacé, après deux lavages des cellules avec 10 mL d'une solution de PBS filtré préalablement à l'aide des filtres Ministar 0,2 µm (afin de la stériliser), par 20 mL de milieu DMEM sans rouge phénol supplémenté (avec 10 % de FCS traité au charbon-dextrane³). Après 24 heures, les cellules sont de nouveau lavées avec 10 mL d'une solution de PBS stérile et, après trypsinisation, les cellules sont récupérées dans 10 mL de milieu DMEM sans rouge phénol supplémenté frais. La suspension cellulaire est diluée d'un facteur deux, et avec 100 µL de cette deuxième suspension chacun des 60 puits intérieurs d'une plaque 96 puits est rempli. Les 36 puits bordant la plaque sont remplis avec 200 µL d'une solution d'HBSS ou PBS stérile selon la lignée afin d'assurer une homogénéité de température. Les plaques sont incubées une nuit à 37 °C sous 5 % de CO₂ et 100 % d'humidité.

Le lendemain, les cellules sont exposées aux composés à tester par ajout de 100 µL de milieu de culture contenant chaque substance ou échantillon à tester diluée dans un solvant approprié, par puits.

Pour l'étude de l'activité agoniste (capacité d'un composé de mimer une hormone endogène), les cellules sont exposées aux composés à tester seuls, dilués à cinq concentrations différentes (0,64 ng/puits ; 3,2 ng/puits ; 16 ng/puits ; 80 ng/puits et 400 ng/puits). La concentration finale du solvant dans le milieu dans ce cas-ci est de 0,4 %.

³ Le traitement du FCS au charbon-dextrane consiste en incuber du FCS à 45 °C pendant 45 min en présence du charbon-dextrane, et permet, après filtration du FCS, l'élimination de l'œstradiol sérique, qui pourrait avoir une influence sur l'expression de la luciférase par les cellules MCF-7-ERE.

Pour l'étude de l'activité anti-œstrogénique (capacité d'un composé d'empêcher la liaison d'une hormone à son récepteur), les cellules sont exposées aux composés à tester dilués à cinq concentrations différentes (0,64 ng/puits ; 3,2 ng/puits ; 16 ng/puits ; 80 ng/puits et 400 ng/puits), en présence du ligand de référence à une concentration proche son EC₅₀ (concentration en hormone requise pour obtenir 50 % de la réponse maximale). La concentration finale du solvant dans le milieu dans ce cas est de 0,8 %.

L'exposition des cellules aux produits testés dure 48 heures (ou 24 heures pour la lignée MCF-7-ERE) dans un incubateur à 37 °C, sous 5 % de CO₂ et 100 % d'humidité.

Pour chaque plaque 96 puits, les cellules sont exposées à des solutions de concentrations connues en ligand de référence, de manière à établir une courbe d'étalonnage.

Une fois le temps d'exposition aux composés écoulé, les plaques sont examinées au microscope afin de repérer les puits présentant des cellules ayant d'éventuelles anomalies morphologiques (signe de cytotoxicité). Les cellules sont ensuite lysées afin de libérer la luciférase produite. Pour ce faire, les 200 µL de milieu sont retirés de chaque puits. Les cellules adhérant aux puits sont lavées avec 100 µL d'une solution de PBS et ensuite 50 µL de solution de lyse (tableau 6) sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques doivent être incubées à – 18°C au moins 2 heures (une semaine au maximum) pour compléter la lyse cellulaire.

Tableau 6 : composition de la solution de lyse, après avoir ajusté le volume à 1 L d'eau pour HPLC. s/o : sans objet.

Composé	Masse (g)	Volume (mL)	Masse moléculaire	Concentration
Tris	3,03	s/o	121,14	25,01 mM
DTT	0,31	s/o	154,24	2,01 mM
CDTA	0,73	s/o	364,35	2,00 mM
Glycérol	s/o	100,00	92,09	10,00 %
Triton X-100	s/o	10,00	250,38	1,00 %

Une heure avant la lecture de la luminescence, la plaque est remise à température ambiante. La lecture est effectuée à l'aide d'un luminomètre. Cet appareil chauffe la plaque à 25°C, injecte 100 µL d'une solution contenant les substrats (luciférine et ATP) et les cofacteurs de la luciférase (tableau 7) et mesure ensuite la quantité de luminescence produite.

Le traitement des données est fait par le logiciel Simplicity 4.2, qui enregistre la luminescence de chaque puits en RLU/s et exporte les valeurs automatiquement vers un classeur dans le logiciel Microsoft Office Excel. Avec les données de luminescence correspondant à l'exposition au ligand de référence, une courbe dose-réponse est obtenue (figure 6). La relation entre la concentration en hormone et la

réponse en RLU/s est établie selon l'équation $y = \frac{a_0}{1 + \left(\frac{x}{a_1}\right)^{a_2}}$, où y = RLU/s mesurés ;

x = concentration en ligand, a₀ = réponse maximale en RLU/s ; a₁ = EC₅₀ ; a₂ = pente de la courbe.

Tableau 7 : composition de la solution contenant les substrats et les cofacteurs de la luciférase, après avoir ajusté le volume à 1 L d'eau pour HPLC.

Composé	Masse (g)	Masse moléculaire	Concentration (mM)
Tricine	3,58	179,17	19,98
(MgCO ₃) ₄ · Mg(OH) ₂ · 5H ₂ O	0,52	485,69	1,07
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,66	246,48	2,68
EDTA	0,04	372,23	0,11
DTT	5,14	154,24	33,32
ATP	0,29	507,21	0,57
luciférine	0,15	280,33	0,04

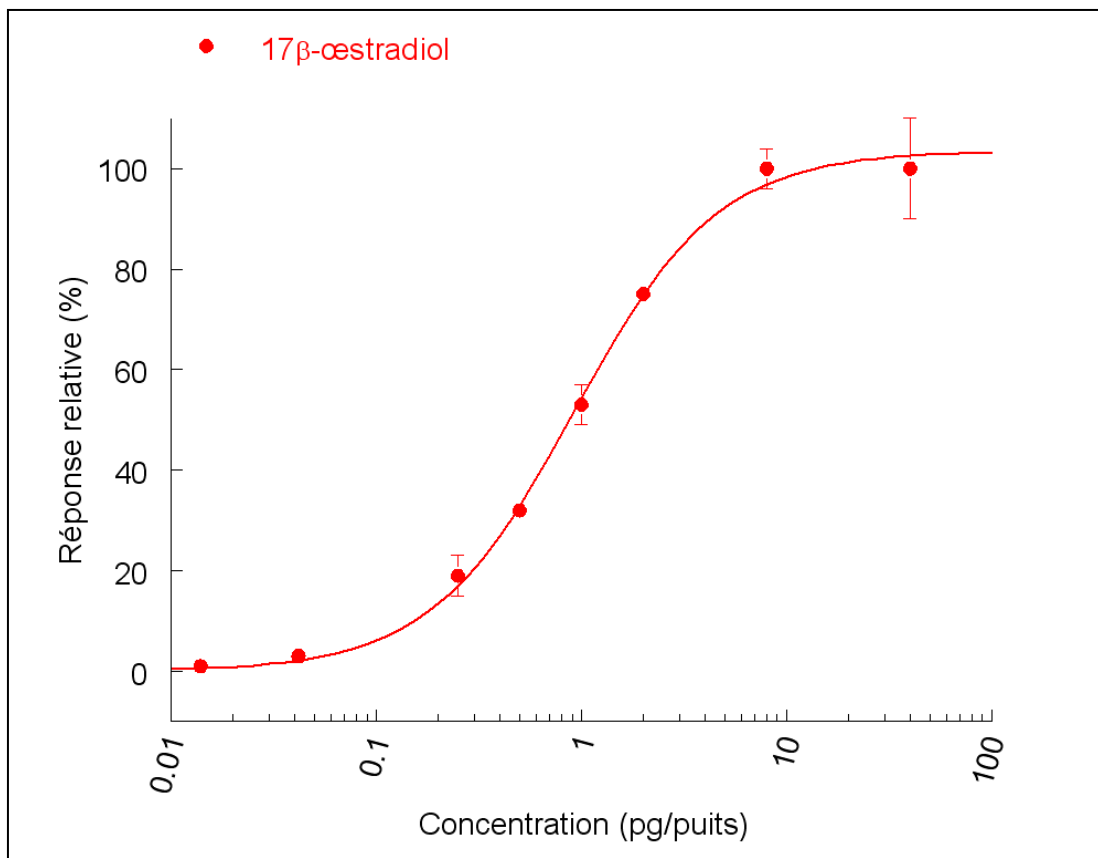


Figure 6 : courbe de calibration pour un test du type gène rapporteur (exemple des cellules MCF-7-ERE). La réponse maximale en RLU/s est ramenée 100 % de réponse relative.

3 La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

L'analyse par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse combine les performances de ces deux techniques permettant de séparer, d'identifier et de quantifier plusieurs substances présentes dans un échantillon de manière juste et précise, même si elles se trouvent sous forme de traces.

La chromatographie en phase gazeuse est une technique qui permet de séparer, dans le temps, les différentes molécules composant l'échantillon. Cette technique est réalisée dans un appareil composé essentiellement d'un injecteur, d'un four et d'une colonne chromatographique.

L'injecteur permet l'introduction de l'échantillon et son entraînement par le gaz vecteur vers la colonne, qui renferme une substance active appelée phase stationnaire. En appliquant au système un gradient de température déterminé, les différentes molécules de l'échantillon vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps en fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules mais aussi en fonction de leur température d'ébullition. Le tableau 8 reprend les paramètres employés pour les analyses chromatographiques dans ce mémoire.

Tableau 8 : paramètres employés pour les analyses chromatographiques.

Volume d'injection	2 μ L
Type d'injection	<i>splitless</i>
Température d'injection	250 $^{\circ}$ C
Gaz porteur	hélium
Débit du gaz porteur	1,0 mL/min
Phase stationnaire	HT8
Description de la phase	8 % phényl-polysiloxane-carborane
Polarité de la phase	non-polaire
Longueur la colonne	25 m
Diamètre de la colonne	0,22 mm
Epaisseur de phase	0,25 μ M

Plusieurs conditions de séparation en chromatographie gazeuse ont été testées avec de solutions standards contenant les composés étudiés à une concentration de 100 pg/ μ L dilués dans du nonane. Le principal paramètre à optimiser était le gradient de température appliqué à la colonne, dans le but d'obtenir des pics bien séparés et résolus pour chacune des substances étudiées.

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse qui permet de détecter et d'identifier un composé après ionisation et éventuellement fragmentation. Les ions sont séparés selon leur rapport masse/charge (m/z) dans l'analyseur et finalement le comptage d'ions est fait dans le détecteur. Le spectromètre de masse utilisé dans ce travail est de type « piège à ions ».

Pour les analyses en spectrométrie de masse, la température de la source a été réglée à 220 °C.

Une première analyse de différentes solutions standards, chacune contenant une seule molécule d'intérêt à une concentration de 100 pg/μL dans du nonane, a été réalisée en mode « balayage » afin d'identifier les ions spécifiques de chaque molécule cible. Après identification des ions, les analyses suivantes ont été réalisées en mode SIM (pour *selected ion monitoring*). Ce mode d'analyse permet de sélectionner quelques ions caractéristiques des analytes étudiés, tout en augmentant la sensibilité de la détection.

Pour quantifier les molécules d'intérêt, on a utilisé la méthode de l'étalon interne. Cette méthode est basée sur la comparaison des intensités du signal correspondant à la molécule à quantifier avec celui d'un composé de référence (le PCB 80 ¹³C dans le cas de cette étude). Une courbe d'étalonnage – qui permet d'obtenir une relation mathématique entre le rapport des signaux correspondant à la substance à analyser et l'étalon interne, et la quantité de substance à doser présente dans l'échantillon – peut être obtenue par l'analyse des solutions contenant la même quantité connue d'étalon interne et des concentrations croissantes des composés à quantifier. Les solutions utilisées pour établir la courbe d'étalonnage ont été préparées dans du nonane, et contenaient toutes du PCB 80 ¹³C (étalon interne) à une concentration de 100 pg/μL et des 13 molécules cibles aux concentrations suivantes : 20 pg/μL ; 60 pg/μL ; 120 μL ; 240 pg/μL et 400 pg/μL.

L'analyse des spectres et calculs de quantification ont été réalisés à l'aide du logiciel Xcalibur 1.4.

4 Extraction et purification des perturbateurs endocriniens à partir de l'échantillon de graisse

Avant la mise au point d'une méthode d'extraction et de purification pour les échantillons de graisse de marsouin, deux autres méthodes d'extraction ont été testées utilisant de la graisse de bœuf comme matrice. Pour ces derniers essais, le 17β -œstradiol a été choisi comme indicateur de l'efficacité de l'extraction car il n'est pas présent dans la graisse de bœuf commerciale, et en plus il peut être facilement quantifié à l'aide des tests cellulaires du type « gène rapporteur » avec la lignée MCF-7-ERE.

4.1 Extraction du 17β -œstradiol à partir de la graisse de bœuf

Les deux essais d'extraction du 17β -œstradiol à partir de la graisse de bœuf se basaient sur une extraction solide-liquide suivie d'une série d'extractions liquide-liquide. L'extraction solide-liquide qui consiste en faire passer une substance présente dans un solide vers un solvant, tandis que l'extraction liquide-liquide consiste en un transfert de matière entre deux phases liquides immiscibles ou partiellement miscibles.

Dans le premier essai d'extraction, 5 g de graisse de bœuf ont été additionnées de 50 μ L d'une solution de 17β -œstradiol 0,1 ng/ μ L dans l'acétonitrile. Ensuite, la graisse de bœuf a été mise dans un sac pour Stomacher en présence de 2 mL de tampon acétate 0,2 M et 8 mL d'eau. Le sac a été placé dans un bain-marie à 55°C pendant 30 min et puis 10 mL de méthanol ont été ajoutés. Ensuite, la suspension contenant la graisse a été broyée pendant 1 min à l'aide d'un homogénéisateur Stomacher avant d'être transférée dans un tube en verre et

centrifugée à 2.000 RPM pendant 15 min. La phase aqueuse a été transférée dans un deuxième tube. Afin d'enlever d'éventuelles traces de graisse de la phase aqueuse, 5 mL d'hexane ont été ajoutés, et après agitation le tube a été encore centrifugé à 2.000 RPM pendant 10 min. Après la centrifugation, l'hexane (phase supérieure) a été enlevé. Ensuite le 17 β -œstradiol a été extrait de la phase aqueuse vers une phase organique en ajoutant 20 mL d'un mélange dichlorométhane-acétone dans une proportion 3/1. Après mélange, la phase aqueuse a été retirée et puis, afin d'éliminer les derniers contaminants solubles dans l'eau présents dans la phase organique, 5 mL d'eau ont été ajoutés et le tube a été soumis à centrifugation à 2.000 RPM pendant 10 min. L'eau a été retirée du tube et ensuite quelques grammes de sulfate de sodium ont été ajoutés, pour éliminer les derniers traces d'eau. L'extrait a été finalement filtré, évaporé à sec, récupéré dans 50 μ L d'éthanol et dilué 200 fois, avant analyse sur cellules MCF-7-ERE.

Dans le deuxième essai, le 17 β -œstradiol a été extrait de la graisse au moyen de méthanol. Pour ce faire, 2 g de graisse, préalablement additionnés de 50 μ L d'une solution de 17 β -œstradiol 0,1 ng/ μ L en acétonitrile, ont été mis dans un tube en verre contenant 1 mL de tampon acétate et 4 mL d'eau. Le tube a été placé dans un bain-marie à 55 °C pendant 30 min et puis 10 mL de méthanol ont été ajoutés. Le tube a été soumis à une agitation pendant 1 min et centrifugé à 2.000 RPM pendant 15 min. La phase liquide a été transférée dans un deuxième tube. Tenant compte du 17 β -œstradiol résiduelle dans la graisse, l'extraction a été répétée avec 5 mL de méthanol. Après, dans le but d'enlever d'éventuelles traces de graisse de la phase liquide, 10 mL d'hexane ont été ajoutés dans le tube, qui a été ensuite soumis à une agitation pendant 1 min. L'hexane a été enlevé et ce procédé a été répété une deuxième fois. Puis, afin d'extraire le 17 β -œstradiol de cette phase polaire vers une phase moins polaire, 20 mL d'un mélange dichlorométhane-acétone ont été ajoutés. Ensuite le tube a été soumis à agitation pendant 1 min et à centrifugation à 2.000 RPM pendant 15 min. La phase supérieure a été transférée dans un autre tube, et l'extraction du 17 β -œstradiol a été répétée une deuxième fois avec 10 mL du mélange dichlorométhane-acétone. Pour éliminer les derniers contaminants solubles dans l'eau présents dans la phase organique, 10 mL d'eau ont été ajoutés, et, après agitation pendant 1 min et centrifugation à 2.000 RPM

pendant 10 min, l'eau a été enlevée et quelques grammes de sulfate de sodium ont été ajoutés, pour éliminer les dernières traces d'eau. Ce procédé a été suivi d'une filtration et d'une évaporation à sec de l'extrait sous flux d'azote, qui a été finalement récupéré en 50 µL d'éthanol et dilué 100 fois, avant analyse sur cellules MCF-7-ERE.

4.2 Extraction et purification des perturbateurs endocriniens à partir de la graisse de marsouin

Les échantillons de graisse de marsouin utilisés dans ce travail sont issus de nécropsies de mammifères marins échoués le long de la côte belge et de la côte française de la Mer du Nord, réalisées par le Laboratoire d'océanologie de l'Université de Liège, entre 2000 et 2003.

La matière grasse a été extraite du tissu adipeux sous-cutané à l'aide d'une extraction solide-liquide. Pour cela, environ 1 g de tissu adipeux sous-cutané a été trituré deux fois à l'aide d'une baguette en verre dans un tube d'essai en présence de 2 mL d'hexane. Une fois la matière grasse extraite, l'hexane a été évaporé et la graisse pesée en deux sous-échantillons – 0,25 g pour les tests *in vivo* du type gène rapporteur et 0,1 g pour les analyses en GC-MS – et resolubilisée dans 2 mL d'hexane.

Pour la purification des molécules d'intérêt à partir de la matière grasse, il a été effectué une chromatographie sur colonne de silice acide. Il s'agit d'une technique basée sur des phénomènes d'adsorption. La phase solide ou phase stationnaire (la silice acide) remplit une colonne, et l'échantillon, en solution concentrée, est déposé en haut de cette colonne. La séparation des composants résulte de l'écoulement continu d'un éluant (phase mobile) traversant la colonne par gravité. Les molécules sont entraînées vers le bas à des vitesses variables selon leur affinité pour l'adsorbant et leur solubilité dans l'éluant. Pour la réalisation de cette

technique, une colonne en verre a été remplie de bas en haut avec un filtre constitué de laine de verre, 5 g de silice acidifiée (40 % de H₂SO₄, w/w), 1 g de Al₂O₃ désactivé et 1 g de Na₂SO₄. La graisse solubilisée dans l'hexane a été déposée sur la colonne, suivie de l'éluant. Trois éluants différents ont été testés (voir la section 4.2 du chapitre « Résultats »). L'éluant final qui a été retenu est un mélange dichlorométhane–hexane 1/3.

Comme la graisse et les molécules cibles (les perturbateurs endocriniens) sont solubles dans les mêmes solvants, cette chromatographie sur silice acide permet de séparer la graisse (qui est hydrolysée par la silice acide) des perturbateurs endocriniens qui restent en solution dans la phase mobile.

L'éluat a été évaporé et récupéré dans 25 µL d'acétonitrile pour le test *in vivo* du type « gène rapporteur », et 90 µL de nonane pour les analyses en GC-MS, auxquels 10 µL de standard interne (PCB 80 ¹³C 1 ng/µL) ont été ajoutés.

RESULTATS

1 Optimisation des tests cellulaires avec les ligands de référence

1.1 Caractérisation des lignées cellulaires

Dans un premier temps, les quatre lignées cellulaires décrites dans la section « Matériel et méthodes » (TM-Luc, TARM-Luc, TGRM-Luc et MCF-7-ERE) ont été exposées à des solutions de plusieurs concentrations en leurs ligands de référence dilués dans des différents solvants de sorte à obtenir les courbes dose-réponse observées dans le figures 7 à 10.

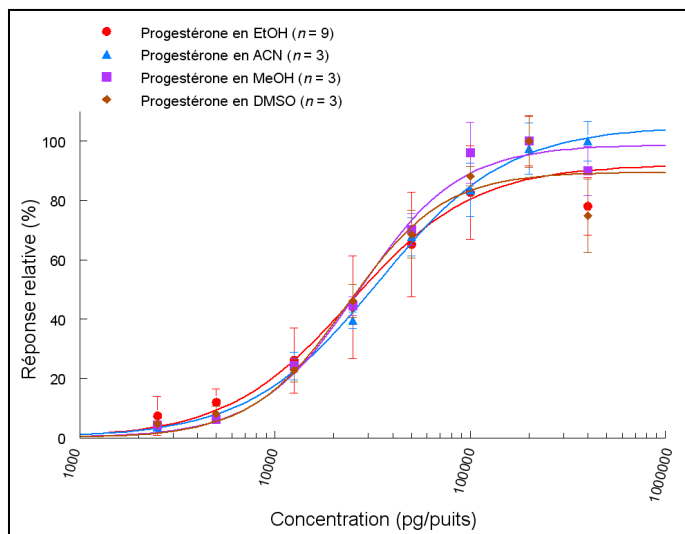


Figure 7 : courbes dose–réponse pour la lignée TM-Luc exposée à la progestérone diluée dans des différents solvants. EtOH : éthanol ; ACN : acétonitrile ; MeOH : méthanol ; DMSO : diméthylsulfoxyde. La réponse maximale obtenue est ramenée à 100 %. Les réponses obtenues pour les différentes concentrations en progestérone sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative).

La réponse cellulaire induite par la progestérone diluée dans les quatre solvants testés sur la lignée TM-Luc était similaire (voir figure 7), indépendamment de la nature du solvant utilisé.

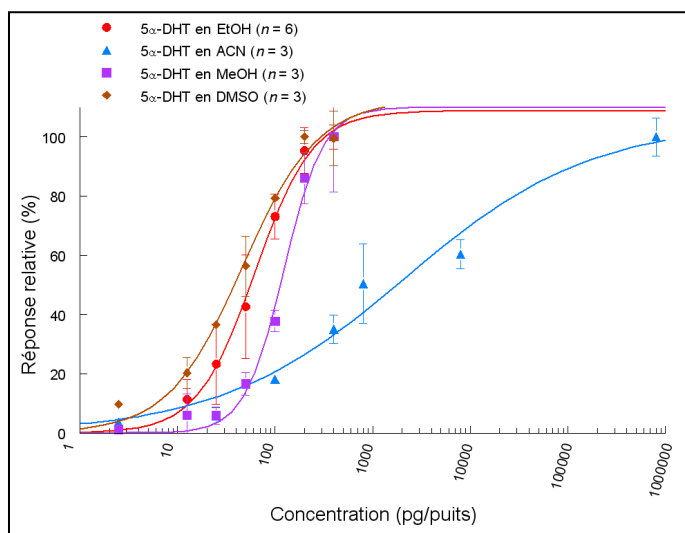


Figure 8 : courbes dose–réponse pour la lignée TARM-Luc exposée à la 5α-dihydrotestostérone (5α-DHT) diluée dans des différents solvants. EtOH : éthanol ; ACN : acétonitrile ; MeOH : méthanol ; DMSO : diméthylsulfoxyde. La réponse maximale obtenue est ramenée à 100 %. Les réponses obtenues pour les différentes concentrations en 5α-DHT sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative).

Lors de tests cellulaires avec la lignée TARM-Luc, il a été observé que l'utilisation de l'acétonitrile a été capable d'augmenter fortement la valeur de l'EC₅₀

(concentration de ligand nécessaire pour atteindre 50 % de la réponse maximale) en comparaison aux autres solvants employés, ce qui résulte en une diminution de la capacité du test de détecter de faibles activités hormonales.

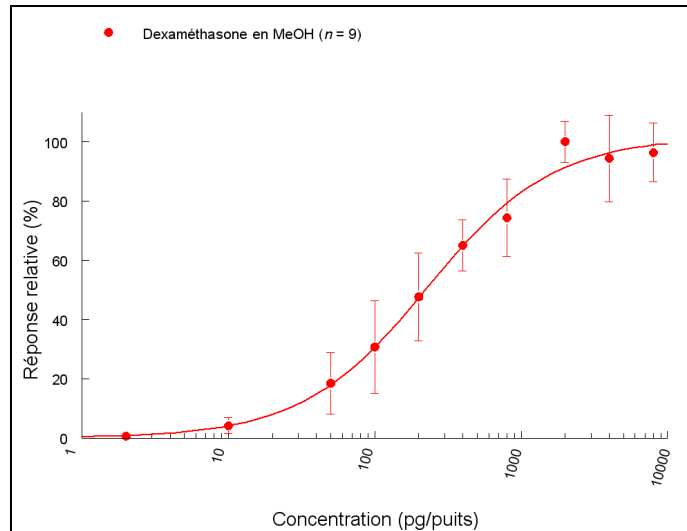


Figure 9 : courbe dose–réponse pour la lignée TGRM-Luc exposée à la dexaméthasone diluée dans du méthanol (MeOH). La réponse maximale obtenue est ramenée à 100 %. Les réponses obtenues pour les différentes concentrations en dexaméthasone sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative).

Le fait d’avoir testé un seul solvant pour diluer la dexaméthasone exposée aux cellules TGRM-Luc ne permet pas d’estimer une éventuelle modification de la réponse cellulaire par le méthanol.

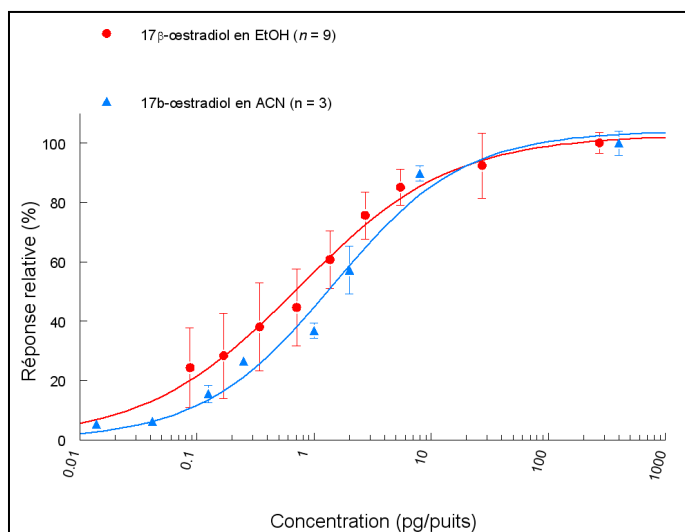


Figure 10 : courbes dose–réponse pour la lignée MCF-7-ERE exposée aux 17β-œstradiol dilué dans des différents solvants. EtOH : éthanol ; ACN : acétonitrile. La réponse maximale obtenue est ramenée à 100 %. Les réponses obtenues pour les différentes concentrations en 17β-œstradiol sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative).

Le tableau 9 compile les valeurs l'EC₅₀ calculées à partir des tests précédents pour chaque ligand de référence solubilisé dans des différents solvants, et exposés à la lignée cellulaire appropriée.

Tableau 9 : valeurs de l'EC₅₀ calculées pour quatre ligands de référence solubilisés dans des différents solvants, et exposés à la lignée cellulaire appropriée. 5α-DHT : 5α-dihydrotestostérone ; DMSO : diméthylsulfoxyde ; n/d : non déterminé.

Solvant	Progestérone	5α-DHT	Dexaméthasone	17β-œstradiol
Ethanol	$3,9 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-9}$	n/d	$1,4 \times 10^{-11}$
Acétonitrile	$5,4 \times 10^{-7}$	$3,7 \times 10^{-7}$	n/d	$2,6 \times 10^{-11}$
Méthanol	$4,2 \times 10^{-7}$	$2,1 \times 10^{-9}$	$2,9 \times 10^{-9}$	n/d
DMSO	$3,7 \times 10^{-7}$	$8,0 \times 10^{-10}$	n/d	n/d

Une fois que les molécules d'intérêt choisies dans le cadre de ce mémoire sont connues pour leur activité œstrogénique et anti-œstrogénique (Kramer *et al.*, 1997 ; Aubé *et al.*, 2008 ; Tiemann *et al.*, 2008), il a été donc décidé de se focaliser dans un premier temps sur l'utilisation des cellules MCF-7-ERE pour l'étude des échantillons de graisse de marsouin susceptibles de contenir les substances sélectionnées. Le solvant retenu pour la continuation de ce travail a été l'ACN vu les caractéristiques de solubilité des molécules cibles.

1.2 Etude de l'influence de différents lots de réactifs

Différentes conditions d'analyse ont été testées afin de vérifier une éventuelle altération de l'expression de la luciférase, dans la lignée MCF-7-ERE. Les courbes d'étalonnage obtenues après utilisation de différents lots de FCS pour la supplémentation des milieux, de différents lots de réactifs pour la préparation de la solution de lyse, et de différents lots de réactifs pour la préparation de la solution contenant les substrats et cofacteurs de la luciférase sont reprises dans les figures 11 à 13, respectivement.

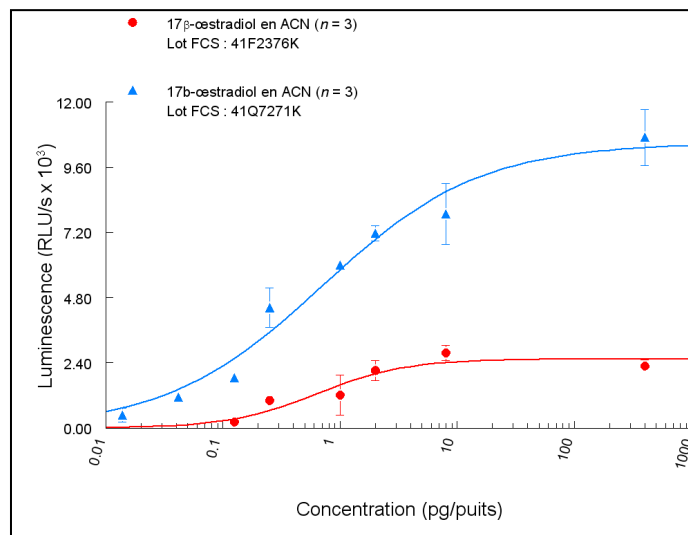


Figure 11 : courbes dose-réponse pour la lignée MCF-7-ERE, cultivée dans des milieux supplémentés avec du sérum foetal bovin (FCS) provenant de deux lots différents et exposée au 17β-oestradiol dilué dans de l'acétonitrile (ACN).

Les différents lots de FCS utilisés pour la supplémentation des milieux utilisés pour la culture de la lignée MCF-7-ERE ont été capables de produire une variation importante de la luminescence maximale mesurée.

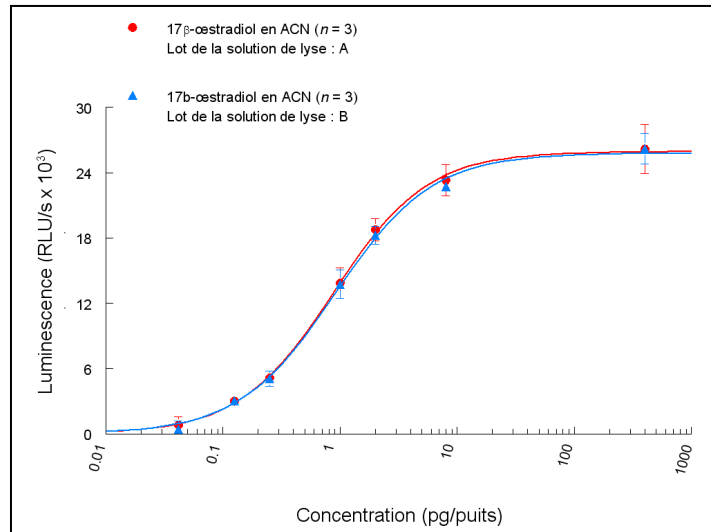


Figure 12 : courbes dose–réponse pour la lignée MCF-7-ERE exposée au 17 β -œstradiol dilué dans de l'acétonitrile (ACN) et lysées à l'aide des solutions de lyse préparées avec des réactifs provenant des lots différents.

Les deux solutions de lyse préparées avec des réactifs provenant de lots différents, et utilisées pendant les deux tests cellulaires repris dans la figure 12 n'ont pas induit une altération de l'activité des cellules MCF-7-ERE.

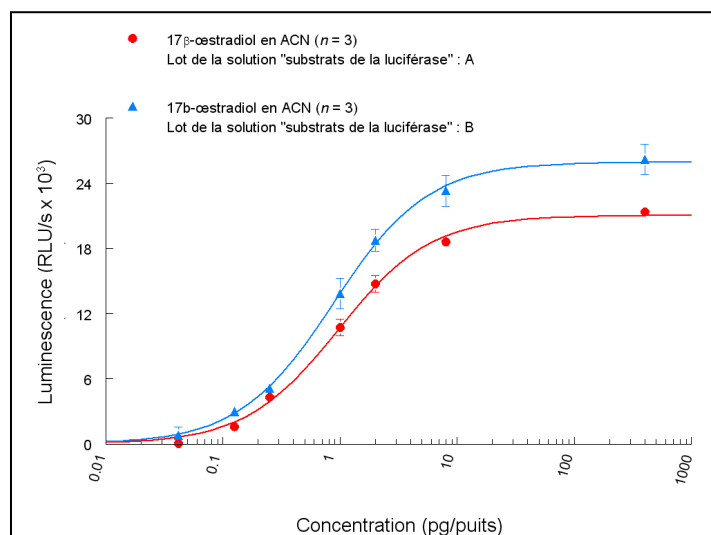


Figure 13 : courbes dose–réponse pour la lignée MCF-7-ERE exposée au 17 β -œstradiol dilué dans de l'acétonitrile (ACN). La lecture de la luminescence a été réalisée à l'aide des solutions contenant les substrats et cofacteurs de la luciférase préparées avec des réactifs provenant des lots différents.

Lors du test de deux solutions contenant les substrats et les cofacteurs de la luciférase provenant de différents lots, deux courbes dose–réponse ont été obtenues avec une légère différence de la luminescence maximale mesurée.

1.3 Etude de l'influence de la température de lecture de la luminescence

La figure 14 reprend les courbes d'étalonnage résultantes des analyses où la lecture de la luminescence a été faite à température ambiante ou où la température du luminomètre a été ajustée à 25 °C.

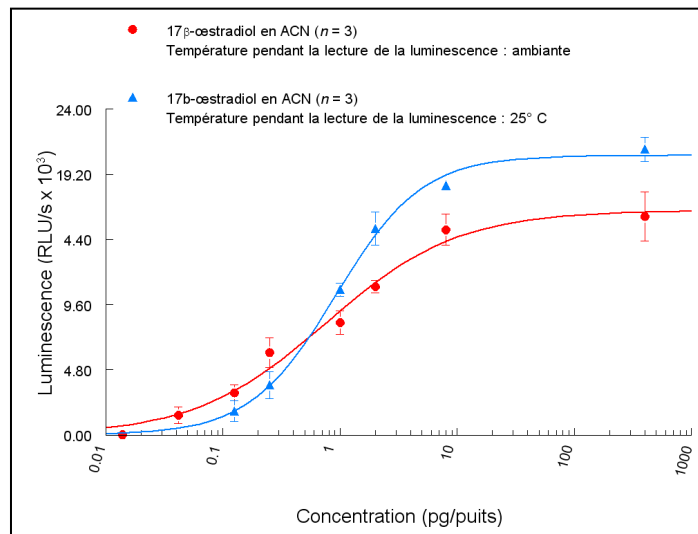


Figure 14 : courbes dose-réponse pour la lignée MCF-7-ERE exposée au 17β-œstradiol dilué dans de l'acétonitrile (ACN). La lecture de la luminescence a été effectuée à température ambiante ou à 25 °C.

Parmi les deux conditions de lecture testées, on obtient une valeur maximale de luminescence plus élevée quand la température du luminomètre est ajustée à 25 °C.

1.4 Paramètres de performance de la courbe d'étalonnage pour la lignée MCF-7-ERE

Après la réalisation de plusieurs courbes d'étalonnage à l'aide de la lignée MCF-7-ERE pour le 17 β -œstradiol solubilisé dans de l'acétonitrile, quelques paramètres de performance de la courbe, comme le coefficient de détermination (R^2), l'EC₅₀ et la mesure d'une solution de référence (de 17 β -œstradiol) de concentration théorique connue ($4,0 \times 10^{-12}$ M), ont été établis. Deux conditions de travail ont été testées : celle où la concentration finale d'acétonitrile dans le milieu de culture atteint 0,4 % et celle où la concentration finale d'acétonitrile dans le milieu atteint 0,8 %. Les données relatives aux paramètres de performance des courbes d'étalonnage pour la lignée MCF-7-ERE exposée au 17 β -œstradiol sont reprises dans le tableau 10.

Tableau 10 : paramètres de performances des courbes d'étalonnage pour la lignée MCF-7-ERE exposée au 17 β -œstradiol solubilisé dans de l'acétonitrile (ACN) à 0,4 % ou à 0,8 % dans le milieu de culture. La solution de référence utilisée avait une concentration théorique de $4,0 \times 10^{-12}$ M. Les valeurs de l'« erreur de justesse » relative et du coefficient de variation ont été calculées sur base de la moyenne et de l'écart-type de la concentration mesurée de la solution de référence.

Paramètres	0,4 % d'ACN dans le milieu (n = 20)	0,8 % d'ACN dans le milieu (n = 27)
Coefficient de détermination (R^2)	0,9912 ($\pm 0,0049$)	0,9916 ($\pm 0,0079$)
EC ₅₀ (M)	$1,5 \times 10^{-11}$ ($\pm 5,1 \times 10^{-12}$)	$1,7 \times 10^{-11}$ ($\pm 5,2 \times 10^{-12}$)
Solution de référence (M)	$3,7 \times 10^{-12}$ ($\pm 1,4 \times 10^{-12}$)	$4,3 \times 10^{-12}$ ($\pm 1,7 \times 10^{-12}$)
« Erreur de justesse » relative (%)	- 7,5 %	7,5 %
Coefficient de variation (%)	38 %	40 %

Le test cellulaire du type « gène rapporteur » réalisé à l'aide des cellules MCF-7-ERE présente une bonne justesse, mais une mauvaise fidélité (coefficient de variation).

Pour tenir compte de la variabilité liée aux tests cellulaires, l'écart minimal entre deux mesures de réponse relative pour déterminer une différence significative dans l'expression de la luciférase a été fixé arbitrairement à la valeur de 15 %.

2 Evaluation de l'activité œstrogénique et anti-œstrogénique des substances d'intérêt

2.1 Etude de l'activité œstrogénique

Afin de vérifier l'activité œstrogénique des polluants étudiés dans ce mémoire, la lignée MCF-7-ERE a été exposée à ces composés ou à des mélanges de ces composés dilués à des concentrations comprises entre 0,64 ng/puits et 400 ng/puits. Aucun des composés ou des mélanges n'a présenté d'activité hormonale significative à des concentrations inférieures à 16 ng/puits, et aucun signe cytotoxicité n'a été observé lors de l'examen des cellules au microscope. La figure 15 montre une courbe dose-réponse obtenue après l'exposition des cellules MCF-7-ERE à l'*o,p'*-DDT.

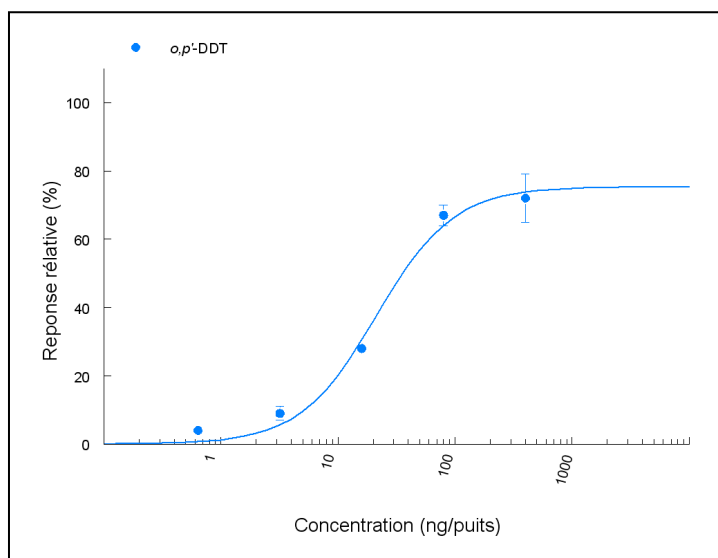


Figure 15 : courbe dose-réponse pour la lignée MCF-7-ERE exposée à l'*o,p'*-DDT. La réponse maximale obtenue après exposition au 17β -œstradiol a été ramenée à 100 % (résultat non montré), et la réponse obtenue pour l'*o,p'*-DDT est exprimée en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative).

L'obtention d'une courbe dose-réponse complète (une fonction sigmoïde) n'a été possible que pour l'*o,p'*-DDT. C'est pour cela que les résultats suivants seront présentés sous forme d'histogrammes. Les figures 16 à 19 reprennent les résultats relatifs à l'exposition des cellules MCF-7-ERE aux substances d'intérêt et aux mélanges de celles-ci.

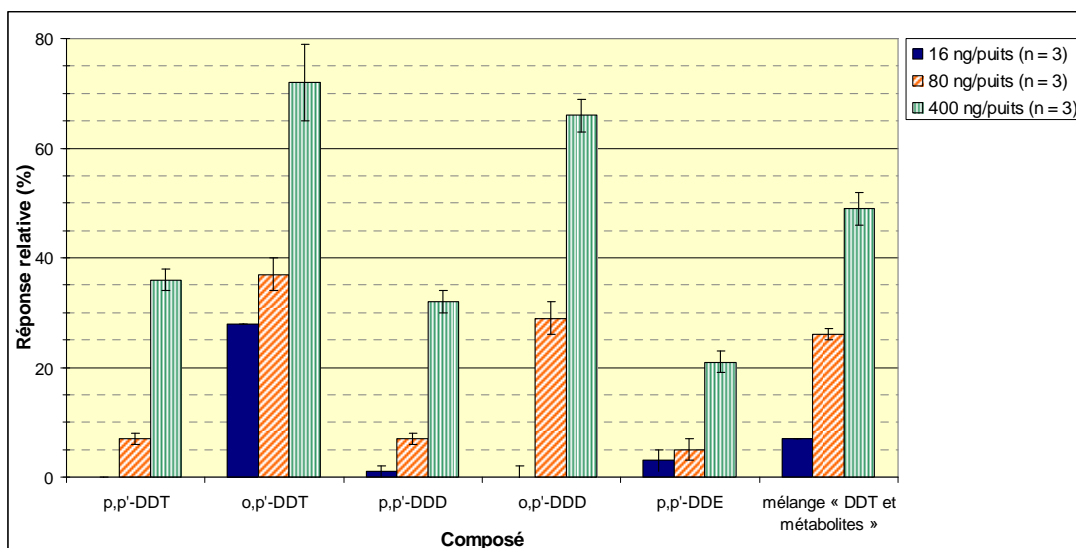


Figure 16 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées au DDT et ses métabolites dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits. Le mélange « DDT et métabolites » contient la même proportion en poids de DDT (*p,p'*-DDT et *o,p'*-DDT) et de ses métabolites (*p,p'*-DDD ; *o,p'*-DDD et *p,p'*-DDE) pour arriver aux concentrations globales indiquées. La réponse maximale obtenue après exposition au 17 β -œstradiol a été ramenée à 100 % (résultat non montré), et les réponses obtenues pour les molécules d'intérêt ou mélanges sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative).

Les cinq molécules appartenant au groupe du DDT et de ses métabolites ont présenté une activité œstrogénique importante, spécialement l'*o,p'*-DDT et l'*o,p'*-DDD, qui ont produit une réponse relative supérieure à 60 %.

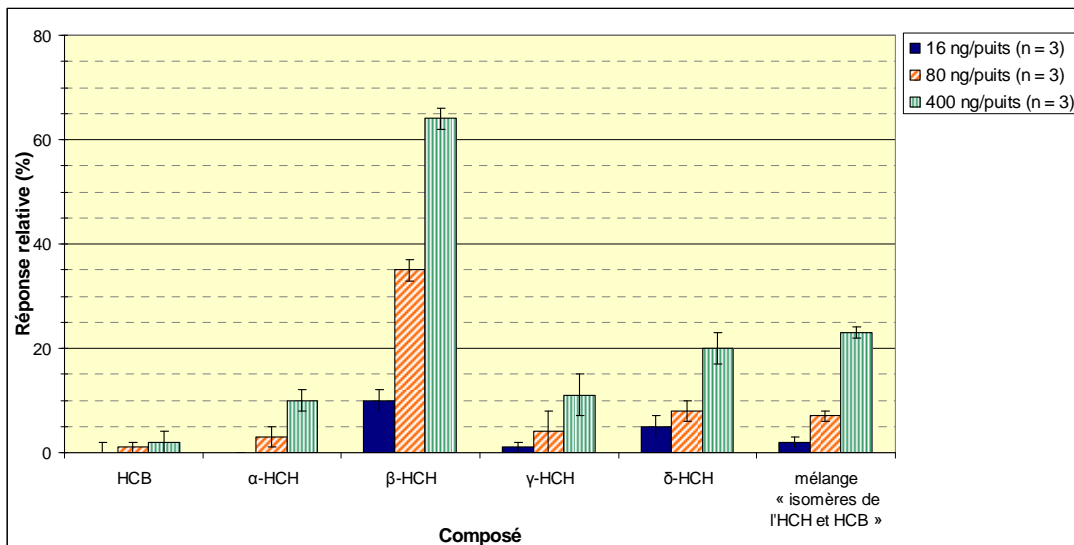


Figure 17 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées à l'HCH et ses isomères, et à l'HCB dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits. Le mélange « isomères de l'HCH et HCB » contient la même proportion en poids des isomères de l'HCH (α-HCH ; β-HCH ; γ-HCH et δ-HCH) et d'HCB pour arriver aux concentrations globales indiquées. La réponse maximale obtenue après exposition au 17β-œstradiol a été ramenée à 100 % (résultat non montré), et les réponses obtenues pour les molécules d'intérêt ou mélanges sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative).

Parmi les substances reprises dans la figure 17, seul l'HCB n'a pas présenté une activité œstrogénique expressive. Le β-HCH a induit une activité cellulaire expressivement plus importante que les autres composés de ce groupe.

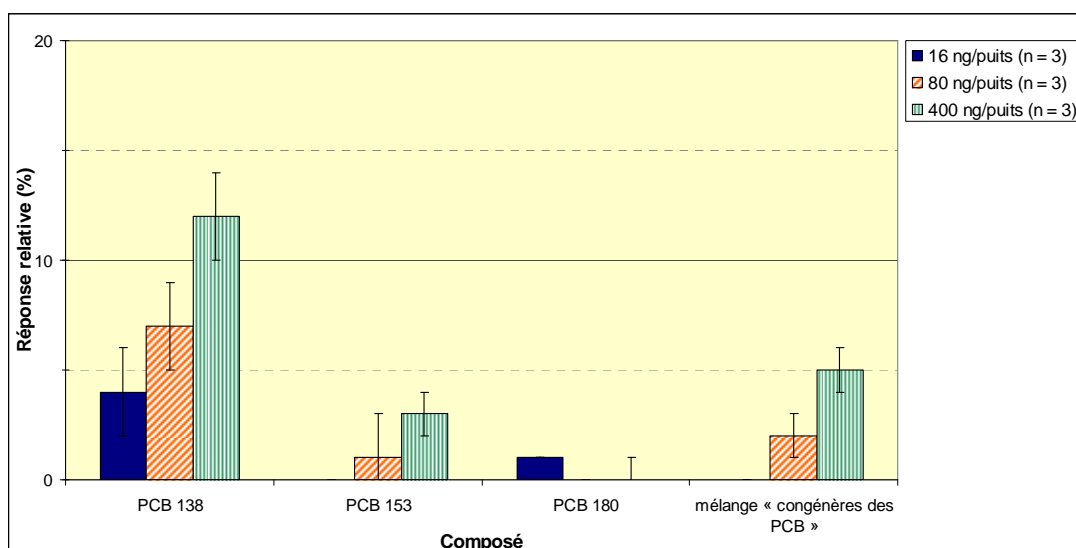


Figure 18 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées à trois congénères des PCB dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits. Le mélange « congénères de PCB » contient la même proportion en poids des congénères 138, 153 et 180 des PCB pour arriver aux concentrations globales indiquées. La réponse maximale obtenue par l'exposition du 17β-œstradiol seul est ramenée à 100 %.

Aucun des PCB étudiés n'a induit une activité cellulaire expressive, probablement à cause du fait que les PCB exercent leur activité biologique par moyen du récepteur Ah (Mortensen et Arukwe, 2007), et que les cellules MCF-7-ERE possèdent majoritairement le récepteur ER.

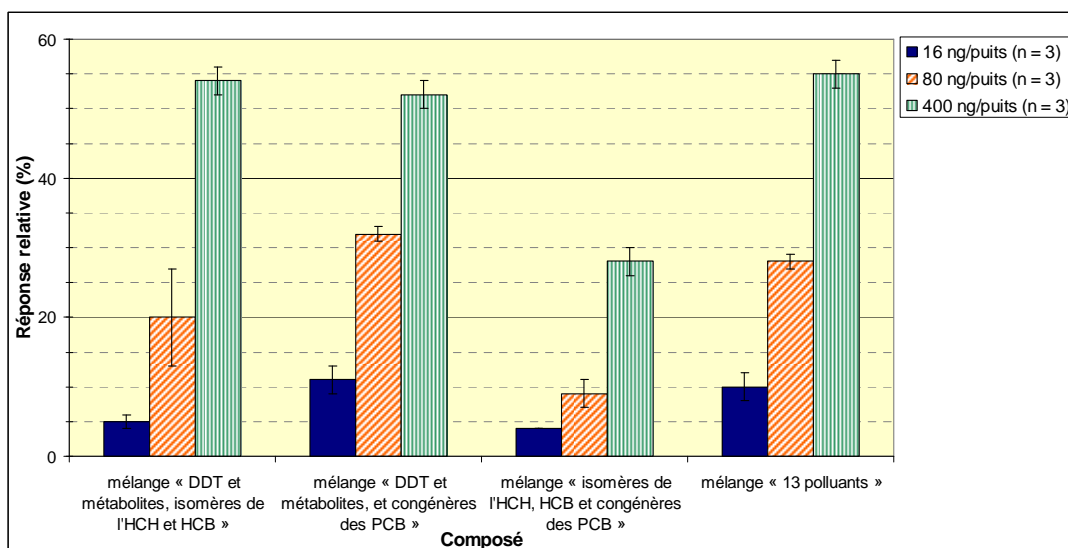


Figure 19 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées à quatre différents mélanges dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits. Tous les mélanges contiennent la même proportion en poids de ses constituants pour arriver aux compositions globales indiquées. Le mélange « DDT et métabolites, isomères de l'HCH et HCB » contient du DDT (*p,p'*-DDT et *o,p'*-DDT), de ses métabolites (*p,p'*-DDD ; *o,p'*-DDD et *p,p'*-DDE), des isomères de l'HCH (α -HCH ; β -HCH ; γ -HCH et δ -HCH) et de l'HCB. Le mélange « DDT et métabolites, et congénères des PCB » contient du DDT (*p,p'*-DDT et *o,p'*-DDT), de ses métabolites déjà cités et des congénères 138, 153 et 180 des PCB. Le mélange « isomères de l'HCH, HCB et congénères du PCB » contient des isomères de l'HCH et des congénères des PCB déjà mentionnés, et de l'HCB. Le mélange « 13 polluants » contient tous les 13 polluants présents dans les mélanges précédents. La réponse maximale obtenue par l'exposition du 17 β -œstradiol seul est ramenée à 100 %.

L'exposition des mélanges révèle que les interactions entre les perturbateurs endocriniens sont complexes et variables. Les mélanges contenant seulement des composés appartenant à une même famille (figures 16 à 18) ont produit une réponse cellulaire qui correspondait à la moyenne arithmétique des réponses produites lors de l'exposition de chaque composé individuellement. Par contre, l'exposition des composés appartenant à des familles différentes ensemble a produit des réponses plus élevées que les moyennes de réponses obtenues pour chaque composé seul (figure 19).

Selon Kortenkamp (2007), le terme « additivité » peut être employé quand un mélange de substances induit une réponse cellulaire sans exacerber ou inhiber la

réponse obtenue par chaque substance testée individuellement. Dans le cas d'une exacerbation ou d'une inhibition de la réponse cellulaire, on emploie respectivement les termes « synergisme » ou « antagonisme ». D'autres études (Tallarida *et al.*, 2003 ; Raffa *et al.*, 2006) proposent encore le terme « sous-additivité » pour les cas où la réponse induite par un mélange se situe entre un antagonisme et une additivité.

On parle donc d'une additivité quand des composés appartenant à une même famille ont été exposés ensemble (figures 16 à 18) et d'un synergisme quand des composés appartenant à des familles différentes ont été exposés en même temps (figure 19).

Dans le tableau 11 les molécules cibles sont classées par ordre décroissant selon leur activité œstrogénique. La réponse relative maximale observée pour chaque molécule a été convertie en équivalent en 17β-œstradiol (quantité de cette hormone requise pour obtenir la même réponse).

Tableau 11 : classement par ordre décroissant des composés étudiés dans ce mémoire selon leur activité œstrogénique. La réponse relative maximale observée pour chaque molécule a été convertie en équivalent en 17β-œstradiol (quantité de cette hormone requise pour obtenir la même réponse).

Composé	Equivalent en 17β-œstradiol de la réponse maximale observée (pg/puits)
<i>o,p'</i> -DDT	1,7
<i>o,p'</i> -DDD	1,2
β-HCH	1,1
<i>p,p'</i> -DDT	0,29
<i>p,p'</i> -DDD	0,23
<i>p,p'</i> -DDE	0,12
δ-HCH	0,11
PCB 138	0,054
γ-HCH	0,048
α-HCH	0,037
PCB 153	0,0090
HCB	0,0055
PCB 180	0,00061

2.2 Etude de l'activité anti-œstrogénique

Lors de l'exposition de la lignée MCF-7-ERE aux substances d'intérêt, ou à des mélanges contenant celles-ci, en présence de 17β -œstradiol, aucune activité anti-œstrogénique n'a été observée. Au contraire, les différentes substances et mélanges ajoutés au 17β -œstradiol ont été capables d'augmenter la réponse des cellules exposées à cette hormone à une concentration de 1 pg/puits (concentration proche de l' EC_{50} et donc correspondant à environ 50 % de réponse relative).

L'*o,p'*-DDD et le β -HCH, qui figuraient parmi les substances ayant les activités œstrogéniques les plus importantes (voir la section 2.1 de ce chapitre), sont celles qui augmentent le plus la réponse cellulaire en présence de 17β -œstradiol.

Les résultats relatifs à l'exposition des cellules MCF-7-ERE aux substances d'intérêt et aux mélanges de celles-ci en présence de 17β -œstradiol (1 pg/puits) sont repris dans les figures 20 à 23.

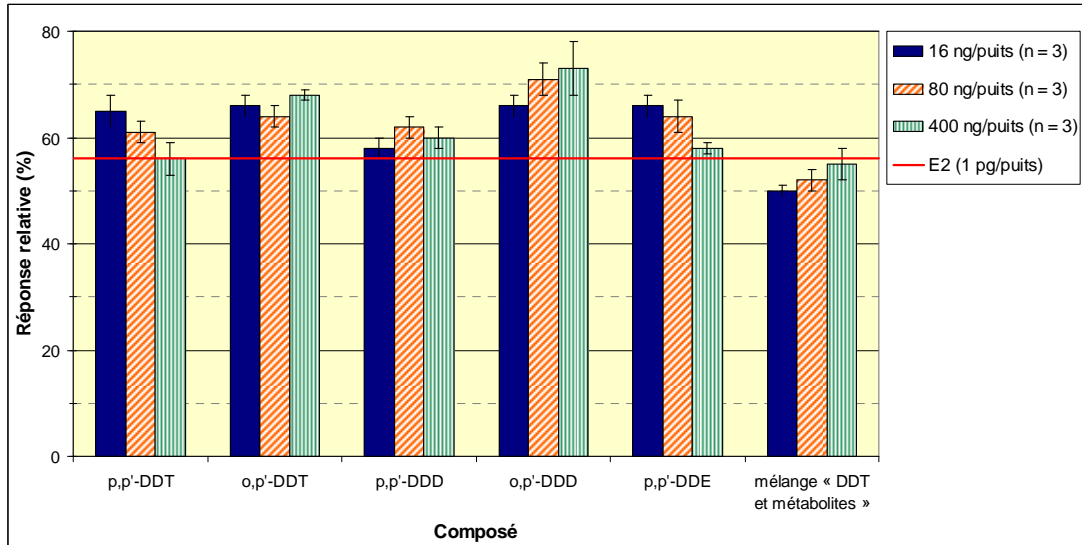


Figure 20 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées simultanément au 17 β -œstradiol (E2) à une concentration de 1 pg/puits et au DDT et ses métabolites dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits. Le mélange « DDT et métabolites » contient la même proportion en poids de DDT (*p,p'*-DDT et *o,p'*-DDT) et de ses métabolites (*p,p'*-DDD ; *o,p'*-DDD et *p,p'*-DDE) pour arriver aux concentrations globales indiquées. La réponse maximale obtenue après exposition au 17 β -œstradiol a été ramenée à 100 % (résultat non montré), et les réponses obtenues pour les molécules d'intérêt ou mélanges sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative). La ligne horizontale représente la réponse cellulaire à 1 pg/puits de 17 β -œstradiol seul (environ 50 %).

Lors de l'exposition cellulaire aux composés appartenant au groupe du DDT et de ses métabolites, en présence de 17 β -œstradiol, seul l'*o,p'*-DDD a été capable de modifier expressivement la réponse des cellules exposées à cette hormone à une concentration de 1 pg/puits. On parle dans ce cas d'une sous-additivité, vu qu'il n'y a pas d'additivité des résultats ni d'inhibition de la réponse cellulaire.

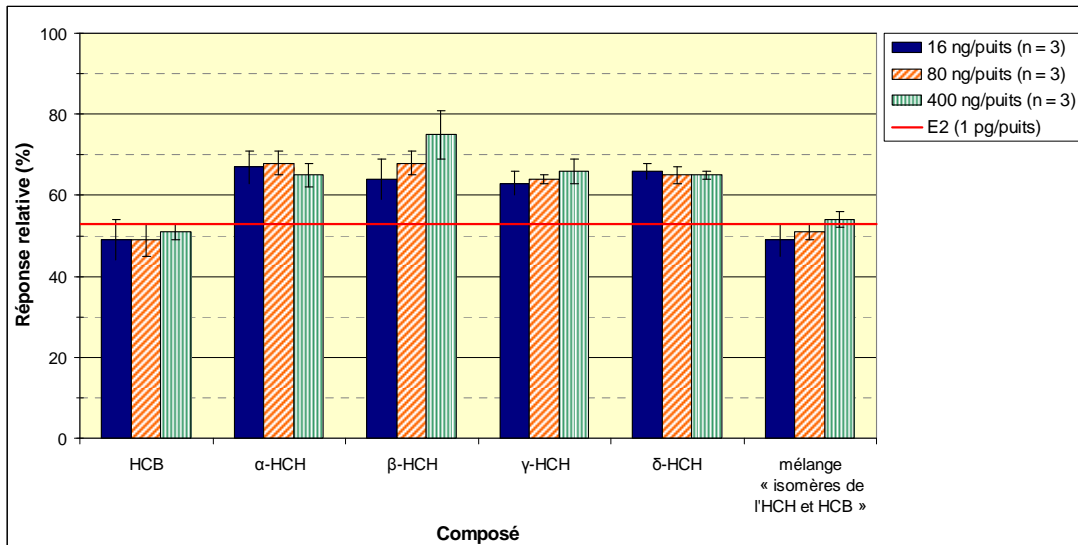


Figure 21 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées simultanément au 17β-œstradiol (E2) à une concentration de 1 pg/puits et à l'HCH et ses isomères dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits. Le mélange « isomères de l'HCH et HCB » contient la même proportion en poids des isomères de l'HCH (α-HCH ; β-HCH ; γ-HCH et δ-HCH) et d'HCB pour arriver aux concentrations globales indiquées. La réponse maximale obtenue après exposition au 17β-œstradiol a été ramenée à 100 % (résultat non montré), et les réponses obtenues pour les molécules d'intérêt ou mélanges sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative). La ligne horizontale représente la réponse cellulaire à 1 pg/puits de 17β-œstradiol seul (environ 50 %).

Parmi les substances reprises dans la figure 21, seul le β-HCH, exposé en présence de 17β-œstradiol, a été capable de modifier expressivement la réponse des cellules exposées à cette hormone à une concentration de 1 pg/puits. Il s'agit également d'une sous-additivité, comme expliqué dans le paragraphe précédent pour l'*o,p'*-DDD

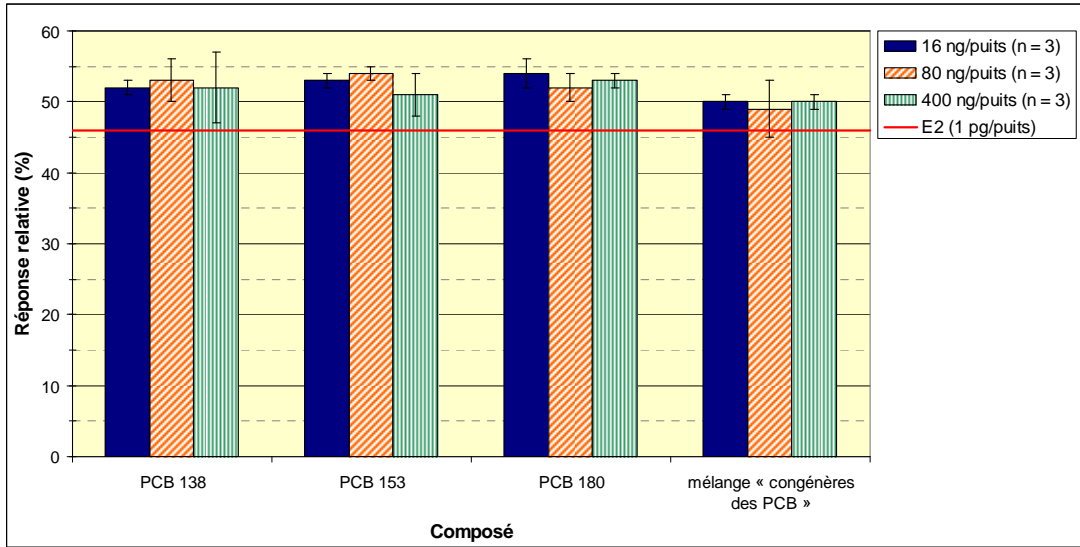


Figure 22 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées simultanément au 17 β -œstradiol (E2) à une concentration de 1 pg/puits et à trois congénères des PCB dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits. Le mélange « congénères de PCB » contient la même proportion en poids des congénères 138, 153 et 180 des PCB pour arriver aux concentrations globales indiquées. La réponse maximale obtenue après exposition au 17 β -œstradiol a été ramenée à 100 % (résultat non montré), et les réponses obtenues pour les molécules d'intérêt ou mélanges sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative). La ligne horizontale représente la réponse cellulaire à 1 pg/puits de 17 β -œstradiol seul (environ 50 %).

Les trois congénères et le mélange des PCB, exposés en présence du 17 β -œstradiol, n'ont induit aucune modification de l'activité des cellules MCF-7-ERE quand exposés à cette hormone à une concentration de 1 pg/puits.

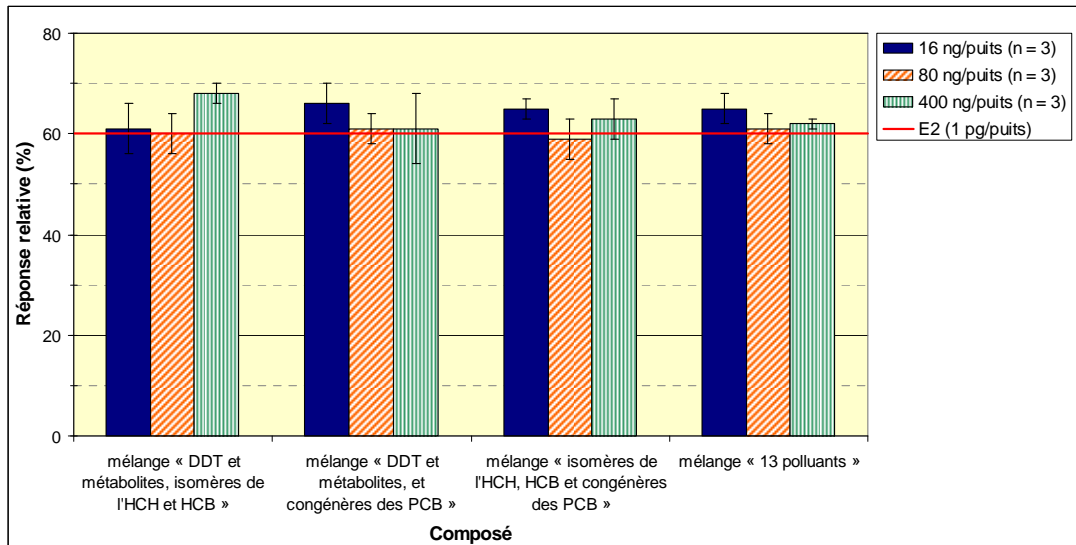


Figure 23 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées simultanément au 17 β -œstradiol (E2) à une concentration de 1 pg/puits et à quatre différents mélanges dont les concentrations varient de 16 ng/puits à 400 ng/puits. Tous les mélanges contiennent la même proportion en poids de ses constituants pour arriver aux compositions globales indiquées. Le mélange « DDT et métabolites ; isomères de l'HCH et HCB » contient du DDT (*p,p'*-DDT et *o,p'*-DDT), de ses métabolites (*p,p'*-DDD ; *o,p'*-DDD et *p,p'*-DDE), des isomères de l'HCH (α -HCH ; β -HCH ; γ -HCH et δ -HCH) et de l'HCB. Le mélange « DDT et métabolites, et congénères des PCB » contient du DDT (*p,p'*-DDT et *o,p'*-DDT), de ses métabolites déjà cités et des congénères 138, 153 et 180 des PCB. Le mélange « isomères de l'HCH, HCB et congénères du PCB » contient des isomères de l'HCH et des congénères des PCB déjà mentionnés, et de l'HCB. Le mélange « 13 polluants » contient tous les 13 polluants présents dans les mélanges précédents. La réponse maximale obtenue après exposition au 17 β -œstradiol a été ramenée à 100 % (résultat non montré), et les réponses obtenues pour les molécules d'intérêt ou mélanges sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative). La ligne horizontale représente la réponse cellulaire à 1 pg/puits de 17 β -œstradiol seul (environ 50 %).

Contrairement aux résultats obtenus pour les mélanges lors de l'étude de l'activité œstrogénique (section 2.1 de ce chapitre), les mêmes mélanges n'ont eu aucune influence sur l'activité des cellules MCF-7-ERE quand exposées au 17 β -œstradiol à une concentration de 1 pg/puits.

3 Optimisation de la séparation et de la détection des substances d'intérêt par GC-MS

Afin d'identifier les ions spécifiques et d'établir l'ordre d'élution des molécules cibles, une première analyse avec de solutions standards contenant une seule molécule d'intérêt à la fois a été réalisée. Le tableau 12 montre les rapports masse/charge recherchés pour chaque composé lors des analyses par GC-MS. Les composés sont classés par ordre croissant de temps de rétention dans ce tableau.

Tableau 12 : rapports masse/charge recherchés pour chaque composé lors des analyses par GC-MS. Les composés sont classés par ordre croissant de temps de rétention.

Composé	Rapports masse/charge recherchés
α -HCH	181 ;183
HCB	284 ;286
γ -HCH	181 ;183
β -HCH	181 ;183
δ -HCH	181 ;183
<i>p,p'</i> -DDE	316 ;318
<i>o,p'</i> -DDD	235 ;237
<i>o,p'</i> -DDT	235 ;237
<i>p,p'</i> -DDD	235 ;237
PCB 153	360 ;362
<i>p,p'</i> -DDT	235 ;237
PCB 138	360 ;362
PCB 180	394 ;396

Le premier paramètre optimisé pour les analyses en GC-MS était le gradient de température appliqué à la colonne chromatographique. L'optimisation de ce paramètre permet d'obtenir des pics bien séparés et résolus pour chacune des substances étudiées. La figure 24 montre un chromatogramme obtenue avant le développement d'un programme de température pour les analyses en GC-MS.

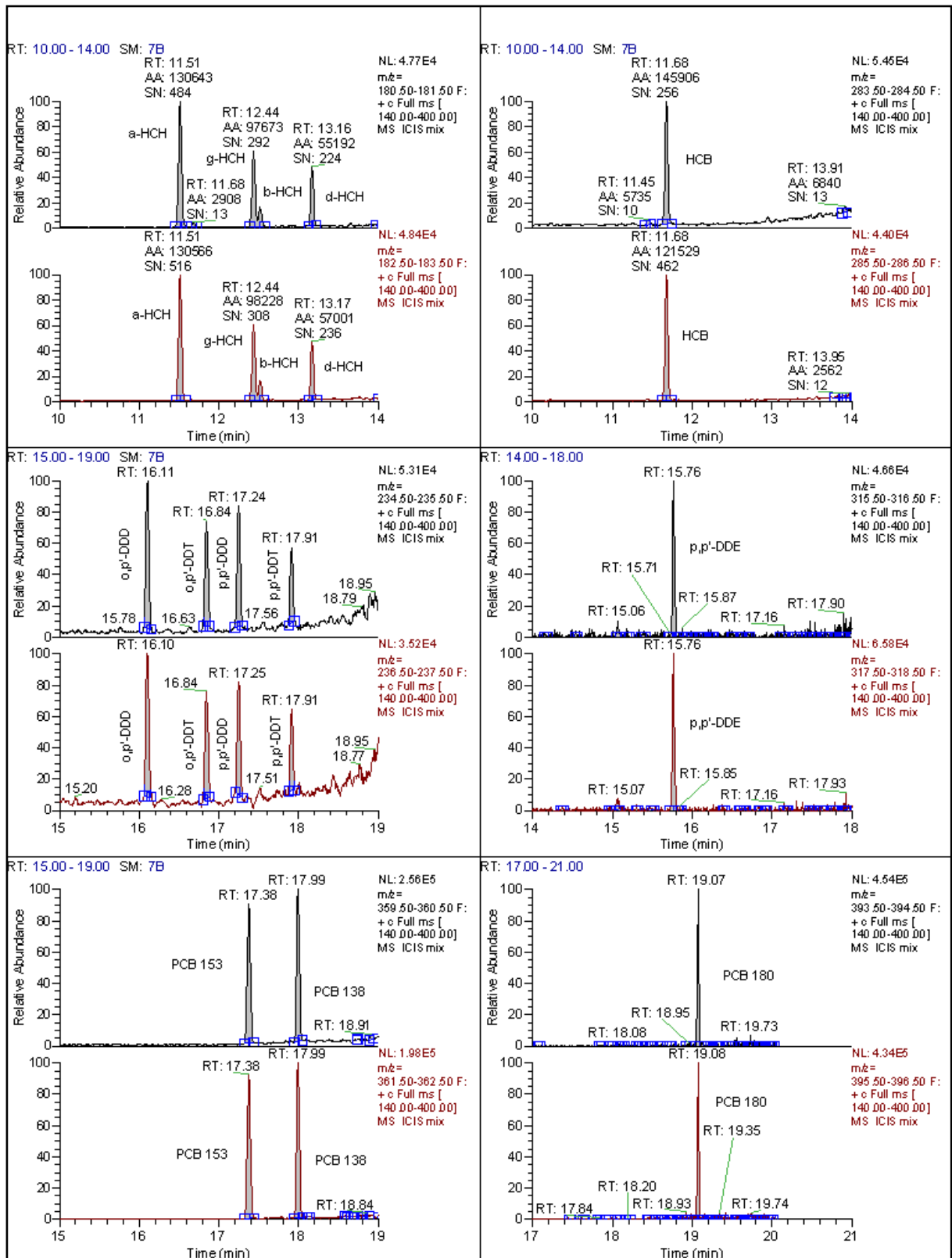


Figure 24 : chromatogramme d'un mélange de solutions standards des 13 polluants étudiés réalisé en mode balayage.

Dans le chromatogramme précédent, on constate que les pics correspondant au β -HCH et au γ -HCH ne sont pas bien séparés, ce qui pourrait générer des erreurs lors de la quantification de ces composés.

Après le test de quelques conditions, le programme suivant a été établi : la colonne est préchauffée à 120°C et cette température est maintenue pendant 2 min après l'injection ; ensuite la première rampe de température de 30 °C/min est appliquée jusqu'à 169°C et la température est maintenue ainsi pendant 13 min ; ensuite la deuxième rampe de température de 5 C/min est appliquée jusqu'à 170°C/min et cette température est maintenue pendant 9 min ; ensuite la colonne est soumise à la troisième rampe de température de 30°C/min jusqu'à 247°C, et cette température est stabilisée pendant 2 min ; finalement la quatrième rampe de température de 20°C/min est appliquée et cette température est maintenue pendant 2 min. Le temps total de l'analyse est de 36,05 min. La représentation graphique du programme de température utilisé dans les analyses par chromatographie gazeuse est reprise dans la figure 25.

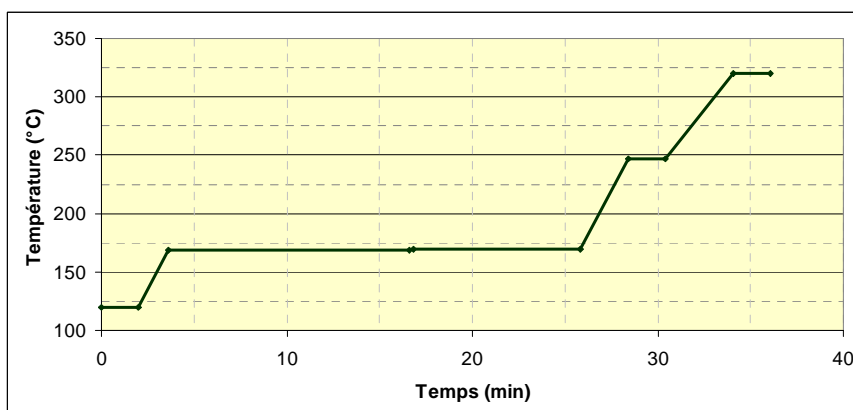


Figure 25 : programme de température utilisé dans les analyses par chromatographie gazeuse.

Après avoir établi le programme de température des analyses par chromatographie gazeuse, on a optimisé les paramètres des analyses par spectrométrie de masse en mode SIM (pour *single ion monitoring*) afin d'augmenter la sensibilité de détection (tableau 13).

Tableau 13 : paramètres des analyses par spectrométrie de masse en mode SIM.

Temps (min)	Potentiel électrique ajouté au multiplicateur (V)	Rapports masse/charge recherchés
11,50 – 15,99	+ 100	181 ; 183 ; 284 et 286
16,00 – 27,99	+ 200	181 et 183
28,00 – 29,99	0	302 ; 304
30,00 – 31,34	0	235 ; 237 ; 316 ; 318
31,35 – 33,29	0	235 ; 237 ; 360 ; 362
33,30 – 36,05	0	394 ; 396

La figure 26 montre un chromatogramme de solutions standards des 13 polluants étudiés et du standard interne PCB 80 ¹³C réalisé en mode SIM.

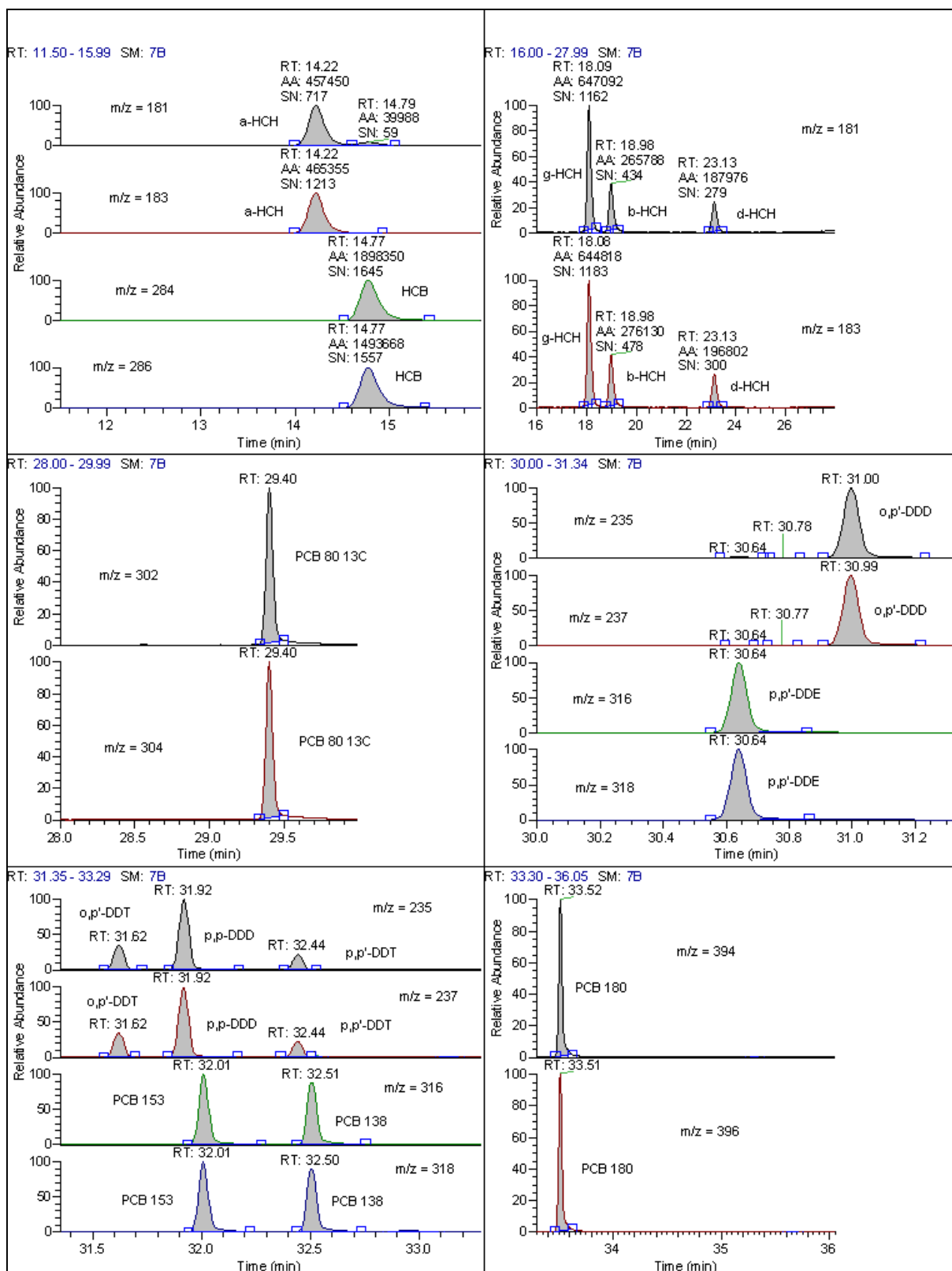


Figure 26 : chromatogramme d'un mélange de solutions standards des 13 polluants étudiés et du standard interne PCB 80-¹³C réalisé en mode SIM.

4 Optimisation de la méthode d'extraction et de purification des substances d'intérêt à partir de la graisse de marsouin

4.1 Extraction du 17β -œstradiol à partir de la graisse de bœuf

Après la réalisation des deux méthodes d'extraction décrites dans la section 4.1 du chapitre « Matériel et méthodes », la quantité de 17β -œstradiol récupéré a été quantifiée à l'aide des tests du type « gène rapporteur ». Un blanc de procédure et un blanc de matrice (graisse de bœuf non additionnée de 17β -œstradiol) ont été utilisés comme contrôles négatifs, et un extrait de graisse de bœuf, auquel du 17β -œstradiol a été additionné après l'extraction a été utilisé comme contrôle positif, ainsi que pour vérifier l'effet matrice sur la réponse cellulaire.

En parallèle, les cellules MCF-7-ERE ont été exposées à une solution de 17β -œstradiol dont la concentration était de 0,4 pg/puits (qui correspond à la concentration théorique en 17β -œstradiol à retrouver dans l'extrait de graisse, en supposant que le taux de récupération soit de 100 %). Ces résultats sont repris dans la figure 27.

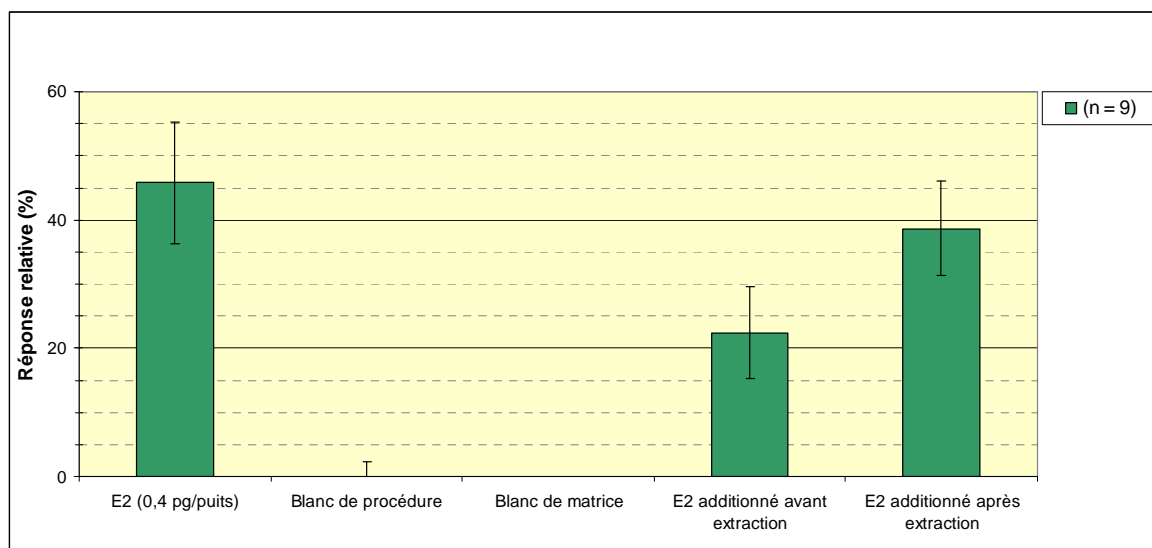


Figure 27 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées aux extraits obtenus après la réalisation de la première méthode d'extraction de la section 4.1 du chapitre « Matériel et méthodes ». Les deux extraits auxquels le 17 β -œstradiol (E2) a été additionné étaient censés avoir cette hormone à une concentration de 0,4 pg/puits lors de l'exposition cellulaire. Une solution 17 β -œstradiol à 0,4 pg/puits a été testée à titre de comparaison. La réponse maximale obtenue après exposition au 17 β -œstradiol a été ramenée à 100 % (résultat non montré), et les réponses obtenues pour les molécules d'intérêt ou mélanges sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative).

Le rendement d'extraction du 17 β -œstradiol à partir de la graisse de bœuf pour la première méthode décrite dans la section 4.1 du chapitre « Matériel et méthodes » a été de 56 %.

Les résultats relatifs à la deuxième méthode d'extraction décrite dans la section 4.1 du chapitre « Matériel et méthodes » sont repris dans la figure 28. La réponse relative théorique pour une concentration en 17 β -œstradiol de 0,8 pg/puits a été ajoutée aux résultats à titre comparatif, vu que les deux extraits auxquels le 17 β -œstradiol a été additionné étaient censés avoir une concentration de 0,8 pg/puits de cette hormone lors de l'exposition cellulaire.

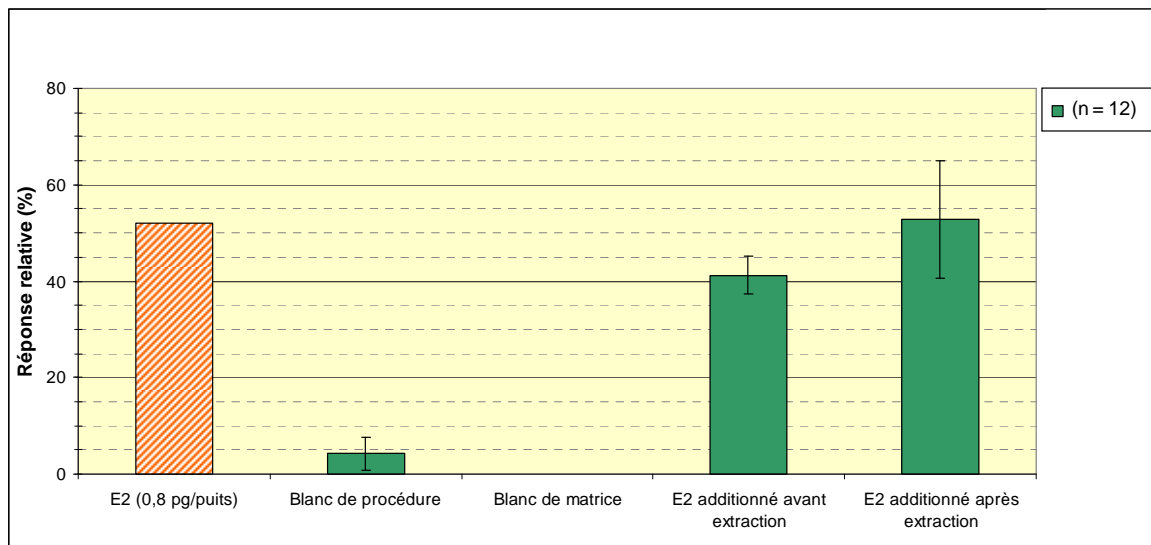


Figure 28 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées aux extraits obtenus après la réalisation de la deuxième méthode d'extraction de la section 4.1 du chapitre « Matériel et méthodes ». Les deux extraits auxquels le 17 β -œstradiol (E2) a été additionné étaient censés avoir cette hormone à une concentration de 0,8 pg/puits lors de l'exposition cellulaire. La réponse maximale obtenue après exposition au 17 β -œstradiol a été ramenée à 100 % (résultat non montré), et les réponses obtenues pour les molécules d'intérêt ou mélanges sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative).

Le rendement d'extraction du 17 β -œstradiol à partir de la graisse de bœuf pour la deuxième méthode décrite dans la section 4.1 du chapitre « Matériel et méthodes » a été de 77,4 %.

4.2 Extraction et purification des perturbateurs endocriniens à partir de la graisse de marsouin

Au début du développement d'une méthode d'extraction et de purification des substances d'intérêt à partir de la graisse de marsouin, les tests cellulaires du type « gène rapporteur » étaient optimisés, par contre la mise en place d'un programme avec les paramètres pour les analyses en GC-MS était encore en cours. C'est pour cette raison que le 17 β -œstradiol, qui est facilement mesuré par les tests cellulaires, a été la molécule employée pour évaluer les deux premiers essais d'extraction testés.

Après la mise en place d'un programme de paramètres pour les analyses en GC-MS, l'approche a dû changer car le 17 β -œstradiol ne pourrait pas être séparé/déecté en utilisant tel programme et ne pouvait donc être présent dans les extraits de graisse de marsouin. Autrement, il y aurait une influence difficile à estimer lorsque ces extraits seraient testés à l'aide des tests cellulaires du type « gène rapporteur ».

L'option par une méthode de purification en colonne de silice acidifiée a été faite car les hormones stéroïdes sont hydrolysées en présence d'acides minéraux (Jayle et Crépy, 1961).

4.2.1 Mesure du rendement de récupération par GC-MS

La méthode décrite dans la section 4.2 du chapitre « Matériel et méthodes » a été appliquée pour une solution contenant les 13 composés cibles de ce mémoire en hexane. Trois éluions différentes ont été testés : 1) éluion avec 15 mL d'hexane ; 2) éluion avec 15 mL de l'hexane suivis de 25 mL d'un mélange dichlorométhane/hexane 1:3 (v/v) ; 3) éluion avec 25 mL d'un mélange dichlorométhane/hexane 1:3 (v/v). Au bout de la purification, les extraits (à une concentration théorique de 200 pg/ μ L) ont été analysés par GC-MS avec les paramètres optimisés selon la section 3 de ce chapitre. La figure 29 montre les valeurs des rendements d'extraction obtenus après ces analyses.

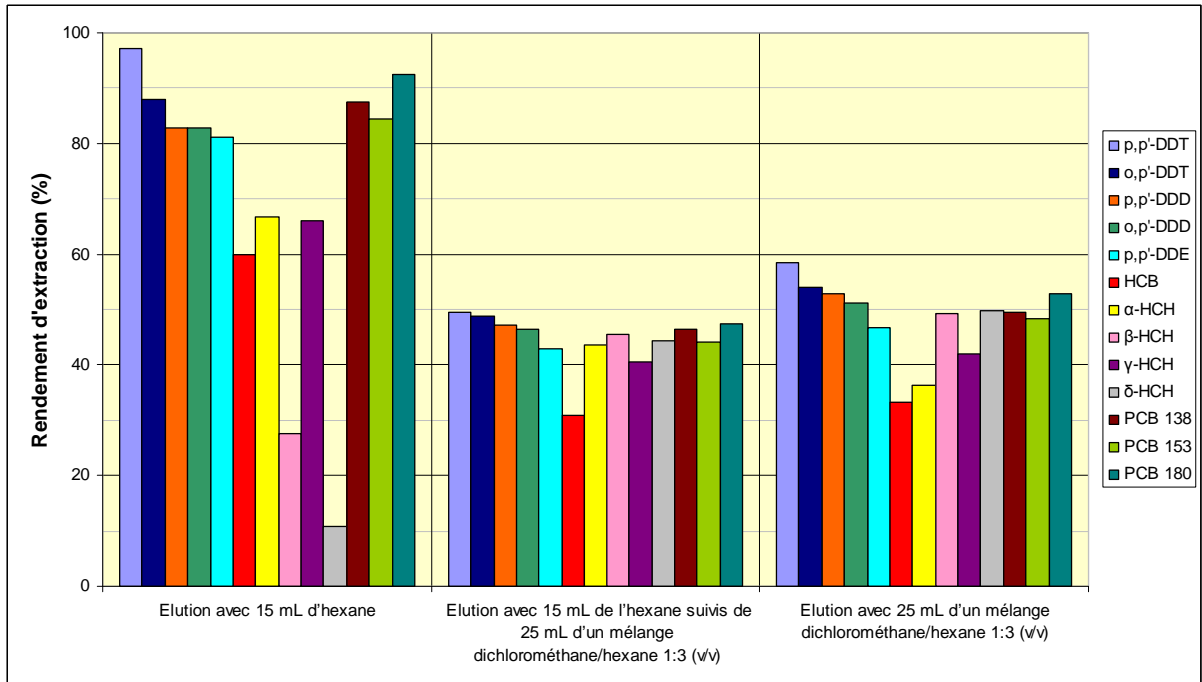


Figure 29 : rendements d'extraction obtenues par l'application de la méthode décrite dans la section 4.2 du chapitre « Matériel et méthodes » à partir d'une solution contenant les 13 polluants étudiés dans ce mémoire.

Parmi les différentes éluions testées, celle de numéro 3 a été retenue pour présenter un meilleur rendement d'extraction global.

4.2.2 Mesure du rendement de récupération de l'activité hormonale à laide du test cellulaire du type « gène rapporteur »

Dans la suite, la même solution contenant les 13 polluants cibles de ce mémoire utilisée dans la section 2 de ce chapitre (à une concentration de 400 ng/μL lors de l'exposition cellulaire) a été soumise à cette méthode d'extraction/purification (méthode n°3), et l'extrait final a été analysé par test cellulaire du type « gène rapporteur », en présence et en absence de 17β-œstradiol. Une solution des mêmes composés à la même concentration, sans avoir subi l'étape d'extraction/purification, a été testée en parallèle (figure 30 et figure 31).

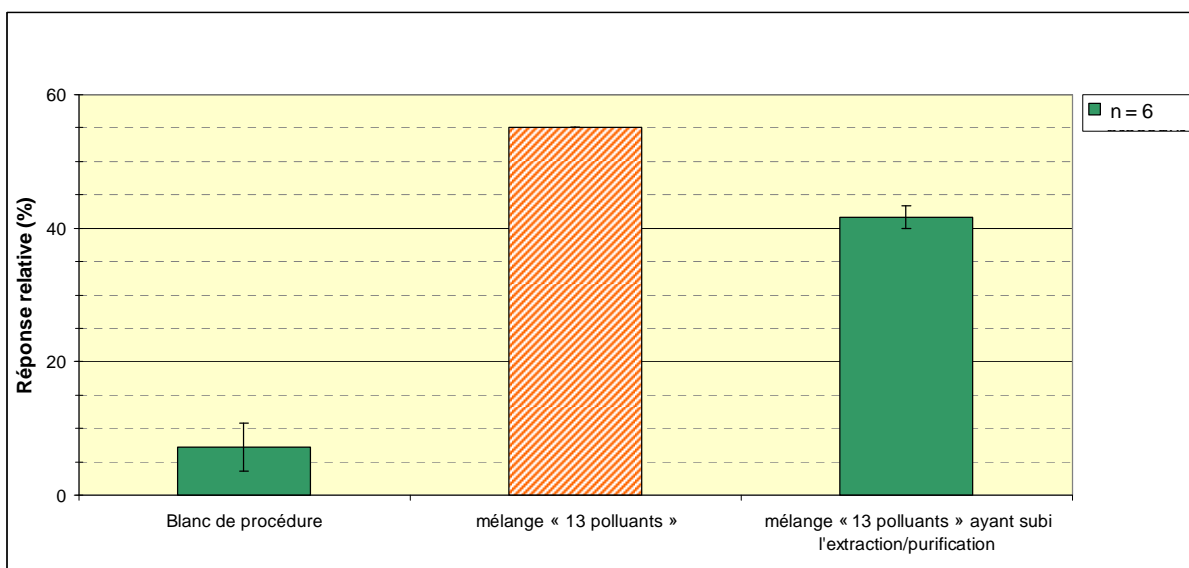


Figure 30 : réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées aux extraits obtenus après l'application de la méthode d'extraction décrite dans la section 4.2 du chapitre « Matériel et méthodes » à une solution contenant les 13 polluants cibles de ce mémoire, à une concentration de 400 ng/puits lors de l'exposition cellulaire. La réponse obtenue par l'exposition de la même solution n'ayant pas subi l'extraction/purification est ajoutée au graphique à titre de comparaison. La réponse maximale obtenue après exposition au 17β -œstradiol a été ramenée à 100 % (résultat non montré), et les réponses obtenues pour les extraits sont exprimés en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative).

Le graphique précédent montre qu'une grande partie de l'activité hormonale présente dans la solution contenant les 13 polluants cibles est récupérée après l'étape d'extraction/purification.

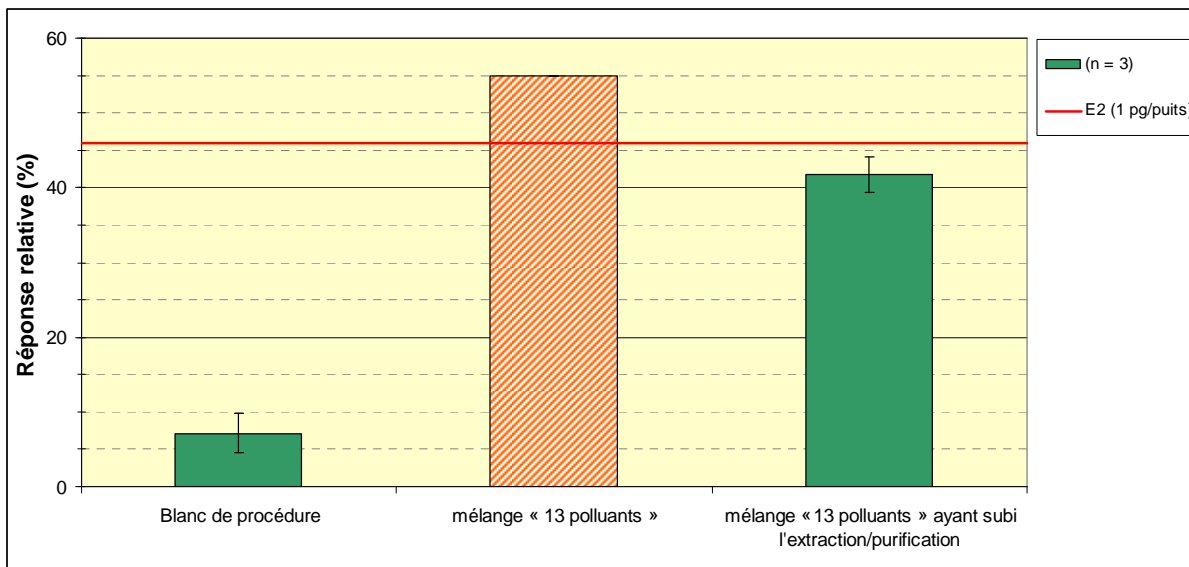


Figure 31 : expression réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées au 17 β -œstradiol à une concentration de 1 pg/puits et aux extraits obtenus après l'application de la méthode d'extraction décrite dans la section 4.2 du chapitre « Matériel et méthodes » à une solution contenant les 13 polluants cibles de ce mémoire à une concentration de 400 ng/puits lors de l'exposition cellulaire. La réponse obtenue par l'exposition au 17 β -œstradiol à une concentration de 1 pg/puits et à la même solution contenant les 13 polluants est ajoutée au graphique, à titre de comparaison. La ligne horizontale représente la réponse cellulaire à 1 pg/puits de 17 β -œstradiol seul (environ 50 %). La réponse maximale obtenue après exposition au 17 β -œstradiol a été ramenée à 100 % (résultat non montré), et les réponses obtenues pour les extraits sont exprimés en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative).

Aucun des mélanges montrés dans la figure précédente n'a eu d'influence sur l'activité des cellules MCF-7-ERE quand exposées au 17 β -œstradiol à une concentration de 1 pg/puits.

Afin de contrôler que le 17 β -œstradiol est bien éliminé lors de l'extraction/purification des 13 polluants, la même méthode a été appliquée à 100 μ L d'une solution de 17 β -œstradiol à une concentration de 0,1 ng/ μ L. L'élution a été effectué avec 25 mL de dichlorométhane 25 % v/v en hexane. Un blanc de procédure a été utilisé comme contrôle négatif, et un extrait obtenu à partir de l'hexane, auquel 100 μ L d'une solution de 17 β -œstradiol à une concentration de 0,1 ng/ μ L, a été utilisé comme contrôle positif. Ces trois extraits et une solution de 17 β -œstradiol à une concentration de 1 pg/puits ont été testés à l'aide des cellules MCF-7-ERE (figure 32)

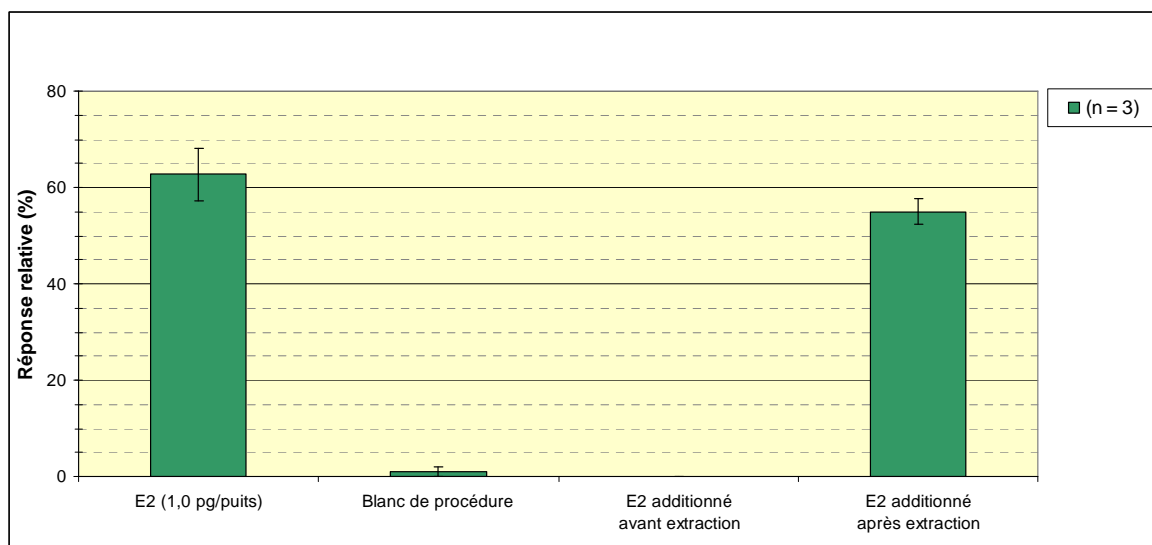


Figure 32 : expression réponse (activité de la luciférase) des cellules MCF-7-ERE exposées aux extraits obtenus après l'application de la méthode d'extraction décrite dans la section 4.2 du chapitre « Matériel et méthodes » à 100 μ L d'une solution de 17 β -œstradiol (E2) à une concentration de 0,1 ng/ μ L. Un blanc de procédure a été utilisé comme contrôle négatif, et un extrait obtenu à partir de l'hexane, auquel 100 μ L d'une solution de 17 β -œstradiol à une concentration de 0,1 ng/ μ L, a été utilisé comme contrôle positif. Une solution 17 β -œstradiol à 1,0 pg/puits a été testée à titre de comparaison. La réponse maximale obtenue après exposition au 17 β -œstradiol a été ramenée à 100 % (résultat non montré), et les réponses obtenues pour les extraits sont exprimés en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative).

Les résultats indiquent que l'extrait provenant de la solution de 17 β -œstradiol ayant subi l'extraction/purification ne montre aucune activité œstrogénique, ce qui indique que le 17 β -œstradiol est sans doute dégradé par le passage sur silice acide, comme attendu. Le blanc de procédure (contrôle négatif) ne montre aucune activité, ce qui indique que la méthode est compatible avec le test cellulaire. De même, lorsqu'on ajoute le 17 β -œstradiol dans l'extrait provenant du blanc de procédure, les cellules répondent positivement, et selon l'intensité attendue, ce qui indique que la procédure d'extraction/purification en elle-même n'apporte aucun effet négatif ou inhibiteur pour les cellules.

5 Analyse d'échantillons de graisse de marsouin par GC-MS

La méthode d'extraction et de purification décrite dans la section 4.2 du chapitre « Matériel et Méthodes » combinée aux conditions d'élution n°3 dans la section précédente ont été appliquées à 12 échantillons de graisse de marsouin. Les extraits obtenus ont été dilués 10 fois et 100 fois, et ont été analysés par GC-MS.

La figure 33 montre le chromatogramme de tous les composés obtenue lors de l'analyse de l'échantillon 01/805 par GC-MS.

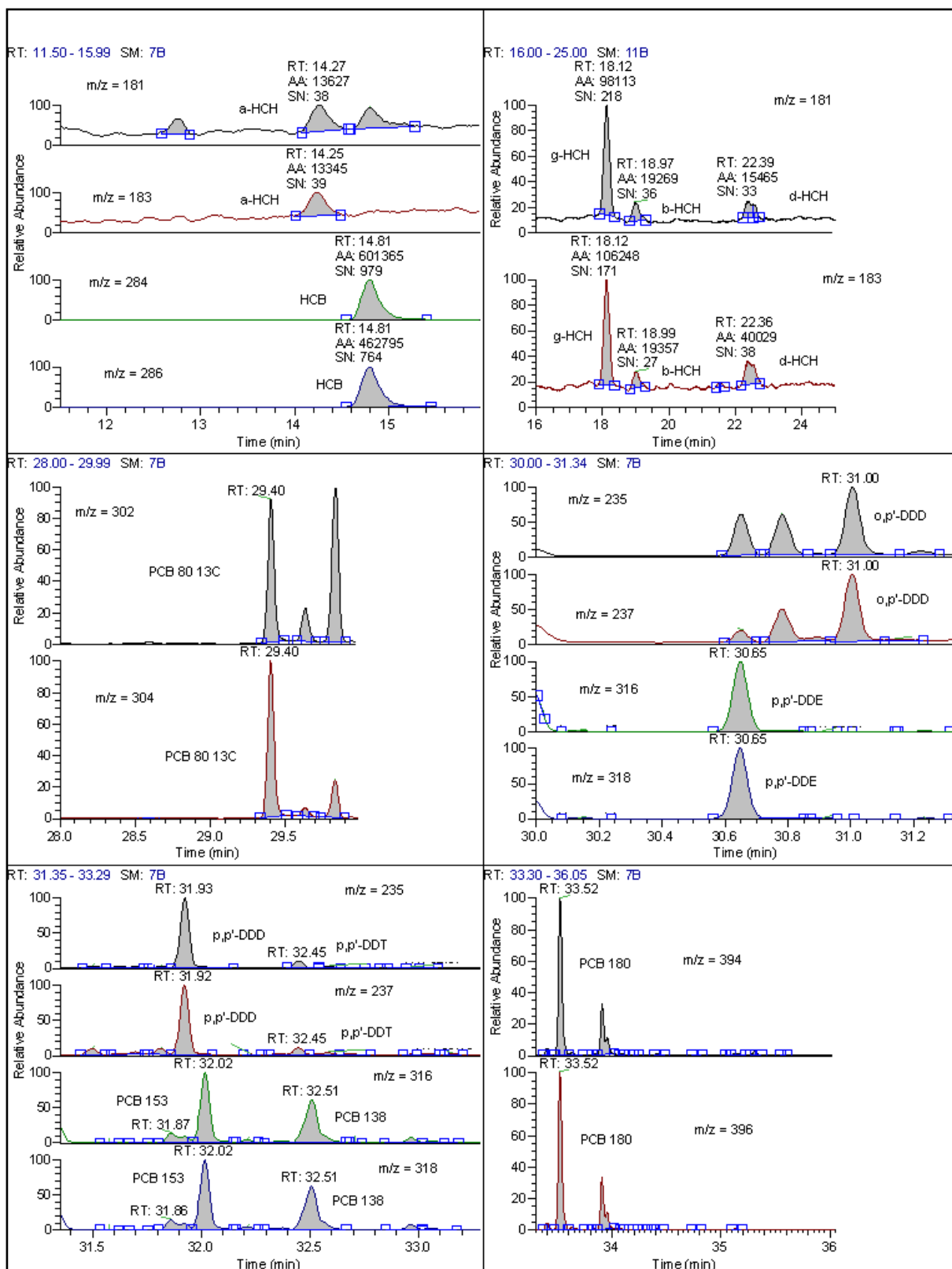


Figure 33 : chromatogramme de tous les composés obtenus lors de l'analyse de l'échantillon 01/805 par GC-MS.

Les chromatogrammes issus des analyses des échantillons par GC-MS présentaient tous les pics, sauf un, bien séparés et résolus, c'est qui a permis d'identifier et de quantifier les composés cibles. Il a été observé que le pic ayant le même temps de rétention que celui produit par le PCB 138 se présentait déformé lors des analyses des échantillons (figure 34).

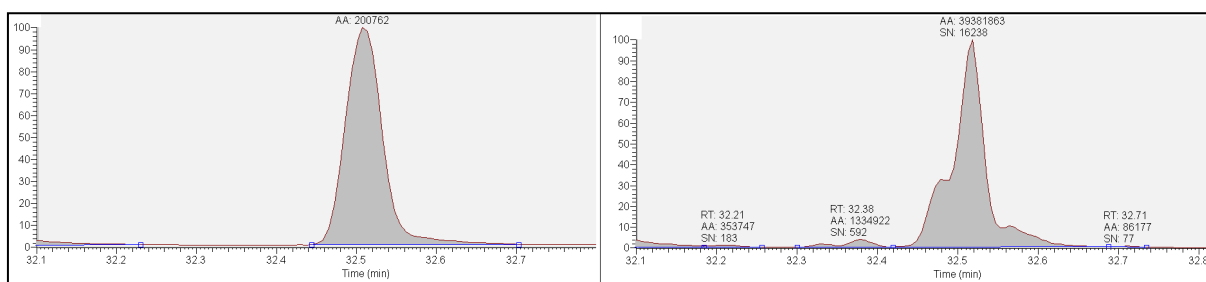


Figure 34 : partie du chromatogramme comprenant le temps de rétention correspondant au PCB 138 à partir de l'analyse d'une solution standard de PCB 138 (gauche) et de l'échantillon A03/1517 (droite).

Ce phénomène spécifique aux échantillons n'a pas été observé lors de l'analyse de la solution du mélange des 13 polluants ayant subi les étapes d'extraction/purification, et est peut-être due à l'inefficacité du programme utilisé en chromatographie gazeuse pour séparer le couple PCB 138/PCB 163 (probablement présent dans les échantillons). Cette problématique a été précédemment observée par Schantz et collaborateurs (1996).

Le tableau 14 reprend les résultats de la quantification des substances cibles dans 12 échantillons de graisse de marsouin.

Tableau 14 : concentrations (ppm) des substances d'intérêt présentes dans 12 échantillons de graisse de marsouin commun. Les polluants ont été divisés en trois groupes, et la somme des concentrations des polluants de chaque groupe est présentée pour les différents échantillons. La moyenne et l'écart-type des concentrations des différents polluants et de la somme des concentrations des polluants de chaque groupe dans les différents échantillons figurent également dans ce tableau. La limite de quantification (LOQ) pour l'*o,p'*-DDD est de 0,039 ppm; n.d = non détecté.

Echantillon	<i>p,p'</i> -DDT	<i>o,p'</i> -DDT	<i>p,p'</i> -DDD	<i>o,p'</i> -DDD	<i>p,p'</i> -DDE	Σ
03/1521	0,18	0,048	0,34	< LOQ	1,0	1,6
01/1196	0,32	0,10	0,53	0,072	1,2	2,3
03/1238	0,79	0,34	0,88	0,18	3,1	5,3
A00/1140	0,56	0,098	0,92	0,078	2,6	4,3
A00/258	0,47	0,074	0,85	0,068	2,9	4,4
A03/1517	0,71	0,21	1,24	0,41	4,1	6,6
01/847	0,19	0,060	0,24	< LOQ	0,91	1,4
01/805	0,37	0,082	0,73	0,086	2,4	3,7
01/1219	1,40	0,86	2,6	0,52	8,6	14
A00/600	0,20	0,054	0,41	< LOQ	1,4	2,1
01/887	0,58	0,17	0,60	0,069	2,3	3,7
A00/974	0,11	0,071	0,14	0,040	0,51	0,9
Moyenne	0,49	0,18	0,79	0,13	2,6	4,2
Ecart-type	0,36	0,23	0,66	0,17	2,2	3,5
Echantillon	HCB	α-HCH	β-HCH	γ-HCH	δ-HCH	Σ
03/1521	0,14	0,070	n.d.	0,098	n.d.	0,31
01/1196	0,21	n.d.	n.d.	0,14	n.d.	0,35
03/1238	0,54	0,068	0,097	0,13	n.d.	0,83
A00/1140	0,22	0,066	n.d.	0,13	n.d.	0,42
A00/258	0,31	n.d.	0,088	0,23	n.d.	0,63
A03/1517	0,49	n.d.	0,080	0,20	n.d.	0,77
01/847	0,13	n.d.	n.d.	0,080	n.d.	0,21
01/805	0,34	0,080	0,083	0,17	n.d.	0,67
01/1219	1,5	0,098	0,13	0,48	n.d.	2,2
A00/600	0,098	0,071	0,042	0,17	n.d.	0,38
01/887	0,60	0,10	0,074	0,15	n.d.	0,93
A00/974	0,076	0,074	0,047	0,12	n.d.	0,31
Moyenne	0,39	0,053	0,053	0,18	n.a.	0,67
Ecart-type	0,40	0,041	0,045	0,11	n.a.	0,54

(continue)

(continuation)

Echantillon	PCB 138	PCB 153	PCB 180	Σ
03/1521	0,99	1,4	0,33	2,7
01/1196	1,3	1,7	0,32	3,3
03/1238	8,3	12	2,5	23
A00/1140	3,8	6,3	1,8	12
A00/258	3,7	5,5	1,2	10
A03/1517	31	42	7,4	81
01/847	2,7	4,0	0,80	7,5
01/805	3,7	5,5	1,2	10
01/1219	7,7	11	1,9	21
A00/600	3,6	5,1	0,93	9,6
01/887	2,3	3,2	0,79	6,3
A00/974	0,59	0,60	0,11	1,3
Moyenne	5,8	8,3	1,6	16
Ecart-type	8,4	11	1,9	22

Le groupe des PCB est celui présent en plus grande concentration dans les échantillons analysés, suivi de celui du DDT et de ses métabolites, et après de celui de l'HCB, de l'HCH, et de ses isomères.

Dans le groupe du DDT et de ses métabolites, le *p,p'*-DDE est la molécule présente en plus grande concentration dans la graisse de marsouin. Parmi l'HCB, l'HCH et ses isomères, l'HCB et le γ -HCH ont été trouvés en plus grande quantité dans les échantillons. Finalement, dans le groupe des congénères recherchés des PCB, on a trouvé une quantité plus importante de PCB 138.

Les grands écarts de concentration entre les échantillons sont observés car ils proviennent des animaux de différents âges et aussi de différentes parties de la mer du Nord, c'est qui peut produire une variation de la contamination selon les activités humaines et les décharges des eaux usées dans chaque région.

6 Analyse d'échantillons de graisse de marsouin par test du type « gène rapporteur »

A partir de la même extraction réalisée pour la section précédente, 12 extraits de graisse de marsouin ont été obtenus pour les analyses par test cellulaire du type « gène rapporteur ». L'expression de la luciférase exposées à ces extraits, en absence ou en présence de 17 β -œstradiol (à une concentration qui donne une réponse relative d'environ 50 %), sont repris dans le tableau 15.

Tableau 15 : expression de la luciférase par les cellules MCF-7-ERE exposées aux extraits de graisse de marsouin obtenus comme décrit dans la section 5 de ce chapitre, en absence ou présence de 17 β -œstradiol. Pour le blanc de procédure n = 6 et pour les échantillons n = 3 . La réponse maximale obtenue après exposition au 17 β -œstradiol a été ramenée à 100 % (résultat non montré), et les réponses obtenues pour les extraits sont exprimés en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative).

Echantillon	Exposition de l'extrait seul		Exposition de l'extrait avec le 17 β -œstradiol à une concentration de 1 pg/puits	
	Moyenne (%)	Ecart-type (%)	Moyenne (%)	Ecart-type (%)
Blanc de procédure	7	3	54	3
03/1521	12	1	51	1
01/1196	15	1	48	1
03/1238	9	0	38	1
A00/1140	12	1	48	2
A00/258	22	0	52	1
A03/1517	8	1	41	2
01/847	10	1	50	0
01/805	17	2	51	1
01/1219	24	1	48	0
A00/600	9	1	49	2
01/887	14	1	54	1
A00/974	13	2	47	2

Les échantillons A00/258 et 01/1219 présentent l'activité œstrogénique la plus importante avec plus de 20 % de réponse relative. Aucun échantillon ne semble produire une activité anti-œstrogénique (en présence de 17 β -œstradiol) sauf peut-être les échantillons 03/1238 et A03/1517, où l'activité de l'œstradiol semble être légèrement inhibé, en passant de 54 % à 38 % et 41 % respectivement.

7 Corrélation entre les résultats obtenus par GC-MS et par test cellulaire

Le tableau 16 reprend tous les échantillons classés par ordre décroissant de contamination globale par les 13 substances cibles de ce mémoire avec leurs réponses respectives produites lors des tests cellulaires.

Tableau 16 : échantillons de graisse de marsouin avec leurs respectives valeurs de contamination globale par les 13 substances cibles de ce mémoire. L'activité œstrogénique ou anti-œstrogénique est représentée par expression de la luciférase par les cellules MCF-7-ERE exposées aux échantillons, en absence ou présence de 17 β -œstradiol.

Echantillon	Contamination globale (ppm)	Activité œstrogénique (%)	Activité anti-œstrogénique (%)
A03/1517	88	8	41
01/1219	37	24	48
03/1238	29	9	38
A00/1140	17	12	48
A00/258	15	22	52
01/508	15	17	51
A00/600	12	9	49
01/887	11	14	54
01/847	9,1	10	50
01/1196	5,9	15	48
03/1521	4,6	12	51
A00/974	2,4	13	47

En observant le tableau 16, on constate déjà que parmi les trois échantillons le plus contaminés, un a produit l'activité œstrogénique la plus élevée (01/1219) et les deux autres, les activités anti-œstrogénique les plus importantes (A03/1517 et 03/1238).

Afin de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre les résultats obtenus par les analyses en GC-MS et par tests cellulaires du type « gène rapporteur », les substances ont été divisées en deux groupes selon leur activité la plus accentuée (œstrogénique ou anti-œstrogénique). Les échantillons 03/1521 ; 01/1196 ; A00/258 ; 01/805 ; 01/1219 et 01/887 ont été repris dans le premier

groupe. Les échantillons 03/1238 ; A00/1140 ; A03/1517 ; 01/847 : A00/600 et A00/974 on été repris dans le deuxième groupe. Un graphique a été créé pour chaque groupe reprenant les taux de contamination de chaque échantillon et son activité hormonale correspondante (figure 35 et figure 36).

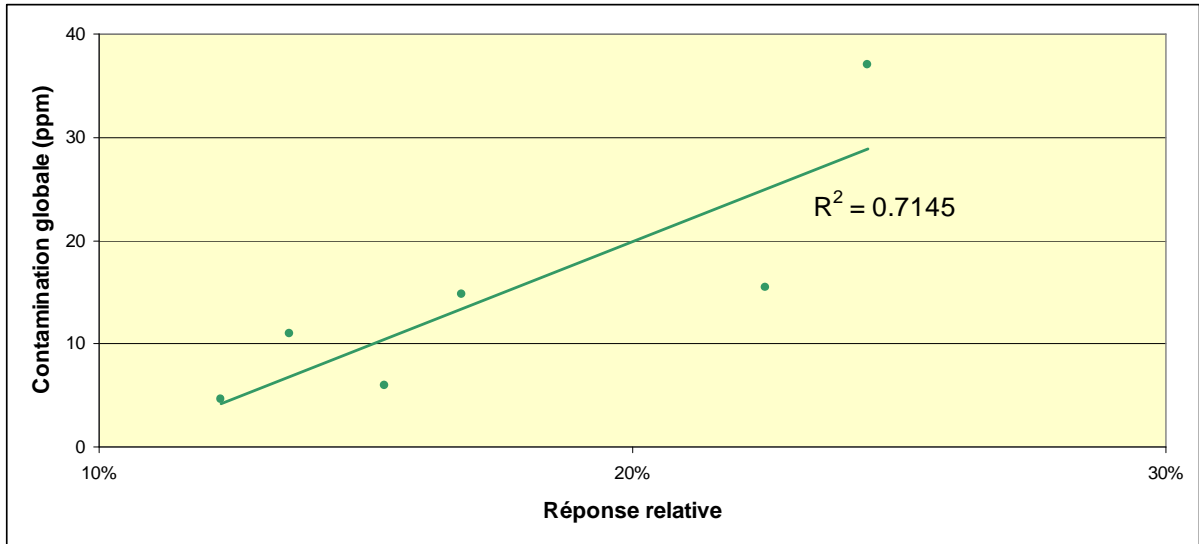


Figure 35 : corrélation entre la réponse relative obtenue par six échantillons de graisse de marsouin ayant les activités œstrogéniques les plus accentués et leur valeur de contamination globale par les 13 polluants cibles de ce mémoire correspondante.

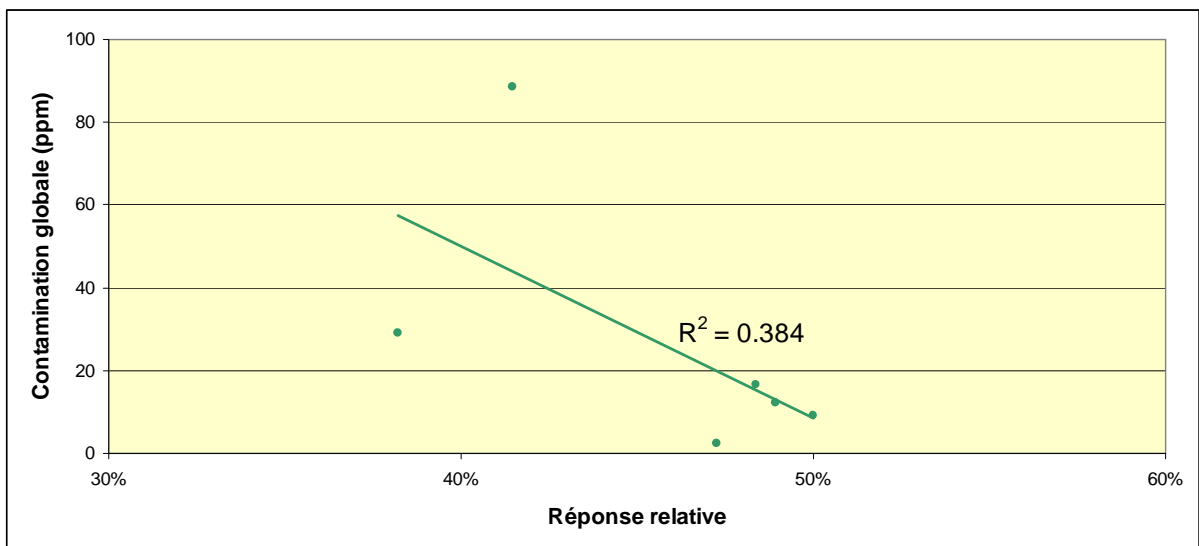


Figure 36 : corrélation entre la réponse relative obtenue par six échantillons de graisse de marsouin ayant les activités anti-œstrogéniques les plus accentués et leur valeur de contamination globale par les 13 polluants cibles de ce mémoire correspondante.

En observant la figure 35, on peut constater qu'il y a une corrélation importante entre l'activité œstrogénique des échantillons et leur taux de

contamination globale par les substances cibles. D'un autre côté, une corrélation plus faible est observée quand on tient compte de l'activité anti-œstrogénique.

Avec les données sur l'activité œstrogénique des substances d'intérêt obtenues dans la section 2 de ce chapitre et sur la concentration de ces substances dans la graisse de marsouin obtenues dans la section 5 de ce chapitre, une estimation de l'activité œstrogénique attendue a été faite pour trois échantillons (tableau 17). Cette estimation n'a pas été réalisée pour les autres échantillons car les substances d'intérêt y étaient présentes à des concentrations qui n'induisent pas de réponse cellulaire.

Tableau 17 : activité œstrogénique attendue et mesurée pour trois échantillons de graisse de marsouin. L'activité maximale obtenue après exposition au 17 β -œstradiol a été ramenée à 100 % (résultat non montré), et les activités obtenues pour les échantillons sont exprimées en pourcentage de la réponse maximale (réponse relative).

Echantillon	Activité œstrogénique attendue (%)	Activité œstrogénique mesurée (%)
03/1238	12	9
A03/1517	15	8
01/1219	15	24

La divergence des valeurs d'activité œstrogénique attendue et d'activité œstrogénique mesurée indique que l'activité œstrogénique de l'échantillon est liée à d'autres perturbateurs endocriniens que ceux recherchés par GC-MS.

8 Données complémentaires sur les échantillons de graisse de marsouin

Le tableau 18 compile les données fournies par le Laboratoire d'océanologie de l'Université de Liège concernant l'année et le lieu de collecte, l'âge et le sexe des marsouins dont les échantillons étaient issus.

Tableau 18 : année et lieu de collecte, âge et sexe des marsouins dont les échantillons utilisés dans ce mémoire sont issus. n.d. = non disponible.

Echantillon	Année de collecte	Lieu de collecte	Age	Sexe
03/1521	2003	France	jeune	mâle
01/1196	2001	n.d.	jeune	mâle
03/1238	2003	Belgique	jeune	femelle
A00/1140	2000	Belgique	jeune	femelle
A00/258	1999	Belgique	jeune	mâle
A03/1517	2003	France	jeune	mâle
01/847	2000	Belgique	jeune	femelle
01/805	2001	Belgique	jeune	mâle
01/1219	2001	Belgique	jeune	mâle
A00/600	2000	Belgique	jeune	mâle
01/887	2001	Belgique	jeune	mâle
A00/974	2000	Belgique	jeune	femelle

Le faible nombre et l'homogénéité des échantillons ne permettent pas établir un lien entre le niveau de contamination ou l'activité hormonale de ces échantillon et les données relatives aux animaux dont ils sont issus.

DISCUSSION

1 Optimisation des tests cellulaires

Pendant l'optimisation des tests cellulaires, on a constaté que les quatre lignées cellulaires caractérisées dans ce mémoire répondaient de manière significative à leur ligand de référence, indépendamment du solvant utilisé. Les valeurs d'EC₅₀ calculées pour le ligand de référence de chaque lignée (sauf la progestérone) sont similaires à celles publiées par Willemsen et collaborateurs (2004). L'observation de plusieurs paramètres pouvant influencer directement la performance de ces essais montre l'importance du contrôle du plus grand nombre possible de paramètres de manière à éviter des variations d'un test à l'autre. Les conditions idéales sont celles fournissant des mesures de RLU/s élevées (augmentation de la résolution) et des valeurs d'EC₅₀ faibles (augmentation de la sensibilité). Finalement, la mauvaise fidélité du test du type « gène rapporteur » réalisé à l'aide des cellules MCF-7-ERE peut être expliquée à cause d'une diminution de la sensibilité du test au fur et à mesure des passages cellulaires successifs.

2 Etude de l'activité hormonale de substances d'intérêt

Les tests d'activité hormonale ont montré que la majorité des polluants étudiés possède une activité œstrogénique quand ils sont testés à l'aide de la lignée MCF-7-ERE. On a constaté que la réponse cellulaire induite par un mélange de ces composés est pratiquement impossible à prédire, c'est pour cela que la connaissance des effets générés par un ensemble de substances se montre très importante dans n'importe quelle étude toxicologique ou épidémiologique, même si des données abondantes pour chaque substance isolée sont disponibles.

3 Optimisation des paramètres des analyses par GC-MS

La mise au point d'un programme de température pour les analyses en chromatographie gazeuse a permis d'obtenir des temps de rétention bien écartés pour les composés d'intérêt, sauf pour les couples *p,p'*-DDD/PCB 153 et *p,p'*-DDT/PCB 138. Cela n'a pas cependant posé un problème majeur car les rapports *m/z* suivis pour détecter les deux composés de chaque couple sont différents, de manière qu'après l'optimisation des paramètres des analyses par spectrométrie de masse, tous les composés ont pu être facilement quantifiés.

4 Analyse des échantillons de graisse de marsouin

Les concentrations des polluants cibles dans les échantillons de graisse de marsouin sont conformes aux données présentes dans le tableau 1 et publiées par Mössner et Ballschmiter (1997), et par Covaci et collaborateurs (2002). La quantité plus élevée de *p,p'*-DDE dans la graisse de marsouin, quand comparée au DDT et à ses autres métabolites confirme que le DDE est une molécule encore plus persistante que le DDT (d'Amato *et al.*, 2002), probablement à cause de la dégradation biologique ou environnementale du DDT en DDE. L'isomère le plus abondant de l'HCH dans les échantillons analysés était le γ -HCH. De prime abord, cela pourrait sembler surprenant car, pour chaque tonne de γ -HCH synthétisée, neuf tonnes de ses isomères non-désirés sont produits (Brown, 2008). En fait, ce résultat peut-être expliqué par la préoccupation croissante de l'industrie moderne de transformer les isomères non-désirés de l'HCH en des composés moins toxiques, comme le trichlorobenzène et l'acide chlorhydrique avant de les rejeter dans la nature. Finalement, la grande quantité de PCB 153 mesurée dans les échantillons n'est pas surprenante vu qu'il s'agit d'une molécule extrêmement persistante et difficilement biométabolisée (Bruhn, 1995).

La littérature concernant l'utilisation des tests du type « gène rapporteur » pour évaluer l'activité hormonale des échantillons provenant des organismes marins est peu abondante. Garritano et collaborateurs (2006) ont essayé d'établir sans succès une relation entre la contamination des échantillons provenant des organismes marins destinés à la consommation humaine par des PCB et leur activité œstrogénique.

Malheureusement, la quantité insuffisante d'analyses réalisées dans ce travail ne permet pas la réalisation d'une analyse statistique plus puissante afin d'affirmer que les corrélations trouvées sont significatives ou pas.

CONCLUSION

Les objectifs fixés dans le cadre de ce mémoire ayant été atteints, on dispose à présent de données sur l'activité hormonale des composés étudiés, ainsi que de celles des échantillons de graisse de marsouin. De plus, l'évaluation de la contamination par des perturbateurs endocriniens dans ces mêmes échantillons a pu être réalisée.

La charge élevée en polluants organiques persistants dans les échantillons de graisse de marsouin indique que ces polluants peuvent être aussi retrouvés dans les denrées alimentaires originaires de la Mer du Nord.

L'activité œstrogénique mesurée dans les échantillons confirme encore la présence des perturbateurs endocriniens dans le milieu marin, ce qui peut engendrer des effets négatifs sur la santé des consommateurs de produits de la mer.

La réalisation de ce mémoire a également permis la mise au point des différents procédés d'analyse, comme une méthode d'extraction d'hormones et une méthode d'analyse des perturbateurs endocriniens par GC-MS et par test cellulaire du type « gène rapporteur » à partir des échantillons de graisse.

Il serait intéressant d'analyser un plus grand nombre d'échantillons afin de pouvoir définir une stratégie d'analyse où le test du type « gène rapporteur » serait utilisé comme une première méthode de *screening* avant de passer à une étape de confirmation par GC-MS.

BIBLIOGRAPHIE

- ARUKWE A., GOKSOYR A. Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparat. Hepatol.*, 2003, **2**, 4.
- AUBE M., LAROCHELLE C., AYOTTE P. 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (*p,p'*-DDE) disrupts the estrogen-androgen balance regulating the growth of hormone-dependent breast cancer cells. *Breast Cancer Res.*, 2008, **10**, R16.
- BAKER M.E., RUGGERI B., SPRAGUE L.J., ECKHARDT-LUDKA C., LAPIRA J., WICK I., SOVERCHIA L., UBALDI M., POLZONETTI-MAGNI A.M., VIDAL-DORSCH D., BAY S., GULLY J.R., REYES J.A., KELLEY K.M., SCHLENK D., BREEN E.C., SASIK R., HARDIMAN G. Analysis of endocrine disruption in Southern California coastal fish using an aquatic multispecies microarray. *Environ. Health Perspect.*, 2009, **117**, 223-230.
- BAKER V.A. Endocrine disrupters — testing strategies to assess human hazard. *Toxicol. In Vitro*, 2001, **15**, 413-419.
- BAY K., ASKLUND C., SKAKKEBAEK N.E., ANDERSSON A.M. Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2006, **20**, 77-90.
- BEARD J., MARSHALL S., JONG K., NEWTON R., TRIPLETT-MCBRIDE T., HUMPHRIES B., BRONKS R. 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)-ethane (DDT) and reduced bone mineral density. *Arch. Environ. Health*, 2000, **55**, 177-180.
- BILA D.M., DEZOTTI M. Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e conseqüências. *Quím. Nova*, 2007, **30**, 651-666.
- BORNSTEIN J., ADAM E., ADLER-STORTHZ K., KAUFMAN R.H. Development of cervical and vaginal squamous cell neoplasia as a late consequence of *in utero* exposure to diethylstilbestrol. *Obstet. Gynecol. Surv.*, 1988, **43**, 15-21.
- BROWN V.J. Life after lindane in California. *Environ. Health Perspect.*, 2008, **116**, A128.
- BRUCKER-DAVIS F., DUCOT B., WAGNER-MAHLER K., TOMMASI C., FERRARI P., PACINI P., BODA-BUCCINO M., BONGAIN A., AZUAR P., FENICHEL P. Environmental pollutants in maternal milk and cryptorchidism. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, 2008, **36**, 840-847.

- BRUHN R., KANNAN N., PETRICK G., SCHULZ-BULL D.E., DUINKER J.C. CB pattern in the harbour porpoise: bioaccumulation, metabolism and evidence for cytochrome P450 IIB activity. *Chemosphere*, 1995, **31**, 3721-3732.
- CENTER FOR BIOMOLECULAR MODELING The remote SMART team project in 3 easy steps [en ligne] (sans date) Adresse URL : <http://www.rpc.msoe.edu/cbm/smartteams/remote/>, consulté le 17/08/2009.
- CHETRITE G.S., CORTES-PRIETO J., PHILIPPE J.C., WRIGHT F., PASQUALINI J.R. Comparison of estrogen concentrations, estrone sulfatase and aromatase activities in normal, and in cancerous, human breast tissues. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2000, **72**, 23-27.
- CHIAPPINI F., ALVAREZ L., LUX-LANTOS V., RANDI A.S., KLEIMAN DE PISAREV D.L. Hexachlorobenzene triggers apoptosis in rat thyroid follicular cells. *Toxicol. Sci.*, 2009, **108**, 301-310.
- CHU S., COVACI A., HARAGUCHI K., VOORSPOELS S., VAN DE VIJVER K., DAS K., BOUQUEGNEAU J.M., DE COEN W., BLUST R., SCHEPENS P. Levels and enantiomeric signatures of methyl sulfonyl PCB and DDE metabolites in livers of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) from the Southern North Sea. *Environ. Sci. Technol.*, 2003, **37**, 4573-4578.
- COMMISSION DE COOPERATION ENVIRONNEMENTALE Plan d'action régional nord-américain (PARNA) relatif au lindane et aux autres isomères de l'hexachlorocyclohexane (HCH). [en ligne] (30/11/2006) Adresse URL : http://www.cec.org/files/PDF/POLLUTANTS/LindaneNARAP-Nov06_fr.pdf, consulté le 16/06/2009.
- COMMISSION DES COMMUNAUTES EUROPEENNES Communication de la Commission au Conseil et au Parlement européen sur la mise en oeuvre de la stratégie communautaire concernant les perturbateurs endocriniens – une série de substances suspectées d'influer sur le système hormonal des hommes et des animaux (COM (1999) 706). [en ligne] (14/06/2001) Adresse URL : <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2001:0262:FIN:FR:PDF>, consulté le 17/04/2009.
- CONSEIL DE L'UNION EUROPEENNE Directive 96/59/CE du Conseil du 16 septembre 1996 concernant l'élimination des polychlorobiphényles et des polychloroterphényles (PCB et PCT). *J. Off. Comm. Eur.*, 1996, **L 243**, 31-35.
- COUSE J.F., LINDZEY J., GRANDIEN K., GUSTAFSSON J.A., KORACH K.S. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER α -knockout mouse. *Endocrinology*, 1997, **138**, 4613-4621.
- COVACI A., VAN DE VIJVER K., DE COEN W., DAS K., BOUQUEGNEAU J.M., BLUST R., SCHEPENS P. Determination of organohalogenated contaminants in liver of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded on the Belgian North Sea coast. *Mar. Pollut. Bull.*, 2002, **44**, 1157-1165.
- D'AMATO C., TORRES J.P.M., MALM O. DDT (diclorodifeniltricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. *Quím. Nova*, 2002, **25**, 995-1002.
- DAS K., BEANS C., HOLSBECK L., MAUGER G., BERROW S.D., ROGAN E., BOUQUEGNEAU J.M. Marine mammals from Northeast Atlantic: relationship between their trophic status as determined by $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ measurements and their trace metal concentrations. *Mar. Environ. Res.*, 2003, **56**, 349-365.
- DAS K., SIEBERT U., FONTAINE M., JAUNIAUX T., HOLSBECK L., BOUQUEGNEAU J.-M. Ecological and pathological factors related to trace metal concentrations in harbour porpoises

- (*Phocoena phocoena*) from the North Sea and adjacent areas. *Mar. Ecol. Progress. Ser.*, 2004, **281**, 283-295.
- DIEUDONNE M.N., LENEVEU M.C., GIUDICELLI Y., PECQUERY R. Evidence for functional estrogen receptors α and β in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2004, **286**, 655-661.
- DUPUIS L. Le marsouin commun. [en ligne] (06/2007) Adresse URL : <http://www.picardie-nature.org/s/pip.php?article298>, consulté le 02/06/2009.
- ESCRIVA H., DELAUNAY F., LAUDET V. Ligand binding and nuclear receptor evolution. *Bioessays*, 2000, **22**, 717-727.
- GARRITANO S., PINTO B., CALDERISI M., CIRILLO T., AMODIO-COCCHIERI R., REALI D. Estrogen-like activity of seafood related to environmental chemical contaminants. *Environ Health*, 2006, **5**, 9.
- GIWERCMAN A., RYLANDER L., HAGMAR L., GIWERCMAN Y.L. Ethnic differences in occurrence of TDS — genetics and/or environment?. *Int. J. Androl.*, 2006, **29**, 291-297.
- GRANDJEAN P., BELLINGER D., BERGMAN A., CORDIER S., DAVEY-SMITH G., ESKENAZI B., GEE D., GRAY K., HANSON M., VAN DEN HAZEL P., HEINDEL J.J., HEINZOW B., HERTZ-PICCIOTTO I., HU H., HUANG T.T., JENSEN T.K., LANDRIGAN P.J., MCMILLEN I.C., MURATA K., RITZ B., SCHOETERS G., SKAKKEBAEK N.E., SKERFVING S., WEIHE P. The faroes statement: human health effects of developmental exposure to chemicals in our environment. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2008, **102**, 73-75.
- GUERRIERO G. Vertebrate sex steroid receptors: evolution, ligands, and neurodistribution. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2009, **1163**, 154-168.
- GUILLETTE L.J., PICKFORD D.B., CRAIN D.A., ROONEY A.A., PERCIVAL H.F. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. *Gen. Comp. Endocr.*, 1996, **101**, 32-42.
- GUYTON A.C., HALL J.E. Introduction to Endocrinology. In : Guyton A.C., Hall J.E. (Eds.), *Textbook of Medical Physiology*. Elsevier Saunders : Philadelphia, 2006, 905-917.
- HAMMOND P.S., BERGGREN P., BENKE H., BORCHERS D.L., COLLET A., HEIDE-JORGENSEN M.P., HEIMLICH S., HIBY A.R., LEOPOLD M.F., OIEN N. Abundance of harbour porpoise and other cetaceans in the North Sea and adjacent waters. *J. Appl. Ecol.*, 2002, **39**, 361-376.
- INSTITUT DE FORMATION EN SOINS ANIMALIERS Quel avenir pour l'ours blanc ?. [en ligne] (07/12/2004) Adresse URL : <http://www.ifsanimal.com/19/actuanimmo/quel-avenir-pour-l-ours-blanc.html>, consulté le 17/07/2009.
- INSTITUT NATIONAL DE L'ENVIRONNEMENT INDUSTRIEL ET DES RISQUES DE France Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : hexachlorobenzène. [en ligne] (10/05/2005) Adresse URL : http://rsde.ineris.fr/fiches/fiche_hexachlorobenzene.pdf, consulté le 15/06/2009.
- INSTITUT NATIONAL DE L'ENVIRONNEMENT INDUSTRIEL ET DES RISQUES DE FRANCE Données technico-économiques sur les substances chimiques en France : hexachlorocyclohexane. [en ligne] (06/03/2007) Adresse URL : http://www.ineris.fr/rsde/fiches/fiche_hch_V3.pdf, consulté le 15/06/2009.

- JAUNIAUX T., PETITJEAN D., BRENEZ C., BORRENS M., BROSENS L., HAELTERS J., TAVERNIER T., COIGNOUL F. *Post-mortem* findings and causes of death of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded from 1990 to 2000 along the coastlines of Belgium and northern France. *J. Comp. Pathol.*, 2002, **126**, 243-253.
- JAYLE M.F., CRÉPY O. Hydrolyse, extraction et purification des stéroïdes. In : Jayle M.F. (Eds.), *Analyses des stéroïdes hormonaux : Tome I*. Masson et Cie Editeurs : Paris, 1961, 61-113.
- JEANES H.L., TABOR C., BLACK D., EDERVEEN A., GRAY G.A. Oestrogen-mediated cardioprotection following ischaemia and reperfusion is mimicked by an oestrogen receptor (ER) α agonist and unaffected by an ER β antagonist. *J. Endocrinol.*, 2008, **197**, 493-501.
- KALBE C., MAU M., WOLLENHAUPT K., REHFELDT C. Evidence for estrogen receptor α and β expression in skeletal muscle of pigs. *Histochem. Cell Biol.*, 2007, **127**, 95-107.
- KELCE W.R., STONE C.R., LAWS S.C., GRAY L.E., KEMPPAINEN J.A., WILSON E.M. Persistent DDT metabolite *p,p'*-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature*, 1995, **375**, 581-585.
- KONDURI S., SCHWARZ R.E. Estrogen receptor beta alpha ratio predicts response of pancreatic cancer cells to estrogens and phytoestrogens. *J. Surg. Res.*, 2007, **140**, 55-66.
- KORTENKAMP A. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect.*, 2007, **115**, 98-105.
- KRAMER V.J., HELFERICH W.G., BERGMAN A., KLASSON-WEHLER E., GIESY J.P. Hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites are anti-estrogenic in a stably transfected human breast adenocarcinoma (MCF7) cell line. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1997, **144**, 363-376.
- KUMAR V., MAJUMDAR C., ROY P. Effects of endocrine disrupting chemicals from leather industry effluents on male reproductive system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2008, **111**, 208-216.
- MANGELSDORF D.J., THUMMEL C., BEATO M., HERRLICH P., SCHUTZ G., UMESONO K., BLUMBERG B., KASTNER P., MARK M., CHAMBON P., EVANS R.M. The nuclear receptor superfamily – the 2nd decade. *Cell*, 1995, **83**, 835-839.
- MARANGHI F., RESCIA M., MACRI C., DI CONSIGLIO E., DE ANGELIS G., TESTAI E., FARINI D., DE FELICI M., LORENZETTI S., MANTOVANI A. Lindane may modulate the female reproductive development through the interaction with ER- β : an *in vivo-in vitro* approach. *Chem. Biol. Interact.*, 2007, **169**, 1-14.
- MASUDA Y. Fate of PCDF/PCB congeners and change of clinical symptoms in patients with Yusho PCB poisoning for 30 years. *Chemosphere*, 2001, **43**, 925-930.
- MELVIN J.F., LUTTGE W.G. *Human endocrinology : an interactive text*. Elsevier Biomedical : New York, 1982, 365 p.
- MILNES M.R., BRYAN T.A., MEDINA J.G., GUNDERSON M.P., GUILLETTE L.J. Developmental alterations as a result of *in ovo* exposure to the pesticide metabolite *p,p'*-DDE in *Alligator mississippiensis*. *Gen. Comp. Endocr.*, 2005, **144**, 257-263.
- MINISTERE DE L'ECOLOGIE, DE L'ENERGIE, DU DEVELOPPEMENT DURABLE ET DE L'AMENAGEMENT DU TERRITOIRE DE FRANCE Les perturbateurs endocriniens : quels risques ? [en ligne] (19/12/2003) Adresse URL : <http://lesrapports.ladocumentationfrancaise.fr/BRP/044000234/0000.pdf>, consulté le 15/07/2009.

- MINISTERE DE L'ÉCOLOGIE, DE L'ÉNERGIE, DU DÉVELOPPEMENT DURABLE ET DE L'AMÉNAGEMENT DU TERRITOIRE DE FRANCE Les PCB ou polychlorobiphényles : état des lieux et plan national d'actions. [en ligne] (04/06/2008) Adresse URL : <http://www.ecologie.gouv.fr/PCB.html>, consulté le 16/06/2009.
- MIYAKOSHI T., MIYAJIMA K., TAKEKOSHI S., OSAMURA R.Y. The influence of endocrine disrupting chemicals on the proliferation of ER α knockdown-human breast cancer cell line MCF-7; new attempts by RNAi technology. *Acta Histochem. Cytochem.*, 2009, **42**, 23-28.
- MORTENSEN A.S., ARUKWE A. Interactions between estrogen- and Ah-receptor signalling pathways in primary culture of salmon hepatocytes exposed to nonylphenol and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (congener 77). *Comp. Hepatol.*, 2007, **6**, 2.
- MOSSNER S., BALLSCHMITER K. Marine mammals as global pollution indicators for organochlorines. *Chemosphere*, 1997, **34**, 1285-1296.
- MURAMATSU M., INOUE S. Estrogen receptors: how do they control reproductive and nonreproductive functions?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000, **270**, 1-10.
- ORGANISATION DE COOPERATION ET DE DÉVELOPPEMENT ÉCONOMIQUES OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. [en ligne] (2008) Adresse URL : <http://oberon.sourceoecd.org/vl=8496293/cl=12/nw=1/rpsv/cgi-bin/fulltextew.pl?prpsv=/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s8/p1.idx>, consulté le 28/07/2009.
- PARLEMENT EUROPÉEN ET CONSEIL DE L'UNION EUROPÉENNE Directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE. *J. Off. Comm. Eur.*, 2008, **L 348**, 87-97.
- PIKULEVA I.A. Cholesterol-metabolizing cytochromes P450: implications for cholesterol lowering. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 2008, **4**, 1403-1414.
- RAFFA R.B., STAGLIANO G.W., TALLARIDA R.J. Subadditive withdrawal from cocaine/kappa-opioid agonist combinations in Planaria. *Brain Res.*, 2006, **1114**, 31-35.
- RIBEIRO A.L.F.A.A., FERREIRA A.P., DA CUNHA C.L.N., KLING A.S.M. Disruptores endócrinos: potencial problema para la salud pública y medio ambiente. *Rev. Biomed.*, 2006, **17**, 146-150.
- ROMIEU I., HERNANDEZ-AVILA M., LAZCANO-PONCE E., WEBER J.P., DEWAILLY E. Breast cancer, lactation history, and serum organochlorines. *Am. J. Epidemiol.*, 2000, **152**, 363-370.
- SCHANTZ M.M., PORTER B.J., WISE S.A., SEGSTRO M., MUIR D.C., MOSSNER S., BALLSCHMITER K., BECKER P.R. Interlaboratory comparison study for PCB congeners and chlorinated pesticides in beluga whale blubber. *Chemosphere*, 1996, **33**, 1369-1390.
- SCIPPO M.-L., MAGHUIN-ROGISTER G. Les perturbateurs endocriniens dans l'alimentation humaine : impact potentiel sur la santé. *Ann. Méd. Vét.*, 2007, **151**, 44-54.
- SHIN J.H., HUR J.Y., SEO H.S., JEONG Y.A., LEE J.K., OH M.J., KIM T., SAW H.S., KIM S.H. The ratio of estrogen receptor α to estrogen receptor β in adipose tissue is associated with leptin production and obesity. *Steroids*, 2007, **72**, 592-599.

- SHUGHRUE P.J., LANE M.V., SCRIMO P.J., MERCHENTHALER I. Comparative distribution of estrogen receptor- α (ER- α) and β ER- β mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids*, 1998, **63**, 498-504.
- SJAASTAD Ø.V., HOVE K., SAND O. The Endocrine System. In : Sjaastad Ø.V., Hove K., Sand O. (Eds.), *Physiology of Domestic Animals*. Scandinavian Veterinary Press : Oslo, 2003, 200-234.
- SKAKKEBAEK N.E. Endocrine disrupters and testicular dysgenesis syndrome. *Horm. Res.*, 2002, **57**, 43.
- SMITH A.G., GANGOLLI S.D. Organochlorine chemicals in seafood: occurrence and health concerns. *Food Chem. Toxicol.*, 2002, **40**, 767-779.
- TALLARIDA R.J., COWAN A., RAFFA R.B. Antinociceptive synergy, additivity, and subadditivity with combinations of oral glucosamine plus nonopioid analgesics in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2003, **307**, 699-704.
- TIEMANN U. In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: a review. *Reprod.Toxicol.*, 2008, **25**, 316-326.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY Assay development and validation. [en ligne] (01/11/2007) Adresse URL : <http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/pubs/assayvalidation/index.htm>, consulté le 15/07/2009.
- WHITE P.C. Genetic Diseases of Steroid Metabolism. In : Litwack G. (Ed.), *Vitamins and Hormones: Volume 49: Steroids*. Academic Press : San Diego, 1994, 131-195.
- WILLEMSEN P., SCIPPO M.-L., KAUSEL G., FIGUEROA J., MAGHUIN-ROGISTER G., MARTIAL J.A., MULLER M. Use of reporter cell lines for detection of endocrine-disrupter activity. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 655-663.
- WILLINGHAM E., CREWS D. Sex reversal effects of environmentally relevant xenobiotic concentrations on the red-eared slider turtle, a species with temperature-dependent sex determination. *Gen. Comp. Endocr.*, 1999, **113**, 429-435.
- YAGHMAIE F., SAEED O., GARAN S.A., FREITAG W., TIMIRAS P.S., STERNBERG H. Caloric restriction reduces cell loss and maintains estrogen receptor-alpha immunoreactivity in the pre-optic hypothalamus of female B6D2F1 mice. *Neuroendocrinol. Lett.*, 2005, **26**, 197-203.
- YI K.W., SHIN J.H., SEO H.S., LEE J.K., OH M.J., KIM T., SAW H.S., KIM S.H., HUR J.Y. Role of estrogen receptor- α and - β in regulating leptin expression in 3T3-L1 adipocytes. *Obesity*, 2008, **16**, 2393-2399.
- YOU L. Steroid hormone biotransformation and xenobiotic induction of hepatic steroid metabolizing enzymes. *Chem. Biol. Interact.*, 2004, **147**, 233-246.
- YOUNG J.C., HARTL F.U. Chaperones and transcriptional regulation by nuclear receptors. *Nat. Struct. Biol.*, 2002, **9**, 640-642.
- ZACHAREWSKI T. *In Vitro* bioassays for assessing estrogenic substances. *Environ. Sci. Technol.*, 1997, **31**, 613-623.