Université de Lille
Faculté Ingénierie et Management de la santé (ILIS)
Master Ingénierie de la santé parcours Qualité, Environnement, Santé, Toxicologie option recherche

CHARDON Clémence

Année universitaire 2017-2018

Mémoire de fin d'études de la 2ème année de Master

Bioessais *in vitro* de détection de composés perturbateurs endocriniens et *dioxin-like* : application à l'évaluation de la qualité chimique d'eaux de surface

Sous la direction de Selim Aït-Aïssa

Soutenu le 21 septembre 2018

Président de jury : Pr. Hervé Hubert
Directeur de mémoire : Dr. Selim Aït-Aïssa
2ème membre de jury : Dr. Sopheak Net-David

Remerciements

Je remercie tout d'abord Eric Thybaud et Jean-Marc Porcher de m'avoir accueillie dans l'équipe ECOT (écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*) de l'INERIS.

Merci à Selim d'être toujours à l'écoute, attentif à mes difficultés et disponible. Merci pour ta confiance et pour ton aide précieuse pour la réalisation de ce travail.

Merci aussi à Manu, tu as rendu ces heures de SPE dans le sombre et froid labo de chimie et ces moments de culture cellulaire vraiment agréables. Merci aussi à Clémentine, Pierre et Yazo, car cette année a été riche en émotions pour l'équipe « culture cell » … ! Merci à Julie, avec qui j'ai partagé mon bureau et beaucoup d'autres moments. Je remercie évidemment toute l'équipe ECOT, dans laquelle j'ai vécu de bons moments au quotidien.

Merci à ma famille, mes amis (mention spéciale pour Charlotte), collègues de Master, et bien sûr mes colocs de choc. Merci d'avoir partagé avec moi cette folle année de Master 2.

Je suis fière de ce travail et de ce stage, que j'ai sincèrement adoré, et qui confirme sans aucun doute que la recherche est le domaine dans lequel je souhaite poursuivre.

Merci !

Table des matières

Remerciements 1
Index des figures 4
Index des tableaux 4
Abréviations 5
I. INTRODUCTION 6
1.1. La contamination des eaux de surface 7
1.2. Surveillance de la qualité chimique des eaux de surface 8
1.2.1. Approche actuelle 8
1.2.2. Approche bioanalytique 9
1.3. Activités étudiées 11
1.3.1 Perturbateur endocrinien 12
1.3.2. L'activité *dioxin-like – HAP-like* 13
1.3.3 Activité génotoxique 14
1.4. Echantillonnage 16
1.5. Objectifs et démarche expérimentale 17
II. MATERIELS ET METHODES 19
2.1. Echantillons 19
2.2 Extractions des échantillons 20
2.2.1. Préparation des extraits d'eau : Solid Phase Extraction (SPE) 20
2.2.2 Extraction des matières en suspension : méthode QuEChERS 21
2.2.3 Extraction des membranes SR (réalisées par l'IFREMER) 21
2.3. Bioessais *in vitro* 22
2.3.1. Culture cellulaire 22
2.3.2. Exposition aux extraits 23
2.3.3 Identification des activités détectées par le test MDA-Kb2 24
2.4. Mesure des activités 24
2.4.1. Activité EROD 24
2.4.2. Activité luciférase 25
2.5. Test de viabilité cellulaire : MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide)) 26

2.6. Traitement des données 26
2.6.1. Modélisation 26
2.6.2. Calcul des équivalents toxiques biologique (TEQ-Bio)....27
III.RESULTATS 28
3.1. Réponses de la batterie de bioessais *in vitro* aux substances de référence 28
3.1.1. Activités perturbateurs endocriniens 28
3.1.2. Activité *Dioxin-like* 28
3.1.3. Activité génotoxique 29
3.2. Validation du protocole d'extraction des membranes SR 31
3.3. Application de la batterie de bioessais *in vitro* aux extraits environnementaux 32
3.3.1. Criblage des extraits ponctuels d'eau sur la batterie de bioessais *in vitro* 32
3.3.2. Répartition des contaminants dans la colonne d'eau 35
IV. DISCUSSION....38
V. CONCLUSION 43
BIBLIOGRAPHIE....44
ANNEXES 48

Index des figures

Figure 1 :Devenir des contaminants dans l'environnement aquatique et les organismes (adapté de Schwarzenbach [2006]). 7
Figure 2 : Approche bioanalytique : complémentarité de l'approche analytique et des EBT .10
Figure 3 : Principe de calcul des TEQ-Bio à l'aide de bioessais in vitro basés sur une interaction ligand-récepteur 11
Figure 4 : Schéma simplifié de la voie de signalisation modulée par p53 [Levine & Oren, 2009] 15
Figure 5 : Photographies de capteurs intégratifs passifs.....17
Figure 6 : Démarche générale suivie dans ce travail 18
Figure 7 : Localisation des sites échantillonnés dans cette étude.....19
Figure 8 : Réaction engagée dans l'activité EROD 25
Figure 9 : Principe de l'activation du gène rapporteur de la luciférase [Creusot, 2011] 25
Figure 10 : Réponses des lignées MELN et MDA-Kb2 à leurs ligands de référence.....28
Figure 11 : Réponses de la lignée PLHC-1 à la TCDD et au BaP après 4 h et 24 h d'exposition 29
Figure 12 : Activité et cytotoxicité de molécules génotoxiques sur la lignée A549-p53RE-luc après 24 h d'exposition.....30
Figure 13 : Principe de l'expérience de validation du protocole d'extraction des membranes SR 31
Figure 14 : Validation de l'absence d'effet matrice des extraits de membranes SR sur la lignée MDA-Kb2.....32
Figure 15 : Coexposition des extraits d'eau du site de l'Iton avec un antagoniste du AR et un agoniste partiel du GR.....34
Figure 16 : TEQ-Bio (E2 Eq, DHT/DexEq, BaPEq et TCCD Eq) obtenus pour les extraits d'eau, de membranes SR et MES de 4 sites.....36

Index des tableaux

Tableau 1 : Exemples de ligands environnementaux du récepteurs des estrogènes (ER)....12
Tableau 2 : Exemples de ligands environnementaux du récepteur des androgènes (AR) 13
Tableau 3 : Sites échantillonnés.....20
Tableau 4 : Conditions d'exposition des différentes lignées cellulaires aux composés et aux échantillons 24
Tableau 5 : EC50 des ligands de référence de chaque test de la batterie de bioessais.....29
Tableau 6 : TEQ-Bio calculés pour les extraits d'eau.....33
Tableau 7 : TEQ-Bio d'extraits d'eau, de membranes SR et de matières en suspension calculés pour 4 sites.....37

Abréviations

AhR : Récepteur des hydrocarbures arylés

AR : *Androgen Receptor*, Récepteur des androgènes

BaP : Benzo(a)pyrène

BRGM : Bureau de Recherches Géologiques et Minières

DCM : Dichlorométhane

DCE : Directive cadre sur l'eau

Dexa : Dexaméthasone

DHT : Dihydrotesterone

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EASZY : *Endocrine Active Substance, acting through estrogen receptors, using transgenic cyp 19a1b-GFP Zebrafish embrYos.* Bioessais in vivo d'estrogénicité

EBT : *Effect based tools*, outil basés sur l'effet

EC : *Effect concentration*

EDA : *Effect directed analysis*, analyse basée sur l'effet

EIP : Echantillonneur intégratif passif

EROD : Ethoxyrésorufine-O-dééthylase

ER : *Estrogen Receptor*, récepteur des estrogènes

E1 : Estrone

E2 : 17β-estradiol

EE2 : 17α-ethynyl estradiol

GR : *Glucocorticoid receptor*, récepteur des glucocorticoïdes

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycyliques

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer

Irstea : Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture

LNE : Laboratoire National de Métrologie et d'Essais

LOD : *Limit of detection*, limite de détection

LOQ : *Limit of quatification*, limite de quantification

MBA : *Mass balance analysis*, analyse de l'équilibre des masses

Mb SR : Membrane silicone, « *silicone rubber* »

MeOH : Méthanol

MES : Matières en suspension

NQE : Norme de qualité environnementale

PC : *Positive Control*

PE : Perturbateur endocrinien

p53RE : protéine p53 *response element*, éléments de réponse à la protéine p53

POCIS : *Polar organic compounds integrative sampler*

QuEChERS : *Quick Easy Cheap Efficient, rugged and safe*

SPE : *Solid phase extraction*

TCDD : 2,3,7,8 - tétrachloro-*p*-dibenzodioxine ou dioxine

TEQ-Bio : *Toxic equivalent*, équivalent toxique biologique

I. INTRODUCTION

Les eaux de surface sont le réceptacle final de nombreux contaminants émis dans l'environnement, comme par exemple les produits phytosanitaires, pharmaceutiques et d'hygiène personnelle. Ces molécules, principalement issues de sources anthropiques comme l'agriculture et les rejets urbains, industriels ou encore hospitaliers, altèrent la qualité chimique des eaux de surface qui peuvent alors présenter un risque pour l'Homme et les écosystèmes. La surveillance de la qualité chimique des cours d'eau est encadrée par La Directive Cadre sur l'Eau (DCE), qui met en place des méthodes analytiques et des prélèvements ponctuels d'eau. Or, la multiplicité des sources et des molécules rejetées dans l'environnement complexifie le travail de surveillance qui est réalisé. De plus, les activités toxiques de la majorité des composés rejetés ainsi que leur devenir dans le compartiment aquatique sont encore inconnus. Face à ces problématiques, les méthodes de surveillance actuelles ne permettent pas d'évaluer de façon globale la contamination des eaux de surface, principalement car ils ciblent une liste restreinte de composés et qu'ils ne prennent pas en compte les effets biologiques. Des approches plus intégrées dites bioanalytiques, qui allient d'une part des outils basés sur l'effet (EBT) comme les bioessais *in vitro,* et d'autre part des méthodes analytiques se développent. Les EBT permettent une mesure intégrative qui renseigne d'une toxicité globale d'un mélange ou plus spécifiquement sur un mécanisme d'action toxique (ex : effet perturbateur endocrinien). Dans ce travail, une batterie de bioessais *in vitro* capable de détecter des activités de perturbateurs endocriniens et *dioxin-like/HAP-like* est mise en œuvre, dans le but d'évaluer la contamination chimique d'eaux de surface françaises et la répartition des activités toxiques dans le compartiment aquatique.

Dans un premier temps, la contamination des eaux de surface, la surveillance de la qualité chimique, les différentes activités toxiques étudiées ainsi que les objectifs du travail seront présentés. Les méthodes mises en œuvre pour la réalisation des expérimentations (extraction, lignées cellulaires utilisées, méthodes des tests) seront présentées dans une seconde partie. La troisième partie sera consacrée aux résultats obtenus : (i) mise en place de la batterie de bioessais *in vitro* (ii) criblage des extraits d'eau sur la batterie et (iii) étude de la répartition des activités dans le compartiment aquatique. Ces résultats seront discutés dans une dernière partie.

1.1. La contamination des eaux de surface

La pollution chimique des cours d'eau a été identifiée comme une menace importante pour les écosystèmes et la santé publique (Figure 1).

Le compartiment aquatique est le réceptacle de composés chimiques de natures variées : e.g. pesticides, produits pharmaceutiques et d'hygiène ainsi que de nombreuses molécules issues d'industries et de procédés de combustion. Une grande partie est apportée dans les cours d'eau via les effluents domestiques et industriels, par l'agriculture ou encore les retombées atmosphériques.

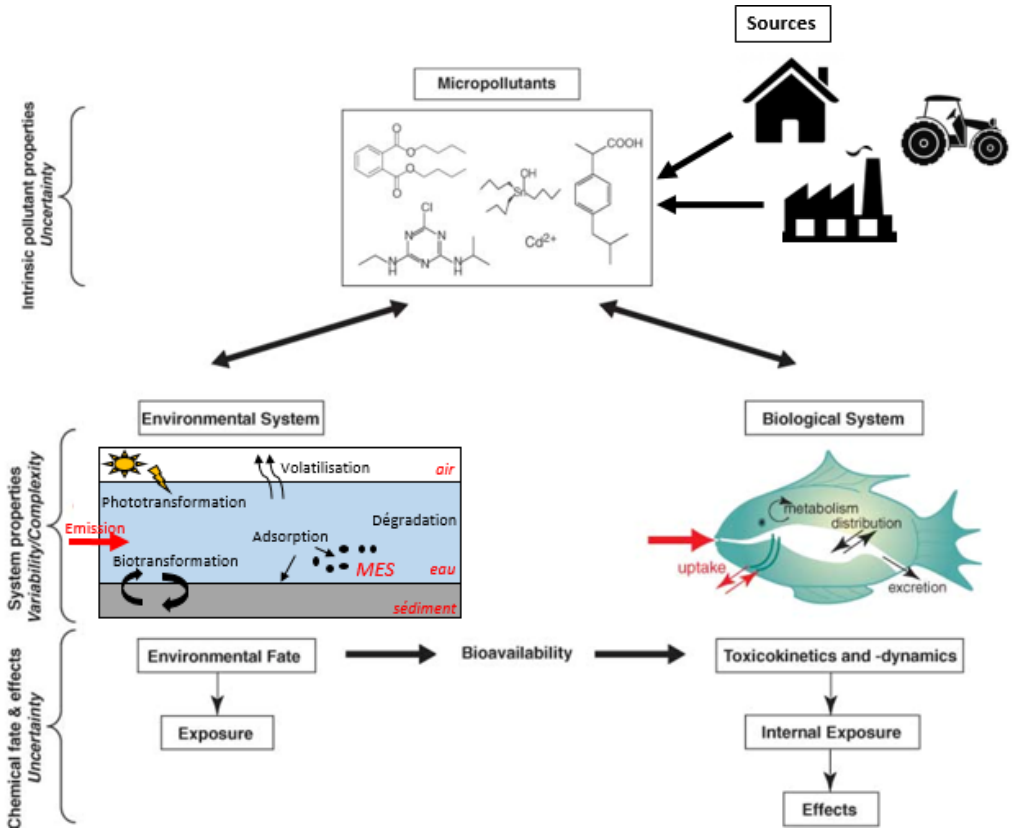


Figure 1 :Devenir des contaminants dans l'environnement aquatique et les organismes (adapté de Schwarzenbach [2006]).

Une fois dans le compartiment aquatique, ils peuvent être dégradés, biotransformés à l'interface eau-sédiment, photo-transformés ou encore volatilisés. Ils interagissent avec les différentes matrices présentes (ex : sédiment, matières en suspension MES) au regard de leurs propriétés physico-chimiques (ex : polarité). Ces interactions peuvent aboutir au piégeage de certains composés. Par exemple, les composés apolaires sont adsorbés sur les sédiments ou les MES, alors que les composés polaires se retrouveront principalement dans la phase dissoute.

In fine, le devenir des contaminants dans le milieu conditionnera leur biodisponibilité pour les organismes qui sont exposés simultanément à de nombreuses substances. Nombre de ces molécules présentent une toxicité avérée (danger) et leur présence dans le compartiment aquatique pose donc un risque pour les organismes exposés. Les effets combinés de ces contaminants au sein de ces mélanges complexes (ex : synergie, addition, inhibition) ajoutent une part d'incertitude dans l'évaluation du risque.

Au final, la prise en compte des faibles concentrations en contaminants, de leur devenir dans le milieu et de leurs effets au sein de mélanges complexes constituent donc des enjeux actuels majeurs pour une bonne évaluation de la qualité chimique des milieux [Altenburger *et al.*, 2015; Dévier *et al.*, 2011].

1.2. Surveillance de la qualité chimique des eaux de surface

1.2.1. Approche actuelle

La surveillance de la qualité chimique des eaux de surface est classiquement réalisée sur la base d'analyses chimiques ciblant un nombre fini de substances sélectionnées *a priori*. Cette approche purement analytique est actuellement celle utilisée dans le cadre réglementaire. Par exemple, la protection des eaux de surfaces et souterraines est réglementée dans l'Union Européenne par la Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2000/60/EC). L'objectif de cette directive est de maintenir un bon état des masses d'eau, tant au niveau chimique qu'écologique, et d'en garantir les usages. Aujourd'hui, 45 substances prioritaires sont suivies dans le cadre de la DCE pour l'évaluation de la qualité chimique des eaux de surface. Les concentrations mesurées sont comparées à une norme de Qualité Environnementale (NQE), définie comme une concentration d'un polluant ou d'un groupe de polluants dans l'eau qui ne doit pas être dépassée pour protéger la santé humaine et l'Environnement. Si les concentrations mesurées dans l'eau sont supérieures aux NQE, la qualité chimique est classée comme « mauvaise ». Au contraire si elles sont inférieures, elle est classée comme « bonne ».

Si l'approche analytique est très performante (spécifique, détection de niveaux traces), elle cible uniquement des familles de composés ou des composés prioritaires choisis a priori. Elle ne permet donc d'obtenir qu'une vision partielle de la complexité de la contamination des eaux de surface. De plus, elle cible des polluants individuels et ne rend donc pas compte de possibles effets de mélange. Les propriétés (éco)toxicologiques de l'ensemble des substances présentes dans le compartiment aquatique ne sont pas encore connues, une approche analytique seule risque donc de passer à côté de molécules dangereuses pour l'Homme et les écosystèmes.

1.2.2. Approche bioanalytique

1.2.2.1 Outils basés sur l'effet (EBT)

Pour pallier les limites de l'approche analytique actuelle, il apparait important de développer de nouvelles méthodes permettant une évaluation plus intégrative de la contamination chimique tout en informant sur le risque associé aux mélanges environnementaux. Parmi ces approches nouvelles, l'utilisation d'outils biologiques (« *effect-based tools* » ou EBT) permettant la détection de polluants par leur activité toxique est préconisée [Brack *et al.*, 2017; Neale *et al.*, 2017a].

Les EBT sont des méthodes basées sur la réponse biologique d'un organisme ou d'une cellule à la contamination que ce soit au laboratoire (bioessais) ou chez un organisme exposé *in situ* (biomarqueur) [Wernersson *et al.*, 2015]. Dans notre étude nous nous intéresserons uniquement aux bioessais de laboratoire. Il existe différents types de bioessais qui, en fonction de leur principe, vont informer la toxicité globale d'un échantillon (e.g. mortalité embryonnaire, inhibition de croissance algale) ou sur la présence de substance capable d'interagir avec un mécanisme d'action spécifique.

Dans une démarche de surveillance environnementale, le diagnostic fourni par les EBT est une réponse intégrative puisqu'il prend en compte l'ensemble des contaminants toxiques biodisponibles (connus et inconnus) présents au sein des matrices complexes (eaux, sédiments). Dans ce contexte, ils peuvent prétendre combler, au moins partiellement, le lien entre contamination chimique et impact écologique, puisqu'ils peuvent couvrir une large gamme de mécanismes de toxicité dans divers organismes et prennent en compte les effets de composés inconnus (ex : non recherchés dans le cadre de la DCE) et des mélanges [Altenburger *et al.*, 2015, 2018]. Toutefois, ils n'informent pas sur l'identité des molécules détectées. Dans cette optique, il convient donc de définir des stratégies intégrées combinant approches analytiques et bio-analytiques et bénéficiant de leur complémentarité (Figure 2).

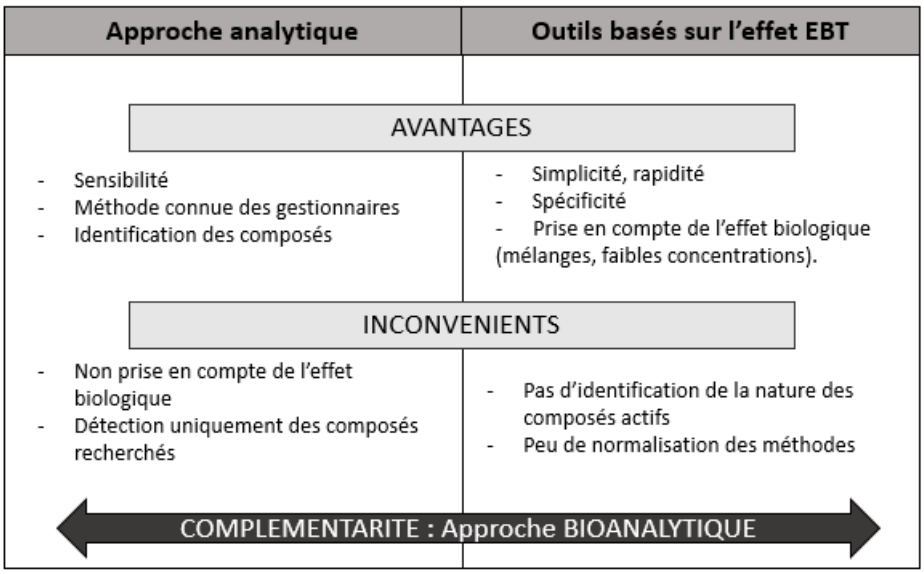


Figure 2 : Approche bioanalytique : complémentarité de l'approche analytique et des EBT

Ces méthodes sont à utiliser de façon complémentaire pour avoir une vision globale de la contamination du compartiment aquatique. Les EBT permettent de détecter des activités biologiques, et la chimie peut être utilisée pour identifier les molécules responsables des activités détectées.

1.2.2.2. Bioessais in vitro

Parmi les EBT, les bioessais *in vitro* basés sur des cultures cellulaires exprimant un gène rapporteur dont l'expression est spécifique d'un mode d'action toxique des polluants sont particulièrement intéressants en biosurveillance. D'un point de vue pratique, ils sont rapides, permettent de travailler avec de faibles volumes d'échantillons (automatisables), sensibles et ne soulèvent pas de problème éthique (pas d'utilisation d'animaux de laboratorie). Ils sont donc adaptés à une utilisation à haut débit et de routine.

Les bioessais utilisés dans ce travail sont basés sur des cellules exprimant des récepteurs qui interagissent avec des ligands spécifiques. La figure 3 présente le principe de ces tests et leur utilisation pour dériver des équivalent-toxiques biologiques (TEQ-Bio) dans des extraits environnementaux.

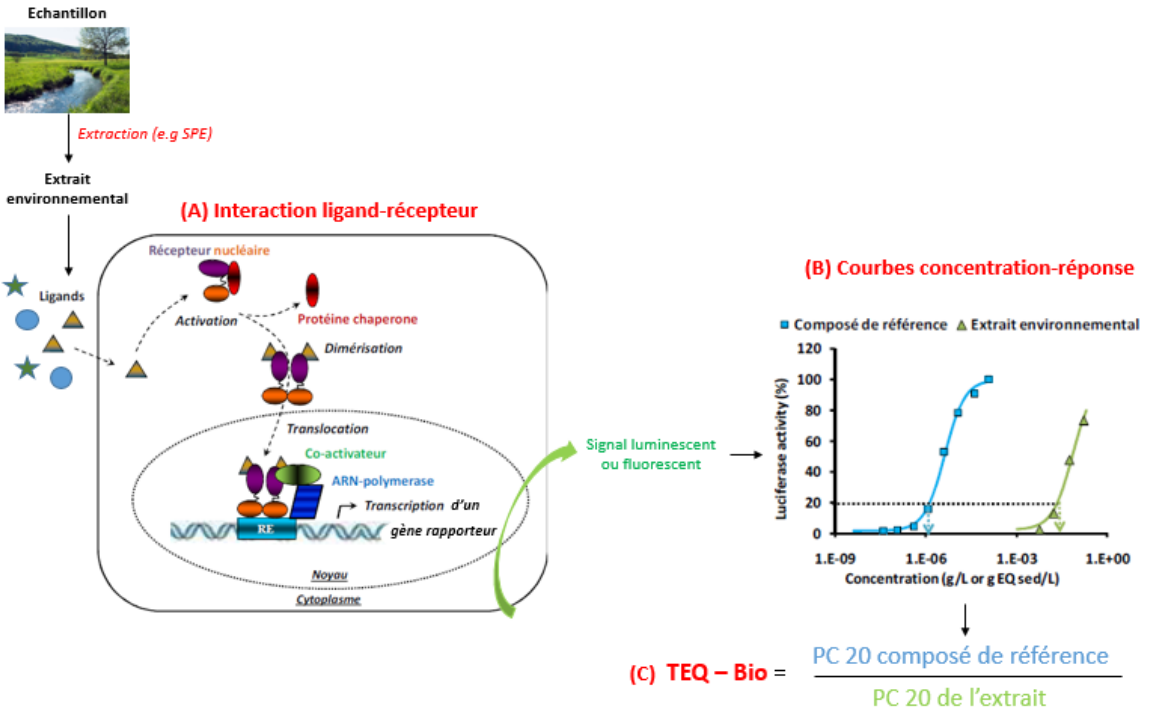


Figure 3 : Principe de calcul des TEQ-Bio à l'aide de bioessais in vitro basés sur une interaction ligand-récepteur

En présence de ligands agonistes des récepteurs dans les extraits, un gène rapporteur (e.g. luciférase) ou naturel (e.g. CYP1A) est transcrit de manière proportionnelle à la concentration des ligands actifs (**A**). L'acquisition du signal (luminescence ou fluorescence) permet d'établir des courbes concentration-réponse (**B**). Des concentrations actives, telles que des ECx (Effect concentration) ou des PCx (Positive control) sont déterminées. Les ECx sont les concentrations causant x % de réponse (ex : fixation d'un ligand sur son récepteur). Les PCx sont obtenues en normalisant les données entre 0 et 1, afin de pouvoir comparer la réponse des extraits à celles des composés de référence (Voir annexe 1). Ces concentrations actives sont rapportées à celles du toxique de référence pour chaque récepteur. Cette comparaison permet la quantification de la réponse du bioessai enquantité d'équivalents toxiques biologique (Bio-TEQ, **C**) par quantité d'échantillon. Ce sont des valeurs quantitatives comparables aux concentrations en substances individuelles données par des analyses chimiques. Ces dernières pouvant être traduites en TEQ-chimiques après pondération de la concentration par le facteur de toxicité relative (TEF) d'une substance donnée.

1.3. Activités étudiées

Pour couvrir une large gamme d'activités toxiques, des batteries de bioessais sont mises en place et appliquées pour évaluer la qualité chimique de l'eau [Leusch *et al.*, 2017, 2018; Neale *et al.*, 2017a; Escher *et al.*, 2018]. Elles comprennent des tests qui sont capables

de détecter spécifiquement différentes activités, afin d'établir des profils de contamination par différentes familles de polluants. Dans ce travail, 3 familles sont étudiées : les perturbateurs endocriniens (PE), les composés *dioxin-like/HAP-like* et génotoxiques.

1.3.1 Perturbateur endocrinien

Le système endocrinien contrôle différentes fonctions vitales à travers l'action de molécule de signalisation appelées hormones. Les perturbateurs endocriniens (PE) peuvent interférer avec la biosynthèse, le transport, l'interaction avec les récepteurs ainsi qu'avec la dégradation des hormones chez les organises exposés. De nombreux bioessais *in vitro* sont basés sur les interactions entre des ligands (activateurs ou inhibiteurs) et les récepteurs hormonaux nucléaires. Ce sont principalement les PE de type hormono-mimétiques (activités estrogénique, androgénique et glucocorticoïde) qui sont étudiés.

Tableau 1 : Exemples de ligands environnementaux du récepteurs des estrogènes (ER)

Classes	Composés	Références
Phytoœstrogènes	zéaralénone, génistéine, α/β/γ-zéaralénol, coumestrol, daidzéine, equol, biochaninA, flavones	Pillon *et al.* 2005 , Sanseverino *et al.* 2009 Mueller 2002
Stéroides naturels	E1, E2, E3, corticostérone	Escande *et al.* 2006
Composés pharmaceutiques	EE2, DES, dexaméthasone, tamoxifène	Fent *et al.* 2006
Plastifiants	BPA, butyl-benzylphtalate	Sanseverino *et al.* 2009
Surfactants	nonylphénol, 4-tert-octylphénol	Pillon *et al.* 2005
Pesticides	vinclozoline, o,p'DDT, p,p'DDE, endosulfan, méthoxychlor, butamifos, fénamirol, fénitrothion, pentachlorophénol, chlordécone, heptachlor, prochloraz, nonachlor	Kojima *et al.* 2010b, McKinlay *et al.* 2008
Produits cosmétiques	benzophénone 1,2 et 3, tetra-hydroxy-benzophénone	Molina Molina *et al.* 2008
Autres	OH-PCB	Andersson *et al.* 1999

Les molécules capables de se fixer sur les récepteurs des œstrogènes (ER) des androgènes (AR) et des glucocorticoïdes (GR) sont rejetés dans l'environnement principalement via les eaux usées. Elles incluent des hormones naturelles et d'autres composés actifs provenant de produits pharmaceutiques destinés à l'Homme et aux animaux, ou de produits d'hygiène personnelle par exemple [Wangmo *et al.*, 2018]. Des exemples de ligands environnementaux du ER et du AR sont présentés dans les tableaux 1 et 2, respectivement [Creusot, 2011].

Tableau 2 : Exemples de ligands environnementaux du récepteur des androgènes (AR)

	Classes	Composés	Références
Antagonistes	Phytoœstrogènes	flavonoïdes (5-hydroxyflavone, génistéine)	Nishizaki *et al.* 2009
	Composés Pharmaceutiques	mifépristone (RU486)	Hackenberg *et al.* 1996
	Plastifiants	BPA, phtalates (benzyl-butylphtalate)	Paris *et al.* 2002, Kruger *et al.* 2008
	Pesticides	chloropropylate, o,p'DDT, p,p'DDT/DDE heptachlor époxide, chlométhoxyfène, fénitrothion, vinzocloline, chlordécone toxaphène, aldrine, fénamirol, métolachlor	Kojima *et al.* 2010 Scippo *et al.* 2004 Aït-Aïssa *et al.* 2010
	Surfactants	4-t-OP, 4-n-NP, parabènes	Kruger *et al.* 2008 Satoh *et al.* 2005
	Divers	polyphénols, benzo[a]anthracène, benzo[a]pyrene, PCB	Paris *et al.* 2002 Roy *et al.* 2004
Agonistes	Stéroides naturels	testostérone, 5α-dihydroxytestostérone, 17α-méthyltestostérone, androstènedione	Térouanne *et al.* 2000
	Divers	trenbolone, mélengestrol acétate, benzophénones	Daxenberger 2002 Ankley *et al.* 2004 Nashev *et al.* 2010

L'activité de PE est très représentée parmi les activités toxiques recherchées dans les batteries de bioessais *in vitro* développées [Leusch *et al.*, 2018; Valcárcel *et al.*, 2018; Leusch *et al.*, 2017; Kunz *et al.*, 2017; Wangmo *et al.*, 2018; Conley *et al.*, 2017]. En effet, ce sont les activités retrouvées majoritairement dans le compartiment aquatique.

Parmi les activités PE recherchées, la contamination des eaux par les xéno-estrogènes est rapportée dans de très nombreuses situations environnementales [Könnemena et al 2018; Kase *et al.*, 2018]. Si les hormones naturelles (estrone, estradiol) et synthétiques (ethynyl-estradiol) sont des contributeurs majeurs des activités ER dans les eaux de surface et les rejets, d'autres xéno-estrogènes (bisphenol A, alkylphénols, phyto-estrogènes) contribuent également [Jarasova *et al.* 2014 ; Neale *et al*. 2015]. Récemment, plusieurs études ont proposé des valeurs seuils (« *trigger value* ») pour l'activité estrogénique détectée par les bioessais *in vitro*, valeurs situées entre 0.3 et 1 ng E2-EQ/L selon les études et les bioessais [Kunz *et al.*, 2015, Van der Oost *et al.* 2017, Escher *et al*. 2018]. Une discussion est en cours au niveau européen pour fixer cette valeur qui sera amenée à être utilisée comme NQE dans le cadre de la DCE. À ce jour, moins d'études ont été rapportées sur les activités médiées par les récepteurs AR et GR, même si plusieurs études ont montré leur occurrence dans différentes eaux de surface et dans des rejets urbains et industriels [Creusot *et al.*, 2014; Sonavane *et al.*, 2018]. Il existe néanmoins encore un besoin d'information sur la fréquence d'occurrence et la nature de ces contaminations [Creusot *et al.*, 2013].

1.3.2. L'activité *dioxin-like – HAP-like*

Le terme « *dioxin-like* » (DL) réfère à la similarité de mode d'action d'une molécule par rapport à celle observée pour les dioxines. Ces dernières forment un groupe de composés chimiques organiques chlorés essentiellement d'origine anthropique notamment émis par divers processus industriels (incinérateurs, métallurgie…) mais aussi comme sous-produits

indésirables dans les procédés de fabrication de pesticides notamment. Ils sont, pour une partie d'entre eux, hautement toxiques. Au niveau cellulaire, cette activité se traduit par l'activation d'une voie de signalisation médiée par le récepteur des hydrocarbures arylés (AhR). Ce récepteur est un facteur de transcription qui module, entre autre, l'expression d'enzymes impliquées dans la détoxification, notamment les monooxygénases à cytochrome P450 (« CYP ») composées de plusieurs sous-familles comme par exemple les CYP1A1, CYP1A2 et autres [Pelkonen *et al.*, 2008]. Le principal rôle de ces enzymes de détoxification consiste à éliminer des composés hydrophobes de l'organisme. Dans certains cas, elles peuvent activer des molécules qui étaient jusqu'à lors inactives, comme lors de l'activation métabolique des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Cette activité peut déclencher la transcription de nombreux autres gènes impliqués dans des mécanismes précoces de mutagénèse et de cancérogénèse.

Initialement désignée comme étant spécifique du composé 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) [Poland et Glover, 1976], cette voie de signalisation dépendante du AhR peut être déclenchée par d'autres molécules hydrophobes tels que les HAP ou les polychlorobiphényls (PCB) [Behrens *et al.*, 2001]. Ces molécules sont émises principalement lors de combustion incomplètes de matière organique (charbon, biomasse, pétrole ou gaz naturel), et se retrouvent *in fine* dans le compartiment aquatique. Certains pesticides ont aussi la capacité de déclencher l'activation de la voie médiée par AhR (ex : iprodione, chlorpyrifos, prochloraz) [Long *et al.*, 2003].

Dans l'environnement, les composés DL sont de type hydrophobes, ils ont par conséquent tendance à se fixer sur la phase particulaire de la colonne d'eau (sédiments, MES) et dans les capteurs passifs adaptés [Creusot *et al.*, 2013]. Ils ont déjà été détectés dans le compartiment aquatique, par exemple dans les sédiments [Louiz *et al.*, 2008; Kinani *et al.*, 2010] et dans la phase dissoute [Escher *et al.*, 2015].

1.3.3 Activité génotoxique

La présence d'agents génotoxiques dans les eaux de surface est mise en évidence depuis de nombreuses années [Stahl, 1991]. Ces agents sont capables de compromettre l'intégrité du génome en induisant des lésions, qui peuvent conduire à des mutations si elles ne sont pas correctement réparées par la machinerie cellulaire.

La principale source de composés génotoxiques dans les eaux de surface sont les effluents d'industries chimiques, les effluents urbains ou encore hospitalier [White & Rasmussen, 1998; Claxton *et al.*, 1998; Žegura *et al.*, 2009; Jovanović *et al.*, 2018]. Les composés responsables sont par exemple les N-nitroso amines et les HAP. Les sous-produits de désinfections sont

aussi potentiellement génotoxiques [Cortés & Marcos, 2018], principalement les dichloramines et éthanolamine.

Différents bioessais sont utilisés pour monitorer la présence de ces composés dans l'eau [Tabrez *et al.*, 2011] : le test d'Ames, des comètes ou encore le test SOS *E.coli* k-12. Récemment, des bioessais *in vitro* en contexte cellulaire humain ont été développés. Ils se focalisent sur l'activation de régions promotrices de gènes impliqués dans les réponses de génotoxicité, ex : GADD45a ou p53R2. Ces gènes sont régulés en amont par le gène suppresseur de tumeur p53.

L'activation de la protéine p53, la « gardienne du génome », joue un rôle central dans la régulation transcriptionnelle d'un réseau de gènes impliqués dans la réponse aux éléments qui porte atteinte à l'intégrité du génome (figure 4).

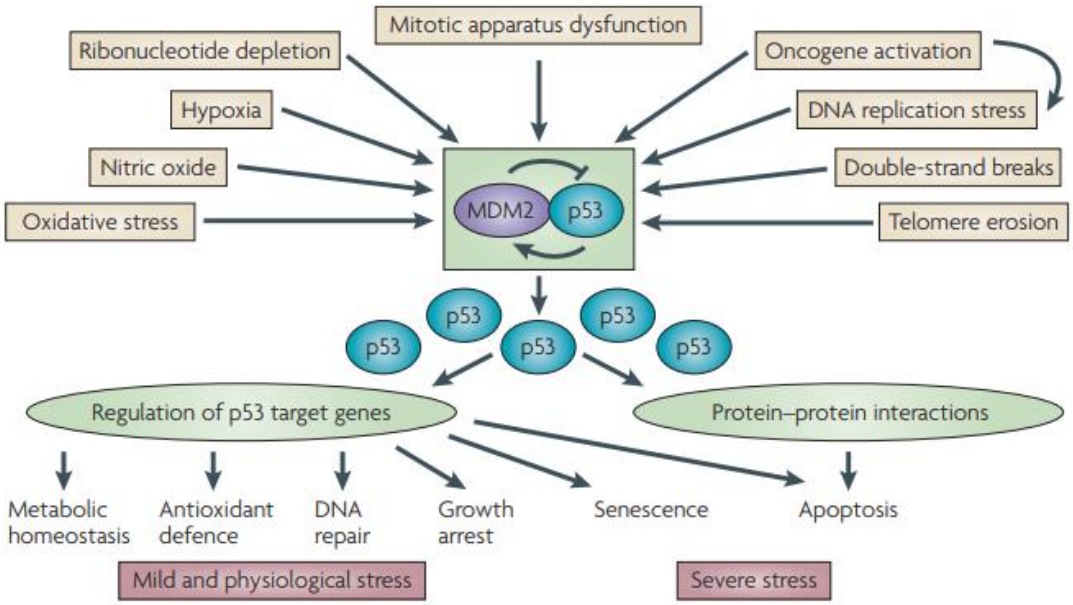


Figure 4 : Schéma simplifié de la voie de signalisation modulée par p53 [Levine & Oren, 2009]

Dans des conditions normales, p53 est présente dans les cellules à de faibles concentrations, car elle est régulée par un rétrocontrôle négatif (implication de la protéine *Mouse Double Minute 2* MDM2) [Levine & Oren, 2009]. De nombreux agents génotoxiques peuvent interférer, activer et stabiliser la protéine p53, causant sont accumulation. Différentes réponses peuvent se déclencher, incluant des dommages à l'ADN, l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose. Ces mécanismes limitent l'apparition de tumeurs. Les activités génotoxiques à travers l'activité de la protéine p53 [Yeh *et al.*, 2014] sont elles aussi recherchées dans le compartiment aquatique mais sont moins représentées.

Van der Linden *et al.* [2014] ont développé un bioessais (p53RE-luc) capable d'identifier l'induction de la protéine p53 à travers différents mécanismes avec et sans activation métabolique (S9 mix) [Di Paolo *et al.*, 2018].

L'activité génotoxique à travers l'interaction protéine p53 – p53RE a déjà été étudiée dans le compartiment aquatique. Ce type d'activité a été détectée dans des capteurs passifs (disques SDB-RPS Empore™ , [Novák *et al.*, 2018]) ainsi que dans l'eau [Neale *et al.*, 2015].

1.4. Echantillonnage

Pour dresser un diagnostic sur la base des bioessais, la stratégie d'échantillonnage que l'on va mettre en œuvre est primordiale dans la mesure où on n'a pas d'*a priori* sur la nature des polluants que l'on cherche à détecter.

Les activités PE, DL, et génotoxique sont retrouvées dans les différentes matrices du compartiment aquatique. Les molécules responsables de chacune des activités se répartissent préférentiellement dans une ou plusieurs matrices au regard de leurs propriétés physico-chimiques (HAP adsorbés sur les sédiments et MES, PE présents dans la phase dissoute).

L'étude de différentes matrices ainsi que le recours à différents types d'échantillonnage (passif et intégratif) est nécessaire pour avoir une vision globale de la contamination chimique d'eaux de surface.

La surveillance de l'état chimique du compartiment aquatique est actuellement basée sur des prélèvements ponctuels de la phase dissoute des eaux de surface. C'est le cas dans le cadre de la DCE, mais aussi dans d'autres programmes de surveillance à large échelle [e.g. Conley *et al.*, 2017]. Cette matrice fait état d'une contamination à un instant donné. Elle est intéressante pour sa simplicité d'échantillonnage. Les molécules susceptibles d'être retrouvées dans ce compartiment sont principalement polaires, par exemple les composés hormono-mimétiques, agonistes des récepteurs estrogéniques, androgéniques, et glucocorticoïde [Creusot *et al.*, 2013].

Cependant cette méthode d'échantillonnage présente des limites. Dans un échantillon ponctuel de phase dissoute les composés apolaires dissouts peuvent se retrouvés à de faibles concentration ce qui peut être limitant pour leur analyse. Un plus grand volume d'eau doit être alors échantillonné et extrait mais cela entraîne des difficultés logistiques. De plus, les variations temporelles intrinsèques à un prélèvement ponctuel peuvent biaiser le diagnostic d'un cours d'eau. D'autres outils ont été développés pour répondre aux problématiques soulevées par l'échantillonnage ponctuel.

Les échantillonneurs intégratifs passifs (EIP) ont fait l'objet de nombreux travaux de développement et de mises en œuvre ces dernières années et sont identifiés dans la directive 2013/39/CE (directive fille de la DCE) comme des outils prometteurs pour la surveillance future. Ils sont basés sur le principe de libre circulation des composés depuis l'eau vers une phase réceptrice, souvent spécifique d'un groupe de composé (fixation en fonction de la polarité).

L'utilisation des échantillonneurs passifs, notamment ceux destinés à capter les composés de type apolaires, sont aussi proposés comme alternative aux prélèvements ponctuels d'eau [Dévier et al 2011; Brack *et al.*, 2017]. Les capteurs passifs permettent de limiter les variations temporelles naturelles observées lors d'un échantillonnage ponctuel et donne une information globale de l'état de contamination.

A titre d'exemple, les membranes SR (*Silicone Rubber,* ou PDMS pour polymethylsiloxane, figure 5 A), utilisés dans ce travail sont des capteurs passifs de composés organiques principalement hydrophobes (log K_{ow}>2-3) comme les PCB, HAP ou encore des pesticides organochlorés [Martin *et al.*, 2016; Prokeš *et al.*, 2012]. Au contraire, les POCIS (*Polar Organic Compounds Integrative sampler*, figure 5 B*)* sont utilisés pour capter les composés organiques polaires (log K_{ow} < 3) [Creusot *et al.*, 2013].

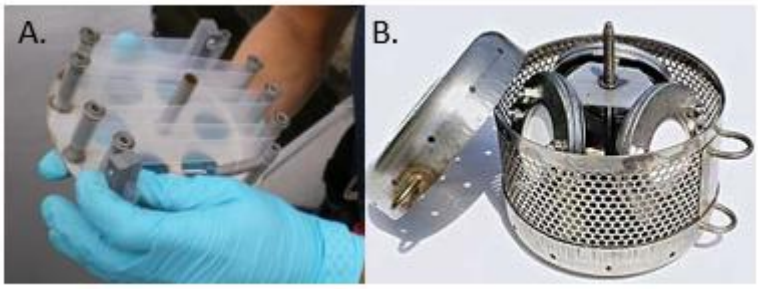


Figure 5 : Photographies de capteurs intégratifs passifs.

A : Membranes SR ; B : POCIS.

1.5. Objectifs et démarche expérimentale

Ce travail a pour objectif principal : 1) d'obtenir des informations, à l'aide d'une batterie de bioessais in vitro, sur la présence et les niveaux de contamination en composés perturbateurs endocriniens (activités estrogénique, androgénique et glucocorticoïde), en *dioxin-like/HAP-like* et génotoxiques dans des eaux de surface prélevées sur 20 sites (17 rivières et 3 sites marins) répartis sur le territoire français et soumis à des pressions anthropiques différentes ; 2) d'évaluer la répartition de ces activités dans la colonne d'eau entre phases dissoute (échantillonnage ponctuel et intégratif) et particulaire (échantillonnage ponctuel) (figure 6).

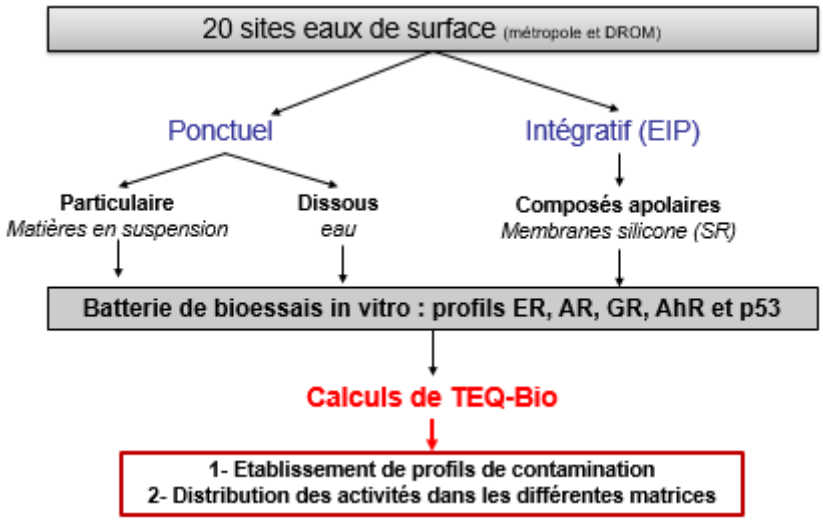


Figure 6 : Démarche générale suivie dans ce travail

Notre étude s'intègre dans une étude plus large menée dans le cadre du laboratoire national de référence sur l'eau (AQUAREF) en collaboration avec des équipes de l'Irstea (équipes de Lyon et Bordeaux), l'Ifremer (Nantes) et le BRGM (Orléans). Cette étude, menée à l'échelle nationale, vise à faire la démonstration *in situ* de la pertinence des échantillonneurs intégratifs passifs (EIP), au regard des prélèvements ponctuels, pour la surveillance des substances prioritaires de la DCE. Dans ce contexte, l'INERIS applique une batterie de bioessais dans une démarche prospective d'évaluation et de démonstration de la pertinence de ces nouveaux outils de surveillance et de leur couplage avec les EIP dans un contexte pré-réglementaire.

Mon travail a consisté plus spécifiquement à :

1- Mettre en place la batterie de bioessais *in vitro*, à travers la validation du caractère inductible des lignées cellulaires par leurs molécules de références dans nos conditions de test. Les lignées MELN, MDA-Kb2, PLHC-1 qui détectent respectivement les activités ER (récepteur des estrogènes), AR/GR (récepteur des androgènes et des glucocorticoïdes) et AhR (récepteur des hydrocarbures arylés) étaient en place au démarrage de l'étude.

Un travail spécifique a été réalisé sur le test de génotoxicité (mise en culture de la nouvelle lignée A549-p53RE-luc, évaluation des effets de molécules modèles et d'extraits environnementaux) pour statuer sur sa pertinence pour l'évaluation d'eaux de surface.

2- L'évaluation et la comparaison de la capacité de différentes matrices (eau, MES, membranes SR) et sites à induire les effets toxiques recherchés. Pour cela la compatibilité du protocole d'extraction des membranes SR avec les bioessais a été validé. Ensuite, les extraits ont été criblés sur la batterie de bioessais *in vitro* et des profils de contamination PE (ER, AR et GR), dioxin-like et HAP-like (AhR) de chaque matrice et EIP prélevés sur l'ensemble des

sites ont été déterminés. Ces profils sont réalisés en équivalents toxiques biologiques (TEQ-Bio).

II. MATERIELS ET METHODES

2.1. Echantillons

Vingt sites ont été échantillonnés de novembre 2017 à juin 2018 dans le cadre de l'étude spatiale nationale de démonstration des EIP. Ils sont localisés sur la figure 7 et leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau 3. Ils comprennent 3 sites de référence (peu contaminés) et 3 sites dans les Départements et Région d'Outre-Mer (DROM). L'échantillonnage a été réalisé par différents laboratoires inclus dans AQUAREF (BRGM, Irstea et IFREMER).

Sur chaque site, des capteurs passifs de type membranes silicones (*Silicone Rubber*, SR) ont été déployés durant 2 semaines. Des prélèvements d'eau ponctuels (4L) ont été effectués lors de la mise à l'eau des capteurs (T0) et lors de leur reprise 15 jours plus tard (T15).

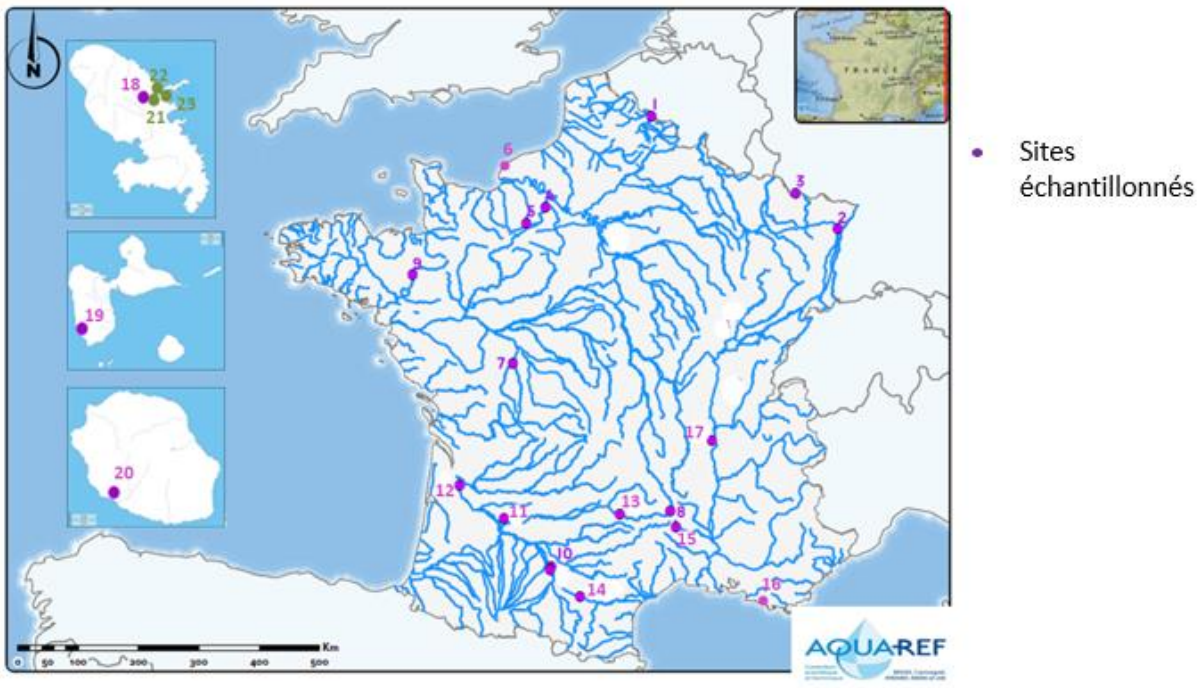


Figure 7 : Localisation des sites échantillonnés dans cette étude

Les sites représentés en vert ne sont pas inclus dans ce travail. 1 : L'Allier ; 2 : La Souffel ; 3 : La Rosselle ; 4 : L'Iton ; 5 : La Risle ; 6 : Antifer ; 7 : Le Clain ; 9 : La Vilaine ; 10 : L'Hers Mort ; 11 : Le Tolzac ; 12 : La Jalle ; 13 : La Boralde ; 14 : Le Tréboul ; 16 : Le Gier ; 17 : La Baie du Lazaret ; 18 : Grand Galion ; 19 : Pérou-pères ; 20 : L'Etang du Gol.

Tableau 3 : Sites échantillonnés

AP : Artois-Picardie ; RM : Rhin-Meuse ; SN : Seine-Normandie ; LB : Loire-Bretagne ; AG : Adour-Garonne ; RMC : Rhône méditerranée Corse

Site	Station de prélèvement	Bassin versant	Code national	Code liste de vigilance
1	L'Escaut canalisé à Fresnes sur Escaut	AP	1016000	CE_WL2016_M1_St0104
2	La Souffel à Mundolsheim	RM	2037500	CE_WL2016_M1_St0203
3	La Rosselle à Petite-Rosselle	RM	2103800	CE_WL2016_M1_St0207
4	L'Iton à Normanville	SN	3199200	CE_WL2016_M1_St0304
5	La Risle à Ambenay 2	SN	3219780	CE_WL2016_M1_St0305
6	Antifer	SN	/	/
7	Le Clain en aval de Poitiers	LB	4085500	/
8	L'allier lieu-dit de Chabalier	LB	4026500	Site référence
9	La Vilaine à Guichen	LB	4209990	CE_WL2016_M1_St0428
10	L'Hers mort à St-Sauveur	AG	5156950	/
11	Le Tolzac à Varès	AG	5083585	CE_WL2016_M1_St0520
12	La Jalle de Blanquefort	AG	5073800	/
13	La Boralde Flaujaguèse en amont d'Espalion	AG	5099170	Site référence
14	Tréboul à Castelnaudary	RMC	6177910	CE_WL2016_M1_St0628
15	Le Luech à Génolhac	RMC	6118550	Site référence
16	Le Gier à Givors	RMC	6097000	CE_WL2016_M1_St0618
17	La Baie du Lazaret	RMC	/	/
18	Grand Galion	Martinique	8225101	/
19	Pérou-pères	Guadeloupe	/	/
20	L'étang du Gol	La Réunion	10520050	/

2.2 Extractions des échantillons

2.2.1. Préparation des extraits d'eau : Solid Phase Extraction (SPE)

Extraction

Les échantillons de 4L d'eau sont décongelés (20 h à 20°C) puis filtrés (Filtre GF/C, 47 mm de diamètre, 1,2 µm, Whatman) afin de séparer les matières en suspension. Les filtres sont pesés avant filtration, sont séchés et pesés à nouveau après filtration, puis sont conservés à -20°C avant leur extraction (cf. § 2.2.2). L'extraction des échantillons d'eau est réalisée sur des colonnes de type HLB (Hydrophobic-Lipophilic Beads, 200mg, OASIS Waters), disposées sur un manifold avec système de pompage à vide. Les colonnes sont préparées avec dans l'ordre 5 mL de dichlorométhane (DCM, Milipore, 99,8%), 5 mL d'un mélange v : v DCM/méthanol (MeOH, VWR chemicals, 99,9%), 5mL de MeOH, puis 5 mL d'eau ultrapure. 4mL d'eau ultrapure sont disposés au-dessus de la phase pour éviter son assèchement. Les échantillons passent sur les colonnes au goutte à goutte. Après extraction, la phase est séchée durant 2 h. L'élution est réalisée avec dans l'ordre 10 mL de MeOH, 10 mL d'un mélange v : v DCM/MeOH, puis 10 mL de Dcm. Les extraits sont conservés à -18°C. Un blanc d'extraction (4 L d'eau ultrapure) est réalisé lors de chaque SPE.

Evaporation et reprise

Une fois à température ambiante, les extraits sont passés aux ultra-sons durant 5 minutes, puis évaporés à sec dans un évaporateur rotatif (EZ-2plus, Genevac). L'extrait sec est repris dans 1,2 mL d'un mélange v : v DCM/MeOH (3 lavages successifs de 400µL) dans un tube ambré de 1,5 mL. Ensuite, un aliquote de 300 µL est transféré dans un tube ambré avec insert, puis évaporé sous flux d'azote jusqu'à l'obtention d'un volume de 10µL environ. 100µL de diméthylsulfoxyde (DMSO, sigma aldrich) y sont ajoutés. Le restant de DCM/MeOH est évaporé sous flux d'azote durant quelques minutes. Les extraits sont conservés à -18°C avant utilisation pour les bioessais.

Un suivi gravimétrique est réalisé : les extraits sont pesés lors de chaque transfert de tube afin d'utiliser les masses exactes pour le calcul des facteurs de concentration.

2.2.2 Extraction des matières en suspension : méthode QuEChERS

La méthode QuEChERS (Quick (rapide), Easy (facile), Cheap (abordable), Efficient (efficace), Rugged (robuste) and Safe (sûre)) a été utilisée pour l'extraction des matières en suspension (MES) [Albinet *et al.*, 2014, 2013]. Les filtres sont placés dans des tubes en verre auxquels ont été ajoutés 7 mL d'un mélange v : v DCM/MeOH puis mis sous agitation mécanique (vortex à 1500 rotations par minute (rpm) durant 1 minute 30). L'extrait a été ensuite centrifugé 5 minutes à 4500 rpm. 4 mL de surnageant ont été transférés dans un tube pour évaporation à sec sous flux d'azote et finalement redissous dans 200 µL de DMSO. Les extraits sont conservés à -18°C puis sont utilisés pour les bioessais.

2.2.3 Extraction des membranes SR (réalisées par l'IFREMER)

Les membranes sont décongelées durant 30 minutes. Elles sont plongées dans deux pots d'eau UV successivement à l'aide de pinces. Elles sont essuyées sur toute la longueur et sur les deux faces avec un chiffon non pelucheux, préalablement nettoyés dans deux bains de MeOH passés aux ultrasons 15 minutes. Les membranes propres et sèches sont pesées puis placées dans un pot de 280 mL. Une première extraction au cyclohexane (environ 200 mL) est réalisée durant une nuit. Le solvant est transvasé dans un ballon de 500 mL. Les membranes sont extraites pendant 4 h minimum avec du MeOH. Il est transvasé dans le même ballon de 500 mL. Les parois du pot sont rincées avec du MeOH et transvasé dans le même ballon. Le ballon est évaporé au rota/vap jusqu'à environ 3 mL, ensuite transféré dans un tube gradué. Les parois du ballon sont rincées avec 2 mL de MeOH le ballon de 500 mL. Les tubes sont évaporés à 1mL puis transférés en ampoule en rinçant le tube avec 2 fois 500 µL de MeOH. Ensuite, un aliquote de 300 µL est transféré dans un tube ambré avec insert, puis évaporé sous flux d'azote jusqu'à l'obtention d'un volume de 10µL environ. 100µL de

diméthylsulfoxyde (DMSO, sigma aldrich) y sont ajoutés. Le restant de DCM/MeOH est évaporé sous flux d'azote durant quelques minutes. Les extraits sont conservés à -18°C avant utilisation pour les bioessais.

2.3. Bioessais *in vitro*

2.3.1. Culture cellulaire

Lignée MELN

Les cellules MELN [Balaguer *et al.*, 1999] expriment de façon endogène le sous-type α du récepteur humain aux œstrogènes (hERα). Elles dérivent de la lignée de cellules de cancer du sein MCF-7. La lignée MELN a été établie par transfection stable du gène rapporteur de la luciférase sous contrôle d'un promoteur synthétique ERE répondant à l'activation de hERα. Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco), supplémenté avec 5% de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma Aldrich), 1% d'acide aminés non essentiels (AANE, Gibco), 1% d'antibiotiques (pénicilline 5unité/mL-streptomycine 5 µg/mL, PS) et 0,1 mg/mL de généticine (Gibco) Deux jours avant leur exposition aux échantillons, le milieu est changé par du milieu DMEM sans rouge de phénol, supplémenté avec 1% PS, 2% de SVF décomplémenté et déstéroïdé (DCC, milieu DMEM blanc, 10 mg de charbon végétal et 500 mg de dextran T-70) et 1% de glutamine (gibco). Elles sont maintenues à une température de 37°C dans une atmosphère humide à 5% de dioxyde de carbone.

Lignée MDA-Kb2

Les cellules MDA-Kb2 (ATCC #CRL-2713) sont dérivées de la lignée de cellules de cancer du sein MDA-MB-453 [Wilson, 2002] transfectées de manière stable avec le gène rapporteur de la luciférase sous contrôle d'un promoteur MMTV (*Mouse Mammary Tumor Receptor*). Ce promoteur est activé par deux récepteurs nucléaires endogènes, celui des androgènes (AR) et des glucocorticoïdes (GR). Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM contenant du rouge de phénol (Gibco), supplémenté avec 5% SVF,1% PS, 1% AANE, et 0,1 mg/mL de généticine. Elles sont maintenues à une température de 37°C dans une atmosphère humide à 5% de dioxyde de carbone.

Lignée PLHC-1

La lignée PLHC-1 (ATCC, CRL-2406) a été dérivée à partir d'un hépatome induit chez une femelle adulte de vairon du désert Sonoran (Poeciliopsis lucida), par de multiples doses de 7,12-diméthylbenz(a)anthracène. Elle a été adaptée à la culture cellulaire par Ryan & Hightower (1996). Ces cellules expriment le récepteur des hydrocarbures arylés de façon

endogène (AhR). Elle est pertinente pour l'étude de l'activation de la voie médiée par ce récepteur [Hahn et al., 1993] notamment dans des matrices environnementales tel que le sédiment [Louiz et al., 2008; Kinani et al., 2010]. Les cellules sont cultivées dans du milieu E-MEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Gibco) contenant du rouge de phénol, supplémenté avec 10% SVF,1% PS et 1% AANE. Elles sont maintenues à une température de 30°C dans une atmosphère humide à 5% de dioxyde de carbone.

Lignée A549-p53RE-luc

La lignée A549-p53RE-luc (Xenogen Corporation, Alameda, USA) dérive des cellules d'adénocarcinome humain A549 (pneumocytes de type II), transfectée de manière stable avec le gène de la luciférase sous contrôle de trois séquences d'éléments de réponse à la protéine p53 (p53 *response element*, RE).

Cette lignée a été conçue initialement pour générer des xenogreffes *in vivo,* et d'observer le développement de tumeurs à l'aide de la luminescence. Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium, Gibco) supplémenté avec 10% SVF. Elles sont maintenues à une température de 37°C dans une atmosphère humide à 5% de dioxyde de carbone.

2.3.2. Exposition aux extraits

Les tests sont réalisés en plaques 96 puits, à l'aide d'un automate de culture cellulaire (Freedom EVO75, TECAN). Chaque plaque comprend un témoin solvant (DMSO), un témoin positif et une gamme de dilution de l'extrait (6 à 8 points de gamme). Les solutions mères préparées dans le DMSO sont diluées dans du milieu de culture (voir tableau 4) spécifique pour chaque lignée. Ces solutions sont ensuite déposées sur cellules afin d'obtenir une concentration en solvant de 0,1% (vol/vol) pour les molécules de référence, et de 0,5% pour les échantillons environnementaux. Ces concentrations de DMSO ne causent pas d'effet toxique et ne modifient pas la réponse des cellules. Une gamme des molécules de référence est systématiquement déposée en parallèle de chaque test pour vérifier la conformité de la réponse des cellules. Les cellules MELN, MDA-Kb2, A549-p53RE-luc sont exposées durant 24 h. La lignée PLHC-1 est exposées pendant 24 h (ligand de type *dioxin-like*) et 4 h (ligand de type *HAP-like*).

Tableau 4 : Conditions d'exposition des différentes lignées cellulaires aux composés et aux échantillons

<table>
<tr><th>Lignée</th><th>MELN</th><th>MDA-Kb2</th><th>A549-P53RE-luc</th><th>PLHC-1</th></tr>
<tr><td>Type de plaque</td><td colspan="3">Blanche fond transparent ou opaque</td><td>Transparente</td></tr>
<tr><td>Milieu d'exposition</td><td colspan="3">DMEM sans rouge de phénol DCC</td><td>E-MEM</td></tr>
<tr><td>Temps d'exposition</td><td colspan="3">24 h</td><td>4 h et 24 h</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Témoin(s) positif(s)

Concentrations 100% activation</td><td rowspan="2">17-β-œstradiol (E2)
10^{-8} M</td><td>AR
5α-dihydrotestostérone (DHT)
10^{-8} M</td><td rowspan="2">Etoposide (Etop)</td><td rowspan="2">2,3,7,8-tétrachlorodibenzodioxine (TCDD)
10^{-9} M</td></tr>
<tr><td>GR : dexaméthasone (Dexa)
10^{-6} M</td></tr>
<tr><td>Activité mesurée</td><td colspan="3">Luciférase</td><td>Ethoxyrésorufine-O-déethylase (EROD)</td></tr>
</table>

2.3.3 Identification des activités détectées par le test MDA-Kb2

La lignée MDA-Kb2 est capable de détecter à la fois des activités androgénique et glucocorticoïde. Afin d'identifier quel type d'activité est identifiée par le test, des coexpositions avec des antagonistes de chacun des récepteurs sont réalisées. Les concentrations actives des échantillons sont déposés seules, mélangées à une solution de Flutamide 10^{-5} M (Sigma, antagoniste du récepteur des androgènes) et mélangés à une solution de RU 486 10^{-6} M (Sigma, antagoniste du récepteur des glucocorticoïdes). Le témoin positif de chaque récepteur est déposé sur la même plaque, ils sont également déposés en mélange avec leurs antagonistes respectifs (afin de vérifier l'inhibition des réponses). La RU 486 10^{-6} M est elle aussi déposée (activité à 15-20% de la dexaméthasone).

2.4. Mesure des activités

2.4.1. Activité EROD

Le principe du dosage de l'activité EROD repose sur la détection de la fluorescence de la résorufine, produit de la transformation de la 7-éthoxyrésorufine par l'activité enzymatique du cytochrome P450 1A (Stegeman *et al.*, 1992).

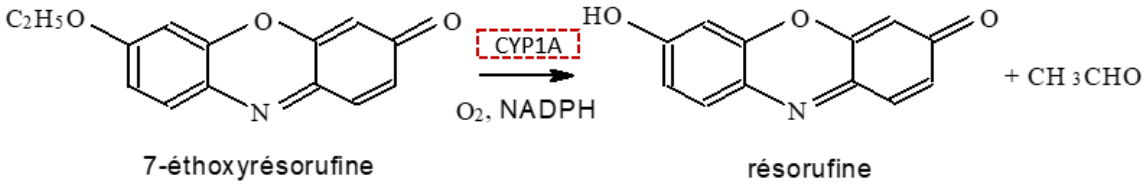


Figure 8 : Réaction engagée dans l'activité EROD

Les plaques 96 puits sont vidées par retournement, puis 100 µL de 7-ERF (sigma) préparée dans du milieu sans rouge de phénol à 5 µM sont ajoutés dans les puits. L'activité EROD suit une courbe de cinétique linéaire de 0 à 20 minutes. Les plaques sont donc placées à l'obscurité durant 15 minutes, la réaction est arrêtée à l'aide de 100 µL de DMSO. La fluorescence est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Biotek, Synergy H4 Hybrid Reader) à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm. La fluorescence mesurée est exprimée en RFU (relative fluorescence unit).

2.4.2. Activité luciférase

L'activité luciférase est mesurée dans les lignées MELN, MDA-Kb2 et A549-p53RE-luc.

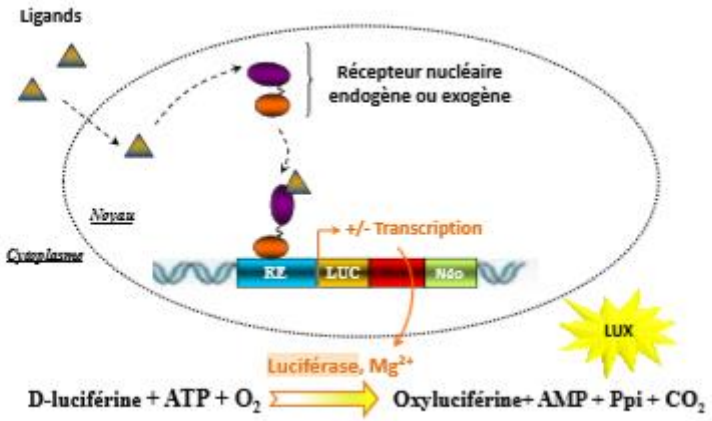


Figure 9 : Principe de l'activation du gène rapporteur de la luciférase [Creusot, 2011]

Le principe de l'activité luciférase repose sur l'activation de la transcription du gène de la luciférase par interaction entre les récepteurs (ou la protéine) et les éléments de réponses associés (figure 9). La luciférase catalyse la réaction de transformation de son substrat la luciférine en oxyluciférine et de la luminescence.

Après exposition des lignées aux extraits ou aux molécules seules, l'activité luciférase est mesurée. Les plaques sont vidées par retournement, 50 µL par puit de milieu contenant 0,3 nM (MELN, MDA-Kb2) ou 1,2 nM (A549-P53RE-luc) de luciférine (799-xenolight D-luciferin, potassium salt, 30 mg/mL) sont ajoutés. Le signal de luminescence est mesuré sur cellules vivantes avec un luminomètre (Synergy H4, BioTek). Le résultat est exprimé en pourcentage

par rapport au contrôle positif concernant la lignée MELN (E2) et la lignée MDA-Kb2 (DHT ou dexa).

2.5. Test de viabilité cellulaire : MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide))

L'effet des molécules et des échantillons sur la viabilité cellulaire a été évalué par le test MTT. Après lecture des activités, le milieu est retiré par retournement et remplacé par 100 µL par puit de milieu contenant 0,5 mg/ml de MTT (Sigma aldrich). Dans des cellules métaboliquement actives, le MTT est réduit en précipité de bleu de formazan. Après 1h30 à 3 h d'incubation, le milieu est retiré lentement (retournement des plaques sur du papier absorbant). Les cristaux de formazan sont dissous dans 100µL de DMSO par puit, les plaques sont placées sous agitation pendant 10 minutes. Elles sont lues à 570 nm et 640 nm successivement par un lecteur de microplaque (Synergy H4, BioTek). Les résultats sont exprimés en pourcentage (640 nm-570nm) relatif aux cellules contrôles.

2.6. Traitement des données

2.6.1. Modélisation

La modélisation des courbes concentration-réponse et le calcul des EC50 et PC20 a été réalisée par le modèle de Hill à l'aide de la macro Excel Regtox développée par Vindimian *et al.* [1983]. Le signal basal (témoin DMSO) est soustrait à la luminescence/fluorescence mesurée, afin de normaliser les réponses entre 0 et 1. Il s'agit dans ce cas de PCx (concentration en extrait induisant x % d'effet relativement au contrôle positif ou *Positive Control*).

L'apparition d'effets au niveau biochimique (induction enzymatique) en fonction de la concentration suit de façon générale une fonction décrite par l'équation de Hill. L'effet concentration – dépendante est caractérisée par l'EC50 et le nombre de Hill (Equation (1)).

$$y = Min + \frac{(Max - Min) * c^n}{EC50^n + c^n} \qquad (1)$$

avec n le nombre de Hill qui caractérise la pente de la relation dose-réponse au point d'inflexion et EC50 la concentration causant 50% d'effet. Min et Max correspondent aux valeurs minimum et maximum de la courbe.

2.6.2. Calcul des équivalents toxiques biologique (TEQ-Bio)

Les équivalents-toxiques biologiques (TEQ-Bio), représentent un indice global de toxicité d'un extrait environnemental ou autre mélange complexe. Ils permettent de quantifier une activité, de manière à ce qu'elle soit comparable avec les concentrations mesurées par des analyses chimiques.

Pour un extrait environnemental donné, l'activité biologique globale est mesurée avec l'établissement d'une courbe dose-réponse qui est ensuite comparée à celle du composé de référence. Dans ce travail, il s'agit en 4 h d'exposition du BaP (activité *HAP-like*) et en 24 h de la TCDD (activité *dioxin-like*) pour la lignée PLHC-1, en 24 h d'exposition de l'E2 et de la DHT ou de la Dexa (i.e. selon détection d'une activité AR ou GR) pour la lignée MELN et MDA-kb2 respectivement.

Cette comparaison permet la détermination du TEQ-biologique (TEQ-Bio) (Equation (2)).

$$TEQ - Bio = \frac{PC20\ du\ composé\ de\ référence}{PC20\ de\ l'extrait\ environnemental} \qquad (2)$$

avec la PC20 du composé de référence exprimée en $g.L^{-1}$ et la PC20 de l'extrait environnemental exprimée en facteur de concentration de l'échantillon initial. Ce facteur de concentration est dépendant de chaque échantillon ; il prend en compte la concentration de l'échantillon au cours de la phase d'extraction et la dilution de l'extrait organique dans le bioessai.

Les valeurs de TEB-Bio sont exprimées, selon le bioessai, en E2-équivalents (E2-Eq), DHT-Eq, Dexa-Eq, BaP-Eq ou TCDD-Eq par quantité de matrice.

Les valeurs de TEQ-Bio sont exprimées en ng équivalent/L pour les extraits d'eau de de MES, et en ng équivalent/g Mb SR de membranes SR

La limite de détection (LD) des tests est définie par le rapport entre l'EC5 en g/L du composé de référence et le facteur de concentration maximal de chaque échantillon. La limite de quantification (LQ) des tests est définie par le rapport entre l'EC20 en g/L du composé de référence et le facteur de concentration maximal de chaque échantillon. Dans ce travail une moyenne des concentrations maximal des extraits a été réalisée pour le calcul.

III.RESULTATS

3.1. Réponses de la batterie de bioessais *in vitro* aux substances de référence

3.1.1. Activités perturbateurs endocriniens

La première étape de ce travail a consisté à vérifier la réponse des cellules aux molécules de référence. La réponse de la lignée MELN à la 17-β-estradiol (E2) et MDA-Kb2 à la 5α-dihydrotestosterone (DHT) et à la déxaméthasone (Dexa) a été vérifiée. Les courbes sont présentées sur la figure 10 et les valeurs d'EC50 associées dans le tableau 5.

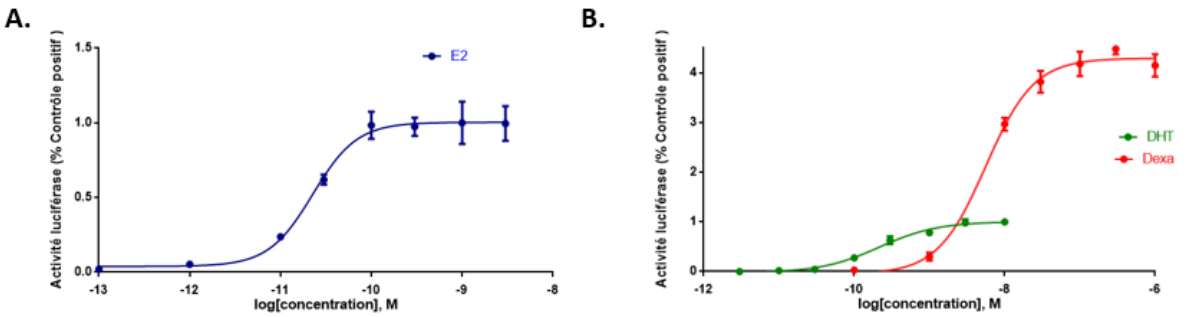


Figure 10 : Réponses des lignées MELN et MDA-Kb2 à leurs ligands de référence

***A** : Réponse de la lignée MELN à l'E2 (17-β-estradiol) ; **B** : Réponse de la lignée MDA-Kb2 à la DHT (5α-dihydrotestosterone) et à la Dexa (dexaméthasone), les activités sont exprimées en % de la DHT (1=100%).*

Les cellules MDA-Kb2 sont plus sensibles à la DHT (EC50 = 0,19 nM), ligand de référence du AR, qu'à la dexaméthasone (EC50 = 5,94 nM), activateur du GR. Cependant elles expriment une intensité de réponse GR plus importante (de 4 à 6 fois).

Globalement, les valeurs d'EC50 déterminées expérimentalement sont cohérentes avec celles déjà reportées dans la littérature (tableau 5). De plus, les réponses obtenues sur les ligands de référence sont reproductibles (variabilité des EC50 faible), ce qui en fait des outils robustes.

3.1.2. Activité *Dioxin-like*

La lignée PLHC-1 est utilisée pour détecter l'activité *dioxin-like*, i.e les composés capables de se fixer sur le récepteur des hydrocarbures arylés (AhR). L'activité de la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzodioxine (TCDD), le ligand de référence du AhR, ainsi que du benzo(a)pyrène (BaP) ont été étudiées (figure 11, EC50 tableau 5).

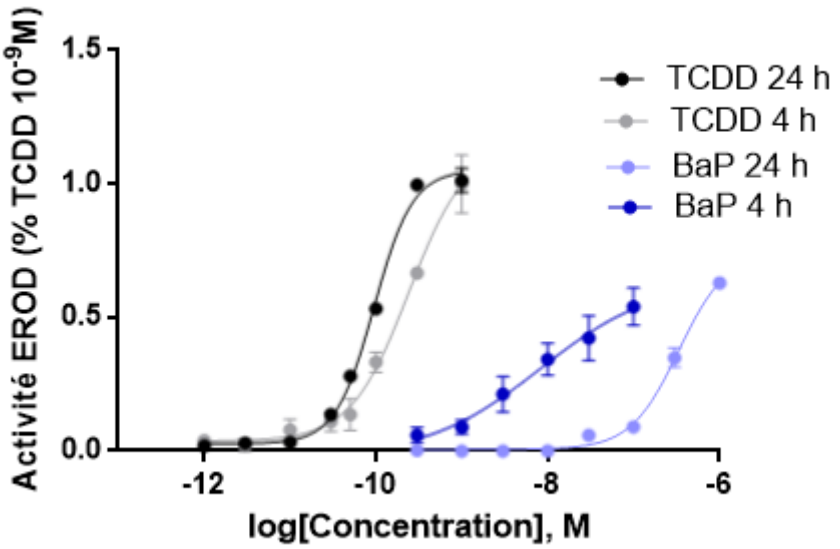


Figure 11 : Réponses de la lignée PLHC-1 à la TCDD et au BaP après 4 h et 24 h d'exposition

Tableau 5 : EC50 des ligands de référence de chaque test de la batterie de bioessais.

Les EC50 sont exprimées en nM (ng/L). ***E2 :*** *17-β-estradiol ;* ***DHT*** *: 5α-dihydrotestosterone ;* ***Dexa*** *: Dexamethasone* ***; TCDD*** *: 2,3,7,8-tétradichlorodibenzodioxine ;* ***BaP*** *: Benzo(a)pyrène ;* ***n*** *: nombre d'expériences indépendantes.*

Test	Molécule de référence *(Récepteur)*	Temps d'exposition	EC50 expérimentale *(n)*	EC50 littérature	Référence
MELN	E2 *(ER)*	24 h	0,02 ± 0,007 *(7)*	0,02	Serra, 2017
MDA-Kb2	DHT *(AR)*	24 h	0,19 ± 0,04 *(5)*	0,15 ± 0,07	Aït-Aïssa *et al.*, 2010
	Dexa *(GR)*	24 h	5,94 ± 0,27 *(5)*	4,40 ± 0,62	Aït-Aïssa *et al.*, 2010
PLHC-1	TCDD *(AhR)*	24 h	0,06 ± 0,004 *(4)*	0,098	Louiz *et al.*, 2008
	BaP *(AhR)*	4 h	3,87 ± 2,27 *(4)*	4,12	Louiz *et al.*, 2008

AhR est plus sensible à la TCDD après 24 h d'exposition, contrairement au BaP qui a une EC50 plus faible après 4 h d'exposition. Cette molécule représentative du groupe des HAP est rapidement métabolisée dans les cellules. Elle est aussi plus instable dans le milieu que la TCDD car elle est volatile et sensible aux UV. Une plus grande variabilité des valeurs d'EC50 du BaP est d'ailleurs observée par rapport aux autres molécules de référence (tableau 5). Cette variabilité est également retrouvée pour les valeurs de PC20 (2,3 ± 1,2 nM ; *n = 6*) au cours de nos expériences. Pour cette molécule, c'est une moyenne des valeurs de PC20 qui sera utilisée pour dériver les équivalents toxiques biologiques.

3.1.3. Activité génotoxique

La lignée A549-p53RE-luc dérive des cellules de pneumocytes de type II (A549). Initialement, ces cellules ont été conçues pour être greffées *in vivo*, dans le but de suivre l'apparition de tumeurs à l'aide de la luminescence [Yan *et al.*, 2011]. Dans ce travail nous

avons cherché à évaluer sa pertinence pour identifier des activités génotoxiques dans les matrices du compartiment aquatique.

Des tests préliminaires (exposition durant 4 h, 8 h puis 24 h) ont permis de déterminer que le temps d'exposition optimal de ces cellules aux molécules génotoxiques est de 24 h (résultats non montrés). Des molécules aux propriétés génotoxiques connues ont ensuite été testées afin de vérifier l'induction du signal de luminescence dans ces cellules (figure 12). En parallèle, des tests de viabilité cellulaire (MTT) ont été effectués pour chaque molécule.

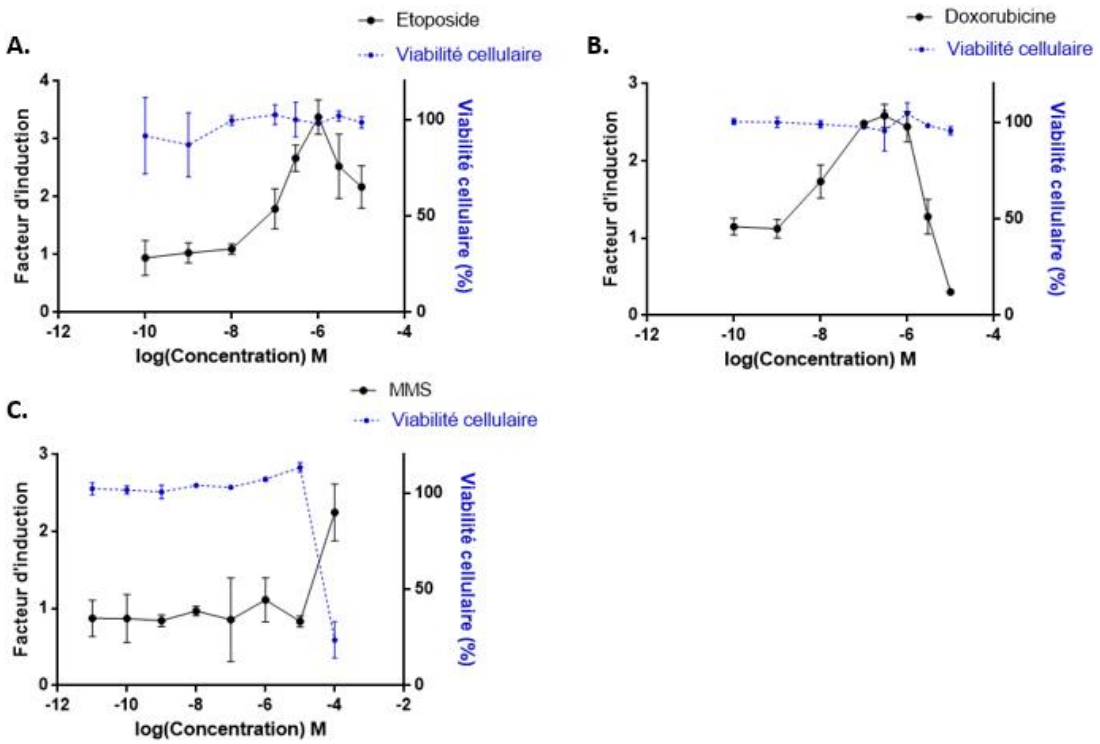


Figure 12 : Activité et cytotoxicité de molécules génotoxiques sur la lignée A549-p53RE-luc après 24 h d'exposition
A : *Etoposide ;* ***B*** *: Doxorubicine ;* ***C*** *: MMS = méthanesulfonate de méthyl*

L'étoposide ainsi que la doxorubicine induisent un facteur d'induction de 2,5 à 3, sans induire de mortalité (Figure 12-A, 12-B). Au contraire, le méthanesulfonate de méthyl (MMS) n'induit une activité qu'à la plus forte concentration testée (10^{-4} M), à laquelle uniquement 25% des cellules sont encore vivantes (C). Le BaP et le témozolomide ont également été testés mais n'induisent pas d'activité luciférase. On peut supposer que dans ces cellules le BaP ne subit pas l'activation métabolique qui est nécessaire au développement de ses propriétés génotoxiques.

Ces résultats montrent que certains génotoxiques connus répondent dans ce test et valident l'intérêt de cet outil pour évaluer des atteintes génotoxiques. Quelques extraits issus de différentes matrices environnementales ont ensuite été testées sur cette lignée (extraits

d'eau, de MES, de particules d'air ambiant PM_{10}) et n'ont pas montré d'activité. Au regard de ces résultats préliminaires, il a été décidé de ne pas poursuivre le screening des échantillons appartenant à cette étude (AQUAREF) car le volume disponible est limité pour réaliser l'ensemble des tests. Des études ultérieures seront à effectuer afin de vérifier que l'absence de réponse concernant les extraits environnementaux est causée par les échantillons, et pas par un dysfonctionnement de la lignée.

3.2. Validation du protocole d'extraction des membranes SR

Les membranes SR sont des capteurs passifs conçus pour capter les molécules semi-polaires à apolaires dans la colonne d'eau. Le laboratoire n'ayant pas d'expérience préalable sur le couplage de cette matrice avec les bioessais, une phase de validation du protocole d'extraction a dû être réalisée (en collaboration avec l'Ifremer) pour s'assurer d'une absence d'effet matrice. Pour cela, deux blancs d'extraction (M1 et M2), consistant au protocole complet d'extraction appliqué à une matrice blanche, ont été réalisés. Le blanc M2 a été dopé avec uen concentration connue du ligand de référence de chaque lignée, afin d'évaluer une possible interférence matricielle avec sa détection par le bioessai. Un mL de chaque blanc ainsi que d'un blanc solvant (MeOH) ont été évaporés sous azote puis repris dans du DMSO (figure 13). Les résultats obtenus sur la lignée MDA-Kb2 sont présentés sur la figure 14. Les résultats sur les autres lignées sont présentés en annexe 2.

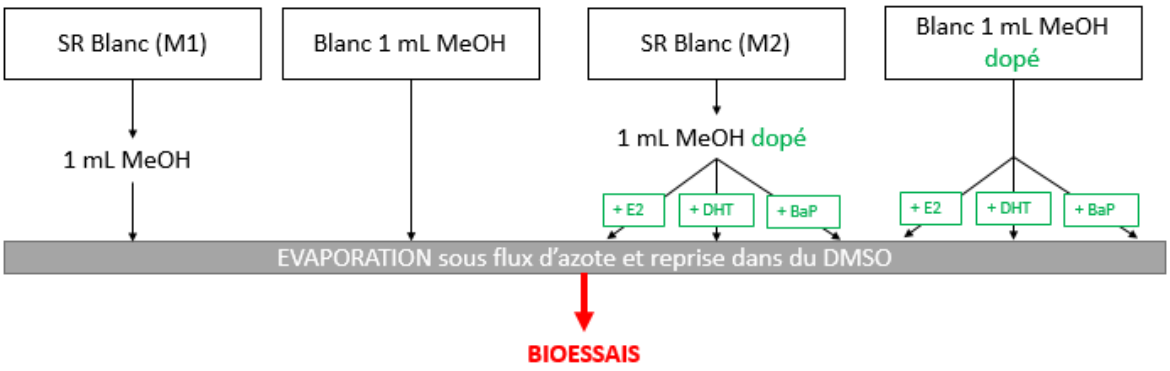


Figure 13 : Principe de l'expérience de validation du protocole d'extraction des membranes SR

M1 : blanc d'extraction de membranes SR non dopé ; M2 : blanc d'extraction de membranes SR dopé avec les molécules de référence de chaque test. En vert : + dopage E2, DHT ou BaP

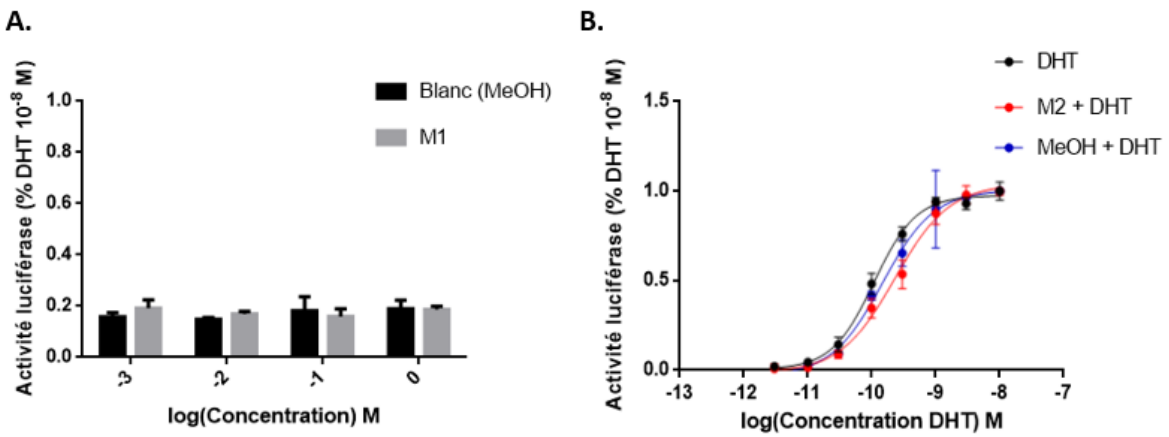


Figure 14 : Validation de l'absence d'effet matrice des extraits de membranes SR sur la lignée MDA-Kb2

***A** : Comparaison d'un blanc d'extraction de membranes SR (M1) avec du MeOH (méthanol) ; **B** : Courbes dose-réponse du DHT, du blanc d'extraction de membranes SR dopé avec du DHT (M2+DHT) et d'un témoin solvant MeOH dopé avec du DHT (MeOH+DHT)*

La figure 14-A montre que le protocole d'extraction des membranes SR n'induit pas d'interférence positive (pas d'effet activateur) ou négative (pas d'effet inhibiteur) sur la réponse du bioessai MDA-kb2. Le dopage par la DHT montre une absence d'effet matrice sur la détection de la DHT (M2+DHT vs. MeOH+DHT, Figure 14-B). Des conclusions similaires sont obtenues avec les deux autres lignées MELN et PLHC-1 (Annexe 2). Aucune différence significative n'a été observée entre le blanc matrice (M1) et le blanc solvant (MeOH) pour les trois lignées. De la même façon, le blanc matrice dopé (M2 + x) a une réponse similaire au blanc MeOH dopé (MeOH + x). L'effet matrice est donc négligeable sur les bioessais, les extraits de membranes SR sont compatibles avec les bioessais *in vitro*.

Sur la lignée PLHC-1, il est cependant à noter une perte de l'activité du BaP due à l'évaporation sous azote, car il s'agit un composé volatil.

3.3. Application de la batterie de bioessais *in vitro* aux extraits environnementaux

3.3.1. Criblage des extraits ponctuels d'eau sur la batterie de bioessais *in vitro*

Les extraits d'eau des 20 sites ont été testés sur la batterie de bioessais (MELN, MDA-Kb2, PLHC-1). Les équivalents toxiques biologique (TEQ-Bio) sont présentés dans le tableau 6. Deux sites (l'Allier et le Luech) ont été exclus du tableau car les réponses des bioessais observées se sont avérées non conclusives.

Tableau 6 : TEQ-Bio calculés pour les extraits d'eau

***T0** : Prélèvement d'eau lors de la mise à l'eau des membranes SR sur site ; **T15** : Prélèvement d'eau lors de la reprise des membranes SR sur site (15 jours plus tard). Les équivalents, « Eq » (TEQ-Bio) sont exprimés en ng d'équivalent/L. LOD ng E2Eq/L =0,01 ; LOQ ng E2Eq/L = 0,04 ; LOD ng DexEq/L = 3,5 ; LOQ ng DexEq/L =13,5 ; LOD ng TCCDEq/L = 0,1. < BLC : activité détectée inférieure à l'activité du blanc d'extraction.* *Pour le site de la Souffel, le résultat est exprimé en DexEq mais des activités AR et GR sont co-détectées.

SITE	T	E2 Eq	Dex Eq	BaP Eq (4h)	TCDD Eq (24 h)
L'Escaut	T0	< LD	< LD	32	< LD
	T15	< LD	< LD	23	< LD
La Souffel	T0	0,96	38*	122	< LD
	T15	1,53	27*	138	< LD
La Rosselle	T0	0,10	< LOD	76	< LD
	T15	3,44	28	127	0,25
L'Iton	T0	0,10	1185	167	< LD
	T15	0,37	464	54	< LD
La Risle	T0	1,84	70	218	0,22
	T15	< BLC	< LD	43	< LD
Antifer	T0	0,41	< LD	< BLC	< LD
	T15	0,56	< LD	< BLC	< LD
Le Clain	T0	1,30	< LD	230	< LD
	T15	1,36	< LD	117	< LD
La Vilaine	T0	5,55	101	142	< LD
	T15	0,84	< LQ	35	< LD
L'Hers mort	T0	< LD	< LD	10	< LD
	T15	< LD	< LD	52	< LD
Le Tolzac	T0	< LD	< LD	76	< LD
	T15	< LD	< LD	74	< LD
La Jalle	T0	1,83	59	50	0,29
	T15	0,48	40	48	< LD
La Boralde	T0	< LQ	< LD	28	< LD
	T15	< LQ	< LD	77	< LD
Tréboul	T0	0,72	< LD	60	< LD
	T15	2,43	< LD	78	< LD
Le Gier	T0	17,40	114	118	< LD
	T15	0,40	< LQ	71	< LD
Baie du Lazaret	T0	1,56	< LD	13	< LD
	T15	1,26	< LD	27	< LD
Martinique	T0	0,04	< LD	60	< LD
	T15	0,01	< LD	9	< LD
Guadeloupe	T0	0,06	< LD	48	< LD
	T15	0,09	< LD	40	< LD
Réunion	T0	< LD	< LD	92	< LD
	T15	< LD	< LD	21	< LD

*Pour le site de la Souffel, le résultat est exprimé en DexEq mais des activités AR et GR sont co-détectées.

Des activités sont détectées sur l'ensemble des sites et pour l'ensemble des tests. On observe des profils contrastés selon les sites et les activités. Les activités les plus récurrentes sont les activités *HAP-like* et estrogéniques.

L'activité *dioxin-like* en 4 h d'exposition est détectée sur l'ensemble des sites excepté Antifer qui est un site marin, *a priori* plus dilué. Après 24 h d'exposition, elle n'est détectée que sur trois sites (La Rosselle T15, La Risle T0, La Jalle T0). Cette diminution d'activité après 24 h d'exposition indique que se sont probablement des composés de type HAP qui sont responsables des activités détectées.

Les extraits de 13 sites sont actifs sur le test MELN. Le site du Gier est particulièrement contaminé à T0 en composés à activité estrogénique (TEQ-Bio à T0 17,40 ngE2Eq/L).

Il est intéressant de noter que sept sites se sont avérés actifs sur la lignée MDA-Kb2. Afin d'identifier quel type d'activité est détectée par le test, des co-expositions avec des antagonistes de chacun des récepteurs (AR et GR) ont été réalisées. Les résultats obtenus pour le site de l'Iton sont présentés sur la figure 15.

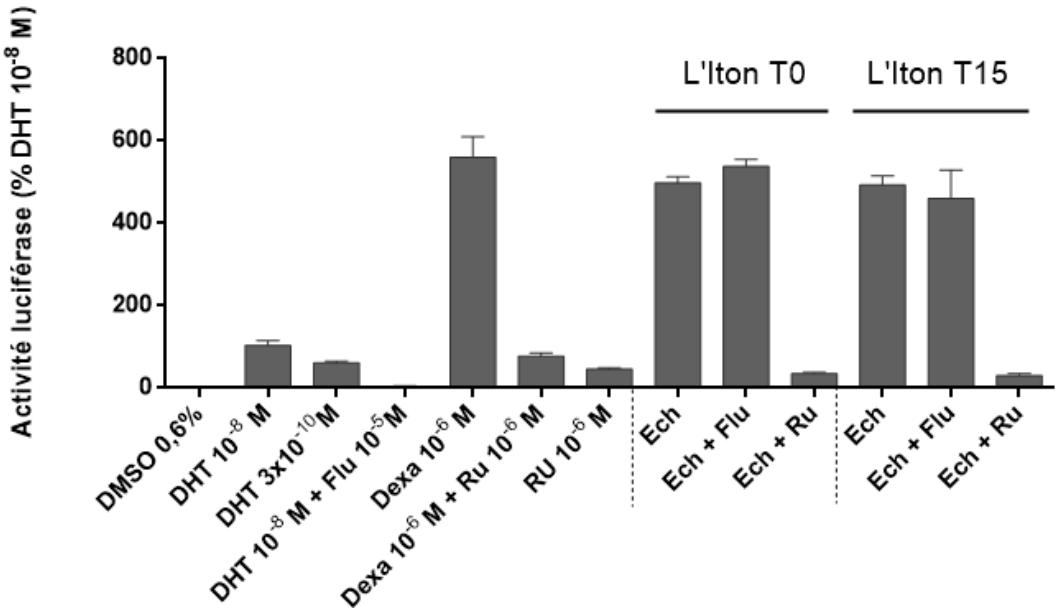


Figure 15 : Coexposition des extraits d'eau du site de l'Iton avec un antagoniste du AR et un agoniste partiel du GR

***DHT** : 5α-dihydrotestosterone ; **Flu** : Flutamide, antagoniste du AR ; **Dexa** : dexaméthasone ; **Ru** : RU-486, antagonistel du GR ; **Ech** : échantillon (extrait d'eau de l'Iton) ; **+** : coexposition ; **AR** : récepteur des androgènes ; **GR** : récepteur des glucocorticoïdes.*

L'activité des extraits provenant de l'Iton T0 et T15 n'est pas inhibée par la flutamide, antagoniste du récepteur AR. Au contraire la coexposition avec la RU-486, antagoniste du récepteur des glucocorticoïdes, diminue l'activité des extraits (même niveau d'activation que la RU-486 10^{-6} M seule). Pour l'Iton l'activité luciférase est donc attribuable à des ligands du GR. Il en est de même pour l'ensemble des autres extraits d'eau (données non montrées). Seul le site de la Souffel, également testé sur une lignée uniquement AR, présente un profil mixte (mélange d'activités glucocorticoïde et androgénique). Le site de l'Iton apparait particulièrement actif, avec des concentrations en ng DexEq/L > 400 à T0 et T15.

Enfin, un point intéressant qui ressort du criblage sont les différences importantes d'intensité de réponse sont parfois détectées entre T0 et T15 pour certains sites (ex : La Vilaine T0 plus actif que T15, La Gier T0 plus actif que T15 pour l'activité estrogénique) ce qui atteste d'une variation temporelle importante de la contamination. D'autres sites ont au contraire des valeurs de TEQ-Bio constants sur toutes les lignées à T0 et T15 (ex : Pérou-pères). Ces résultats mettent en évidence le problème qui est posé par la représentativité de la contamination de ces sites dans le temps lorsque des échantillons de phase dissoute (eau) sont utilisés pour le diagnostic.

3.3.2. Répartition des contaminants dans la colonne d'eau

En plus des extraits d'eau, des extraits de membranes SR et de matières en suspension (MES) ont été testés sur la batterie de bioessais pour quatre sites : Le Gier, Guadeloupe (Pérou-pères), Martinique (Grand Galion) et la Rosselle. Cette comparaison inter-matrice a pour but de mettre en évidence la répartition des activités biologiques dans les différentes matrices du compartiment aquatique.

L'activité ER, AR/GR et AhR sont présentés sur la figure 16. A titre comparatif, les valeurs mesurées dans les échantillons d'eaux ponctuels sont également représentées. Les concentrations associées sont présentées dans le tableau 7.

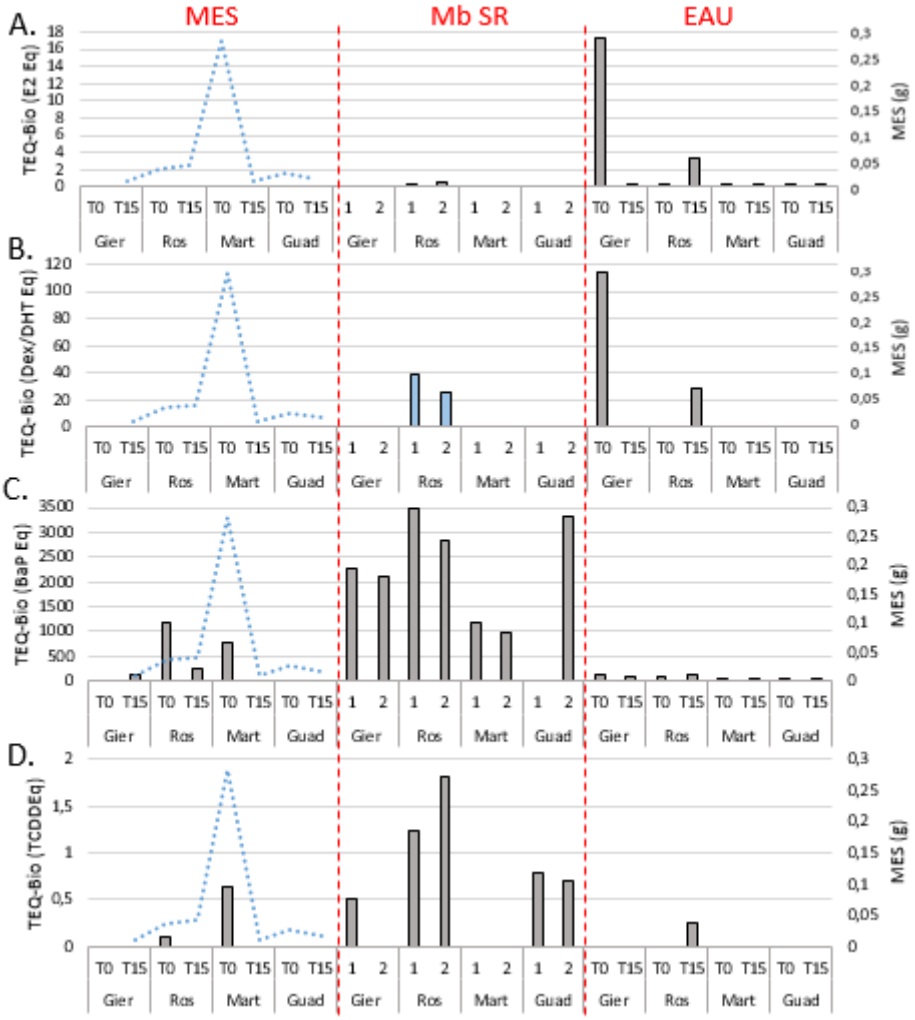


Figure 16 : TEQ-Bio (E2 Eq, DHT/DexEq, BaPEq et TCCD Eq) obtenus pour les extraits d'eau, de membranes SR et MES de 4 sites

***A** : Distribution de l'activité estrogénique en E2Eq ; **B** : Distribution de l'activité androgénique et glucocorticoïde (Barre bleue : DHTEq /Barre grise : Dex Eq); **C** : Distribution de l'activité HAP-like en BaP Eq ; **D** : Distribution de l'activité et dioxin-like en TCDD Eq. **Barre bleue** : DHT Eq ; **Barre grise** : E2 Eq, Dex Eq, BaP Eq ; **Trait bleu** : g MES/L. **Gier** : Le Gier ; **Ros** : La Rosselle ; **Mart** : Martinique (Grand-Galion) ; **Guad** : Guadeloupe (Pérou-pères). **T0** : Prélèvement d'eau lors du dépôt des membranes SR ; **T15** : prélèvement d'eau lors de la reprise des membranes SR (15 jours plus tard) ; **1** : Réplica 1Mb SR ; **2** : Réplica 2 Mb SR. Les valeurs d'équivalents sont exprimées en ng Eq/L pour les extraits d'eau et de MES, en ng Eq/gMb pour les extraits de membranes SR. L'extrait de MES du Gier T0 n'est pas disponible.*

Les résultats montrent que les activités hormonales sont principalement retrouvées dans la phase dissoute (eau) sauf pour le site de la Rosselle, alors que les *HAP-like* et *dioxin-like* se répartissent entre les MES et les membranes SR.

L'activité estrogénique (test MELN) est détectée dans les extraits d'eau pour l'ensemble des sites, et faiblement dans les extraits de membranes SR uniquement du site de La Rosselle. Elle n'est pas détectée dans les extraits de MES (figure 16-A).

Les extraits de membranes SR du site de la Rosselle sont actifs sur la lignée MDA-Kb2. Pour ce site, il est étonnant de noter qu'il s'agit de composés activateurs du récepteur

des androgènes dans les membranes SR, alors que ce sont de composés activateurs du récepteur des glucocorticoïdes dans les extraits d'eau (Figure 16-B). Ce résultat a pu être confirmé à l'aide d'une autre lignée cellulaire exprimant uniquement le récepteur des androgènes (résultat non montré). Aucune activité AR ou GR n'est détectée dans les MES.

Les activités *HAP-like* et *dioxin-like* sont détectées dans toutes les matrices, principalement dans les membranes SR et les MES (figure 16-C et 16-D). Il est intéressant de noter que les BaP Eq sont plus élevés dans les MES que dans la phase dissoute (ex : La Rosselle T0 1179 ng BaPEq/L dans les MES contre 76 ng E2Eq/ L dans l'eau).

Ces résultats permettent de confirmer que les activités de types PE sont liées à la présence de composés plutôt polaires (détectés préférentiellement dans la phase dissoute eau) alors que les activités HAP et *dioxin-like* sont liés à la présence de composés plutôt apolaires (détectés préférentiellement dans la phase particulaire et les membranes SR).

La répartition des activités dans les différentes matrices qui est observée dans ce travail confirme que l'utilisation de matrices aux propriétés contrastés est pertinente pour la surveillance de la qualité chimique des eaux de surface, car elle permet d'avoir une vision plus globale de la contamination des sites.

Tableau 7 : TEQ-Bio d'extraits d'eau, de membranes SR et de matières en suspension calculés pour 4 sites

***T0** : Prélèvement d'eau lors du dépôt des membranes SR ; **T15** : prélèvement d'eau lors de la reprise des membranes SR (15 jours plus tard) ; **1** : Réplica 1Mb SR ; **2** : Réplica 2 Mb SR. Les valeurs d'équivalents sont exprimées en ng Eq/L pour les extraits d'eau et de MES, en ng Eq/gMb pour les extraits de membranes SR. L'extrait de MES du Gier T0 n'est pas disponible. LOD ng E2Eq/L =0,014 ; LOQ ng E2Eq/L = 0,041; LOD ng DexEq/L = 3,5 ; LOQ ng DexEq/L =13,5 ; LOD ng TCCDEq/L = 0,1.*

		Le Gier		Guadeloupe (Pérou-pères)		Martinique (Grand Galion)		La Rosselle	
		T0 1	T15 2	T0 1	T15 2	T0 1	T15 2	T0 1	T15 2
EAU	E2Eq	17	0,40	0,06	0,09	0,04	0,01	0,10	3,44
	DexEq	114	< LQ	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	28
	BaPEq	118	71	48	40	60	9	76	127
	TCDDEq	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,25
Mb SR	E2Eq	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	0,35	0,50
	DHTEq	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	38	26
	BaPEq	2277	2093	-	3340	1185	989	3486	2846
	TCDDEq	0,51	<	0,79	0,71	<	<	1,24	1,82
MES	E2Eq		< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	DexEq/DHTEq		< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	BaPEq		135	< LD	< LD	791	< LQ	1179	239
	TCDDEq		< LD	< LD	< LD	0,64	< LD	0,09	< LD

IV. DISCUSSION

Ce travail a vu la mise en œuvre d'une batterie de bioessais *in vitro* pour dresser, sur la base des activités biologiques, des profils de contamination d'eaux de surface françaises. Les résultats informent sur la complémentarité des bioessais sélectionnés, le type et le niveau de contamination aux sites investigués et les stratégies d'échantillonnage à déployer dans ce type d'étude.

La première partie des résultats a mis en évidence que la réponse des bioessais *in vitro* inclus dans la batterie est conforme à celle retrouvée dans la littérature, ce qui valide l'utilisation de ces outils dans le cadre de cette étude. Il est intéressant de noter que dans ce travail, il a été considéré que la lignée MDA-Kb2 est capable de détecter deux activités distinctes (AR et GR). Dans d'autres travaux elle n'est utilisée que pour sa capacité à détecter les activités (anti)androgéniques, avec comme argument la plus grande sensibilité de la lignée pour les ligands AR (EC50 = 0,19 nM) que GR (EC50 = 5,94) [Conley *et al.*, 2017]. Cependant, les co-expositions avec les antagonistes réalisées dans ce travail confirment que ce bioessai peut également détecter les composés glucocorticoïdes dans les eaux de surface lorsqu'ils sont présents, même à des concentrations relativement faibles. Ce constat corrobore des études précédentes menées à des sites spécifiques comme des effluents urbains (Sonavane et al 2018) ou industriels [Creusot *et al.* 2014].

Le travail spécifique réalisé sur la lignée A549-p53RE-luc a mis en avant l'intérêt de cette lignée pour détecter des réponses génotoxiques pour certains composés. Par exemple, l'étoposide et la doxorubicine ont activé la luciférase dans cette lignée. Ce sont des composés qui inhibent la topoisomérase II et stabilisent les complexes topoisomérase II – cassure à l'ADN. Le MMS (methylmethane sulfonate), lui aussi actif sur la lignée, est un agent alkylant Sn2, il induit la formation de sites abasiques sur l'ADN. En revanche, le BaP n'a pas induit un signal de luminescence sur cette lignée. Pour être génotoxique, ce dernier doit subir une activation métabolique par les enzymes de transformation de phase I (implication du CYP1A1). Il est possible que les cellules de la lignée utilisée ne disposent pas de la machinerie enzymatique suffisante pour réaliser cette activation. De futurs tests faisant appel à l'utilisation de S9 mix par exemple pour mimer l'activation métabolique seront à effectuer pour pouvoir détecter un plus grand nombre d'activités génotoxiques de molécules seules ou d'extraits environnementaux. En effet, dans ce travail, considéré comme préliminaire, la lignée n'a pas détecté d'activité sur les extraits environnementaux testés. Le test d'autres extraits environnementaux est à envisager, car l'absence de réponse peut être simplement dûe à l'absence de composés génotoxiques directs dans les extrais testés. L'intérêt pour le

développement d'un test de détection des activités liées à p53 reste évident car elles sont détectées dans les eaux de surface [Neale *et al.*, 2015, Novak et al 2018].

L'activité estrogénique a déjà été largement étudiée dans le compartiment aquatique. Récemment, des études ont proposé des valeurs seuils (« *trigger value* ») pour l'activité estrogénique détectée par les bioessais *in vitro*, valeurs entre 0.3 et 1 ng E2-EQ/L selon les études et les bioessais [Kunz *et al.*, 2015, Van der Oost *et al.* 2017, Escher e*t al.* 2018]. Une valeur générique de 0,4 ng E2-Eq/L est actuellement à l'étude pour être introduite dans la future réglementation européenne et être utilisée comme valeur de référence dans les programmes de surveillance. Dix sites étudiés dans ce travail ont des valeurs d'E2-Eq supérieurs à 0,4 ng/L, la qualité chimique de ces sites serait par conséquent classée comme « mauvaise » dans le cadre de la DCE. Il est à noter que d'autres valeurs seuils ont été proposées par certains auteurs, certaines existent pour les autres activités de notre batterie de bioessais (AhR : 150 ng BaP Eq/L et GR : 100 ng DexaEq/L) [VanderOost *et al*.2017, Escher *et al*. 2018). Au vu de ces valeurs, l'Iton serait considéré comme un site à risque pour l'environnement du point de vue de l'activité glucocorticoïde. Cette définition de valeur seuil est un objectif important à atteindre afin que les EBT soient utilisables dans le cadre d'une surveillance de routine par les gestionnaires de l'environnement.

Afin d'approfondir le travail sur l'activité estrogénique, le test *in vivo* EASZY (pour *Endocrine Active Substance, acting through estrogen receptors, using transgenic cyp 19a1b-GFP Zebrafish embrYos*, [Brion *et al.*, 2012]) a été réalisé en parallèle sur les extraits de phase dissoute et fait l'objet d'un autre travail de Master (stage Pénelope Platon 2018). Ce bioessai est basé sur l'induction du gène rapporteur de la GFP (*green fluorescent protein*) placé sous le contrôle du promoteur de l'aromatase b cérébrale dans des embryons de poissons zèbres transgéniques (cyp19a1b-GFP). Dans le cerveau, le gène cyp19a1b est hautement régulé par le récepteur des estrogènes, l'induction de la GFP est donc un marqueur d'activation estrogénique *in vivo* dans ce modèle (Brion et al 2012). Dix sites où des E2-Eq ont pu être déterminés *in vitro* ont été testés *in vivo*. Pour 3 sites (La Vilaine T0, du Gier T0 et de la Souffel T0), les activités estrogéniques détectées *in vitro* ont pu être confirmées *in vivo* (7, 20 et 6 ng E2Eq/L respectivement). Le Gier et la Vilaine sont les sites les plus actifs *in vitro* (5 et 17 ng E2Eq/L respectivement), l'activité *in vivo* était donc attendue. Au contraire, le site de la Souffel est moins actif que d'autres sites *in vitro* (0,96 ng E2Eq/L) il a pourtant révélé une activité sur le test *vivo*. Cela permet d'illustrer l'importance dans une démarche d'évaluation des risques de prendre en compte la métabolisation par les organismes, qui n'est pas présente dans les tests *in vitro*. En effet, les réponses estrogéniques *in vivo* impliquent dans certains cas des interactions entre plusieurs voies de signalisation et différents organes cibles. Cependant les

tests *in vivo* sont plus chers, plus longs à réaliser que les tests *in vitro*, et pose un problème éthique. Dans le cadre d'une surveillance de la qualité chimique de l'eau, un criblage en amont sur des bioessais *in vitro* est préférable avant de réaliser les tests *in vivo*, essentiels pour évaluer le risque.

L'ensemble des tests ont révélé des activités sur les extraits ponctuels d'eau des 20 sites. Des profils de réponse contrastés sont observés en fonction des activités et en fonction des sites, suggérant la présence de divers types de contaminants organiques.

Dans ce travail, les activités détectées par la lignée MDA-Kb2 sur les extraits de phase dissoute sont toutes attribuables à des ligands du GR (7 sites actifs sur 18). Cette contamination est rarement reportée, elle est très probablement liée au relargage de substances de type pharmaceutiques (ex : dexaméthasone) via des effluents urbains, industriels ou hospitaliers, comme cela a été rapporté dans d'autres cas (Creusot et al 2014, Sonavane et al 2018). Le site de l'Iton est particulièrement actif (TEQBio > 400 ng Dex Eq/L), un effort d'échantillonnage et de recherche des composés responsables des activités détectées ainsi que des sources sur ce site permettrait de mieux connaître ce type de contamination.

L'identification des molécules responsables des activités détectées constitue la suite de ce travail. En effet, aucune approche analytique classique pour rechercher des composés n'a été réalisée à ce stade sur les extraits testés. Elle sera réalisée courant 2019 dans le cadre du réseau AQUAREF. Certains composés prioritaires seront recherchés, notamment les 45 composés qui le sont dans le cadre de la DCE ainsi que des hormones. Les concentrations mesurées par les analyses chimiques seront dérivées en équivalents toxiques chimiques (TEQ-Chim) en multipliant les concentrations de composés actifs par leur facteur de toxicité relative à une molécule de référence (TEF). Le rapport TEQ-Chim sur TEQ-Bio permettra ainsi d'estimer la contribution des composés identifiés dans les extraits à l'activité biologique détectée par les bioessais.

Une telle approche a déjà été utilisée dans d'autres études. Par exemple, une étude nationale menée récemment aux Etats-Unis sur des extraits d'échantillons de phase dissoute de cours d'eau, à l'aide d'une batterie de bioessais a rapporté des profils similaires d'activités PE (ER, AR, GR) [Conley *et al.*, 2017]. Une analyse d'équilibre des masses a été réalisée et a conclu que l'estrone est responsable de presque l'entièreté de l'activité estrogénique détectée in vitro pour l'ensemble des 27 sites étudiés. Une étude sur le Danube a confirmé l'implication majeure de l'estrone, parmi d'autres molécules, dans l'activité estrogénique de la phase dissoute [Neale *et al*. 2015]. Cependant, des activités estrogéniques ont pu également

être retrouvées dans des membranes SR et être expliquées, jusqu'à 4%, par la présence d'autres xéno-estrogènes comme le bisphenol A, ou le 4-t-octylphenol [Novák *et al.*, 2018].

Concernant l'activité androgénique, elle a déjà pu être expliquée dans des extraits d'eau jusqu'à 96% par la testostérone, l'androstenedione, l'androsterone et la dihydrotestosterone dans l'étude de Conley *et al.* [2017] (1 site sur les 5 actifs). Aucune molécule responsable de l'activité GR n'a pu être identifiée bien que certains sites présentaient une activité liée à ce récepteur.

Dans notre étude, l'activité AhR en 4 h est quantifiable sur 17 des 18 sites testés, ce qui laisse suspecter la présence de composés *HAP-like*. L'activation de la voie médiée par AhR (test CAFLUX) a déjà pu être expliquée dans des extraits de phase dissoute jusqu'à presque 30% par le fongicide propiconazole [Neale *et al.* 2015]. D'autres pesticides comme le terbuthylazine (herbicide) ou l'insecticide diazinon ont aussi été mis en lien avec l'activation de la voie dans des extraits de phase dissoute [Neale *et al.*, 2017b]. Ce travail a montré que les activités *HAP-like* et *dioxin-like* se répartissent principalement entre les MES et les membranes SR. L'activité *dioxin-like* dans des membranes SR a pu être partiellement expliquée (8%) dans une menée sur le Danube par Novák *et al*. [2018]. Les molécules explicatives sont principalement des HAP (ex : Benzo(k)fluoranthene, Benzo(b)fluoranthene, benzo(j)fluoranthene, chrysène).

A ce jour, nous ne disposons d'information précises sur le type de pression anthropique existant sur chacun des sites investigués. Dans le future, l'étude des pressions exercées sur chacun des sites (industrielles, agricoles, urbaines…) sera aussi effectuée au regard des composés identifiés. Cela permettra de mieux caractériser chaque type de pression et de classer les sites en fonction de ceux-ci.

Dans certains cas, l'activité biologique détectée ne peut pas être expliquée ou seulement partiellement par les analyses ciblées. L'approche dite EDA (*Effect directed analysis*) peut être alors mise en œuvre. Elle consiste à fractionner l'extrait (e.g. par méthode HPLC), tester l'activité des fractions et identifier par analyse dite « non-ciblées » (e.g. spectrométrie de masse haute résolution), les composés responsables des activités dans les fractions actives [Brack *et al.*, 2017].

La distribution des activités dans les différentes matrices est similaire à celle qui avait déjà pu être observée auparavant, les activités AhR étant plutôt associées aux phase semi-polaire à apolaires (MES, membranes SR) alors que les activité hormonales sont plutôt dans la phase dissoute [Creusot *et al.*, 2013, Novak *et al.* 2018]. Il est à noter que des capteurs de type POCIS (*polar organic compounds integrative sampler*) ont également été déployés sur les sites pendant la même durée que les membranes SR. Leur étude apportera de l'information supplémentaire sur la distribution des activités dans la colonne d'eau en fonction de la polarité

des ligands présents sur les sites. Enfin, les matières en suspension ne sont pas souvent utilisées dans les études de ce type. Un biais important reste la quantité de MES récupérée sur les filtres, qui peut dépendre de nombreux facteurs environnementaux (ex : conditions climatiques, débit).

Il n'est pas possible de comparer directement les TEQ-Bio obtenus pour les membranes SR avec ceux obtenus pour les extraits d'eau car ils sont exprimés par g/MbSR et g/L respectivement. Aujourd'hui des modèles sont utilisés pour extrapoler la valeur des équivalents mesurés dans les capteurs passifs de type membrane SR en équivalent litre pour pouvoir les comparer à ceux retrouvés dans l'eau [Novák *et al.*, 2018; Vrana *et al.*, 2018]. Ces modèles sont basés sur l'estimation du volume d'eau extrait par le capteur passif (*sampling rate*, Rs). Or, pour estimer cette valeur il est nécessaire de connaître les contaminants captés par les membranes. Des estimations du Rs ont déjà été réalisées lorsque, comme dans ce travail, les molécules actives n'étaient pas identifiées [Sonavane *et al.*, 2018; Creusot *et al.*, 2014]. Cependant, il a été décidé pour cette étude que les extrapolations seront réalisées lorsque les composés actifs auront été identifiés afin d'utiliser des Rs adaptés.

V. CONCLUSION

Ce travail a permis l'évaluation de la contamination d'eaux de surface françaises par différentes familles de toxiques par la mise en œuvre d'une batterie de bioessais *in vitro* ciblant différents modes d'action. Les résultats montrent des profils de contamination contrastés entre les sites, avec une prédominance des activités estrogéniques et *HAP-like*. Des activités de type glucocorticoïdes sont également observées pour certains sites spécifiques suggérant l'influence de rejets pharmaceutiques ou hospitaliers. Globalement, la comparaison de la répartition des activités biologiques dans différentes matrices a montré que les activités liées aux perturbateurs endocriniens sont principalement retrouvées dans la phase dissoute (composés polaires à semi-polaires), les activités *HAP-like* sont retrouvées dans toutes les matrices et les *dioxin-like* principalement dans les membranes SR (composés apolaires).

Ces résultats confirment que 1- l'utilisation d'une batterie de bioessais et 2- l'étude de différentes matrices est pertinent pour la surveillance de la qualité chimique des eaux de surface. En effet, ils permettent d'avoir une vision plus globale de la contamination au regard de la surveillance actuelle basée sur des substances prioritaires.

Enfin, ce travail constitue la partie « bioanalyse » d'une approche bioanalytique plus large. Courant 2019, des méthodes de chimie analytique seront appliquées sur ces extraits, afin de quantifier la présence de molécules susceptibles d'être responsables des effets biologiques observés. L'analyse de capteurs passifs susceptibles de concentrer les molécules polaires (POCIS) permettra d'approfondir le travail sur la répartition des activités dans le compartiment aquatique. De plus, une extrapolation des valeurs exprimées par gramme de matrice en litre est aussi à réaliser afin de pouvoir comparer les équivalents toxiques calculés dans les différentes matrices. L'ensemble de ces informations pourront être mises en relation avec les pressions exercées sur les sites étudiés dans le but de mener des investigations plus poussées pour identifier les causes des contaminations.

BIBLIOGRAPHIE

Aït-Aïssa S., Laskowski S., Laville N., Porcher J.-M., Brion F. - Anti-androgenic activities of environmental pesticides in the MDA-kb2 reporter cell line. *Toxicology in Vitro*, 2010, **24** (7), 1979–1985.

Albinet A., Nalin F., Tomaz S., Beaumont J., Lestremau F. - A simple QuEChERS-like extraction approach for molecular chemical characterization of organic aerosols: Application to nitrated and oxygenated PAH derivatives (NPAH and OPAH) quantified by GC-NICIMS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014, **406** (13), 3131–3148.

Albinet A., Tomaz S., Lestremau F. - A really quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) extraction procedure for the analysis of particle-bound PAHs in ambient air and emission samples. *Science of The Total Environment*, 2013, **450**–**451**, 31–38.

Altenburger R. *et al.* - Future water quality monitoring — Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. *Science of The Total Environment*, 2015, **512**–**513**, 540–551.

Altenburger R. *et al.* - Mixture effects in samples of multiple contaminants – An inter-laboratory study with manifold bioassays. *Environment International*, 2018, **114**, 95–106.

Balaguer P., François F., Comunale F., Fenet H., Boussioux A.-M., Pons M., Nicolas J.-C., Casellas C. - Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Science of The Total Environment*, 1999, **233** (1), 47–56.

Behrens A., Schirmer K., Bols N.C., Segner H. - Polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1, and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 2001, **20** (3), 632–43.

Brack W. *et al.* - Towards the review of the European Union Water Framework Directive: Recommendations for more efficient assessment and management of chemical contamination in European surface water resources. *Science of The Total Environment*, 2017, **576**, 720–737.

Brion F., Le Page Y., Piccini B., Cardoso O., Tong S.-K., Chung B., Kah O. - Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures In Vivo Using Transgenic (cyp19a1b-GFP) Zebrafish Embryos ed. Hubert Vaudry. *PLoS ONE*, 2012, **7** (5), e36069.

Claxton L.D., Houk V.S., Hughes T.J. - Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 1998, **410** (3), 237–243.

Conley J.M., Evans N., Mash H., Rosenblum L., Schenck K., Glassmeyer S., Furlong E.T., Kolpin D.W., Wilson V.S. - Comparison of in vitro estrogenic activity and estrogen concentrations in source and treated waters from 25 U.S. drinking water treatment plants. *Science of The Total Environment*, 2017, **579**, 1610–1617.

Cortés C., Marcos R. - Genotoxicity of disinfection byproducts and disinfected waters: A review of recent literature. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2018, **831**, 1–12.

Creusot N. - Contribution de l'approche effect directed analysis à l'identification de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques. Bordeaux 1, 2011. Available at: http://www.theses.fr/2011BOR14417 [Accessed July 17, 2018].

Creusot N., Aït-Aïssa S., Tapie N., Pardon P., Brion F., Sanchez W., Thybaud E., Porcher J.-M., Budzinski H. - Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling. *Environmental Science & Technology*, 2014, **48** (7), 3649–3657.

Creusot N., Tapie N., Piccini B., Balaguer P., Porcher J.-M., Budzinski H., Aït-Aïssa S. - Distribution of steroid- and dioxin-like activities between sediments, POCIS and SPMD in a French river subject to mixed pressures. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013, **20** (5), 2784–2794.

Dévier M.-H., Mazellier P., Aït-Aïssa S., Budzinski H. - New challenges in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures. *Comptes Rendus Chimie*, 2011, **14** (7–8), 766–779.

Di Paolo C., Müller Y., Thalmann B., Hollert H., Seiler T.-B. - p53 induction and cell viability modulation by genotoxic individual chemicals and mixtures. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, **25** (5), 4012–4022.

Escher B.I. *et al.* - Effect-based trigger values for in vitro and in vivo bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive. *Science of The Total Environment*, 2018, **628**–**629**, 748–765.

Escher B.I., Neale P.A., Leusch F.D.L. - Effect-based trigger values for in vitro bioassays: Reading across from existing water quality guideline values. *Water Research*, 2015, **81**, 137–148.

Hahn M.E., Lamb T.M., Schultz M.E., Smolowitz R.M., Stegeman J.J. - Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3′,4,4′-tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquatic Toxicology*, 1993, **26** (3–4), 185–208.

Jovanović J. *et al.* - Evaluation of genotoxic potential in the Velika Morava River Basin in vitro and in situ. *Science of The Total Environment*, 2018, **621**, 1289–1299.

Kase R. *et al.* - Screening and risk management solutions for steroidal estrogens in surface and wastewater. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, **102**, 343–358.

Kinani S., Bouchonnet S., Creusot N., Bourcier S., Balaguer P., Porcher J.-M., Aït-Aïssa S. - Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environmental Pollution*, 2010, **158** (1), 74–83.

Könemann S. *et al.* - Effect-based and chemical analytical methods to monitor estrogens under the European Water Framework Directive. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2018, **102**, 225–235.

Kunz P.Y., Kienle C., Carere M., Homazava N., Kase R. - In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2015, **106**, 107–115.

Kunz P.Y., Simon E., Creusot N., Jayasinghe B.S., Kienle C., Maletz S., Schifferli A., Schönlau C., Aït-Aïssa S., Denslow N.D., Hollert H., Werner I., Vermeirssen E.L.M. - Effect-based tools for monitoring estrogenic mixtures: Evaluation of five in vitro bioassays. *Water Research*, 2017, **110**, 378–388.

Leusch F.D.L., Neale P.A., Arnal C., Aneck-Hahn N.H., Balaguer P., Bruchet A., Escher B.I., Esperanza M., Grimaldi M., Leroy G., Scheurer M., Schlichting R., Schriks M., Hebert A. - Analysis of endocrine activity in drinking water, surface water and treated wastewater from six countries. *Water Research*, 2018, **139**, 10–18.

Leusch F.D.L., Neale P.A., Hebert A., Scheurer M., Schriks M.C.M. - Analysis of the sensitivity of in vitro bioassays for androgenic, progestagenic, glucocorticoid, thyroid and estrogenic activity: Suitability for drinking and environmental waters. *Environment International*, 2017, **99**, 120–130.

Levine A.J., Oren M. - The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer*, 2009, **9** (10), 749–758.

van der Linden S.C., von Bergh A.R.M., van Vught-Lussenburg B.M.A., Jonker L.R.A., Teunis M., Krul C.A.M., van der Burg B. - Development of a panel of high-throughput reporter-gene assays to detect genotoxicity and oxidative stress. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2014, **760**, 23–32.

Long M., Laier P., Vinggaard A.M., Andersen H.R., Lynggaard J., Bonefeld-Jørgensen E.C. - Effects of currently used pesticides in the AhR-CALUX assay: comparison between the human TV101L and the rat H4IIE cell line. *Toxicology*, 2003, **194** (1), 77–93.

Louiz I., Kinani S., Gouze M.-E., Ben-Attia M., Menif D., Bouchonnet S., Porcher J.M., Ben-Hassine O.K., Aït-Aïssa S. - Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based

bioassays: Contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Science of The Total Environment*, 2008, **402** (2–3), 318–329.

Martin A., Margoum C., Randon J., Coquery M. - Silicone rubber selection for passive sampling of pesticides in water. *Talanta*, 2016, **160**, 306–313.

Neale P.A. *et al.* - Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: Fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water. *Water Research*, 2017a, **123**, 734–750.

Neale P.A., Munz N.A., Aït-Aïssa S., Altenburger R., Brion F., Busch W., Escher B.I., Hilscherová K., Kienle C., Novák J., Seiler T.-B., Shao Y., Stamm C., Hollender J. - Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. *Science of The Total Environment*, 2017b, **576**, 785–795.

Neale P.A., Stalter D., Tang J.Y.M., Escher B.I. - Bioanalytical evidence that chemicals in tattoo ink can induce adaptive stress responses. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, **296**, 192–200.

Novák J., Vrana B., Rusina T., Okonski K., Grabic R., Neale P.A., Escher B.I., Macová M., Ait-Aissa S., Creusot N., Allan I., Hilscherová K. - Effect-based monitoring of the Danube River using mobile passive sampling. *Science of The Total Environment*, 2018, **636**, 1608–1619.

Pelkonen O., Turpeinen M., Hakkola J., Honkakoski P., Hukkanen J., Raunio H. - Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: Current status. *Archives of Toxicology*, 2008, **82** (10), 667–715.

Poland A., Glover E. - Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. *Journal of Biological Chemistry*, 1976, **251** (16), 4936–4946.

Prokeš R., Vrana B., Klánová J. - Levels and distribution of dissolved hydrophobic organic contaminants in the Morava river in Zlín district, Czech Republic as derived from their accumulation in silicone rubber passive samplers. *Environmental Pollution*, 2012, **166**, 157–166.

Schwarzenbach R.P. - The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. *Science*, 2006, **313** (5790), 1072–1077.

Serra H. - Évaluation in vitro et in vivo des perturbateurs endocriniens chez le poisson zèbre : cas de substances seules et en mélanges. Bordeaux, 2017. Available at: http://www.theses.fr/2017BORD0744 [Accessed July 17, 2018].

Sonavane M., Schollée J.E., Hidasi A.O., Creusot N., Brion F., Suter M.J.-F., Hollender J., Aït-Aïssa S. - An integrative approach combining passive sampling, bioassays, and effect-directed analysis to assess the impact of wastewater effluent: Effect-based analysis of WWTP impact on a river stream. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2018, **37** (8), 2079–2088.

Stahl R.G. - The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1991, **22** (1), 94–125.

Tabrez S., Shakil S., Urooj M., Damanhouri G.A., Abuzenadah A.M., Ahmad M. - Genotoxicity Testing and Biomarker Studies on Surface Waters: An Overview of the Techniques and Their Efficacies. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 2011, **29** (3), 250–275.

Valcárcel Y., Valdehíta A., Becerra E., López de Alda M., Gil A., Gorga M., Petrovic M., Barceló D., Navas J.M. - Determining the presence of chemicals with suspected endocrine activity in drinking water from the Madrid region (Spain) and assessment of their estrogenic, androgenic and thyroidal activities. *Chemosphere*, 2018, **201**, 388–398.

Vindimian E., Robaut C., Fillion G. - A method for cooperative or noncooperative binding studies using nonlinear regression analysis on a microcomputer. *J. Appl. Biochem.*, 1983, **5** (4–5), 261–268.

Vrana B., Smedes F., Allan I., Rusina T., Okonski K., Hilscherová K., Novák J., Tarábek P., Slobodník J. - Mobile dynamic passive sampling of trace organic compounds: Evaluation of sampler performance in the Danube River. *Science of The Total Environment*, 2018, **636**, 1597–1607.

Wangmo C., Jarque S., Hilscherová K., Bláha L., Bittner M. - In vitro assessment of sex steroids and related compounds in water and sediments – a critical review. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2018, **20** (2), 270–287.

Wernersson A.-S. *et al.* - The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe*, 2015, **27** (1). Available at: http://www.enveurope.com/content/27/1/7 [Accessed September 5, 2018].

White P.A., Rasmussen J.B. - The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. 1998, 14.

Wilson V.S. - A Novel Cell Line, MDA-kb2, That Stably Expresses an Androgen- and Glucocorticoid-Responsive Reporter for the Detection of Hormone Receptor Agonists and Antagonists. *Toxicological Sciences*, 2002, **66** (1), 69–81.

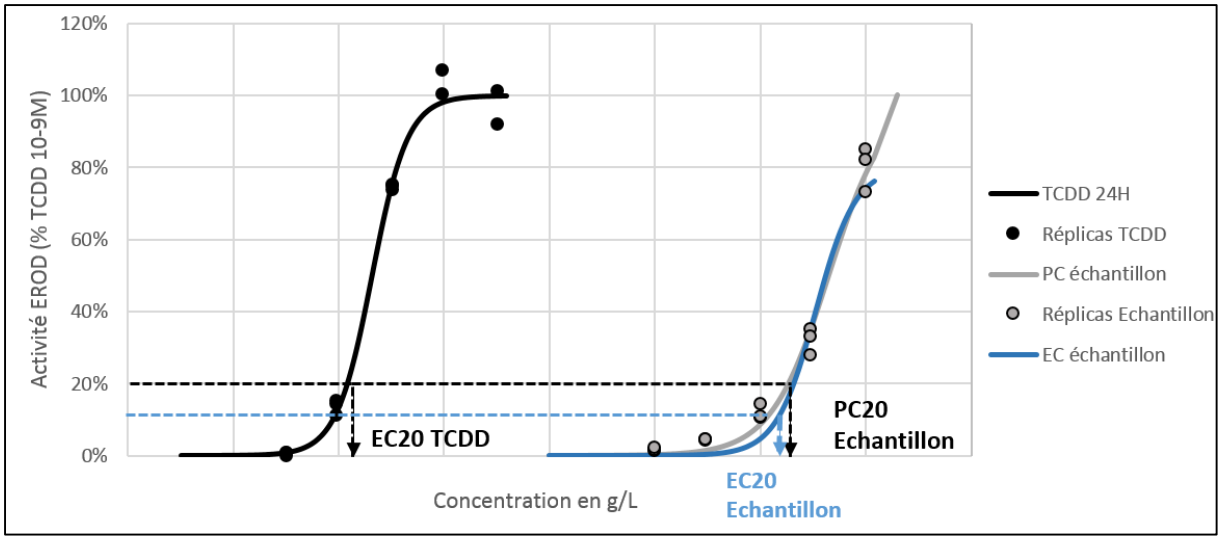
Yan W., Xiao D., Yao K. - Combined bioluminescence and fluorescence imaging visualizing orthotopic lung adenocarcinoma xenograft in vivo. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2011, **43** (8), 595–600.

Yeh R.Y.L., Farré M.J., Stalter D., Tang J.Y.M., Molendijk J., Escher B.I. - Bioanalytical and chemical evaluation of disinfection by-products in swimming pool water. *Water Research*, 2014, **59**, 172–184.

Žegura B., Heath E., Černoša A., Filipič M. - Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere*, 2009, **75** (11), 1453–1460.

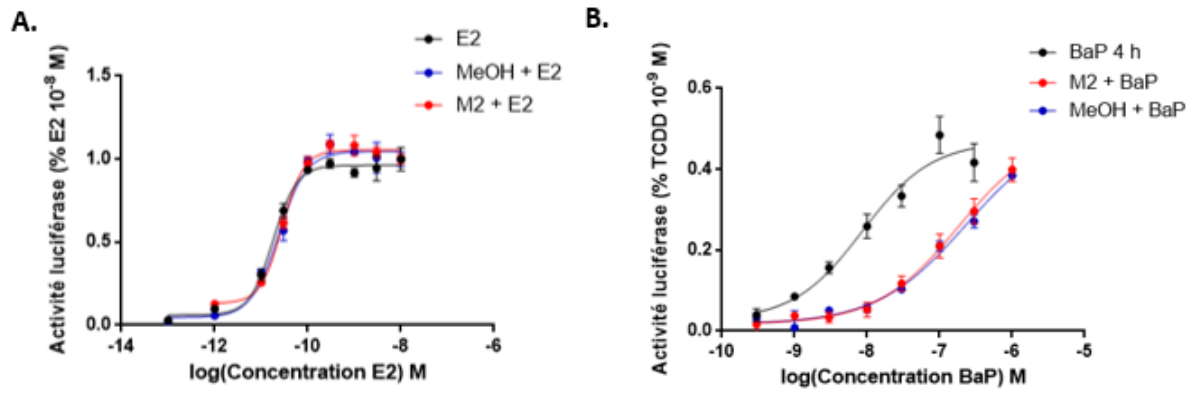
ANNEXES

ANNEXE I : Comparaison de la dérivation d'EC et de PC.



Les valeurs d'EC sont dérivées à partir de courbes où le plateau est déterminé par le modèle de Hill utilisé par la macro Exel Regtox (Vindimian *et al.,* 1983). Il est possible de fixer différents paramètres lors de la modélisation des courbes (minimum, maximum, pente). Afin d'harmoniser les valeurs dérivées par rapport à la molécule de référence, la valeur maximum (plateau) peut être fixée à 1. Dans ce cas, ce sont des valeurs de PC (positive control) qui sont dérivées. Cette figure illustre le décalage qui peut apparaître entre des valeurs de PC (plateau fixé à 1) et d'EC (plateau déterminé par le modèle de Hill).

<u>ANNEXE II</u> : Validation de l'absence d'effet matrice des extraits de membranes SR sur les lignées MELN et PLHC-1



***A** : Lignée MELN. **B** : Lignée PLHC-1. E2 : 17β-estradiol ; BaP : Benzo(a)pyrène ; MeOH : méthanol ; M2 : blanc d'extraction de membranes SR dopé avec les molécules de référence de chaque test.*

CHARDON Clémence

BIOESSAIS *IN VITRO* DE DETECTION DE COMPOSES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET *DIOXIN-LIKE* : APPLICATION A L'EVALUATION DE LA QUALITE CHIMIQUE D'EAUX DE SURFACE

La **qualité chimique** d'extraits organiques de phase dissoute de 18 sites « **eaux de surface** » français a été étudiée à l'aide d'une batterie de **bioessais *in vitro*** ciblant les effets **perturbateurs endocriniens** (activités estrogénique, androgénique et glucocorticoïde) et ***dioxin-like/HAP-like***. L'ensemble des activités testées ont été détectées dans les extraits, avec des profils contrastés selon les sites et les moments de prélèvements (T0/T15). Des activités ***HAP-like***, estrogénique, glucocorticoïde et ***dioxin-like*** sont quantifiables pour 17, 13, 7 et 3 sites sur 18 respectivement. Pour l'activité estrogénique, 10 sites ont des valeurs d'E2 équivalent supérieures à la valeur seuil de danger pour l'écosystème.

En parallèle, une comparaison de la répartition des activités biologiques dans différentes matrices échantillonnées (eau, matières en suspension et capteur passif de type membrane de silicone SR) a été entrepris. Globalement, les activités **perturbateurs endocriniens** sont principalement retrouvées dans la phase dissoute (composés polaires), les activités ***HAP-like*** sont retrouvées dans toutes les matrices et l'activité ***dioxin-like*** principalement dans les membranes SR (composés apolaires). Ce travail confirme la pertinence de ces outils ainsi que l'utilisation de différentes matrices pour la **surveillance** de la **qualité chimique des eaux de surface**. De prochains travaux permettront d'identifier les molécules responsables des activités biologiques détectées à l'aide de méthodes analytiques.

Mots-clefs : Qualité chimique des eaux de surface, batterie de bioessais, perturbateurs endocriniens, activités *dioxin-like/HAP-like*, surveillance.

Chemical quality of water organic extracts coming from 18 French **surface water** sites has been investigated, through the application of a **battery of *in vitro* bioassays** targeting **endocrine disruptors** (estrogens, androgens and glucocorticoids) and **dioxin-like/HAP-like activities**. All tested activities were detected in the extracts, showing different response profiles regarding the sites and time of sampling (T0/T15). **HAP-like**, estrogenic, glucocorticoid and **dioxin-like** activities are quantified at 17, 13, 7, 3 out of 18 sites, respectively. For 10 sites, E2-Eq are above the trigger value considering hazard for ecosystems.

Furthermore, a comparison of *in vitro* profiles in different matrices (i.e. dissolved phase, suspended particulate matter and integrative sampler silicone rubber type) has been carried out. Globally, **endocrine disruptors** activities are mainly found in the dissolved phase (polar compounds), while **HAP-like activities** are found in every matrices and **dioxin-like** ones mainly in silicone rubber (non-polar compounds). The present work confirms the relevance of these tools as well as the use of different matrices for **surface water chemical quality monitoring**. Further studies will allow the identification of responsible molecules of detected biological activities through analytical methods.

Key-words : Surface water chemical quality, battery of in vitro bioassays, endocrine disruptors, dioxin/HAP-like activities, monitoring.