



Bioessais *in vitro*

Évaluation de la contamination par des composés perturbateurs endocriniens, dioxin-like et génotoxiques

Selim AIT-AISSA

INERIS : S. Aït-Aïssa, N. Creusot, E. Maillot-Maréchal

Université de Paris Sud : Y. Lévi, L. Oziol

Université de Bordeaux : J. Cachot, C. Clérandeau, A. Pichon

Irstea : F. Serveto, M.J. Capdeville, C. Miège



Contexte ECHIBIOTEB

Eaux usées et boues = mélanges complexes

Des milliers de molécules

Lien entre contamination et effets ?

Quelles approches pour les évaluer ?



Approche analytique
(analyses ciblées / non ciblées)

- ✓ quantitatives, sélectives, sensibles (traces)
- ✗ vision partielle / structurale de la contamination



Approche écotoxicologique
(bioessais standards)

- ✓ intègrent l'ensemble des composés actifs biodisponibles
- ✓ pertinence (éco)toxicologique
- ✗ identité des molécules ?



Approche Bio-analytique

Bioessais *in vitro* - Détection basée sur le mécanisme d'action des substances

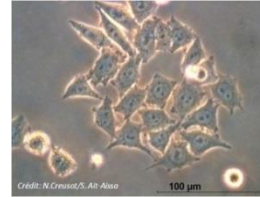
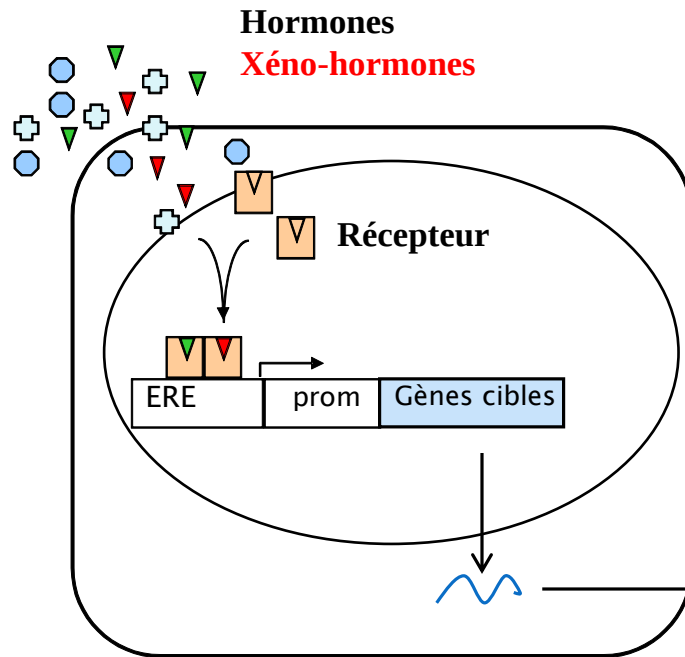


Perturbateurs endocriniens

Dioxin-like

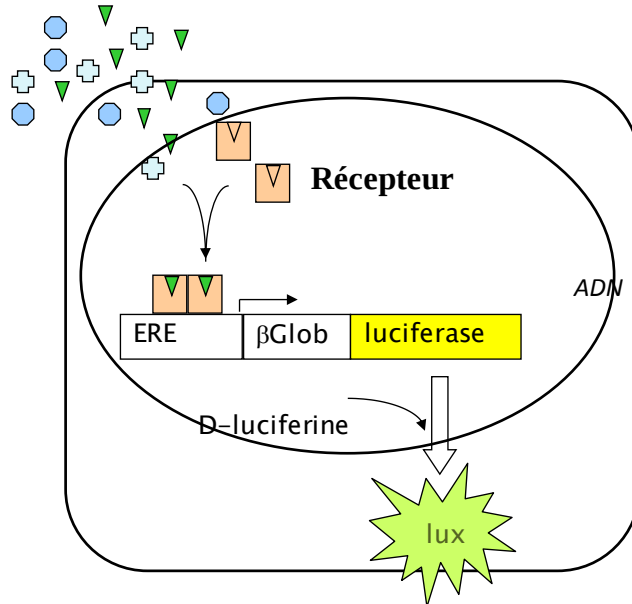
Génotoxiques

Perturbateurs endocriniens: mécanisme d'action



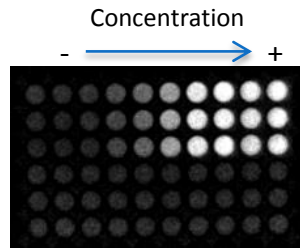
~~Réponse cellulaire aux hormones~~

Bio-essais *in vitro* basés sur le mécanisme d'action

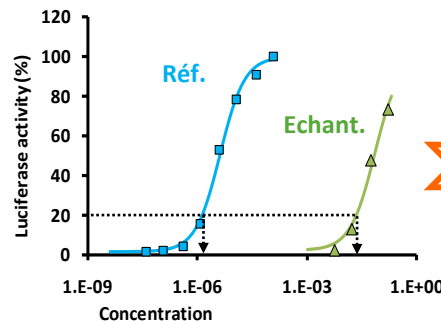


Tests cellulaires exprimant un gène rapporteur (mesure simple et spécifique) sous contrôle de récepteurs des hormones (ER, AR, GR, TR) ou de la dioxine (AhR)

- Mise en évidence de la **présence de composés actifs** au sein des échantillons
- **Quantification** relative en **équivalents-hormones** ou équivalents-dioxine dans l'échantillon (TEQ)



Microplaques



$$\text{BIO-TEQ} = \frac{\text{EC20 réf.}}{\text{EC 20 échant.}} + \text{une LD}$$

Des outils déjà éprouvés

Outils fonctionnels

criblage
quantitatifs
sensibilité (e.g. E2-Eq 0,1 ng/L)

Applications à différentes matrices environnementales

Eaux de surface, effluents (Harries et al 1998, Hislcherova 2000)
Sédiments (Kinani et al 2010)
Biote (Legler et al 2002)

Validation dans un contexte de surveillance des milieux aquatiques

DCE : alternatives à l'analyse de E2 et EE2 (liste de vigilance) dans les eaux usées et eaux de surface

France: AQUAREF

Europe: NORMAN, SPI-Effect-based tools for estrogens (R Käse, eawag)

ISO: normes en cours d'élaboration (potentiel estrogénique des eaux)

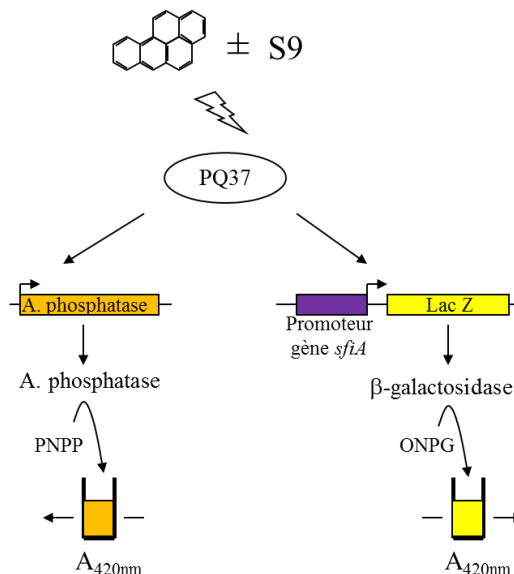
Bioessais *in vitro* dans ECHIBIOTEB

Activité	Récepteur	Bioessai	Résultat
<u>Hormono-mimétiques</u>			
Estrogénique	ER	MELN	estradiol-Eq
Anti-estrogénique	anti-ER		-
Androgénique	AR	MDA-kb2	dihydrotestostérone -Eq
anti-Androgénique	anti-AR	MDA-kb2	flutamide-Eq
Glucocorticoïde	GR	MDA-kb2	dexaméthasone-Eq
Thyroïdien	TR	PC-DR-LUC	T3-Eq
anti-thyroïdien	anti-TR	PC-DR-LUC	-
<u>Dioxin-like</u>			
HAP-like	AhR 4h	PLHC-1	BaP-Eq
dioxine-like	AhR 24h	PLHC-1	TCDD-Eq

Génotoxicité : SOS Chromotest

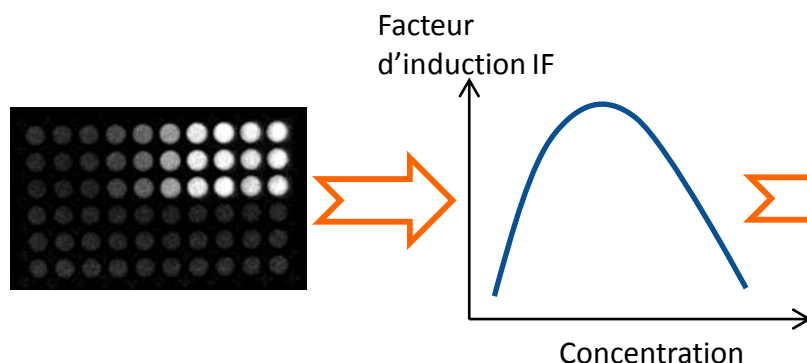
Test basé sur l'expression d'un **gène rapporteur *lacZ*** (mesure simple et spécifique) **sous le contrôle du promoteur du gène *sfiA*** (gène de réparation de l'ADN). Plus le composé est génotoxique, plus le gène *lacZ* est induit et plus l'activité de l'enzyme β galactosidase est élevée.

- Mesure du potentiel **génotoxique** des échantillons
- Test **semi-quantitatif**



$$IF = \frac{[\beta\text{-gal. / A. phosph.}]_{\text{essai}}}{[\beta\text{-gal. / A. phosph.}]_{\text{témoin}}}$$

IF	Génotoxicité
≤ 1	-
$1 < \leq 1,5$	+/-
$1,5 < \leq 2$	+
> 2	++



Bioessais *in vitro* dans ECHIBIOTEB

Activité	Récepteur/ mécanisme	Bioessai	Résultat
<u>Hormono-mimétiques</u>			
Estrogénique	ER	MELN	estradiol-Eq
Anti-estrogénique	Anti-ER		-
Androgénique	AR	MDA-kb2	dihydrotestostérone -Eq
anti-Androgénique	anti-AR	MDA-kb2	flutamide-Eq
Glucocorticoïde	GR	MDA-kb2	dexaméthasone-Eq
Thyroïdien	TR	PC-DR-LUC	T3-Eq
anti-thyroïdien	anti-TR	PC-DR-LUC	-
<u>Dioxin-like</u>			
HAP-like	AhR 4h	PLHC-1	BaP-Eq
dioxine-like	AhR 24h	PLHC-1	TCDD-Eq
<u>Génotoxicité</u>			
Génotoxicité (± S9)	SOS (±S9)	SOS chromotest	Induction gène <i>sfiA</i>

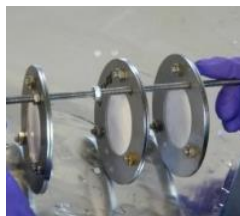


Comprendre le monde,
construire l'avenir®



Objectifs de l'étude

Eaux



Boues



1. Profils de contamination sur la base des bioessais *in vitro* ?
2. Influence des traitements complémentaires ?
3. Lien avec la chimie ciblée ?

Evaluation des eaux



6 sites de STEU

21 eaux d'entrée

Protocole de bioanalyse des eaux



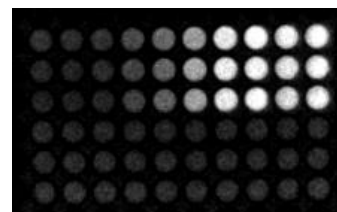
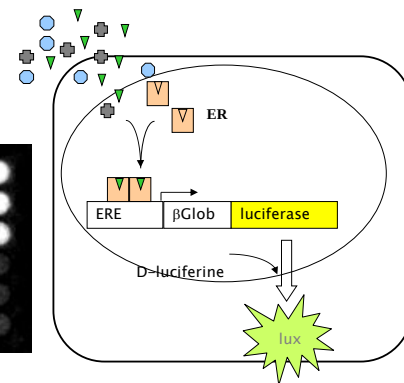
Eaux brutes



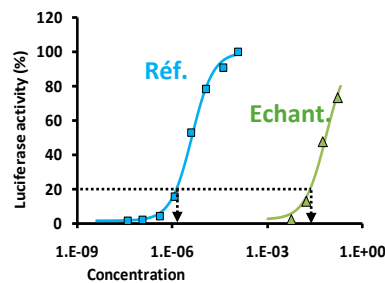
Extraction sur
phase solide
(SPE)



Extrait
organique
(DMSO)



Bioessais *in vitro*

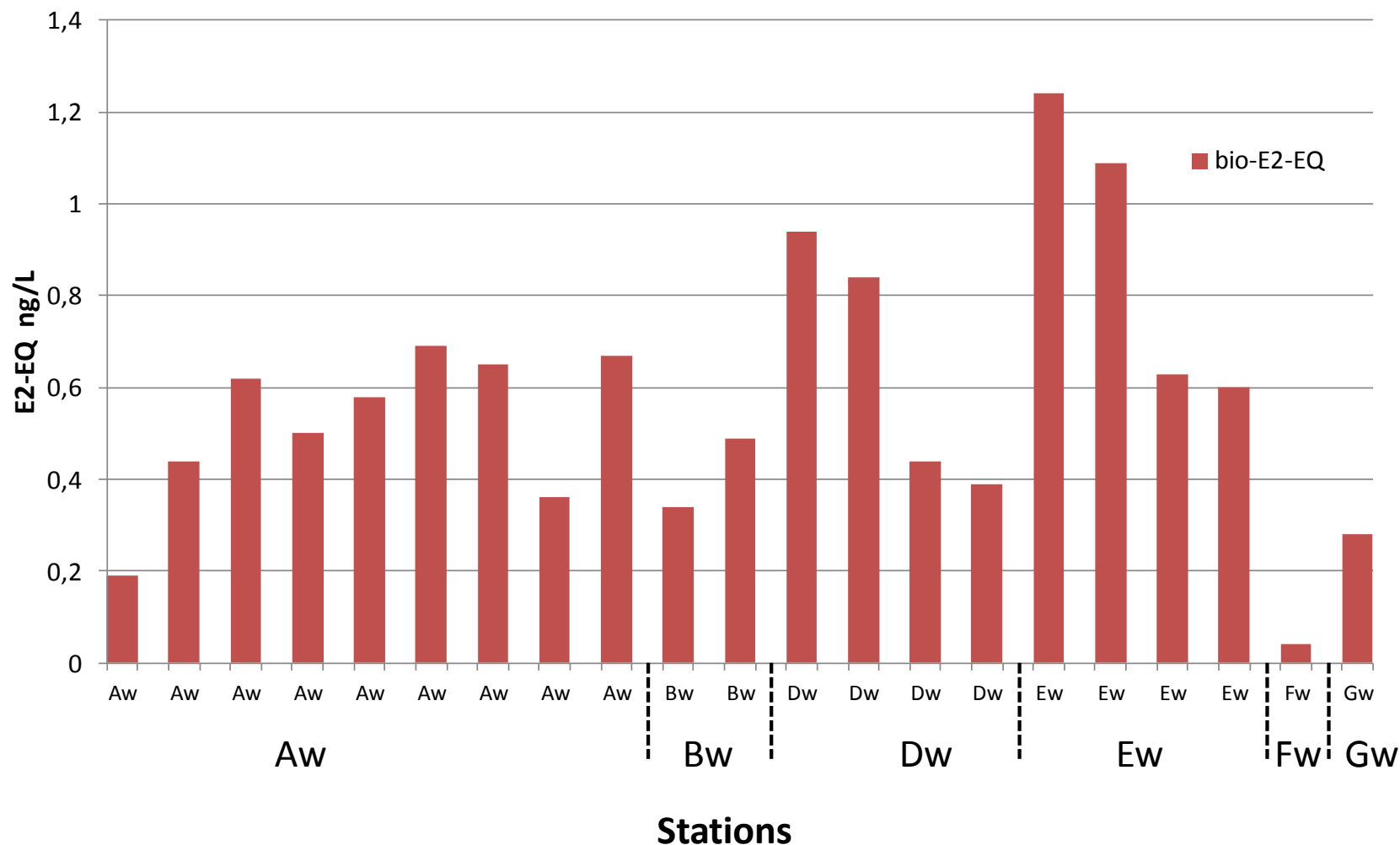


Activités *in vitro* dans les eaux avant traitement complémentaire

6 STEU,
21 eaux
analysées

Activités	Présence	Fréquence	Concentrations
Estrogénique	++	100 % (21/21)	E2-Eq : 0.1-1 ng/L
Glucocorticoïde	+/-	15% (3/21)	Dexa-Eq : 0.5 – 1 µg/L
Androgénique	+/-	9% (2/21)	DHT-Eq : 4 -14 ng/L
Anti-androgénique	+/-	4 % (1/21)	Fluta-Eq : 55 µg/L
(Anti)Thyroïdienne	-	0%	non détecté
HAP-like	+	57 % (12/21)	BaP-Eq : 0.02 – 1 µg /L
Dioxin-like	-	0 %	non détecté
Genotoxicité (SOS)	+	60% (13/21)	non applicable

Activité estrogénique des eaux avant traitement complémentaire



Contribution des hormones, alkylphénols et bisphénol A analysés dans les eaux

Substances	E2-EF
17β-estradiol	1
Ethinylestradiol	0,93
Estrone	0,02
17 α -Estradiol	0,02
Estriol	0,17
4-NP mélange isomères	5,E-05
4-Nonylphénoxyacetic acid	4,10E-07
4-tert-octylphénol	1,10E-04
4 tert-butylphénol	1,20E-06
Bisphenol A	4,50E-05

Analyses
chimiques

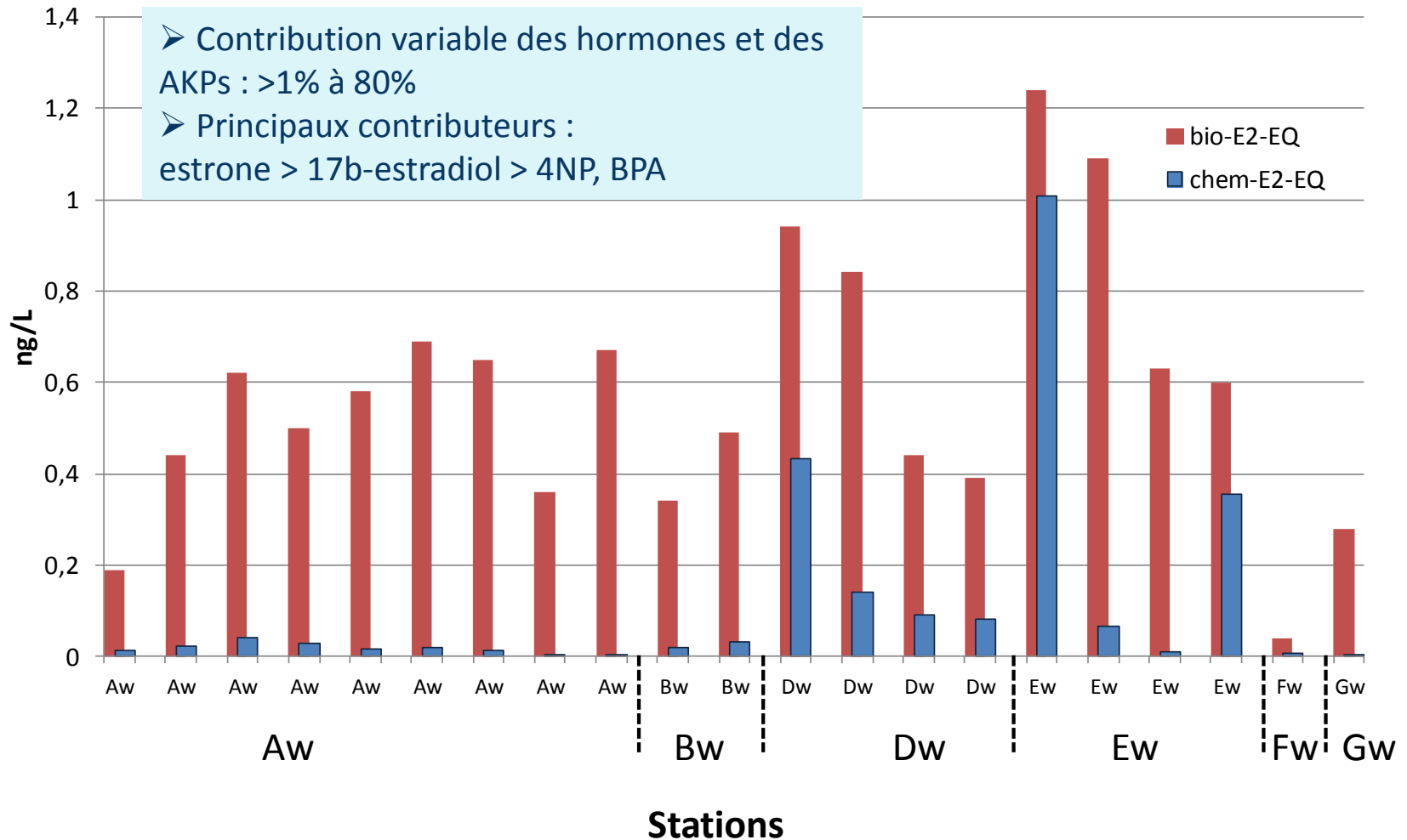


$$\text{Chem-E2-EQ} = \sum (C_i \times \text{E2-EF}_i)$$

Contribution des hormones, alkylphénols et bisphénol A analysés dans les eaux

		Exemple : STEU Dw	
Substances	E2-EF	Conc. (ng/L)	Chem-E2-Eq (ng/L)
17β-estradiol	1	nd	-
Ethinylestradiol	0,93	nd	-
Estrone	0,02	4,9	0,10
17α-Estradiol	0,02	nd	-
Estriol	0,17	1,9	0,32
4-NP mélange isomères	5,E-05	112	0,006
4-Nonylphénoxyacetic acid	4,10E-07	16	0,002
4-tert-octylphénol	1,10E-04	30	0,00004
4 tert-butylphénol	1,20E-06	150	0,007
Bisphenol A	4,50E-05	845	0,0003
		Σ = 0,43 ng/L	
		Bio-E2-Eq =	0,94 ng/L
		% Chimie / Bioessai	46 %

Contribution des hormones, alkylphénols et bisphénol A analysés dans les eaux



In vitro vs. analyses chimiques ciblées: autres activités

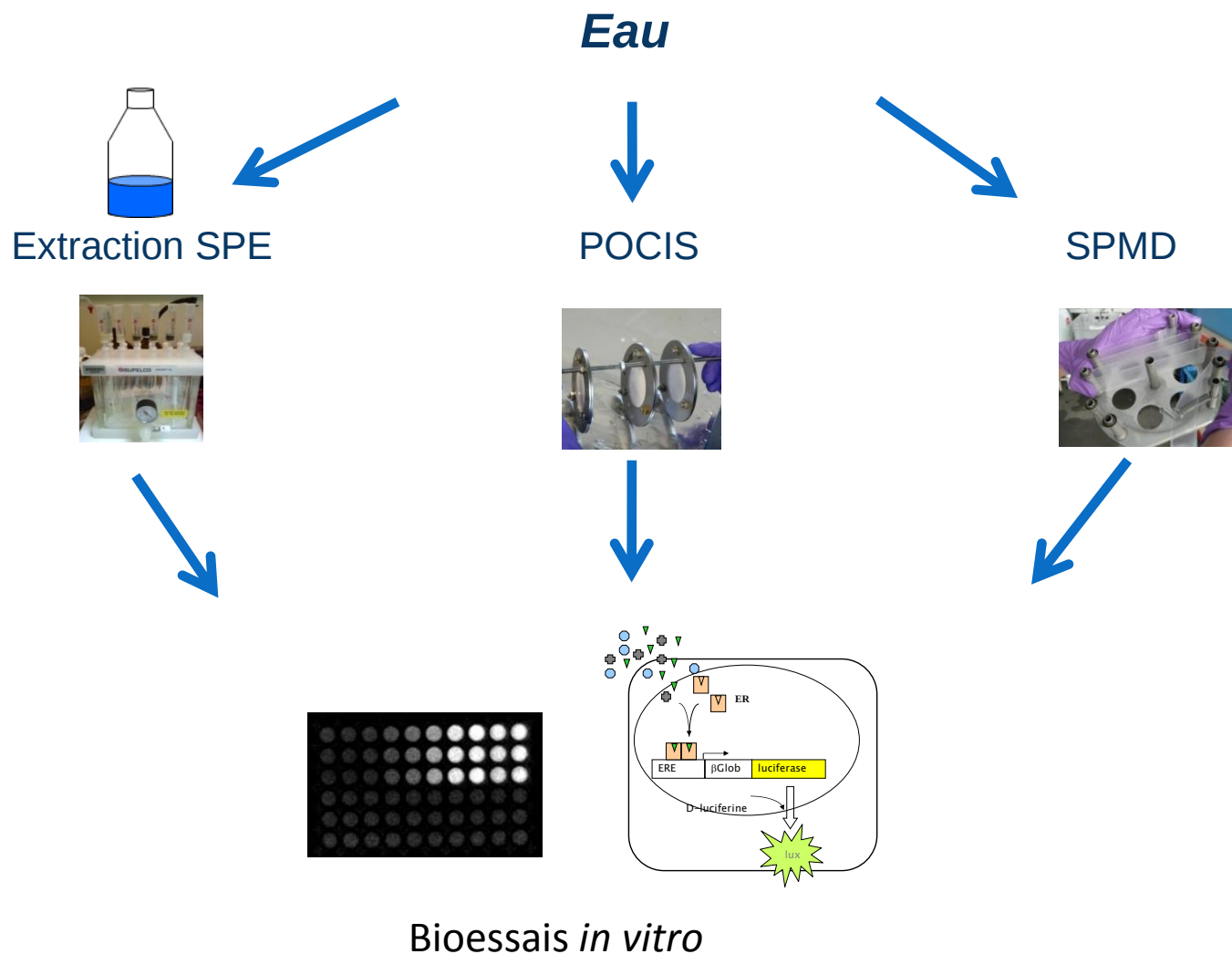
- Activité anti-androgénique (1 échantillon): **contribution faible** des AKP (< 1 %)
- **Pas de données d'analyses ciblées** de polluants connus pour être actifs dans les bioessais : GR, AR, TR



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



Eaux vs. échantillonneurs passifs



Eaux vs. échantillonneurs passifs

3 STEU : Aw, Dw, Ew



Activités	Eau	POCIS	SPMD
Estrogénique	+	++	+/-
Glucocorticoïde	+/-	+	-
Androgénique	+/-	+	-
HAP-like	+	+/-	++
Anti-Androgénique	-	-	+
Thyroïdienne	-	-	+ (1 éch)
Anti-Thyroïdienne	-	-	-
Genotoxicité (SOS)	+	Non mesuré	Non mesuré

➤ Cohérence avec polarité des polluants, e.g. hormones / POCIS, HAP / SPMD

➤ Apport des échantillonneurs passifs : concentrer / révéler activités non détectées en SPE

Effet des procédés de traitements complémentaires

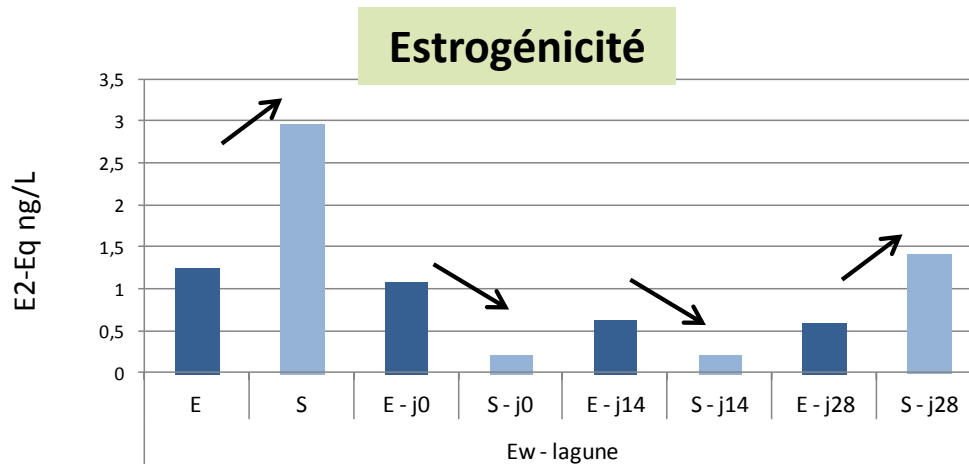
	Aw						Bw				Dw			
	O ₃ + CAG		O ₃ + H ₂ O ₂		UV + H ₂ O ₂		O ₃ + H ₂ O ₂		UV + H ₂ O ₂		Adsorbants alternatifs			
	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S	E	S CAG	S argile	S zéolite
Estrogénique	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+
Androgénique	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucocorticoïde	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PAH-like	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-
Génotoxicité directe	++	+	-	-	++	++	++	-	-	-	++	-	-	++
Génotoxicité indirecte	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	++

Une diminution de l'effet après traitement

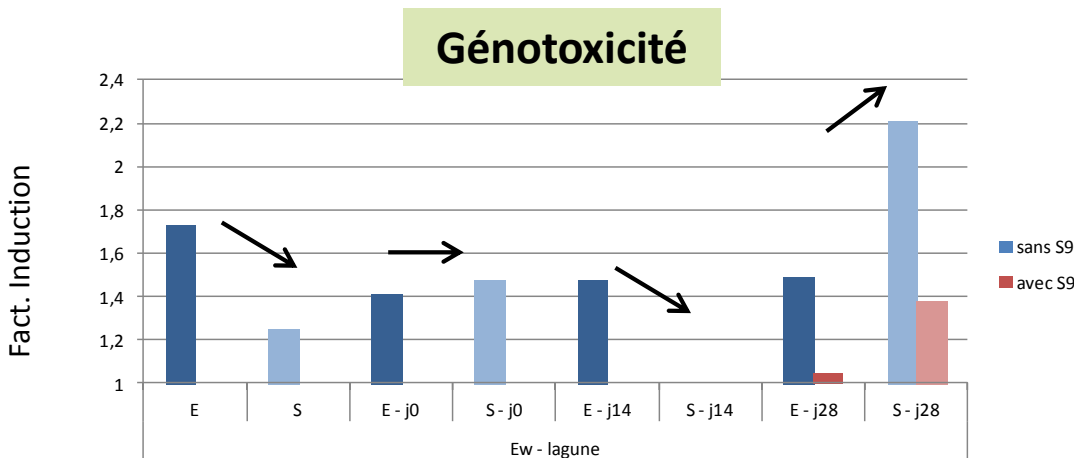
Pas de diminution de l'effet après traitement

- : en dessous des seuils de détection, impossible de conclure sur l'efficacité

Effet de la lagune de finition



Activités œstrogénique et génotoxique : variation aléatoire en sortie de lagune de finition



Résultats à vérifier au regard des temps de séjour

Cohérence avec chimie ciblée (cf. Capdeville)

Eaux : conclusions

Profils d'activités

Fréquente: œstrogénique, génotoxiques et HAP-like

Parfois : glucocorticoïdes, androgénique

Jamais détectées : (anti)TR, dioxin-like

Intérêt des échantillonneurs passifs pour concentrer et révéler des activités (GR, AR)

Procédés de traitement globalement efficaces pour abattre ces activités (résultats à approfondir pour la lagune de finition)



Comprendre le monde,
construire l'avenir®



maîtriser le risque
pour un développement durable



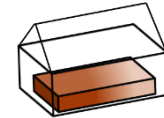
Evaluation des boues



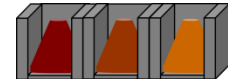
3 Boues de STEU

3 procédés de traitement

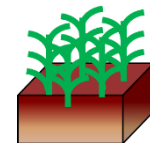
- Séchage solaire



- Compostage



- Lit de séchage planté de roseaux



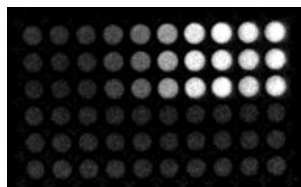
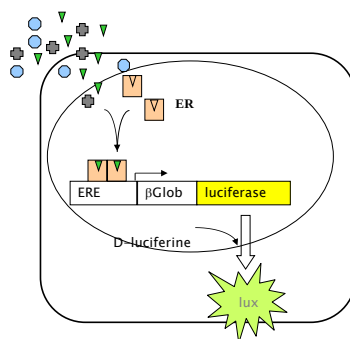
Protocole de bioanalyse des boues



Extraction ASE
(AcE / DCM / CH)

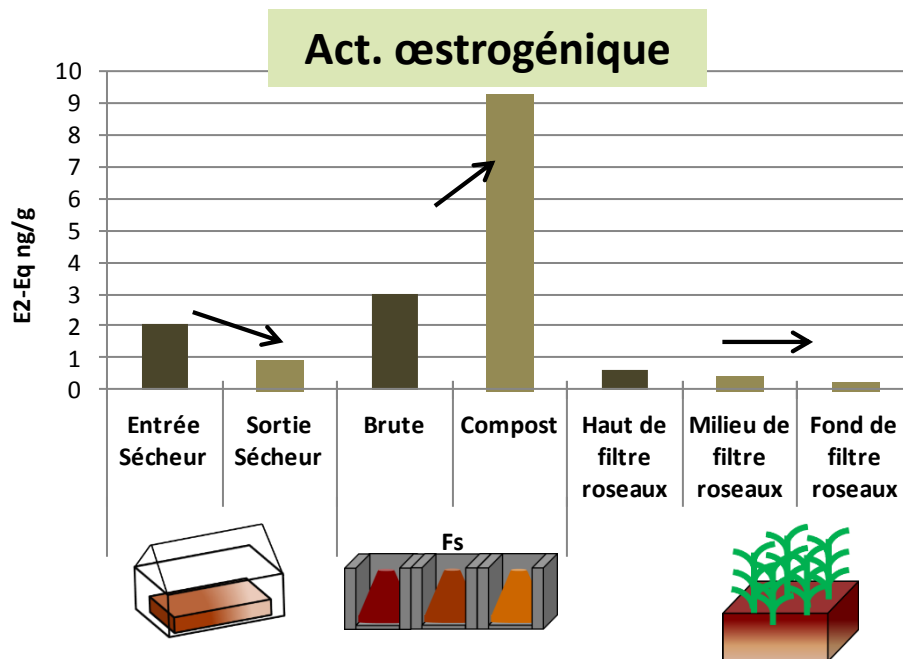


Extrait
organique
(DMSO)



Bioessais *in vitro*

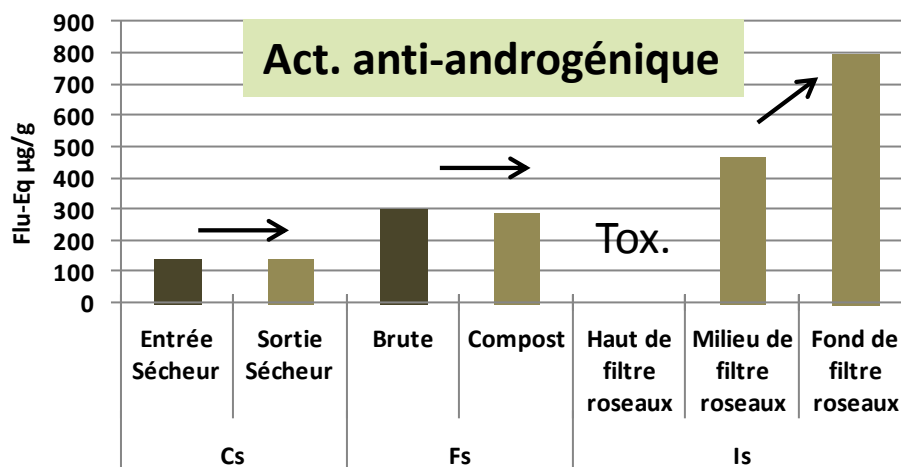
Boues : activités PE



- Fortes activités
estrogénique (ER) et
anti-androgénique (anti-AR)

- Pas d'activité AR, GR et TR détectable

- **Traitements peu efficaces** pour abattre les activités

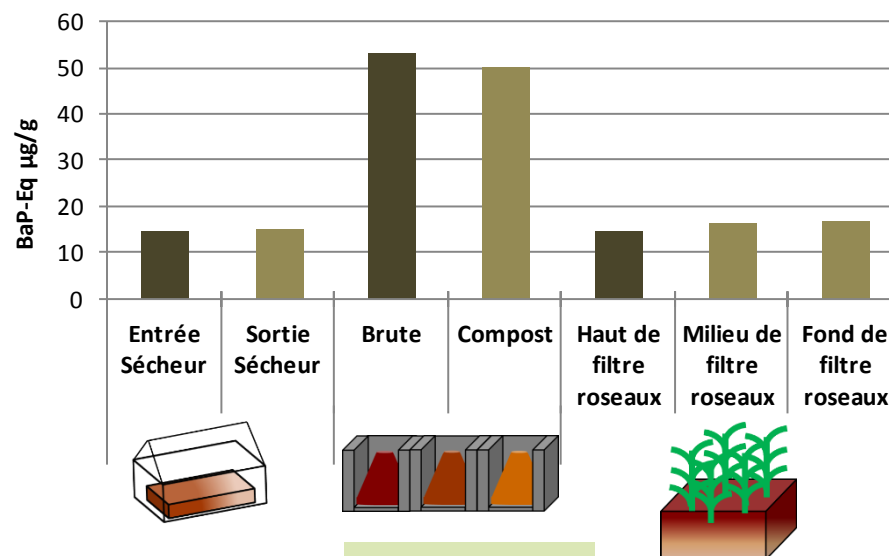


Boues : activités dioxin-like

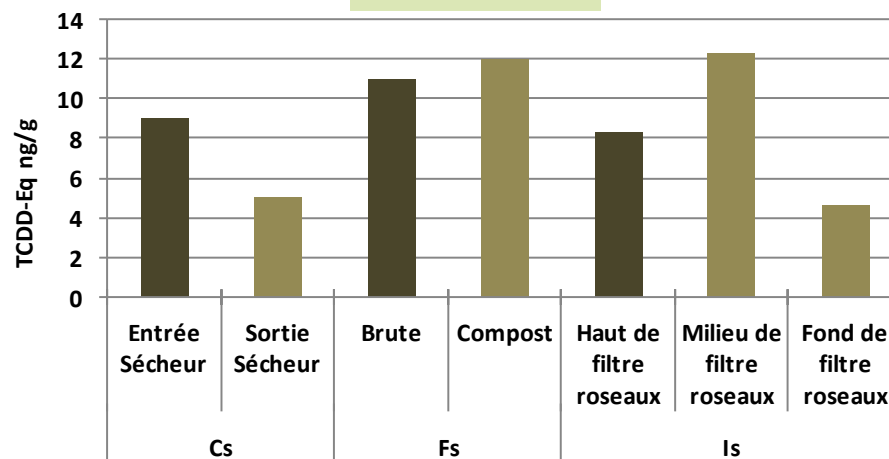
- Importantes activités HAP-like et dioxin-like en entrée et sortie

- Procédés de traitements inefficaces pour abattre les activités

HAP-like



Dioxin-like



Boues : conclusions

Profils d'activités marqués

Fortes activités œstrogénique, anti-androgénique et dioxin-like
Autres activités non détectées

Procédés de traitement pas ou peu efficaces pour abattre ces activités

Certains verrous méthodologiques

- interférence matricielle (e.g. ac humiques) : cytotoxicité, « quenching »
- SOS Chromotest : problèmes de blancs positifs (données génotox ininterprétables)
- ➔ Améliorer la préparation d'échantillon (clean-up) pour une meilleure comparaison chimie ciblée / bioessais in vitro

Bilan sur la compartimentation des activités *in vitro*

Activités	Eaux	POCIS	SPMD	Boues
Estrogénique	+	++	+/-	+
Glucocorticoïde	+/-	+	-	-
Androgénique	+/-	+	-	-
Anti-Androgénique	+/-	-	+	++
Thyroïdienne	-	-	+/-	-
HAP-like	+	+/-	+	++
Dioxin-like	-	-	-	++
Genotoxicité (SOS)	+	Non mesuré	Non mesuré	(+)

Conclusions

Apports des bioessais *in vitro* basés sur le mécanisme d'action

- ✓ Outils de screening sensibles et quantitatifs
- ✓ Profils d'activité (e.g. eaux vs boues)
- ✓ Intérêt du couplage bioessais / échantillonneurs passifs (concentration, répartition)
- ✓ Informations complémentaires à l'analyse chimique ciblée
- Identité des molécules détectées ?
 - ➔ Cf. *Approche EDA* (présentation de Nicolas Creusot)
 - ➔ **Meilleur diagnostic de danger**
 - ➔ **Surveillance de sites, optimisation et suivi de procédés**

Besoins / Développements

- **Batterie de tests:** autres « endpoints » à considérer
 - *Projet ANR-PROOFS (progestagènes)*
 - *Projet UE-FP7-SOLUTIONS (batterie large de bioessais)*
- **Standardisation/Normalisation des méthodes**
 - *AQUAREF (activité estrogénique)*
 - *Etudes inter-labos (réseau NORMAN; SPI-Effect-based tools/ R. Käse, Eawag)*
 - *Norme ISO en cours (activité estrogénique)*
- **Signification des TEQ en terme de danger ?**

Perturbateurs endocriniens : intégration de modèles *in vivo*
Vers des valeurs seuils *in vitro* ?



Merci de votre attention

