Caractérisation de la contamination du milieu aquatique par les perturbateurs endocriniens par une approche combinant tests biologiques *in vitro* et méthodes physico-chimiques d'analyse

Nicolas CREUSOT - nicolas.creusot@ineris.fr

Directeur de thèse : Hélène **BUDZINSKI** - Laboratoire de Physico- et ToxicoChimie (ISM) - Université Bordeaux-1

Thèse suivie à l'INERIS par Selim **AIT AISSA**, Direction des Risques Chroniques – Pôle Dangers et impact sur le vivant - Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*

Contexte

En raison des dangers que les perturbateurs endocriniens (PEs) représentent pour l'homme et les écosystèmes (i.e. cancers hormonaux dépendants, altération du développement et de la reproduction…), la caractérisation de l'état de contamination des milieux aquatiques par ces substances est devenu un enjeu de recherche important, tant méthodologique, avec la mise en place et la validation de nouvelles stratégies bio-analytiques d'identification des composés toxiques dans des matrices environnementales, que dans l'évaluation du risque pour les populations exposées, notamment vis-à-vis des polluants émergents (i.e. substances pharmaceutiques…). Parmi les approches employées, l'approche dite bio-analytique utilisant des bioessais qui permettent la biodétection des PE sur la base de leur mécanisme d'action toxique intracellulaire, apparaît particulièrement adaptée au cas des PE. Ils permettent notamment une évaluation (semi)quantitative de la contamination à travers la détermination de TEQ (Toxic Equivalent) au sein d'échantillons environnementaux. Cependant, utilisés seuls, ces tests ne permettent pas d'identifier les composés responsables des effets mesurés. Par conséquent, ces bioessais *in vitro* tendent à être intégrés dans des stratégies bio/analytique plus globales, par couplage avec des méthodes physico-chimique d'analyse.

Objectifs

Notre travail s'inscrit dans une optique de caractérisation de la contamination chimique du milieu aquatique par les PEs à travers la mise en place d'une stratégie bio-analytique intégrant différents outils biologiques et analytiques. Notre démarche globale s'articule autour de 3 axes : **1)** le développement et/ou l'amélioration d'outils *in vitro* pour la détection des PEs ; **2)** l'étude de la compartimentation des contaminants présents dans les milieux aquatiques ainsi que leur biodisponibilité pour les organismes exposés ; **3)** l'identification des PEs, connus ou inconnus, responsables des activités mesurées.

Avancement des travaux

Axe I -Bioessais in vitro utilisés dans nos travaux

Par le passé, les tests utilisés au laboratoire permettaient la détection de composés à activité oestrogénique, (anti)-androgénique et dioxin like dans les matrices environnementales. De manière à élargir notre capacité de diagnostic de contamination par les PEs, nous avons développé des outils (CYP3A et hPXR) permettant la détection de polluants émergents tels que les substances pharmaceutiques et les pesticides. Ces développements ont consisté en un sreening d'un grand nombre de ce type de molécule sur nos modèles cellulaires **(Creusot et al., 2009a, 2009b, 2010)**.

Concernant la mesure du CYP3A les résultats ont permis de confirmer certaines hypothèses, notamment sur la régulation du CYP3A par le AhR et l'interaction de nombreuses voies de signalisation dans cette régulation. Nos résultats ont aussi confirmé qu'il n'était pas possible, pour l'activité du CYP3A, d'extrapoler du système poisson au système mammifère et même d'une espèce de poisson à une autre. Enfin, il semble que la mesure de l'activité du CYP3A puisse être employée en alternative à la mesure de l'activité EROD, non détectable chez certaines lignées cellulaire, pour la détection de composés dioxin-like.

Parmis les outils développés, la lignée HG5LN-hPXR caractérisée comme activable par des PEs émergents, a été intégrée à notre batterie de biodétecteurs et a permis la détection de PEs émergents dans du sédiment **(Kinani et al., 2010)**, des extraits d'eaux de surface et des effluents de station d'épuration (i.e. urbaine et industrielle) **(Creusot et al., 2010, Tapie et al., accepté).** Le calcul de TEQ s'est avéré être un bon bio-traceur de la contamination.

Ainsi notre batterie actuelle de tests *in vitro* permet de couvrir une large gamme de composés présentant des activités très variées. Cependant il convient en amont de disposer de techniques d'échantillonnage et d'extraction qui permettent d'isoler ces composés de nature, de structure et propriété physico-chimique (Log Kow, PKa…) très variées. Cette problématique est abordée dans l'axe II.

Axe II- Méthodes physico-chimiques

Les eaux de surface

Les préleveurs passifs (e.g. Polar Organic Compound Integrative Sampler (POCIS) et Semi PermeableMembrane Device (SPMD)) permettent de pré-concentrer les contaminants sur de longues périodes d'échantillonnage et de donner une mesure intégrée du niveau de contamination sur cette période. Les POCIS ont la capacité de capturer sélectivement des molécules hydrophyles de type pesticides, stéroïdes et composés pharmaceutiques. Le couplage entre ces capteurs et nos tests *in-vitro* a été évalué sur plusieurs sites d'études, choisis pour leur source de contamination potentielle (Creusot et al, 2010, Tapie et al, accepté). Ce couplage a notamment permis la détection de PEs émergents à très forte activités (i.e. hPXR et GR) à proximité d'une usine pharmaceutique et donc de confirmer la source de contamination (Creusot et al, SETAC meeting, 2010).

Le sédiment

Concernant l'extraction de matrice solide (i.e. sédiment et poisson), il existe un besoin de valider une méthode permettant d'extraire rapidement une large gamme de composés. L'*Accelerated Solvant Extractor* (**ASE**), basé sur une extraction à haute température et haute pression, a été choisi pour réaliser ce développement méthodologique. En parallèle du rendement chimique classique, il nous a paru intéressant d'établir un rendement biologique d'extraction. Cependant, les extraits sont des mélanges complexes et les activités biologiques mesurées sont le fruit d'interactions de molécules entre elle et vis à vis des voies de signalisation (additivité, synergisme, antagonisme). En conséquence, un mélange d'une douzaine de molécules actives couvrant un large spectre de polarité (2<log Kow<8) a été préparé et utilisé pour doper du sédiment artificiel. Les performances d'extraction de différents solvants ont été évaluées biologiquement et chimiquement pour les PEs présents naturellement dans des échantillons de sédiment d'un site atelier (choisi car présentant de multiple activités PE) et sur du sédiment artificiel dopé par un mélange défini. Les résultats des analyses chimiques sont en cours de traitements ; les premiers résultats biologiques semblent indiquer que l'extraction par des mélanges de type méthanol/dichlorométhane est la plus adaptée à l'extraction d'une large gamme de PEs.
Les développements décrits dans l'axe I et l'axe II étant en cours de finalisation, la suite de la thèse sera consacrée au troisième axe de notre stratégie.

Axe III-L'identification des PEs

Pour identifier les composés responsables des activités mesurées, les extraits bruts (sédiment, POCIS…) seront soumis à un fractionnement de manière à réduire la complexité du mélange d'origine. Ce type de fractionnement permettra d'isoler progressivement, à l'aide des tests *in vitro*, les fractions actives et donc les composés d'intérêts. Dans le cadre de cette thèse, les développements porteront sur un pré-fractionnement (i.e. 4-5 fractions) par Solid Phase Extraction (**SPE,** phase silice et C18) suivi d'un hyperfractionnement sur chromatographie liquide haute performance (**HPLC,** phase NH2 et C18).

Conclusions

L'ensemble de ces résultats témoigne de l'intérêt d'utiliser nos modèles cellulaires en première approche comme biotraceur de la contamination, permettant d'orienter ensuite les analyses chimiques. Ils montrent aussi la nécessité de s'intéresser aux polluants émergents ainsi qu'à d'autres voies de signalisation. Enfin, certaines des études réalisées traduisent la nécessité de suivre la contamination dans l'ensemble des compartiments, de manière à pouvoir mieux appréhender les sources et le devenir potentiels des contaminants dans les milieux aquatiques.

Communications et Publications

CREUSOT N., TAPIE N., LEMACH K., BALAGUER P., MAILLOT-MARÉCHAL E., PORCHER J.-M., BUDZINKI H., AÏT-AÏSSA S. Abstract book of the 20th European SETAC,37-27 Mai 2010, Seville. [Communication orale]

CREUSOT N., TAPIE N., DÉVIER M.H., PORCHER J.M, BUDZINSKI H AND AÏT AÏSSA S. Recueil des résumés du colloque Adebiotech, eau et polluants émergents, 20 – 22 Octobre 2009 [poster]

CREUSOT N., KINANI S., PORCHER J.M., BALAGUER P., TAPIE N., BUDZINSKI H., AÏT-AÏSSA S. Abstract book of the 15th PRIMO, 17-20 Mai 2009, Bordeaux. [Poster]

TAPIE N., DEVIER M.H., SOULIER C., **CREUSOT** N., LE MENACH K. AÏT-AÏSSA S., VRANA B., BUDZINSKI H. Acceptée *à Water Science and Technology*

CREUSOT N., KINANI S., BALAGUER P., TAPIE N., LEMENACH K., MAILLOT-MARÉCHAL E., PORCHER J.-M., BUDZINSKI H., AÏT-AÏSSA S. *Anal Bioanal Chem* **396**, 2 (2010) 569-83

KINANI S, BOUCHONNET S, **CREUSOT N**, BOURCIER S, BALAGUER P, PORCHER JM, AÏT-AÏSSA S. *Environmental Pollution* **158**, 1 (2010) 74-83