

NOTE D'AVANCEMENT

Mise en place du bioessai FITC-T4 pour la bio-détection de composés perturbateurs thyroïdiens, dont certains PFAS

Avril 2025

Cette note a pour objectif de décrire l'avancée des travaux réalisés à l'Ineris en 2024 sur 1) la mise en place à l'Institut d'un bioessai *in vitro* permettant la détection de substances capables d'interagir avec la protéine de transport de la thyroxine (T4, hormone thyroïdienne) et 2) les résultats préliminaires de sa mise en œuvre pour la détection de substances actives, dont de nombreuses substances per- et poly-fluoroalkylées (PFAS), dans des matrices environnementales.

Contexte et objectifs

Les substances per- et poly-fluoroalkylées (PFAS) constituent un groupe de polluants organiques largement répandus dans l'environnement (Panieri et al., 2022). Ces composés se distinguent par des propriétés uniques, notamment une forte hydrophobicité, une acidité élevée et une remarquable résistance à la chaleur et à la dégradation chimique. Ces propriétés physico-chimiques en font des polluants très persistants et pour certains très mobiles, notamment dans l'environnement aquatique par exemple. Les PFAS incluent potentiellement des milliers de molécules dont seule une partie ne peut raisonnablement être surveillée par analyses chimiques ciblées. Un des défis actuels dans la surveillance environnementale de ces polluants est donc de disposer de méthodes plus intégratives et complémentaires des analyses ciblant uniquement des polluants prioritaires. Les outils basés sur le mode d'action biologique des polluants, comme les bioessais *in vitro*, peuvent prétendre apporter ces informations complémentaires, comme cela a été démontré pour d'autres familles de perturbateurs endocriniens (e.g. composés oestrogéniques) ou des composés dioxine-like ([Note Ineris sur les méthodes bio-analytiques](#)).

L'exposition aux PFAS est associée à de nombreux effets néfastes sur la santé, notamment une toxicité hépatique, des perturbations du système immunitaire, certains types de cancers, ainsi que des altérations de la reproduction et du développement (Hamers et al., 2020; Panieri et al., 2022; Schrenk et al., 2020). Les PFAS peuvent également perturber le système endocrinien,

en particulier le système thyroïdien (TH), de par leur capacité à se fixer aux principales protéines de transport de la thyroxine (T4), telles que la transthyréline (TTR), la globuline liant la thyroxine (TBG) ou l'albumine (ALB), et à perturber le transport de cette hormone vers les organes cibles (Hamers et al., 2020).

Sur la base de ce mode d'action moléculaire (i.e. capacité d'interaction avec la protéine TTR), des tests *in vitro* ont été très récemment développés, comme le test cellulaire PFAS-CALUX (Collet et al., 2020) ou le test acellulaire FITC-T4 (Hamers et al., 2020). Ces bioessais sont des outils de criblage performants et pertinents pour caractériser le mode d'action endocrinien des substances individuelles (Carlier et al., 2024; Hamers et al., 2020; Shen et al., 2024). Leur application pour détecter la présence de substances actives au sein de matrices environnementales complexes comme des eaux de surface a été récemment démontrée (Mikušová et al., 2024; Šauer et al., 2024). Des travaux récents comparant les test PFAS-CALUX et FITC-T4 à des analyses chimiques ciblant 20 PFAS ont montré l'intérêt des bioessais pour détecter les molécules ciblées et aussi révéler la présence d'autres molécules « PFAS-like » non ciblées par la chimie (de Schepper et al., 2023).

Dans le cadre du plan interministériel sur les PFAS, des travaux ont été lancés en 2024 visant à mettre en place à l'Ineris le bioessai FITC-T4 et à évaluer son application à la bioanalyse d'échantillons complexes en vue de son intégration dans les programmes de surveillance environnementale menés par l'Institut.

Principe du test FITC-T4

Dans son principe, cet essai repose sur l'utilisation d'une sonde fluorescente (FITC-T4), un composé synthétique combinant la T4 avec un marqueur fluorescent (FITC), pour mesurer et quantifier le déplacement de la T4 de la TTR par une substance ou un échantillon test (Figure 1). L'intensité de la fluorescence reflète la proportion de FITC-T4 lié à la TTR. Lorsque le FITC-T4 est lié à la TTR, la fluorescence est maximale. Une diminution de la fluorescence indique que le FITC-T4 a été déplacé de la TTR, par exemple, par la présence d'une substance active (les PFAS par exemple).

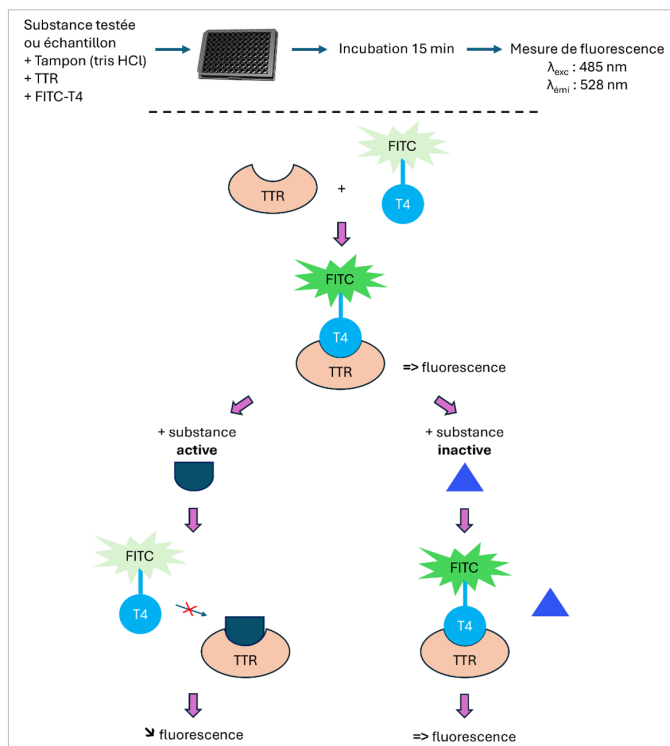


Figure 1 /
Schéma du principe du test de liaison du FITC-T4 à la protéine TTR.

Mise en place du bioessai à l'Ineris

Une collaboration a été mise en place en 2024 avec l'équipe de Marja Lamoree et Timo Hamers (université libre d'Amsterdam), responsables du laboratoire de Chimie pour l'Environnement et la Santé où a été développé le test. Cette équipe a établi une procédure opératoire standardisée (SOP) pour le bioessai FITC-T4, laquelle a été évaluée dans le cadre du réseau EU-NET-VAL (méthode TM2019-09) et est en cours de pré-validation dans la plateforme de PEPPER. Cette SOP a servi de base au démarrage de nos travaux.

En mai 2024, un scientifique de l'Ineris a suivi une formation d'une semaine à l'université libre d'Amsterdam, en vue du transfert du bioessai FITC-T4 dans notre laboratoire. A l'Ineris, le travail a d'abord consisté à reproduire la SOP et à la valider avec des substances de références (ci-dessous). Par ailleurs, un effort particulier a été consacré

à optimiser la mise en œuvre, notamment grâce à l'automatisation d'une partie du protocole (pipetage) à l'aide du robot Evo150 (TECAN), dans le but de réduire le temps d'exécution, améliorer la variabilité observée et *in fine* optimiser la capacité de criblage.

Effets de substances de référence

Pour valider la bonne mise en place du bioessai FITC-T4 dans nos conditions de laboratoire, nous avons évalué la réponse de ce bioessai à trois substances chimiques modèles : la thyroxine (T4), le tétrabromobisphénol A (TBBPA) et l'acide perfluorooctanoïque (PFOA). Chaque substance a été testée plusieurs fois de façon indépendante ($n=4$ à 12 selon les substances), par des opérateurs différents (3) et à des dates différentes, ce qui a permis une première appréciation de la variabilité intra-essai (réalisés le même jour), inter-essai (réalisés à différents jours) et inter-opérateurs.

Comme illustré dans la Figure 2, les trois substances testées ont produit une réponse positive dans le bioessai FITC-T4, générant une courbe concentration-réponse complète et montrant leur capacité à se lier à la TTR. Sur la base de ces courbes, le calcul des IC_{50} (concentration en substance induisant 50 % de liaison à la TTR) ont été déterminées (Figure 3) : 63 ± 12 nM pour la T4, 34 ± 6 nM pour le TBBPA et 544 ± 53 nM pour le PFOA. On note une relativement faible variabilité entre les essais indépendants ce qui laisse pressentir une bonne reproductibilité. Pour la T4, les valeurs d' IC_{50} déterminées sont conformes au critère d'acceptabilité décrit dans la SOP (i.e. doivent être comprises entre 40 et 140 nM). Pour les deux autres substances, les IC_{50} concordaient également avec celles rapportées dans la littérature pour le PFOA (756 nM, de Schepper *et al.*, 2023) et le TBBPA (22 nM, Shen *et al.*, 2024).

Dans l'ensemble, ces résultats démontrent que le bioessai FITC-T4 a été correctement mis en place et est robuste et fiable dans nos conditions de laboratoire.

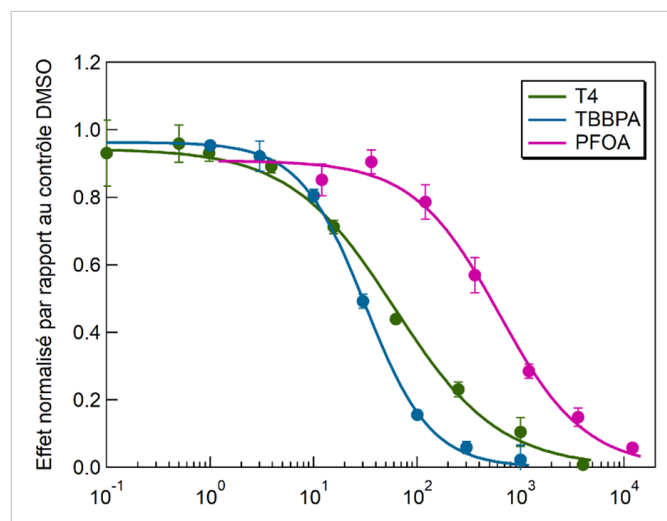


Figure 2 /
Exemples de courbes dose-réponse obtenues pour les trois molécules testées (T4, TBBPA, et PFOA). Les barres représentent l'écart-type des trois réplicats.

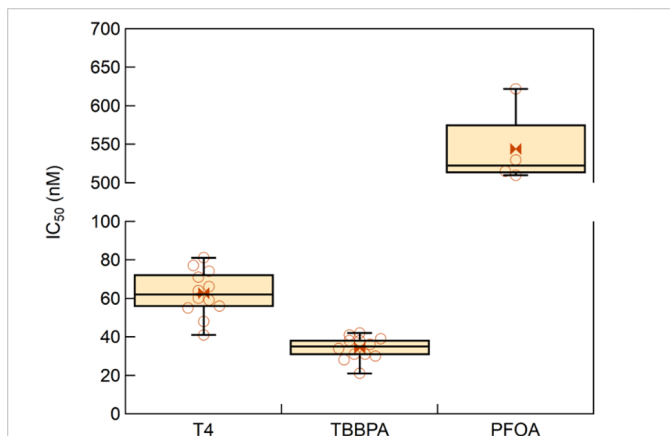


Figure 3 / Détermination indépendante de l'IC₅₀ des trois molécules (T4, TBBPA, et PFOA) évaluées par le bioessai FITC-T4. Les cercles représentent chaque détermination indépendante quel que soit le jour ou l'opérateur (n = 4 à 12).

Analyse de matrices environnementales

Pour évaluer la faisabilité de l'utilisation de ce bioessai pour le criblage d'échantillons environnementaux réels, des échantillons provenant de diverses matrices (eau et sol) ont été testés. Les échantillons sélectionnés (extraits organiques d'eaux de surface et de sol) font partie de la campagne européenne de surveillance des perturbateurs endocriniens menée dans le cadre du [partenariat PARC¹](#).

La Figure 4 présente les courbes dose-réponse obtenus avec les blancs (témoins négatifs) et les échantillons provenant de sites différemment impactés pour des échantillons d'eau (Figure 4A) et des sols (Figure 4B). Les blancs pour les deux matrices ne présentent aucune activité, ce qui atteste de l'absence de contamination extérieure au cours de la manipulation (échantillonnage, transfert et extraction des échantillons), comme attendu. Concernant les extraits d'eaux et de sols, on observe des niveaux d'activité détectables, quantitatifs (dose-réponse) et différents d'un site à l'autre, en accord avec ce que l'on sait des pressions anthropiques présentes.

Ces résultats démontrent que la méthode mise en place est efficace pour tester l'activité TTR d'échantillons environnementaux. Par la suite, ces résultats (courbes dose-réponse) seront utilisés pour estimer les quantités d'équivalents de type PFAS présents dans ces échantillons.

Perspectives

Les travaux menés en 2024 ont vu la mise en place du bioessai FITC-T4 dans nos conditions de laboratoire, et démontré son opérationnalité avec des substances de référence et des échantillons environnementaux (extraits organiques d'eaux et de sols).

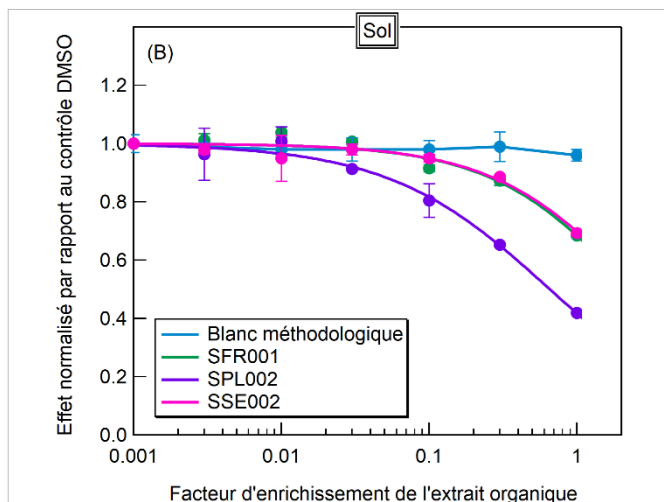
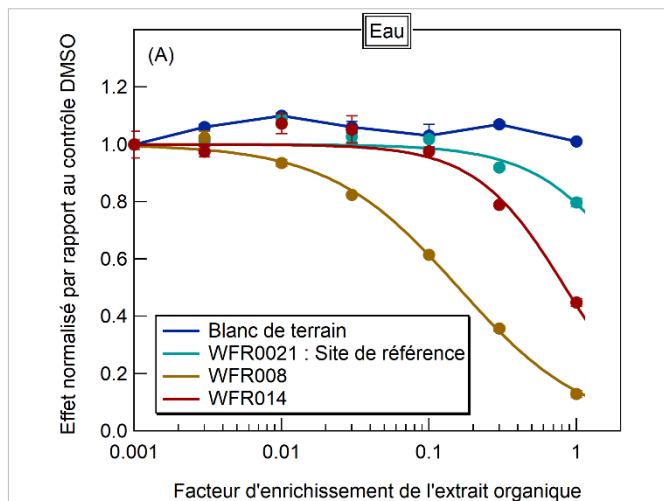


Figure 4 / Exemples de courbes dose-réponse obtenues pour divers échantillons sélectionnés aléatoirement parmi ceux de PARC, pour (A) la matrice eau et (B) la matrice sol. Les barres représentent l'écart-type basé sur deux mesures répliquées.

En 2025, il s'agirait de mettre en œuvre cet outil dans des programmes de surveillance environnementale et d'évaluer sa pertinence et ses limites pour la détection des PFAS dans diverses matrices environnementales.

Plus spécifiquement, il s'agirait :

- / d'éprouver la méthodologie de préparation d'échantillon dédiée aux PFAS, en comparant différentes méthodes d'extraction ;
- / de caractériser plus avant le potentiel activateur TTR de molécules environnementales : cela passerait par un criblage large de substances individuelles, dont de nombreux PFAS pour lesquels il existe un manque d'information ;
- / d'appliquer ce bioessai aux échantillons de la campagne européenne PARC de surveillance des perturbateurs endocriniens dans différentes matrices (eaux, sols, air).

Références bibliographiques

- / Carlier, M.P., Cenijn, P.H., Baygildiev, T., Irwan, J., Escher, S.E., van Duursen, M.B.M., Hamers, T., 2024. Profiling the endocrine-disrupting properties of triazines, triazoles, and short-chain PFAS. *Toxicol. Sci.* kfae131. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfae131>
- / Collet, B., Simon, E., van der Linden, S., el Abdellaoui, N., Naderman, M., Man, H., Middelhof, I., van der Burg, B., Besselink, H., Brouwer, A., 2020. Evaluation of a panel of in vitro methods for assessing thyroid receptor β and transthyretin transporter disrupting activities. *Reprod. Toxicol.* 96, 432–444. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.05.011>
- / de Schepper, J.K.H., van Oorschot, Y., Jaspers, R.J., Hamers, T., Lamoree, M.H., Behnisch, P., Besselink, H., Houtman, C.J., 2023. The contribution of PFAS to thyroid hormone-displacing activity in Dutch waters: A comparison between two in vitro bioassays with chemical analysis. *Environ. Int.* 181, 108256. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108256>
- / Hamers, T., Kortenkamp, A., Scholze, M., Molenaar, D., Cenijn, P.H., Weiss, J.M., 2020. Transthyretin-Binding Activity of Complex Mixtures Representing the Composition of Thyroid-Hormone Disrupting Contaminants in House Dust and Human Serum. *Environ. Health Perspect.* 128, 017015. <https://doi.org/10.1289/EHP5911>
- / Mikušová, P., Toušová, Z., Sehnal, L., Kuta, J., Grabicová, K., Fedorova, G., Marek, M., Grabic, R., Hilscherová, K., 2024. Identification of new endocrine disruptive transthyretin ligands in polluted waters using pull-down assay coupled to non-target mass spectrometry. *J. Hazard. Mater.* 471, 134240. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.134240>
- / Panieri, E., Baralic, K., Djukic-Cosic, D., Buha Djordjevic, A., Saso, L., 2022. PFAS Molecules: A Major Concern for the Human Health and the Environment. *Toxics* 10, 44. <https://doi.org/10.3390/toxics10020044>
- / Šauer, P., Bořík, A., Staňová, A.V., Grabic, R., Kodeš, V., Amankwah, B.K., Kocour Kroupová, H., 2024. Identification of hot spots and co-occurrence patterns of activities on thyroid hormone receptor and transthyretin binding in passive samplers from Czech surface waters. *Environ. Res.* 252, 118891. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2024.118891>
- / Schrenk, D., Bignami, M., Bodin, L., Chipman, J.K., del Mazo, J., Grasl-Kraupp, B., Hogstrand, C., Hoogenboom, L. (Ron), Leblanc, J., Nebbia, C.S., Nielsen, E., Ntzani, E., Petersen, A., Sand, S., Vleminckx, C., Wallace, H., Barregård, L., Ceccatelli, S., Cravedi, J., Halldorsson, T.I., Haug, L.S., Johansson, N., Knutsen, H.K., Rose, M., Roudot, A., Van Loveren, H., Vollmer, G., Mackay, K., Riolo, F., Schwerdtle, T., 2020. Risk to human health related to the presence of perfluoroalkyl substances in food. *EFSA J.* 18, e06223. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6223>
- / Shen, Y., Bovee, T.F.H., Molenaar, D., Weide, Y., Nolles, A., Braucic Mitrovic, C., van Leeuwen, S.P.J., Louisse, J., Hamers, T., 2024. Optimized methods for measuring competitive binding of chemical substances to thyroid hormone distributor proteins transthyretin and thyroxine binding globulin. *Arch. Toxicol.* 98, 3797–3809. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03842-y>

[†] Partenariat européen pour l'évaluation des risques liés aux substances chimiques (PARC)