RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
Liberté Égalité Fraternité

INERIS
maîtriser le risque pour un développement durable

Application du bioessai FITC-T4 comme méthode de détection intégrative de PFAS dans les milieux

Avril 2026

Les substances per- et polyfluoroalkylées (PFAS) constituent une vaste famille de composés organiques fluorés, largement répandus dans l'ensemble des compartiments environnementaux (Panieri *et al.*, 2022). Leur structure chimique unique, caractérisée par une chaîne fortement fluorée associée à des groupements fonctionnels polaires, leur confère des propriétés physico-chimiques remarquables, telles qu'une forte hydrophobicité, une grande résistance mécanique, ainsi qu'une stabilité chimique et thermique exceptionnelle. Ces caractéristiques expliquent leur utilisation massive dans de nombreux secteurs industriels (Gaines, 2023; Paris-Davila *et al.*, 2023; État des lieux des usages des PFAS et alternatives documentées | Ineris), mais sont également à l'origine de leur extrême persistance dans l'environnement, ce qui leur vaut le qualificatif de « polluants éternels ».

Contexte et objectifs

L'exposition aux PFAS est associée à de nombreux effets délétères sur la santé humaine, tels que des atteintes hépatiques, des troubles de la reproduction et du développement, des altérations du système immunitaire, ainsi que certains cancers (Hamers *et al.*, 2020; Panieri *et al.*, 2022; Schrenk *et al.*, 2020). De nombreux PFAS sont également reconnus comme des perturbateurs endocriniens, notamment du système thyroïdien. Un de leurs modes d'action consiste en leur capacité à interagir avec les principales protéines de transport de la thyroxine (T4), telles que la transthyrétine (TTR), la globuline liant la thyroxine (TBG) ou l'albumine (ALB), perturbant ainsi le transport et la biodisponibilité de l'hormone vers ses organes cibles (Hamers *et al.*, 2020).

Les PFAS regroupent potentiellement plusieurs milliers de molécules, dont seule une fraction limitée peut être surveillée par des analyses chimiques ciblées. Si cette approche est essentielle pour quantifier les substances PFAS prioritaires, elle n'informe pas sur la présence de PFAS inconnus, ni sur le danger associé aux effets combinés de ces molécules au sein des mélanges complexes. Ainsi, l'un des principaux défis actuels de leur surveillance environnementale consiste à développer des méthodes plus intégratives et complémentaires à ces approches analytiques centrées sur des substances prioritaires.

Dans ce contexte, l'utilisation d'outils biologiques permet une détection intégrée de l'ensemble des substances actives présentes dans un échantillon complexe. Parmi les outils existants, les bioessais in vitro basés sur le mode d'action toxicologique des polluants sont particulièrement pertinents dans une démarche de bioanalyse environnementale : ils sont sensibles, rapides et permettent une quantification de l'activité globale du mélange en concentration d'équivalents-bioanalytiques (BEQ), fournissant des informations complémentaires aux analyses chimiques quantitatives (cf : Note Ineris sur les méthodes bio-analytiques). La présente étude s'intéresse au bioessai in vitro FITC-T4 TTR, qui permet de mesurer l'interaction des substances avec la protéine TTR, et constitue un outil de criblage performant. Plusieurs études récentes ont montré que différents PFAS sont actifs dans ce test et qu'il présente un fort potentiel pour détecter et quantifier des substances actives de type PFAS dans des matrices environnementales complexes comme des eaux de surface ou des rejets (Carlier *et al.*, 2024; Hamers *et al.*, 2020; Shen *et al.*, 2024).

L'objectif général de nos travaux est de caractériser plus avant les performances de cet outil pour la bioanalyse environnementale des PFAS, 1) en l'appliquant à large échelle dans des programmes de surveillance afin de renforcer nos connaissances sur la présence de subs-

tances actives dans l'environnement, 2) en identifiant l'activité TTR de PFAS retrouvés dans l'environnement et en évaluant leur contribution aux activités globales mesurées dans les milieux. Ce second objectif passera par le criblage de substances individuelles et l'établissement de facteurs d'activité relative (RPF) pour les molécules actives.

En 2024, dans le cadre du plan interministériel sur les PFAS, le bioessai FITC-T4 TTR a été mis en place au laboratoire et son caractère opérationnel a été validé à l'aide de substances de référence ainsi que d'échantillons environnementaux (extraits organiques d'eaux et de sols) (cf : Mise en place du bioessai FITC-T4 pour la bio-détection de composés perturbateurs thyroïdiens, dont certains PFAS | Ineris). Ces premiers travaux ont permis de confirmer la pertinence de cet outil pour la bioanalyse environnementale de matrices complexes. En 2025, l'objectif a été d'appliquer ce bioessai à un criblage à grande échelle portant sur un nombre élevé d'échantillons issus de différentes matrices environnementales (eau, sol et air), collectées dans le cadre de campagnes nationale et européenne. Ces campagnes de surveillance ont été menées dans le cadre de la seconde Stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriniens (SNPE2) et du partenariat européen pour l'évaluation des risques des substances chimiques (HE PARC ; https://www.eu-parc.eu/).

Cette note présente un état d'avancement des travaux et des premiers résultats obtenus.

Méthodologie

La méthode de bioanalyse par le bioessai in vitro consiste en trois étapes clés : 1) préparation de l'échantillon, 2) réalisation du bioessai, et 3) traitement des données.

Préparation des extraits organiques à partir d'échantillons d'eau, d'air et de sols

Des échantillons d'eaux de surface, de sols et d'air ont été collectés dans différents pays européens sur des sites représentatifs de différents types de pression anthropique : contextes urbain, agricole, industriel et sites de référence faiblement contaminés. Un total de 102 échantillons d'eau, 39 de sols et 16 échantillons d'air a ainsi été collecté. En parallèle, des blancs terrain et des blancs laboratoire ont été générés dans une démarche d'assurance et de contrôle de la qualité des analyses réalisées.

La fraction organique de chaque échantillon a été extraite comme suit. L'extraction des échantillons de sols et d'air a été réalisée respectivement par une approche de type QuEChERS («*Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe*») et par extraction Soxhlet. Les extraits organiques ainsi obtenus ont ensuite été analysés par le bioessai FITC-T4 TTR. Les échantillons d'eau de surface ont été préalablement filtrés sur filtres en microfibres de verre (diamètre de pores 0,7 µm), puis extraits sur phase solide par SPE (phase HLB). Chaque extrait ainsi obtenu a été repris par le solvant DMSO afin d'être testé avec le bioessai FITC-T4 TTR.

Bioessai FITC-T4 TTR

Le bioessai FITC-T4 TTR mesure la capacité d'une substance test à se lier à la protéine TTR, en compétition avec l'hormone T4 couplée à la sonde fluorescente FITC (Figure 1). Ce bioessai est réalisé au format microplaque selon la méthode de Hamers et al. (2020), après adaptation sur un automate de multidistribution (robot Evo150).

Pour chaque échantillon, une gamme de concentrations de l'extrait organique est mise en présence de FITC-T4, en présence (test de compétition) ou non (mesure de la fluorescence basale) de la protéine TTR. Chaque plaque contient des contrôles positifs (T4, TBBPA, PFOA) et un contrôle négatif (témoin solvant seul). Après agitation (5 min) suivie d'une incubation (15 min), la fluorescence est mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques équipé d'un filtre d'excitation à 485 nm et d'un filtre d'émission à 528 nm (Figure 1). Pour chaque échantillon, trois répétitions biologiques indépendantes ont été réalisées afin d'assurer la reproductibilité des résultats. En parallèle, des gammes de concentrations de PFOA et de T4 (molécules de référence) sont réalisées, afin de contrôler la sensibilité attendue du test.

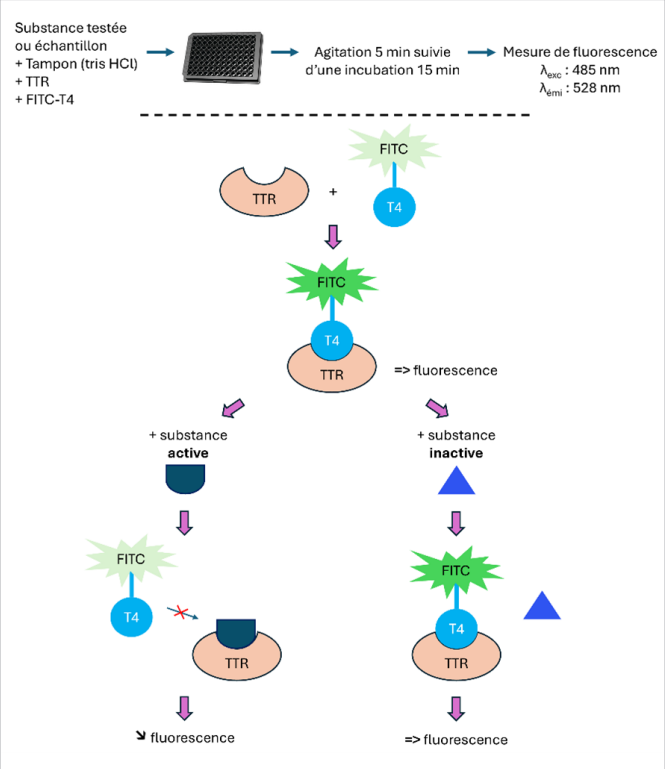

Figure 1 /
Schéma du principe du test de liaison du FITC-T4 à la protéine TTR.

Traitement des données

La Figure 2 présente les différentes étapes de traitement de la donnée, depuis le résultat obtenu pour un échantillon jusqu'à la détermination de sa concentration en PFOA-EQ. Les données de fluorescence obtenues ont été normalisées par rapport au témoin solvant et exprimées en pourcentage selon l'équation 1.

$$RFI = \left(\frac{RFU_{échant\ avec\ TTR} - \overline{RFU}_{échant\ sans\ TTR}}{\overline{RFU}_{CS\ avec\ TTR} - \overline{RFU}_{CS\ sans\ TTR}}\right) \times 100$$

Où :

RFI : intensité relative de fluorescence exprimée en pourcentage

$RFU_{échant\ avec\ TTR}$: intensité de fluorescence pour l'échantillon testé avec TTR

$\overline{RFU}_{échant\ sans\ TTR}$: intensité moyenne de l'échantillon sans TTR

$\overline{RFU}_{CS\ avec\ TTR}$: intensité moyenne du contrôle solvant avec TTR

$\overline{RFU}_{CS\ sans\ TTR}$: intensité moyenne du contrôle solvant sans TTR

Équation 1 /

Cette normalisation a permis de construire des courbes dose-réponse, où l'intensité relative de fluorescence (RFI) est représentée en fonction des concentrations des substances testées (Figure 2A). Ces courbes ont été modélisées à l'aide du modèle de l'équation de Hill, via la macro Excel™ RegTox 7.0.7 (Vindimian *et al.*, 1983), permettant de déterminer la concentration inhibant 10 % de la liaison FITC-T4 TTR (IC_{10}, Figure 2B).
Les valeurs d'IC_{10} de la molécule de référence (PFOA) et d'un échantillon donné sont ensuite utilisées pour déterminer des concentrations d'équivalent-bioanalytiques (BEQ) en équivalents PFOA (PFOA-Eq, µg/L) selon l'équation 2 (Figure 2C).

$$BEQ = \frac{IC_{10PFOA}}{IC_{10échantillon}}$$

Équation 2 /

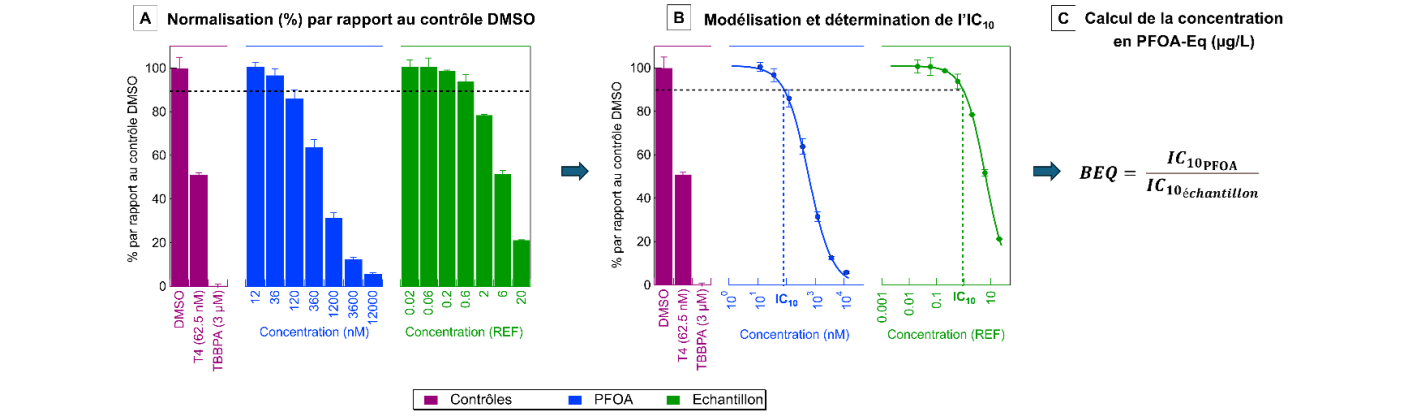

Figure 2 /
Exemple illustrant les différentes étapes de traitement des données brutes pour la molécule de référence (PFOA) (en bleu) et l'échantillon (en vert), permettant de déterminer leurs IC_{10} et de calculer la concentration en équivalents PFOA (PFOA-Eq, µg/L).

Résultats et discussion

Activité TTR *in vitro* des eaux de surface européennes

La Figure 3 présente l'activité d'inhibition de la TTR *in vitro* (exprimées en µg PFOA-Eq/L) mesurée à l'aide du bioessai FITC-T4 TTR dans les 102 échantillons d'eaux de surface décrits en section 2.1, collectés dans différents pays européens (Allemagne, Belgique, Espagne, France, Lettonie, Pologne, Slovénie, Suède).

Une activité a été détectée dans près de 99 % des échantillons, tandis que les blancs terrain, prélevés et traités en parallèle, n'ont montré aucune activité. Ces résultats confirment que les effets observés sont bien imputables aux contaminants organiques présents dans les échantillons environnementaux, et non à une contamination lors de l'échantillonnage, du transport, de l'extraction ou de l'analyse.

La majorité des échantillons ont présenté des valeurs d'activité TTR comprises entre <0.7 et 5 µg PFOA-Eq/L (Figure 3). Ces niveaux d'activité sont du même ordre de grandeur que ceux mesurés dans des eaux de surface aux Pays-Bas ou en République Tchèque (de Schepper *et al.*, 2023; Šauer *et al.*, 2024). Toutefois, trois échantillons, deux en provenance de Belgique et un de France, se distinguent par des concentrations beaucoup plus élevées, atteignant jusqu'à 33 µg PFOA-Eq /L. Ces niveaux de concentrations en PFOA-Eq correspondraient à des sites « hotspots » pour des eaux de surface, selon de Schepper *et al.*, (2023). Ces fortes activités ont été observées sur des sites soumis à des pressions industrielles, qui représentent une source importante pour de nombreux PFAS.
L'application des bioessais *in vitro* en surveillance opérationnelle nécessite de disposer de valeurs seuils ou valeurs de déclenchement (EBT ou Effect-Based Trigger values) au-delà de laquelle un risque pour l'environnement est prédit. Concernant l'activité TTR dans les eaux de surface, Neale *et al.* (2023) ont dérivé une valeur d'EBT de ≈ 6 µg PFOA-Eq /L, développée sur la base de scenarios de risque utilisant les normes de qualité environnementale (NQE) de composés détectés par ce test, dont des PFAS. Dans notre étude, 21 sites sur les 102 analysés présentent des valeurs supérieures à cette EBT (Figure 3). En priorité pour ces sites, des investigations complémentaires soent à envisager afin d'identifier la nature et la source des molécules responsables des activités, pour le cas échéant proposer des mesures de réduction de leur rejet.

Activités TTR dans les échantillons de sol

La Figure 4 présente les résultats du bioessai FITC-T4 TTR obtenus à partir de l'analyse de 39 échantillons de sols collectés sur différents sites européens. Les blancs procéduraux extraits en parallèle se sont révélés inactifs, confirmant que l'activité observée provient bien de la matrice sol elle-même et non d'une contamination lors du processus d'extraction. Contrairement aux échantillons d'eaux de surface, pour lesquels une activité TTR a été détectée dans près de 99 % des cas, une plus forte proportion d'échantillons de sols (15/39) se sont révélés inactifs. Parmi les échantillons actifs, l'activité mesurée reste généralement faible, se traduisant le plus souvent par des courbes dose-réponse partielles. Toutefois, il s'agit de la première application du bioessai FITC-T4 TTR à des échantillons de sol et, à notre connaissance, aucune valeur de référence n'est actuellement disponible dans la littérature scientifique pour comparer ces résultats. Néanmoins, ces observations suggèrent que ces échantillons de sols présentent effectivement de faibles niveaux de contamination par des composés de type PFAS. Des analyses ciblant certains PFAS sont en cours dans le cadre du projet PARC et pourront venir confirmer ou infirmer cette hypothèse. Ces résultats, qui mettent en évidence la présence de substances actives sur TTR dans les sols, soulignent la nécessité d'approfondir notre connaissance de leur nature chimique ainsi que de définir des valeurs seuils adaptées à cette matrice.

Activités TTR dans les échantillons de particules d'air ambiant

La Figure 5 présente les résultats d'activité TTR mesurée dans des particules d'air ambiant (PM ou particulate matter) prélevées à 16 différents sites européens à l'aide du bioessai FITC-T4 TTR. Une activité TTR a été détectée dans tous les échantillons, avec une variation importante dans les concentrations mesurées d'un site à l'autre. Les niveaux les plus élevés étant observés en République Tchèque, atteignant ~ 250 ng PFOA-Eq/m^3.

Il s'agit de la première application du bioessai FITC-T4 TTR à des échantillons d'air ambiant, et comme pour la matrice sol, aucune valeur de référence n'est à notre connaissance actuellement disponible dans la littérature scientifique pour permettre une comparaison directe. Néanmoins, l'ampleur des activités observées, ainsi que les courbes dose-réponse nettes et complètes obtenues pour les échantillons tchèques, suggèrent une contamination significative de l'air ambiant en République Tchèque par les composés actifs sur TTR, comme les PFAS. Là encore, une recherche de la nature chimique de ces substances à l'aide d'analyses chimiques ciblées sera nécessaire pour conclure quant à la contribution de tel PFAS dans ces activités.

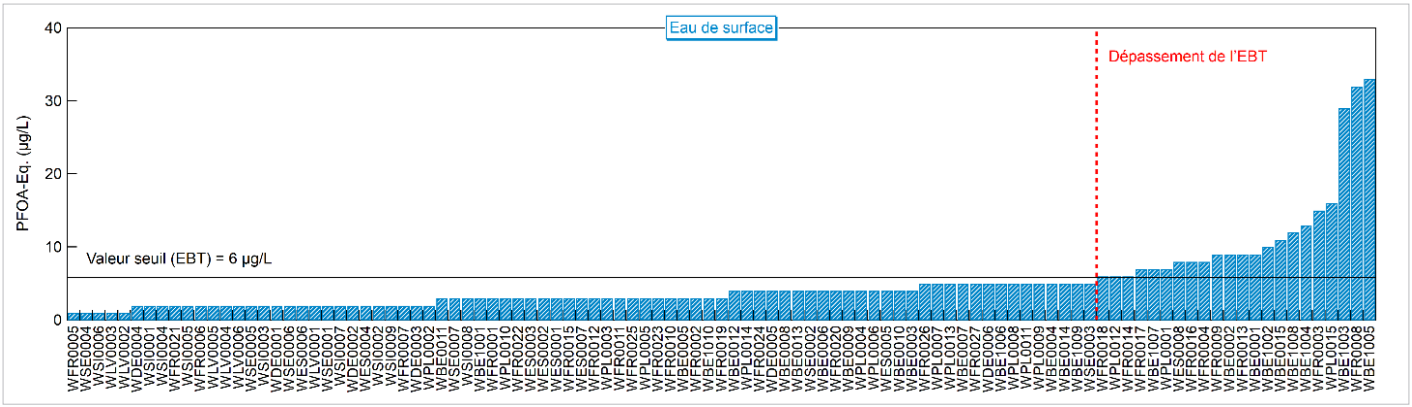

Figure 3 /
Activité d'inhibition de la TTR in vitro dans les eaux de surface européennes (BEQ en µg PFOA-Eq/L). Les échantillons sont classés par ordre croissant de PFOA-Eq. La ligne horizontale noire représente la valeur seuil basée sur l'effet (EBT) de 6 µg/L PFOA-Eq ≈ 0,49 µg/L T4-Eq (Neale et al., 2023). La ligne verticale rouge en pointillés sépare les échantillons dépassant l'EBT (à droite).

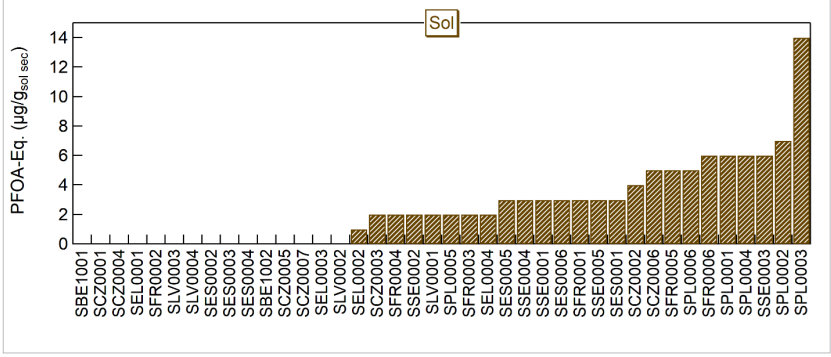

Figure 4 /
Activité d'inhibition de la TTR mesurée par le bioessai FITC-T4 TTR dans des échantillons de sol collectés dans différents pays européens (Belgique BE, République Tchèque CZ, France FR, Espagne ES, Lettonie LV, Suède SE, Pologne PL). Les résultats sont exprimés en µg PFOA-Eq/g de sol sec et les barres sont ordonnées par activité croissante.

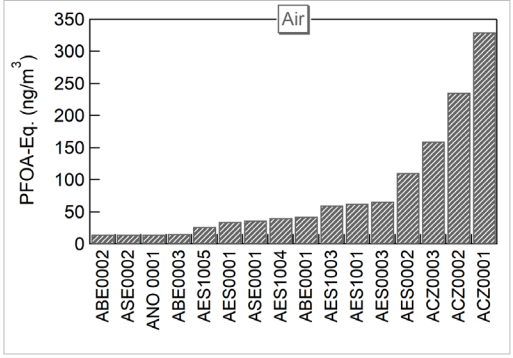

Figure 5 /
Activité d'inhibition de la TTR mesurée par le bioessai FITC-T4 TTR dans la phase particulaire de l'air ambiant, échantillonnée dans plusieurs pays européens (Belgique BE, Suède SE, Norvège NO, Espagne ES, République Tchèque CZ). Les résultats sont exprimés en ng PFOA-Eq/m^3 et les barres sont ordonnées par activité croissante.

Conclusion et perspectives

L'application du bioessai FITC-T4 TTR à différentes matrices environnementales collectées à travers l'Europe dans le cadre du projet PARC a montré la présence de substances actives, comme les PFAS, dans une majorité des échantillons analysés, permettant de discriminer certains sites/échantillons comme étant particulièrement actifs. A notre connaissance, ces résultats représentent les premières données d'occurrence de l'activité TTR dans les matrices environnementales sol et air et constituent des premières valeurs de référence pour ces matrices.

Ces résultats sont innovants et posent la question de la nature chimique des substances responsables des activités observées. La prochaine étape du travail consistera donc à évaluer la contribution aux activités TTR des substances individuelles mesurées par analyses chimiques réalisées dans le cadre du projet PARC. Pour cela, l'approche dite de « mass balance » ou « iceberg modeling » (Escher *et al.*, 2020) sera utilisée. Il s'agira de déterminer les équivalents-bioanalytiques à partir des concentrations mesurées par analyses chimiques ciblant des molécules actives, comme les PFAS, présentes dans les échantillons (BEQ-Chim), puis de les comparer avec les équivalents-bioanalytiques obtenus par bioessai (BEQ-Bio). Pour cela, il sera nécessaire de déterminer les facteurs d'activité relative (RPF) de chaque composé individuel dans le bioessai FITC-T4 TTR. Ce travail impliquera l'acquisition et le test d'un grand nombre de standards PFAS (>100 composés identifiés) avec le bioessai FITC-T4 TTR, ce qui constituera l'action principale prévue pour l'année 2026.

Références

- 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. Toxicological Sciences kfae131. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfae131

- 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. Environment International 181, 108256. https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108256

- Escher, B.I., Stapleton, H.M., Schymanski, E.L., 2020. Tracking complex mixtures of chemicals in our changing environment. Science 367, 388–392. https://doi.org/10.1126/science.aay6636

- Gaines, L.G.T., 2023. Historical and current usage of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS): A literature review. American Journal of Industrial Medicine 66, 353–378. https://doi.org/10.1002/ajim.23362

- 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. Environmental Health Perspectives 128, 017015. https://doi.org/10.1289/EHP5911

- Neale, P.A., Escher, B.I., de Baat, M.L., Dechesne, M., Dingemans, M.M.L., Enault, J., Pronk, G.J., Smeets, P.W.M.H., Leusch, F.D.L., 2023. Application of Effect-Based Methods to Water Quality Monitoring: Answering Frequently Asked Questions by Water Quality Managers, Regulators, and Policy Makers. Environ. Sci. Technol. 57, 6023–6032. https://doi.org/10.1021/acs.est.2c06365

- 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

- Paris-Davila, T., Gaines, L.G.T., Lucas, K., Nylander-French, L.A., 2023. Occupational exposures to airborne per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS)—A review. American Journal of Industrial Medicine 66, 393–410. https://doi.org/10.1002/ajim.23461

- 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. Environmental Research 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

- Vindimian, E., Robaut, C., Fillion, G., 1983. A method for cooperative or noncooperative binding studies using nonlinear regression analysis on a microcomputer. J Appl Biochem 5, 261-268. Freely available at: https://www.normalesup.org/~vindimian/en_index.html.

Institut national de l'environnement industriel et des risques
Parc technologique Alata • BP 2 • F-60550 Verneuil-en-Halatte
03 44 55 66 77 • ineris@ineris.fr • www.ineris.fr

Réf. : Ineris-2850848