

RAPPORT D'ÉTUDE
N° -DRC-08-95306-16732A-

10/01/09

**Outils bio-analytiques *in vitro* : principe
et apports pour la surveillance des
contaminants organiques dans le milieu
aquatique**

INERIS

maîtriser le risque |
pour un développement durable |

Outils bio-analytiques *in vitro* : principe et apports pour la surveillance des contaminants organiques dans le milieu aquatique

INERIS

Direction des Risques chroniques
Pôle Dangers et Impacts sur le Vivant
Unité d'Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*
Verneuil en Halatte (Oise)

Client : ONEMA

Cette note bibliographique a été réalisée avec le soutien l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (convention cadre ONEMA-INERIS 2008).

Liste des personnes ayant participé à l'étude : Selim AIT-AISSA

PRÉAMBULE

Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

La responsabilité de l'INERIS ne pourra être engagée si les informations qui lui ont été communiquées sont incomplètes ou erronées.

Les avis, recommandations, préconisations ou équivalents qui seraient portés par l'INERIS dans le cadre des prestations qui lui sont confiées, peuvent aider à la prise de décision. Etant donné la mission qui incombe à l'INERIS de par son décret de création, l'INERIS n'intervient pas dans la prise de décision proprement dite. La responsabilité de l'INERIS ne peut donc se substituer à celle du décideur.

Le destinataire utilisera les résultats inclus dans le présent rapport intégralement ou sinon de manière objective. Son utilisation sous forme d'extraits ou de notes de synthèse sera faite sous la seule et entière responsabilité du destinataire. Il en est de même pour toute modification qui y serait apportée.

L'INERIS dégage toute responsabilité pour chaque utilisation du rapport en dehors de la destination de la prestation.

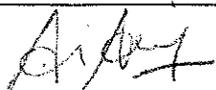
	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	Selim AIT-AISSA	Jean-Marc PORCHER	Eric THYBAUD
Qualité	Ingénieur à l'Unité ECOT	Responsable de l'Unité ECOT	Responsable du Pôle VIVA
Visa			

TABLE DES MATIÈRES

1. CONTEXTE : UN BESOIN D'OUTILS POUR EVALUER LA QUALITE DES MILIEUX.....	7
2. METHODES BIO-ANALYTIQUES BASEES SUR LES MECANISMES D'ACTION	9
2.1 Concept de l'approche bio-analytique.....	9
2.2 Les modèles in vitro d'interaction polluants/récepteurs biologiques.....	9
2.3 Evaluation in vitro de substances pures.....	13
2.4 Evaluation in vitro de mélanges environnementaux complexes.....	14
3. INTEGRATION DES TESTS IN VITRO DANS DES STRATEGIES BIO-ANALYTIQUES	16
3.1 Détermination de profils d'activités in vitro	17
3.2 Couplage tests in vitro et analyses chimiques : « mass-balance analysis »	17
3.3 Analyses dirigées par les bioessais (EDA ou Effect Directed Analyses).....	19
4. PERSPECTIVES POUR LA BIOSURVEILLANCE.....	22
5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	25

Résumé

Les récentes avancées biotechnologiques ont vu l'émergence d'un large panel d'outils biologiques *in vivo* (tests sur organismes entiers), *in vitro* (tests cellulaires), biochimiques et moléculaires, susceptibles de trouver leur application en toxicologie environnementale en général et pour la biosurveillance de la pollution chimique en particulier. L'objet de ce rapport n'est pas d'en dresser une synthèse exhaustive mais de présenter le principe de ces nouvelles approches bio-analytiques et leurs applications potentielles pour la détection de polluants organiques présents à l'état de trace dans le milieu aquatique. A travers l'exemple des perturbateurs endocriniens (PE) et des composés *dioxin-like* (DL), nous focalisons ici notre propos sur les outils *in vitro* basés sur l'utilisation de modèles cellulaires, qui figurent parmi les outils les plus fréquemment décrits dans la littérature scientifique dans le cadre d'études de biosurveillance des milieux aquatiques. Dans un premier temps, nous décrivons dans leur principe les tests biologiques *in vitro* utilisés pour caractériser l'activité toxique et/ou biologique de substances chimiques et de mélanges complexes. Dans un second temps, nous présentons l'apport de ces tests dans des démarches bio-analytiques intégrées pour caractériser la contamination des milieux par des polluants organiques. Enfin, quelques considérations pratiques sont abordées afin d'envisager leurs avantages et limites dans une perspective d'utilisation en routine pour la biosurveillance.

Abstract

For the last decade, a wide range of *in vitro* and *in vivo* biological models have emerged and are now used as bio-analytical tools for applied research studies in environmental toxicology and field biomonitoring of classical and emerging chemical contaminants. In this report, we present the bio-analysis concept and the applications of bio-analytical tools for the detection of trace organic pollutants in aquatic systems. This is exemplified by the recent development of mechanisms-based *in vitro* tools and their use for the detection of endocrine disrupting (EDCs) and dioxin-like compounds (DL) in environmental samples. The use of such tools within integrated bio-analytical strategies for the chemical identification of emerging pollutants is also presented. Finally, some practical aspects for routine application in environmental surveys are discussed.

1. CONTEXTE : UN BESOIN D'OUTILS POUR EVALUER LA QUALITE DES MILIEUX

De nombreuses études font état de la présence dans l'environnement aquatique de substances toxiques de classes chimiques et d'origines très diverses. En marge des polluants chimiques toxiques persistants dans l'environnement (e.g. dioxines, HAPs, PCBs, métaux, pesticides organochlorés...), pour lesquels des méthodes analytiques sont relativement bien établies, l'émergence de nouveaux types de contaminants, comme les médicaments, les produits cosmétiques ou les composés issus des activités domestiques, complexifie l'évaluation de la qualité chimique des milieux aquatiques. La surveillance en routine de ces substances est confrontée à différents problèmes, en particulier quelles substances et comment les surveiller ? La directive européenne sur l'Eau (DCE) a partiellement répondu au problème en définissant une liste de 41 substances prioritaires. Toutefois, au regard des milliers de substances présentes dans le milieu, scientifiques et gestionnaires de l'environnement s'accordent à penser que cela reste insuffisant pour établir une évaluation réaliste du risque pour l'environnement. De plus, les substances polluantes sont le plus souvent présentes à de faibles concentrations, inférieures au microgramme par litre. Ceci pose un réel problème d'analyse de ces substances dans la mesure où les instruments de mesure utilisés en routine par une majorité des laboratoires d'analyse présentent des limites de détection supérieures aux seuils fixés. La multiplicité de ces polluants, présents le plus souvent à de faibles concentrations et pour lesquels peu d'information (éco) toxicologique est disponible, pose donc clairement la question du risque associé aux expositions chroniques des faibles doses et des mélanges et de l'évaluation de ce risque.

Actuellement, l'évaluation de la qualité chimique des milieux fait appel aux analyses chimiques et aux bioessais d'écotoxicité, lesquels se complètent mais présentent également certaines limites. Les méthodes analytiques en vigueur dans les laboratoires d'analyses de routine font le plus souvent appel à des méthodes multi-résidus avec des seuils de détection de l'ordre du µg/L (variable selon les polluants recherchés) sans relation avec l'écotoxicité des substances. Les récents développements en chimie analytique montrent qu'il est actuellement possible, d'un point de vue technique, de mesurer nombre de ces molécules à l'état de trace avec des seuils de sensibilité très performants. Toutefois, cette approche fait appel à un appareillage conséquent (e.g. méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse) et reste encore très coûteuse dans une optique de surveillance en routine. De plus, l'approche analytique reste limitée au fait qu'elle ne permet de mesurer que des molécules déjà identifiées comme étant problématiques.

Parallèlement, l'évaluation des effets biologiques à l'aide de bioessais d'écotoxicité prend en compte l'ensemble des polluants toxiques biodisponibles dans l'échantillon testé. Cette approche fournit donc une évaluation intégrée de la toxicité intrinsèque (danger) de l'échantillon testé, sans toutefois permettre d'identifier la cause de la toxicité c'est-à-dire la nature des polluants responsables de l'effet observé. De plus, les bioessais réglementaires renseignent sur des paramètres de toxicité globale comme la mortalité, l'inhibition de croissance ou la reproduction et sont donc non spécifiques d'une classe de polluants. Les outils actuellement disponibles pour les gestionnaires de l'environnement présentent donc plusieurs limites pour répondre aux challenges actuels et relayés entre autres par la DCE.

Face à ces constats, un des défis actuels en écotoxicologie concerne donc le développement et la validation de nouveaux outils de surveillance plus sensibles, relativement peu coûteux, et qui permettent une évaluation du devenir et des effets de ces nouvelles familles de polluants. À l'interface entre approche analytique et bioessais d'écotoxicité, l'utilisation de nouvelles méthodes bio-analytiques basées sur les mécanismes de toxicité peut avantageusement compléter les outils existants.

2. METHODES BIO-ANALYTIQUES BASEES SUR LES MECANISMES D’ACTION

2.1 CONCEPT DE L’APPROCHE BIO-ANALYTIQUE

Tout organisme répond aux stress chimiques en mettant en œuvre une diversité de réponses moléculaires et cellulaires qui lui permettront de faire face à l’agression par le polluant. Ces réponses sont basées sur des mécanismes qui peuvent être très spécifiques de familles ou de structures de composés chimiques et/ou d’un mode d’action toxique spécifique. Dans le cadre de ce document, nous définissons les outils bio-analytiques comme des méthodes basées sur la mesure sensible et quantitative de réponses biologiques précoces (i.e. sub-létales) et spécifiques d’un mode d’action toxique bien caractérisé en termes de polluants effecteurs et de pertinence toxicologique (Giesy et al, 2002, Eggen et Segner, 2003). Ainsi, pour un mécanisme d’action donné, ces outils doivent permettre une mesure (semi)quantitative des concentrations en composés actifs au sein de mélanges (notion d’équivalents-toxiques, voir plus bas), avec des sensibilités de détection relativement performantes. En outre, au contraire des méthodes analytiques, les méthodes bio-analytiques basées sur les mécanismes d’action des polluants permettent, dans certains cas, de faire le lien entre exposition et effets. D’une part elles intègrent les effets interactifs entre polluants, permettant ainsi une évaluation plus juste du danger associé au mélange considéré. D’autre part, elles renseignent sur les mécanismes de stress susceptibles de contribuer ou d’être impliqués dans l’apparition d’effets à l’échelle sub-organisme ou de l’organisme, permettant ainsi d’étayer la causalité entre exposition et effets. Idéalement, les méthodes bio-analytiques fournissent donc des informations analytiques et toxicologiques.

2.2 LES MODELES IN VITRO D’INTERACTION POLLUANTS/RECEPTEURS BIOLOGIQUES

Le développement de méthodes bio-analytiques nécessite une très bonne connaissance des mécanismes d'action des contaminants au niveau (intra)cellulaire, tant en terme de types de polluants effecteurs que des implications toxicologiques des réponses mesurées. Parmi les multiples mécanismes identifiés, il est maintenant largement reconnu que les interactions polluant-récepteur biologique constituent une étape clé dans le développement de la toxicité d'un grand nombre de xénobiotiques organiques. L'exemple le plus représentatif est certainement le cas des composés dits « dioxin-like » (dioxines, furanes, HAPs, PCBs...) qui sont capables de se lier au récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR - *Aryl hydrocarbon receptor*), également appelé récepteur de la dioxine, et d'induire une cascade d'événements toxiques qui peuvent, dans certains cas, conduire à des effets oxydants et génotoxiques, impliqués notamment dans l'initiation des effets carcinogènes. Un second exemple très bien décrit dans la littérature concerne les perturbateurs endocriniens (PE) mimétiques des hormones. Les PE appartiennent à des classes chimiques diverses (stéroïdes naturels et synthétiques, alkyl phénols, dioxines, pesticides, plastifiants, etc.) et sont présents dans les eaux de surface, les sédiments ou les rejets de stations d'épuration. Un des mécanismes primaires importants qui initie leur toxicité réside dans leur capacité à se lier aux récepteurs des hormones stéroïdes (œstrogènes, androgènes) et à perturber la réponse cellulaire régulée par ces récepteurs.

Au niveau cellulaire, ces récepteurs ont un rôle de facteur de transcription : une fois activé par liaison avec un ligand (i.e. une substance chimique qui peut être l'hormone endogène ou un xénobiotique), ils migrent vers le noyau de la cellule où ils vont se fixer sur des séquences spécifiques de l'ADN et moduler l'expression de gènes cibles (Figure 1). Au laboratoire, il est possible de déterminer spécifiquement l'activité *in vitro* de substances chimiques sur un récepteur donné à l'aide de modèles cellulaires ayant intégré de manière stable un gène rapporteur (e.g. luciférase) régulé par ce récepteur et facilement mesurable en luminescence ou fluorescence (Figure 1). La réponse génique ainsi mesurée est dépendante de la concentration en ligand effecteur ; elle atteint un plateau lorsque tous les récepteurs intracellulaires sont saturés par les ligands.

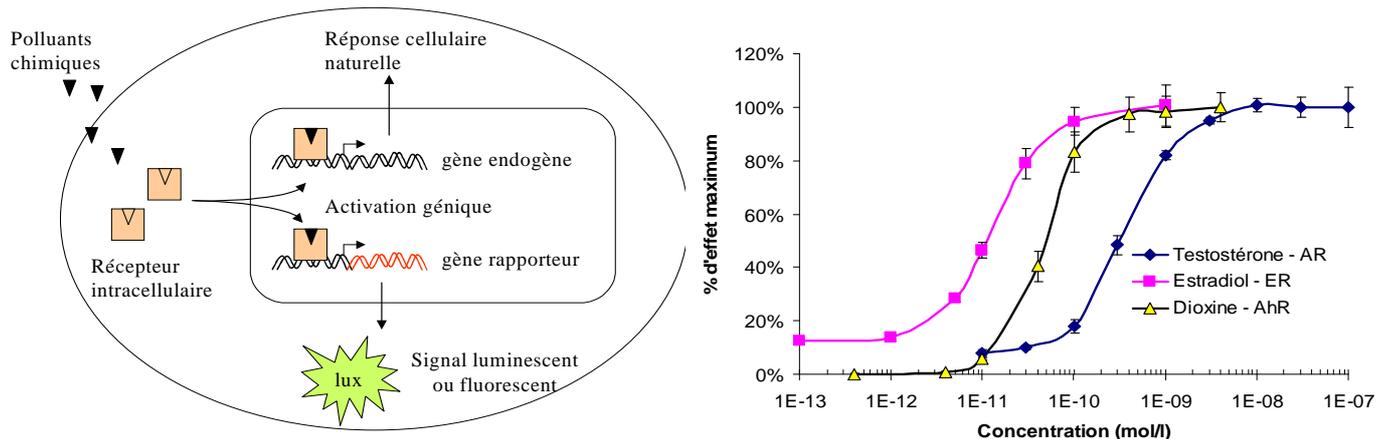


Figure 1 : A) Principe des tests cellulaires *in vitro* basés sur l'interaction ligand/récepteur au sein d'une cellule. B) Le graphique montre l'effet de l'œstradiol, la testostérone et la dioxine sur l'activation respective des récepteurs des œstrogènes (ER), des androgènes (AR) et de la dioxine (AhR) dans différents modèles cellulaires spécifiques.

De nombreuses substances organiques présentes dans l'environnement aquatique sont ainsi capables d'interagir avec différents récepteurs nucléaires, tels que le récepteur des œstrogènes (ER), des androgènes (AR), de la dioxine (AhR), mais également avec d'autres récepteurs impliqués dans la régulation du système endocrinien mais pour lesquels les données bibliographiques sont beaucoup moins abondantes. Il s'agit par exemple des récepteurs des glucocorticoïdes (GR), des xénobiotiques (PXR) ou des proliférateurs des peroxyosomes (PPARs). Le tableau 1 présente quelques exemples de polluants aquatiques qui ont été décrits comme ligands de ces récepteurs.

Tableau 1 : Exemple de récepteurs cibles et de ligands naturels, synthétiques et xénobiotiques

Récepteurs	Ligands naturels ou synthétiques	Polluants aquatiques d'origine industrielle, urbaine ou agricole (exemples)
Récepteur des oestrogènes (ER)	17 β -estradiol, estrone, phyto-œstrogènes, myco-œstrogènes, 17 α -ethynylestradiol	Pesticides organochlorés, alkylphénols, bisphénol A, phtalates, parabènes, benzophénones (filtres anti-UV), hydroxy-PCBs, ...
Récepteur des hydrocarbures (AhR)	HAPs, amines aromatiques	Dioxines, furanes, PCBs plans, HAPs, imidazoles...
Récepteur des androgènes (AR)	Testostérone, 5-dihydroxytestostérone	Pesticides : vinclozoline, DDT et métabolites, alkylphénols, benzophénones, bisphénolA...
Récepteur des pregnanes (PXR)	Pregnénolone, RU486, stéroïdes	Pesticides, PCBs hyperchlorés, carbamazepine, PBDEs, pharmaceutiques...
Récepteur des glucocorticoïdes (GR)	Cortisole, dexamethasone, pharmaceutiques	Inconnu
Récepteurs des activateurs de prolifération des peroxysomes (PPARs)	Acides gras	Perfluorés, Phtalates, phényles étain, PBDE

Le tableau 1 reflète le fait que la combinaison d'un ensemble de bioessais permet potentiellement de détecter une gamme assez large de polluants organiques. Toutefois, si l'utilisation de ce type d'application a été relativement bien rapportée pour la détection des xéno-hormones (ER, AR) et des composés dioxin-like (AhR), les tests utilisant les récepteurs PXR, PPARs ou GR sont actuellement beaucoup moins explorés en termes d'outils de biosurveillance, essentiellement car ils ont été établis plus récemment. Bien que leur utilisation reste encore à être validée par des travaux de recherche sur le terrain, nous avons choisis de les citer dans ce rapport car ils ouvrent des perspectives très intéressantes pour la bio-détection de substances préoccupantes, comme les médicaments ou les composés perfluorés, qui ne sont pas du tout prises en compte dans les autres tests.

2.3 EVALUATION IN VITRO DE SUBSTANCES PURES

Dans une optique de bio-détection de substances actives, l'intérêt de ce type de systèmes réside dans le caractère spécifique et quantitatif de la réponse mesurée, laquelle est directement proportionnelle à la concentration en composé effecteur. Les concentrations effectrices dépendent du composé testé et en particulier de son affinité pour le récepteur, laquelle est généralement liée à sa structure. Par exemple, le 17 β -œstradiol, hormone œstrogène naturelle, a une forte affinité pour le récepteur des œstrogènes (ER) et sera capable de l'activer à de faibles concentrations (de l'ordre du nanogramme par litre), qui correspondent aux niveaux environnementaux dans les eaux de rivières. A l'inverse, des composés d'origine industrielle comme les alkylphénols ont une affinité moindre pour ce récepteur et seront donc actifs à des concentrations plus élevées. Ceci est illustré dans la figure 2 qui présente l'activité œstrogénique de différents composés naturels, synthétiques et industriels dans la lignée cellulaire MELN. Sur la base de ce type de résultats, la comparaison des concentrations effectrices (CE50) permet de déterminer, pour un composé *i* donné, son activité relative (AR_i) à celle de la molécule de référence (ici l'œstradiol) selon la formule : $AR_i = CE50_{\text{estradiol}} / CE50_{\text{composé } i}$.

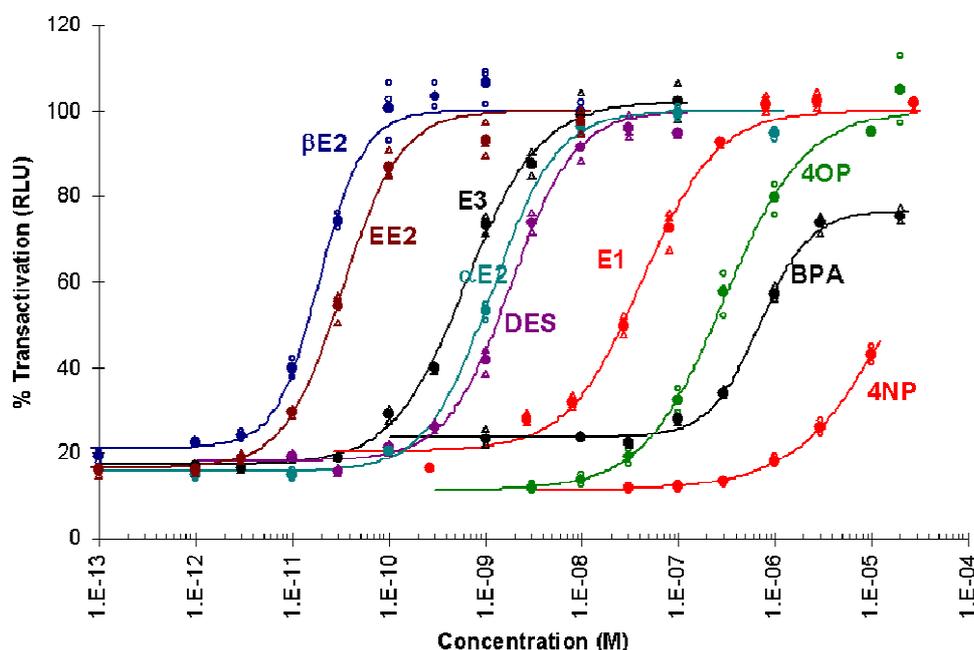


Figure 2 : Exemples d'activation *in vitro* du récepteur des œstrogènes (ER) par différents produits chimiques : œstrogènes naturels (E2, estrone E1, estriol E3) et synthétiques (ethynylestradiol EE2, diethylstilbestrol DES), octylphénol (4OP), nonylphénol (4NP), bisphénol A (BPA). Les résultats montrent l'induction de la luciférase (donnée en unités RLU) dépendante du ER dans la lignée cellulaire MELN.

Différents modèles cellulaires établis à partir de cellules de mammifères ou de levures ont ainsi été rapportés dans la littérature et sont maintenant disponibles dans de nombreux laboratoires de recherche. Depuis peu, certains modèles « gène rapporteur » (T47D-kbLuc, MDA-kb2, lignées CALUX) sont également disponibles commercialement pour des utilisations à des fins de recherche ou dans le cadre d'applications définies.

D'un point de vue pratique, l'utilisation des systèmes cellulaires en formats miniaturisés (généralement en microplaques de 96 puits) sont adaptés au criblage de substances chimiques ou d'échantillons : ils sont relativement rapides (6-24 heures), sensibles et utilisent de faibles volumes d'échantillons. Au laboratoire, il est nécessaire de disposer *a minima* d'un poste équipé pour la culture cellulaire (hotte à flux laminaire, incubateur de cellules, microscope, centrifugeuse) et d'un lecteur de microplaque en fluorescence ou luminescence selon le type de gène rapporteur. Actuellement, le développement des matériels d'automatisation permet d'envisager leur utilisation dans des protocoles de criblage à haut débit, ce qui est déjà le cas dans les laboratoires industriels dans des programmes de criblage de substances pharmaceutiques par exemple.

2.4 EVALUATION IN VITRO DE MELANGES ENVIRONNEMENTAUX COMPLEXES

De nombreuses études publiées ont démontré la faisabilité de l'utilisation des modèles *in vitro* pour la détection de ces polluants organiques au sein de mélanges environnementaux complexes tels que des extraits d'effluents ou de sédiments. L'intérêt des méthodes est d'intégrer dans une seule mesure l'ensemble des composés actifs (e.g. ligands dans le cas d'une réponse médiée par un récepteur) au sein d'un mélange.

En pratique, différentes dilutions de l'extrait à analyser sont testées pour leur capacité à induire une réponse *in vitro* (Figure 3). Dans le cas de réponses positives, la modélisation des courbes dose-réponse permet de déterminer les concentrations effectrices, rapportées en quantité d'échantillon (en litre d'effluent ou en poids de sédiment par exemple), lesquelles sont proportionnelles à la concentration en polluants actifs dans l'extrait.

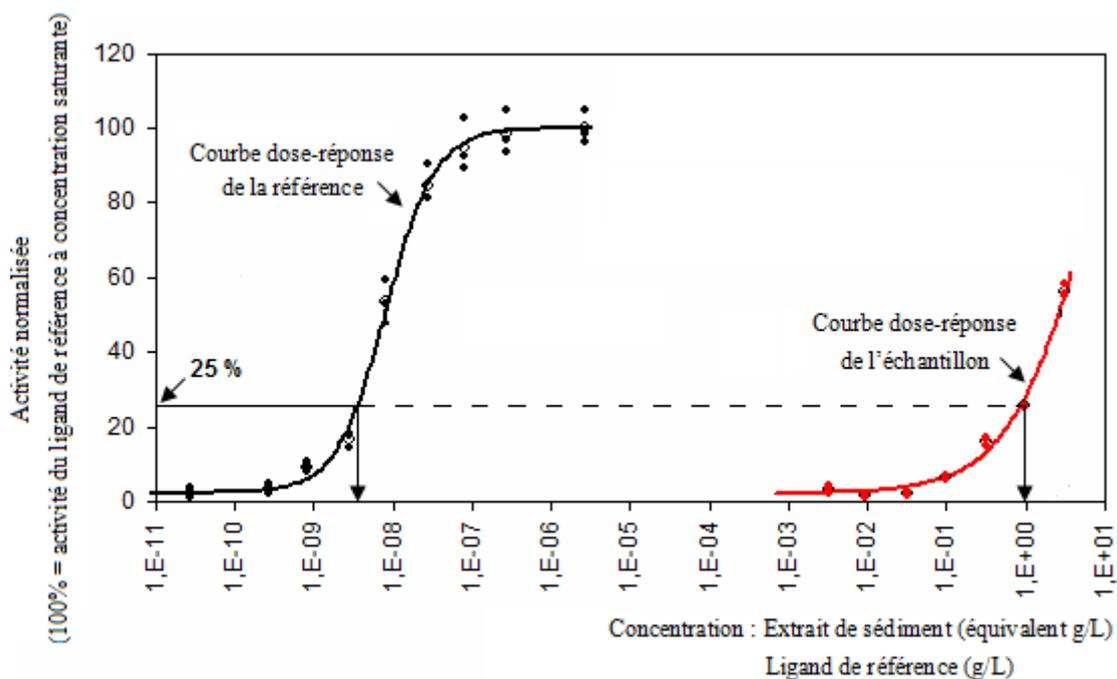


Figure 3 : Principe de détermination de l'activité biologique *in vitro* d'un échantillon complexe (ici un extrait de sédiment de rivière) dans un modèle cellulaire récepteur/gène rapporteur.

Pour un même niveau d'effet (e.g. 25 % dans la figure 3), la comparaison de la concentration effectrice (e.g. CE_{25}) de l'échantillon avec celle de la substance de référence (e.g. estradiol pour ER ou dioxine pour AhR) permet de déterminer la charge en toxiques-équivalents (TEQ) dans l'échantillon, selon l'équation suivante :

$$TEQ = \frac{CE_{25} \text{ (substance de référence)}}{CE_{25} \text{ (échantillon)}}$$

avec TEQ= quantité d'équivalents toxiques de l'échantillon sur le récepteur X exprimée en masse de ligand de référence par masse d'échantillon (e.g. g d'équivalents-estradiol par g de sédiment sec).

3. INTEGRATION DES TESTS IN VITRO DANS DES STRATEGIES BIO-ANALYTIQUES

Selon les objectifs visés, différentes stratégies bio-analytiques intégrant les tests *in vitro* peuvent être mises en œuvre pour caractériser et identifier la nature des polluants actifs dans des échantillons environnementaux (Figure 4). Ces stratégies impliquent l'utilisation de tests *in vitro* seuls (batteries de tests) ou en couplage avec des méthodes physico-chimiques d'analyse plus ou moins sophistiquées, selon le degré d'information recherchée en termes de caractérisation de la contamination chimique.

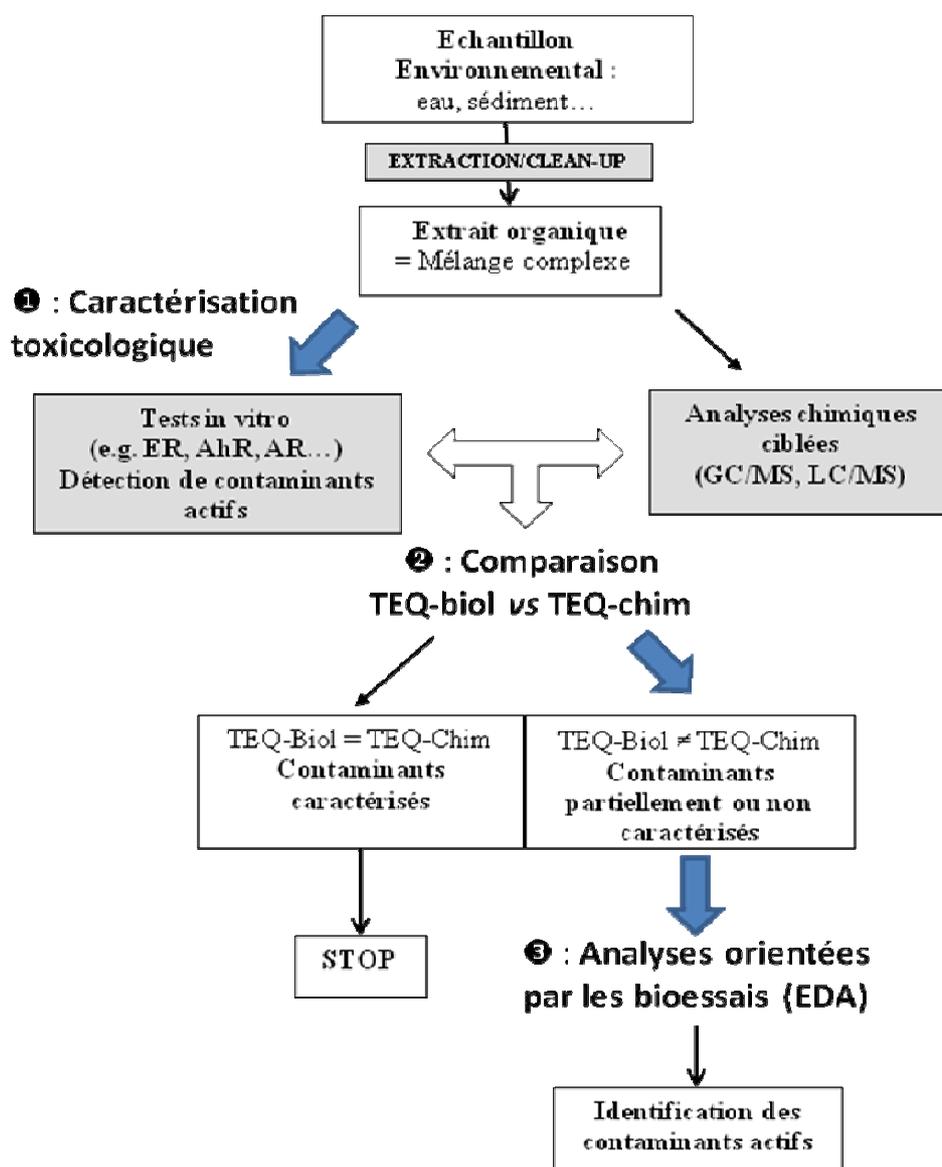


Figure 4 : Exemple de stratégie bio-analytique intégrant outils *in vitro* et analyses chimiques dans une démarche globale de caractérisation et d'identification de contaminants organiques dans des mélanges environnementaux.

3.1 DETERMINATION DE PROFILES D'ACTIVITES IN VITRO

Comme présenté dans le tableau 1, une large diversité de micropolluants organiques sont capables d'activer différents récepteurs. Dans le cas d'un échantillon inconnu, la combinaison d'un ensemble choisi de tests *in vitro* permet la détection spécifique de différentes familles de polluants. En l'absence d'information *a priori* sur les sources de pollution et donc sur les analyses à effectuer, l'élaboration de profils d'activités toxicologiques peut donc être préconisée en première étape pour caractériser les polluants organiques majoritairement présents sur le site (démarche de criblage) et ainsi orienter les analyses chimiques à mener prioritairement pour identifier les polluants présents.

3.2 COUPLAGE TESTS IN VITRO ET ANALYSES CHIMIQUES : « MASS-BALANCE ANALYSIS »

Cette approche consiste à procéder à des analyses physico-chimiques (généralement par chromatographie gazeuse ou liquide couplée à la spectrométrie de masse) conduites en fonction des résultats des tests *in vitro*. Les résultats des deux approches sont ensuite comparés afin d'associer l'effet biologique d'un échantillon à la présence et à la concentration de polluants cibles.

Cette approche repose sur la comparaison d'équivalents-toxiques (TEQ_{biol}) déterminés par les tests *in vitro* (cf II.3., Figure 4) aux TEQ déterminés à partir des analyses chimiques (TEQ_{chim}). Le calcul de ces derniers repose sur l'hypothèse d'un effet additif des composés actifs identifiés dans le mélange. Ainsi, l'activité théorique obtenue par les méthodes analytiques peut être calculée à l'aide de la formule suivante :

$$TEQ_{chim} = \sum_{i=1}^n (AR_i \times C_i)$$

avec TEQ_{chim} = activité théorique globale mesurée par les méthodes physicochimiques sur le récepteur x (g REQ/L ou g), n = nombre de composés i identifiés ayant une activité sur le récepteur x, AR_i = activité relative du composé i sur le récepteur x par rapport à la molécule de référence, C_i = concentration mesurée du composé i (g/L) dans le mélange.

Cette approche a été appliquée à différentes matrices environnementales et a montré son efficacité en termes d'identification de certains polluants responsables d'activités dioxin-like et oestrogénique, mais également ses limites. Dans le cas des ligands de AhR, nombre d'études publiées rapportent de fortes corrélations entre TEQ_{biol} *in vitro* et TEQ_{chim} mesurés dans diverses matrices environnementales comme les sédiments ou le biote dans différents contextes de pollution (Behnsich et al, 2001, Giesy et al, 2002, Louiz et al, 2008). Dans les sédiments de rivières, les HAPs, PCB-DL et PCDD/Fs sont les molécules principalement détectées, avec des contributions relatives variables selon les sites, ce qui s'explique par des contextes de pollution différents. Néanmoins, la quasi-totalité des études publiées montrent que, bien que corrélées, les analyses chimiques des polluants ciblés par l'approche « mass-balance » ne sont que partiellement explicatives de l'ensemble des polluants détectés par les tests *in vitro*. Cela n'est pas surprenant dans la mesure où, d'une part, seule une partie des familles de molécules citées est analysée et, d'autre part, ces molécules subissent dans le milieu diverses (bio)transformations qui conduisent à la production de métabolites actifs et non analysés. C'est le cas par exemple des HAPs nitrés et oxygénés qui ont été décrits comme majoritaires dans des sédiments de rivière et comme de puissants inducteurs d'activité EROD (Brack et Schirmer, 2003). Pour les composés dioxin-like, il est maintenant reconnu que les tests *in vitro* constituent une alternative pertinente aux analyses chimiques des polluants prioritaires, avec des taux de faux-négatifs quasi-inexistants et une détection plus exhaustive que l'approche analytique pure.

En ce qui concerne les activités oestrogéniques, la concordance entre approches chimique et biologique dans une démarche « mass-balance » est moins systématiquement rapportée. Cette variabilité est due à la diversité chimique et structurale des ligands environnementaux du ER et, de ce fait, à la multiplicité des sources de pollutions qui varie d'un site à l'autre. Dans le cas d'effluents de stations d'épuration, source bien identifiée de PE dans l'environnement aquatique, nombre d'études, y compris des études françaises, ont corrélé des activités oestrogéniques avec la présence d'hormones stéroïdes (E2, EE2, E1), d'alkylphénols ou de bisphénol A. Dans les autres compartiments du milieu aquatique, les résultats sont beaucoup plus variables et sont fortement liés au site ou au compartiment (eau de surface, matières en suspension, sédiment) étudiés. Sur la Seine, en aval de la station d'épuration d'Achères (Ile-de-France), Fenet et al (2003) ont montré la contribution significative (jusqu'à 40%) des alkylphénols dans les activités oestrogéniques mesurées dans le sédiment, alors que les hormones stéroïdiennes naturelles et synthétiques seraient principalement responsables des activités dans l'eau de surface sur ce même site (Cargouet et al, 2004). Dans des sédiments issus d'autres sites français non

directement impactés par une station d'épuration mais soumis à des pressions de pollution mixtes (agriculture, urbain), Kinani et al (2008) ont analysé près de 50 molécules appartenant à divers familles de polluants et sélectionnées en fonction de leur occurrence environnementale et de leur activité estrogénique.

Ils ont montré que les hormones naturelles (estradiol, estrone), et dans une moindre mesure le bisphénol A, les alkylphénols et certains parabènes, contribuaient pour seulement 39 % de l'activité oestrogénique mesurée *in vitro*, suggérant la présence d'autres polluants actifs dans les extraits mais non pris en compte par les analyses. Dans cette même étude, les auteurs ont également détecté d'autres types d'activités sur ces sites, comme des activités (anti)androgéniques et PXR (Kinani et al, soumis). Toutefois, les analyses chimiques ciblées n'ont pas permis d'identifier les molécules responsables de ces effets.

L'approche dite "*mass balance*" est donc performante pour établir des corrélations entre une activité biologique et la présence de certains types de contaminants. Elle reste toutefois limitée aux polluants ciblés par les analyses chimiques et, dans de nombreux cas (contextes de multi-pollution, activités autres que AhR et ER), elle n'est que partiellement explicative des activités détectées par les tests *in vitro*. Dans ces cas, la déconvolution des mélanges par l'approche dite EDA décrite ci-après peut aider à contourner ces limites pour identifier les polluants actifs majoritaires dans un échantillon inconnu.

3.3 ANALYSES DIRIGÉES PAR LES BIOESSAIS (EDA OU EFFECT DIRECTED ANALYSES)

L'approche EDA consiste en un couplage entre des outils bio-analytiques, des méthodes de fractionnement et des outils de chimie analytique, avec pour objectif principal de réduire la complexité du mélange environnemental afin d'isoler de permettre l'identification des composés responsables des réponses biologiques observées (Leonard et Lamoree, 2006). Cette approche intégrée s'inspire directement de la méthode TIE (*Toxicity Identification Evaluation*) lancée par l'agence environnementale américaine (US EPA) en 1988 dans l'objectif d'abaisser la toxicité aigue et chronique d'effluents municipaux.

L'approche EDA complète se divise généralement en 3 phases (Figure 5).

- dans une première phase, le mélange complexe est soumis à un ou plusieurs fractionnements et chacune des fractions obtenues est testée en bioessai afin d'isoler les plus actives. Selon les études, différentes stratégies de fractionnement sont possibles. Le cas le plus général implique un fractionnement fonction des propriétés physicochimiques des molécules (ex. fractionnement en colonnes SPE, hyper-fractionnement HPLC sur phase normale ou inversée...). Plus récemment, une séparation des molécules actives en fonction de leur activité biologique a été décrite. Il s'agit d'utiliser des colonnes d'affinité au récepteur cible ce qui permet une purification sélective des ligands de ce récepteur au sein de matrices complexes (Pillon et al, 2005, Riu et al, 2008). Dans tous les cas, des étapes de sous-fractionnement sont souvent nécessaires pour affiner l'isolement des molécules actives et optimiser leur identification.
- une phase d'identification des composés suspectés (Brack, 2003). Lorsque la complexité du mélange est réduite à seulement quelques composés, les fractions actives sont soumises à une identification et une quantification chimique par des méthodes d'analyse physico-chimiques. La chromatographie en phase gazeuse couplé à une spectrométrie de masse (GC/MS) est la méthode la plus employée dans le cas de polluants organiques (Thomas et al, 2001). Une combinaison de méthodes (spectrométrie de masse, RMN, spectrométrie UV-visible...) peut et dans certains doit être employée selon les composés et le degré d'identification moléculaire recherchés (Brack, 2003).
- une phase de confirmation. Une fois la molécule identifiée, il s'agit de pouvoir caractériser son effet biologique, *in vitro* mais aussi idéalement *in vivo*. L'étape de confirmation est essentielle pour établir une relation de cause à effet fiable et fournir une information utilisable pour la caractérisation du danger. Pour cela, il convient de disposer de la substance pure, obtenue commercialement ou de la synthétiser.

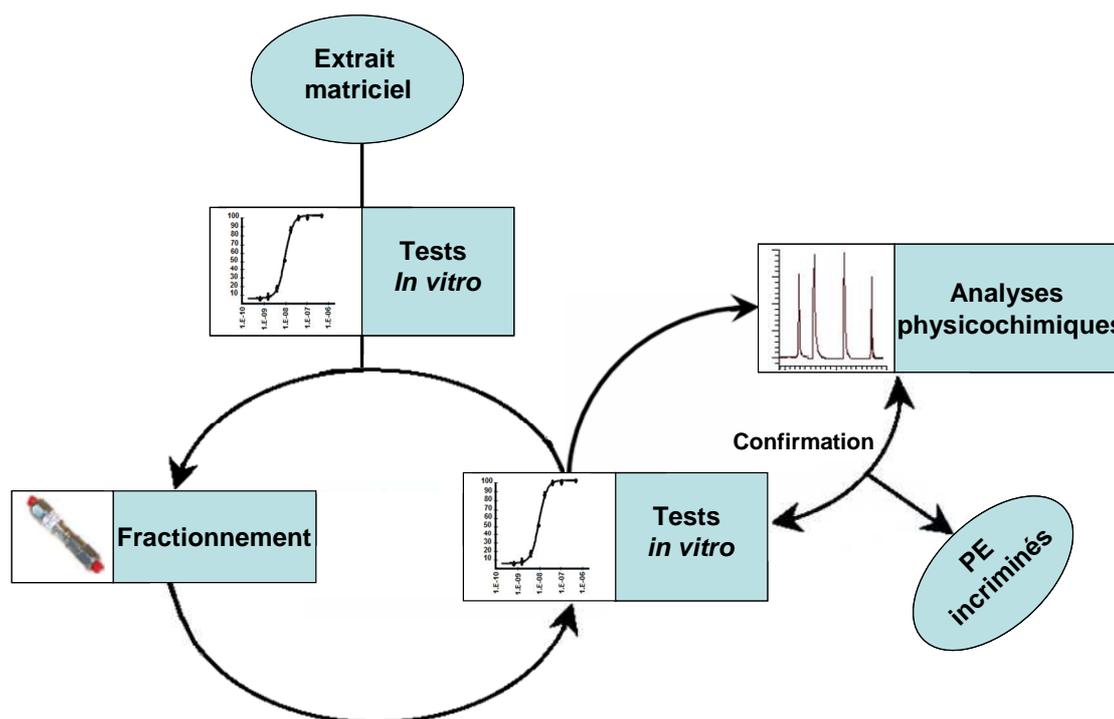


Figure 5 : Principe de l'approche EDA (*Effect Directed Analyses*) selon Brack (2003).

De par leur rapidité, bonne sensibilité et le fait de pouvoir travailler avec de petits volumes d'échantillons, les modèles *in vitro* avec gène rapporteur sont particulièrement adaptés pour être utilisés dans le cadre de ce type d'approche. Dans le cadre des polluants PE, cette approche a ainsi permis d'identifier avec succès de nouveaux composés actifs dans les milieux aquatiques (Thomas et al., 2002 ; Burnison et al., 2003 ; Grung et al., 2007) et constitue une méthodologie unique pour acquérir de nouvelles données sur l'état de contamination et compléter l'évaluation des risques de sites impactés.

Au contraire des méthodes TIE utilisant les bioessais aquatiques, l'utilisation de l'approche EDA intégrant des tests *in vitro* avec gène rapporteur pour l'identification de perturbateurs endocriniens est relativement récente. De fait, s'il y a consensus sur le principe de l'EDA, il n'existe pas aujourd'hui de méthode bio-analytique standardisée pour l'identification de perturbateurs endocriniens, les protocoles rapportés dans la bibliographie impliquant des stratégies d'extraction, de fractionnement et de bio-détection qui peuvent varier d'une étude à l'autre.

L'EDA est actuellement la seule approche qui permette de caractériser une pollution environnementale en l'absence de données *a priori* et d'identifier les polluants responsables. Elle nécessite cependant un investissement conséquent en termes d'équipements et de temps d'analyse. Son utilisation peut donc être envisagée dans une optique d'identification de polluants actifs et de caractérisation du danger sur un (des) site(s) donné(s), mais elle reste encore trop lourde pour être envisagée en routine dans le cadre d'un réseau de surveillance à grande échelle.

4. PERSPECTIVES POUR LA BIOSURVEILLANCE

Dans une perspective d'utilisation en routine, ces méthodes *in vitro*, qui sont adaptées au criblage de substances et d'échantillons, présentent certaines spécificités par rapport aux outils réglementaires actuels de bio-surveillance, tant du point de vue du concept analytique que sur le plan de la réalisation technique et du coût des bioessais.

En termes de coût, les tests *in vitro* en eux-mêmes (hors préparation d'échantillon) sont compétitifs par rapport aux analyses chimiques. Selon les laboratoires, le coût d'analyse d'un échantillon est de l'ordre de 100 à 200 euros par échantillon. A titre d'exemple comparatif, l'analyse chimique des composés dioxin-like (dioxines, furanes) varie de 500 à 1000 euros par échantillon, selon les laboratoires. Dans le cadre de programmes de surveillance de ces substances, l'introduction de ces tests dans les stratégies analytiques, en remplacement partiel ou en complément aux analyses chimiques, peut donc s'avérer particulièrement intéressante pour réduire les coûts et/ou augmenter les informations sur l'état de contamination du milieu.

Cet avantage est néanmoins à pondérer par le traitement amont de l'échantillon brut qui peut constituer une part significative de la bio-analyse. En effet, dans une majorité de cas, l'échantillon qui sera *in fine* testé dans le bioessai *in vitro* est un extrait organique de l'échantillon brut (sédiment, effluent ou autre), généralement plus concentré que l'échantillon de départ. Cette étape préalable de pré-concentration ou de purification de l'échantillon peut être plus ou moins contraignante et nécessiter une mise au point spécifique en fonction du type d'échantillon (eaux, sédiment, biote) ou des familles de molécules recherchées (e.g. ligands très hydrophobes ou polaires). Une fois établis, ces protocoles sont cependant routiniers pour des laboratoires d'analyse environnementale et s'ils ne constituent pas un frein méthodologique, ils peuvent néanmoins augmenter le temps de traitement de l'échantillon et donc le coût de la bio-analyse.

Cependant dans de nombreux cas, le choix de la méthode dépendra avant tout du niveau d'information recherchée et de la stratégie à adopter en fonction de l'objectif fixé. Par exemple, dans une démarche de criblage de sites, les tests *in vitro* peuvent contribuer significativement à réduire les coûts de détection, notamment vis-à-vis de familles de contaminants bien identifiés comme les dioxines et composés dioxin-like. Dans une optique d'identification de polluants toxiques dans un contexte donné, les analyses chimiques restent incontournables. Dans ce cas, une démarche combinant tests *in vitro* et analyses peut être pertinente pour optimiser et orienter l'identification et tout en minimisant les coûts.

Enfin, si de nombreux outils ont été établis et ont prouvé leur fonctionnalité dans le cadre de programmes de recherche *in situ*, peu d'études inter-laboratoires ont été rapportées et il n'existe pas de méthodes standardisées. Actuellement, chaque laboratoire utilise ses propres outils ou ceux disponibles commercialement et validés du point de vue scientifique. En ce qui concerne les tests *in vitro*, une solution à ce manque viendra certainement du contexte réglementaire puisque des tests *in vitro* d'œstrogénicité et d'androgénicité sont en cours d'évaluation dans le cadre de validations inter-laboratoires menées par l'ECVAM (European Center for validation of Alternative Methods) et l'OCDE. Des méthodes *in vitro* standardisées d'évaluation de l'œstrogénicité et de l'androgénicité des substances chimiques devraient donc être bientôt proposées.

Globalement, ces nouvelles approches bio-analytiques ont un fort potentiel tant pour compléter l'évaluation des risques liés aux substances chimiques que pour la surveillance de la pollution chimique en permettant la détection de molécules à l'état de traces dans le milieu et non prises en compte par les normes réglementaires. Ceci s'est traduit ces dernières années par un accroissement exponentiel de l'intégration de ces méthodes dans le cadre de programmes de recherche pluridisciplinaires portant sur la caractérisation des contaminants et leur bio-surveillance dans les milieux aquatique, non seulement en Europe mais aussi au niveau mondial. Dans ce contexte, des pays comme la Hollande et le Royaume-Uni font figure de précurseurs puisque, à la fin des années 90, ils ont été à l'initiative des premiers programmes de suivi *in situ* à grande échelle en intégrant les outils *in vitro* (Pickering and Sumpter, 2003 ; Vethaak et al, 2005). Actuellement en France, il existe à notre connaissance très peu de laboratoires ou de structure unique qui combinent la double compétence analyse environnementale et test *in vitro*, la majorité des études françaises publiées impliquant un partenariat entre au moins deux laboratoires. C'est moins vrai à l'échelle européenne où plusieurs centres de recherche et instituts publiques, comme par exemple l'université de Leipzig (Allemagne), l'IVM (Hollande), VITO (Belgique), l'EAWAG (Suisse) ont mis en œuvre des structures transversales dédiées à la bio-analyse.

Parmi les principales actions menées actuellement en Europe, citons par exemple le programme de recherche européen MODELKEY (2005-2010), coordonné par l'Université de Leipzig en Allemagne (<http://www.modelkey.org/>), et qui vise à promouvoir le développement des méthodes bio-analytiques, en particulier les approches EDA, en appui à la DCE. Le réseau NORMAN (http://www.norman-network.net/index_php.php), coordonné par l'INERIS, qui regroupe un grand nombre de laboratoires européens, a pour vocation de fédérer les actions de surveillance des polluants émergents, avec une large part réservée aux approches bio-analytiques. En France, le projet SURVAQUA (2006-2009) du programme national de recherche sur les perturbateurs endocriniens (PNRPE) vise, sur une dizaine de sites soumis à divers contextes de pollution (mixtes, agriculture, station d'épuration, industrie) à évaluer le niveau de contamination par les perturbateurs endocriniens (œstrogènes, androgènes, dioxine-like) et leurs impacts sur les organismes (poissons, invertébrés). Ce programme met en œuvre diverses compétences comme les outils bio-analytiques *in vitro*, les biomarqueurs chez le poisson et la chimie analytique. Il devrait notamment fournir des informations sur la pertinence des tests *in vitro* au regard de mesures plus intégrées comme les biomarqueurs.

5. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Brack, W., 2003. Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, 397-407.
- Brack, W., Schirmer, K., Erdinger, L., Hollert, H., 2005. Effect-directed analysis of mutagens and ethoxyresorufin-O-deethylase inducers in aquatic sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24, 2445-2458.
- Behnisch, P.A., Hosoe, K., Sakai, S., 2001. Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds - a review of bioassays/biomarker technology. *Environ. Int.*, 27, 413-439.
- Burnison, B.K., Hartmann, A., Lister, A., Servos, M.R., Ternes, T., Van Der Kraak, G., 2003. A toxicity identification evaluation approach to studying estrogenic substances in hog manure and agricultural runoff. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22, 2243-2250.
- Cargouet, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y., 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment*, 324, 55-66.
- Eggen, R.I.L., Segner, H., 2003. The potential of mechanism-based bioanalytical tools in ecotoxicological exposure and effect assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, 386-396.
- Fenet, H., Gomez, E., Pillon, A., Rosain, D., Nicolas, J.C., Casellas, C., Balaguer, P., 2003. Estrogenic activity in water and sediments of a French river: contribution of alkylphenols. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 1-6.
- Giesy, J.P., Hilscherova, K., Jones, P.D., Kannan, K., Machala, M., 2002. Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Marine Pollution Bulletin*, 45, 3-16.
- Grung, M., Lichtenthaler, R., Ahel, M., Tollefsen, K.E., Langford, K., Thomas, K.V., 2007. Effects-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia. *Chemosphere*, 67, 108-120.
- Kinani, S., Bouchonnet, S., Bourcier, S., Creusot, N., Porcher, J.M., Aït-Aïssa, S., 2008. Extraction and purification procedures for simultaneous quantification of phenolic xenoestrogens and steroid estrogens in river sediment by gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22, 3651-3661.

- Kinani S., Bouchonnet S., Creusot N., Bourcier S., Balaguer P., Porcher J.-M., Aït-Aïssa S. Bioanalytical characterisation of endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Soumis*.
- Leonards, P. et M. Lamoree (2006). "Protocol for the integration of chemical and biological techniques to enable linkage of chemical and biological data". NORMAN protocol guidelines, http://www.norman-network.net/index_php.
- Louiz, I., Kinani, S., Gouze, M.E., Ben-Attia, M., Menif, D., Bouchonnet, S., Porcher, J.-M., Ben-Hassine, O.K., Aït-Aïssa, S., 2008. 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*, 402, 318-329.
- Pickering, A.D., Sumpter, J.P., 2003. Comprehending endocrine disrupters in aquatic environments. *Environmental Science & Technology*, 37, 331A-336A.
- Pillon, A., Boussioux, A.M., Escande, A., Aït-Aïssa, S., Gomez, E., Fenet, H., Ruff, M., Moras, D., Vignon, F., Duchesne, M.J., Casellas, C., Nicolas, J.C., Balaguer, P., 2005. Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor alpha : Application to environmental analysis. *Environmental Health Perspectives*, 113, 278-284.
- Riu, A., Balaguer, P., Perdu, E., Pandelova, M., Piccinelli, R., Gustafsson, J.A., Ledercq, C., Schramm, K.W., Dagnino, S., Debrauwer, L., Cravedi, J.P., Zalko, D., 2008. Characterisation of bioactive compounds in infant formulas using immobilised recombinant estrogen receptor-alpha affinity columns. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 3268-3278.
- Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M., Kuiper, R.V., Legler, J., Murk, T.A.J., Peijnenburg, W., Verhaar, H.J.M., de Voogt, P., 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere*, 59, 511-524.