

# Recherche et identification de polluants chimiques perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques : approche bioanalytique

Selim Ait-Aissa, Nicolas Creusot, Saïd Kinani, Jean-Marc Porcher

## ► To cite this version:

Selim Ait-Aissa, Nicolas Creusot, Saïd Kinani, Jean-Marc Porcher. Recherche et identification de polluants chimiques perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques : approche bioanalytique. Rapport Scientifique INERIS, 2009, 2008-2009, pp.18-20. ineris-01869238

**HAL Id: ineris-01869238**

**<https://hal-ineris.archives-ouvertes.fr/ineris-01869238>**

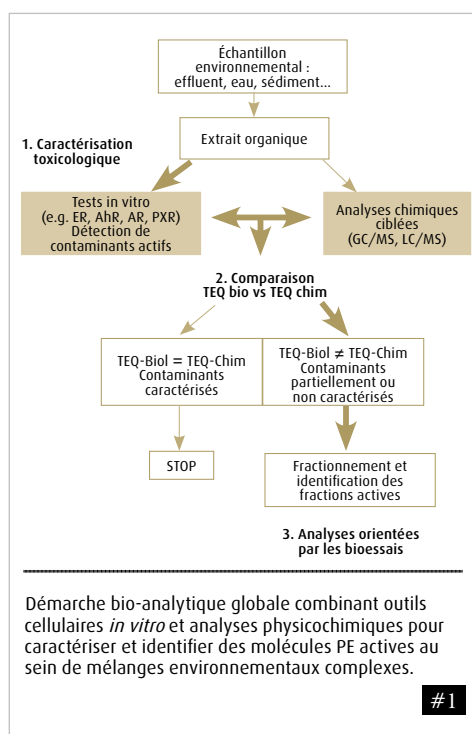
Submitted on 6 Sep 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Recherche et identification de polluants chimiques perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques : approche bio-analytique

{ S. Aït-Aïssa, N. Creusot, S. Kinani, J.M. Porcher }



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 : quelles substances et comment les surveiller ? La Directive européenne sur l'eau (DCE) n'a que partiellement répondu au problème en définissant une liste de 41 substances prioritaires. En effet, 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. La multiplicité de ces polluants, présents le plus souvent à de faibles concentrations et pour lesquels peu d'information (éco) toxicologique est disponible, pose clairement la question du risque associé aux expositions chroniques des faibles doses et des mélanges complexes et de l'évaluation de ce risque. À l'interface entre approches analytiques pures et bioessais classiques d'écotoxicité, le développement de nouvel-

les approches bio-analytiques de détection basées sur les mécanismes de toxicité peut avantageusement compléter, voire dans certains cas remplacer les outils existants.

## Objectifs

Dans le cas des polluants organiques et des perturbateurs endocriniens (PE) en particulier, l'utilisation des méthodes biologiques *in vitro* basées sur le mécanisme d'action toxique des substances permet une détection rapide, spécifique et quantitative (i.e. par détermination d'équivalents-toxiques ou TEQ) de substances actives au sein de mélanges complexes. Le couplage de ces tests avec des méthodes physicochimiques dans le cadre d'approches intégrées (figure 1) constitue une stratégie nouvelle et très prometteuse pour identifier les substances toxiques présentes dans l'environnement. La méthodologie globale mise en œuvre à l'INERIS, en partenariat avec des laboratoires extérieurs, repose sur le couplage entre outils bio-analytiques (e.g. tests *in vitro*), méthodes de fractionnement physico-chimique (e.g. HPLC semi-préparative) et outils de chimie analytique (e.g. spectrométrie de masse).

## Résultats

### Détermination d'équivalents-toxiques par les bioessais

Dans le cadre de nos travaux, nous avons montré l'applicabilité des tests *in vitro* pour évaluer la présence de perturbateurs endocriniens à activité œstrogénique et (anti) an-

drogénique et de composés à mode d'action analogue à la dioxine (*dioxin-like*) dans des extraits de sédiments et d'eaux de rivières, dans différents contextes de pollution [David *et al.* soumis ; Louiz *et al.* 2008 ; Michallet-Ferrier *et al.* 2004 ; Pillon *et al.* 2005]. Ces premières études ont permis d'évaluer l'imprégnation des sites étudiés par ces familles de composés en dressant des profils de toxicité, tout en soulevant la nécessité d'aller plus avant dans l'identification des molécules actives détectées par les tests *in vitro*.

### Couplage tests *in vitro* et analyses chimiques

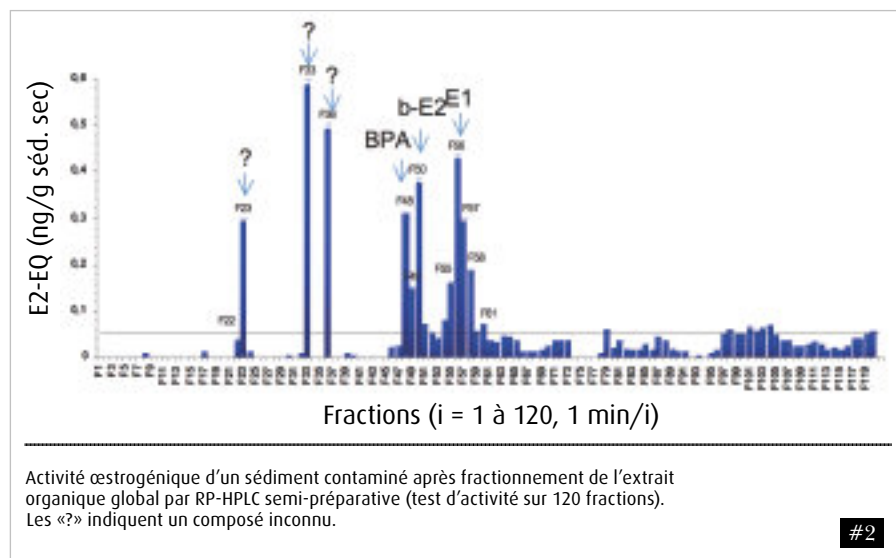
Une approche bio-analytique couplant différents tests *in vitro* et analyses chimiques a été mise en œuvre dans le cadre d'une thèse de doctorat réalisée en collaboration avec le Laboratoire de chimie réactionnelle de l'École polytechnique [Kinani 2009]. Cette démarche a été appliquée à 5 sites du Nord de la France différemment impactés en terme de qualité de l'eau et de réponses de biomarqueurs mesurées chez les poissons autochtones [Sanchez *et al.* 2007].

Du point de vue méthodologique, cette étude a permis le développement et la validation de méthodes d'analyses (GC/MS, LC/MS) de différentes classes de PE (hormones naturelles et synthétiques, mycotoxines, cosmétiques, pesticides, HAPs...) comprenant plus de 50 molécules cibles [Kinani *et al.* 2008a ; Kinani *et al.* 2008b]. Leur application à la détection de ces molécules dans les sédiments a mis en évidence la présence de divers polluants classiques (HAPs, pesticides) et émergents (*e.g.* hormones estrogènes : estradiol, œstrone, Bisphénol A, alkylphénols, parabènes, métabolites de la zéaralénone) sur les sites les plus impactés (Kinani *et al.* sous presse). La comparaison de ces données analytiques avec un panel d'activités PE *in vitro* (*i.e.* œstrogéniques, (anti) androgéniques, HAP-like, dioxin-like et PXR) a montré une bonne complémentarité entre les deux approches. Concernant les activités œstrogéniques par exemple, la quasi-totalité des activités mesurées par le test MELN est expliquée par les hormones naturelles, œstradiol et œstrone, mesurées sur les sites les moins pollués. En revanche sur les deux sites les plus impactés, ces hormones n'expli-

quent que 28 et 35 % de l'activité révélée par le bioessai, suggérant la présence d'autres substances œstrogéniques non initialement ciblées par les analyses. Des observations similaires ont été obtenues avec les activités HAP-like, les concentrations en 16 HAPs prioritaires n'expliquant que 12 à 60 % des activités biologiques mesurées. Enfin, les tests *in vitro* ont permis de détecter et de quantifier des activités androgéniques, anti-androgéniques (test MDA-kb2) et PXR (test HG-hPXR) sur certains sites. Cependant, les molécules initialement ciblées par les analyses, dont certaines sont actives dans ces tests, étaient détectées à des concentrations trop faibles pour expliquer les effets observés [Kinani *et al.*, sous presse].

### Isolement des molécules actives par fractionnement HPLC

Pour tenter d'identifier les molécules œstrogéniques détectées sur les sites très impactés, un échantillon correspondant à un site très contaminé a été fractionné par HPLC en phase inverse et chaque fraction a été testée sur cellules MELN. Le résultat (figure 2) confirme la présence d'œstrone (E1), d'œstradiol (E2) et de bisphénol A (BPA) comme contributeurs majoritaires de l'activité œstrogénique globale. De plus, il montre également la présence dans l'échantillon de molécules plus polaires qui présentent une forte activité œstrogénique (fractions 23, 33, 36), confirmant ainsi l'hypothèse de la présence de molécules actives non initialement ciblées par les analyses chimiques.



### RÉFÉRENCES

- David A., Gomez E., Aït-Aïssa S., Casellas C., Fenet H. (soumis). Impact of urban wastewater discharges on the sediments of a small Mediterranean river and associated coastal environment: assessment of estrogenic and dioxin-like activities.
- Kinani S., 2009. Caractérisation et dosage de substances chimiques à activité de perturbation endocrinienne dans des sédiments aquatiques ; développement d'une approche couplant tests biologiques *in vitro* et méthodes physico-chimiques d'analyse. Thèse de Doctorat, École polytechnique, Palaiseau.
- Kinani S., Bouchonnet S., Bourcier S., Creusot N., Porcher J.M., Aït-Aïssa S., 2008a. Extraction and purification procedures for simultaneous quantification of phenolic xenoestrogens and steroid estrogens in river sediment by gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22, 3651-3661.
- Kinani S., Bouchonnet S., Bourcier S., Porcher J.-M., Aït-Aïssa S., 2008b. Study of the chemical derivatization of zearalenone and its metabolites for gas chromatography-mass spectrometry analysis of environmental samples. *Journal of Chromatography A* 1190, 307-315.

## RÉFÉRENCES

Kinani S., Bouchonnet S., Creusot N., Bourcier S., Balaguer P., Porcher J.-M., Ait-Aïssa S. (Sous presse). Bioanalytical characterisation of multiple endocrine and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environment Pollution*.

Louiz I., Kinani S., Guze M.E., Ben-Attia M., Menif D., Bouchonnet S., Porcher J.-M., Ben-Hassine O.K., Ait-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). *Sci. Total Environ.* 402, 318-329.

Michallet-Ferrier P., Ait-Aïssa S., Balaguer P., Dominik J., Haffner G.D., Pardos M., 2004. Assessment of estrogen (ER) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediated activities in organic sediment extracts of the Detroit River, using *in vitro* bioassays based on human MELN and teleost PLHC-1 cell lines. *J. Great Lakes Res.* 30, 82-92.

Pillon A., Boussioux A.M., Escande A., Ait-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. *Environ. Health Perspect.* 113, 278-284.

Sanchez W., Ait-Aïssa S., Palluel O., Ditche J.M., Porcher J.-M., 2007. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* 16, 279-287.

## Conclusions et perspectives

Les études menées ont vu la mise en place et la validation d'une démarche bio-analytique couplant méthodes physicochimiques et tests *in vitro* pour la caractérisation des PE dans le milieu aquatique. Elles ont apporté des informations nouvelles sur l'occurrence de molécules PE actives dans des sites français avec des premiers éléments de réponses sur l'identité des molécules détectées par les tests biologiques *in vitro* et sur la présence environnementale de molécules (anti)androgéniques et à activité PXR, qui sont actuellement peu ou pas décrites, en comparaison aux substances œstrogéniques et dioxin-like. Ces études ont ainsi montré la nécessité de s'intéresser à d'autres types d'activités PE présentes sur les sites étudiés et jusque-là très peu étudiées dans l'environnement ; il s'agit notamment des activités (anti)an-

drogénique ou PXR. L'identification de la nature des substances détectées par ces tests constitue une des perspectives de recherche.

Une autre perspective de ce travail consiste à améliorer la démarche bio-analytique mise en œuvre en intégrant de nouvelles méthodes de fractionnement et de purification des PE, comme par exemple, l'utilisation de colonnes d'affinités aux récepteurs nucléaires [Pillon *et al.* 2005]. Ce travail fait l'objet d'un projet qui sera mené en collaboration avec des laboratoires extérieurs (INSERM U896, INRA UMR Xénobiotiques, ISM-LPTC) dans le cadre du Pôle national applicatif en Toxicologie et Écotoxicologie. *In fine*, ces études devraient apporter de nouvelles informations sur le type et la nature de la contamination des milieux aquatiques par les polluants à caractère PE.

## ABSTRACT

Bio-analytical approaches that combine *in vitro* biological tools and chemical analyses have been developed and used to identifying endocrine disrupting chemicals (EDCs) and dioxin-like compounds in environmental matrices such as effluents, surface waters or river sediments. By using a panel of *in vitro* bioassays based on cultured reporter cell lines, our study revealed the presence of multiple endocrine active chemicals (i.e. chemicals that interfere with estrogen, androgenic and pregnane X receptors) and dioxin-like compounds in sediments from various French river sites. Chemicals analyses of several EDCs including steroid hormones, mycotoxins, UV-screens, alkylphenols, parabens, pesticides and PAHs confirmed multiple contamination at the most active sites as determined by the bioassays. On the basis of toxic-equivalent concentrations (TEQs), an overall good correlation was noted between biological and chemical approaches. For instance, PAHs were found as major contributors to the dioxin-like activities while the natural steroid estrogens, estradiol and estrone, explained most of the estrogenic activities. However, at the most impacted sites, targeted chemical analyses were only partly explicative of the biological activities measured in the samples suggesting that non analyzed pollutants were also present in the samples. Indeed, fractionation of the samples (RP-HPLC) and testing of the fractions with the bioassays revealed the presence of other unknown estrogenic chemicals that remain to be identified.