

# **VALIDATION DE LA MESURE DE L'ACTIVITÉ OESTROGÉNIQUE DANS LES MATRICES ENVIRONNEMENTALES - Revue bibliographique -**

**Thème G - Méthodes et technologies innovantes**

**S. AÏT-AÏSSA, N. CREUSOT**

Décembre 2015

Programme scientifique et technique  
Année 2014

Rapport final



## Contexte de programmation et de réalisation

---

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du programme d'activité AQUAREF pour l'année 2014, thème G « Méthodes et technologies innovantes » / action G3b « Outils bio-analytiques ».

Auteur (s) :

*Sélim AÏT-AÏSSA*  
INERIS  
[Selim.AIT-AISSA@ineris.fr](mailto:Selim.AIT-AISSA@ineris.fr)

*Nicolas CREUSOT*  
INERIS  
[Nicolas.creusot@ineris.fr](mailto:Nicolas.creusot@ineris.fr)

Référence INERIS : DRC-15-136927-12327A

Vérification du document :

*Olivier Geffard*  
IRSTEA  
[olivier.geffard@irstea.fr](mailto:olivier.geffard@irstea.fr)

## Les correspondants

---

Onema : Pierre-François STAUB, [pierre-francois.staub@onema.fr](mailto:pierre-francois.staub@onema.fr)  
Olivier PERCEVAL, [olivier.perceval@onema.fr](mailto:olivier.perceval@onema.fr)

INERIS : Selim AIT-AISSA, [Selim.AIT-AISSA@ineris.fr](mailto:Selim.AIT-AISSA@ineris.fr)

Référence du document : S. AÏT-AÏSSA, N. CREUSOT - Validation de la mesure de l'activité œstrogénique dans les matrices environnementales - Revue bibliographique.  
Rapport AQUAREF DRC-15-136927-12327A, 2014 - 30 p.

<b>Droits d'usage :</b>	<i>Accès libre</i>
Couverture géographique :	<i>International</i>
Niveau géographique :	<i>National</i>
Niveau de lecture :	<i>Professionnels, experts</i>
Nature de la ressource :	<i>Document</i>

# SOMMAIRE

<b>RESUME .....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCTION.....</b>	<b>6</b>
<b>2. METHOLOGIE D'EVALUATION DE L'OESTROGÉNICITÉ DE MELANGES COMPLEXES.....</b>	<b>8</b>
2.1 Procédure générique .....	8
2.2 La preparation des echantillons.....	9
2.2.1 Le sédiment .....	9
2.2.1.1 Échantillonnage .....	9
2.2.1.2 Extraction.....	10
2.2.1.3 Purification ou clean-up.....	10
2.2.2 Eaux de surface & effluents .....	11
2.2.2.1 Echantillonnage.....	11
2.2.2.2 Filtration & extraction.....	12
2.2.3 Conclusions .....	13
2.3 Les bioessais in vitro .....	13
2.3.1 Définitions.....	13
2.3.2 Description & utilisation des modeles in vitro .....	14
2.3.2.1 Bioessais basés sur l'utilisation d'un gène rapporteur .....	15
2.3.2.2 Bioessais basés sur la prolifération cellulaire .....	16
2.3.2.3 Performances analytiques des différents modèles .....	16
2.4 Le traitement & l'interpretation des donnees .....	19
2.5 Conclusions.....	20
<b>3. PERSPECTIVES : OUTILS BIO-ANALYTIQUES &amp; ÉVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL .....</b>	<b>21</b>
3.1 Profilage toxicologique in vitro multi-récepteurs .....	22
3.2 Vers l'utilisation combinée des bioessais in vitro & in vivo.....	22
3.2.1 Intérêt des tests embryo-larvaires pour la bio-analyse.....	22
3.2.2 Une démarche intégrée <i>in vitro</i> & <i>in vivo</i> .....	24
<b>4. CONCLUSIONS.....</b>	<b>24</b>
<b>5. RÉFÉRENCES.....</b>	<b>26</b>

## **RESUME**

### **Résumé**

---

L'objet de ce rapport est de dresser un état de l'art non exhaustif sur les méthodes bio-analytiques actuellement utilisées pour mesurer le potentiel œstrogénique de matrices environnementales de type sédiment, effluent et eau de surface. Dans une première partie, nous décrivons la méthodologie globale d'évaluation de l'œstrogénicité par les bioessais *in vitro* et les enjeux actuels associés aux grandes étapes de cette mesure, i.e. préparation d'échantillon, bioessais *in vitro*, traitement et interprétation des données. La seconde partie du rapport présente quelques perspectives associées à l'utilisation de la bio-analyse pour la surveillance de la qualité chimique dans une optique d'évaluation du danger pour les organismes aquatiques.

Ce rapport est un préalable aux actions d'inter-comparaison et de validation de ces outils, supportées par AQUAREF, en vue de la standardisation d'une méthodologie d'évaluation du potentiel œstrogénique par des outils bio-analytiques *in vitro* et de leur application pour la surveillance des milieux aquatiques.

### **Mots clés (thématique et géographique)**

---

Bio-analyse, bioessais *in vitro*, activité œstrogénique, équivalents-œstradiol, eaux de surface, sédiments

## 1. INTRODUCTION

Les systèmes aquatiques sont aujourd'hui contaminés par une diversité de composés organiques. Parmi ces contaminants, certains sont qualifiés de **perturbateurs endocriniens** (PE) de par leur capacité à altérer le fonctionnement normal du système endocrinien et engendrer des effets sur la reproduction, le développement ou l'homéostasie d'un organisme et/ou de sa descendance. Au niveau moléculaire et cellulaire, la perturbation endocrinienne implique divers mécanismes d'action, parmi lesquels, l'interaction avec les récepteurs nucléaires a été bien caractérisée. Dans l'environnement aquatique, la présence de composés capables d'interagir avec le récepteur des œstrogènes, a été associée à la féminisation de poissons (Desbrow et al. 1998) avec des répercussions à l'échelle de la population (Kidd et al. 2007). Ainsi, en raison des risques encourus par les populations exposées, une attention croissante a été portée sur ces composés durant la dernière décennie. Au niveau réglementaire, cela c'est traduit en 2013 par la volonté d'inclure dans la liste de vigilance (**watch-list**) de la directive fille (2013/39/EU) de la directive cadre sur l'eau (DCE), l'œstradiol ( $E_2$ ) et l'éthinyl-œstradiol ( $EE_2$ ).

Si la décision d'inclure l' $E_2$  et l' $EE_2$  est une avancée positive, elle se confronte aujourd'hui à des difficultés techniques du fait des niveaux traces de ces contaminants dans l'environnement aquatique et de leur effet à faibles doses qui ont conduit à la définition de normes de qualité environnementale (**NQE**) très basses (i.e. 0.4 ng/L pour l' $E_2$  et 0.035 ng/L pour l' $EE_2$ ). Ainsi, les laboratoires en charge des analyses chimiques pour la surveillance en routine de l'état chimique ne disposent pas actuellement de méthodes suffisamment sensibles pour analyser ces composés. Si de telles méthodes sont actuellement disponibles au sein de laboratoires académiques ou privés, leur transfert vers les laboratoires de routine implique un investissement financier conséquent. Par conséquent, pour répondre aux besoins d'analyse de l' $E_2$  et l' $EE_2$ , le recours à d'autres méthodes, telles que les méthodes basées sur les bioessais, trouve un intérêt dans ce cadre réglementaire. Le réseau AQUAREF s'inscrit dans cette mission dont un des objectifs est de proposer et valider de nouvelles méthodes pour la surveillance de la qualité chimique des milieux aquatique, en appui à la DCE.

Si les **analyses chimiques** constituent aujourd'hui des méthodes de choix pour l'évaluation de la qualité chimique des masses d'eau, elles ne fournissent qu'une vision partielle de la complexité de la contamination environnementale et du danger (éco)toxique associé (i.e. ciblées uniquement sur les composés actifs connus, non prise en compte des effets de mélange). Dans ce contexte, les méthodes de détection biologiques, dite **bio-analytiques**, ont vu leur utilisation croître ces dernières années. Une diversité d'outils est aujourd'hui disponible pour répondre aux enjeux de la surveillance de la qualité chimique des milieux aquatiques. Basées sur l'utilisation de bioessais *in vitro* et/ou *in vivo*, elles permettent la détection sensible, spécifique et intégrative d'effets de polluants actifs au sein de matrices environnementales complexes. En particulier les bioessais *in vitro* basés sur le mécanisme d'action des polluants s'imposent de plus en plus comme une alternative pertinente aux analyses chimiques pour détecter la présence dans l'environnement aquatique de polluants émergents d'intérêt (éco)toxicologique tels que les composés œstrogène-mimétiques et les quantifier (i.e. œstrogènes-équivalents) (Ait-Aïssa 2009, Aït-Aïssa et Creusot 2011). Actuellement, un nombre significatif de laboratoires de recherche (académiques, institutionnels ou privés) utilisent ce type d'approche pour détecter ces molécules au sein de mélanges complexe. De plus, l'utilisation de ces outils dans la surveillance de l'état chimique s'inscrit dans les perspectives de la directive fille, avec la "future application d'outils pour la surveillance autre que substance par substance" (récital 18, 2013/39/EU).

Dans le cas plus particulier des composés œstrogéno-mimétiques, une diversité d'outils biologiques *in vitro* sont actuellement disponibles pour répondre aux enjeux de la surveillance de l'E<sub>2</sub> et l'EE<sub>2</sub> (Kunz et al. 2015). Toutefois, à ces multiples outils sont associés une diversité de pratiques différentes. Aussi, si les différents tests existant sont valides du point de vue biologique et sont *a priori* équivalents en termes de spécificité (mais pas de sensibilité), il existe aujourd'hui un besoin d'harmonisation des méthodes employées pour leur application à la détection de composés actifs, en particulier l'E<sub>2</sub> et l'EE<sub>2</sub>, dans des échantillons environnementaux.

Dans ce contexte, l'objectif de l'action menée dans le cadre d'AQUAREF est de **contribuer à la standardisation de la méthodologie d'évaluation d'œstrogènes-équivalents au sein de diverses matrices environnementales complexes à l'aide de bioessais *in vitro***. Pour mener à bien ce travail, il paraissait nécessaire de dresser au préalable un état de l'art non exhaustif sur les méthodes utilisées actuellement pour mesurer le potentiel œstrogénique de matrices environnementales de type sédiment, effluent et eau de surface, ce qui fait l'objet du ce présent rapport bibliographique. L'objectif ici étant de présenter les grands principes de la méthodologie et d'identifier les étapes techniques clés qui peuvent être sources potentielles de variabilité inter-laboratoires, dans une optique de standardisation.

Dans la première partie de ce rapport, nous décrivons la méthodologie globale d'évaluation de l'œstrogénicité par les bioessais et les enjeux actuels associés aux grandes étapes de cette mesure (i.e. préparation d'échantillon, bioessais *in vitro*, traitement et interprétation des données). La seconde partie du rapport présente les perspectives associées à l'utilisation de la bio-analyse pour la surveillance de la qualité chimique dans une optique d'évaluation du danger pour les organismes aquatiques *in situ*.

## 2. METHOLOGIE D'EVALUATION DE L'OESTROGÉNITÉ DE MELANGES COMPLEXES

### 2.1 PROCÉDURE GÉNÉRIQUE

D'une manière générale, la mesure d'une activité œstrogénique d'un échantillon complexe basée sur l'utilisation de bioessais peut se décomposer en trois grandes étapes (Figure 1).

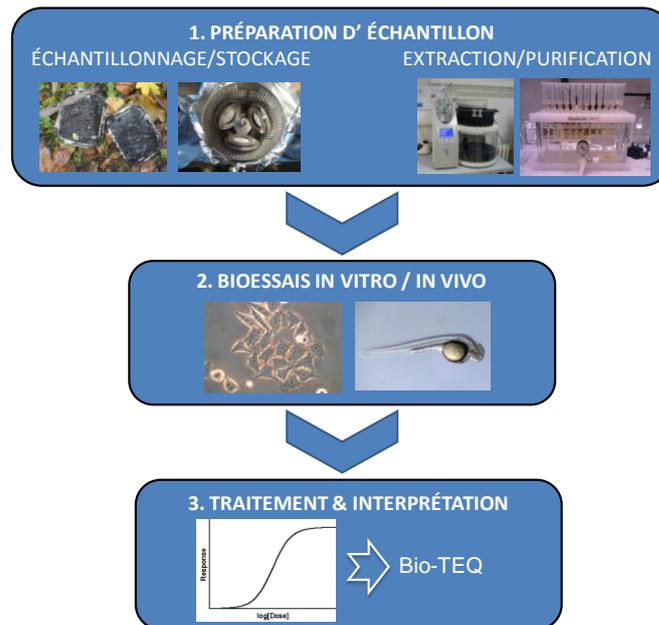


Figure 1 : Principe général de la démarche globale pour l'évaluation du potentiel œstrogénique de matrices environnementales

La première de ces étapes est la préparation de l'échantillon. Elle consiste à prélever puis à préparer l'échantillon en vue de son analyse. Il s'agit d'une étape clef qui peut influencer sur la composition du mélange de composés organiques et donc conditionner significativement les réponses biologiques mesurées en aval. Une multitude de procédures sont actuellement disponibles aussi bien en terme d'échantillonnage, d'extraction que de purification des échantillons.

La seconde étape est la mise en œuvre de bioessais qui va consister à exposer des cellules (*in vitro*) ou des organismes (*in vivo*) aux échantillons en conditions contrôlées au laboratoire afin de détecter et quantifier la présence de xéno-œstrogènes. Le test de l'échantillon est généralement réalisé selon une gamme de dilutions en série permettant l'obtention de courbes dose réponse qui vont servir à rendre compte de la présence ou non de xéno-œstrogènes dans l'échantillon. Nous verrons ci-après qu'un large panel de bioessais existe actuellement pour mesurer le potentiel œstrogénique de matrices environnementales.

La troisième et dernière étape concerne le traitement des données (i.e. modélisation des courbes doses réponses). Il existe actuellement plusieurs méthodologies pour le traitement et l'interprétation des données mais aucune procédure standard n'a pour le moment été définie.

## 2.2 LA PREPARATION DES ECHANTILLONS

La préparation d'échantillon est une étape critique pour la bio-analyse des perturbateurs endocriniens. En effet, de par la diversité des composés actifs, en termes de structures et de propriétés physico-chimiques, elle se doit d'être relativement **exhaustive** et de permettre des analyses biologiques optimales (i.e. limiter les effets de matrices). De plus, dans une optique d'évaluation du risque pour les organismes exposés, elle se doit de rendre compte du mieux possible de l'exposition réelle des organismes en essayant de tenir compte, en particulier, de la biodisponibilité des contaminants. Par ailleurs, si certaines études rapportent la possibilité de tester l'échantillon brut sans extraction préalable, l'hétérogénéité des matrices aussi bien sédimentaires qu'aqueuses rend difficile l'inter-comparaison entre différentes études. Ainsi, l'extraction des composés organiques est quasi-systématique dans le cas du déploiement d'outils bio-analytiques

### 2.2.1 LE SÉDIMENT

Le sédiment est une matrice complexe qui se compose d'eau interstitielle, d'une phase inorganique et d'une phase organique. Cette dernière, de par sa composition chimique et structurale (i.e. granulométrie, pourcentage en carbone organique total) influe sur le transport, la biodisponibilité et l'extraction des composés organiques qu'elle contient (Seiler et al. 2008).

#### 2.2.1.1 Échantillonnage

Un guide concernant l'échantillonnage et le prétraitement d'échantillons de sédiment dans le cadre de la directive cadre sur l'eau a été publié dans le cadre d'AQUAREF (Schivavone et Coquery 2011) et peut servir de support à la réflexion concernant le traitement des sédiment dans un contexte bio-analytique.

L'échantillonnage du sédiment peut-être réalisé à l'aide de différents outils (écope, benne Eckman, carottier) (Figure 2) mais il convient au préalable de définir une stratégie d'échantillonnage, c'est-à-dire de définir le nombre de points de prélèvements (échantillon ponctuel vs composite) ou encore l'épaisseur de la couche prélevée. Le flaconnage utilisé ainsi que les modalités de conservation de échantillons lors du transport sont des éléments clés en vue de la non-altération de l'échantillon avant son arrivé au laboratoire. Suite à l'échantillonnage, c'est principalement le prétraitement de l'échantillon (broyage, homogénéisation) qui peut conditionner les résultats biologiques obtenus en aval bien que cela n'ait jamais été démontré dans le cas de la bio-analyse. En effet, selon la granulométrie du sédiment, l'extractabilité des contaminants organiques peut varier. Par ailleurs, la teneur en carbone organique peut influencer sur les niveaux d'activités mesurées (REF). Il conviendra donc de mesurer le COT et de normaliser les niveaux d'activité biologique par cette valeur de manière à pouvoir comparer différents échantillons.



Figure 2 : Dispositifs pour l'échantillonnage de sédiment  
(a, écope ; b, benne van-Ween ; c, carottier)

### 2.2.1.2 Extraction

Différentes méthodes d'extraction sont disponibles pour préparer les échantillons en vue d'évaluer leur potentiel œstrogénique. Elles diffèrent notamment par leur rapidité, leur consommation et leur composition en solvant, leur possible automatisation et leur coût. Actuellement les techniques les plus utilisées sont l'extraction assistée par micro-onde (MAE) et l'extraction liquide à haute pression (ASE, *accelerated solvent extraction* ou PLE, *pressurized liquid extraction*) car elles permettent une extraction automatisée rapide et efficace d'un grand nombre d'échantillon. Toutefois, il s'agit de méthodes drastiques qui conduisent généralement à la co-extraction de composés matriciels (e.g. acides humiques, sulfures) pouvant interférer avec la réponse biologique (e.g. *quenching*, cytotoxicité), si bien qu'une étape de purification post-extraction est souvent nécessaire (cf. §2.2.1.3).

Par ailleurs, il s'agit généralement de méthodes qui ont été initialement développées et validées sur la base d'un recouvrement chimique d'un nombre limité de composés appartenant à une famille chimique spécifique (e.g. stéroïdes). Ainsi, seulement quelques études se sont focalisées sur le développement de **méthode à large spectre** permettant une mesure du potentiel œstrogénique de sédiments ou de sols de manière optimale (Houtman et al. 2007, Kinani et al. 2008, Creusot 2011). De plus, ces méthodes sont généralement validées sur la base d'analyses chimiques et il semble important à l'avenir de pouvoir les évaluer également d'un point de vue biologique (e.g. recouvrement des activités biologiques).

Enfin, la plupart des méthodes utilisées actuellement permettent l'obtention d'un extrait organique total ne rendant pas compte de la biodisponibilité réelle des contaminants (i.e. fraction désorbable et dissoute libre pouvant circuler à travers les membranes biologiques) et par conséquent pouvant sur-estimer le danger/risque associé à ces composés. Dans ce contexte, plusieurs études se sont penchées sur le développement d'approches permettant de tenir compte de cette biodisponibilité. Il s'agit d'une part de méthodes d'extraction prenant en compte la bio-accessibilité des contaminants (*bioaccessibility-directed extraction*, BDE) (e.g. TENAX, Schwab et al. 2009) et d'autre part de méthodes d'extraction basées sur le partitionnement des contaminants (*partition based-extraction/dosing*, PBE/D) qui considèrent la biodisponibilité des contaminants (e.g. SPMD, *semi permeable membrane device* Leppänen et Kukkonen 2006 ; *Silicone rods*, Bandow et al. 2009).

### 2.2.1.3 Purification ou clean-up

La littérature scientifique rapporte que nombre de composés naturels présents dans le sédiment ou les organismes peuvent interférer avec les analyses chimiques et biologiques. Par exemple, les substances humiques peuvent altérer la biodisponibilité des contaminants organiques *in situ* mais aussi post-extraction (Steinberg et al. 2003, Seiler et al. 2006) alors que les acides humiques semblent pouvoir interagir directement avec les cibles biologiques (e.g. récepteur AhR). Dans le cas de la mesure de l'activité œstrogénique, nous avons pu montrer que les acides humiques réduisaient la réponse du bioessai MELN à l'œstradiol, vraisemblablement en se complexant à ce composé et en limitant son interaction avec le ER (Pany, 2011). L'extraction conduisant généralement à une co-extraction de ces interférents, une étape de purification est donc nécessaire, l'enjeu étant d'éliminer une majorité d'interférents tout en conservant une large gamme de composés actifs.

Une méthode largement employée est la chromatographie par perméation de gel (GPC) permettant une séparation des composés selon la taille des molécules. Elle permet l'élimination de la plupart des interférents, tout en conservant une majorité de composés d'intérêts (Houtman et al. 2007; Simon et al. 2011). Elle reste toutefois fortement

consommatrice en solvant et parfois moins efficace pour certains interférents (i.e. phénomène d'*overloading*, Streck et al. 2008). D'autres méthodes, basées sur la polarité des composés, (e.g. extraction sur phase solide), sont également disponibles. Elles sont plus simples d'utilisation et moins coûteuses mais généralement plus sélectives. Plus récemment des techniques automatisées basées, entre autres, sur le principe de la dialyse ont été développés (Streck et al. 2008). Cette méthode offre de bonnes performances pour l'élimination des lipides et d'autres interférents vis-à-vis de composés hydrophobes de type *dioxin-like* mais son efficacité vis à vis des xéno-œstrogènes, généralement plus polaires, reste à être évaluée.

## 2.2.2 EAUX DE SURFACE & EFFLUENTS

### 2.2.2.1 Echantillonnage

Différents types de prélèvements sont employés pour caractériser le potentiel œstrogénique des matrices aqueuses. Il s'agit généralement de **prélèvements ponctuels** mais qui ne fournissent qu'une image de la contamination à un endroit donné et à un temps donné. De manière à gagner en représentativité, des prélèvements moyennés peuvent être réalisés (entre 24h et 3 jours). C'est généralement le cas pour la caractérisation d'effluents de stations d'épurations pour lesquels il peut survenir d'importantes variations des niveaux de contamination sur de courtes périodes. Concernant les eaux de surface, en raison des niveaux traces de contamination et des épisodes de pollution périodique, l'**échantillonnage passif** (e.g. POCIS- *polar organic compounds integrative sampler*, SPMD, *Chemcatcher*) est de plus en plus fréquemment employé afin d'avoir une vision intégrée de la contamination sur l'ensemble de la période d'échantillonnage tout en pré-concentrant les contaminants (Vermeirssen et al. 2005, Liscio et al. 2009, David et al. 2010, Creusot et al. 2013) (Figure 3). Un autre intérêt de l'échantillonnage passif est de rendre compte de la biodisponibilité des contaminants. En effet, ces dispositifs sont fabriqués de manière à mimer la circulation des contaminants à travers les membranes biologiques (pores de 1 à 100 nm pour les capteurs) et la bioaccumulation se produisant chez certains organismes.



Figure 3 : Différents systèmes d'échantillonnage passif  
(de gauche à droite : POCIS, SPMD et Chemcatcher)

Plus récemment, de nouveaux dispositifs permettant l'**échantillonnage et l'extraction de très grands volumes d'eau** (LV-SPE, 50-1000 L) ont été proposés. Il s'agit de systèmes prototypes évalués dans le cadre de projets de recherche Européen (FP7-EDA-Emerge et FP7-SOLUTION). La possibilité de prélever et extraire sur site 50 à 1000L permet d'envisager d'abaisser très fortement les limites de détection des bioessais (e.g. < 0.1 pg/L) tout en obtenant de grands volumes d'extrait permettant l'application d'un large panel de bioessais et d'analyses chimiques (Schulze et al. 2015). L'évaluation de l'applicabilité de tels dispositifs dans un contexte de surveillance de la qualité de l'eau est en cours dans le cadre de ces programmes Européens.

Concernant la conservation des échantillons, il s'agit pour les prélèvements ponctuels de limiter la photodégradation et la biodégradation des échantillons. L'échantillonnage est

donc généralement réalisé à l'aide de bouteilles ambrées (volume entre 1 et 40 litres) pour réduire la photodégradation alors que la filtration et/ou l'extraction des échantillons sont réalisées dans les 24 à 48h suivant la réception de l'échantillon pour limiter la biodégradation des composés actifs. Les échantillons sont généralement conservés à 4°C avant leur préparation mais ils peuvent être également congelés pour une conservation prolongée (i.e. jusqu'à plusieurs mois). Cette congélation est préférentiellement réalisée dans des bouteilles en polypropylène haute densité non sujette à la casse contrairement aux bouteilles en verre. Certaines études rapportent également l'ajout de méthanol (0,1%) à l'échantillon ou son acidification d'eau pour limiter l'activité bactérienne (Aerni et al. 2004) mais qui n'est pas une solution à préconiser dans le cas de la bio-analyse en raison de la sensibilité des modèles biologiques à ces solvants.

### 2.2.2.2 Filtration & extraction

La préparation des échantillons d'eau ponctuels débute généralement par une étape de filtration. Cette filtration est réalisée à l'aide de filtres en fibre de verre de taille et de porosités différentes selon les matrices considérées (0.45 à 1.2  $\mu\text{m}$ ). Elle a notamment pour but de limiter l'obstruction des cartouches utilisées pour **l'extraction sur phase solide (SPE)** (Figure 4) qui constitue la méthode la plus fréquemment employée pour l'extraction des xéno-œstrogènes dans les matrices aqueuses.

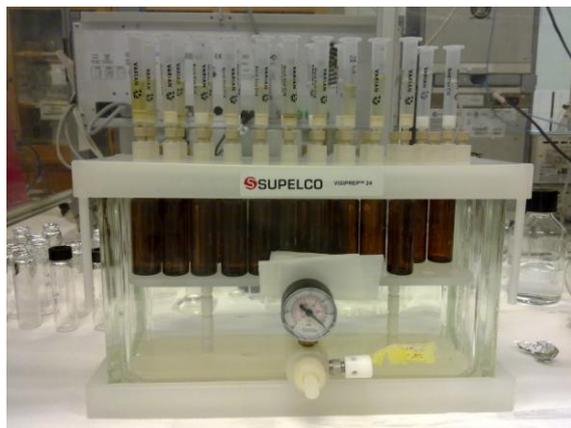


Figure 4 : Système d'extraction sur phase solide

La SPE est réalisée à l'aide de disques ou cartouches constitués de différentes phases adsorbantes. Historiquement, la phase la plus employée a été la C18 (Desbrow et al. 1998, Fenet et al. 2003, Pillon et al. 2005) bien que l'utilisation d'autres phases basées sur le styrène-divinylbenzène ait également été rapportée (ENV+, SBD) (Murk et al. 2002). Récemment, les phases mixtes contenant des fonctions lipophyles et hydrophyles (Oasis HLB, StrataX), permettant d'extraire une gamme plus large de composés actifs avec un rendement optimal (Liu et al. 2004), ont vu leur utilisation croître dans le domaine de la bio-analyse (Muller et al. 2008, Jugan et al. 2009, Maletz et al. 2013, Alvarez et al. 2013). Les solvants généralement utilisés pour l'élution sont le méthanol ou des mélanges de type dichlorométhane/acétone ou dichlorométhane/méthanol. Dans certains cas une élution séquentielle a même été réalisée selon un gradient eau/méthanol (Desbrow et al. 1998, Fenet et al. 2003).

En parallèle de la SPE, **l'extraction liquide-liquide (LLE)** est parfois employée. Elle s'est avérée, dans certains cas, être plus efficace que la SPE, vraisemblablement en raison de la perte de composés absorbés sur les particules au moment de la filtration associée à la SPE (Kinnberg et al. 2003). Toutefois, la mise en œuvre de la LLE reste rare en raison des grandes quantités de solvants nécessaires à sa réalisation.

Suite à l'extraction, l'extrait se doit d'être repris dans un solvant compatible avec les bioessais. Dans la plupart des cas, l'extrait est évaporé à sec avant d'être repris dans du méthanol, de l'éthanol ou du DMSO. La mise à sec complète des extraits en vue de leur reprise fait encore aujourd'hui débat du fait que certaines familles chimiques volatiles sont perdues lors de cette étape.

### 2.2.3 CONCLUSIONS

La préparation d'échantillon est une étape clef dans l'évaluation du potentiel œstrogénique de matrices environnementales. Qu'il s'agisse des sédiments ou des eaux de surface ou des eaux usées, il n'existe pas actuellement de procédures standardisées pour l'évaluation de ce potentiel. En effet, si différentes méthodes d'échantillonnage et d'extraction sont aujourd'hui disponibles, il reste à les valider dans un cadre bio-analytique c'est à dire sur la base des bioessais et non pas uniquement à partir de méthodes de chimiques analytiques.

Ainsi, il s'agira à l'avenir de (1) définir une méthode générique (échantillonnage et extraction) selon le type de matrice considéré et (2) de la valider sur la base des bioessais et des analyses chimiques pour enfin (3) la standardiser au travers d'une étude inter-laboratoire.

D'ores et déjà, les investigations méthodologiques menées par notre laboratoire orientent vers l'utilisation de l'ASE pour l'extraction de sédiment et l'emploi de capteurs passifs de type POCIS pour la caractérisation des eaux de surface et des effluents. Dans un cas comme dans l'autre, l'utilisation d'un mélange méthanol/dichlorométhane apparaît comme la plus performante pour l'extraction de composés actifs présentant une large gamme de polarité (Creusot, 2011, Creusot et al. ).

## 2.3 LES BIOESSAIS *IN VITRO*

### 2.3.1 DÉFINITIONS

Différentes méthodes biologiques sont actuellement disponibles pour évaluer la présence de xéno-œstrogènes dans l'environnement. Nous focalisons dans ce rapport sur les **méthodes bio-analytiques** basées sur le mécanisme d'action des xéno-œstrogènes et qui sont définies comme des outils biologiques utilisant des principes de détection spécifiques (i.e. interaction avec le récepteur des œstrogènes) et quantifiables (i.e. détermination d'un équivalent toxique biologique -œstradiol-équivalent, E<sub>2</sub>-EQ). Ici, le terme "analyse" ne fait pas référence à un concept physique mais à une détection basée sur une interaction biologique-chimique (Eggen et Segner 2003).

L'intérêt principal de ces outils demeure leur capacité à mesurer et à quantifier l'activité biologique globale (ici le potentiel œstrogénique exprimé en E<sub>2</sub>-EQ) d'un échantillon environnemental complexe en tenant compte de l'ensemble des molécules extraites et biodisponibles pour les cellules (i.e. réponse intégrative prenant en compte les effets de mélange), tout en fournissant une information (éco)toxicologique pertinente sur le mécanisme d'action de ces substances.

Parmi les bioessais actuellement disponibles, on trouve d'une part les bioessais *in vitro* qui font l'objet d'une description approfondie dans le présent rapport (partie 2.3.2) et d'autre part les bioessais *in vivo* qui constitue aujourd'hui une perspective pertinente dans le domaine de la bio-analyse (partie 4.2).

### 2.3.2 DESCRIPTION & UTILISATION DES MODELES *IN VITRO*

Les modèles *in vitro* sont basés sur l'utilisation d'une composante d'un organisme (i.e. récepteur isolé ou cellule), isolé de son contexte biologique naturel. Il s'agit de tests qui sont sensibles, rapides, relativement peu coûteux, compatibles avec un criblage d'échantillon à haut débit et dont l'emploi ne soulève pas de problème éthique au regard de l'expérimentation animale. Ils constituent de ce fait des outils à fort potentiel dans un contexte de surveillance de la qualité chimique.

Les bioessais *in vitro* utilisées pour la bio-détection de xéno-œstrogènes sont présentées dans le Tableau 1.

*Tableau 1 : Bioessais in vitro basés sur l'interaction avec le récepteur des œstrogènes humain (hER) et utilisés pour la détection d'activité œstrogénique.*

Principe	Types cellulaire	Exemples de bio-essais	Sous-type récepteur	Avantages	Limites	Réf
Gène rapporteur	Lignées cellulaires humaines	ER-CALUX (T47D et U2OS)	hER $\alpha$	- Simple	- Réponse artificielle - Problèmes de faux positif rapportés sur le YES	a
		MELN/MVLN (MCF-7)	hER $\alpha$			b
		T47D-kbLUC (T47D)	hER $\alpha/\beta$			c
		HELN-ER $\alpha/\beta$ (Hela)	hER $\alpha$ ou $\beta$	- Très spécifique (lignée humaine)		d
		GenER-Blazer (HEK293T)	hER $\alpha$	- Très sensible		e
		BG-1 LUC (BG-1)	hER $\alpha$ et ( $\beta$ )			f
	Hela 993 (Hela)	hER $\alpha$	f			
	Levures	YES	hER $\alpha$			g
Prolifération cellulaire	Lignées cellulaires humaines	E-SCREEN (MCF-7)	hER $\alpha/\beta$	- Réponse physiologique - Distinction ago/antago - Sensible	- Faible spécificité	h
Binding : liaison au récepteur	Lignées cellulaires humaines	LIBER	hER $\alpha/\beta$	- Simple	- Aucune distinction agoniste/antagoniste - Sensibilité	i

a, Legler et al. 1999, van der Burg et al. 2010 ; b, Balaguer et al. 1999 ; c, Wilson 2004 ; d, Balaguer et al. 2001; e, Escher et al. 2014 ; f, OCDE455, Draft, 2006 ; g, Routledge et Sumpter 1996; h, Soto et al. 1995; i, ?

Les tests les plus largement employés dans le contexte du criblage d'échantillons environnementaux sont ceux basés sur l'utilisation d'un gène rapporteur ou sur la prolifération cellulaire. D'autres tests basés sur la mesure directe de l'interaction entre le ligand et le récepteur (mesure de **binding**) ont également été déployés mais présentent un intérêt moindre pour la caractérisation du potentiel œstrogénique de matrices environnementales en raison de (1) leur incapacité à distinguer les activités agonistes, des activités antagonistes et (2) de leur plus faible sensibilité. Ces tests ne sont donc pas décrits plus avant dans ce rapport.

### 2.3.2.1 Bioessais basés sur l'utilisation d'un gène rapporteur

Dans leur principe, ces bioessais sont basés sur la capacité d'un composé à interagir avec le récepteur des œstrogènes, à l'activer et à stimuler l'activité transcriptionnelle de gènes régulés par ce récepteur, ici le gène rapporteur dont l'expression est facilement mesurable en luminescence ou en fluorimétrie.

Ces modèles ont été construits à partir de lignées cellulaires humaines (e.g. cellules du cancer du sein, MCF-7) ou de levures (e.g. *Sacharomyces cerevisiae*) à travers l'ajout d'une séquence d'ADN codante pour un gène rapporteur placé sous le contrôle transcriptionnel d'un élément de réponse du récepteur des œstrogènes (ER). Ce récepteur peut-être présent de manière endogène (e.g. cellules MCF-7 ou T47D) ou introduit en parallèle du gène rapporteur (e.g. levure, cellules U2OS ou HeLa).

En pratique, dans le cas d'une lignée cellulaire, la présence de ligands environnementaux du ER dans un extrait conduit à l'activation du récepteur qui se fixe sur le promoteur du gène rapporteur au niveau des éléments de réponse du ER (ERE) et induit la transcription de la luciférase, conduisant, en présence d'un substrat (i.e. la luciférine), à une émission de luminescence proportionnelle à la quantité de ligands du ER (Figure 5).

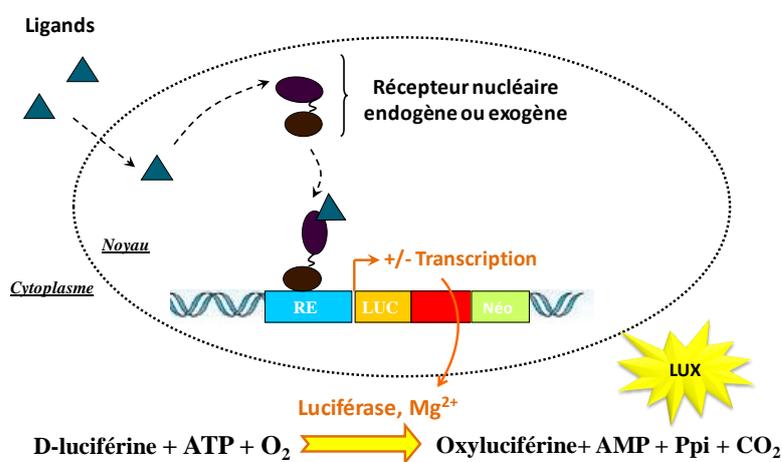


Figure 5 : Principe de l'utilisation d'un gène rapporteur luciférase

Concernant les **lignées cellulaires** de mammifères, différents modèles sont rapportés dans la littérature pour la bio-détection de xéno-œstrogènes dans les matrices environnementales (Tableau 1). De manière générale, ces modèles offrent une détection très sensible et spécifique des ligands du ER et présentent peu d'inconvénients, excepté un investissement matériel plus conséquent que pour la mise en œuvre du YES (i.e. levures) décrit ci-après. Une autre limite spécifique à l'utilisation du bioessai ER-CALUX réside dans le coût de la licence d'utilisation, relativement élevée. À l'opposé, les lignées cellulaires T47D-KBLUC, développée par l'US-EPA (Wilson et al. 2004) et HeLa-9903 (OCDE, TG455), sont disponibles commercialement et libres d'utilisation à des fins non commerciales.

Concernant le test sur **levures**, le modèle **YES** (yeast estrogens screen) a été fortement utilisé pour la caractérisation du potentiel œstrogénique de substances mais moins pour celui des matrices environnementales en raison de sa plus **faible sensibilité** (partie 2.3.2.3) et de sa forte sensibilité aux composés cytotoxiques (Leusch et al. 2010). Toutefois, une nouvelle version du YES (L-YES) semble plus sensible et donc compatible avec le criblage d'échantillons environnementaux (Maletz et al. 2013).

La levure présente l'avantage d'être relativement **facile à mettre en œuvre** et de ne pas nécessiter d'équipement particulier (e.g. hotte à flux laminaire) en raison de leur meilleure résistance aux conditions environnementales (e.g. contamination bactérienne) par rapport aux lignées cellulaires. Néanmoins, les levures ont le désavantage d'avoir une membrane et un système de transport actif qui diffèrent des cellules de mammifères et qui peut conduire à des **faux négatifs ou positifs**. Aussi, le nombre de faux négatif est particulièrement marqué dans ce modèle (Kinnberg 2003).

### 2.3.2.2 Bioessais basés sur la prolifération cellulaire

En parallèle des bioessais basés sur la mesure de l'activité transcriptionnelle associée à l'activation du récepteur ER, on rencontre un bioessai basé sur la prolifération cellulaire dépendante du ER: le test **E-screen**.

Le E-screen emploie des cellules humaines du cancer du sein dont la croissance est œstrogène-dépendante. Dans ce test, la croissance cellulaire est mesurée après 4 à 6 jours d'exposition à l'échantillon et comparée avec le nombre de cellules exposées à l'œstradiol. Ce test a initialement été développé dans les années 1990 avec la lignée MCF-7 (Soto et al. 1995).

Bien que le E-Screen fournisse une mesure de l'activité œstrogénique à l'échelle cellulaire en intégrant des effets génomiques et non génomiques, il a été rapporté des variations importantes dans les réponses prolifératives entre les différents clones de la lignée MCF-7 actuellement disponibles. De plus, la croissance peut également être influencée par les conditions de culture, des différences dans le sérum, ou encore la densité cellulaire (Zacharewski 1997). Un autre désavantage de ce modèle est le manque de spécificité de la réponse œstrogénique. En effet, certaines études rapportent une prolifération des cellules MCF-7 en réponse à une gamme de nutriments, de facteurs de croissance ou d'hormones autres que les œstrogènes (Zacharewski 1997). Par conséquent, le test E-screen peut conduire à une fausse identification de composés ou d'échantillons actifs. Par ailleurs, la présence de composés cytotoxiques ou encore d'inhibiteurs de croissance peut conduire à l'identification de **faux négatifs**. Enfin, ce test est fortement consommateur de temps en comparaison des autres bioessais disponibles.

### 2.3.2.3 Performances analytiques des différents modèles

Les études visant à évaluer le potentiel œstrogénique de substances, de mélanges ou de matrices environnementales permettent de rendre compte des performances analytiques des différents bioessais en termes de sensibilité et de robustesse.

#### **Sensibilité**

Un premier critère de comparaison des modèles consiste à évaluer leur sensibilité à différentes **substances de référence** connues pour lier le ER et induire son activité transcriptionnelle. Le Tableau 2 inventorie l'activité œstrogénique, exprimée en concentration induisant 50 % (EC50) de quelques substances modèles dans différents modèles *in vitro*.

Tableau 2 : Valeurs d'EC<sub>50</sub> de différents xéno-œstrogènes dans différents modèles *in vitro*

Substances	E-Screen	YES	ER-CALUX	MELN	HELN-hER $\alpha$	Hela-9903	T47D-KBLUC	BG-1 LUC	Gene Blazer
17 $\beta$ -œstradiol	0.009 nM <sup>i</sup> 0.005 nM <sup>l</sup> 0.005 nM <sup>m</sup>	0.1 nM <sup>b</sup> 0.21 nM <sup>g</sup> 0.1 nM <sup>h</sup> 0.78 nM <sup>k</sup>	0.006 nM <sup>a</sup> 0.006 nM <sup>d</sup>	0.03 nM <sup>c</sup> 0.02 nM <sup>i</sup>	0.017 nM <sup>q</sup>	0.008 nM <sup>p</sup>	0.003 nM <sup>f</sup> 0.002 nM <sup>o</sup>	0.006 nM <sup>p</sup>	< 1 nM
DES	0.002 nM <sup>m</sup>	3 nM <sup>h</sup> 0.2 nM <sup>n</sup>	0.01 nM <sup>d</sup>	0.2 nM	-	24 nM <sup>p</sup>	0.014 nM <sup>f</sup>	0.033 nM <sup>p</sup>	2.9 nM
17 $\alpha$ -éthynyl-œstradiol	0.006 nM <sup>i</sup> 0.004 nM <sup>m</sup>	0.18 nM <sup>g</sup> 0.7 nM <sup>h</sup> 0.8 nM <sup>k</sup> 0.3 nM <sup>n</sup>	0.002 nM <sup>d</sup>	0.02 nM <sup>c</sup> 0.007 nM <sup>i</sup>	0.008 nM <sup>q</sup>	0.006 nM <sup>p</sup>	0.009 nM <sup>f</sup> 0.0002 nM <sup>o</sup>	42 nM <sup>p</sup>	-
bisphenol A	134 nM <sup>j</sup> 150 nM <sup>l</sup> 200 nM <sup>m</sup>	2000 nM <sup>g</sup> 7000 nM <sup>h</sup> 9600 nM <sup>k</sup>	770 nM <sup>a</sup>	96 nM <sup>i</sup>	410 nM <sup>q</sup>	455 nM <sup>p</sup>	-	533 nM <sup>p</sup>	-
4-tert-octylphénol	121 nM <sup>j</sup> 97 nM <sup>l</sup>	27000 nM <sup>g</sup> 940 nM <sup>h</sup> 1600 nM <sup>k</sup>	-	54 nM <sup>i</sup>	-	100 nM <sup>p</sup>	-	32 nM <sup>p</sup>	-
nonylphénol	98 nM <sup>l</sup>	2000 nM <sup>e</sup> 8400 nM <sup>g</sup> 360 nM <sup>h</sup> 2900 nM <sup>n</sup>	260 nM <sup>a</sup> 100 nM <sup>d</sup>	700 nM <sup>c</sup> 339 nM <sup>i</sup>	-	491 nM <sup>p</sup>	-	-	-
o,p' DDT		3600 nM <sup>e</sup>	660 nM <sup>a</sup> 324 nM <sup>d</sup>	1800 nM <sup>c</sup>	-	-	-	-	-
genistein	18 nM <sup>l</sup> 40 nM <sup>m</sup>	-	100 nM <sup>a</sup> 64 nM <sup>d</sup>	2000 nM <sup>c</sup> 26 nM <sup>i</sup>	38 nM <sup>q</sup>	25 nM <sup>p</sup>	-	271 nM <sup>p</sup>	816 nM

Références : a, Legler et al. 1999 ; b, Murk et al. 2002 ; c, Witters et al. 2010 ; d, Van der Burg et al. 2010 ; e, Legler et al. 2002 ; f, Wilson et al. 2004 ; g, Rutishauser et al. 2004 ; h, Cespedes et al. 2004 ; i, Pillon 2005 ; j, Drewes et al. 2005 ; k, Segner et al. 2003 ; l, Körner et al. 2001 ; m, Gutendorf et Westendorf 2001 ; n, Folmar et al. 2002 ; o, Bermudez et al. 2012 ; p, OECD-455 2009 ; q, Escande et al. 2006.

Ces études mettent principalement en évidence des différences de sensibilité entre les modèles mais pas de spécificité.

Globalement, ce tableau montre que le YES est le modèle le moins sensible et que le *E-screen* et ER-CALUX sont les plus sensibles. Ce constat est confirmé par les conclusions de certaines études comparant les performances des différents bioessais. Ainsi, Fang et al. (2000) et Folmar et al. (2002) ont observé une plus grande sensibilité du *E-Screen* vis-à-vis du YES alors que les travaux menés par Legler et al. (1999 et 2002) et Murk et al. (2002) confirment que le ER-CALUX est plus sensible que le YES.

Ce tableau montre également une légère variabilité inter-laboratoire dans les réponses mesurées pour une même substance au sein d'un même test. Cette variabilité semble particulièrement marquée pour le YES. Certaines études d'inter-comparaison des

bioessais ont également confirmé cette variabilité inter-laboratoire, qu'il s'agisse du YES et du *E-Screen* (Fang et al. 2000), du ER-CALUX (Van der Burg et al 2010) ou encore du test MELN (Witters et al. 2010). Ainsi Witters et al. (2010) rapporte des CV entre 20 et 70% dans le modèle MELN alors que Van der burg et al. (2010) obtiennent des CV entre 10 et 30% dans le modèle ER-CALUX. Ces différences pourraient en partie s'expliquer par des procédures de tests qui diffèrent entre les laboratoires.

En ce qui concerne la détection de l'activité œstrogénique au sein de **matrices environnementales**, la différence de sensibilité observée pour les substances se traduit par une réponse aux mélanges environnementaux complexes qui diffère entre les bioessais, d'une part en termes de limite de détection (i.e. quantité de matrice nécessaire pour détecter une activité) et d'autre part en termes de quantification de l'activité œstrogénique globale des échantillons (Tableau 3).

*Tableau 3 : Comparaison des LOD et des E2-EQ quantifiées dans un même échantillon au sein de l'étude citée.*

Matrices	Bioessais	LOD (ng-E2/L)	E <sub>2</sub> -EQ	Ref
Effluent municipal	E-SCREEN	18 pg/L	10 ng/L	Leusch 2008
	YES	300 pg/L	n.d.	
	MELN	22 pg/L	10 ng/L	
	ER-CALUX	8 pg/L	10 ng/L	
	T47D-KBluc	16 pg/L	10 ng/L	
Effluent hospitalier traité	LYES	-	2,5 ng/L	Maletz et al. 2013
	ER-CALUX	-	0,37 ng/L	
Eau de surface, élevage bovins	YES	-	0,2 ng/L	Alvarez et al. 2013
	E-SCREEN	-	1,5 ng/L	
	T47D-KBluc	-	1,3 ng/L	

Comme pour les composés individuels, les différences les plus marquées concernent le modèle YES avec une sensibilité 10 fois inférieure à celle des lignées cellulaires. Une telle différence peut s'expliquer par une perméabilité membranaire qui diffère entre les modèles (Zacharewski 1997), par la présence de facteurs de transcription ou de co-facteurs de natures différentes ou encore par le niveau d'organisation biologique considéré. Toutefois, bien qu'il existe des différences entre les modèles, les résultats d'un criblage de plusieurs échantillons abouti généralement à un classement similaire des échantillons quelques soit le modèle considéré (Murk et al. 2002, Leusch et al. 2008).

### **Robustesse**

Au-delà de la sensibilité du modèle, un facteur important à prendre en considération est la robustesse du modèle c'est-à-dire sa capacité à produire des résultats qui soient reproductibles (i.e. avec de faibles variations). Comme évoqué pour les substances (Tableau 2), certains modèles semblent plus robustes que d'autres. Parmi les modèles présentés plus haut, le *E-Screen* souffre d'une forte variabilité inter-laboratoire associée à la diversité de clones de la lignée MCF-7 qui diffèrent notamment par leur taux de prolifération et leur susceptibilité à rentrer l'apoptose (Soto et al. 2006). Par ailleurs, les travaux menés par Legler et al. (1999) semblent indiquer que le ER-CALUX produit des résultats plus reproductibles que le YES (5-10 % de coefficient de variation contre 10-25% dans le YES). L'étude d'inter-comparaison réalisée par Leusch et al (2008) abonde dans ce sens, le test ER-CALUX est celui dont les résultats sont les plus reproductibles.

## 2.4 LE TRAITEMENT & L'INTERPRETATION DES DONNEES

L'enjeu de cette étape porte sur la quantification de l'activité œstrogénique globale de l'échantillon, c'est-à-dire dans la détermination d'un équivalent toxique biologique (Bio-TEQ). L'estimation du Bio-TEQ repose sur le paradigme selon lequel le niveau de l'effet d'un échantillon peut-être exprimé comme une concentration du composé de référence qui produit un effet de magnitude identique dans un bioessai spécifique. Dans le cas de l'activité œstrogénique, il s'agira d'un équivalent œstradiol (E<sub>2</sub>-EQ) ou d'un équivalent éthynyl-œstradiol (EE<sub>2</sub>-EQ). Il n'existe pas actuellement de consensus sur une unique stratégie pour l'analyse des données. Il existe ainsi plusieurs modèles mathématiques utilisés pour estimer les BioTEQ. Trois modèles sont plus communément rencontrés : les modèles basés sur l'interpolation linéaire et non linéaire à partir de la courbe dose réponse du composé de référence et d'une seule dilution de l'échantillon et le modèle basé sur le ratio des concentrations effectives déterminées à partir des courbes doses réponses du composé de référence et de l'échantillon (ratio des EC<sub>x</sub>) (Wagner et al. 2013).

Le modèle le plus employé est celui basé sur le ratio des EC<sub>x</sub>. Il est basé sur le concept du potentiel relatif (REP) qui est utilisé traditionnellement pour comparer différents composés au sein d'un bioessai spécifique. En pratique, il s'agit de tester l'échantillon et le composé de référence selon une gamme de dilution de manière à obtenir des courbes dose-réponse pour lesquels les valeurs sont rapportées généralement de manière relative à l'effet maximum (Figure 6).

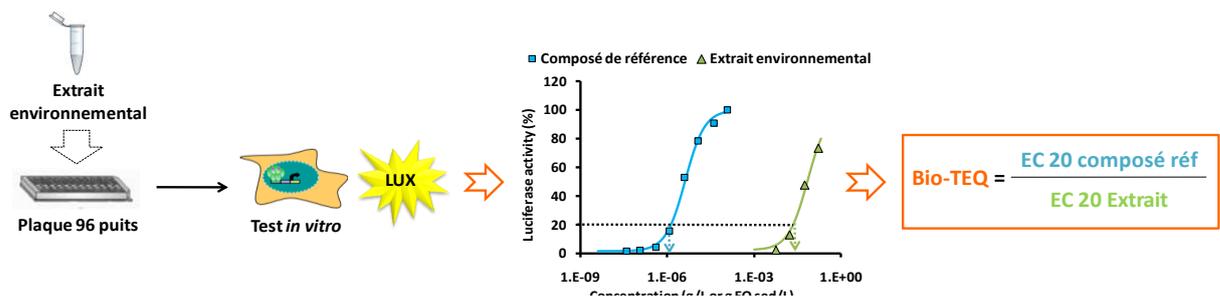


Figure 6 : Principe du calcul d'un Bio-TEQ sur la base des courbes doses-réponses

Ces courbes se présentent sous la forme de sigmoïdes et sont généralement modélisées selon le modèle de régression non-linéaire de Hill à 4 paramètres. À partir des courbes modélisées, il est ensuite possible de déterminer l'EC<sub>x</sub>, c'est-à-dire la concentration aboutissant à X% de la réponse maximale. Le calcul du Bio-TEQ consiste simplement à faire le ratio EC<sub>x</sub> composé de référence/EC<sub>x</sub> échantillon. Toutefois la mise en œuvre de ce calcul implique de remplir plusieurs conditions : les courbes de l'échantillon et du composé de référence doivent avoir le même minimum, le même maximum et la même pente (courbes parallèles). Dans le cas des échantillons environnementaux, ces conditions sont rarement respectées, si bien que les BioTEQ calculés sous-estiment ou sur-estiment généralement le potentiel.

De manière générale, quelque soit le modèle considéré (i.e., EC<sub>x</sub>, interpolation linéaire/non linéaire), il apparaît que les Bio-TEQ rapportés sont associés à un fort degré d'incertitude. Il est aujourd'hui impossible d'évaluer l'impact de cette imprécision sur l'extrapolation des Bio-TEQ en raison du manque d'information sur les procédures mathématiques employées. Ainsi, Wagner et al. 2013 ont récemment soulevé la nécessité de mettre en œuvre des stratégies visant à réduire l'incertitude dans l'analyse des données. Ils ont donc proposé une stratégie pour estimer les Bio-TEQ qui se compose de

3 étapes : (1) identifier la meilleure fonction de régression possible pour modéliser la courbe dose réponse du composé de référence (e.g., comparaison des interpolations linéaires et non-linéaires); (2) déterminer les limites de détection (haute et basse) du bioessai ; (3) estimer le BioTEQ. Dans la cadre de cette stratégie, ils proposent de faire figurer dans les publications une série d'informations« minimums » portant sur l'estimation des Bio-TEQ (MIBEST) de manière à faciliter l'inter-comparaison des données (Tableau 4).

*Tableau 4 : Information minimum à fournir pour l'estimation des BioTEQ d'après Wagner et al. 2013.*

	Informations	Détails
<b>Comment l'échantillon a été préparé ?</b>	Facteur de concentration avant le test Facteur de dilution dans le test Facteur de concentration final	Associé à la préparation de l'échantillon Associé à dilution dans le milieu de culture
<b>Caractéristique du bioessai ?</b>	Courbe dose réponse du composé de référence Limite de détection/quantification du bioessai	Test de différentes fonctions de régression Définition de la LOD/LOQ et manière de les calculer
<b>Détails sur la détermination du BioTEQ ?</b>	Test d'une seule concentration Test de dilutions en série	- Test du parallélisme (fonction de regression, paramètre de la courbe, résultats statistiques)

Le MIBEST couvre l'ensemble des informations du bioessai relative à la quantification du Bio-TEQ à savoir, la préparation de l'échantillon (facteur de concentration ou de dilution), la sensibilité du test (limite de détection), les conditions de test (1 ou plusieurs concentrations) et l'estimation du Bio-TEQ lui-même.

## 2.5 CONCLUSIONS

Une diversité de modèles *in vitro* ont été développés et sont actuellement disponibles pour évaluer le potentiel œstrogénique de substances ou de matrices environnementales. Ces bioessais ne sont pas équivalents, ils apportent chacun une information différente à des niveaux d'organisations biologiques différents (i.e. liaison au récepteur, prolifération cellulaire, expression d'un gène rapporteur) et présentent des avantages et des inconvénients respectifs qui vont conditionner leur utilisation (Tableau 5).

*Tableau 5 : Avantages et limites de bioessais d'œstrogénicité (inspiré de Leusch et al. 2010).*

Bioessai	Sensibilité	Robustesse	Haut-débit	Facilité	Coût
E-Screen	+++	++	+	+	+
YES	+	+	+++	++	++
ER-CALUX	+++	+++	+++	+	-
MELN	++	++	+++	+	+
HeLa-9903	++	++	+++	+	+
T47D-kbLUC	+++	++	+++	+	+
<i>ER-Binding</i>	+	++	+++	+	+

Il ne semble pas qu'un seul de ces bioessais doive être utilisé de manière universelle mais plutôt que **le choix du modèle** dépend de la question à laquelle on cherche à répondre (Alvarez et al. 2013, Leusch et al. 2010). Par exemple, si l'on veut déterminer le potentiel œstrogénique d'un échantillon *a priori* fortement contaminé (e.g. effluent de STEP) à moindre coût, le test YES pourra être privilégié. En revanche, si on cherche à détecter une activité au sein d'un échantillon *a priori* peu contaminé (e.g. eau de surface), les tests sur lignées cellulaires avec gène rapporteur, plus sensibles mais plus chers, seront plus adaptés. Par ailleurs, certaines études préconisent l'utilisation d'une batterie de bioessais d'œstrogénicité de manière à avoir une vision la plus intégrée possible (Rotroff et al. 2014, Escher et al. 2014). Si cette approche est pertinente dans le cadre d'un programme de recherche, elle a cependant un coût qui la rend moins compatible avec un criblage en routine dans le cadre d'un réseau de surveillance.

En amont du choix du modèle se pose la question de la **variabilité des réponses** entre les laboratoires soulignée par plusieurs études comparatives (Leusch et al. 2010, Witters et al. 2010, Van der Burg et al. 2010). Ces différences, en partie liées à des protocoles qui diffèrent entre les laboratoires, soulignent la nécessité **d'harmoniser les procédures**. Cette harmonisation/standardisation devrait impliquer, dans un premier temps, des études de pré-validation des modèles, déjà entreprises pour certains modèles (Witters et al. 2010 pour les MELN, Van der Burg et al. 2010 pour le ER $\alpha$ -CALUX; ISO) qui seront suivies d'études d'inter-comparaison comme celle réalisée par Leusch et al. (2008) mais qui devraient comparer la réponse d'un même modèle au sein de différents laboratoires et non la réponse des différents modèles utilisés dans les différents laboratoires. A termes, une harmonisation du traitement des données semble indispensable afin de pouvoir interpréter et comparer de manière pertinente les valeurs de Bio-TEQ calculées, en particulier dans un cadre réglementaire impliquant la définition de valeurs seuils.

En résumé, les bioessais *in vitro* constituent aujourd'hui la seule méthode disponible à moindre coût pour la surveillance en routine de l'E2, l'EE2 et l'E1 (i.e. surveillance de l'état chimique) récemment intégrés à la *watch-list* de la DCE. Toutefois, leur utilisation dans ce cadre impliquera une standardisation des procédures aussi bien en termes de préparation des échantillons (voir partie 2.2) que dans la mise en œuvre du bioessais *stricto sensu*. Une réflexion devra également être menée concernant l'interprétation des E2-EQ au regard des NQE qui viennent d'être proposés (i.e. comment utiliser les valeurs d'EEQ à la place de la concentration d'un seul composé issu d'analyse chimique ?).

**Ces points techniques, i.e. échantillonnage, extraction, réalisation et inter comparaison des bioessais et traitement de l'information, sont actuellement spécifiquement abordés dans le cadre de l'action européenne portant sur l'œstrogénicité d'eaux de surface et d'eaux usées, portée par R. Käse (Centre suisse d'Ecotoxicologie) et à laquelle l'INERIS participe avec le support d'AQUAREF (Cf. Note d'avancement action G3b, décembre 2015).**

### **3. PERSPECTIVES : OUTILS BIO-ANALYTIQUES & ÉVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL**

Les aspects présentés précédemment ont porté sur l'utilisation de bioessais basés sur le récepteur des œstrogènes humains (hER) uniquement, ce qui reste limitant au regard de la complexité des contaminants PE présents dans les milieux. Dans une démarche d'utilisation de tels outils bioanalytiques pour l'analyse environnementale, il convient donc de replacer ces outils dans une perspective plus large dans une optique d'évaluation du risque environnemental associés à la contamination du milieu aquatique par les perturbateurs endocriniens (PE). Pour cela, nous listons ci-après d'autres bioessais complémentaires des bioessais *in vitro* déjà listés pour améliorer le diagnostic environnemental associé aux PE.

### 3.1 PROFILAGE TOXICOLOGIQUE IN VITRO MULTI-RÉCEPTEURS

Si le présent rapport focalise sur la détection des composés œstrogéniques dans les milieux aquatiques, l'occurrence environnementale de composés capable d'interagir avec d'autres récepteurs (stéroïdiens- AR, GR, PR ... ou impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques- PXR, AhR) a clairement été démontrée (Creusot et al. 2014, Kinani et al. 2010, Schriks et al. 2010). Par conséquent, si les actions en cours prônent l'intégration des modèles *in vitro* basés sur le mécanisme d'action pour la détection de PE -ici l'utilisation de tests *in vitro* d'œstrogénicité pour la surveillance de l'EE2 et l'E2- le déploiement d'une batterie de bioessais couvrant différentes activités paraît à plus long terme incontournable pour une évaluation réaliste et pertinente de la contamination par les PE (Aït-Aïssa et al 2014, Creusot 2013, Poulsen et al. 2011, Escher et al. 2014). L'utilisation d'une batterie de bioessais *in vitro* (profilage toxicologique *in vitro*) pour caractériser la qualité chimique des eaux de surface et des sédiments a récemment été investiguée par l'INERIS dans le cadre de l'étude prospective 2012 (Aït-Aïssa et al. 2014) et de l'accord cadre ONEMA-INERIS 2013-2015. Il s'est révélé particulièrement pertinent pour hiérarchiser les sites selon leur profil de contamination et ainsi identifier des sites présentant une forte contamination et/ou une contamination atypique sur lesquels mener des investigations plus poussées (i.e. contrôle d'enquête).

Par ailleurs, les bioessais *in vitro* actuellement utilisés pour évaluer le potentiel œstrogénique (et autres) de matrices environnementales sont basés sur des modèles *in vitro* de mammifères (i.e. récepteur des œstrogènes humains). Compte tenu des différences inter-espèces rapportées dans la littérature, notamment en ce qui concerne l'activation du récepteur des œstrogènes (Molina-Molina et al. 2008, Cosnefroy et al. 2009), il semble indispensable à l'avenir de développer des modèles basés sur des cellules de poissons afin de mieux appréhender le danger pour les organismes aquatiques. Un travail spécifique est actuellement en cours à l'INERIS autour de l'utilisation de lignées cellulaires hépatiques de poisson zèbre pour la bio-détection de xéno-œstrogènes spécifiques des poissons dans les matrices environnementales (FP7-EDA-Emerge et FP7-SOLUTION). Les premières investigations confirment la présence de xéno-œstrogènes spécifiques du poisson zèbre.

### 3.2 VERS L'UTILISATION COMBINÉE DES BIOESSAIS IN VITRO & IN VIVO

Si les bioessais *in vitro* constituent un complément pertinent et puissant au regard des analyses chimiques, il faut garder à l'esprit qu'ils restent des systèmes simplifiés qui ne permettent pas de rendre compte des réponses à l'échelle d'un organisme entier. En effet, l'exposition des cellules est relativement directe sans interaction avec des facteurs environnementaux conditionnant la biodisponibilité et l'accumulation. De plus, les aspects **pharmaco-cinétiques** (absorption, transport, métabolisme et excrétion) se produisant *in vivo* ne sont pas pris en compte. En particulier les modèles *in vitro* possèdent des capacités métaboliques réduites en comparaison d'un organisme entier. Ainsi, certains composés apparaissant inactifs *in vitro* peuvent s'avérer actifs *in vivo* du fait d'une bio-activation du composé. Inversement un contaminant actif *in vitro* peut être rendu inactif *in vivo*. De plus, les réponses œstrogéniques *in vivo* peuvent impliquer des processus complexes tels que des **interactions entre plusieurs voix de signalisation** (i.e. *cross-talk*) ou entre différents organes cibles mais également des boucles de rétro-contrôle. Elles peuvent également impliquer d'autres processus que l'interaction avec le récepteur des œstrogènes tels que des modifications de la bio-synthèse hormonale ou de métabolisation des hormones endogènes.

#### 3.2.1 INTÉRÊT DES TESTS EMBRYO-LARVAIRES POUR LA BIO-ANALYSE

Les bioessais *in vivo* et *in situ* sont *a priori* les outils les plus pertinents pour la détection d'effets néfastes sur les organismes aquatiques. Cependant, ils sont généralement coûteux, utilisent de gros volumes d'échantillon et ne sont pas sans poser des problèmes

éthiques. De ce fait, leur utilisation dans le cadre de la surveillance des milieux aquatiques reste restreinte à des études ponctuelles et est généralement incompatible avec une surveillance à l'échelle d'un réseau. Toutefois, le développement récent de nouveaux bioessais basés sur des embryons de poisson offre de nouvelles perspectives dans un cadre de surveillance, c'est en particulier le cas de l'utilisation d'embryons de poissons transgéniques pour la détection de perturbateurs endocriniens dans les matrices environnementales.

Les bioessais sur embryons permettent de s'affranchir des contraintes éthiques associés à l'expérimentation animale tout en réduisant les volumes nécessaires à leur mise en œuvre. Ils sont ainsi compatibles avec un criblage d'échantillon "moyen" débit, certains de ces tests pouvant être réalisés en microplaques 96 puits. Enfin, leur intérêt principal réside dans le fait que l'on mesure une réponse moléculaire (i.e. une réponse sensible et spécifique) à l'échelle de l'organisme qui tient compte de la pharmacocinétique des composés. Dans le cadre de la surveillance de la qualité chimique des milieux aquatiques, en particulier celle des PE, plusieurs outils bio-analytiques *in vivo*, basés sur des embryons sauvages ou transgéniques, sont aujourd'hui disponibles.

Parmi eux, le bioessai EASZY emploie des embryons de poissons zèbres transgéniques (*cyp19a1b*-GFP) exprimant le gène rapporteur GFP placé sous le contrôle du promoteur aromatase b (cérébrale) qui est l'enzyme responsable de la conversion finale des androgènes en œstrogènes. L'ensemble de la procédure pour la mise en œuvre de ce bioessai est présenté en Figure 7.

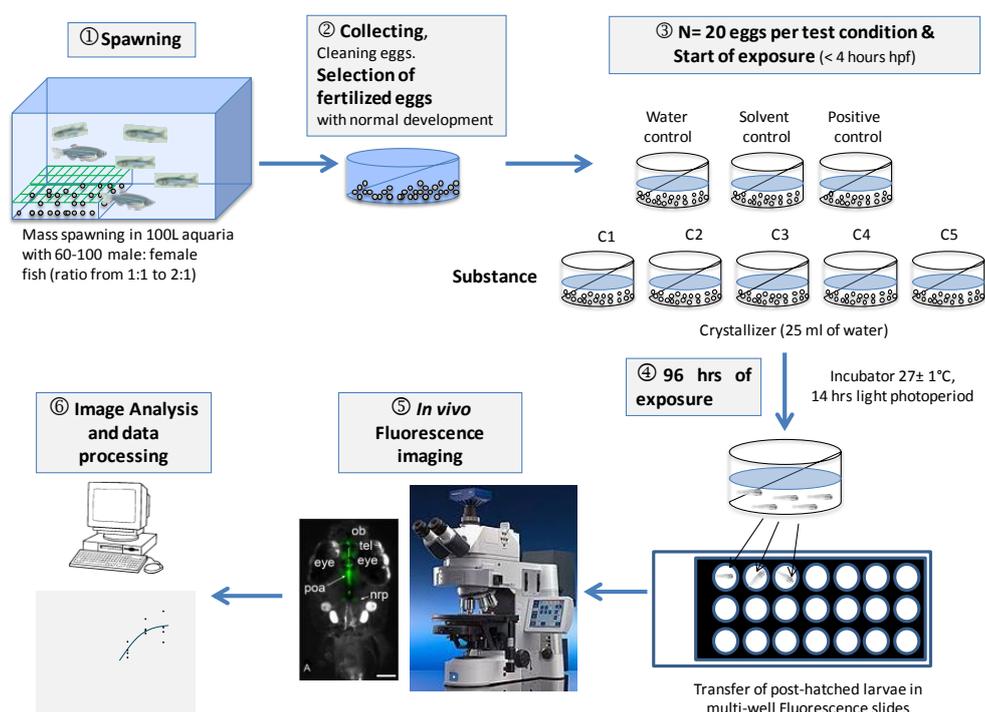


Figure 7 : Principe du test EASZY sur embryons de poisson zèbre transgénique (source : F. Brion, INERIS).

En pratique, ce modèle s'est révélé performant pour caractériser le potentiel œstrogénique de nombreux composés (Brion et al. 2012) ainsi que matrices environnementales (Aït-Aïssa et al. 2014), confirmant notamment l'importance de la prise

en compte du métabolisme des organismes dans l'activité mesurée. Concernant la caractérisation des extraits environnementaux, les résultats confirment l'intérêt des bioessais *in vivo* en aval d'un profilage d'activité biologique *in vitro* afin de confirmer le danger à l'échelle de l'individu. A terme, la comparaison des réponses *in vitro* et *in vivo* pourrait permettre d'envisager la détermination de seuils de réponse *in vitro* (i.e. *trigger values*) au-delà desquels on peut s'attendre à un effet à l'échelle de l'organisme.

### 3.2.2 UNE DÉMARCHE INTÉGRÉE *IN VITRO* & *IN VIVO*

Dans le contexte de l'évaluation du risque environnemental vis-à-vis des xéno-œstrogènes, les bioessais *in vitro* constituent, certes, des outils de criblage intégratifs permettant une mesure de l'exposition potentielle tout en indiquant un effet potentiel sur les organismes (indicateur précoce de danger), néanmoins ils ne permettent pas totalement de rendre compte de la réponse biologique à l'échelle de l'organisme. Si l'on cherche en première approche à surveiller en routine la qualité chimique des milieux aquatiques et notamment l'occurrence environnementale de composés actifs représentant un danger, il paraîtrait pertinent de mettre en œuvre des bioessais *in vitro* compatibles avec un criblage haut débit d'échantillon. Par la suite pour certains échantillons dépassant un seuil (qu'il reste à définir), il devrait être envisagé de mettre en œuvre des bioessais *in vivo* de manière à confirmer ce danger et éventuellement le risque associé à ces mélanges pour les organismes exposés. A termes, l'objectif pourrait être de disposer d'une valeur seuil de l'activité œstrogénique déterminée par les bioessais *in vitro* qui puissent être considéré comme sans danger. Différentes stratégies ont été proposées pour l'établissement de telles valeurs (Kunz et al. 2015 ; Jarosova et al. 2014 ; Tang et al. 2013; Brand et al. 2014). Une de ces stratégies pourrait consister en l'utilisation conjointe des bioessais *in vitro* et *in vivo* de manière à définir ces **seuils de danger *in vivo*** au regard des réponses *in vitro* ou encore de proposer des modèles prédictifs dans un contexte d'évaluation du risque environnementale (Ankley et al. 2009).

## 4. CONCLUSIONS

Dans le cadre de la surveillance de la qualité chimique des milieux aquatiques, les limites des outils réglementaires actuels conduisent progressivement à proposer de nouvelles méthodes basées sur l'utilisation, entre autres, de bioessais *in vitro* (Wernersson et al. 2015) de manière à englober une plus grande diversité de composés actifs. En particulier, la proposition d'inclure l'E<sub>2</sub> et l'EE<sub>2</sub> dans la *watch-list* du prochain cycle de la DCE, a conduit à la mise en œuvre d'études d'inter-comparaison de bioessais *in vitro* permettant de caractériser le potentiel œstrogénique de matrices environnementales. Dans ce contexte, le présent rapport visait précisément à identifier les besoins actuels en termes de développement(s) méthodologique(s) et de standardisation des procédures pour l'évaluation du caractère œstrogénique des eaux de surface et du sédiment.

L'inventaire des procédures de **préparation d'échantillons** a mis en évidence la nécessité de valider des méthodes d'extraction à large spectre (i.e. multi-résidus) du fait de la diversité des classes chimiques impliquées. La validation de telles méthodes doit se faire sur la base des bioessais *in vitro* en complément d'analyses chimiques. Cette validation ne doit pas porter que sur l'activité œstrogénique mais également sur d'autres cibles biologiques d'intérêt pour la mise en œuvre d'une batterie pertinente en vue d'une caractérisation exhaustive de la contamination. Par ailleurs, il faut développer des méthodes qui soient les plus représentatives des conditions d'exposition environnementale des organismes de manière à ce que la mesure de l'activité biologique permette une première évaluation du risque (i.e. définition de seuil). Dans cette optique l'utilisation de l'échantillonnage passif pour les eaux de surface et de l'extraction passive pour les sédiments semble pertinente.

Concernant la mise en œuvre des **bioessais**, une diversité d'outils est aujourd'hui disponible pour la mesure du potentiel œstrogénique de matrices environnementales. Ils présentent chacun leurs avantages et inconvénients respectifs qui vont conditionner leur utilisation selon les moyens à notre disposition (e.g. financier et équipement) et selon le contexte de l'étude. Actuellement, si certains de ces modèles ont fait l'objet d'études de pré-validation (i.e. ER $\alpha$ -CALUX et MELN), il subsiste un fort besoin d'établir des procédures standardisées pour l'utilisation de ces bioessais, en particulier dans le cas du criblage d'échantillons environnementaux. Des travaux sont actuellement en cours au sein de l'ISO pour aboutir à une norme sur l'évaluation du potentiel œstrogénique des eaux et eaux usées pour les modèles basés sur les levures et les modèles basés sur les lignées cellulaires humaines (ISO ISO-19040-3).

Par ailleurs, les outils aujourd'hui disponibles sont basés sur le ER humain alors que certaines études mettent en évidence des différences inter-espèces dans l'activation de ce récepteur (i.e. identité des ligands, potentiel œstrogénique). Par conséquent, de manière à mieux appréhender le danger pour les organismes aquatiques, le développement de modèles basés sur les récepteurs de poisson semble pertinent. Il s'agit d'un travail actuellement en cours à l'INERIS. Enfin, si les bioessais *in vitro* sont particulièrement adaptés à un criblage haut débit d'échantillons dans le cadre d'une surveillance en routine de la qualité chimique, ils ne permettent pas aujourd'hui à eux seuls de rendre compte d'une réponse à l'échelle de l'organisme et donc du danger/risque réel pour les organismes exposés. Différentes stratégies ont été proposées et explorées afin de palier cette limite : mise en œuvre de bioessais *in vivo* transgéniques en parallèle des bioessais *in vitro* pour confirmer le potentiel œstrogénique (e.g. test EASZY) ; approche intégrée combinant bioessais *in vitro* et mesure biochimique (e.g. mesure la VTG) après exposition *in vivo* en conditions contrôlées ; prise en compte du métabolisme dans les modèles *in vitro*. De telles stratégies pourraient constituer la base pour la détermination de seuils de danger des réponses *in vitro* au regard des réponses *in vivo*.

L'étape finale de l'évaluation du potentiel œstrogénique porte sur **le traitement et l'interprétation des données** (i.e. calcul du Bio-TEQ). Cela passe par l'utilisation de différentes régressions permettant de modéliser les effets dose réponse des échantillons et des composés de référence. Néanmoins, les modèles mathématiques employés et la détermination même des Bio-TEQ diffèrent entre les études si bien que les résultats sont rarement comparables. Des recommandations ont récemment été faites afin d'harmoniser le traitement des données ou à minima permettre une inter-comparaison des données. Cela passe, entre autres, par une définition précise des conditions de détermination des bio-TEQ (i.e. MIBEST).

S'il est aujourd'hui scientifiquement et techniquement admis que les bioessais *in vitro* sont des outils valides pour répondre aux besoins actuels de surveillance et de gestion des substances à activité œstrogénique dans les milieux aquatiques, la standardisation des méthodes existantes constitue un point incontournable et nécessaire pour permettre leur utilisation effective dans les réseaux de surveillance. A travers son implication dans AQUAREF, l'INERIS contribue à plusieurs programmes d'inter-comparaison et de validation de ces outils au niveau international, en interface avec les instances réglementaires européennes (Cf. Note d'avancement action G3b, décembre 2015).

## 5. RÉFÉRENCES

- Aerni, H. R., B. Kobler, B. V. Rutishauser, F. E. Wettstein, R. Fischer, W. Giger, A. Hungerbühler, M. D. Marazuela, A. Peter, R. Schonenberger, A. C. Vogeli, M. J. F. Suter et R. I. L. Eggen (2004). "Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(7): 1873-1873.
- Ait-Aïssa, S. (2009). "Outils bio-analytiques in vitro : principe et apports pour la surveillance des contaminants organiques dans le milieu aquatique." Rapport d'étude DRC-08-95306-16732A, convention INERIS-ONEMA.
- Aït-Aïssa, S., F. Brion, N. Creusot et W. Sanchez (2014). "Etude prospective 2012 : Apport des outils biologiques (bioessais et biomarqueurs) pour le diagnostic de la contamination des milieux aquatiques." Rapport final DRC-14-127339-06620A, Juillet 2014.
- Aït-Aïssa, S. et N. Creusot (2011). "Veille relative aux avancées scientifiques et techniques des approches EDA pour la surveillance des substances émergentes." Rapport d'étude DRC-12-126842-03580A, convention INERIS-ONEMA.
- Alvarez, D. A., N. W. Shappell, L. O. Billey, D. S. Bermudez, V. S. Wilson, D. W. Kolpin, S. D. Perkins, N. Evans, W. T. Foreman, J. L. Gray, M. J. Shipitalo et M. T. Meyer (2013). "Bioassay of estrogenicity and chemical analyses of estrogens in streams across the United States associated with livestock operations." *Water Research* 47(10): 3347-3363.
- Ankley, G. T., D. C. Bencic, M. S. Breen, T. W. Collette, R. B. Conolly, N. D. Denslow, S. W. Edwards, D. R. Ekman, N. Garcia-Reyero, K. M. Jensen, J. M. Lazorchak, D. Martinovič, D. H. Miller, E. J. Perkins, E. F. Orlando, D. L. Villeneuve, R.-L. Wang et K. H. Watanabe (2009). "Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action." *Aquatic Toxicology* 92(3): 168-178.
- Balaguer, P., A. M. Boussioux, E. Demirpence et J. C. Nicolas (2001). "Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands." *Luminescence* 16: 153-158.
- Balaguer, P., F. Francois, F. Comunale, H. Fenet, A. M. Boussioux, M. Pons, J. C. Nicolas et C. Casellas (1999). "Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens." *Science of the Total Environment* 233(1-3): 47-56.
- Bandow, N., R. Altenburger, U. Lubcke-von Varel, A. Paschke, G. Streck et W. Brack (2009). "Partitioning-Based Dosing: An Approach To Include Bioavailability in the Effect-Directed Analysis of Contaminated Sediment Samples." *Environmental Science & Technology* 43(10): 3891-3896.
- Bermudez, D. S., L. E. Gray et V. S. Wilson (2012). "Modelling defined mixtures of environmental oestrogens found in domestic animal and sewage treatment effluents using an in vitro oestrogen-mediated transcriptional activation assay (T47D-KBluc)." *International Journal of Andrology* 35(3): 397-406.
- Brand, W., C. M. de Jongh, S. C. van der Linden, W. Mennes, L. M. Puijker, C. J. van Leeuwen, A. P. van Wezel, M. Schriks et M. B. Heringa (2014). "Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays." *Environment International* 55(0): 109-118.
- Brion, F., Y. Le Page, B. Piccini, O. Cardoso, S.-K. Tong, B.-c. Chung et O. Kah (2012). "Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos." *PLoS one* 7(5): e36069.
- Céspedes, R., M. Petrovic, D. Raldúa, U. Saura, B. Pina, S. Lacorte, P. Viana et D. Barcelo (2004). "Integrated procedure for determination of endocrine-disrupting activity in surface waters and sediments by use of the biological technique recombinant yeast assay and chemical analysis by LC-ESI-MS." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378(3): 697-708.

- Cosnefroy, A., F. Brion, B. Guillet, N. Laville, J. M. Porcher, P. Balaguer et S. Ait-Aïssa (2009). "A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens." *Toxicology in Vitro* 23(8): 1450-1454.
- Creusot, N. (2011). "Contribution de l'approche effect directed analysis à l'identification de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques." Thèse de doctorat, Université Bordeaux I.
- Creusot, N., M.-H. Dévier, H. Budzinski et S. Aït-Aïssa "Evaluation of an extraction method for a mixture of endocrine disrupters in sediment using chemical and in vitro biological analyses." *Environmental Science and Pollution Research*, en révision.
- Creusot, N., N. Tapie, B. Piccini, P. Balaguer, J.-M. Porcher, H. Budzinski et S. Ait-Aïssa (2013). "Distribution of steroid- and dioxin-like activities between sediments, POCIS and SPMD in a French river subject to mixed pressures." *Environmental Science and Pollution Research* 20(5): 2784-2794.
- David, A., E. Gomez, S. Ait-Aïssa, M. Bachelot, D. Rosain, C. Casellas et H. Fenet (2010). "Monitoring organic contaminants in small French coastal lagoons: comparison of levels in mussel, passive sampler and sediment." *Journal of Environmental Monitoring* 12(7): 1471-1481.
- Desbrow, C., E. J. Routledge, G. C. Brighty, J. P. Sumpter et M. Waldock (1998). "Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening." *Environmental Science & Technology* 32(11): 1549-1558.
- Drewes, J. E., J. Hemming, S. J. Ladenburger, J. Schauer et W. Sonzogni (2005). "An assessment of endocrine disrupting activity changes during wastewater treatment through the use of bioassays and chemical measurements." *Water Environment Research* 77(1): 12-23.
- Eggen, R. I. L. et H. Segner (2003). "The potential of mechanism-based bioanalytical tools in ecotoxicological exposure and effect assessment." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377(3): 386-396.
- Escande, A., A. Pillon, N. Servant, J. P. Cravedi, F. Larrea, P. Muhn, J. C. Nicolas, V. Cavailles et P. Balaguer (2006). "Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta." *Biochemical Pharmacology* 71(10): 1459-1469.
- Escher, B. I., M. Allinson, R. Altenburger, P. A. Bain, P. Balaguer, W. Busch, J. Crago, N. D. Denslow, E. Dopp, K. Hilscherova, A. R. Humpage, A. Kumar, M. Grimaldi, B. S. Jayasinghe, B. Jarosova, A. Jia, S. Makarov, K. A. Maruya, A. Medvedev, A. C. Mehinto, J. E. Mendez, A. Poulsen, E. Prochazka, J. Richard, A. Schifferli, D. Schlenk, S. Scholz, F. Shiraishi, S. Snyder, G. Su, J. Y. M. Tang, B. v. d. Burg, S. C. v. d. Linden, I. Werner, S. D. Westerheide, C. K. C. Wong, M. Yang, B. H. Y. Yeung, X. Zhang et F. D. L. Leusch (2014). "Benchmarking Organic Micropollutants in Wastewater, Recycled Water and Drinking Water with In Vitro Bioassays." *Environmental Science & Technology* 48(3): 1940-1956.
- Fang, H., W. Tong, E. J. Perkins, A. M. Soto, N. V. Prechtel et D. M. Sheehan (2000). "Quantitative Comparisons of in Vitro Assays for Estrogenic Activities."
- Fenet, H., E. Gomez, A. Pillon, D. Rosain, J. C. Nicolas, C. Casellas et P. Balaguer (2003). "Estrogenic activity in water and sediments of a French river: Contribution of alkylphenols." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44(1): 1-6.
- Folmar, L. C., M. J. Hemmer, N. D. Denslow, K. Kroll, J. Chen, A. Cheek, H. Richman, H. Meredith et E. G. Grau (2002). "A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro." *Aquatic Toxicology* 60(1-2): 101-110.
- Gutendorf, B. et J. Westendorf. (2001). "Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens." *Toxicology* Retrieved 1-2, 166,
- Houtman, C. J., P. E. G. Leonards, W. Kapiteijn, J. F. Bakker, A. Brouwer, M. H. Lamoree, J. Legler et H. J. C. Klamer (2007). "Sample preparation method for the ER-CALUX bioassay screening of (xeno-)estrogenic activity in sediment extracts." *Science of the Total Environment* 386(1-3): 134-144.

- ISO-19040-3 Qualité de l'eau -- Détermination du potentiel oestrogène de l'eau et des eaux résiduaires -- Partie 3: Dosage humain in vitro d'un gène rapporteur à base de cellules.
- Jarosova, B., L. Blaha, J. P. Giesy et K. Hilscherova (2014). "What level of estrogenic activity determined by in vitro assays in municipal waste waters can be considered as safe?" *Environment International* 64: 98-109.
- Jugan, M. L., L. Oziol, M. Bimbot, V. Huteau, S. Tamisier-Karolak, J. P. Blondeau et Y. Levi (2009). "In vitro assessment of thyroid and estrogenic endocrine disruptors in wastewater treatment plants, rivers and drinking water supplies in the greater Paris area (France)." *Science of the Total Environment* 407(11): 3579-3587.
- Kidd, K. A., P. J. Blanchfield, K. H. Mills, V. P. Palace, R. E. Evans, J. M. Lazorchak et R. W. Flick (2007). "Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(21): 8897-8901.
- Kinani, S., S. Bouchonnet, S. Bourcier, N. Creusot, J. M. Porcher et S. Ait-Aissa (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(22): 3651-3661.
- Kinnberg, K. (2003). Evaluation of in vitro assays for determination of estrogenic activity in the environment.
- Körner, W., P. Spengler, U. Bolz, W. Schuller, V. Hanf et J. W. Metzger (2001). "Substances with estrogenic activity in effluents of sewage treatment plants in southwestern Germany. 2. Biological analysis." *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(10): 2142-2151.
- Kunz, P. Y., C. Kienle, M. Carere, N. Homazava et R. Kase (2015). "In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 106: 107-115.
- Lee, O., J. M. Green et C. R. Tyler (2015). "Transgenic fish systems and their application in ecotoxicology." *Critical Reviews in Toxicology* 45(2): 124-141.
- Legler, J., M. Dennekamp, A. D. Vethaak, A. Brouwer, J. H. Koeman, B. van der Burg et A. J. Murk (2002). "Detection of estrogenic activity in sediment-associated compounds using in vitro reporter gene assays." *Science of The Total Environment* 293: 69-83.
- Legler, J., C. E. van den Brink, A. Brouwer, A. J. Murk, P. T. van der Saag, A. D. Vethaak et P. van der Burg (1999). "Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line." *Toxicological Sciences* 48(1): 55-66.
- Leppänen, M. T. et J. V. K. Kukkonen (2006). "Evaluating the role of desorption in bioavailability of sediment-associated contaminants using oligochaetes, semipermeable membrane devices and Tenax extraction." *Environmental Pollution* 140(1): 150-163.
- Leusch (2008). "Tools to Detect Estrogenic Activity in Environmental Waters." London : Global Water Research Coalition, 84p.
- Leusch, F. D. L., C. de Jager, Y. Levi, R. Lim, L. Puijker, F. Sacher, L. A. Tremblay, V. S. Wilson et H. F. Chapman (2010). "Comparison of Five in Vitro Bioassays to Measure Estrogenic Activity in Environmental Waters." *Environmental Science & Technology* 44(10): 3853-3860.
- Liscio, C., E. Magi, M. Di Carro, M. J. F. Suter et E. L. M. Vermeirssen (2009). "Combining passive samplers and biomonitors to evaluate endocrine disrupting compounds in a wastewater treatment plant by LC/MS/MS and bioassay analyses." *Environmental Pollution* 157(10): 2716-2721.
- Liu, R., J. L. Zhou et A. Wilding (2004). "Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* 1022(1-2): 179-189.
- Maletz, S., T. Floehr, S. Beier, C. Klamper, A. Brouwer, P. Behnisch, E. Higley, J. P. Giesy, M. Hecker, W. Gebhardt, V. Linnemann, J. Pinnekamp et H. Hollert (2013). "In vitro characterization of the effectiveness of enhanced sewage treatment processes to eliminate endocrine activity of hospital effluents." *Water Research* 47(4): 1545-1557.

- Molina-Molina, J.-M., A. Escande, A. Pillon, E. Gomez, F. Pakdel, V. Cavallès, N. Olea, S. Ait-Aïssa et P. Balaguer (2008). "Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific *in vitro* bioassays." *Toxicology and Applied Pharmacology* 232(3): 384-395.
- Muller, M., F. Rabenoelina, P. Balaguer, D. Patureau, K. Lemenach, H. Budzinski, D. Barcelo, M. L. De Alda, M. Kuster, J. P. Delgenes et G. Hernandez-Raquet (2008). "Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant." *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(8): 1649-1658.
- Murk, A. J., J. Legler, M. M. H. van Lipzig, J. H. N. Meerman, A. C. Belfroid, A. Spenkeliink, B. van der Burg, G. B. J. Rijs et D. Vethaak (2002). "Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays." *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(1): 16-23.
- OECD-455 (2009). The Stably Transfected Human Estrogen Receptor-alpha Transcriptional Activation Assay for Detection of Estrogenic Agonist-Activity of Chemicals. *OECD Guidelines for the testing of Chemicals*.
- Pany I. (2011) Evaluation de l'effet des interférents matriciels sur la détection des perturbateurs endocriniens par les bioessais *in vitro*. Rapport de Master Toxicologie de l'Environnement, Université Paris 5.
- Pillon, A., A. M. Boussioux, A. Escande, S. Ait-Aïssa, E. Gomez, H. Fenet, M. Ruff, D. Moras, F. Vignon, M. J. Duchesne, C. Casellas, J. C. Nicolas et P. Balaguer (2005). "Binding of Estrogenic Compounds to Recombinant Estrogen Receptor- $\alpha$ : Application to Environmental Analysis." *Environmental Health Perspectives* 113(3): 278-284.
- Poulsen, A., H. Chapman, Leusch et B. Escher (2011). "Application of Bioanalytical Tools for Water Quality Assessment." Urban Water Security Research Alliance, Technical Report No. 41.
- Rotroff, D. M., M. T. Martin, D. J. Dix, D. L. Filer, K. A. Houck, T. B. Knudsen, N. S. Sipes, D. M. Reif, M. Xia, R. Huang et R. S. Judson (2014). "Predictive Endocrine Testing in the 21st Century Using *in vitro* Assays of Estrogen Receptor Signaling Responses." *Environmental Science & Technology*, 48:8706-16.
- Routledge, E. J. et J. P. Sumpter (1996). "Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen." *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(3): 241-248.
- Rutishauser, B. V., M. Pesonen, B. I. Escher, G. E. Ackermann, H. R. Aerni, M. J. F. Suter et R. I. L. Eggen (2004). "Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three *in vitro* assays and chemical analysis of steroids." *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(4): 857-864.
- Schiavone, S. et M. Coquery (2011). "Guide d'échantillonnage et de pré-traitement des sédiments en milieu continental pour les analyses physico-chimiques de la DCE." *AQUAREF : Appui aux donneurs d'ordre, surveillance milieux*.
- Schulze, T., M. Krauss, J. Novak, K. Hilscherova, S. Ait-Aïssa, N. Creusot, M. Macova, P. A. Neale, B. I. Escher, T. Gomes, K. E. Tollefsen, Z. Tarcai, Y. Shao, B. Deutschmann, T.-B. Seiler, H. Hollert, P. Tarabek, Z. Tousova, J. Slobodnik, K.-H. Walz et W. Brack (2015). Large volume sampling and effect-based screening. In: Liska, I., Wagner, F., Sengl, M., Deutsch, K., Slobodnik, J. (Eds.), *Joint Danube Survey 3: a comprehensive analysis of Danube water quality*. International Commission for the Protection of the Danube River, pp. 284–295.
- Schwab, K., R. Altenburger, U. Lubcke-von Varel, G. Streck et W. Brack (2009). "Effect-Directed Analysis of Sediment-Associated Algal Toxicants at Selected Hot Spots in the River Elbe Basin with a Special Focus on Bioaccessibility." *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(7): 1506-1517.
- Segner, H., J. M. Navas, C. Schäfers et A. Wenzel (2003). "Potencies of estrogenic compounds in *in vitro* screening assays and in life cycle tests with zebrafish *in vivo*." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54(3): 315-322.
- Seiler, T. B., A. C. Rastall, E. Leist, L. Erdinger, T. Braunbeck et H. Hollert (2006). "Membrane dialysis extraction (MDE): A novel approach for extracting toxicologically relevant hydrophobic

- organic compounds from soils and sediments for assessment in biotests." *Journal of Soils and Sediments* 6(1): 20-29.
- Seiler, T. B., T. Schulze et H. Hollert (2008). "The risk of altering soil and sediment samples upon extract preparation for analytical and bio-analytical investigations - a review." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390(8): 1975-1985.
- Simon, E., M. H. Lamoree, T. Hamers, J. M. Weiss, J. Balaam, J. de Boer et P. E. G. Leonards (2011). "Testing Endocrine Disruption in Biota Samples: A Method to Remove Interfering Lipids and Natural Hormones." *Environmental Science & Technology* 44(21): 8322-8329.
- Soto, A. M., M. V. Maffini, C. M. Schaeberle et C. Sonnenschein (2006). "Strengths and weaknesses of in vitro assays for estrogenic and androgenic activity." *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 20(1): 15-33.
- Soto, A. M., C. Sonnenschein, K. L. Chung, M. F. Fernandez, N. Olea et F. O. Serrano (1995). *Environ. Health Perspect.* 103(Suppl. 7): 113.
- Steinberg, C. E. W., A. Paul, S. Pflugmacher, T. Meinelt, R. Klocking et C. Wiegand (2003). "Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals - A review." *Fresenius Environmental Bulletin* 12(5): 391-401.
- Streck, H. G., T. Schulze et W. Brack (2008). "Accelerated membrane-assisted clean-up as a tool for the clean-up of extracts from biological tissues." *Journal of Chromatography A* 1196: 33-40.
- Tang, J. Y. M., S. McCarty, E. Glenn, P. A. Neale, M. S. J. Warne et B. I. Escher (2013). "Mixture effects of organic micropollutants present in water: Towards the development of effect-based water quality trigger values for baseline toxicity." *Water Research* 47(10): 3300-3314.
- Van der Burg, B., R. Winter, M. Weimer, P. Berckmans, G. Suzuki, L. Gijbbers, A. Jonas, S. van der Linden, H. Witters, J. Aarts, J. Legler, A. Kopp-Schneider et S. Bremer (2010). "Optimization and prevalidation of the in vitro ERI± CALUX method to test estrogenic and antiestrogenic activity of compounds." *Reproductive Toxicology* 30(1): 73-80.
- Vermeirssen, E. L. M., R. Burki, C. Joris, A. Peter, H. Segner, M. J. E. Suter et P. Burkhardt-Holm (2005). "Characterization of the estrogenicity of Swiss midland rivers using a recombinant yeast bioassay and plasma vitellogenin concentrations in feral male brown trout." *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(9): 2226-2233.
- Wagner, M., E. L. M. Vermeirssen, S. Buchinger, M. Behr, A. Magdeburg et J. Oehlmann (2013). "Deriving bio-equivalents from in vitro bioassays: Assessment of existing uncertainties and strategies to improve accuracy and reporting." *Environmental Toxicology and Chemistry* 32(8): 1906-1917.
- Wernersson, A.-S., M. Carere, C. Maggi, P. Tusil, P. Soldan, A. James, W. Sanchez, V. Dulio, K. Broeg, G. Reifferscheid, S. Buchinger, H. Maas, E. Van Der Grinten, S. O'Toole, A. Ausili, L. Manfra, L. Marziali, S. Polesello, I. Lacchetti, L. Mancini, K. Lilja, M. Linderoth, T. Lundeborg, B. Fjällborg, T. Porsbring, D. Larsson, J. Bengtsson-Palme, L. Förlin, C. Kienle, P. Kunz, E. Vermeirssen, I. Werner, C. Robinson, B. Lyons, I. Katsiadaki, C. Whalley, K. den Haan, M. Messiaen, H. Clayton, T. Lettieri, R. Carvalho, B. Gawlik, H. Hollert, C. Di Paolo, W. Brack, U. Kammann et R. Kase (2015). "The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive." *Environmental Sciences Europe* 27(1): 1-11.
- Wilson, J. (2004). "Development and Characterization of a Cell Line That Stably Expresses an Estrogen-Responsive Luciferase Reporter for the Detection of Estrogen Receptor Agonist and Antagonists." *Toxicological Sciences* 81(1): 69-77.
- Witters, H., A. Freyberger, K. Smits, C. Vangenechten, W. Lofink, M. Weimer, S. Bremer, P. H. J. Ahr et P. Berckmans (2010). "The assessment of estrogenic or anti-estrogenic activity of chemicals by the human stably transfected estrogen sensitive MELN cell line: Results of test performance and transferability." *Reproductive Toxicology* 30(1): 60-72.
- Zacharewski, T.R. (1997). "In Vitro Bioassays for Assessing Estrogenic Substances." *Environmental. Sciences and Technology.*, 1997, 31 (3), pp 613-626.