

# **Evaluation *in vitro* des effets perturbateurs de l'activité transcriptionnelle des récepteurs aux estrogènes et aux hormones thyroïdiennes dans les eaux du bassin versant de l'Orge : Campagnes de la Prédecelle, juin et septembre 2008.**

Mary-Line Jugan<sup>1</sup>, Maya Bimbot<sup>1</sup>, Viviane Huteau<sup>1</sup>, Sara Karolak<sup>1\*</sup>, Jean-Paul Blondeau<sup>2</sup>, Yves Lévi<sup>1</sup>

1. IFR 141 - Laboratoire Santé Publique Environnement – Faculté de Pharmacie – Université Paris-Sud 11.

2. INSERM-IFR 141 – Ciblot - Faculté de Pharmacie – Université Paris-Sud 11.  
\* sara.karolak@u-psud.fr

## **1. Introduction**

En 2007, une campagne de prélèvements réalisée le long de la Prédecelle avait permis de mettre en évidence des effets perturbateurs estrogéniques qui ont pu être partiellement corrélés aux teneurs en hormones naturelles et synthétiques analysées dans les mêmes échantillons. Seule la phase liquide a été étudiée durant cette première campagne. Aucun effet perturbateur thyroïdien n'a été décelé. De nouvelles campagnes ont été programmées et réalisées en juin et septembre 2008, par temps humide et sec respectivement. L'analyse des échantillons a porté sur la phase liquide ainsi que sur les matières en suspension (MES) et les sédiments.

## **2. Matériel et méthodes**

### **2.1. Réactifs**

Le 17 $\beta$ -Estradiol (E2) et la L-triiodothyronine (T3) ont été fournis par Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Les solutions de E2 et les extraits d'eaux et de matières en suspension sont préparés et dilués dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) de qualité CLHP (Sigma-Aldrich). Les solutions de T3 sont préparées et diluées dans de l'eau ultrapure, additionnée de NaCl à 9%. L'eau ultrapure est obtenue par osmose (système MilliRIOS<sup>®</sup>) et déminéralisation/purification avec un système MilliQ<sup>®</sup> (Millipore, St-Quentin-en-Yvelines, France). Tout le matériel utile à la culture cellulaire provient de Life Technologies (Cergy-Pontoise, France). Les solvants utilisés pour l'extraction : méthanol Hipersolv Chromanorm, n-hexane Pestinorm<sup>®</sup> et l'acétone Normapur sont fournis par VWR (Fontenay sous Bois, France)

### **2.2. Préparation des échantillons**

Les prélèvements d'eau sont réalisés dans flacons en verre ambré, bouchés Téflon préalablement nettoyés aux détergents, rincés à l'eau ultrapure puis au méthanol. Après l'échantillonnage, les eaux sont rapidement filtrées sur fibre de verre de porosité moyenne 1 $\mu$ m (Filtres GF/B Whatman, France) et conservées à 4°C au maximum 48 heures. Les filtres sont également conservés à 4°C pour extraction des matières en suspension (MES).

L'extraction de la phase liquide est pratiquée sur des cartouches Oasis HLB 500 mg (Waters, Guyancourt, France), préalablement conditionnées par des lavages successifs au méthanol et à l'eau ultrapure. Un litre de chaque prélèvement est ensuite percolé, à un débit de 5 mL/min puis la cartouche est séchée pendant 5 min sous flux d'air. L'élution est réalisée avec 2x5 mL de méthanol à un débit de 1 mL/min. L'éluat est évaporé à sec sous azote à 40°C et les extraits secs sont repris dans du DMSO. Ces derniers sont conservés au congélateur à -20°C dans des flacons en verre ambré.

Les MES sont extraites par sonication dans du méthanol: les filtres sont découpés et placés dans des tubes en verre contenant du sulfate de sodium anhydre et 10 ml de méthanol. Après passage aux ultrasons (cuve Branson 3510, Emerson Industrial Automation) pendant 15 minutes, le surnageant est récupéré puis centrifugé à 3000 tours/min pendant 10 minutes. Ce protocole est réalisé une

deuxième fois puis les éluats méthanoliques sont regroupés, évaporés sous azote et repris dans 200 µL de DMSO.

Des échantillons de sédiments ont été récupérés pour la campagne de juin 2008. L'extraction est réalisée par sonication dans un mélange hexane/acétone (50/50 v/v) selon le protocole utilisé pour l'extraction des PBDE (Pierre Labadie, UMR 7619 Sisyphe). Une prise d'essai d'environ 2g de sédiment lyophilisé est dissoute dans 10 ml du mélange hexane-acétone et placée aux ultrasons pendant 15 minutes. Après centrifugation et reprise de l'éluat, une nouvelle extraction est réalisée dans les mêmes conditions. Enfin, le culot est nettoyé par 5 ml du mélange hexane-acétone. L'ensemble des éluats (soit 25 ml) sont regroupés et mis à évaporer sous azote. L'extrait est finalement repris dans 200 µL de DMSO.

Les extraits dans le DMSO sont conservés à -20°C jusqu'à l'analyse. Pour éviter la cytotoxicité, les extraits sont dilués au moins 1000 fois dans le milieu de culture cellulaire. Des témoins d'extraction en phase solide sont réalisés en parallèle avec de l'eau ultrapure suivant la même procédure que les extraits environnementaux.

## **2.3. Tests biologiques**

### **2.3.1. Principe**

Deux tests cellulaires basés sur le même principe ont été utilisés pour détecter la présence de perturbateurs endocriniens. Les tests PC-DR-LUC et MELN permettent de détecter respectivement les perturbations de la transcription des récepteurs aux hormones thyroïdiennes et estrogènes.

- Le test PC-DR-LUC permet de détecter les composés capables d'interférer avec la transcription génique médiée par le récepteur  $\alpha 1$  aux hormones thyroïdiennes (TR $\alpha 1$ ). Des cellules PC12 de phéochromocytome de rat, exprimant l'isoforme  $\alpha 1$  du récepteur aux hormones thyroïdiennes ont été transfectées avec un gène rapporteur luciférase dont l'activité sur la luciférine induit une luminescence d'intensité proportionnelle à l'activité transcriptionnelle. Le test a été adapté en microplaques et optimisé afin d'obtenir une haute sensibilité et sélectivité (Jugan *et al.*, 2007).

- Le test MELN a été construit à partir d'une lignée de cellules MCF7 de cancer du sein humain, transfectées de façon stable avec un gène rapporteur luciférase (Balaguer *et al.*, 1999). Ce test cellulaire, généreusement fourni par P. Balaguer (INSERM U540, Montpellier), permet de détecter les perturbations liées au récepteur aux estrogènes ER $\alpha$ .

Les deux modèles cellulaires permettent d'évaluer de façon simple l'activité transcriptionnelle des 2 récepteurs TR et ER, proportionnelle à la production de luciférase par les cellules mesurée par luminescence.

En parallèle, la viabilité cellulaire est évaluée par le test MTT pour s'assurer de l'absence de toxicité des extraits.

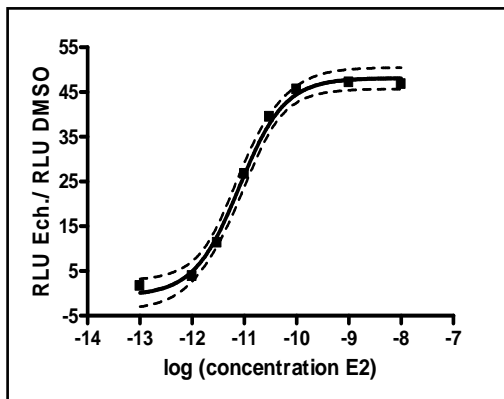
### **2.3.2. Protocole de lecture de l'activité luciférase**

Les cellules MELN ou PC-DR-LUC sont placées en plaque 96 puits opaques (Becton Dickinson, Le-Pont-de-Claix, France) à une densité de  $2 \cdot 10^4$  cellules par puits, dans du milieu de culture DMEM sans rouge de phénol complété avec 15 % d'un mélange de sérum de cheval et de veau fœtal. Après 24 h d'adhérence, les cellules sont mises en présence des extraits environnementaux, et en présence ou en absence d'hormones afin d'étudier indépendamment d'éventuels effets mimétiques ou antagonistes/synergiques. Après 16 h d'incubation, les cellules sont rincées 2 fois au PBS et l'activité luciférase est lue sur les cellules lysées à l'aide du kit «luciférase reporter gene assay» (Roche Applied Science, Meylan, France), avec un luminomètre Centro LB 960 (Berthold, Thoiry, France). Le signal obtenu pour un échantillon est rapporté à celui du témoin négatif et le résultat final est exprimé en Relative Luminescence Unit (RLU). L'analyse de chaque extrait est répétée 5 fois et parallèlement à une gamme d'hormone naturelle (respectivement E2 et T3 pour MELN et PC-DR-

LUC), afin de réaliser une évaluation quantitative de l'activité des extraits, exprimée en ng/L d'équivalent E2 (EEQ) ou T3 (TEQ).

### 2.3.3 Traitement des résultats

La distribution normale de la réponse des tests biologiques, exprimée en RLU, a été confirmée par un test de Shapiro-Wilk (n=10), pour toutes les concentrations étudiées, permettant ainsi l'utilisation d'un test paramétrique. Pour chaque échantillon analysé, un test de Student est effectué pour comparer la réponse obtenue pour cet échantillon à la réponse obtenue pour le témoin DMSO. La courbe d'étalonnage sigmoïde (figure 1) est estimée avec le logiciel Graphpad Prism 4 (San Diego, CA), permettant ensuite de déterminer les concentrations des extraits ayant montré une induction significative de luciférase :



$$RLU/RLU_{DMSO} = B + \frac{T - B}{1 + 10^{\log(EC50) - \log(Concentration)}}$$

$$Concentration = \log(EC50) - \log\left(\frac{T - RLU/RLU_{DMSO}}{RLU/RLU_{DMSO} - B}\right)$$

Figure 1 : Exemple de courbe d'étalonnage

La plus petite concentration d'hormone capable d'induire une réponse significative (p<5%, test de Student) par comparaison au contrôle négatif correspond à la limite de détection LD. La limite de quantification est la concentration correspondant au signal de la première concentration de la gamme additionné de son écart-type.

Pour les extraits d'eau montrant une induction significative de luciférase par rapport au témoin (>LOD) mais inférieure à la limite de quantification, le résultat est exprimé comme inférieur à la limite de quantification (< LOQ). Par ailleurs, les extraits montrant une activité luciférase égale au plateau de la courbe dose-réponse aux hormones naturelles sont systématiquement dilués afin de déterminer les teneurs en équivalents.

Les concentrations en EEQ et TEQ sont exprimées en ng/L d'échantillon avant l'extraction en phase solide.

## 2.4. Campagne de prélèvements

Deux campagnes ont été réalisées en juin et septembre 2008 dans le bassin versant de l'Orge. Des prélèvements ont été réalisés le long de la Prédecelle (amont tête de bassin, aval STEP Pecqueuse en amont de Limours, aval Limours, rejets d'eaux pluviales en aval de Limours, affluent et effluent de la STEP de Briis sous Forge, amont, sortie et aval de l'étang de Vaugrigneuse). Des échantillons ont été prélevés dans les affluents et rejets de la STEP de Briis sous Forge. Des prélèvements ont également été effectués dans l'Orge en amont et aval de la confluence avec la Prédecelle.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Evaluation des effets perturbateurs estrogéniques

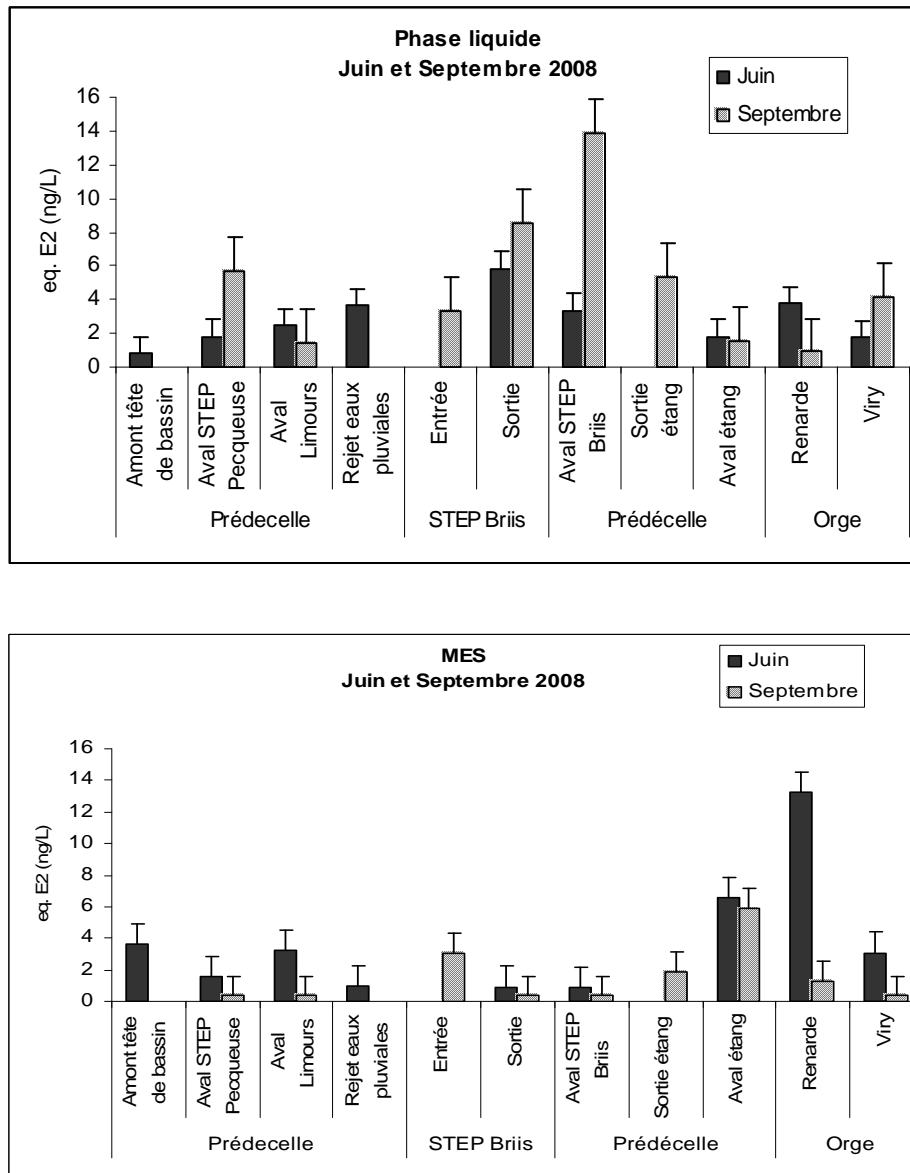


Figure 2 : Effets estrogéniques exprimés en équivalents estradiol (EEQ en ng/L) quantifiés dans la phase liquide (figure en haut) et dans les matières en suspension (figure en bas) durant les campagnes de juin et septembre.

Les extraits de rivière ont été testés sur le modèle MELN à une concentration en micropolluants correspondant (sous réserve des capacités d'extraction) à celle présente dans l'échantillon initial. La figure 2 rapporte les concentrations exprimées en équivalents E2 déterminées dans la phase liquide et dans les MES des échantillons prélevés durant les campagnes de juin et septembre. Il est à noter que ces valeurs sont supérieures à celles observées durant la campagne de juin 2007 au plus égales à 3 ng/L en équivalents E2. La campagne de juin a été réalisée par temps humide contrairement à celle de septembre, réalisée par temps sec. Ceci explique que certains prélèvements n'ont pu être effectués en septembre (amont tête de bassin, rejet eaux pluviales). Les concentrations

généralement plus élevées observées dans la phase liquide en septembre s'expliquent par une concentration des polluants résultant du manque de pluie. Pour les matières en suspension, les teneurs paraissent plus élevées en juin. L'interprétation de ces valeurs nécessite de les pondérer par la quantité de MES des échantillons et de les rapprocher des valeurs des autres paramètres analysés.

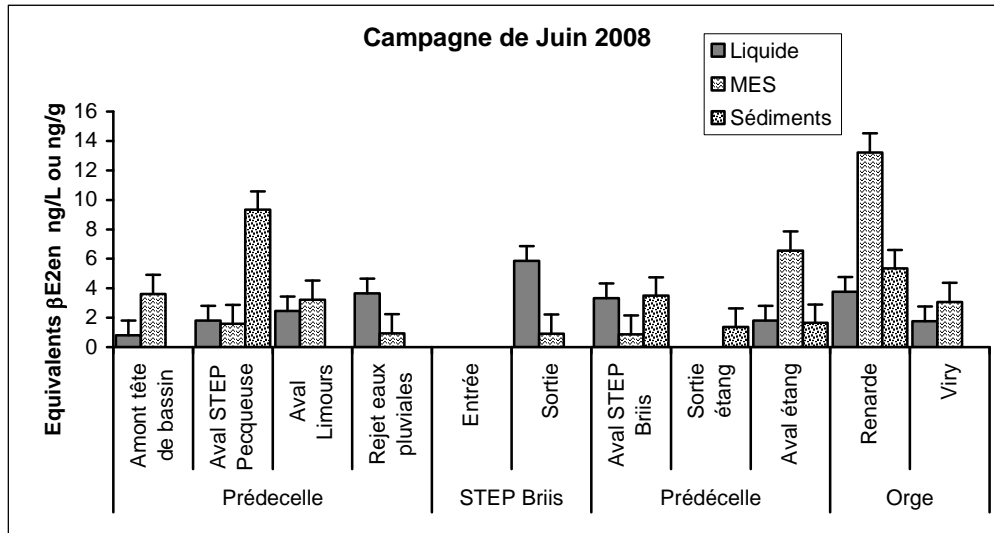


Figure 3 : Effets estrogéniques exprimés en équivalents estradiol (EEQ en ng/L pour la phase liquide et les MES, ng/g pour les sédiments) quantifiés dans la phase liquide, les matières en suspension et les sédiments des prélèvements de la campagne de juin 2008.

La figure 3 regroupe les effets estrogéniques observés dans la phase liquide, les matières en suspension et les sédiments des prélèvements effectués en juin 2008. Comme montré lors de la campagne de 2007, les effets observés dans les extraits de la phase liquide sont dus en partie aux hormones naturelles et synthétiques présentes dans ces mêmes échantillons.

Il est intéressant de noter une concentration élevée dans l'eau du rejet pluvial sur la Prédecelle qui s'explique par le constat du mélange de ces eaux pluviales avec des eaux usées.

Des concentrations importantes sont observées sur les MES et les sédiments, surtout en aval de STEP et en particulier pour les MES en aval de l'étang de Vaugrigneuse. Sur ces échantillons, la perturbation serait plus à rapprocher d'une contamination par des dérivés chlorés (pesticides) ou des phtalates et ceci pourrait expliquer les concentrations élevées observées dans des échantillons plus dépendants du ruissellement. Le rapprochement de ces résultats avec ceux des autres paramètres mesurés durant ces campagnes permettra de compléter l'interprétation.

### 3.2. Evaluation des effets perturbateurs thyroïdiens

Les effets perturbateurs observés sur modèle PC-DR-LUC sont très faibles dans la phase liquide ce qui a déjà été observé lors d'études sur les STEP de Seine Amont et Seine Centre et la SEINE au cours de travaux précédents (publication Sc. Tot. Environ. Acceptée).

Le tableau I regroupe les résultats obtenus durant les campagnes de juin et septembre.

*Tableau I : Effets perturbateurs thyroïdiens observés dans la phase liquide, les MES et les sédiments des prélèvements effectués durant les campagnes de juin et septembre 2008. <LQ= inférieur à la limite de quantification, NS= inférieur à la limite de détection.*

Localisation des prélèvements		Campagne juin 2008			Campagne septembre 2008	
		Liquide	MES	Sédiments	Liquide	MES
Prédécelle	Amont tête de bassin	<LQ	<b>66,1</b>			
	Aval STEP Pecqueuse	NS	NS	NS	NS	<LQ
	Aval Limours	NS	<b>61,7</b>		NS	NS
	Rejet eaux pluviales	<LQ	<LQ			
STEP Briis	Entrée				<LQ	<b>93,79</b>
	Sortie STEP	<LQ	<LQ		NS	<LQ
Prédécelle	Aval STEP Briis	NS	<b>547,2</b>	NS	NS	NS
	Amont étang			NS		
	Sortie étang			NS	NS	NS
	Aval étang	<LQ	<LQ	NS	NS	NS
Orge	Renarde	NS	<b>55,6</b>	NS	NS	NS
	Viry	NS	<LQ		NS	NS

Des effets sont détectables mais non quantifiables, surtout dans les MES et paraissent plus importants en juin. Contrairement à nos attentes, aucun effet n'est détecté dans les extraits de sédiments. Une relation positive est observée entre les résultats obtenus pour la phase liquide et pour les MES d'un même échantillon. Ainsi, des effets sont détectés dans la phase liquide et dans les MES au niveau de la tête de bassin, du rejet d'eaux pluviales, de la sortie de STEP et en aval de l'étang de Vaugrigneuse. Ces résultats doivent être rapprochés des dosages en PBDE et phtalates effectués dans ces mêmes échantillons.

Aucun effet antagoniste thyroïdien n'a été observé sur ces extraits.

## Conclusion

Cette étude, a permis de confirmer la pollution des eaux de surface par des perturbateurs de la transcription des récepteurs TR $\alpha$ 1 aux hormones estrogènes avec effets agonistes. Cette perturbation est observée aussi bien dans la phase liquide que dans les MES et les sédiments. La comparaison de ces données sur les effets biologiques avec celles des analyses chimiques effectuées sur ces mêmes prélèvements permettra éventuellement de relier cette perturbation aux principaux polluants organiques. Les résultats obtenus sur le modèle PC-DR-LUC (récepteurs aux hormones thyroïdiennes) attestent d'effets significatifs agonistes de certains extraits de MES prélevés en amont et aval de STEP.

## Bibliographie

Balaguer, P. Francois, F. Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A. M., Pons, M., Nicolas, J. C., Casellas, C., 1999. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens, *Sci Total Environ*, 233 (1-3), 47-56

Cargouet, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y., 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci Total Environ* 324, 55-66.

Houtman, C.J., Cenijn, P.H., Hamers, T., Lamoree, M.H., Legler, J., Murk, A.J., Brouwer, A., 2004. Toxicological profiling of sediments using *in vitro* bioassays, with emphasis on endocrine disruption. *Environ Toxicol Chem* 23, 32-40.

Jugan, M.L., Levy-Bimbot, M., Pomerance, M., Tamisier-Karolak, S., Blondeau, J.P., Levi, Y., 2007. A new bioluminescent cellular assay to measure the transcriptional effects of chemicals that modulate the alpha-1 thyroid hormone receptor. *Toxicol In Vitro* 21, 1197-1205.

Jugan M.L., Oziol L., Bimbot M., Huteau V., Tamisier-Karolak S., Blondeau J.P., Lévi Y. (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). *Sci Total Environ*, *Accepté pour publication*.

Meulenberg, E., Marchesini, G., 2006, Thyroid hormone like activity - biosensor screening of surface water: Rapport de l'Association of River Waterworks – RIWA.

Miege C., Karolak S., Gabet V., Jugan M-L., Oziol L., Chevreuil M., Levi Y., Coquery M. (2009) Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis – TrAC, *accepté pour publication*.