

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.

Mary-Line Jugan¹, Maya Bimbot¹, Viviane Huteau¹, Sara Karolak^{1*}, Jean-Paul Blondeau², Yves Lévi¹

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

2. IFR 141 – Ciblot - Faculté de Pharmacie – Université Paris-Sud 11.

* sara.karolak@u-psud.fr

1. Introduction

Parmi les micropolluants organiques présents, en mélange, dans les eaux de surface et les eaux souterraines influencées, se trouvent des produits d'origine domestique ou industrielle susceptibles d'engendrer des perturbations des systèmes endocriniens. Il en résulte un risque pour la faune, voire pour l'homme par la contamination des ressources destinées à la production d'eau de consommation humaine. La présente étude, menée dans le bassin versant de l'Orge, avait pour but d'évaluer l'effet perturbateur des mélanges de micropolluants organiques sur les systèmes estrogénique et thyroïdien. Deux tests cellulaires ont été utilisés, tout deux capables de réagir aux produits susceptibles de modifier l'activité transcriptionnelle des récepteurs intracellulaires aux estrogènes (ER α) et aux hormones thyroïdiennes (TR α 1).

2. Matériel et méthodes

2.1. Réactifs

Le 17 β -Estradiol (E2) et la L-triiodothyronine (T3) ont été fournies par Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Les solutions de E2 et les extraits d'eaux et de matières en suspension (MES) sont préparés et dilués dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) de grade 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[®]) et purification avec un système MilliQ[®] (Millipore, St-Quentin-en-Yvelines, France). Tout le matériel utile à la culture cellulaire provient de Life Technologies (Cergy-Pontoise, France).

2.2. Préparation des échantillons

Les prélèvements d'eau ont été réalisés dans des récipients en verre teinté préalablement nettoyés aux détergents, rincés à l'eau ultrapure et au méthanol. Après l'échantillonnage, les prélèvements sont rapidement filtrés sur fibre de verre de porosité moyenne 1 μ m (Whatman, France) et conservés à 4°C au maximum 48 heures. L'extraction en phase solide 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 à 40°C et les extraits secs sont repris dans du DMSO. Ces derniers sont conservés au congélateur à -20°C dans des vials en verre teinté. Pour éviter la cytotoxicité, les extraits sont dilués au moins 1000 fois dans le milieu de culture cellulaire, ce qui conduit à un facteur de concentration de 3 fois la concentration initiale dans l'eau. Des témoins d'extraction en phase solide sont réalisés en parallèle avec de l'eau ultrapure suivant la même procédure que les extraits environnementaux.

Pour un échantillon, une extraction supplémentaire a été effectuée afin de récupérer les éventuels polluants adsorbés sur les matières en suspension. Le filtre, résultant de la filtration initiale, a été placé, sous sonication de 10 minutes en cuve Branson 3510, dans un bécher rempli de méthanol. La solution méthanolique a ensuite été centrifugée, évaporée à sec puis reprise dans du DMSO.

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 liées aux hormones thyroïdiennes et aux estrogènes.

- Le protocole PC-DR-LUC permet de détecter les composés capables de se lier au récepteur $\alpha 1$ aux hormones thyroïdiennes (TR $\alpha 1$), ainsi que ceux qui interfèrent avec l'induction de l'expression des gènes médiée par TR $\alpha 1$. Les cellules sont issues des PC12 de phéochromocytome de rat, exprimant l'isoforme α du récepteur aux hormones thyroïdiennes. Elles ont été transfectées de façon stable avec un gène rapporteur luciférase et le test a été adapté en microplaques et optimisé afin d'obtenir une haute sensibilité et sélectivité (Jugan *et al.*, 2007).

- Le protocole MELN a été construit à partir d'une lignée de cellules de cancer du sein humain, sensibles aux estrogènes, 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 α .

Les deux tests permettent d'évaluer de façon simple l'activité transcriptionnelle des 2 récepteurs TR et ER, proportionnelle à la luminescence émise par les cellules.

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 mises 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, en présence ou en absence d'hormones afin de d'étudier indépendamment d'éventuels effets mimétiques ou antagonistes/synergiques. Après 16 h d'incubation en présence ou absence des extraits d'eau, 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 adapté aux microplaques (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 Unités de Luminescence Relative (RLU). Chaque extrait est analysé en quintuplats 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 a été confirmée par un test de Shapiro-Wilk (n=10), pour toutes les concentrations étudiées, permettant ainsi l'utilisation d'un test paramétrique. De ce fait, la plus petite concentration d'hormone capable d'induire une réponse significative par comparaison au contrôle négatif correspond à la limite de détection LD. Pour les extraits montrant une induction significative de luciférase, la concentration correspondante en hormone et exprimée en équivalents (EEQ ou TEQ) a été déterminée après linéarisation de la courbe

dose-réponse (figure 1) par la représentation de Scatchard à l'aide du logiciel Graphpad Prism 4 (San Diego, CA), selon la formule suivante :

$$\text{TEQ or EEQ} = \frac{RLU}{b \cdot RLU + a}$$

b et a : respectivement pente et intersection de la partie linéaire de la représentation de Scatchard.

La limite de quantification correspond à la plus petite concentration prise en compte dans la représentation de Scatchard.

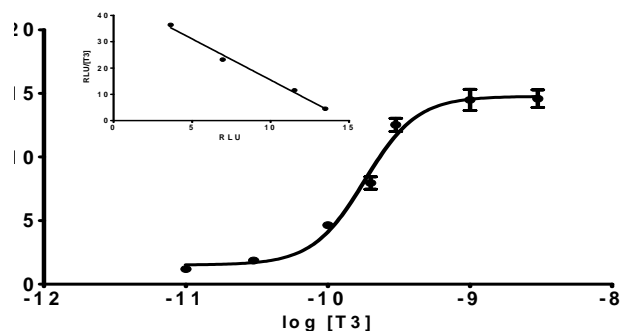


Figure 1 : courbe dose-réponse obtenue sur le modèle PC-DR-LUC. La figure en insert correspond à la représentation de Scatchard.

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). A l'opposé, les extraits montrant une activité luciférase plus élevée que le plateau de la courbe dose-réponse aux hormones naturelles sont systématiquement dilués afin de déterminer les teneurs en équivalents.

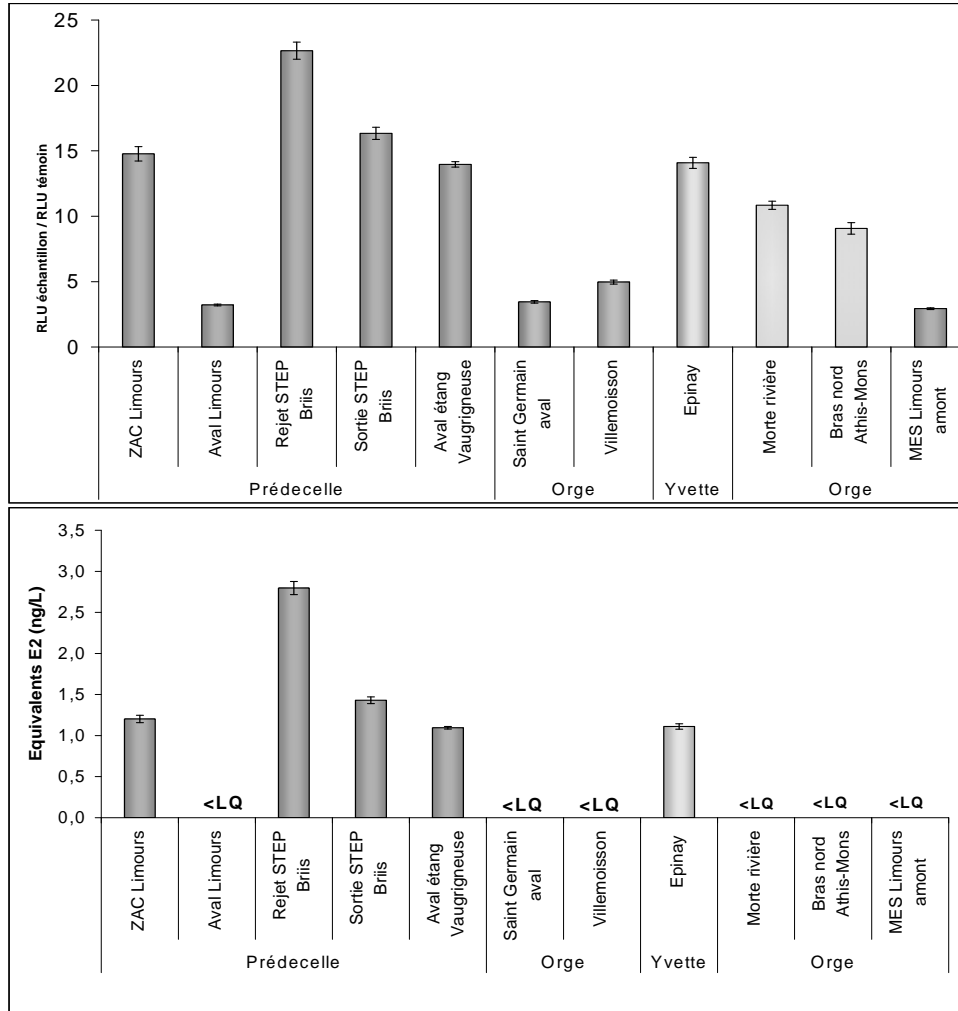
Les concentrations en EEQ et TEQ sont exprimées en ng/L d'échantillon avant l'extraction en phase solide.

2.4. Campagne de prélèvements

Une seule campagne a été réalisée fin septembre 2007 dans le bassin versant de l'Orge. Des prélèvements ont été réalisés le long de la Prédecelle (Amont Limours, Aval Limours, Aval STEP de Briis, Aval de l'étang de Vaugrigneuse). Un échantillon a été prélevé dans le rejet de la STEP de Briis et d'autres dans l'Orge, en amont de la confluence de la Prédecelle à Saint Germain les Arpajons, puis en amont et aval de la confluence avec l'Yvette et à Athis-Mons. Un prélèvement a été réalisé dans l'Yvette, juste avant sa confluence avec l'Orge.

3. Résultats et discussion

3.1. Evaluation des effets perturbateurs estrogéniques



Figures 2 : Effets estrogéniques exprimés en intensité de luminescence relative (RLU) de l'échantillon par rapport au témoin (figure en haut) et en équivalents estradiol (EEQ en ng/L) (figure en bas).

Les extraits de rivière ont été testés sur le modèle cellulaire 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 valeurs de RLU obtenues pour les échantillons rapportées à celle du témoin négatif. Tous les extraits engendrent une induction significative de l'activité luciférase ($p < 0,01\%$ par rapport au témoin négatif) suggérant la présence de composés à effets agonistes estrogéniques dans les eaux de surface. Le rejet de la station d'épuration (STEP) de Briis présente la réponse la plus élevée et multiplie par 23 l'activité luciférase comparativement au contrôle. Cet effet diminue avec la dilution dans la rivière en aval de la station. L'induction de luciférase moyenne est plus importante dans la zone de la Prédecelle comparativement à celle de l'Yvette/Orge. Il est à noter que ces résultats montrent bien l'effet de la dilution des polluants en sortie de STEP avec la décroissance des valeurs entre le rejet de la STEP de Briis et l'aval de l'étang de Vaugrigneuse. De même, l'effet polluant de l'Yvette est bien marqué au niveau de sa confluence avec l'Orge, les valeurs mesurées dans cette rivière augmentant de façon proportionnelle après mélange avec les eaux de

l'Yvette. Une faible activité est notée dans l'échantillon correspondant aux matières en suspension relative au prélèvement en amont de Limours.

La quantification des équivalents en E2 n'a pu être réalisée que dans les échantillons les plus concentrés, situés principalement dans la zone de la Prédecelle. L'activité estrogénique globale de cette région est proche de 1,0 ng/L EEQ, valeur également retrouvée dans l'Yvette (figure 2, bas). Une concentration de 2,8 ng/L EEQ est mesurée en sortie de la STEP. Aucune quantification n'a pu être réalisée dans l'Orge.

L'analyse de ces résultats montre l'existence d'un potentiel perturbateur estrogénique dans les eaux de surface, essentiellement à proximité des zones de rejets de STEP. En effet, les concentrations mesurées décroissent en aval des rejets par dilution progressive de ces derniers dans la rivière. Il est à noter que le premier prélèvement présentant une concentration significative d'équivalent EEQ, a été réalisé en sortie d'une ZAC recueillant les effluents domestiques d'une zone pavillonnaire. Les valeurs trouvées dans les rivières et dans le rejet de la STEP coïncident avec celles déjà relevées dans la littérature.

Compte tenu des résultats obtenus, des effets antagonistes/synergiques ont été recherchés par incubation de ces mêmes échantillons sur les cellules MELN en présence d'E2 à une concentration de 10^{-11} mole/L (figure 3).

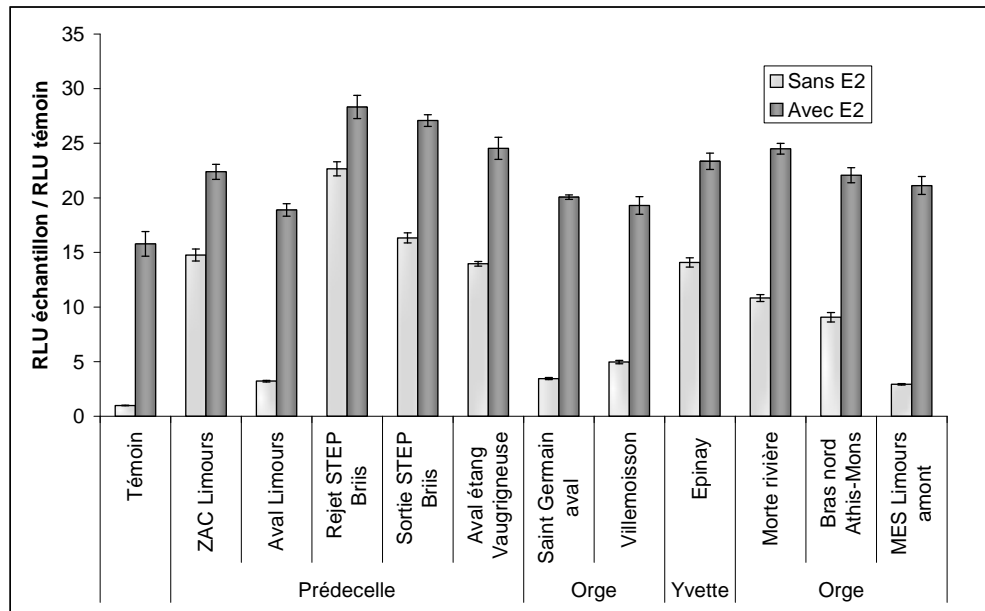


Figure 3 : Recherche d'effets antagonistes/synergiques avec l'estradiol. Réponses observées dans les échantillons incubés en absence ou en présence d'E2 à $10^{-11}M$.

Dans ces conditions, tous les échantillons ont présenté une réponse significativement supérieure à celle de la solution témoin en E2. Aucun effet antagoniste n'a donc été observé. La valeur de l'induction semble être corrélée à l'induction de luciférase en absence de E2, les échantillons ayant montré une réponse élevée en absence d'E2 présentant les valeurs les plus élevées en présence d'E2. Ceci pourrait s'expliquer soit par un effet génomique lié, par exemple, à la présence de composés montrant plus d'affinité que E2 pour le récepteur ER, ou par une synergie entre l'estradiol et les composés présents dans l'eau, soit par des effets non génomiques, impliquant par exemple une induction de l'expression du récepteur ER.

3.2. Evaluation des effets perturbateurs thyroïdiens

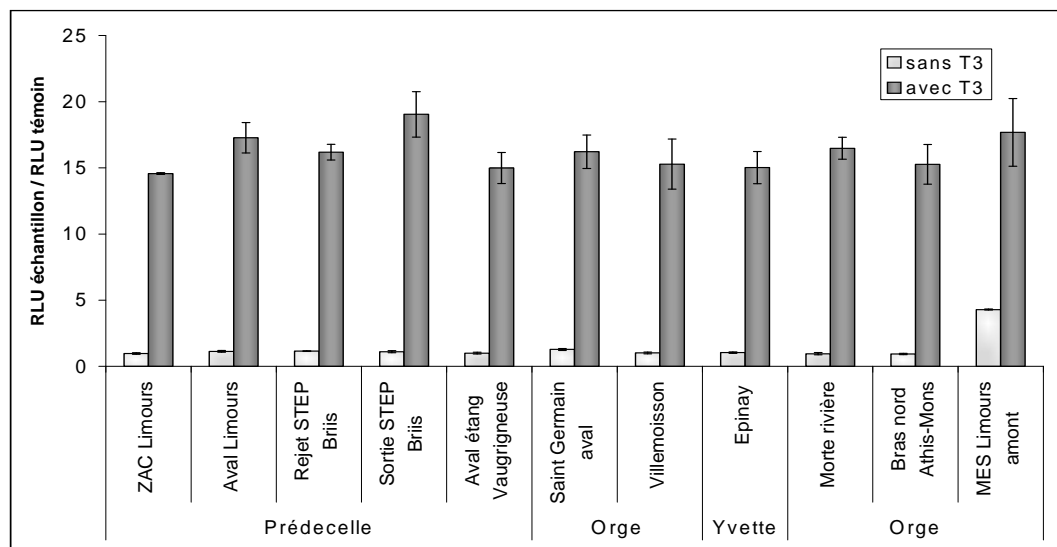


Figure 4 : Effet des extraits sur le test PC-DR-LUC en présence ou en absence de l'hormone thyroïdienne T3 (* $p < 0,01$)

Contrairement aux résultats obtenus sur le modèle MELN, aucun effet n'a été détecté avec le modèle PC-DR-LUC attestant d'une absence d'effet perturbateur thyroïdien détectable dans les échantillons analysés (figure 4). De même, aucun effet antagoniste n'a été mis en évidence. Cependant, il est à noter qu'une induction significative de l'activité luciférase est observée en présence de l'extrait de MES de l'amont de Limours. L'activité luciférase est multipliée par 4,2 ce qui suggère la présence de composés qui interfèrent avec la transcription de gène médiée par le récepteur TR α 1 ou qui possèdent une affinité pour le récepteur TR α 1. Cette activité est quantifiable et s'élève à 20 ng/L TEQ.

A notre connaissance et excepté nos travaux en cours dans le cadre du doctorat de Melle Jugan, il n'existe aucune donnée concernant l'évaluation de l'activité thyroïdienne des eaux en France. L'absence d'effet thyroïdien dans les eaux de surface et les rejets observé pour cette campagne est en accord avec d'autres résultats par notre laboratoire sur différentes eaux de surface et effluents de la région parisienne (résultats en cours de publication). Néanmoins, un certain nombre d'études mettent en évidence la présence de perturbateurs thyroïdiens dans les sédiments (Houtman *et al.*, 2004 ; Meulenberg *et al.*, 2006), ce qui justifie le résultat obtenu sur les matières en suspension.

Conclusion

Cette étude a permis, par une approche biologique globale, de confirmer l'existence d'une pollution des eaux de surface responsable d'effets perturbateurs estrogéniques : des effets significatifs sont ainsi relevés en sortie de STEP mais diminuent par dilution des rejets dans les rivières. Des concentrations de l'ordre de 1 à 2 ng/L équivalent E2 ont été notées, en accord avec les valeurs déjà trouvées dans la Seine région parisienne à l'occasion de nos études précédentes (Cargouët *et al.* 2004).

Par contre, aucun effet perturbateur thyroïdien n'a été observé dans la phase liquide des échantillons. Néanmoins, une réponse significative est relevée dans les matières en suspension. Ce résultat était envisageable car les molécules identifiées comme perturbateurs thyroïdiens sont apolaires, tel que le nonylphénol. De ce fait, les méthodes d'évaluation des effets perturbateurs vont

être optimisées pour l'analyse des matières en suspension, ce qui permettra une estimation complète des effets sur les phases liquide et solide.

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.

Meulenberg, E., Marchesini, G., 2006, Thyroid hormone like activity - biosensor screening of surface water: Association of River Waterwork.