

Développement d'un outil de suivi sur site de l'effet perturbateur endocrinien potentiellement induit par les rejets de station d'épuration

■ L. CASTILLO¹, A. MAITROT¹, J.-F. MOUGEL², D. DU PASQUIER³, G.F. LEMKINE³

Mots-clés : perturbateur endocrinien, mesure d'effet automatisée, suivi en ligne, outil biologique, station d'épuration, Biottope, FrogBox

Keywords: endocrine disruptors, on-site monitoring, biological tools, automated read-out, waste water treatment plant, Biottope, FrogBox

Introduction

De nombreuses molécules chimiques, issues du développement industriel et urbain, ont été mises sur le marché au cours de ces deux derniers siècles, ou sont générées par les activités anthropiques. Elles sont maintenant présentes dans l'environnement à l'état de traces. Ces composés présentent une grande diversité dans leurs structures chimiques, leurs propriétés physico-chimiques et leurs effets sur les organismes [CHOUBERT *et al.*, 2009 ; ROSSI *et al.*, 2009 ; GEARA-MATTA *et al.*, 2011 ; PETRIE *et al.*, 2014]. Certains de ces composés ont une activité de perturbation endocrinienne supposée ou démontrée. Un perturbateur endocrinien est une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant de ce fait des effets néfastes sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou de sous-populations [EFSA, 2013 ; WHO/IPCS, 2002]. L'évaluation du risque de perturbation endocrinienne

demande des efforts considérables de recherche pour être plus performante et mieux contrôlée. C'est l'un des enjeux importants de la mise en œuvre des réglementations récentes (REACH⁴, DCE⁵, arrêté préfectoral complémentaire⁶) ou futures (stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens).

Ces perturbateurs endocriniens sont présents dans les rejets urbains et dans l'environnement en général à de faibles concentrations. Leur taux d'élimination dans les stations d'épuration des eaux usées (STEU) est habituellement compris entre moins de 10 % et plus de 95 % en fonction de la molécule considérée [VIRKUTYTE *et al.*, 2010, PETRIE *et al.*, 2014]. Ces taux d'élimination suggèrent une réduction des éventuels effets toxiques spécifiques sur les organismes aquatiques du milieu récepteur. Néanmoins, avec des milliers de molécules différentes présentes dans les eaux usées et l'environnement, il est évidemment impossible de les analyser tous, ou même une proportion raisonnable d'entre eux. Le suivi environnemental des rejets urbains et des milieux aquatiques doit aujourd'hui s'appuyer sur l'utilisation de méthodes fondées sur des modèles biologiques capables de révéler l'effet d'un mélange complexe. Ces modèles permettent d'évaluer et de mesurer les effets des molécules d'intérêt sur le vivant en considérant leurs biodisponibilités, leurs toxicités intrinsèques, leurs interactions dans un mélange complexe et leurs présences en faibles concentrations dans des matrices environnementales diverses.

¹ Veolia Recherche & Innovation – Chemin de la Digue – BP 76 – 78603 Maisons-Laffitte cedex – France.
Courriel : Luis.castillo@veolia.com

² Aquiris – Avenue de Vilvorde, 450 – 1130 Bruxelles – Belgique.

³ WatchFrog SA – 4, rue Pierre-Fontaine – 91000 Évry – France.
Courriel : lemchine@watchfrog.fr

⁴ Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances : règlement du Parlement européen et du Conseil n° 1907/2006 du 18 décembre 2006, entré en vigueur en France le 1er juin 2007.

⁵ Directive cadre sur l'eau : directive n° 2000/60 du 23 octobre 2000, transposée en droit français en 2004.

⁶ Arrêté préfectoral complémentaire n° 11/01163 du 18 avril 2011 prescrivant des mesures de suivi (perturbation endocrinienne) des rejets aqueux et du milieu récepteur.

Un nombre considérable d'outils ou modèles *in vitro*, *in vivo* et d'indicateurs écologiques ont été développés ces dernières années pour évaluer si une substance chimique est capable d'altérer le fonctionnement normal d'un axe endocrinien [BORGERT *et al.*, 2011 ; OCDE 2012a]. Certaines de ces méthodes sont utilisées depuis de longues années par l'industrie chimique et pharmaceutique lors du développement de nouvelles molécules et sont maintenant de plus en plus adaptées

et utilisées pour l'évaluation de la qualité de l'eau. Ces modèles permettent la mise en évidence des effets physiologiques sur les organismes exposés, voire de déterminer les modes d'action des substances chimiques [OCDE, 2012b]. Ces approches offrent en plus l'avantage de pouvoir évaluer la matrice dans sa globalité, le degré de pollution d'un milieu, ou bien encore la toxicité potentielle des rejets. Dans le cadre de la DCE (Common Implementation Strategy

Type d'essai	Test	Méthode de détection	Modèle biologique	Référence
<i>In vivo</i> (organisme entier)	Observation de changements dans le phénotype de l'organisme	Production de protéine	Organismes (poissons, amphibiens)	Demeneix et Balaguer, 2008 Campbell <i>et al.</i> , 2006
		Développement : malformations, anomalies des gonades, production d'œufs...		
		Reproduction : intersexe, stérilité...		
<i>In vitro</i> (bioessais cellulaires)	(L-)Yeast Estrogen Screen	Colorimétrie ou luminescence	Levure	Routledge et Sumpter, 1996 Schultis et Metzger, 2004
	E-Screen	Prolifération cellulaire	Lignée cellulaire MCF7 (cellules du cancer du sein)	Soto <i>et al.</i> , 1995
	ER-CALUX	Luminescence	Cellules du cancer du sein	Legler <i>et al.</i> , 1999
	ER-Luciférase assay	Luminescence	Lignée cellulaire HEK293 (cellules humaines embryonnaires de rein)	Kuiper <i>et al.</i> , 1998 Pawlowski <i>et al.</i> , 2003
	IR-Bio-Amplification	Fonction cellulaire	Lignées cellulaires de mammifères	Holman <i>et al.</i> , 2000
Bioessais non cellulaires	Receptor Binding Assays	Réponse radioactive	Récepteurs nucléaires aux œstrogènes	Scippo <i>et al.</i> , 2004 Leusch <i>et al.</i> , 2006
	ELISA, ELRA	Colorimétrie ou luminescence		Huang et Sedlak, 2001 Seifert <i>et al.</i> , 1999
	Biosensors	Résonance plasmonique de surface, fluorescence, signal électrochimique...		Hock <i>et al.</i> , 2002 Rodriguez-Mozaz <i>et al.</i> , 2004 Murata <i>et al.</i> , 2001

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assays ; ELRA : enzyme-linked receptor assay.

Tableau I. Description des différents essais utilisés pour évaluer la perturbation endocrinienne (liste non exhaustive, modifiée de Campbell *et coll.* [2006])

guidance documents n° 19 et 25), les outils basés sur l'effet peuvent être utilisés pour l'élaboration et la mise en œuvre des programmes de surveillance et pourraient servir à étayer l'évaluation de la qualité de l'eau et fournir un lien entre les évaluations chimiques et écologiques [EUROPEAN COMMISSION, 2014].

1. Modèles biologiques pour évaluer la perturbation endocrinienne

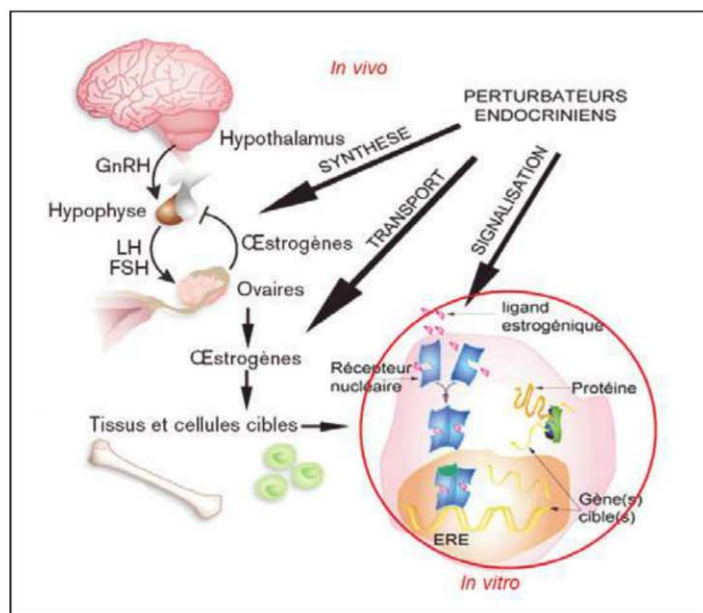
La mesure des effets d'une substance ou d'un mélange de substances doit permettre d'apporter des réponses sur l'impact éventuel sur une population, une communauté ou un écosystème (écotoxicologie) et pas

seulement sur un individu (toxicologie). La mesure de l'effet peut être réalisée de différentes manières, avec différents types d'outils offrant différents niveaux d'information. Le *tableau I* décrit brièvement certains de ces outils.

Parmi ces différents outils, certains peuvent être utilisables dans le cadre d'une biosurveillance *in situ*. On utilise alors des outils biologiques soit déjà présents (bio-indicateurs), soit apportés (biocapteurs, transplants...) sur le site d'étude. D'autres sont utilisables uniquement pour une biosurveillance *ex situ*. Ces derniers sont des tests réalisés en laboratoires, sous conditions contrôlées et le plus souvent normalisées et/ou standardisées (tests OCDE, Afnor...).

Critères de comparaison	Essais <i>in vitro</i>	Essais <i>in vivo</i>
Niveau d'information apporté	Toxicité intrinsèque de la substance	Toxicité intrinsèque de la substance sur l'organisme entier
Cibles visées	Molécules, cellules isolées (humaines et animales)	Organismes vivants, entiers
Mécanismes d'actions visés	Voies métaboliques et interactions entre métabolites actifs avec les cibles moléculaires et cellulaires	Réaction directe des substances mais aussi cascades de réaction en lien avec l'exposition à ces substances
Représentativité de la réponse	Limitée au processus toxicologique recherché Trop spécifique	L'organisme
Prise en compte de l'état physiologique de l'individu	Non	Oui
Approche milieu	Niveau cadre expérimental	Oui
Représentativité qualité des écosystèmes	Transposition difficile au niveau individuel, communautés et écosystèmes	Oui
Logistique du test	Difficulté de maintenir les particularités de l'organe cible	Exposition directe
Sensibilité et seuils (limite de détection de l'effet)	Très basse	Peut nécessiter des concentrations plus importantes que tests <i>in vitro</i>
Technologies déployées	Sophistiquées	Variables mais très réglementées (expérimentation sur animaux de laboratoire)
Nécessite un prétraitement	Oui	Non
Adapté pour screening, haut débit et automatisation	Certains	Non
Coût	Faible à élevé (mise en culture, maintien...)	Moyen – Élevé

Tableau II. Comparatif des tests *in vitro* et *in vivo*



GnRH : hormone libératrice de gonadotrophine (gonadotropin releasing hormone) ; LH : hormone lutéinisante (luteinizing hormone) ; FSH : hormone folliculostimulante (follicle stimulating hormone) ; ERE : éléments de réponse à l'œstrogène (estrogen response elements).

Figure 1. Schéma des mécanismes de perturbation de l'axe œstrogénique pouvant être détectés par les tests *in vitro* et *in vivo* (source : Muséum national d'histoire naturelle)

Le niveau de la réponse apportée est également différent selon les tests. Pour les essais *in vitro* : les effets recherchés se situent au niveau de la cellule vivante et intègrent toutes les réactions pouvant se réaliser au niveau cellulaire (fixation à un récepteur, réaction enzymatique, métabolisation...). Ces essais sont réalisés en laboratoire et nécessitent en général des prétraitements assez lourds et susceptibles de modifier l'échantillon avant l'exposition des cellules cibles à l'échantillon testé. Pour les essais *in vivo*, toutes les fonctions physiologiques de l'organisme vivant sont prises en compte (absorption, métabolisation, réactions au niveau cellulaire, élimination...). Ces essais ne nécessitent généralement pas de prétraitement de l'échantillon.

La littérature scientifique est très riche en méthodes de détection de divers effets de telle ou telle substance. Ces méthodes sont bien souvent présentées comme de nouveaux outils particulièrement performants [EUROPEAN COMMISSION, 2014]. Néanmoins, la majorité des outils actuellement recensés ne font l'objet d'investigation et de recherche que depuis une vingtaine d'années. Il n'existe donc actuellement que peu d'outils de mesure de l'écotoxicité

normalisés. Ces derniers sont, de plus, souvent difficiles à mettre en œuvre.

La mesure d'effet sur des échantillons environnementaux doit être réalisée avec des outils spécifiques permettant de ne pas avoir à prétraiter l'échantillon. La réponse doit être rapide, avec un coût acceptable de mise en œuvre et offrir une information pertinente sur l'impact sur les organismes. Cela conduit principalement à travailler avec des outils de type *in vivo*, et ce pour les raisons synthétisées dans le tableau II. Dans ce contexte, il a été développé de nouvelles méthodes d'analyse biologique *in vivo* rapides et simples de mise en œuvre permettant d'évaluer des effets biologiques spécifiques (perturbation endocrinienne, axe œstrogénique et thyroïdien). Ces modèles ont été développés par le Muséum national d'histoire naturelle [FINI *et al.*, 2007 ; DEMENEIX et BALAGUER, 2008] et par la société WatchFrog. Ils font appel des constructions génétiques permettant l'expression d'une protéine fluorescente de type GFP (green fluorescent protein) en présence de molécules induisant l'effet recherché. Ce « dosimètre moléculaire » a été ensuite intégré dans une larve d'amphibien xénope (*Xenopus laevis*) ou dans un alevin du poisson médaka (*Oryzias latipes*) prenant ainsi en compte l'ensemble des régulations biochimiques pouvant intervenir *in vivo* en réponse à l'échantillon testé (figure 1).

Une limitation des tests biologiques *in vitro* et *in vivo* actuels est liée à la nécessité de prélever des échantillons environnementaux. Ainsi, comme pour les analyses chimiques, la fréquence d'échantillonnage et le prétraitement des échantillons environnementaux sont des aspects importants à considérer. Les prétraitements peuvent provoquer une altération de la composition chimique d'un échantillon [EUROPEAN COMMISSION, 2014] et une fréquence d'échantillonnage insuffisante ne permet pas aux tests de révéler l'impact réel et dynamique de l'effluent. Cela souligne l'importance de développer de nouveaux outils permettant l'évaluation d'un effet biologique directement sur site, en continu et d'une manière la plus simple et automatisée possible. Le développement de ce type d'outil constitue l'objectif principal du projet Biottope (www.biottope.eu, LIFE11 ENV/FR/742). Ce projet a permis de tester ce type

d'approche pour évaluer la toxicité potentielle d'effluents de station d'épuration des eaux usées urbaines, en particulier l'effet perturbateur endocrinien (thyroïdien et œstrogénique). Ces outils ont été utilisés pour évaluer l'efficacité d'une technologie de traitement basée sur l'adsorption sur charbon actif en poudre, combinée à une sédimentation accélérée, pour l'élimination de perturbateurs endocriniens potentiellement présents dans ce type de rejet. Le projet a permis également le développement d'un système de lecture en flux automatisé pour la détermination, directement sur site, de l'effet perturbateur endocrinien. Cette publication se focalise sur les outils biologiques pouvant être utilisés pour évaluer la qualité de l'eau, et a plus spécifiquement pour objectif de décrire la procédure et les composants qui ont conduit au développement de ce système de lecture pour l'évaluation de la qualité des eaux.

2. Matériel et méthodes

2.1. Les modèles biologiques retenus pour l'évaluation de la perturbation endocrinienne

Le développement du système de lecture en flux automatisé pour évaluer la qualité (risque perturbateur endocrinien) des rejets est basé sur l'utilisation de petits modèles biologiques aquatiques (têtards de l'amphibien xénope et alevins du poisson médaka) associés à des marqueurs génétiques, afin d'être fluorescents lorsqu'ils sont en contact avec des perturbateurs endocriniens [DEMENEIX et BALAGUER, 2008 ; FINI *et al.*, 2007 ; CASTILLO *et al.*, 2013 ; TSM 2010, 2013]. La fluorescence induite par les

échantillons d'eau à tester est comparée à celle de témoins négatifs (eau minérale) et positifs (eau minérale dopée avec des hormones) à l'aide de tests statistiques adaptés (figure 2).

Ces modèles permettent ainsi d'évaluer la réponse de l'organisme à l'ensemble des molécules chimiques présentes dans la matrice et qui interagissent avec le système endocrinien. Ils intègrent les actions de toutes les molécules présentes dans l'échantillon, mais ne permettent pas d'identifier spécifiquement la ou les molécules en cause ni le mécanisme d'action qui va induire la réponse physiologique.

2.2. Le développement du dispositif de mesure en ligne

Le développement du prototype industriel automatisé a été réalisé à partir du préprototype d'un système de lecture en flux de la fluorescence émise par les petits organismes aquatiques modèles [FINI *et al.*, 2009]. Le principe de fonctionnement du dispositif de mesure en ligne est de quantifier de manière automatisée l'évolution de la fluorescence d'un groupe de larves exposées à un flux continu d'échantillon. Cet instrument est composé de deux réservoirs qui contiennent les larves dans un environnement hermétique. Un ensemble de filtres garantit qu'aucune larve ne peut quitter l'enceinte de l'appareil. L'échantillon est préalablement chauffé pour être mis à une température adaptée à la biologie des larves. Une pompe péristaltique permet de faire transiter les larves d'un réservoir à l'autre, elles passent alors dans une cellule de mesure où leur fluorescence est quantifiée grâce à un système d'imagerie.

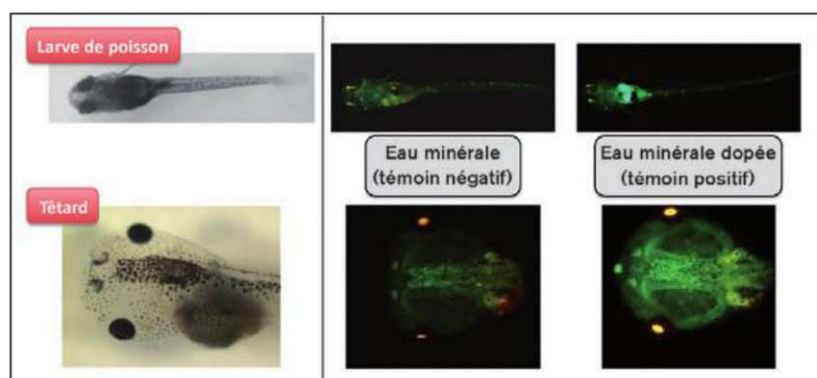


Figure 2. Modèles biologiques pour l'évaluation *in vivo* de l'effet perturbateur endocrinien

2.3. Validation du dispositif

L'objectif principal de cette phase de validation est la détermination de l'ensemble des paramètres qui vont permettre une quantification optimale de la fluorescence des groupes de larves. Ces paramètres comprennent les réglages ayant trait à la fluidique, qui vont déterminer la vitesse de passage des larves, la densité de larves et les paramètres ayant trait à l'acquisition et à l'analyse des images, qui détermineront la sensibilité et la gamme dynamique (niveau de fluorescence émise) de la mesure. L'objectif est d'atteindre une sensibilité et une gamme dynamique au minimum équivalentes à celles obtenues avec les tests effectués en laboratoire, la fluorescence y étant quantifiée par imagerie robotisée sur des animaux endormis placés de manière stéréotypée, sur le dos, dans une plaque 96 puits.

3. Résultats

La figure 3 montre l'évolution des systèmes de mesure du niveau de fluorescence émise par les larves des organismes aquatiques. Le préprototype du système de lecture en flux qui a servi de base pour le développement du prototype industriel dénommé FrogBox est montré dans la photo située au centre de la figure. Les principales évolutions du prototype industriel par rapport au préprototype comprennent l'utilisation d'un système d'imagerie (caméra, cellule de mesure et éclairage LED) plus performant permettant d'obtenir des images plus intenses. L'utilisation d'algorithmes

de traitement d'images développés spécifiquement confère une plus grande robustesse à la mesure.

L'ensemble du processus est automatisé par un logiciel spécifique qui déclenche les mesures de fluorescence en contrôlant les flux d'eau via la pompe et un ensemble d'électrovannes. Le logiciel effectue l'acquisition et l'analyse des images lors du passage des organismes aquatiques. Il indique en direct à l'opérateur l'évolution de la fluorescence moyenne du groupe de larves et la traduit en niveaux de perturbation endocrinienne. Le prototype industriel comprend une tablette tactile qui permet de contrôler l'équipement et de visualiser les résultats. Des alarmes de dysfonctionnement sont maintenant reportées visuellement sur la tablette tactile et déclenchent une alarme sonore.

3.1. Optimisation des composants

3.1.1. Cartouches amovibles

Un système de cartouche amovible a été développé pour faciliter l'entretien ainsi que le transport des organismes et les manipulations par l'opérateur. Cette cartouche comprend deux réservoirs (figure 4) dans lesquels se trouvent les organismes aquatiques. Lors de l'exposition des larves à l'échantillon, les larves ne sortent jamais de l'enceinte de la cartouche. Un ensemble de filtres garantit qu'elles ne peuvent circuler dans d'autres parties de l'appareil. Les cartouches sont chargées en larves sur le lieu de production des embryons (laboratoire agréé) et sont expédiées (hermétiquement fermées et dans un emballage spécifique robuste et étanche) sur les sites industriels sur lesquels sont placés les systèmes de lecture en flux.

Une fois en place, un système de verrouillage permet de s'assurer qu'elles ne peuvent être retirées que par le personnel autorisé. Ainsi, à aucun moment, le personnel du site n'est amené à manipuler directement les larves.

3.1.2. Les composants optiques

Lorsque les larves sont transférées d'un réservoir à l'autre grâce à la pompe péristaltique, elles passent dans une cellule de mesure située dans la base de la cartouche. Une caméra placée sous une zone transparente de la cellule permet de prendre des images des larves tandis qu'elles sont éclairées par une LED

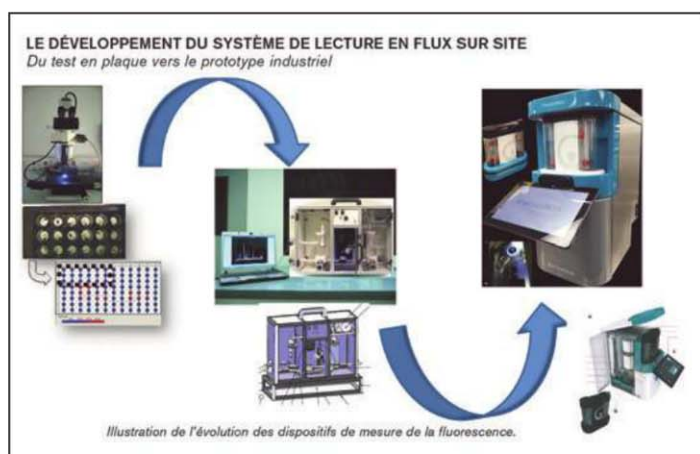


Figure 3. Système de lecture en flux FrogBox. Plateforme d'imagerie robotisée utilisée en laboratoire (gauche), préprototype (centre) et prototype industriel avec la cartouche de transport des organismes aquatiques permettant l'envoi des larves sur les sites industriels (droite)

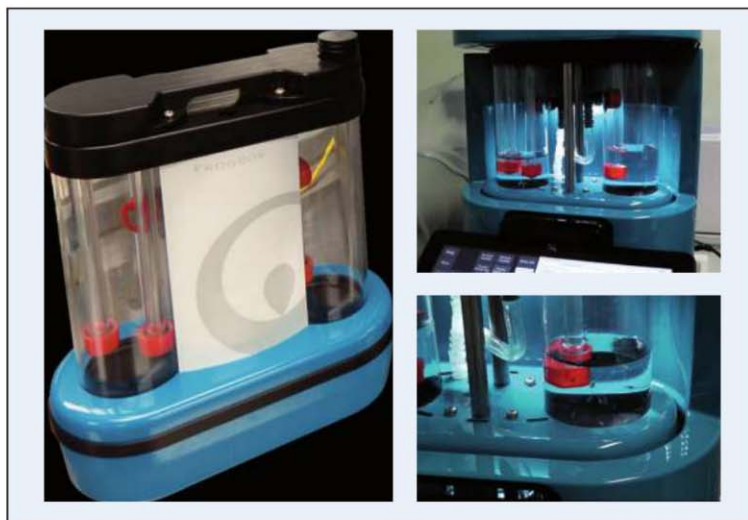


Figure 4. Cartouche de transfert des organismes aquatiques comprenant dans sa base la cellule de mesure du niveau de fluorescence

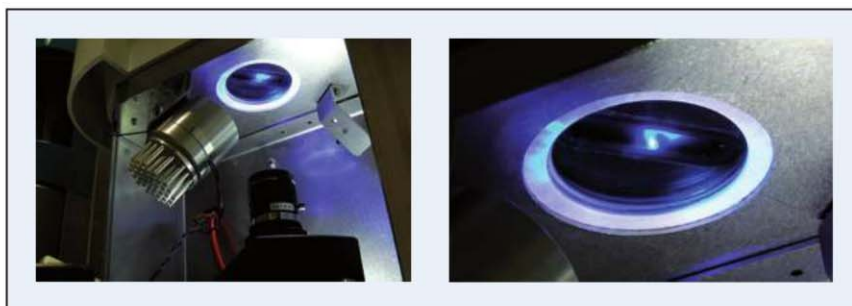


Figure 5. Système d'imagerie : caméra et LED UV (gauche) ; larve passant dans la cellule de mesure (droite)

bleue (figure 5). La LED émet dans une plage de longueur d'onde d'excitation (485 ± 20 nm) adaptée à la protéine verte fluorescente synthétisée par les larves. L'objectif de la caméra est équipé d'un filtre qui permet de ne capter que les longueurs d'onde (535 ± 25 nm) émises par la protéine fluorescente.

3.2. Analyse d'image

L'objectif du traitement d'image est d'obtenir un indicateur de niveau de fluorescence à partir des images

des larves ayant été mises en contact avec l'échantillon. Le traitement d'image permet de détecter les pixels dont le niveau de gris est significatif (« seuillage ») et spécifique à la larve (figure 6).

Une fois ces pixels isolés, la moyenne des niveaux de gris de la zone est calculée, elle constitue l'indicateur de niveau de fluorescence de la larve. Pour chaque point de mesure, la moyenne du niveau de fluorescence de toutes les larves est calculée. Cette valeur est comparée avec des courbes d'étalonnage réalisées avec des témoins positifs et négatifs. Cette dernière comparaison permet d'identifier le niveau de « toxicité » ou de risque de perturbation du système endocrinien des organismes aquatiques. Le résultat final de l'étape de mesure est la traduction dans une forme la plus simple possible, soit un code couleur soit un niveau chiffré de perturbation endocrinienne, à travers un affichage du résultat sur l'écran tactile de la tablette.

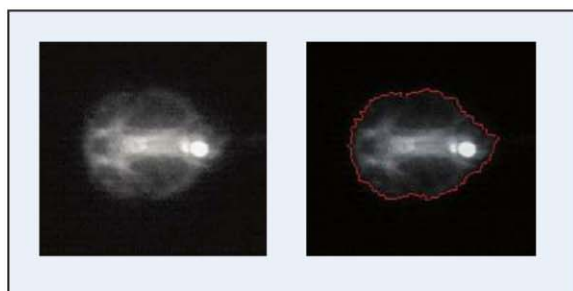


Figure 6. Image acquise (gauche) ; zone détectée par traitement d'image (droite)

3.3. Comparaison test en laboratoire vs FrogBox (validation du dispositif)

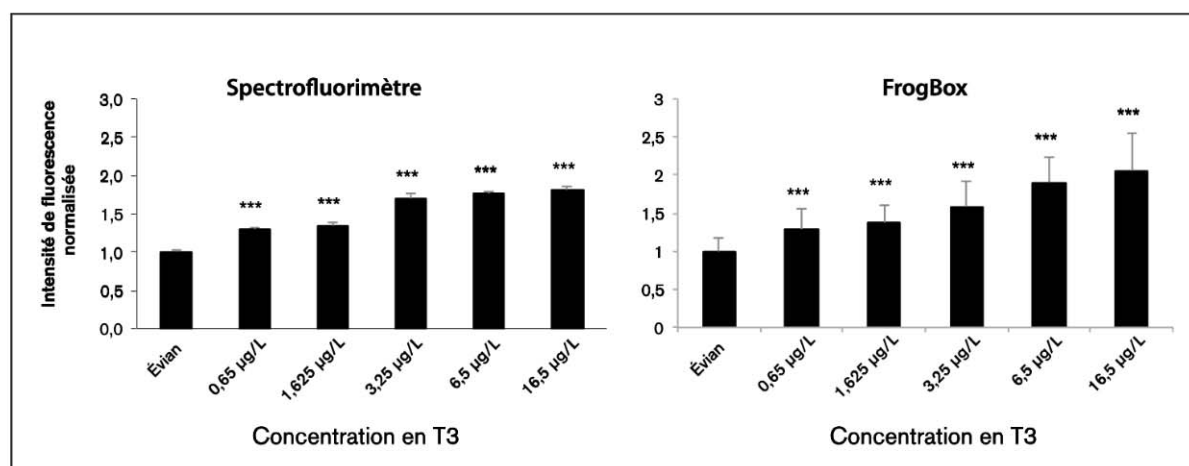
Un des objectifs de ce système de lecture en flux est d'atteindre une sensibilité et une gamme dynamique au minimum équivalentes à celles obtenues avec les tests effectués au laboratoire. Pour vérifier cela, des expériences de dose-réponse en cinétique ont été réalisées : différents groupes de larves de xénope, de la lignée permettant la détection des perturbateurs thyroïdiens, ont été placés dans des concentrations croissantes d'hormone thyroïdienne (T3). Leur fluorescence est ensuite quantifiée à l'aide de la FrogBox en faisant varier à chaque expérience le réglage d'un paramètre. La fluorescence de ces groupes de larves a été également quantifiée en utilisant le protocole utilisé pour les tests en laboratoire. Les larves sont alors anesthésiées, placées dans une plaque 96 puits et la fluorescence est quantifiée à l'aide d'un spectrofluorimètre. La figure 7 montre un résultat représentatif de différents tests effectués après optimisation des paramètres. La même sensibilité est alors atteinte par les deux méthodes de quantification. Une induction de fluorescence extrêmement significative est détectée lorsque les têtards sont traités avec 0,65 µg/L de T3. La gamme dynamique obtenue avec la FrogBox montre une amplitude plus importante : à la plus forte concentration testée, une induction de 80 % est détectée par le spectrofluorimètre, et de 105 % avec la FrogBox™.

Au terme de la validation de ce dispositif, nous attendons un niveau de sensibilité comparable au test en plaque également pour le modèle permettant la détection d'effets sur l'axe œstrogénique (sensibilité à l'éthinylestradiol de l'ordre de 15 ng/L).

3.4. Interprétation du résultat (niveau de fluorescence)

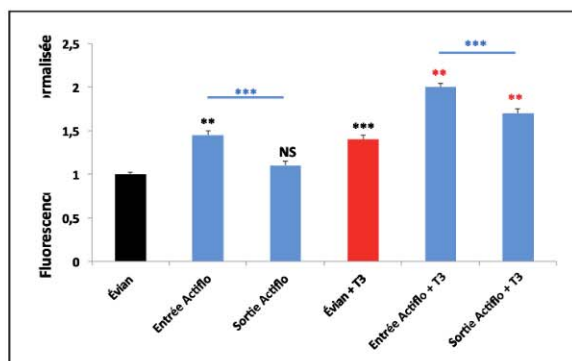
À titre d'exemple, la figure 8 montre des résultats pouvant être obtenus grâce à l'utilisation des modèles biologiques. L'objectif était d'évaluer les niveaux de réponses des modèles biologiques aux éventuels perturbateurs endocriniens présents dans le rejet de la STEU avant et après traitement à l'aide de charbon activé en poudre et par sédimentation accélérée. La comparaison du niveau de fluorescence induit par les composés chimiques contenus dans les rejets, avant et après traitement, permet d'évaluer si le traitement conduit à la diminution ou à l'élimination de l'effet perturbateur endocrinien global.

Le témoin positif « Évian + T3 » induit la fluorescence des larves à un niveau qui est statistiquement significativement supérieur par rapport au groupe témoin « Évian » (témoin négatif). Le groupe « Évian » indique le niveau de fluorescence basale des larves et le groupe « Évian + T3 » indique le seuil physiologique au-dessus duquel les perturbations de l'axe thyroïdien sont certaines.



Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne (SEM). Analyse statistique : ANOVA suivi d'un test de comparaison multiple *a posteriori* de Dunnett ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

Figure 7. Dose réponse d'hormone thyroïdienne T3. Des groupes de 50 têtards de la lignée THbZip ont été exposés à des doses croissantes de T3 pendant 72 h et leur fluorescence a été quantifiée en FrogBox (figure de droite) et avec un spectrofluorimètre (figure de gauche)



Les barres d'erreur sur chaque colonne affichent l'erreur type de la moyenne (SEM). NS : non significatif ($p > 0,05$) ; *significatif ($p < 0,05$) ; **très significatif ($p < 0,01$) ; ***extrêmement significatif ($p < 0,001$). L'analyse statistique a été réalisée par rapport au groupe « Évian » (étoiles noires) ou au groupe « Évian + T3 » (étoiles rouges) pour les échantillons dopés avec T3. Étoiles bleues : comparaison statistique des « entrée Actiflo Carb » et « sortie Actiflo Carb » dopé ou non dopés.

Figure 8. Représentation graphique des résultats obtenus le 10 novembre 2013 lors de l'évaluation de l'effet perturbateur endocrinien sur l'axe thyroïdien (modèle amphibien)

Les effluents sont testés soit bruts, soit dopés avec de l'hormone thyroïdienne T3. Le dopage permet de révéler l'action de molécules qui agissent en synergie avec la T3 ou qui sont capables de bloquer son action (molécules inhibitrices, effet visible par une diminution de la fluorescence par rapport au témoin « Évian + T3 »).

Les larves exposées à l'effluent de la station d'épuration des eaux usées (échantillon « entrée Actiflo ») ont émis un niveau de fluorescence statistiquement similaire à celui du témoin positif (« Évian + T3 »), cela signifiant la présence d'un ensemble de composés chimiques induisant un effet perturbateur endocri-

nien. Les larves exposées à l'effluent traité (échantillon « sortie Actiflo ») ont émis un niveau de fluorescence statistiquement similaire au niveau induit par le témoin négatif (« Évian »), ce qui indique que les composés chimiques ont été éliminés de l'effluent, et que celui-ci ne serait plus considéré comme perturbateur endocrinien.

Les larves exposées à l'effluent de la station d'épuration des eaux usées (échantillon « entrée Actiflo ») dopé avec de la T3 ont émis un niveau de fluorescence statistiquement supérieur à celui des larves exposées au témoin positif (« Évian + T3 »). Les larves exposées à l'effluent traité (échantillon « sortie Actiflo ») dopé avec la T3 ont émis un niveau de fluorescence statistiquement inférieur au groupe « entrée Actiflo » dopé à la T3. Le niveau obtenu reste cependant statistiquement supérieur à celui du témoin positif (« Évian + T3 »). Ces résultats indiquent que l'Actiflo Carb élimine des composés perturbateurs capables d'interagir avec l'hormone T3 pour amplifier la réponse physiologique (effet additif ou synergique), mais que cette élimination n'est pas totale.

Comme indiqué précédemment, ces modèles biologiques ne permettent pas de déterminer spécifiquement la ou les molécules qui induisent la réponse physiologique ni le mécanisme d'action (interaction avec les récepteurs nucléaires, perturbation du transport de l'hormone, inhibition de l'activité enzymatique, etc.) directement impliqué. Ces bioessais

Nom de la molécule	CAS	Utilisation	Perturbateur endocrinien	Taux d'élimination (%)	Concentration avant traitement (ng/L)
Diclofénac	15307-86-5	Anti-inflammatoire	Supposé	66 ± 2	542 ± 300
Carbamazépine	298-46-4	Antiépileptique	Supposé	82 ± 1	417 ± 218
17 α -éthynylestradiol	57-63-6	Contraceptif	Prouvé	92	3,6
œstrone	53-16-7	Hormone naturelle	Prouvé	63	6,2
Sulfaméthoxazole	723-46-6	Antibiotique	Supposé	60 ± 10	107 ± 80
Triclosan	3380-34-5	Biocide	Prouvé	> 80 ± 10	265 ± 193
Diuron	330-54-1	Pesticide	Prouvé	> 75 ± 10	94 ± 66
Oxadiazon	19666-30-9	Herbicide	Non déterminé	65 ± 10	43 ± 12
Monobutylétain cation	78763-54-9	Biocide	Non déterminé	> 97	624 ± 8
PCB 180	35065-29-3	Additif industriel	Prouvé	> 50	10

Tableau III. Exemple de molécules chimiques identifiées avant et après traitement tertiaire du rejet d'une station d'épuration d'eaux usées urbaines

permettent l'évaluation de l'effet global de la matrice et de ses composants. À des fins d'évaluation de la technologie de traitement, et sans intention d'établir une corrélation entre l'analyse chimique et la mesure de l'effet physiologique, certaines molécules ont été identifiées avant et après traitement. Le *tableau III* montre à titre d'illustration une liste non exhaustive des molécules identifiées par chromatographie en phase gazeuse ou chromatographie liquide couplées à la spectrométrie de masse. Parmi ces molécules, il est possible d'observer que certaines ont été identifiées dans la littérature scientifique comme étant des perturbateurs endocriniens.

Le taux d'élimination par la technologie testée est généralement supérieur à 50 % par rapport à la concentration avant traitement. La variabilité de l'efficacité d'élimination serait en partie due à la concentration avant traitement, ainsi qu'à la proximité de la concentration mesurée de la limite de quantification de la méthode. Plus la valeur avant traitement est proche de la limite de quantification plus le taux d'élimination sera faible si la valeur après traitement est égale ou inférieure à la limite de quantification.

Conclusion

Le projet Biotopex (outils BIologiques pour l'Optimisation des Technologies de Traitement pour l'élimination des Perturbateurs Endocriniens) a permis de développer un outil automatisé pour évaluer sur site le potentiel perturbateur endocrinien d'un prélèvement continu. Cet outil, nommé FrogBox, s'appuie

sur des modèles biologiques (têtards et alevins de poissons) qui émettent de la fluorescence en présence de molécules à effet perturbateur endocrinien. La FrogBox, grâce à un système de lecture en flux automatisé, permet de suivre en ligne, en continu, les niveaux de perturbation endocrinienne associés à l'effluent.

Le processus d'acquisition d'images et certains équipements du préprototype ont été optimisés. Le principe de mesure a été amélioré : il repose sur la reconnaissance des images contenant une seule larve, la fluorescence est ensuite quantifiée à l'aide d'algorithmes de traitement d'images. Les résultats obtenus lors des étapes de validation montrent que le niveau de sensibilité atteint par la FrogBox est identique à celui obtenu par des tests de perturbation endocrinienne effectués en laboratoire.

Le prototype industriel est en cours de validation et une grille d'interprétation simple des résultats est en cours de développement. Cet outil sera ainsi rapidement opérationnel pour évaluer les niveaux de perturbation endocrinienne présents dans les effluents urbains (traités ou non traités) et aider à la définition des plans d'action (actions à la source sur le réseau d'assainissement, traitements complémentaires...) à mettre en place pour maîtriser la qualité des eaux usées déversées au milieu récepteur.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier la contribution de l'instrument financier LIFE+ de l'Union européenne, n° de contrat LIFE11 ENV/FR/742.

Bibliographie

BORGERT C.J., MIHAICH E.M., QUILL T.F., MARTY M.S., LEVINE S.L., BECKER R.A. (2011) : « Evaluation of EPA's Tier 1 Endocrine Screening Battery and recommendations for improving the interpretation of screening results ». *Regul Toxicol Pharm* ; 59(3) : 397-411.

CASTILLO L., SERIKI K., MATEOS S., LOIRE N., GUÉDON N., LEMKINE G.F., *et al.* (2013) : « In vivo endocrine disruption assessment of wastewater treatment plant effluents with small organisms ». *Water Science & Technology* ; 68(1) : 261-8, DOI : 10.2166/wst.2013.179.

CAMPBELL C.G., BORGLIN S.E., GREEN F.B., GRAYSON A., WOZEI E., STRINGFELLOW (2006) : « Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of

estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review ». *Chemosphere* ; 65 : 1265-1280.

CHOUBERT J.-M., MARTIN RUEL S., COQUERY M. (2009) : « Prélèvement et échantillonnage des substances prioritaires et émergentes dans les eaux usées. Les prescriptions techniques du projet de recherche Amperes ». *TSM* ; 4 : 88-101.

DEMENEIX B., BALAGUER P. (2008) : « Développement d'un test physiologique rapide *in vivo* pour mesurer les effets de perturbations thyroïdiennes ». Programme national de recherche perturbateurs endocriniens (PNRPE), Rapport de fin de contrat (n° CV05000140).

EFSA SCIENTIFIC COMMITTEE (2013) : « Scientific opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors:

Scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment ». *EFSA Journal* ; 11(3) : 3132 [84 p.]

EUROPEAN COMMISSION (2014) : *Technical report on aquatic effect-based monitoring tools*. Technical report - 077, 80 p.

FINI J.-B., PALLUD-MOTHRÉ S., LE MÉVEL S., PALMIER K., HAVENS C., LE BRUN M., *et al.* (2009) : « An innovative continuous flow system for monitoring heavy metal pollution in water using transgenic *Xenopus laevis* Tadpoles ». *Environ Sci Technol* ; 43(23) : 8895-900.

FINI J.-B., LE MEVEL S., TURQUE N., PALMIER K., ZALKO D., CRAVEDI J.P., DEMENEIX B.A. (2007) : « An *in vivo* multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption ». *Environ Sci Technol* ; 15 ; 41(16) : 5908-14.

GEARA-MATTA D., LORGEUX C., ROCHER V., CHEBBO G., MOILLERON R. (2011) : « Contamination des eaux usées par les perturbateurs endocriniens ». *TSM* ; 10 : 17-24.

HOCK B., SEIFERT M., KRAMER K. (2002) : « Engineering receptors and antibodies for biosensors ». *Biosens Bioelectron* ; 17(3) : 239-49.

HOLMAN H.-Y.N., GOTH-GOLDSTEIN R., MARTIN M.C., RUSSELL M.L., MCKINNEY W.R. (2000) : « Low-Dose responses to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in single living human cells measured by synchrotron infrared spectromicroscopy ». *Environ Sci Technol* ; 34(12) : 2513-7. DOI : 10.1021/es991430w

HUANG C.H., SEDLAK D.L. (2001) : « Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry ». *Environ Toxicol Chem* ; 20(1) : 133-9.

KUIPER G.G., LEMMEN J.G., CARLSSON B., CORTON J.C., SAFE S.H., VAN DER SAAG P.T., *et al.* (1998) : « Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta ». *Endocrinology* ; 139(10) : 4252-63.

LEGLER J., VAN DEN BRINK C.E., BROUWER A., MURK A.J., VAN DER SAAG, P.T., VETHAAK A.D., VAN DER BURG B. (1999) : « Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line ». *Toxicol Sci* ; 48(1) : 55-66.

LEUSCH F.D., CHAPMAN H.F., VAN DEN HEUVEL M.R., TAN B.L., GOONERATNE S.R., TREMBLAY L.A. (2006) : « Bioassay-derived androgenic and estrogenic activity in municipal sewage in Australia and New Zealand ». *Ecotoxicol Environ Safe* ; 65 : 403-11.

MURATA M., NAKAYAMA M., IRIE H., YAKABE K., FUKUMA K., KATAYAMA Y., MAEDA M. (2001) : « Novel biosensor for the rapid measurement of estrogen based on a ligand-receptor interaction ». *Anal Sci* ; 17 : 387-390.

OCDE – Organisation de coopération et de développement économiques (2012a) : *Series on testing and assessment* ; N° 150 : Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption. ENV/JM/MONO (2012) 22, 524 p.

OCDE – Organisation de coopération et de développement économiques (2012b) : *Series on testing and as-*

essment ; N° 178 : Detailed review paper on the state of the science on novel *in vitro* and *in vivo* screening and testing methods and endpoints for evaluating endocrine disruptors. ENV/JM/MONO (2012) 23, 213 pp

PAWLOWSKI S., TERNES T., BONERZ M., KLUCZKA T., VAN DER BURG B., NAU H., *et al.* 2003. « Combined *in situ* and *in vitro* assessment of the estrogenic activity of sewage and surface water samples ». *Toxicol Sci* ; 75(1) : 57-65. DOI : 10.1093/toxsci/kfg162

PETRIE B., BARDENA R., KASPRZYK-HORDEN B. (2014) : « A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring ». *Water Research* ; 72 : 3-27.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>.

RODRIGUEZ-MOZAZ S., REDER S., DE ALDA M.L., GAUGLITZ G., BARCELÓ D. (2004) : « Simultaneous multi-analyte determination of estrone, isoproturon and atrazine in natural waters by the River ANALyser (RIANA), an optical immunosensor ». *Biosens Bioelectron* ; 19(7) : 633-40.

ROSSI L., LIENERT J., LARSEN T. (2009) : « Lutte à la source pour la rétention de micropolluants dans les eaux. Le concept NoMix ». *TSM* ; 4 : 53-9.

ROUTLEDGE E.J., SUMPTER J.P. (1996) : « Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen ». *Environ Toxicol Chem* ; 15 : 241-8.

SCHULTIS T., METZGER J.W. (2004) : « Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase) ». *Chemosphere* ; 57(11) : 1649-55.

SCIPPO M.L., WILLEMENSEN P., DANYI S., HELBO V., MULLER M., MARTIAL J., MAGHUIN-ROGISTER G. (2004) : « Receptor-based screening assay: new perspectives in anti-doping control ». *Chromatographia* ; 59 : S23-S27.

SEIFERT M., HAINDL S., HOCK B. (1999) : « Development of an enzyme linked receptor assay (ELRA) for estrogens and xenoestrogens ». *Anal Chim Acta* ; 386 : 191-9.

Soto A.M., Sonnenschein C., Chung K.L., Fernandez M.F., Olea N., Serrano F.O. (1995) : « The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants ». *Environ Health Perspect* ; 103(7) : 113-22.

TSM - Année 2013 n° 11 - Actualités des entreprises. « Veolia et Watchfrog industrialisent des tests biologiques en ligne ».

TSM - Année 2010 n° 1 /2 - Actualités des entreprises. « Les têtards fluos de Watchfrog pour suivre l'impact des polluants ».

VIRKUTYTE J., VARMA R.S., HOAG G. (2010) : *Treatment of micropollutants in water and wastewater*. Londres : IWA Publishing.

WHO/IPCS – World Health Organization/International Programme on Chemical Safety (2002) : « Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors ». In : Damstra T., Barlow S., Bergman A., Kavlock R., Van der Kraak G. (eds.), World Health Organization (WHO/PCS/EDC/02.2). World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Résumé

L. CASTILLO, A. MAITROT, J.-F. MOUGEL, D. DU PASQUIER, G.F. LEMKINE

Développement d'un outil de suivi sur site de l'effet perturbateur endocrinien potentiellement induit par les rejets de station d'épuration

Un grand nombre de molécules chimiques issues du développement industriel et urbain sont détectables dans l'environnement. Certaines de ces substances ont des effets négatifs sur les organismes vivants. Parmi ces effets, la perturbation endocrinienne a conduit à des efforts considérables de recherche pour développer des méthodes pour mieux l'évaluer et pour diminuer son impact sur les écosystèmes. Le suivi environnemental des rejets urbains et des milieux aquatiques s'oriente aujourd'hui vers l'utilisation de méthodes ou de modèles biologiques. L'avantage de ces méthodes est qu'elles évaluent la matrice dans sa globalité et permettent d'évaluer l'état écologique des milieux,

leur degré de pollution et la toxicité potentielle des rejets. Ces approches peuvent également permettre l'identification des mécanismes d'effets des polluants des rejets aqueux sur l'écosystème aquatique. Le projet Biottope a permis de développer un outil automatisé pour évaluer directement sur site le potentiel de perturbation endocrinienne d'un prélèvement continu. La détermination de l'effet perturbateur endocrinien est basée sur l'utilisation de petits modèles biologiques aquatiques (têtards de l'amphibien xénope et alevins du poisson médaka) associés à des marqueurs génétiques afin d'être fluorescents lorsqu'ils sont en contact avec des perturbateurs endocriniens.

Abstract

L. CASTILLO, A. MAITROT, J.-F. MOUGEL, D. DU PASQUIER, G.F. LEMKINE

Development of an automated monitoring tool for on-site assessment of the potential endocrine disruptive effects of wastewater treatment plant effluents

A large number of chemicals from industry and urban development have been shown to be present in the environment. A number of these molecules are deleterious to living organisms. Among the numerous mechanisms of toxicity considerable research efforts have been applied to improve assessment and monitoring practices for endocrine disruption. Environmental monitoring of urban discharges and aquatic environments is now oriented towards the use of biological models. The advantage of these models is that they evaluate the matrix in its entirety, assessing the ecological state of the

media, the degree of pollution or the potential toxicity of discharges. In addition these biological tools can be used to identify the mechanism of action of pollutants in aqueous discharges. The Biottope project has led to the development of an automated tool to assess the quality of the water directly on-site. This apparatus measures endocrine disruptive effects by monitoring small aquatic biological models (*Xenopus* tadpoles or small medaka fishes). These small model organisms harbor genetic markers which fluoresce in the presence of endocrine disrupters.



La collection est maintenant complète!

La nature et les causes des risques sanitaires liés à la consommation d'eau contaminée sont multiples et le rôle joué par le réseau de distribution est loin d'être négligeable. Retrouvez dans les tomes 2 et 3 de cet ouvrage, **le manuel du parfait opérateur** qui aborde l'exploitation et la maintenance du réseau et les aspects liés à la surveillance permanente de la qualité de l'eau mise en distribution. Ils complètent le tome 1 qui traite de la nature et des origines des problèmes de qualité.

Ces ouvrages s'adressent à l'ensemble des acteurs opérationnels : autorités organisatrices, opérateurs et gestionnaires des services d'eau, responsables institutionnels, maîtres d'œuvre, chercheurs, enseignants et étudiants.

Bon de commande sur le site www.astee.org



AQUANEUTRA

petites bulles à grand rendement...

abaissement du CO₂ libre jusqu'à 2 mg/l
ajustement automatique aux variations du débit et qualité d'eau



Installation des eaux potables de Bale – débit 1 400 m³/h

Neutralisation à haut rendement des eaux agressives
Modification de l'équilibre calco-carbonique des eaux de forage
Technologie AQUADOSIL : plus de 250 références de 4 à 12 000 m³/h

12 bis rue du Cdt Pilot
92200 Neuilly sur Seine, France
Tél : 01 4640 4949 - Fax : 01 4640 0087
Email : info@cifec.fr - Web : www.cifec.fr



certifiée ISO9001

