

RAPPORT D'ÉTUDE  
N°DRC-10-102867-04907A

20/04/2010

**Caractérisation de l'état de contamination de  
sédiments de rivières par des composés à  
activité « dioxin-like » : développement et  
application d'un outil bio-analytique in vitro**

**INERIS**

maîtriser le risque |  
pour un développement durable |



**Caractérisation de l'état de contamination de sédiments de rivières par des composés à activité « dioxin-like » : développement et application d'un outil bio-analytique in vitro**

INERIS

Direction des Risques Chroniques

Client : ONEMA

Liste des personnes ayant participé à l'étude :

Sélim AIT-AISSA, Nicolas CREUSOT

## PRÉAMBULE

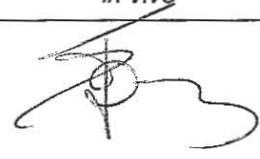
Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

La responsabilité de l'INERIS ne pourra être engagée si les informations qui lui ont été communiquées sont incomplètes ou erronées.

Les avis, recommandations, préconisations ou équivalents qui seraient portés par l'INERIS dans le cadre des prestations qui lui sont confiées, peuvent aider à la prise de décision. Etant donné la mission qui incombe à l'INERIS de par son décret de création, l'INERIS n'intervient pas dans la prise de décision proprement dite. La responsabilité de l'INERIS ne peut donc se substituer à celle du décideur.

Le destinataire utilisera les résultats inclus dans le présent rapport intégralement ou sinon de manière objective. Son utilisation sous forme d'extraits ou de notes de synthèse sera faite sous la seule et entière responsabilité du destinataire. Il en est de même pour toute modification qui y serait apportée.

L'INERIS dégage toute responsabilité pour chaque utilisation du rapport en dehors de la destination de la prestation.

	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	Sélim AIT-AISSA	Jean-Marc PORCHER	Eric THYBAUD
Qualité	Ingénieur et doctorant à l'unité "Ecotoxicologie <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> "	Responsable de l'unité "Ecotoxicologie <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> "	Responsable du pôle "Dangers et impact sur le vivant"
Visa			

## TABLE DES MATIÈRES

<b>RESUME</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>1. GLOSSAIRE</b> .....	<b>9</b>
<b>2. LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES</b> .....	<b>9</b>
<b>3. INTRODUCTION</b> .....	<b>10</b>
<b>4. MISE EN PLACE DU TEST EROD DANS LES LIGNEES CELLULAIRES HEPATOCYTAIRES PLHC-1 ET H4IIE</b> .....	<b>11</b>
4.1 Principe.....	11
4.2 Mise en place méthodologique.....	12
4.3 Caractérisation des effets de substances modèles (HAPs, PCBs et dioxines) dans les bioessais PLHC-1 et H4IIE.....	12
<b>5. APPLICATION A LA DETECTION DE CONTAMINANTS DANS DES SEDIMENTS DU BASSIN ARTOIS-PICARDIE : CAS DU RCS 2008</b> .....	<b>15</b>
5.1 Détection d'activités dans les extraits bruts : influence du temps d'exposition et du traitement acide des échantillons .....	15
5.2 Synthèse des activités mesurées sur les sites du RCS en 2008.....	17
5.3 Comparaison avec les teneurs en HAPs et PCBs données par les analyses chimiques.....	18
<b>6. CONCLUSIONS</b> .....	<b>19</b>
<b>7. COLLABORATIONS</b> .....	<b>20</b>
<b>8. VALORISATION</b> .....	<b>20</b>
<b>9. REFERENCES</b> .....	<b>20</b>



## RESUME

### Résumé

---

Cette étude décrit la mise en place méthodologique et la comparaison de deux bioessais in vitro en microplaques pour détecter des contaminants à activité toxique analogue à la dioxine (composés *dioxin-like* ou DL) dans des échantillons complexes comme des extraits organiques de sédiments. Les bioessais proposés sont basés sur la mesure par fluorescence de l'induction de l'activité 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) dans des lignées cellulaires (cellules PLHC-1 et H4IIE) qui expriment de manière endogène le récepteur de la dioxine (AhR ou *aryl hydrocarbon receptor*). La comparaison des réponses des deux bioessais à des molécules modèles (dioxines, PCB-DL, HAP) et à différents extraits de sédiments montre que les deux bioessais sont globalement équivalents, même si des différences de sensibilité à certaines familles de contaminants sont notées. L'application des outils dans le cadre du réseau de contrôle et de surveillance montre une corrélation avec les analyses chimiques des HAPs, bien que les composés analysés ne contribuent que pour une partie de l'ensemble des activités toxiques mesurées par le bioessai. Il n'existe pas de corrélation quantitative avec les teneurs en PCB indicateurs pour les 10 sites investigués. L'étude suggère enfin l'occurrence de composés DL sur certains sites du Nord de la France, composés actuellement non pris en compte par les données analytiques disponibles.

### Mots clés

---

Composés analogues de la dioxine, bioanalyse, sédiments de rivière, bassin Artois-Picardie, PCB-DL

## ABSTRACT

### Abstracts

---

Two in vitro bioassays based on induction of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in cultured cells (PLHC-1 and H4IIE cell lines) have been established and compared towards i) the characterization of dioxin-like potency of several organic contaminants (PAHs, PCBs, dioxins) and ii) the detection of dioxin-like compounds (DLC) in organic extracts of sediments sampled from various river stations. The comparative study showed that the two bioassays were overall equivalent to highlight the activity of studied the chemicals and to detect bioactive compounds in complex mixtures, although some differences in terms of response sensitivity were noted for certain class of compounds. Application of the bioassays to 10 sediment samples from the RCS (Réseau de Contrôle et de Surveillance) showed significant correlation between toxic activities of samples and the analyses of priority PAHs, albeit mass balance calculation indicated that analyzed PAH contributed only to a part of the activities detected by the bioassays (on a toxic-equivalent quantities basis). No quantitative correlation was noted between toxic activities and the sum of concentrations of indicator PCBs. Finally, the bioassays analyses suggested the occurrence of dioxin-like compounds at some impacted sites, which compounds were not included in priority analyses.

### Key words (thematic and geographical area)

Dioxin-like compounds, bioanalysis, river sediment, Artois-Picardie watershed, PCB-DL

---

## 1. GLOSSAIRE

<b>AhR</b>	Récepteur des hydrocarbures ( <i>Aryl hydrocarbon Receptor</i> ) ou récepteur de la dioxine
<b>Bioanalyse in vitro</b>	Détection in vitro de molécules cibles sur la base de leur mécanisme d'action toxique à l'aide de bioessais utilisant des lignées cellulaires en culture
<b>CYP1A</b>	Cytochrome P450 1A, enzyme responsable du métabolisme oxydatif de xénobiotiques hydrophobes comme les HAP, dioxines
<b>Composés « Dioxin-like » ou DL</b>	Molécules ayant le même mécanisme d'action que la TCDD : fixation au récepteur Ah et activation de ce dernier
<b>EROD</b>	7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase, activité enzymatique du CYP1A
<b>HAP</b>	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
<b>PCB</b>	Polychlorobiphényles
<b>PLHC-1, H4IIE</b>	Lignées cellulaires issues d'hépatocytes de poisson (PLHC-1) ou de rat (H4IIE) maintenant une activité EROD inducible par les activateurs du récepteur Ah
<b>TCDD</b>	2,3,7,8-tétrachloro- <i>p</i> -dibenzodioxine ou dioxine

## 2. LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

### Liste des tableaux

Tableau 1 : Capacité de dioxines (TCDD, PCDD), DL-PCBs (PCB-77, -126, -169) et HAPs (BAP, DBA, BbF, Indenopyrene, Chrysène) à induire l'activité EROD en fonction du temps d'exposition dans les cellules PLHC-1 (4 h et 72 h) et H4IIE (6 h et 72 h). .....	13
Tableau 2 : Synthèse des activités de type dioxine mesurées sur 10 sites du RCS du bassin Artois-Picardie en 2008. ....	17

### Liste des figures

Figure 1 : Schéma du mode d'action des composés dioxin-like conduisant à l'induction intracellulaire du cytochrome P450 1A (CYP1A) et de son évaluation par la mesure de l'activité enzymatique EROD. ....	11
Figure 2 : Induction de l'activité EROD dans les cellules PLHC-1 et H4IIE en fonction de la durée d'exposition des cellules à la dioxine (TCDD) et à un HAP modèle, le benzo[a]pyrène (BAP). ....	12
Figure 3 : Facteurs de toxicité relative à la TCDD (TEF) pour les différents composés étudiés dans les modèles PLHC-1 et H4IIE à deux temps d'exposition. ....	14
Figure 4 : Corrélations entre les modèles PLHC-1 et H4IIE sur la base des valeurs de TEFs des substances du Tableau 1 obtenues à 4h et 72h d'exposition. ....	14
Figure 5 : Exemples de courbes dose-réponse obtenues après exposition à des extraits organiques de sédiment pendant 4 et 72 h. ....	15
Figure 6 : Influence du traitement acide sur la détection des inducteurs d'activité EROD après 4 h d'exposition. ....	16
Figure 7 : Corrélations entre les bioessais PLHC-1 et H4IIE pour la quantification de valeurs de BaP-EQ et TCDD-EQ dans les différentes fractions globale (cr) et acides (Ac). ....	18

### 3. INTRODUCTION

De nombreuses études font état de la présence dans l'environnement aquatique de substances toxiques de classes chimiques et d'origines très diverses. En marge des polluants chimiques toxiques persistants dans l'environnement (e.g. dioxines, HAPs, PCBs, métaux, pesticides organochlorés...), pour lesquels des méthodes analytiques sont relativement bien établies, l'émergence de nouveaux types de contaminants, comme les médicaments, les produits cosmétiques ou les composés issus des activités domestiques, complexifie l'évaluation de la qualité chimique des milieux aquatiques. La surveillance en routine de ces substances est confrontée à différents problèmes, en particulier quelles substances et comment les surveiller ? La directive européenne sur l'Eau (DCE) a partiellement répondu au problème en définissant une liste de 41 substances prioritaires. Toutefois, au regard des milliers de substances présentes dans le milieu, scientifiques et gestionnaires de l'environnement s'accordent à penser que les approches purement analytiques, bien que performantes en terme de sensibilité de détection, restent insuffisantes pour établir une évaluation réaliste du risque pour l'environnement [e.g. voir réseaux européens NORMAN ([http://www.norman-network.net/index\\_php.php](http://www.norman-network.net/index_php.php)); MODELKEY (<http://www.modelkey.org/>)].

Actuellement, l'évaluation de la qualité chimique des milieux fait appel aux analyses chimiques et aux bioessais d'écotoxicité, lesquels se complètent mais présentent également certaines limites. Les méthodes analytiques en vigueur dans les laboratoires d'analyses de routine font le plus souvent appel à des méthodes multi-résidus avec des seuils de détection de l'ordre du µg/L (variable selon les polluants recherchés) sans relation avec l'écotoxicité des substances. Les récents développements en chimie analytique montrent qu'il est actuellement possible, d'un point de vue technique, de mesurer nombre de ces molécules à l'état de trace avec des seuils de sensibilité très performants. Toutefois, cette approche fait appel à un appareillage conséquent (e.g. méthodes chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse) et reste encore très coûteuse dans une optique de surveillance en routine, particulièrement dans le cas des dioxines et composés analogues de la dioxine (composés *dioxin-like* ou DL). À l'interface entre approche analytique et bioessais d'écotoxicité, l'utilisation de nouvelles méthodes bio-analytiques basées sur les mécanismes de toxicité peut avantageusement compléter les outils existants (Ait-Aïssa 2009).

Parmi les familles de substances organiques contaminant les cours d'eaux français, les composés à activités dioxin-like tels que les PCBs, dioxines, furanes etc... sont particulièrement préoccupantes du fait de leur forte rémanence dans le milieu et leur toxicité élevée. Leur surveillance est toutefois confrontée à des problèmes de coût et le développement de méthodes alternatives aux analyses chimiques apparaît comme une perspective intéressante pour la surveillance de ces molécules in situ. Parmi ces méthodes, les tests biologiques basés sur l'induction du cytochrome P450 1A (CYP1A) dépendante du récepteur de la dioxine (AhR ou *aryl hydrocarbon receptor*) apparaissent très pertinents pour quantifier des activités toxiques (exprimées en TEQ ou toxique-équivalent) au sein de mélanges complexes (voir revues de (Behnisch et al., 2001; Hahn 2002)). En particulier, les tests basés sur l'utilisation de cultures cellulaires s'avèrent particulièrement adaptés au criblage. En effet, ils sont très sensibles, spécifiques du mécanisme intracellulaire étudié, et relativement peu coûteux car miniaturisés (tests en microplaque, faible volume d'échantillon nécessaire). Cependant la bibliographie fait état de nombreuses lignées cellulaires disponibles, issues de divers organismes (humain, rat, poisson, poulet...) et potentiellement utilisables dans cette optique. Si beaucoup de ces lignées sont appliquées à la détection environnementale des composés DL, il existe encore un besoin de caractériser les différences inter-modèles, souvent liées aux différences inter-espèces de l'affinité du AhR, qui peuvent exister et influencer sur les réponses des tests.

L'objectif de cette étude est de mettre en place une méthode de biodétection de composés dioxin-like dans des extraits environnementaux. La méthode est basée sur l'utilisation de lignées cellulaires exprimant le récepteur Ah fonctionnel et une activité enzymatique CYP1A inducible par ce récepteur.

Les objectifs spécifiques sont : 1/ de comparer deux lignées cellulaires en terme de sensibilité à différents ligands environnementaux de AhR (dioxines, HAPs, PCBs-DL) et pour la détection de ce type de molécules dans des échantillons contaminés, 2/ de fournir une première évaluation des niveaux de contamination par les composés DL dans différents sites du bassin Artois-Picardie et de comparer les données fournies par le bioessai avec des mesures analytiques de composés prioritaires indicateurs de ces familles de polluants : les 16 HAPs prioritaires et les 7 PCBs indicateurs.

Il est attendu de cette étude i) de pouvoir statuer sur le choix d'un modèle cellulaire qui serait le plus adapté pour établir le bioessai de criblage d'échantillons, et ii) de montrer l'intérêt de ce type de bio-outil pour la surveillance de molécules dioxin-like en comparaison aux analyses chimiques de polluants prioritaires, tout en apportant de nouvelles informations sur les niveaux de contamination de sites du Nord de la France par ces polluants.

#### 4. MISE EN PLACE DU TEST EROD DANS LES LIGNEES CELLULAIRES HEPATOCYTAIRES PLHC-1 ET H4IIE

##### 4.1 PRINCIPE

La méthode repose sur la mesure intracellulaire de l'activité enzymatique 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD). L'activité enzymatique EROD est portée par le cytochrome P450 1A (CYP1A) dont l'expression est directement régulée par le récepteur Ah (Figure 1). En présence de ligands agonistes de ce récepteur dans le milieu de culture (amenés par l'échantillon test par exemple), le CYP1A est induit de manière proportionnelle à la concentration en ligands actifs. L'établissement de courbes dose-réponse permet de déterminer des concentrations actives en échantillon qui, rapportées à celles du toxique de référence (ex. benzo[a]pyrène BaP ou dioxine TCDD), permettent de quantifier des toxique-équivalents (ex. BaP-EQ ou TCDD-EQ) au sein de l'échantillon testé.

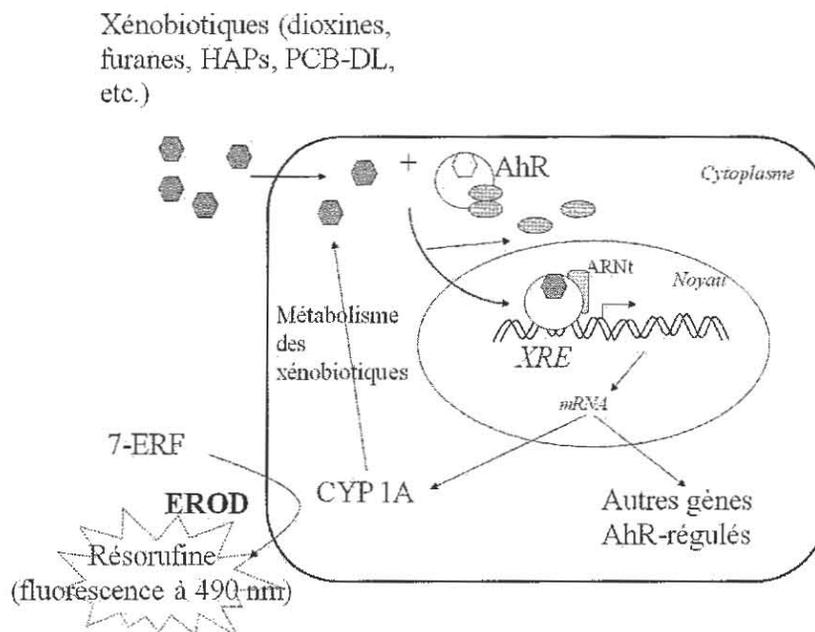


Figure 1 : Schéma du mode d'action des composés dioxin-like conduisant à l'induction intracellulaire du cytochrome P450 1A (CYP1A) et de son évaluation par la mesure de l'activité enzymatique EROD. AhR = aryl hydrocarbon receptor ou récepteur de la dioxine ; ARNt = cofacteur d'activation du AhR ; 7-ERF = 7éthoxyrésorufine, substrat du CYP1A.

## 4.2 MISE EN PLACE METHODOLOGIQUE

Un premier objectif du travail consistait à comparer deux modèles cellulaires, les lignées cellulaires PLHC-1 et H4IIE, couramment employés pour détecter différents ligands environnementaux du récepteur Ah. La lignée PLHC-1 était déjà en place au laboratoire avant cette étude (Kinani et al., 2010; Laville et al., 2004; Louiz et al., 2008). Concernant le modèle H4IIE que nous avons acquis en 2009, un travail préalable de standardisation des conditions d'essais (concentration en substrat, quantité de cellules par puits, caractérisation de la cinétique enzymatique, etc.) a d'abord été réalisé afin de standardiser les paramètres du test en vue de son application.

Du point de vue pratique, le bioessai est réalisé en microplaques de 96 puits contenant les cellules en culture. Ce format miniaturisé permet de réduire le volume d'échantillon à traiter, d'augmenter les capacités de criblage d'échantillons, tout en réduisant le coût d'analyse.

## 4.3 CARACTERISATION DES EFFETS DE SUBSTANCES MODELES (HAPs, PCBS ET DIOXINES) DANS LES BIOESSAIS PLHC-1 ET H4IIE

Pour fixer la durée d'exposition aux échantillons, l'induction de l'activité EROD a d'abord été étudiée après différents temps d'exposition (4 à 72 h) à deux composés modèles, la dioxine (2,3,7,8-tétrachloro-*p*-dibenzodioxin ou TCDD) et le benzo[*a*]pyrène (BAP).

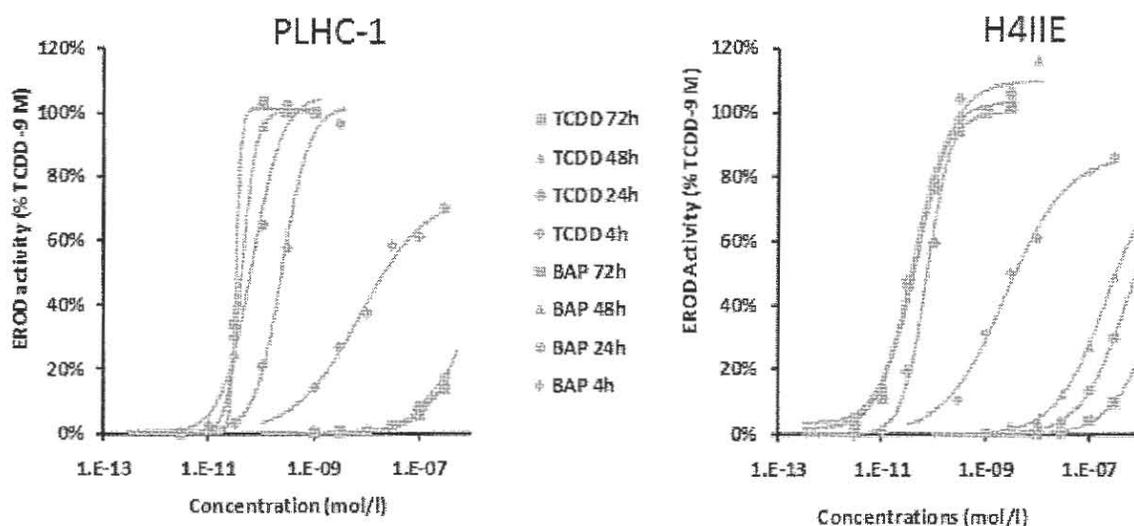


Figure 2 : Induction de l'activité EROD dans les cellules PLHC-1 et H4IIE en fonction de la durée d'exposition des cellules à la dioxine (TCDD) et à un HAP modèle, le benzo[*a*]pyrène (BAP).

La Figure 2 montre que le BAP, qui est rapidement métabolisé par les cellules, est très actif dès 4 h d'exposition puis son activité décroît significativement et rapidement après 24 h. A l'inverse, la TCDD qui est persistante dans les cellules voit son activité croître avec le temps d'exposition, même si elle est quasiment maximale dès 24 h. Les deux modèles cellulaires se comportent globalement de manière similaire, avec toutefois des différences en terme de concentrations actives et d'évolution dans le temps du pouvoir inducteur des produits testés.

Ces résultats concordent avec ceux précédemment publiés dans la lignée PLHC-1 (Louiz et al., 2008) et soulignent la nécessité de mieux caractériser les cinétiques de réponse des différents types de contaminants susceptibles d'être détectés par le test. Pour caractériser plus avant le bioessai, une dizaine de molécules, représentatives des HAPs, DL-PCBs et dioxines, ont donc été testées à différents temps d'exposition dans les deux modèles cellulaires. Les résultats sont rapportés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Capacité de dioxines (TCDD, PCDD), DL-PCBs (PCB-77, -126, -169) et HAPs (BAP, DBA, BbF, Indenopyrene, Chrysène) à induire l'activité EROD en fonction du temps d'exposition dans les cellules PLHC-1 (4 h et 72 h) et H4IIE (6 h et 72 h). Les données correspondent aux concentrations en mol/L induisant 50% d'effet maximum (EC50).

		PLHC-1	H4IIE
<b>TCDD</b>	4h/6h	2.4E-10	7.3E-11
	72h	3.2E-11	3.9E-11
<b>PCDD</b>	4h/6h	9.10E-10	4.6E-10
	72h	1.1E-10	5.7E-10
<b>PCB77</b>	4h/6h	1.9E-6	8.0E-8
	72h	3.6E-6	2.5E-6
<b>PCB 126</b>	4h/6h	2.8E-9	1.2E-9
	72h	8.7E-10	2.5E-9
<b>PCB 169</b>	4h/6h	1.5E-7	2.0E-8
	72h	3.6E-6	2.6E-8
<b>BAP (Benzo[a]pyren)</b>	4h/6h	8.59E-9	2.6E-9
	72h	2.8E-6	1.8E-6
<b>DBA (Dibenzo[a]anthracen)</b>	4h/6h	9.1E-10	3.0E-10
	72h	3.3E-8	9.8E-8
<b>BbF (Benzo[b]fluoranthen)</b>	4h/6h	2.8E-7	1.5E-9
	72h	2.7E-6	5.4E-7
<b>Indenopyrene</b>	4h/6h	2.1E-8	6.1E-10
	72h	4.3E-6	5.9E-7
<b>Chrysène</b>	4h/6h	4.9E-08	4.3E-09
	72h	1.8E-06	3.2E-06

Les données du Tableau 1 montrent que les deux modèles sont susceptibles de détecter de faibles concentrations de polluants environnementaux majeurs connus pour exercer une activité dioxin-like, ce qui valide leur utilisation potentielle pour la détection de ces familles de composés dans des échantillons environnementaux. Des différences existent cependant entre les deux modèles en termes de concentrations actives en substances. C'est le cas avec les PCB169 et 77 qui activent une réponse plus précocement en cellules H4IIE, alors que le PCB126 ou la PCDD sont plus actifs en PLHC-1 après 72 h. De même les HAPs sont actifs à de plus faibles concentrations en cellules H4IIE après 4 h d'exposition, suggérant une plus forte sensibilité des cellules aux HAPs. Dans les deux cas cependant, un temps court d'exposition permet une détection de plus faibles concentrations en HAPs, ce qui atteste de leur dégradation dans les deux systèmes cellulaires.

Dans une perspective de détection de ces composés au sein de mélanges complexes, ces résultats soulignent la nécessité de bien caractériser, au sein de chaque système, les effets et le comportement cinétique des substances ciblées. Cette caractérisation passe notamment par l'établissement de TEF (ou *TCDD-equivalent-factor*, donné par le ratio  $TEFi = EC50 \text{ de la TCDD} / EC50 \text{ du composé } i$ ) pour chaque condition d'essai (modèle cellulaire et temps d'exposition). Les différents TEFs dérivés de nos résultats pour les substances étudiées sont présentés dans la Figure 3.

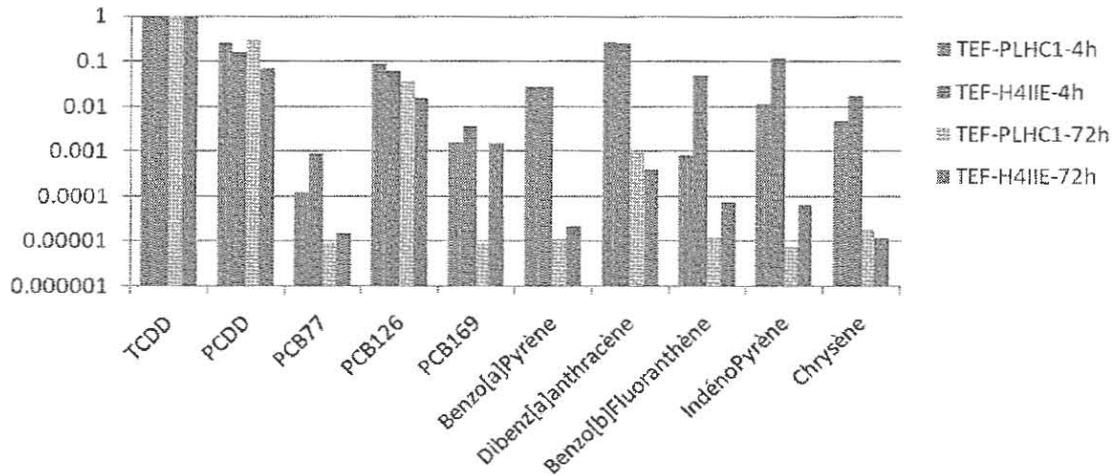


Figure 3 : Facteurs de toxicité relative à la TCDD (TEF) pour les différents composés étudiés dans les modèles PLHC-1 et H4IIE à deux temps d'exposition.

Les TEFs reportés dans la Figure 3 illustrent la variabilité de la réponse qui peut être observée selon le bioessai et/ou le temps d'exposition choisis et ce plus particulièrement pour des composés métabolisables par les systèmes biologiques comme les HAPs ou dans une moindre mesure les PCBs. Les produits plus halogénés comme les dioxines sont moins dégradés et donc plus stables dans les systèmes d'essai, d'où une variation moindre en fonction des conditions d'essai.

Globalement, sur la base de ces premiers résultats obtenus avec substances pures, les deux systèmes testés sont corrélés (Figure 4) et sont donc équivalents pour permettre la détection des substances étudiées, même si les cellules H4IIE semblent un peu plus sensibles à certains HAPs et PCBs. La suite du travail consistera à appliquer ces outils à des échantillons environnementaux et à les confronter aux analyses chimiques (chapitre suivant).

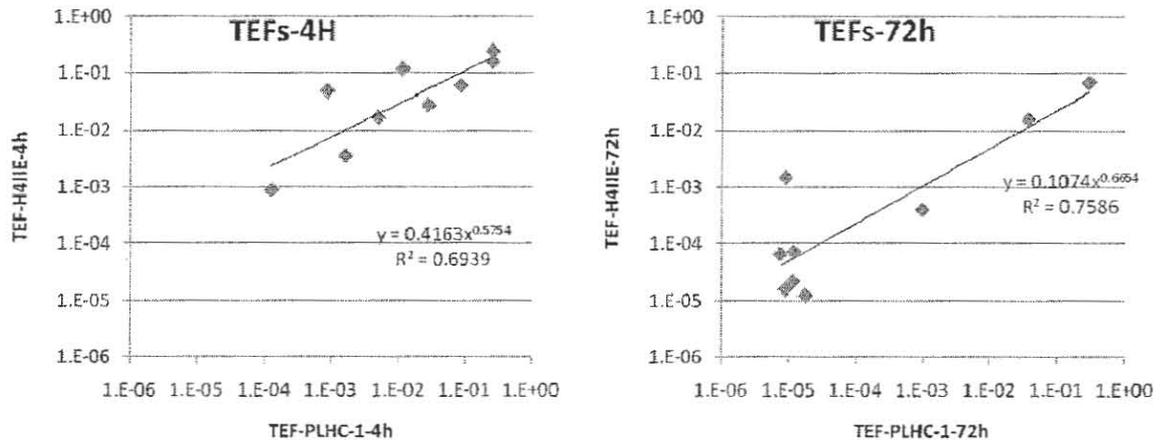


Figure 4 : Corrélation entre les modèles PLHC-1 et H4IIE sur la base des valeurs de TEFs des substances du Tableau 1 obtenues à 4h et 72h d'exposition.

## 5. APPLICATION A LA DETECTION DE CONTAMINANTS DANS DES SEDIMENTS DU BASSIN ARTOIS-PICARDIE : CAS DU RCS 2008

Les objectifs de cette seconde partie du travail étaient 1) de comparer les deux modèles pour la détection de composés inducteur d'EROD dans des extraits organiques de sédiments, 2) de comparer les résultats des bioessais avec les mesures de HAP et PCB dans les sédiments.

Les bioessais PLHC-1 et H4IIE ont été appliqués à 10 échantillons de sédiments prélevés en 2008 sur le bassin Artois-Picardie (Tableau 2). Ces prélèvements ont été effectués et nous ont été fournis par l'Agence de l'Eau Artois-Picardie dans le cadre du Réseau de Contrôle et de Surveillance. Chaque sédiment a été lyophilisé et homogénéisé. A partir de 5 g de sédiment sec, la fraction organique a été extraite par le dichlorométhane (fraction globale). La même extraction a été répétée en conditions acides (fraction Acide), de sorte à éliminer les composés facilement hydrolysables comme les HAPs et à conserver les composés halogénés persistants comme les PCBs et les PCDD/Fs. Les extraits obtenus ont ensuite été évaporés sous azote et repris dans 0,5 mL de diméthylsulfoxyde (DMSO), solvant compatible avec les bioessais. Chaque extrait a été dilué en série et testé sur cellules de façon à établir des courbes dose-réponse d'induction EROD. Les concentrations actives en échantillons, définies par les concentrations induisant 20 % d'effet (EC20), sont rapportées à celles des molécules de référence (BaP à 4 h d'exposition ou TCDD à 72 h d'exposition) de façon à déterminer des quantités d'équivalent-toxiques (BaP-EQ ou TCDD-EQ) selon la relation :  $TCDD-EQ = EC20_{TCDD} \text{ (en g/L)} / EC20_{\text{échantillon}} \text{ (en g sédiment/L)}$ .

### 5.1 DETECTION D'ACTIVITES DANS LES EXTRAITS BRUTS : INFLUENCE DU TEMPS D'EXPOSITION ET DU TRAITEMENT ACIDE DES ECHANTILLONS

Chaque extrait, global et acide, a été testé sur les modèles PLHC-1 et H4IIE après 4 h et 72 h d'exposition. Quelque soit le modèle, des activités plus fortes sont mesurées après un temps court d'exposition (Figure 5), attestant de la présence de molécules rapidement métabolisables comme les HAPs. Ce constat est corroboré par l'effet du traitement acide au cours de l'extraction qui a montré une dégradation de plus de 95% de l'activité mesurée dans l'échantillon brut (Figure 6). Ce résultat a permis de confirmer que les échantillons contenaient une majorité de contaminants inducteurs d'EROD hydrolysables. Il est également notable de constater que des activités significatives restent détectables après traitement acide, attestant de la présence de contaminants actifs et persistants dans les échantillons.

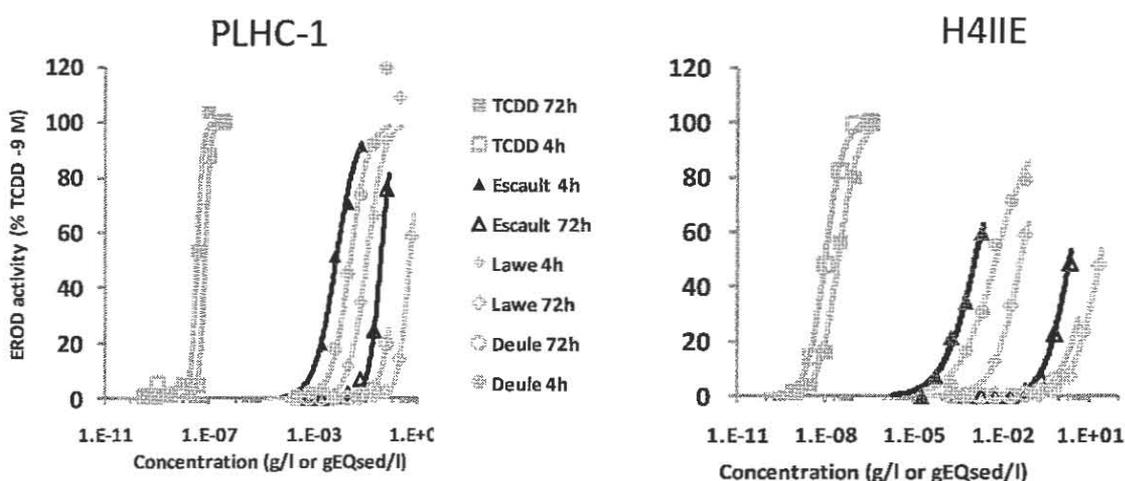


Figure 5 : Exemples de courbes dose-réponse obtenues après exposition à des extraits organiques de sédiment pendant 4 et 72 h.

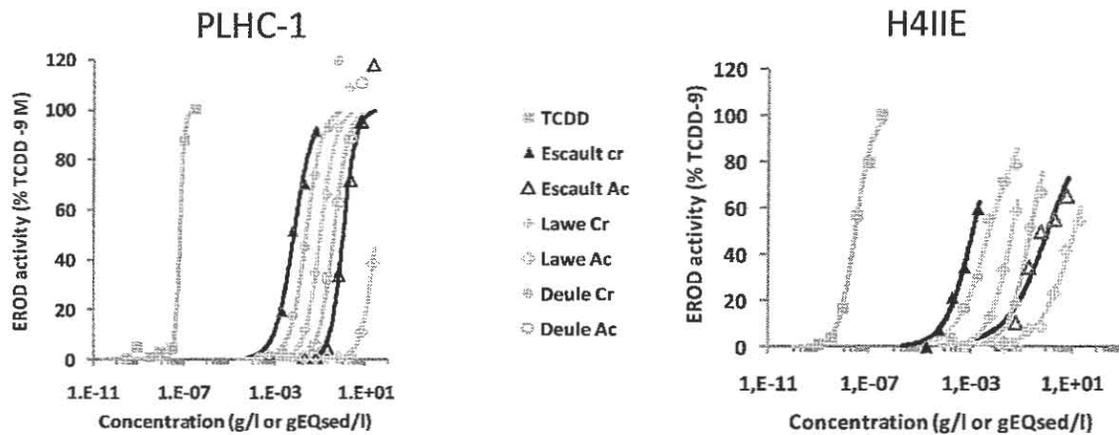


Figure 6 : Influence du traitement acide sur la détection des inducteurs d'activité EROD après 4 h d'exposition. Les figures présentent les courbes dose-réponse des extraits bruts (Cr) et acidifiés (Ac) de sédiments issus de 3 sites différents.

## 5.2 SYNTHÈSE DES ACTIVITÉS MESURÉES SUR LES SITES DU RCS EN 2008

Le Tableau 2 synthétise l'ensemble des activités quantifiées dans les fractions brutes et acides sur les 10 sites investigués en 2008.

Tableau 2 : Synthèse des activités de type dioxine mesurées sur 10 sites du RCS du bassin Artois-Picardie en 2008\*.

Sites	Bio-Analyses								Analyses chimiques	
	Extraits bruts				Extraits acidifiés				$\Sigma$ HAP	$\Sigma$ PCBi
Code station/ Rivière	BEQ- PLHC1	BEQ- H4IIE	TEQ- PLHC1	TEQ- H4IIE	BEQ- PLHC1	BEQ- H4IIE	TEQ- PLHC1	TEQ- H4IIE		
004/ Sambre	17899	116204	9	1.3	187	471	n.d.	n.d.	8958	163
016/ Escault canal	293160	1398770	88	10.8	492	1928	1.7	n.d.	21038	24
036/ Scarpe	21286	73467	9	1.2	448	1051	n.d.	n.d.	8656	145
053/ Lys	1009	5884	1	n.d.	n.d.	12	n.d.	n.d.	3180	n.d.
069/ Clarence	31597	145448	17	1.6	332	962	n.d.	n.d.	25935	26
072/ Lawe	19911	24175	13	1.0	62	132	n.d.	n.d.	8326	25
078/ Deule	110048	453189	21	3.2	1464	3396	4.9	n.d.	40229	220
097/ Temoise	5447	46307	1	0.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3939	n.d.
101/ Aa	8536	20409	2	0.3	23	n.d.	n.d.	n.d.	5866	n.d.
129/ Somme Canal	21086	-	4	0.5	33	65	n.d.	n.d.	11979	46

\*: Les valeurs sont exprimées en ng/g de sédiment sec. BEQ= BaP-équivalents ; TEQ=TCDD-équivalents ;  $\Sigma$ HAP = somme des 16 HAPs indicateurs ;  $\Sigma$ PCBi = somme des 7 PCB indicateurs. nd = non détecté, - : pas de donnée.

Globalement, le Tableau 2 montre la présence de composés inducteurs d'activité EROD sur l'ensemble des sites investigués, avec de fortes concentrations en BaP-EQs, illustrant la présence ubiquiste de contaminants de type HAPs. Les teneurs mesurées sont variables d'un site à l'autre, les sites du canal de l'Escault et de la Deule apparaissant comme les plus contaminés. Il est également intéressant de noter une persistance des activités après traitement acide sur certains sites (e.g. Deule, Scarpe, Escault), ce qui suggère la présence de molécules difficilement hydrolysables et actives en temps court d'exposition (e.g. certains PCBs). En revanche, de faibles activités sont mesurées sur extraits acidifiés après 72 h d'exposition, suggérant une faible contamination par des composés très persistants comme les dioxines, hormis pour les sites de l'Escault et la Deule.

En termes de comparaison des deux bioessais, les activités rapportées dans le Tableau 2 montrent des teneurs en BaP-EQs plus fortes en cellules H4IIE alors que le bioessai PLHC-1 semble plus sensible pour détecter des TCDD-EQs après exposition longue. Ces différences reflètent les différences de sensibilités des modèles aux diverses familles de contaminants déjà constatées avec les molécules modèles (cf § II.C), avec notamment une sensibilité légèrement plus forte des cellules H4IIE aux HAPs. Cependant, les deux modèles restent fortement corrélés et classent les échantillons de manière identique, et ce quelque soit la fraction analysée (Figure 7). Ce résultat amène à conclure à une équivalence des deux bioessais pour analyser ce type d'échantillons.

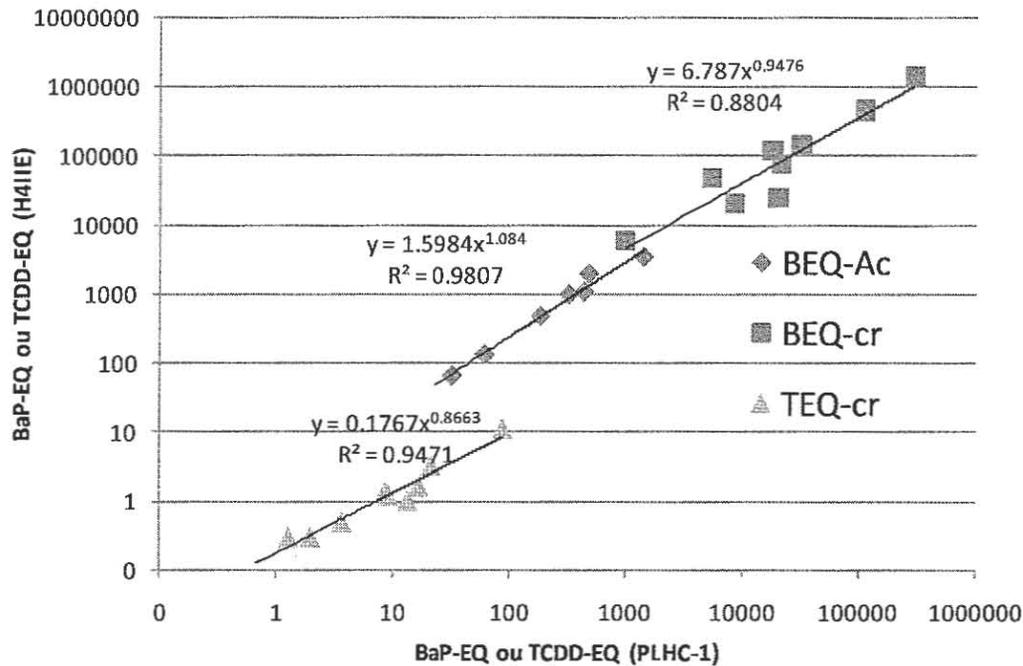


Figure 7 : Corrélation entre les bioessais PLHC-1 et H4IIE pour la quantification de valeurs de BaP-EQ et TCDD-EQ dans les différentes fractions globale (cr) et acides (Ac).

### 5.3 COMPARAISON AVEC LES TENEURS EN HAPs ET PCBs DONNÉES PAR LES ANALYSES CHIMIQUES

Pour évaluer la contribution de polluants organiques dans les données obtenues par les bioessais, nous les avons comparées avec les teneurs en 16 HAPs et 7 PCB indicateurs mesurées par l'Agence de l'eau Artois-Picardie dans le cadre du réseau de contrôle et de surveillance.

Les concentrations en BaP-équivalents dérivées des analyses de HAPs (BaP-EQchem) ont été calculées selon la relation :  $BaP-EQ_{chem} = \sum([HAP_i] \times TEF_{HAP_i})$ , avec  $[HAP_i]$  la concentration dans l'échantillon du HAP  $i$  parmi les 16 analysés et  $TEF_{HAP_i}$  son facteur de toxicité relative au BaP dans les conditions d'essai définies dans la présente étude. La comparaison des BaP-EQchem aux BaP-EQ dérivés du bioessai (BaP-EQbio) est présentée dans la Figure 8.

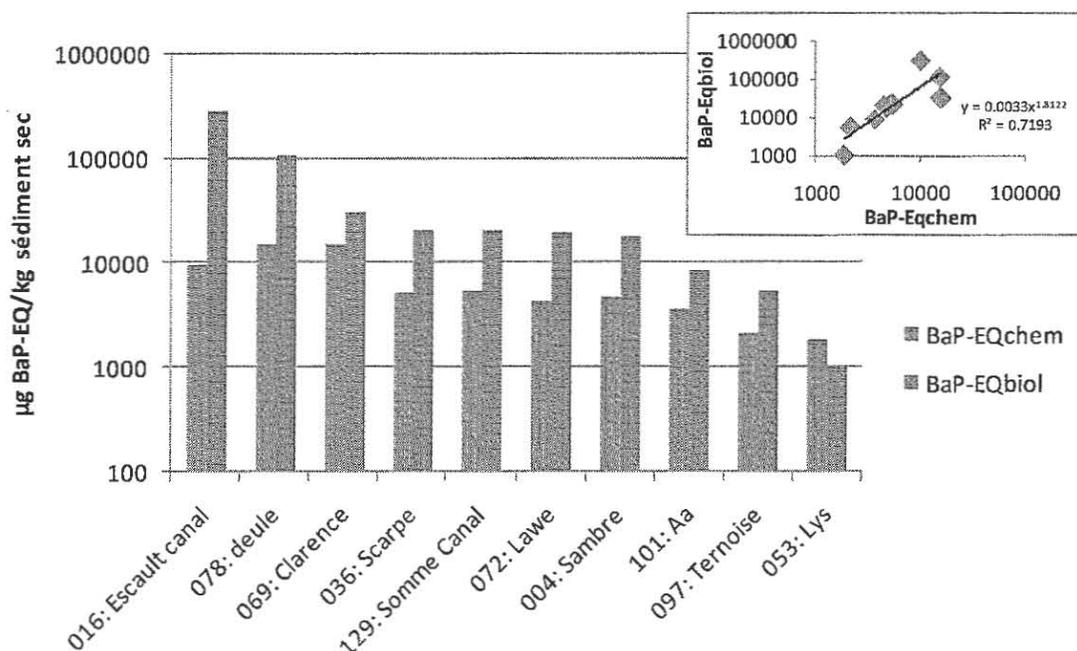


Figure 8 : Comparaison des teneurs de BaP-EQ dérivées des analyses chimiques (BaP-EQchem) et celles dérivées du bioessai PLHC-1 (BaP-EQbio).

La Figure 8 montre une bonne adéquation entre les analyses chimiques et le bioessai, avec une corrélation significative entre les deux approches. Il est également notable que les concentrations dérivées du bioessai soient globalement supérieures à celles données par les analyses chimiques, les HAPs analysés n'expliquant qu'une partie des polluants détectés par le bioessai. La part expliquée par la chimie varie de 100 % (Lys) à 3 % (Escault), la moyenne sur l'ensemble des 10 sites étant de 43 %. Ce constat montre que d'autres molécules actives détectées par le bioessai sont présentes sur les sites, notamment les sites les plus contaminés comme la Deule et l'Escault.

Concernant les PCBs, une analyse similaire, i.e. sur la base d'équivalent toxiques dérivés des analyses chimiques, n'était pas possible dans la mesure où les PCBi ne sont pas des composés dioxin-like et ne sont donc pas détectés par ces bioessais. D'après les données du Tableau 2, une comparaison des TCCD-EQbio et de la somme des 7 PCBis n'a pas montré de corrélation significative. Toutefois, une relation qualitative entre la présence de PCBs et la détection de TCDD-EQ est notée sur la Deule (220 ng/g PCBi), la Sambre (163 ng/g PCBi) et la Scarpe (145 ng/g PCBi). A l'inverse, la Lys, la Ternoise et l'Aa ne sont pas contaminés par les PCBs et présentent également de faibles valeurs de TCDD-EQ. Enfin, l'Escault apparaît très contaminé par des composés dioxin-like mais ne présente pas des taux de PCBi très importants. Dans la mesure où les DL-PCBs (PCB77 et PCB169) n'ont été détecté sur aucun des sites investigués, il est probable que d'autres composés (e.g. type dioxines ou furanes) soient présents.

## 6. CONCLUSIONS

Cette étude a permis la mise en œuvre et l'inter-comparaison de deux bioessais *in vitro* de détection des composés analogues de la dioxine dans des échantillons environnementaux. La prise en compte de différents temps d'exposition permet d'optimiser la détection des molécules de type HAP (temps court) et de les distinguer de molécules plus persistantes comme les DL-PCBs et les dioxines (temps long, extrait acidifié).

La comparaison des modèles a montré certaines différences de sensibilité à des molécules types. Toutefois, leur application à 10 sédiments issus du RCS 2008 a montré qu'ils sont équivalents pour détecter et quantifier ce type de contaminants dans des matrices complexes comme les sédiments de rivière et de classer différents sites contaminés. La corrélation significative avec les équivalents toxiques dérivés des analyses chimique HAPs confirme le caractère quantitatif de l'outil bio-analytique et valide sa pertinence pour la mesure de ce type de molécules. Une relation qualitative est également notée avec les analyses de PCB<sub>i</sub>, mais elle devra être confortée par des analyses chimiques d'autres types de contaminants (e.g. DL-PCBs, PCDD/Fs). Ce constat montre la limite des analyses de PCB<sub>i</sub> seules et plaide pour la recherche d'autres molécules.

Cette étude montre que le bioessai *in vitro* proposé est pertinent pour détecter des contaminants inducteurs d'EROD dans l'environnement. En pratique, du fait de son coût moindre par rapport aux analyses de dioxines et dioxin-like, il peut être envisagé de l'intégrer dans les stratégies de surveillance de ces molécules, par exemple dans une démarche de criblage d'échantillons, préalable à la mise en œuvre d'analyses chimiques de dioxines et analogues, plus coûteuses. Dans le cas de notre étude par exemple, l'échantillon provenant de l'Escault apparaît comme un bon candidat pour une caractérisation plus poussée de son état de contamination par ce type de molécules.

## **7. COLLABORATIONS**

La mise au point du protocole d'extraction et d'acidification des extraits a été réalisée en collaboration avec le LPTC de Bordeaux (Drs H. Budzinski, N. Tapie et M-H. Dévier). Les campagnes de terrain et les prélèvements ont été menés dans le cadre d'un partenariat avec l'Agence de l'Eau Artois-Picardie (responsable d'étude, Dr Jean Prygiel). L'agence nous a également fourni les données analytiques concernant la campagne 2008.

## **8. VALORISATION**

Ce travail a fait l'objet de deux posters au colloque de l'ADEBIOTECH 2009 :

Creusot N., Dévier MH., Tapie N., Porcher JM., Budzinski H., Aït-Aïssa S. (2009) Comparison of two *in vitro* bioassays for the characterization of dioxin-like compounds in French freshwater sediments. Colloque ADEBIOTECH Eau et Polluants émergents, Romainville, 20-22 Octobre.

Aït-Aïssa S., Maillot-Maréchal E., Creusot N., Prygiel J., Porcher J.M. (2009) Assessment of steroid- and dioxin-like compounds in sediments and domestic effluents in the Artois-Picardie watershed by using *in vitro* bioassays. Colloque ADEBIOTECH Eau et Polluants émergents, Romainville, 20-22 Octobre.

Un article de synthèse en préparation à soumettre à Environnement Risques et Santé, sur la base du rapport bibliographique rendu à l'ONEMA en 2008.

## **9. REFERENCES**

Aït-Aïssa, S. (2009) Outils bio-analytiques *in vitro* : principe et apports pour la surveillance des contaminants organiques dans le milieu aquatique. INERIS, Convention cadre INERIS-ONEMA 2008, Verneuil-en-Halatte, p. 26.

Behnisch, P.A., Hosoe, K. and Sakai, S.-i., 2001. Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds – a review of bioassay/biomarker technology. *Environment International* 27, 413-439.

Hahn, M.E., 2002. Biomarkers and bioassays for detecting dioxin-like compounds in the marine environment. *The Science of the Total Environment* 289, 49-69.

Kinani, S., Bouchonnet, S., Creusot, N., Bourcier, S., Balaguer, P., Porcher, J.M. and Aït-Aïssa, S., 2010. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environ Pollut* 158, 74-83.

Laville, N., Aït-Aïssa, S., Gomez, E., Casellas, C. and Porcher, J.M., 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196, 41-55.

Louiz, I., Kinani, S., Gouze, M.E., Ben-Attia, M., Menif, D., Bouchonnet, S., Porcher, J.-M., Ben-Hassine, O.K. and Aït-Aïssa, S., 2008. Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Science of the Total Environment* 402, 318-329.