

Evaluation du potentiel perturbateur endocrinien des eaux de la Seine et en sortie du bassin versant de l'Orge : analyses chimiques et biologiques

[Lucie Ozio1^{2}](mailto:lucie.oziol@u-psud.fr), *Cécile Miege^{1*}, Philippe Bados¹, Maya Bimbot², Viviane Huteau², Séverine Schiavone¹, Sara Karolak², Marina Coquery¹, Yves Levi²

1 : Laboratoire des micropolluants organiques - Unité de recherche Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions (MALY) - Cemagref - 3 bis quai Chauveau, CP 220, 69336 Lyon cedex 09.

2 : Laboratoire Santé Publique Environnement (LSPE) - UMR 8079 - Université Paris-Sud 11 – Faculté de Pharmacie – 5 rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry cedex.

*Contacts : lucie.oziol@u-psud.fr - cecile.miege@cemagref.fr

1. Introduction

Parmi les micropolluants organiques présents en mélange dans l'environnement, et plus particulièrement dans les milieux aquatiques, se trouvent des produits d'origine domestique ou industrielle susceptibles d'engendrer des perturbations du système endocrinien. Il en résulte un risque environnemental et un risque sanitaire avéré pour la faune et suspecté pour l'Homme. Ces micropolluants, rejetés dans les eaux usées ne sont pas totalement éliminés dans les stations d'épuration et peuvent se retrouver dans les milieux aquatiques récepteurs. Les eaux de rivières représentent donc un vecteur d'exposition à ces perturbateurs endocriniens (PEs), avec comme conséquence possible la contamination des ressources destinées à la production d'eau potable. Il est donc important de caractériser cette contamination fluctuante au cours du temps et en fonction des sites, non seulement par une approche globale, en évaluant le potentiel perturbateur endocrinien des eaux, mais aussi spécifique, en quantifiant les concentrations en contaminants PEs (i.e. hormones estrogéniques, alkylphénols, polybromodiphényléthers, ...) potentiellement présents dans les eaux usées et de rivières.

Parmi les études antérieures menées sur des sites du bassin parisien, la campagne de prélèvements réalisée le long de la Prédecelle en 2007 a permis de mettre en évidence des effets perturbateurs estrogéniques qui ont pu être partiellement corrélés aux teneurs en hormones naturelles et synthétiques analysées dans les mêmes échantillons. Par contre, cette corrélation n'a plus été observée pour des prélèvements au niveau des bassins versants de l'Orge et de la Seine en juin et septembre 2008.

Afin d'étayer ces résultats, deux études ont été conduites en 2009, une en sortie du bassin versant de l'Orge (eaux usées et de surface) et l'autre au niveau du bassin de la Seine (eaux de surface). L'objectif ici était de compléter les campagnes antérieures en étudiant la variation de la contamination dans le temps sur un nombre limité de sites. La démarche associe une approche globale par mesures d'effets biologiques estrogéniques à une approche spécifique par détermination des concentrations en œstrogènes dans ces eaux. Le potentiel perturbateur thyroïdien des eaux prélevées a par ailleurs été évalué en parallèle, comme cela a été le cas dans nos travaux antérieurs.

2. Matériel et méthodes

2.1. Réactifs

Pour la biologie : le 17 β -Estradiol (E2) et la L-triiodothyronine (T3) sont fournis par Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Les solutions d'E2 et les extraits d'eaux sont préparés et dilués dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) de grade HPLC (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 system MilliQ[®] (Millipore, St-Quentin-en-Yvelines, France). Tout le matériel utile à la culture cellulaire provient de Life Technologies (Cergy-Pontoise, France).

Pour la chimie : Les hormones deutérées (E1D4, E2D2, E3D2 et EE2D4) et les étalons internes (E2 acétate et métoprolol Impureté A) proviennent de C.I.L. Cluzeau. Le méthanol, de qualité pour analyse de résidus de pesticides, ainsi que l'acétonitrile et l'eau ultrapure pour la phase mobile, de qualité LC-MS, sont fournis par SDS. De l'azote de qualité standard est utilisé pour l'évaporation. La séparation chromatographique est réalisée avec une chaîne de chromatographie en phase liquide Agilent 1100 (Agilent). Le système est équipé d'une colonne X-bridge C18 endcapped (150 x 2,1 mm, 3,5 µm) munie d'une pré-colonne. La chaîne chromatographique est couplée à un spectromètre de masse en tandem de type triple quadripôle : API 4000 (Applied Biosystems-MDS).

2.2. Echantillonnage et préparation des échantillons avant analyses

Six campagnes "Orge" ont été réalisées de février 2009 à octobre 2009 : les eaux usées proviennent du collecteur situé à Athis-Mons et les eaux de surface de l'Orge à Viry-Châtillon. Les échantillons d'eaux usées correspondent à un échantillon moyenné entre deux prélèvements sur 24 h réalisés deux jours consécutifs. Les mesures biologiques ont été effectuées sur les 6 campagnes alors que les mesures chimiques ont été réalisées uniquement pour les 3 dernières campagnes (juillet, septembre et octobre 2009).

Deux campagnes "Axe Seine" ont été conduites en 2009 (mai et septembre) : de l'eau de surface a été prélevée sur les sites de Marnay, Villeneuve, Epinay et Triel.

Les prélèvements d'eau sont réalisés dans des récipients en verre ambré. Après l'échantillonnage, les eaux sont rapidement filtrées sur fibre de verre de porosité moyenne 1 µm (Filtres GF/B Whatman, France) et conservées à 4° C à l'abri de la lumière au maximum 48 heures.

L'extraction des polluants organiques d'une large gamme de polarités à partir de la phase liquide est pratiquée sur des cartouches Oasis HLB 500 mg (Waters, Guyancourt, France), préalablement conditionnées par des rinçages successifs au méthanol et à l'eau ultrapure. Un litre (eaux de surface, témoins) ou 0,5 L (eaux usées) de chaque prélèvement sont ensuite percolés, à un débit de 5 mL/min puis la cartouche est séchée pendant 30 min sous flux d'air. L'éluat est réalisé avec 2x5 mL de méthanol à un débit de 1 mL/min. L'éluat est évaporé à sec à 40° C sous flux d'azote et les extraits secs sont repris, soit dans du DMSO pour les essais uniquement biologiques, soit dans du méthanol. Une partie des extraits méthanoliques est mise de côté pour les analyses chimiques avec dosage des hormones par chromatographie, le reste étant évaporé puis repris dans du DMSO pour les essais biologiques en parallèle. Dans l'extrait, les polluants organiques se retrouvent ainsi concentrés de 2000 à 5000 fois (2000 à 5000 x) par rapport à leur teneur dans l'échantillon avant extraction (1 x). Tous les extraits ainsi préparés sont conservés au congélateur à -20 °C dans des flacons en verre ambré jusqu'à l'analyse. Des témoins d'extraction en phase solide sont réalisés en parallèle avec 1 L d'eau d'Evian® en bouteille en verre suivant la même procédure que précédemment décrite.

2.3. Analyses biologiques

Les perturbations estrogéniques et thyroïdiennes induites par les extraits d'eau ont été évaluées *in vitro* sur des tests cellulaires de mesure de perturbation de l'activité transcriptionnelle, les hormones endocrines engendrant la majorité de leurs effets par la voie génomique.

2.3.1. Principe

Deux tests cellulaires basés sur le même principe ont été utilisés pour évaluer le potentiel perturbateur endocrinien des extraits d'eau : les tests PC-DR-LUC et MELN, permettant de détecter respectivement les perturbations de la transcription dépendante de l'hormone thyroïdienne T3 et de l'estrogène E2.

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

- Le test MELN a été construit à partir d'une lignée de cellules MCF-7 de cancer du sein humain, transfectées de façon stable avec un gène rapporteur luciférase (Balaguer *et al.*, 1999). Ce test cellulaire, généreusement fourni par P. Balaguer (INSERM U540, Montpellier), permet de détecter les perturbations de l'activité transcriptionnelle de l'isoforme α du récepteur aux estrogènes (ER α).

Les deux tests permettent d'évaluer de façon simple l'activité transcriptionnelle des deux récepteurs TR α 1 et ER α , proportionnelle à la luminescence émise par l'activité de luciférase synthétisée sur le substrat luciférine. La viabilité cellulaire est évaluée en parallèle pour chaque expérience, afin de tenir compte des potentiels effets toxiques induits par les extraits.

2.3.2. Protocole de mesure de l'activité transcriptionnelle

Les cellules MELN ou PC-DR-LUC sont mises en plaque 96 puits opaques à fond transparent (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 contenant du sérum (milieu blanc complet). Après adhésion des cellules à 37 °C avec 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité, celles-ci sont mises en présence des extraits environnementaux dilués au moins au 1/1000^{ème}, pour évaluer leurs éventuels effets agonistes sur l'activité des récepteurs nucléaires en limitant les effets toxiques sur cellules induits par des échantillons trop chargés en polluants. Après 18 h d'incubation, l'activité luciférase est mesurée sur les cellules lysées à l'aide du kit « *luciferase reporter gene assay* » (Roche Applied Science, Meylan, France), avec un luminomètre adapté aux microplaques (Centro LB 960, Berthold, Thoiry, France).

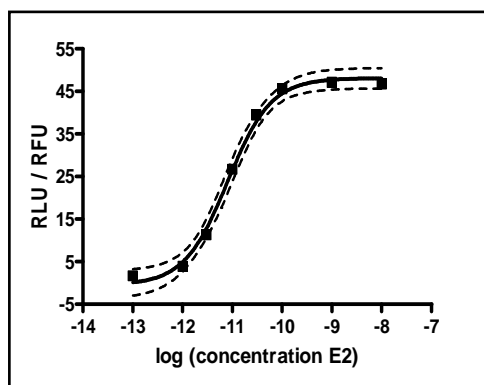
Chaque extrait est analysé, à raison de 5 points de répétition de mesure par expérience et de 2 répétitions d'expériences en moyenne, et ce parallèlement à une gamme d'étalonnage du ligand naturel de chaque récepteur (respectivement E2 et T3 pour MELN et PC-DR-LUC), afin de réaliser une évaluation quantitative de l'activité des extraits, exprimée en ng/L d'équivalent E2 (EEQ) ou T3 (TEQ). Un témoin négatif est également réalisé sur chaque microplaque de culture. Il correspond au solvant des échantillons, le DMSO, sa concentration finale dans chaque puits traité étant de 0,1 %.

En parallèle, sur les mêmes puits d'expérience que pour la mesure de luciférase, la viabilité cellulaire est évaluée par le test au Bleu Alamar (BA ou résazurine) pour s'assurer de l'absence de toxicité de chaque condition testée. La résazurine, de couleur bleue est réduite en résorufine rose par l'activité cellulaire. Celle-ci est dosée par fluorescence, à une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et d'émission de 590 nm. Après 16 h d'incubation, le milieu de culture est remplacé par une solution de BA à 1 μ M diluée dans du milieu blanc complet. L'intensité de fluorescence est mesurée instantanément puis après 2 h d'incubation, l'intensité du temps T0 étant soustraite de celle au temps T2. Pour chaque expérience, la saponine à 1 g/L sert de témoin positif de mortalité cellulaire.

2.3.3. Traitement des résultats

Pour l'activité luciférase, le signal luminescent obtenu pour une condition donnée est rapporté à celui du témoin DMSO pour exprimer le résultat en *Relative Luminescence Unit* (RLU) ou activité luciférase relative. De même, pour la viabilité cellulaire, le signal fluorescent obtenu pour une condition donnée est rapporté à celui du témoin DMSO pour exprimer le résultat en *Relative Fluorescence Unit* (RFU). L'activité luciférase relative est ensuite corrigée de la viabilité relative, exprimant les résultats en RLU/RFU.

Pour chaque expérience, les paramètres de la courbe d'étalonnage réalisée en parallèle (ex. en figure 1) sont estimés avec le logiciel Graphpad Prism 5 (San Diego, CA), permettant ensuite de quantifier les activités mesurées en EEQ ou TEQ. Les paramètres de la régression de Hill de la sigmoïde obtenue permettent de quantifier les activités mesurées en EEQ ou TEQ, ainsi que les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) pour chaque expérience, comme suit :



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

$$EEQ \text{ (mol/L)} = \log(EC50) - \log\left(\frac{T - RLU / RFU}{RLU / RFU - B}\right)$$

LQ = valeur correspondant à B + écartype

LD (en RLU/RFLU) = LOQ (en RLU/RFU) x 3 / 10

Figure 1 : exemple de courbe d'étalonnage obtenue en présence d'une gamme de E2 sur MELN (concentration exprimée en mol/L, la concentration pour l'effet plateau étant voisine de 1 nM), avec modalités de calcul des EEQ.

$T = TOP$, soit la valeur RLU/RFU la plus élevée (réponse maximale) de la sigmoïde, calculée par régression de Hill ; $B = BOTTOM$, soit la valeur RLU/RFU la plus basse de la sigmoïde (ligne de base), calculée par régression de Hill ; $EC50$ = concentration qui induit une réponse agoniste intermédiaire entre T et B , réponse à 50 % de celle induite au T (100 %).

Les EEQ et TEQ sont exprimés au final en ng/L d'échantillon avant l'extraction en phase solide en tenant compte du facteur de dilution utilisé pour les tests cellulaires.

2.4. Analyses chimiques

Cinq estrogènes (17 α -estradiol (α E2), β E2, estrone (E1), estriol (E3) et éthinylestradiol (EE2)) ont été analysés dans les extraits méthanoliques évaporés à sec et repris dans un mélange acétonitrile/eau, 40/60, v/v. L'analyse est réalisée par LC-MS/MS avec étalonnage interne. Le volume injecté est de 10 μ L. La séparation des 5 hormones est réalisée grâce à un gradient chromatographique (0,2 mL/min) mettant en oeuvre de l'eau et de l'acétonitrile : 40 % d'acétonitrile de 0 à 2 min, puis 80 % d'acétonitrile à 4,5 min et jusqu'à 15 min. La température de colonne est fixée à 35 °C. L'ionisation est réalisée avec une source électrospray fonctionnant en mode négatif. Le mode d'acquisition choisi est le mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*). Les conditions appliquées à la source sont les suivantes : température de 400 °C, tension de spray – 4,5 kV, gaz de collision 6 psi, gaz rideau 25 psi. Pour plus de détails concernant l'analyse chromatographique par LC-MS/MS, se référer à la publication récente Miège *et al.*, 2009.

Pour s'affranchir des effets matrice, des traceurs deutérés de méthode sont utilisés (E1D4, E2D2, E3D2 et EE2D4). Ces traceurs ont ici été ajoutés à l'échantillon après extraction, dans l'extrait méthanolique. Les 4 traceurs deutérés utilisés permettent de corriger les 5 estrogènes ciblés ; les résultats obtenus sont donc systématiquement corrigés par le rendement (E2D2 corrigeant la α - et β -E2).

Des solutions standard, préparées indépendamment des solutions standards utilisées pour l'étalonnage, sont régulièrement analysés par LC-MS/MS (toutes les 6 injections) pour vérifier l'absence de dérivation durant l'analyse et la justesse de la droite d'étalonnage. Par ailleurs, des blancs d'analyse sont injectés (toutes les 3 injections) pour éviter tout risque d'effet mémoire. De plus, afin de vérifier la cohérence des résultats et de limiter au mieux l'effet des interférents, les échantillons sont analysés sans et avec dilution (par 5 et/ou 10). Enfin, comme recommandé dans la décision de la commission européenne (EC, 2002), 2 transitions d'ionisation sont utilisées pour chaque composé, l'une servant à la quantification et l'autre pour la confirmation.

Les limites de quantification de la méthode d'analyse dans les eaux de rivière et les effluents de stations d'épuration sont aux environs de : 0,4 ng/L pour E1 et α E2, 0,6 ng/L pour β E2, 0,8 ng/L pour E3 et 1,2 ng/L pour EE2. Ces limites de quantification sont données à titre indicatif, elles sont susceptibles de varier d'une campagne à une autre.

Les résultats des analyses chimiques sont exprimés également en EEQ : les teneurs en estrogènes (en ng/L) pour chaque échantillon sont pondérées par leur potentiel d'activité transcriptionnelle relatif à E2 (potentiel de transactivation relatif) établi sur test MELN. Pour E1, E3 et EE2, les potentiels de transactivation relatifs à celui d'E2 sont respectivement de 0,04, 0,11 et 1,79 (figure 2 et tableau 1).

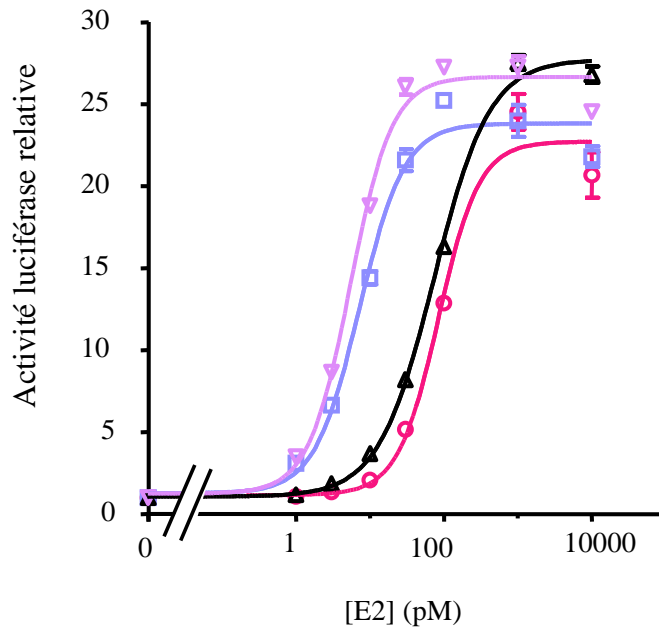


Figure 2 : activité transcriptionnelle (en activité luciférase relative) induites par des concentrations croissantes en EE2 (▽), E2 (□), E3 (△) et E1 (○), mesurées sur test cellulaire MELN.

Tableau 1 : potentiel de transactivation dépendante de ER α par des hormones stéroïdes et de synthèse.

Stéroïdes	EC ₅₀ (pM)	Potentiel de transactivation relatif à E2
E1	193	0,04
E2	6	1,00
E3	69	0,11
EE2	4	1,79

Ces EEQ estimés à partir des analyses chimiques seront appelés dans ce document "EEQ chimie", alors que ceux mesurés en analyses biologiques seront appelés "EEQ biologie".

$$\text{EEQ chimie pour un échantillon} = [\text{E1}] \times 0,04 + [\text{E2}] \times 1,00 + [\text{E3}] \times 0,11 + [\text{EE2}] \times 1,79.$$

3. Résultats – Discussion

3.1. Evaluation des effets perturbateurs thyroïdiens

Campagnes Orge 2009 (figure 3) :

Les eaux de surface de l'Orge n'ont engendré aucun effet perturbateur thyroïdien, à l'inverse des eaux usées, présentant en moyenne une activité voisine de 3 ng/L TEQ. Ces résultats abondent dans le sens de résultats déjà publiés par l'équipe du LSPE, à savoir qu'au niveau des phases liquides des compartiments aquatiques, seules les eaux usées du bassin parisien présentent un effet perturbateur thyroïdien (Jugan *et al.*, 2009). Des effets thyroïdiens sont surtout rapportés pour la phase particulaire, pouvant aller jusqu'à 20 ng/L TEQ (extrait de MES en amont de Limours – rapport 2008). Ces observations sont en accord avec le fait que les composés susceptibles d'interférer avec la transcription génique médiée par TR α 1 sont plutôt des molécules apolaires (Jugan *et al.*, 2009), se fixant partiellement sur les MES et les sédiments.

Par contre, il est difficile de distinguer un effet saison sur les variations en activités thyroïdiennes des eaux usées.

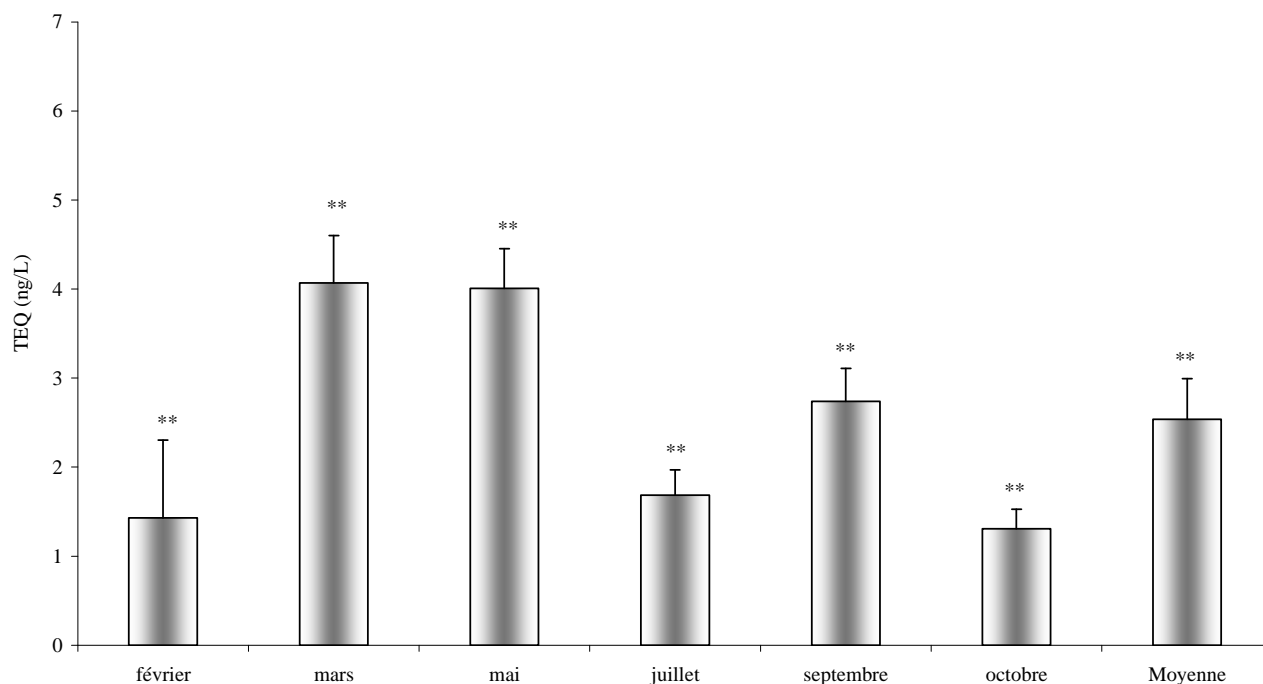


Figure 3 : activité thyroïdienne des extraits d'eaux usées prélevées au niveau du collecteur d'Athis-Mons (en TEQ, ng/L \pm SEM), mesurée sur test cellulaire PC-DR-LUC. ** $p < 0,01$, significativement différent du témoin négatif (blanc d'extraction).

Campagnes Axe Seine 2009 :

Aucun effet thyroïdien significatif n'a été observé pour les extraits d'eau du bassin de la Seine, confirmant là encore l'absence d'activité thyroïdienne dans les eaux de surface.

3.2. Evaluation des effets perturbateurs estrogéniques

Campagnes Orge 2009 (figure 4) :

Les eaux usées et les eaux de surface prélevées lors des campagnes Orge présentent un effet estrogénique ($p < 0,01$ par rapport au blanc d'extraction). Nos résultats confirment que les activités estrogéniques des eaux de surface sont significativement plus faibles que celles des eaux usées, que ce soit en moyenne ou pour chaque campagne (excepté celle de mars). Par contre, le rapport des activités entre eaux de surface et eaux usées varie d'une campagne à l'autre.

Il est à noter que, pour les eaux usées, les effets thyroïdiens (figure 3) et estrogéniques (figure 4) semblent corrélés, les variations entre chaque campagne étant similaires. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les contaminants responsables de ces deux types d'effets PE soient les mêmes. En effet, le nonylphénol, le bisphénol A, par exemple peuvent engendrer des effets PE à la fois thyroïdiens et estrogéniques. Une telle hypothèse irait dans le sens que, pour les sites étudiés en 2009, la perturbation estrogénique ne s'explique pas, pour l'essentiel, par les hormones estrogéniques (*cf* partie 3.3).

Par ailleurs, comme pour les effets thyroïdiens, il n'apparaît aucun effet saison sur les activités estrogéniques observées, même si celles-ci semblent plus élevées en printemps / été qu'en automne / hiver. Pourtant, globalement, les prélèvements ont toujours été réalisés par temps sec. Pour autant, quelques pluies en début de printemps pourraient expliquer les valeurs un peu plus élevées, engendrées par la présence potentielle d'un plus grand nombre de contaminants, ou alors en plus grandes quantités, suite à des phénomènes de lessivage, de dépôts atmosphériques *via* les pluies ou de débordements au niveau des réseaux d'assainissement. Ces campagnes de prélèvements seraient donc à reconduire en période humide franche.

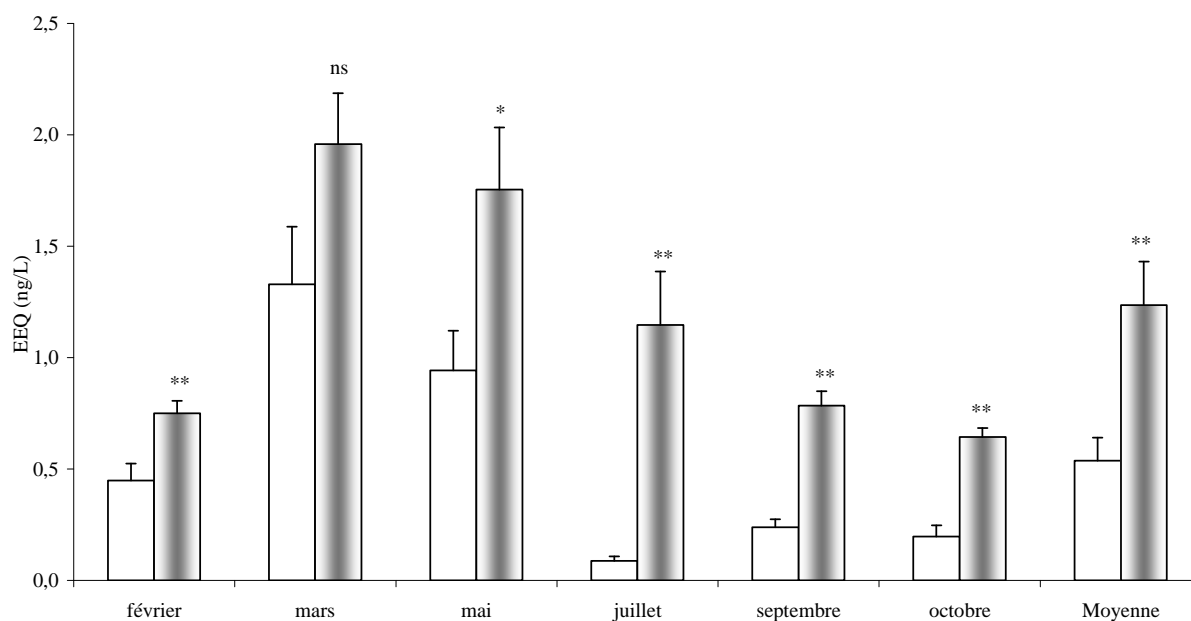


Figure 4 : activité estrogénique des extraits d'eaux usées (en grisé) et d'eaux de surface (en blanc) des campagnes Orge (en EEQ, ng/L \pm SEM), mesurée sur test cellulaire MELN. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns : non significatif comparativement à l'activité des eaux de surface. Les activités de tous les échantillons sont significativement différentes ($p < 0,01$) du témoin négatif (blanc d'extraction).

Campagnes Axe Seine 2008 et 2009 (figure 5) :

Les résultats présentés pour la campagne Axe Seine regroupe les deux prélèvements de 2008 (figurant déjà dans le rapport 2009) et les deux de 2009. Une légère activité estrogénique, comprise en moyenne entre 1 et 2 ng/L EEQ a été retrouvée pour les sites de Villeneuve, Epinay et Triel. Par contre, aucune activité n'a été retrouvée au niveau de Marnay, site le plus en amont de Paris. Les activités relevées pour les eaux des sites en aval de Paris (Triel et Epinay) sont plus élevées que celles relevées à Villeneuve (excepté pour la campagne de mai 2009). Le potentiel perturbateur œstrogénique des eaux au niveau de l'axe fluvial de la Seine semble donc augmenter de l'amont vers l'aval de Paris.

Là encore, il n'est pas possible de conclure à un effet saison sur les effets PE des eaux. Les campagnes 2008 ont été réalisées par temps sec (septembre) et pluvieux (juin), ce qui pourrait expliquer les activités plus élevées mesurées en septembre. Dans ce cas, et contrairement à ce qui a été observé sur l'Orge en 2009, les contaminants responsables des effets estrogéniques pourraient être majoritairement des contaminants véhiculés par les réseaux d'assainissement (eaux usées), comme les hormones par exemple, et non par les eaux de pluie ni les eaux de ruissellement. Dans ce cas, l'effet estrogénique est plus fort par temps sec (concentration des contaminants dans les eaux traitées et rejetées dans les rivières) et moins fort par temps de pluie (dilution des contaminants). Cependant, nous observons que les campagnes de 2009 ont été réalisées plutôt par temps sec, alors que les activités ne sont pas si élevées. En effet, les valeurs les plus élevées mesurées en mai 2009 ne sont significativement différentes du témoin négatif que pour Villeneuve, le blanc d'extraction correspondant ayant engendré un signal (RLU / RFU) plus important qu'habituellement. Pour vérifier ces hypothèses, il faudrait prévoir plus de prélèvements par an pour ces sites Axe Seine, par temps sec et humide et / ou effectuer des mesures d'effets sur des eaux de pluie ou de ruissellement.

Les activités estrogéniques retrouvées pour l'ensemble des extraits de ces campagnes sont similaires à celles déjà observées pour d'autres échantillons de phase liquide lors de précédents travaux sur des sites du bassin parisien (rapports 2008 – 2009 ; Miège *et al.*, 2009).

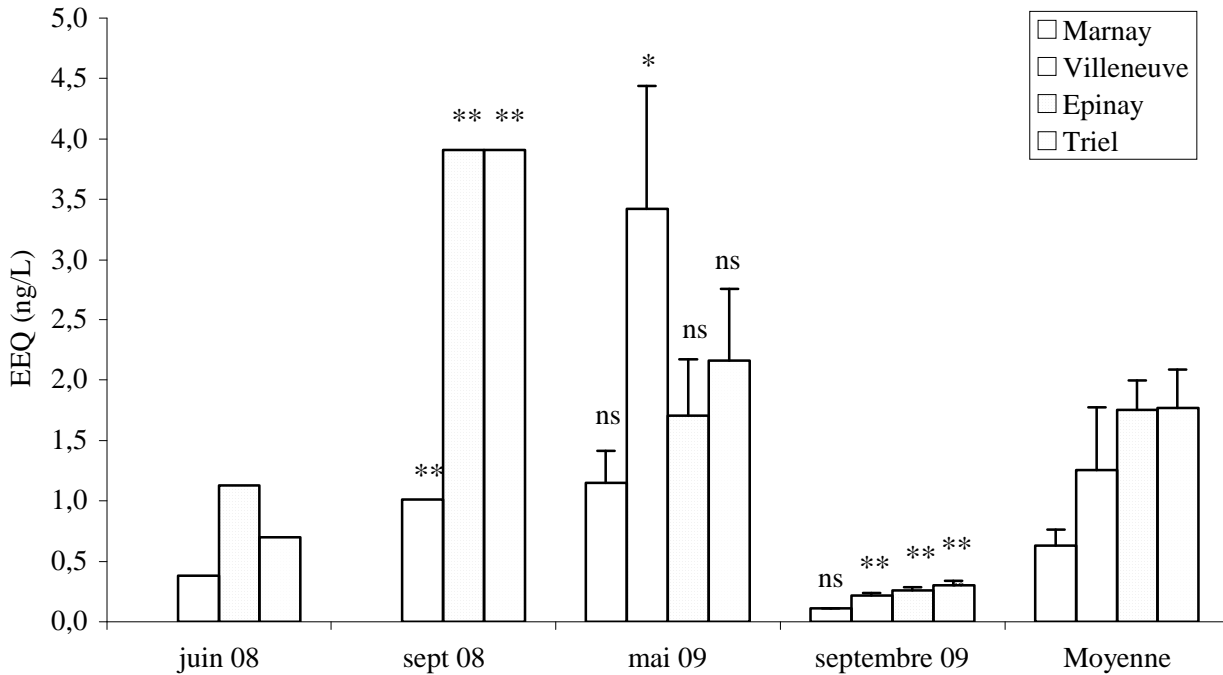


Figure 5 : activité estrogénique des extraits d'eaux de surface des campagnes Axe Seine (en EEQ, ng/L \pm SEM), mesurée sur test cellulaire MELN. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$; ns : non significatif, comparativement à l'activité du témoin négatif (blanc d'extraction).

3.3. Corrélation entre potentiels estrogéniques mesurés sur cellules et estimés par quantification chimique

Campagnes Orge 2009 (figure 6 et tableau 2) :

Que ce soit pour les eaux usées du collecteur à Athis-Mons ou les eaux de surface prélevées à Viry-Châtillon, les variations des EEQ chimie ne semblent pas corrélées à celles des EEQ biologie. Par contre, il est à noter que les valeurs des EEQ chimie et biologie moyennées sur les 3 campagnes par site sont similaires. De plus, les valeurs d'activités estrogéniques estimées en chimie et mesurées en biologie varient dans le même sens entre les eaux de surface (valeurs faibles) et les eaux usées (valeurs élevées).

L'analyse chimique n'a pas permis de détecter EE2, ou α E2 dans les échantillons. E1 a été quantifié uniquement dans l'Orge, à des concentrations voisines de 1 ng/L (septembre et octobre) à 2 ng/L (juillet). E1 présente une faible activité estrogénique et pourrait expliquer partiellement les faibles activités observées dans les eaux de surface. β E2 a été quantifié uniquement dans l'échantillon Orge prélevé en juillet (0,7 ng/L) : la très faible activité biologique observée n'est donc pas complètement en accord avec la concentration mesurée de β E2, même si celle-ci peut être considérée comme relativement faible. E3 n'a été quantifié que dans les échantillons d'eaux usées, à raison de 9 et 27,8 ng/L respectivement en septembre et en juillet, cette variation de concentrations pouvant expliquer les différences d'activités estrogéniques mesurées entre ces deux échantillons. A noter que pour ces eaux usées, les analyses chromatographiques sont fortement interférées, ce qui induit des incertitudes analytiques très élevées (d'au moins un facteur 2).

Pour mémoire, nous avons déjà mené une campagne sur le bassin versant de l'Orge fin septembre 2007 (rapport 2008 – Miège *et al.*, 2009), par temps sec sur de nombreux sites très contrastés du point de vue de leur exposition à des pollutions et de leurs conditions hydrographiques : le long de la Prédecelle (Amont Limours, Aval Limours, Aval STEP de Briis, Aval de l'étang de Vaugrigneuse), dans le rejet de la STEP de Briis, 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 et dans l'Yvette, juste avant sa confluence avec l'Orge. Les EEQ chimie et EEQ biologie ont été comparés là aussi, montrant une corrélation beaucoup plus évidente que pour les campagnes Orge de 2009. Ceci peut s'expliquer par le choix des sites (nombreux, peu distants, se suivant d'amont en aval de rivières), le fait que la campagne ait été menée sur une même période (1 jour) et par temps sec (pas de contamination par d'autres contaminants contenus dans les eaux de ruissellement ou les eaux de pluie). Nous avons alors conclu, pour ces sites par temps sec, que les hormones estrogéniques expliquaient assez bien l'effet estrogénique observé.

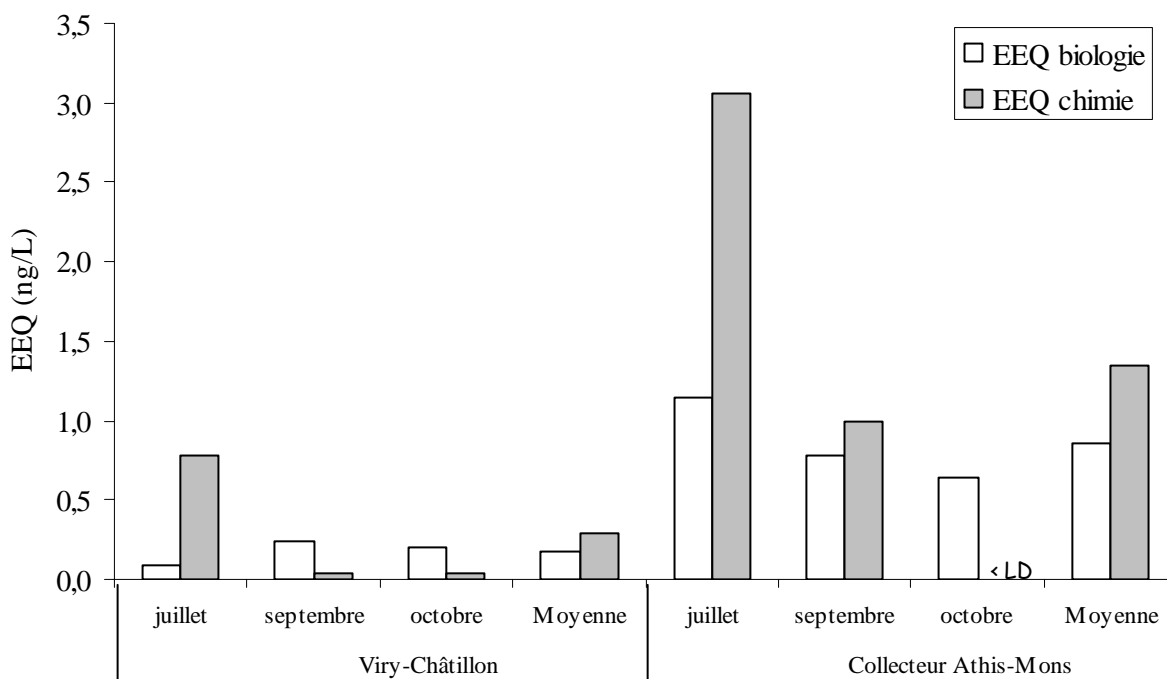


Figure 6 : comparaison des EEQ mesurés en biologie (EEQ biologie) avec les EEQ estimés par analyse chimique d'estrogènes (EEQ chimie) pour les 3 dernières campagnes Orge de 2009.

Tableau 2 : comparaison des EEQ mesurés en biologie (EEQ biologie) avec les EEQ estimés par analyse chimique d'estrogènes (EEQ chimie) pour les 3 dernières campagnes Orge de 2009.

Campagne (2009)	juillet			septembre			octobre		
	activité mesurée	activité estimée	estimée/mesurée	activité mesurée	activité estimée	estimée/mesurée	activité mesurée	activité estimée	estimée/mesurée
Viry-Châtillon	0,09	0,78	8,90	0,24	0,04	0,17	0,20	0,04	0,18
Collecteur Athis-Mons	1,15	3,06	2,67	0,78	0,99	1,26	0,64	< LD	ND

Campagnes Axe Seine 2009 (figure 7 et tableau 3) :

Pour les campagnes Axe Seine 2009, les EEQ estimés en chimie et les EEQ mesurés en biologie sont mieux corrélés que pour les campagnes Orge 2009, et ceci que les résultats soient comparés par campagne ou en moyenne pour chaque site. Cette corrélation semble d'autant plus évidente pour les EEQ biologie élevés. Aucun estrogène n'a été retrouvé dans Marnay, ce qui est cohérent avec l'absence d'activité estrogénique pour les eaux de ce site. EE2 et α E2 n'ont été retrouvés dans aucun échantillon. Par contre, E1 a été quantifié dans tous les échantillons (entre 0,5 et 1,5 ng/L), ce qui confirme la présence de ce composé dans les eaux de surface comme déjà observé dans les campagnes Orge. L'activité biologique observée à Triel peut être expliquée en partie par la présence de E3 (2,9 ng/L). Enfin, les fortes activités estrogéniques observées lors de la campagne de mai peuvent être expliquées en grande majorité par la présence de β E2 dans les échantillons de Villeneuve St Georges (4 ng/L), Epinay (1,5 ng/L) et Triel (2,10 ng/L), avec une bonne corrélation chimie/biologie.

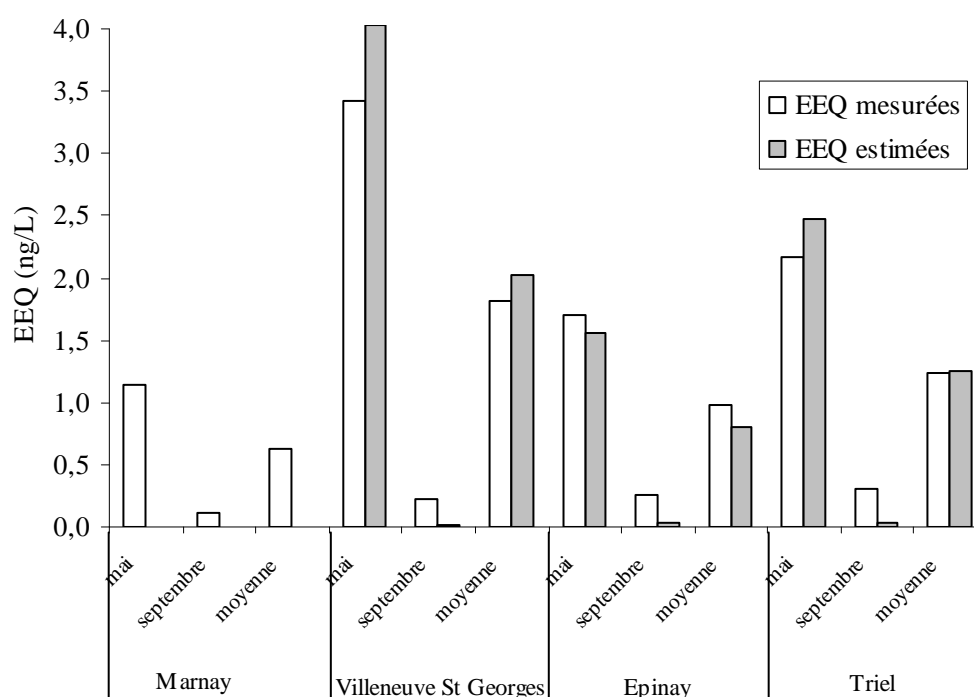


Figure 7 : comparaison des EEQ mesurés en biologie (EEQ biologie) avec les EEQ estimés par analyse chimique d'estrogènes (EEQ chimie) pour les 2 campagnes Axe Seine de 2009.

Tableau 3 : comparaison des EEQ mesurés en biologie (EEQ biologie) avec les EEQ estimés par analyse chimique d'estrogènes (EEQ chimie) pour les 2 campagnes Axe Seine de 2009.

Campagnes (2009)		mai			septembre		
		activité mesurée	activité estimée	estimée/ mesurée	activité mesurée	activité estimée	estimée/ mesurée
	Marnay	1,15	< LQ	ND	0,11	<LD	ND
	Villeneuve St Georges	3,42	4,03	1,18	0,22	0,02	0,09
	Epinay	1,70	1,56	0,92	0,26	0,04	0,14
	Triel	2,16	2,47	1,14	0,30	0,04	0,15

4. Conclusion - perspectives

Les résultats de ces deux études confirment que seules les eaux usées présentent un potentiel perturbateur thyroïdien quantifiable, aucune activité n'ayant pu être observée dans les eaux de surface. Par contre, une activité estrogénique est retrouvée dans les eaux usées et également dans la majorité des eaux de surface.

Les deux approches, spécifique / chimique et globale / biologique, présentent des résultats convergents, plutôt au niveau des teneurs en β E2. Aucune corrélation franche n'est cependant démontrée, ce qui pourrait s'expliquer par la présence, dans les échantillons testés, de composés autres que les estrogènes susceptibles d'engendrer des effets perturbateurs estrogéniques.

A ce propos, ces résultats seront corrélés avec des mesures de flux de contaminants, autres que les estrogènes, réalisées par d'autres équipes (UMR Sisyphe, le LEESU du Cereve) sur les mêmes campagnes de prélèvement au niveau du bassin versant de l'Orge et de l'Axe Seine.

En perspective, il serait intéressant d'étudier les effets PE induits par les eaux de pluie et de ruissellement, qui s'expliqueraient aussi par d'autres contaminants que les hormones estrogéniques, comme par exemple les alkyphénols et polybromodiphényléthers. Dans cette optique, ces campagnes Orge et Axe Seine seront complétées en 2010 par des prélèvements réalisés par temps humide.

Par ailleurs, une autre approche pour caractériser les effets PE au niveau du compartiment aquatique serait de corréler la mesure de biomarqueurs d'exposition chronique à des PE dans des espèces aquatiques, telles que les poissons, à la contamination de ces espèces par des composés PE.

Remerciements : nous remercions le SIAAP pour les prélèvements d'eaux usées à Athis-Mons

Références bibliographiques :

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

Jugan M.L., Levy-Bimbot M., Pomerance M., Tamisier-Karolak S., Blondeau J.P. and Levi Y. (2007) A new bioluminescent cellular assay to measure the transcriptional effects of chemicals that modulate the alpha-1 thyroid hormone receptor. *Toxicology In Vitro* 21(6) 1197-1205.

Jugan M.L., Oziol L., Bimbot M., Huteau V., Tamisier-Karolak S., Blondeau J.P. and Levi, Y. (2009) *In vitro* assessment of thyroid and estrogenic endocrine disruptors in WWTPs, rivers and drinking water supplies in the great Paris (France). *The Science of the Total Environment* 407(11)3579-87.

Miège C., S Karolak S., Gabet V., Jugan M.L., Oziol L., Chevreuil M., Levi Y. and Coquery M. (2009) Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters: combination of chemical and biological analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 28 (2) 186-195.