



HAL
open science

Évaluation in vitro et in vivo des perturbateurs endocriniens chez le poisson zèbre : cas de substances seules et en mélanges

Hélène Serra

► **To cite this version:**

Hélène Serra. Évaluation in vitro et in vivo des perturbateurs endocriniens chez le poisson zèbre : cas de substances seules et en mélanges. Chimie analytique. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0744 . tel-01677239

HAL Id: tel-01677239

<https://theses.hal.science/tel-01677239>

Submitted on 8 Jan 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES
SPÉCIALITÉ : CHIMIE ANALYTIQUE ET ENVIRONNEMENTALE*

Par Hélène SERRA

Soutenue le 21 novembre 2017

ÉVALUATION *IN VITRO* ET *IN VIVO* DES PERTURBATEURS ENDOCRINIENS CHEZ LE POISSON ZÈBRE : CAS DE SUBSTANCES SEULES ET EN MÉLANGES

Membres du jury :

Mme BAUDRIMONT, Magalie	Professeur, Université de Bordeaux	Présidente du jury
M. NAVAS, José-Maria	Directeur de recherche, INIA, Madrid	Rapporteur
M. LEVI, Yves	Professeur, Université Paris Sud	Rapporteur
Mme BERNARD, Cécile	Professeur, MNHN	Examineur
M. PERCEVAL, Olivier	Chargé de mission écotoxicologie, AFB	Examineur
Mme BUDZINSKI, Hélène	Directrice de recherche CNRS, Université de Bordeaux	Directrice de thèse
M. AÏT-AÏSSA, Selim	Chargé de recherche, INERIS	Encadrant de thèse

Titre : Evaluation *in vitro* et *in vivo* des perturbateurs endocriniens chez le poisson zèbre : cas des substances seules et en mélanges

Résumé

L'objectif de ce travail de thèse est d'évaluer le potentiel de nouveaux bio-essais *in vitro* et *in vivo* basés sur le poisson zèbre pour la biosurveillance de la contamination chimique de l'eau par les xeno-estrogènes. Pour cela, les bio-essais ont été appliqués pour évaluer les effets de polluants aquatiques environnementaux seuls, mais aussi en mélanges simples (reconstitués) et complexes (échantillons environnementaux). L'évaluation d'échantillons d'eau à travers les bio-essais *in vitro* humain (MELN) et poisson zèbre (ZELH-zfER β 2) a montré des différences qualitatives et quantitatives de réponse, non expliquées par les molécules estrogéniques détectées. Afin de mieux comprendre ces différences, l'activité de polluants aquatiques a été caractérisée sur les différents modèles, individuellement et au sein de mélanges de 2 à 12 polluants, combinant molécules estrogéniques et non estrogéniques pour simuler des situations environnementales. Les résultats obtenus montrent que les bio-essais basés sur le poisson zèbre répondent différemment, et parfois de manière opposée, au modèle humain MELN aux mélanges reconstitués. Ces différences s'expliquent par des sensibilités différentes à certaines molécules entraînant des interactions avec la réponse aux xeno-œstrogènes spécifiques à chaque modèle biologique. Dans son ensemble, ce travail montre que les particularités biologiques de chaque bio-essai peuvent influencer la réponse des xeno-estrogènes quand présents au sein de mélange avec d'autres polluants. Ces résultats sont discutés au regard de l'utilisation de bio-essais dans l'évaluation de la contamination chimique des masses d'eau.

Mots clés : xeno-estrogènes, poisson zèbre, mélanges, bio-surveillance, activité estrogénique, échantillons environnementaux

Title: *In vitro* and *in vivo* assessment of endocrine disrupting chemicals in zebrafish: the case of aquatic contaminants alone and in mixtures

Abstract

This PhD thesis aims at assessing the potential of innovative *in vitro* and *in vivo* zebrafish-based bioassays for biomonitoring of surface water contamination by xeno-estrogens. For this purpose, the bioassays were applied to assess the effect of environmentally relevant surface water pollutants, alone and in simple (artificial) and complex (environmental samples) mixtures. The screening of surface water samples in zebrafish- (ZELH-zfER β 2 cells) and human-based (MELN cells) bioassays revealed qualitative and quantitative differences which could not be entirely explained by the xeno-estrogens identified. To better understand the response of bioassays to complex environmental mixtures, the activity of environmentally relevant surface water pollutants was characterized across the bioassays, alone and in 2 to 12-component mixtures combining estrogenic and non-estrogenic chemicals to simulate an environmental contamination. The results indicate that zebrafish-based bioassays have a different and even in some cases an opposite response to the simple mixtures compared with the human-based bioassay MELN. These differences are explained by different sensitivity to some pollutants leading to bioassay-specific interactions with estrogen receptor activation. Altogether, this work shows that the biological particularities of each bioassay can influence the response to estrogenic chemicals when mixed with other environmental pollutants, opening the discussion regarding their implementation in chemical water biomonitoring.

Key words: xeno-estrogens, zebrafish, mixtures, bio-monitoring, estrogenic activity, environmental samples

Unités de recherche/Research Units

INERIS- Unité d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo* (DRC/VIVA/ECOT)
Rue Jacques Taffanel, 60550 Verneuil-en-Halatte

Université de Bordeaux - EPOC, UMR 5805 CNRS, LPTC
351, Cours de la Libération, 33405 Talence, France

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier tous les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ces trois années de travail : M. Levi et M. Navas, en tant que rapporteur, ainsi que Mme Baudrimont, Mme Bernard, et M. Perceval. Merci à Hélène Budzinski d'avoir accepté de superviser la thèse. Malgré la distance, les échanges ont toujours été enrichissants et ont significativement contribué à faire aboutir ce travail. Merci à Selim et François, de m'avoir encadré au quotidien, de m'avoir supporté (dans les deux sens du terme), et de ne pas avoir baissé les bras dans les moments difficiles. Merci de m'avoir initié et formé dans vos domaines respectifs de compétence - so zebrafish ! - et de m'avoir permis de vous accompagner aux réunions du projet européen, c'était une expérience super intéressante ! Un grand merci en particulier à Selim pour ton temps et ta patience pour me former à la culture cellulaire. Merci pour tes conseils au cours de ces trois années, j'espère en avoir fait et en faire bon usage...

Je tiens aussi à remercier M. Thybaud et M. Porcher de m'avoir accueilli au sein de l'unité ECOT, ainsi que M. Geffard, M. Perceval, M. Gonzalez et M. Beaudouin d'avoir participé aux comités de pilotage. Un grand merci à Patrice Gonzalez pour m'avoir accueilli dans son équipe et pour m'avoir fait découvrir, avec Cerise, la PCR. Je garderai un très bon souvenir de ces 4 semaines à la station marine d'Arcachon.

Trois années et beaucoup de rencontres ! Tout d'abord, merci à Manu pour ton dynamisme et ta bonne humeur au quotidien, c'était un plaisir de travailler avec toi et regardes, il fait beau aujourd'hui. A toutes les idées cuisines, les recettes, Wilson et les petites histoires qui ont rendu les heures passées au labo toujours très chaleureuses. A Daniel et tes blagues, tes citations (« Leonco, 2017 »), tes ancêtres les esclaves, le foot le mercredi midi (en collants !), Manchester, Fécamp, le stade de France, et j'en oublie sûrement. A Younes, le papa'pinoche des cyclopinoches, roi de la FIV qui fait pousser des pièces de deux euros dans ma voiture. A ces séances Freelytics, ces petits gâteaux délicieux et ce couscous qu'on attend toujours. A Adrien et tes origamis, ta passion pour ce doux breuvage à base de houblon, ton talent de pâtissier, les vides grenier, ta voiture qui s'entend à dix km, et ta gentillesse (à part pour les gerbilles !). Deep, à ces années terminées et commencées ensemble à Paris et à Bruxelles, et tous ces petits moments à papoter, ces journées à Bordeaux et ton soutien pendant la thèse. A Vincent, super dynamique co-fondateur du club des doctorants, si si ! Quelle idée folle on a eu de lancer ce club !! On aura réussi

des petites choses, et c'était une belle aventure, en espérant que le flambeau passera aux générations futures. A Nihal, merci d'avoir cru autant au club des doctorants et d'avoir si souvent contribué à le faire vivre. A Clémentine, et tous ses petits dessins et jeux de mots. A Grazia, pour ta bonne humeur et ton bon esprit combatif, pour ces soirées passées ensemble. A Audrey, pour ton dynamisme, ton envie, et ces discussions enjouées sur la bière, Jack, Daniels, Tequila et Margarita (nos rongeurs préférés) sans oublier les soirées piscine. A Elodie, ton enthousiasme au labo restera un exemple. A Betty, pour ta bonne humeur et ton rire. A Morgane, pour ton dynamisme, ta clairvoyance et gentillesse, pour les séances de sport vernoliennes, ce château qu'on a jamais trouvé et cette mythique soirée à Beauvais. A Valentin pour ton humour acide (de « ta génération » je suppose) et ton accent belge. Et à tous ceux que je n'oublie pas : Nico, Hakim, Louis, Manoj, Fanny, Clémence, Maxime, Marie, Thomas, Soafara, Anitha, Francesco, Youngchang...

A toute l'équipe ECOT pour sa bonne humeur et convivialité : Edith, Nathalie, Benjamin, Sandrine (« intéressant, c'est très intéressant ! »), Cyril, Olivier, Anne et Patrick (et les garçons). A tous les gars du foot (et à Alexandra) pour les mercredi midi sur le terrain et pour ces trois tournois vaillamment défendus, et à René, sportif inépuisable. Merci à Juste pour toutes ces discussions, ton enthousiasme et ton aide à faire sortir de terre ce projet de jeux. Merci à John, pour son indéfectible soutien et ses conseils précieux depuis toutes ces années qui aboutissent enfin. Et un grand merci à ma famille, d'avoir vécu (et survécu) trois années rythmées par le poisson zèbre et les hormones sans en être perturbé, et de m'avoir soutenu et accompagné jusqu'à aujourd'hui.

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX	I
LISTE DES FIGURES	II
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	III
PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS.....	IV
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
A. SYSTEME ENDOCRINIEN ET VOIE DES ESTROGENES	8
1. <i>Le système endocrinien</i>	8
2. <i>Les récepteurs des estrogènes</i>	11
3. <i>Exemples de gènes ER-régulés</i>	21
B. EVALUATION DES XENO-ESTROGENES	25
1. <i>Xeno-estrogènes environnementaux</i>	25
2. <i>Bio-essais et activité estrogénique</i>	26
3. <i>Evaluation des xeno-estrogènes en mélange</i>	36
C. BIO-SURVEILLANCE DES XENO-ESTROGENES DANS L'ENVIRONNEMENT	42
1. <i>Surveillance de l'eau en France</i>	42
2. <i>Stratégie de bio-analyse pour évaluer les xeno-estrogènes</i>	46
3. <i>Conclusions et défis</i>	53
DEMARCHE EXPERIMENTALE.....	55
A. OBJECTIF.....	56
B. LE PROJET SOLUTIONS	57
1. <i>Présentation</i>	57
2. <i>Implications dans le cadre de la thèse</i>	58
C. METHODOLOGIE.....	61
1. <i>Modèles cellulaires in vitro</i>	61
2. <i>Modèle in vivo : le test EASZY</i>	63
3. <i>Sensibilité des bio-essais</i>	64
4. <i>Analyse des données</i>	65
RESULTATS.....	67
A. LES BIO-ESSAIS DANS LA BIO-SURVEILLANCE : APPORTS ET BESOINS	68
1. <i>Article n°1: "Linking in vitro effects and detected organic micropollutants in surface water using mixture toxicity modelling"</i>	68
B. RENSEIGNER L'ACTIVITE DE POLLUANTS ENVIRONNEMENTAUX.....	81
1. <i>Article n°2: "Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water"</i>	81

2.	<i>Article n°3: "Lack of (anti)estrogenicity of triclosan in zebrafish in vitro and in vivo reporter gene assay"</i>	103
C.	EVALUER LES XENO-ESTROGENES EN MELANGES AVEC DES POLLUANTS ENVIRONNEMENTAUX.....	119
1.	<i>Article n°4: "Interference between AhR and ER signalling pathways in human in vitro and zebrafish in vitro and in vivo bioassays used for estrogenicity monitoring"</i> 119	
2.	<i>Article n°5: "Different responses of in vitro zebrafish- and human-based estrogenicity bioassays to selected environmental contaminants and their mixtures"</i> 151	
D.	COMPARAISON DES BIO-ESSAIS EN REPONSE A DES ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX	189
1.	<i>Article n°6: "Comparing zebrafish- and human-based bioassays for estrogenicity screening of river water samples: the Danube as a case-study"</i>	189
	DISCUSSION GÉNÉRALE	217
	CONCLUSION GÉNÉRALE	227
	REFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	229
	ANNEXE	253

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Exemples de ligands environnementaux de ER et de leur occurrence dans les eaux de surface.....	25
Tableau II: Exemples et principales caractéristiques de lignées cellulaires à gènes rapporteurs développées pour évaluer l'activation de ER chez l'Homme et les poissons	29
Tableau III: Exemples et caractéristiques principales de lignées de poissons transgéniques développées pour évaluer les xeno-estrogènes..	34
Tableau IV: Sensibilité des principales lignées de poissons transgéniques aux composés estrogéniques	35
Tableau V: Avantages et inconvénients des bio-essais et de l'analyse chimique ciblée	46
Tableau VI: Exemples d'études évaluant l'activité oestrogénique d'effluents de stations d'épuration urbaine.....	49
Tableau VII: Exemples d'études évaluant l'activité estrogénique d'échantillons ponctuels d'eau de surface à travers le monde.....	50
Tableau VIII: Caractéristiques principales des cas d'étude du Danube et de Novi Sad	59
Tableau IX: Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées dans le cadre de la thèse	61
Tableau X: Sensibilité des bio-essais à l'estradiol (E2) et à l'ethinyl estradiol (EE2)..	64
Tableau XI: Résultats du criblage de 34 molécules sur les bio-essais MELN, ZELH α , ZELH β 2, ZELH, PXR et dans le test EASZY..	84
Tableau XII: Méthodes utilisées pour dériver des valeurs seuils d'activité oestrogénique pour les échantillons environnementaux.	225
Tableau XIII : Bio-essais in vitro et in vivo utilisés dans l'étude sur les mélanges reconstitués.	254
Tableau XIV: 12 composés choisis pour les mélanges reconstitués.	255
Tableau XV : Ratios utilisés pour la réalisation des mélanges M1 et M2, et bio-essais susceptibles de capturer les effets de chaque composé.....	255

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Steroïdogénèse chez le poisson	9
Figure 2: Régulation hormonale de la gamétogenèse chez les poissons femelles.....	10
Figure 3: Structure générale des récepteurs nucléaires.....	12
Figure 4: Signalisation des estrogènes : voie d'activation génomique et non génomique.. ..	13
Figure 5: Arbre phylogénétique du récepteur ER α chez les poissons téléostéens	15
Figure 6: Analyse des identités de séquence entre les domaines des récepteurs ER du poisson zèbre et de l'Homme pour les régions codantes	16
Figure 7: Exemples type de profils de réponse de ligands de ER.....	17
Figure 8: Possibles mécanismes d'interaction entre les voies de signalisation de ER et AhR.	20
Figure 9: Exemples d'essais in vitro et in vivo pour évaluer les molécules estrogéniques chez les mammifères et les poissons.....	26
Figure 10: Principe d'un test de transactivation avec gène rapporteur basé sur l'utilisation de la luciférase pour évaluer l'activité d'une molécule.....	28
Figure 11: exemples de réponse des sous-types de zFER à des xeno-estrogènes dans différentes lignées cellulaires.....	31
Figure 12: Principe de l'évaluation de l'état des masses d'eau de surface dans le cadre de la DCE en France	43
Figure 13: Principe général de la bio-analyse.	47
Figure 14: Démarche expérimentale de la thèse	56
Figure 15: Représentation schématique de la structuration du projet européen SOLUTIONS.	57
Figure 16: Démarche du work package de SOLUTIONS dédiés aux bio-essais.....	58
Figure 17 : Sites échantillonnés (points rouges) dans le cadre de la JDS3	60
Figure 18: Représentation schématique de l'évaluation de l'activité d'une molécule dans les tests in vitro.	61
Figure 19: représentation schématique du test EASZY pour évaluer l'estrogénicité de molécules. 64	
Figure 20: Principe du calcul d'équivalents biologique (Bio-TEQ) et chimique (Chem-TEQ) pour évaluer l'activité estrogénique d'un échantillon environnemental.	66
Figure 21: Comparaison de l'activité estrogénique d'extraits d'eaux de surface sur les cellules ZELH β 2 et MELN.	222

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor	GFP	Green fluorescent proteine
ARNT	Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator	GPGR	Récepteur des estrogènes couplé à une protéine G
4-n-NP	4-n-nonylphenol	HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
17β-HSD	17β-hydroxystéroïde deshydrogénase	hpf	Heures post fécondation
AroB	Aromatase B	IA	Independent Action
BaP	Benzo(a)pyrene	jpf	Jours post fécondation
BbF	Benzo(b)fluoranthène	Kd	Constante de dissociation
Bio-TEQ	Equivalent Toxique Biologique	LBD	Ligand Binding Domain
BPA	Bisphénol A	LUC	Luciférase
CA	Concentration Addition	LVSPE	Large Volume Solid Phase Extraction
Chem-TEQ	Equivalent Toxique Chimique	MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
ChgH/L	Choriogenine H/L	MCF-7	Lignée cellulaire de cancer du sein (Michigan Cancer Foundation-7)
CYP450	Cytochrome P450	MELN	MCF7- ERE-Luc-Neomycin
DBD	DNA Binding Domain	OCDE	Organisation pour la Coopération Economique et pour le Développement
DCE	Directive Cadre sur l'Eau	PE	Pertrubateur endocrinien
DHP	Dihydroprogesterone	PG	Prostaglandine
DSMO	Dimethylsulfovide	PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
E1	Estrone	REP	Relative potency
E2	17β-Estradiol	TA	Transactivation Assay
E2-Eq	Estradiol Equivalent	TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin
ECHA	European Chemicals Agency	TCS	Triclosan
ECx	Concentration efficace induisant X% de réponse	TEQ	Equivalent Toxique
EDC	Endocrine Disrupting chemicals	TF	Transcription Factor
EE2	17α-Ethinyl Estradiol	TPP	Triphenylphosphate
ER	Récepteur des estrogènes	VTG	Vitellogenine
ERE	Estrogen Response Element	YES	Yeast Estrogen Screen
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase	ZELH	ZFL-ERE-Luc-Hygromycin
ES	Effect Summation	ZFL	Lignée de cellules de foie de poisson zèbre (zebrafish liver)
FDA	Food and Drug Organisation		

PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS

➤ Articles publiés

P. Neale, S. Ait-Aïssa, W. Brack, N. Creusot, M. Denison, B. Deutschmann, K. Hilscherová, H. Hollert, M. Krauss, J. Novák, T. Schulze, T-B. Seiler, **H. Serra**, Y. Shao, B. Escher (2015). *Linking in vitro effects and detected organic micropollutants in surface water using mixture toxicity modeling*. Environ. Sci. Technol., 49 (24), pp 14614–14624 **(article n°1)**

P. Neale, R. Altenburger, S. Aït-Aïssa, F. Brion, W. Busch, G. Umbuzeiro, M. Denison, D. Du Pasquier, K. Hilscherová, H. Hollert, D. A. Morales, J. Novák, R. Schlichting, T-B. Seiler, **H. Serra**, Y. Shao, A. Tindall, KE Tollefsen, T. Williams, B. Escher. (2017) *Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water*. Water Res. 123, 734–750. doi:10.1016/j.watres.2017.07.016 **(article n°2)**

➤ Articles en préparation

H. Serra, F. Brion, H. Budzinski, S. Aït-Aïssa. *Lack of (anti)estrogenicity of triclosan in zebrafish ER reporter gene bioassays in vitro and in vivo*. (en préparation) **(article n°3)**

H. Serra, F. Brion, H. Budzinski, G. Daffe, P. Gonzalez, S. Aït-Aïssa. *Interference between AhR and ER signalling pathways in human in vitro and zebrafish in vitro and in vivo bioassays used for estrogenicity monitoring*. (en préparation) **(article n°4)**

H. Serra, M. Scholze, R. Altenburger, W. Busch, H. Budzinski, F. Brion, S. Aït-Aïssa. *Different responses of in vitro zebrafish- and human-based estrogenicity bioassays to selected environmental contaminants and their mixtures*. (en préparation) **(article n°5)**

H. Serra, F. Brion, H. Budzinski, T. Schulze, W. Brack, S. Aït-Aïssa. *Comparing zebrafish- and human-based bioassays for estrogenicity screening of river water samples: the Danube as a case-study*. (en préparation) **(article n°6)**

R. Altenburger *et al.* *Mixture response in complex contaminated samples: an inlaboratory comparative study using effect based methods* (en préparation)

➤ Conférences nationales & internationales

H. Serra, F. Brion, H. Budzinski, M. Scholze, R. Altenburger, S. Aït-Aïssa. *Comparaison de la réponse de lignées cellulaires humaine et de poisson zèbre utilisées pour évaluer l'estrogénicité de polluants émergents seuls et en mélanges reconstitués*. Colloque de la SEFA 2017, 29-30 juin, Lille, France (communication orale)

H. Serra, F. Brion, M. Scholze, W. Busch, R. Altenburger, S. Aït-Aïssa. *Different responses of zebrafish and human-based estrogenicity bioassays to selected environmental contaminants and their mixtures*. Europe SETAC 2017, 7-11 mai, Bruxelles, Belgique (communication orale)

H. Serra, H. Budzinski, F. Brion, S. Aït-Aïssa. *Investigation of (anti)estrogenicity of triclosan using in vitro and in vivo zebrafish bioassays*. Europe SETAC 2016, 22-26 mai, Nantes, France (poster)

H. Serra, M. Sonavane, H. Budzinski, F. Brion, S. Aït-Aïssa. *Evidence of crosstalk between AhR and ER pathways in human and zebrafish reporter cell lines used for estrogenicity screening*. 2nd Workshop PNRPE, 21-22 janvier 2016, Paris, France (Poster)

H. Serra, F. Brion, N. Creusot, J.M. Porcher, N. Munz, J. Hollender, T. Schulze, M. Krauss, W. Brack and S. Aït-Aïssa. *An integrated assessment of estrogenicity of complex environmental samples using in vivo and in vitro effect-based tools*. Europe SETAC 2015, 3-7 mai 2015, Barcelone, Espagne (Poster)

P. Neale, R. Altenburger, S. Aït-Aïssa, F. Brion, W. Busch, G. Umbuzeiro, M. Denison, D. Du Pasquier, K. Hilscherová, H. Hollert, D. A. Morales, J. Novák, R. Schlichting, T-B. Seiler, **H. Serra**, Y. Shao, A. Tindall, KE Tollefsen, T. Williams, B. Escher. (2017) *Fingerprinting the effects of individual micropollutants in a bioanalytical test battery developed for water quality monitoring*. SETAC Australasia 2017, 4-6 September 2017, Gold Coast, Australie (communication orale)

P. Neale, S. Ait-Aïssa, W. Brack, N. Creusot, M. Denison, B. Deutschmann, K. Hilscherová, H. Hollert, M. Krauss, J. Novák, T. Schulze, T-B. Seiler, **H. Serra**, Y. Shao, B. Escher. *Applying mixture toxicity modelling to assess the contribution of detected chemicals to in vitro effects: An example from the Danube River*. Europe SETAC 2016, 22-26 mai 2016, Nantes, France (poster).

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Les eaux continentales constituent le réceptacle de quantité de composés chimiques provenant de diverses sources, rejets industriels, hospitaliers, d'effluents de station d'épuration ou encore de l'agriculture. Les progrès des dernières décennies en matière d'analyses chimiques, tant dans l'échantillonnage de matrices complexes que dans la détection et quantification de molécules en mélange à l'état de traces, ont permis de mettre en évidence l'étendue de la contamination chimique des eaux à travers le monde (Kolpin *et al.*, 2002; Loos *et al.*, 2009). La grande diversité des familles de composés retrouvés dans le milieu aquatique (ex : pesticides, médicaments, produits d'hygiène) soulève la question du devenir et des effets de ces molécules une fois dans le compartiment aquatique et, en conséquence, du risque auquel sont exposées les espèces aquatiques.

La présence de perturbateurs endocriniens (PE) dans l'environnement aquatique, tels que les alkylphénols, bisphénols, pesticides ou les dérivés hormonaux, a fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières décennies (Sumpter and Jobling, 2013). Les PE peuvent être définis comme « des substances exogènes qui provoquent des effets néfastes sur la santé d'un organisme ou de sa descendance, secondairement à des changements dans la fonction endocrine » (WHO 2002). Dans le compartiment aquatique, les poissons sont parmi les organismes les plus sensibles aux PE (Sumpter et Johnson, 2008). Des cas d'intersexes (apparition d'oocytes dans les gonades mâles, ou inversement) ont été reportés sur des poissons sauvages, comme des goujons pêchés en aval d'un effluent d'une industrie pharmaceutique (Sanchez *et al.*, 2011), ou des gardons vivants à proximité de rejets de stations d'épuration (Jobling *et al.*, 1998). Dans le cas des gardons, la présence d'intersexe était associée à une diminution de la fertilité des mâles (Jobling *et al.*, 2002).

Les PE agissent sur le système endocrinien via de multiples mécanismes d'action, parmi lesquels l'interaction avec la voie de signalisation des estrogènes est particulièrement bien documentée chez les poissons (Mills and Chichester, 2005). Les estrogènes jouent un rôle essentiel dans les processus physiologiques fondamentaux tels que la croissance, le développement et la reproduction (Segner *et al.*, 2013). De nombreuses études en laboratoire ont montré que l'exposition chronique à de très faibles concentrations d'estradiol (E2) ou d'éthinyl estradiol (EE2) pouvait impacter négativement les fonctions gonadiques et altérer la fécondité, fertilité et succès reproducteur des poissons (review dans Caldwell *et al.*, 2012). Dans un lac expérimental canadien,

des concentrations aussi faibles que 4 à 6 ng/L d'EE2 ont suffi pour entraîner la féminisation des mâles, puis l'échec de la reproduction de vairons à tête de boules menant à la quasi extinction de la population après seulement deux saisons d'exposition (Kidd *et al.*, 2007).

En Europe, la protection de l'écosystème aquatique est réglementée par la Directive Cadre sur l'Eau (DCE). Adoptée en 2000 (2000/60/CE) puis amendée en 2008 (2008/105/EC) et 2013 (2013/39/EC), la DCE a pour objectif d'atteindre et de maintenir un bon état des masses d'eaux en Europe. La DCE requiert une évaluation régulière des rivières via la détermination des statuts écologique et chimique des eaux. Alors que le statut écologique donne une information très intégrative d'un ensemble de stress (biotiques et abiotiques) auxquels sont exposés les organismes, le statut chimique est déterminé sur la base d'une liste très restreinte de 45 molécules dites prioritaires. A l'occasion de la dernière révision de la DCE, une liste de surveillance a été créée avec pour objectif d'obtenir plus d'informations sur la présence dans l'environnement aquatique de molécules préoccupantes pour lesquelles les données de monitoring à l'échelle de l'Europe sont manquantes ou de qualité insuffisante (Commission Implementing Decision (EU) 2015/495). L'EE2 et l'E2 (ainsi que son principal produit de dégradation l'estrone) font partie des dix molécules inscrites sur cette liste pour le danger potentiel qu'elles présentent.

Alors que l'évaluation réglementaire de la qualité chimique de l'eau ne porte que sur une liste restreinte de molécules, l'écosystème aquatique est en fait contaminé par une multitude de molécules. Par conséquent, les organismes aquatiques sont exposés à des mélanges de composés, souvent inconnus (ex : produits de dégradation, métabolites, produits naturels) et susceptibles d'entraîner des effets biologiques conjointement, même à faibles concentrations (Carvalho *et al.*, 2014). Etant donnée l'étendue de la contamination chimique de l'environnement et des effets combinés potentiels de toutes ces molécules, la stratégie d'évaluation du risque substance par substance telle qu'elle est appliquée aujourd'hui au niveau réglementaire ne permet d'appréhender que très partiellement le risque auquel sont exposés les organismes aquatiques.

Depuis plusieurs années, l'implémentation d'approches complémentaires basées sur l'utilisation de bio-essais est préconisée au niveau européen afin de mieux prendre en considération les polluants émergents et les effets de mélange pour évaluer la qualité de l'eau (Vethaak *et al.*, 2017; Wernersson *et al.*, 2015). Les bio-essais (appelés aussi « effect-based tools »)

sont des tests biologiques permettant d'évaluer une réponse spécifique à différents niveaux d'organisation : cellule, l'organe, tissu ou organisme. Les paramètres mesurés peuvent être très spécifiques (ex : activation d'un récepteur) ou apicaux (ex : mortalité). Les bio-essais présentent l'avantage de prendre en compte les effets biologiques d'un mélange de polluants environnementaux, connus et inconnus. L'utilisation d'approches bio-analytiques combinant bio-essais et analyses chimiques s'est beaucoup développée au cours des dernières années, montrant la complémentarité des méthodes pour améliorer l'évaluation de la qualité des milieux (Brack *et al.*, 2016; Dévier *et al.*, 2011).

Aujourd'hui, les principaux bio-essais utilisés pour évaluer la présence de composés estrogéniques dans l'environnement sont des tests de transactivation *in vitro* basés sur l'utilisation de lignées cellulaires exprimant le récepteur des estrogènes humain (ER). Ces bio-essais sont sensibles, fiables, et robustes pour évaluer les composés estrogéniques en mélange et au sein d'échantillons environnementaux (Kunz *et al.*, 2017; Leusch *et al.*, 2017). Cependant, les récepteurs des estrogènes (ER) des poissons ont une sensibilité différente des ER de l'Homme pour certains composés estrogéniques environnementaux (Matthews *et al.*, 2000; Molina-Molina *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2014). De plus, chaque modèle biologique utilisé pour les bio-essais conserve des spécificités du tissu et de l'espèce d'origine (ex : cofacteurs de ER, métabolisme), susceptibles d'influencer la réponse aux composés estrogéniques (Routledge *et al.*, 2000).

De récentes études ont montré que des bio-essais *in vitro* basés sur le ER du poisson zèbre (Sonavane *et al.*, 2016) et du médaka (Ihara *et al.*, 2014) pouvaient répondre différemment que des bio-essais basés sur le récepteur ER α humain à des échantillons environnementaux, aussi bien quantitativement que qualitativement. Dans certaines situations, les réponses *in vitro* des récepteurs ER de poisson se corrélaient mieux avec les mesures *in vivo* chez le poisson que la réponse du bio-essai *in vitro* basé sur ER de l'Homme (Ihara *et al.*, 2015; Sonavane *et al.*, 2016a). Au regard des différences inter-espèces et des spécificités de réponse des bio-essais basés sur les ER de poisson, ces études soulèvent la question de l'adéquation des bio-essais *in vitro* basés sur l'Homme pour rendre compte de l'exposition aux molécules estrogéniques chez le poisson, taxon le plus sensible de l'écosystème aquatique à ces molécules.

La thèse s'inscrit dans une démarche d'évaluation de l'estrogénicité des eaux de surface à l'aide d'une approche bio-analytique basée sur des bio-essais *in vitro* et *in vivo* chez le modèle poisson zèbre. L'objectif général de ce travail de thèse vise à caractériser les réponses des bio-essais basés sur le poisson zèbre vis-à-vis de polluants aquatiques environnementaux soit seuls, soit en mélanges simples (reconstitués) et au sein d'échantillons environnementaux.

Cette thèse a été menée à l'INERIS, en collaboration avec l'UMR-EPOC (Université de Bordeaux), et en grande partie dans le cadre du projet européen FP7-SOLUTIONS. L'application des bio-essais au cas d'étude du projet (molécules prioritaires, mélanges reconstitués, études terrain) a permis de les inscrire dans une approche intégrée combinant de nombreux outils analytiques et bio-analytiques.

Le manuscrit s'organise en quatre grandes parties :

(1) une synthèse bibliographique présentant les principales caractéristiques du système endocrinien des vertébrés, en particulier les spécificités des poissons par rapport à l'Homme, ainsi que les bio-essais existant pour évaluer les composés estrogéniques et leurs applications dans une démarche de bio-surveillance ;

(2) une présentation des principaux objectifs du travail de thèse incluant une brève description du projet SOLUTIONS et de la démarche expérimentale mise en œuvre ;

(3) les résultats présentés sous forme d'articles et répartis dans 4 chapitres qui concernent (1) les acquis et limites actuelles de la bio-analyse d'échantillons complexes, (2) l'évaluation de l'estrogénicité de polluants environnementaux testés seuls et (3) en mélanges reconstitués, et enfin (4) une application à des échantillons environnementaux ;

(4) une discussion générale visant à replacer les résultats dans le contexte de la surveillance des milieux aquatiques.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

A. Système endocrinien et voie des estrogènes

Cette partie aborde la fonction endocrinienne dans son ensemble et la voie des estrogènes chez le poisson en particulier. Par la suite, le mode d'action des estrogènes via les récepteurs des estrogènes est décrit, avec en focalisant particulièrement sur les différences entre Homme et poissons. Enfin, deux exemples de gènes estrogéno-régulés codant pour protéines d'intérêt (la vitellogénine et l'aromatase B) sont présentés.

1. Le système endocrinien

Le système endocrinien est formé par un réseau d'organes (glandes) et d'hormones qui agissent de manière coordonnée pour maintenir l'homéostasie et contrôler de nombreuses fonctions comme le développement, la croissance ou la reproduction, en relation avec le système nerveux (Norris and Carr, 2013). Les glandes sécrètent des hormones qui peuvent soit agir localement (glandes autocrine et paracrine), soit à distance au niveau des organes effecteurs en étant véhiculées dans le sang par des protéines (glandes neurocrines et endocrines). Les hormones ont des précurseurs variés, comme les dérivés d'acides aminés (ex : mélatonine), des polypeptides (ex : insuline) et glycoprotéines (ex : hormone folliculo-stimulante), des dérivés du cholestérol (ex : hormones stéroïdiennes) ou des dérivés d'acides gras (ex : prostaglandines). Les niveaux circulants d'hormones sont contrôlés par un système complexe de rétrocontrôles, garantissant une action rapide, contrôlée et adaptée. La suite la synthèse porte sur la voie des estrogènes qui font partie des hormones stéroïdes.

1.1 Stéroïdogénèse

La stéroïdogénèse chez les poissons est présentée dans la figure 1 (adapté de Fernandino *et al.*, 2013). Les hormones stéroïdiennes sont synthétisées à partir du cholestérol, converti progressivement par de nombreuses enzymes en androgènes, progestagènes, corticoïdes et estrogènes. L'androstenedione et la testostérone (T), inter-convertibles par l'action de la 17 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (17 β -HSD), sont les précurseurs de l'estrone (E1) et du 17 β -estradiol (E2), respectivement. A la différence de l'Homme, le principal androgène chez le poisson

est la 11 Keto-Testostérone (11-KT) (Tokarz *et al.*, 2015). La testostérone est un précurseur commun de l'E2 et de la 11-KT (figure 1).

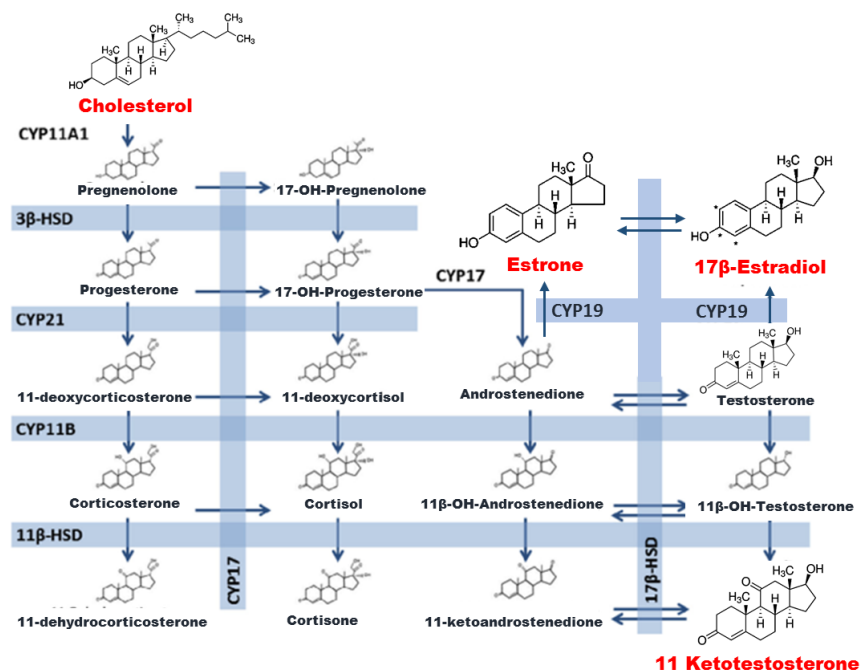


Figure 1: Stéroïdogénèse chez le poisson (adapté de Fernandino *et al.*, 2013).

La formation de stéroïdes en C18 (estrogènes) à partir de stéroïdes en C19 (androgènes) est réalisée par un complexe enzymatique comprenant l'aromatase (Diotel *et al.*, 2011). Cette enzyme, qui fait partie de la famille des cytochromes P450, est responsable de l'aromatation irréversible du cycle A des androgènes. A la différence de l'Homme, où il existe qu'un seul gène *cyp19* codant pour l'aromatase, il y a deux gènes distincts codant pour deux aromatases structurellement et fonctionnellement différentes chez le poisson : *cyp19a1a*, codant pour l'aromatase A (aroA) majoritairement exprimée dans les gonades, et le *cyp19a1b*, codant pour l'aromatase B (aroB) principalement exprimée dans le cerveau (Pellegrini *et al.*, 2005).

1.2 Hormones stéroïdes et reproduction

La reproduction est un processus physiologique coordonné par le système nerveux central et le système endocrinien, où les hormones stéroïdes jouent un rôle primordial chez les vertébrés (Norris et Carr, 2013). En réponse à des stimulus extérieurs (ex : changement de la photopériode ou de la température), toute une chaîne d'évènements est enclenchée, depuis des signaux

neuronaux jusqu'aux stimuli hormonaux, menant à la maturation, libération, et fécondation des gamètes.

Les principales étapes de l'oogenèse chez les poissons femelles sont présentées dans la figure 2 (adapté de Nagahama, 2002). En réponse à des stimuli extérieurs, des neurones en provenance de l'hypothalamus secrètent de la GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormones) au niveau de l'hypophyse qui stimule la production de FSH (hormone folliculo-stimulante) et de LH (luteinizing hormone) (Nagahama, 2002). L'oogenèse dans les ovaires est initiée par la FSH. Les cellules de la thèque, situées en périphérie du follicule grandissant, synthétisent de l'E2 grâce à l'aromatase A. Transporté par le sang, l'E2 agit au niveau du foie pour induire la production de choriogénines (stade pré-vitellogénique) puis de vitellogénines (oocytes vitellogéniques), qui sont incorporées dans le follicule pour former, respectivement, le chorion et le sac vitellin du futur embryon (Lubzens *et al.*, 2010). L'oocyte post-vitellogénique peut rester quiescent plusieurs mois jusqu'à stimulation par la LH de la production de dihydroprogesterone (DHP) par les cellules de granulosa du follicule, qui initie alors la maturation des oocytes. Une fois la maturation terminée, l'ovulation est déclenchée par action des prostaglandines (PG).

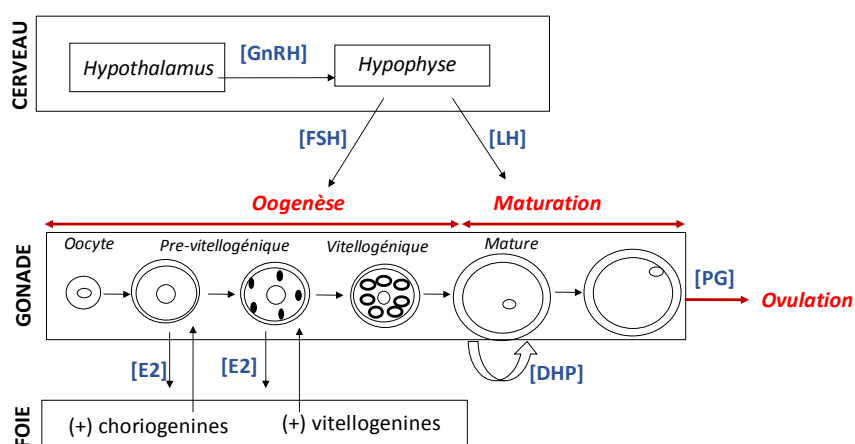


Figure 2: Régulation hormonale de la gamétogenèse chez les poissons femelles (d'après Nagahama 2002).

A la différence de l'oogenèse, la spermatogenèse chez les poissons mâles est principalement sous le contrôle de la FSH. Sous l'action de la FSH, les cellules de Leydig synthétisent de E2 et de 11 KT initiant la prolifération des spermatogonies par l'intermédiaire des cellules de Sertoli (Schulz *et al.*, 2010). Comme lors de l'oogenèse, la DHP contrôle la maturation

des spermatogonies, et serait sécrétée par les cellules souches et les cellules matures (Chen *et al.*, 2010).

1.3 Métabolisme et élimination

Après avoir agi, les hormones stéroïdes sont métabolisées par l'action conjointe des enzymes de phase I et de phase II qui augmentent leur polarité et facilitent leur élimination (Xu *et al.*, 2005). Les enzymes de phase I, dites de fonctionnalisation, catalysent des réactions simples comme des oxydations, des réductions, ou des hydrolyses. Elles regroupent essentiellement des enzymes de la famille des cytochromes P450 responsables d'oxydation et d'oxydo-réduction (Xu *et al.*, 2005). Les cytochromes P450 sont majoritairement régulés de manière transcriptionnelle par des récepteurs nucléaires, à l'instar du CYP1A et CYP3A inductibles, respectivement, par le récepteur AhR (« Aryl hydrocarbon receptor »), et par le récepteur PXR (« Pregnane X receptor ») (Denison and Nagy, 2003). Les enzymes de phase II, dites de conjugaison, transfèrent des groupements polaires, comme un groupement glucuronide (par des glucuronyl transferases, UGT), glutathion (glutathione-S-transferase, GST), ou sulfate (sulfo-transferase, SULT), pour faciliter leur élimination (James, 2011)

Il existe beaucoup de similitudes dans le métabolisme des hormones stéroïdes au sein des vertébrés (James, 2011; Sanderson and van, 2009). La métabolisation des stéroïdes s'effectue principalement dans le foie. L'estradiol, par exemple, est pris en charge par les CYP1A et CYP3A, ainsi que par les hydroxy-stéroïde déshydrogénases (Sanderson and van, 2009). Les métabolites glucuro- et sulfo-conjugués formés sont ensuite éliminés par des transporteurs tels que la P-gp (« P-glycoprotein ») et la MRP (« Multidrug-resistance Associated Protein »).

2. Les récepteurs des estrogènes

2.1 Structure et mode d'action

2.1.1 Généralités

Les récepteurs des estrogènes (ER) sont des récepteurs nucléaires qui font partie de la sous-famille III des récepteurs stéroïdiens, incluant les récepteurs des progestagènes, des

androgènes, des glucocorticoïdes, des minéralocorticoïdes et des estrogen-related receptors (Laudet, 1997). Il existe plusieurs sous-types de ER (α et β), qui peuvent différer en fonction des espèces (Matthews *et al.*, 2000; Tohyama *et al.*, 2016). Les récepteurs nucléaires sont des facteurs de transcription qui régulent l'expression de gènes cibles impliqués dans de grandes fonctions physiologiques comme la croissance, le développement ou la reproduction (Heldring *et al.*, 2007; Segner *et al.*, 2013).

2.1.2 Structure

La structure des récepteurs des estrogènes est présentée dans la figure 3. Les ER ont une organisation structurale commune aux récepteurs nucléaires qui comprend 6 régions appelées domaines (A, B, C, D, E, F) ayant chacun une fonction distincte.

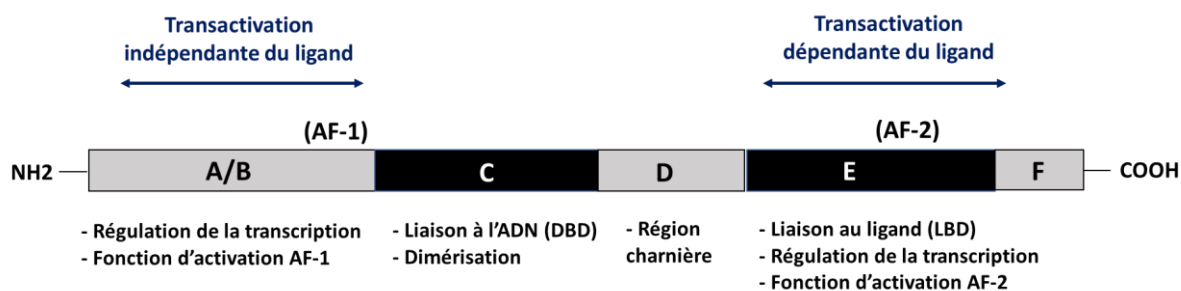


Figure 3: Structure générale des récepteurs nucléaires

Dans la région N-terminale se trouve le domaine A/B qui contient la fonction d'activation AF-1 indépendante du ligand. On y retrouve aussi des sites de phosphorylation (un motif serine-proline), cibles de la signalisation des MAPK (« mitogen-activated protein kinase »), permettant de réguler la transcription de gènes cibles indépendamment du ligand (Nelson and Habibi, 2013). Le domaine C contient le domaine de liaison à l'ADN (DBD pour DNA binding domain). Constitué de deux doigts de zinc, il permet au récepteur de se dimériser et de se lier à l'ADN en reconnaissant l'élément de réponse des estrogènes (ERE) constitué d'un motif palindromique 5'-AGGTCAxxxTGACCT-3'. Le domaine D est une région charnière qui contient un signal de localisation nucléaire masqué lorsque le récepteur inactif est lié aux protéines chaperonnes. De plus, cette région semble importante pour la conformation spatiale du récepteur (Heldring *et al.*, 2007). Le domaine E contient le domaine de liaison au ligand (Ligand Binding Domain, LBD)

composé de 12 hélices α formant une poche hydrophobe. Le domaine E contient aussi la fonction d'activation AF-2 dépendante du ligand capable d'interagir avec des cofacteurs et avec la fonction AF-1 pour réguler la transcription. Le région C-terminale, de petite taille et très variable, constitue le domaine F et jouerait un rôle dans l'action des anti-estrogènes (Nelson and Habibi, 2013).

2.1.3 Mode d'action

Les estrogènes peuvent agir via les différentes voies de signalisation représentées dans la figure 4: les voies génomiques ERE dépendante et ERE-indépendante, et les voies extra-génomiques (Heldring *et al.*, 2007).

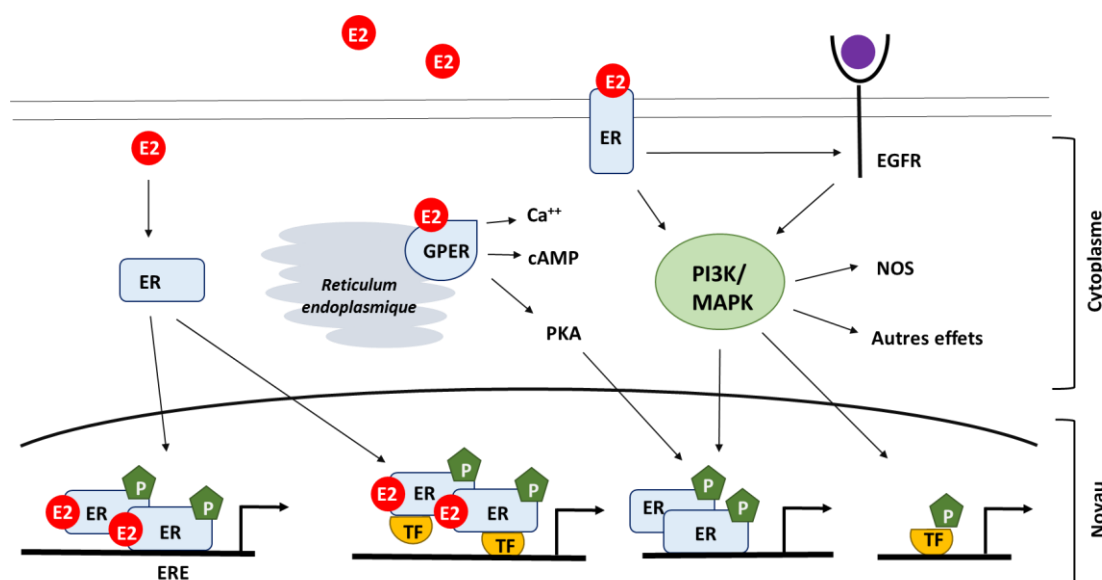


Figure 4: Signalisation des estrogènes : voie d'activation génomique et non génomique. P : phosphorylation, TF : facteur de transcription, E2 : 17 β -estradiol, EGFR : récepteur EGF, GPER : ER couplé à une protéine G, NOS : oxyde nitrique synthase, PKA : phospho-phospho-kinase A (adapté de Heldring *et al.*, 2007 et Prossnitz et Barton, 2005).

En l'absence de ligand, ER est associé à des protéines chaperonnes (« heat shock protein » HSP) et il est maintenu sous sa forme inactive dans le cytoplasme. La fixation du ligand entraîne un changement conformationnel du récepteur induisant la dissociation des protéines chaperonnes, la dimérisation du récepteur et laissant apparaître un site de fixation de cofacteurs. En fonction du ligand, le changement de conformation du récepteur favorise le recrutement de certains cofacteurs (coactivateurs/corépresseurs) qui induisent une réponse transcriptionnelle spécifique (Nelson and Habibi, 2013). Dans la voie génomique classique, le récepteur ER sous

forme d'homodimère activé se lie à l'ADN au niveau des séquences ERE situées dans les promoteurs de gènes cibles hormono-régulés. Cependant, chez l'Homme, un tiers des gènes régulés par ER ne contient pas de séquence ERE complète (Björnström and Sjöberg, 2005).

Dans la voie génomique non-ERE dépendante, les ER peuvent moduler la transcription de gènes en interagissant avec d'autres facteurs de transcription tels que Sp-1 (specific protein 1), ou le complexe AP-1 (activating protein 1) contenant un dimère c-jun et/ou c-fos (Heldring *et al.*, 2007). Les estrogènes peuvent aussi induire des actions rapides via les récepteurs ER membranaires en interagissant avec des récepteurs tyrosines kinases tels que les récepteurs de facteurs de croissance (EGF et IGF). D'autre part, il a été mis en évidence l'existence d'un récepteur membranaire couplé à une protéine G, le GPR30 (« G-protein-coupled estrogen receptor »), capable de lier l'E2 et d'induire des réponses cellulaires rapides (Prossnitz and Barton, 2011; Thomas *et al.*, 2005). L'activation des récepteurs membranaires induit des réponses rapides, telles que l'activation de la voie des MAPK et PI3K (phosphoinositide 3-kinase) et d'une cascade de réponses cytoplasmiques (Heldring *et al.*, 2007).

2.2 Spécificités des récepteurs des estrogènes chez le poisson

Cette partie traite des différences entre récepteurs des estrogènes ichtyens et humains en termes d'homologie de séquence, d'affinité et de réponse à l'E2.

2.2.1 Séquences des ER

L'existence des ER a été mise en évidence initialement par l'identification de ER α chez l'Homme, puis d'un deuxième sous-type, ER β , chez le rat (Kuiper *et al.*, 1996) et de nombreuses autres espèces (Matthews *et al.*, 2000). Chez l'Homme, les deux sous-types de ER, hER α et hER β , sont codés par deux gènes distincts, *esr1* et *esr2*. Chez les poissons téléostéens, un évènement de duplication du génome il y a environ 350 millions d'années serait responsable de l'apparition d'un autre sous-type de ER, orthologue de *esr2* (Tohyama *et al.*, 2016). Chez les salmoniformes, une autre duplication du génome plus récente est suggérée pour expliquer la présence de deux *esr1* identifiés chez la truite (Nagler *et al.*, 2007; Tohyama *et al.*, 2016). D'après la nomenclature internationale (Gray *et al.*, 2015), *esr1* code pour ER α , *esr2a* pour ER β 2 et *esr2b* pour ER β 1, sauf

pour le médaka (*O. latipes*), où la séquence *esr2a* correspond au sous-type initialement appelé ERβ1 et *esr2b* au sous-type initialement appelé ERβ2 (Tohyama *et al.*, 2015).

Les ER de nombreux vertébrés, incluant mammifères, amphibiens et poissons, ont été isolés et séquencés au cours des deux dernières décennies (Hawkins *et al.*, 2000). Un exemple récent d'arbre phylogénétique illustrant l'évolution de ERα chez les poissons téléostéens est présenté en figure 5 (issu de Tohyama *et al.*, 2016). Si les structures de ER pour chaque sous-type sont relativement bien conservées au sein des cyprinidés (gardon, carpe, vairon tête de boule et poisson zèbre), on observe que ces espèces forment un groupe distinct par rapport aux autres poissons téléostéens, comme le médaka, l'épinoche ou la truite arc-en-ciel (figure 5).

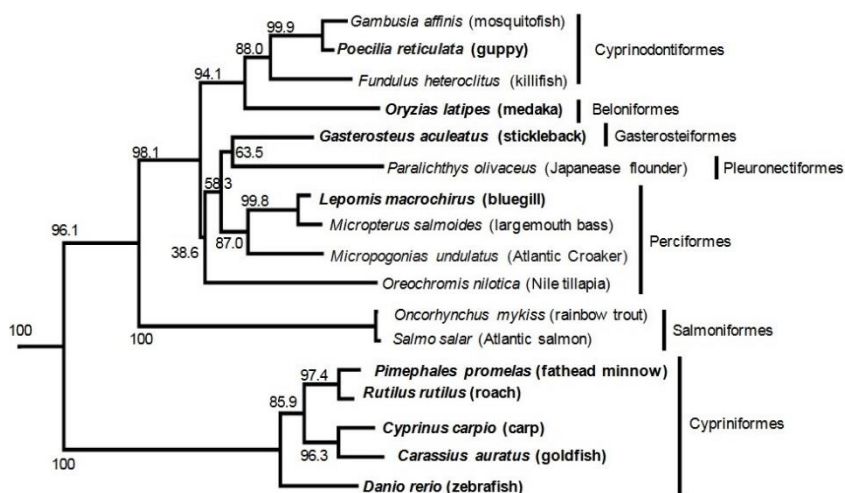


Figure 5: Arbre phylogénétique du récepteur ERα chez les poissons téléostéens (issu de Tohyama *et al.*, 2016). L'échelle représente 0.05 substitutions par sites.

Les sous-types de ER partagent un certain degré d'homologie entre poissons et mammifères. Le domaine C de liaison à l'ADN est très bien conservé entre vertébrés et au sein des poissons téléostéens (Miyagawa *et al.*, 2014; Tohyama *et al.*, 2015), indiquant le maintien de la cible génomique des ER au cours de l'évolution. A titre d'exemple, la figure 6 présente les homologies de séquences pour les récepteurs ER humain (hERα et hERβ) et les récepteurs ERα, ERβ1 et ERβ2 du poisson zèbre (zfERα, zfERβ1, zfERβ2). Menuet *et al.* (2002) montrent qu'il y a plus de 90% d'homologie de séquence entre zfERα et hERα, et entre zfERβ et hERβ.

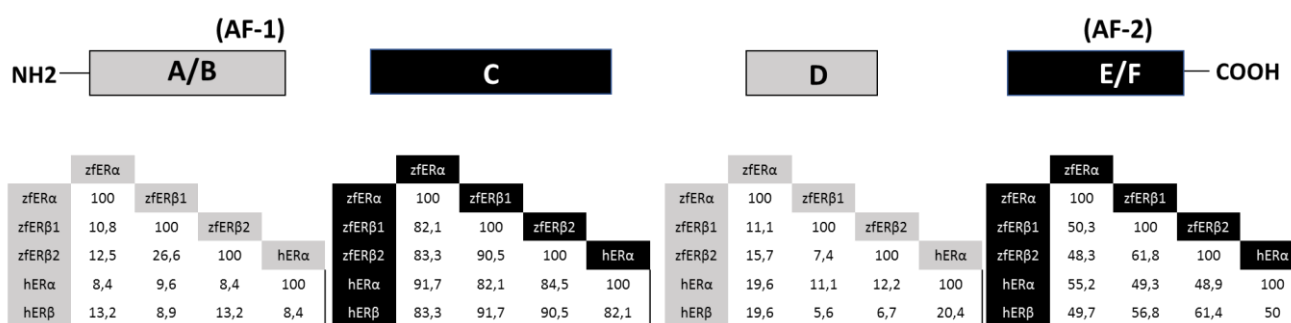


Figure 6: Analyse des identités de séquence entre les domaines des récepteurs ER du poisson zèbre et de l'Homme pour les régions codantes (issu de Menuet *et al.*, 2002).

Au sein des poissons téléostéens, le domaine E de liaison du ligand est également relativement bien conservé, avec 78% à 98% d'homologie pour un même sous-type (Miyagawa *et al.*, 2014; Tohyama *et al.*, 2015). Cependant, on relève en moyenne 60% d'identité de séquence seulement entre le ERα de l'Homme et de nombreuses espèces de poissons, ce qui soulève la question d'une sensibilité différente des poissons aux ligands de ER par rapport à l'Homme (Matthews *et al.*, 2000; Menuet *et al.*, 2002; Miyagawa *et al.*, 2014). A la différence des domaines C et E, les domaines A/B, D et F sont très variables quels que soient le ER et l'espèce considérés, comme illustré dans la figure 5 entre l'Homme et le poisson zèbre (Miyagawa *et al.*, 2014; Tohyama *et al.*, 2015; Menuet *et al.*, 2002).

2.2.2 Evaluation de l'interaction ligand-récepteur

La fixation du ligand au récepteur peut entraîner son activation ou son inhibition. La réponse transcriptionnelle qui en résulte dépend la force de l'interaction du ligand avec le récepteur (affinité), et de la conformation du complexe ligand-récepteur, qui peut entraîner soit une induction (agoniste) ou une inhibition (antagoniste) de la transcription des gènes cibles (efficacité et puissance) (Foreman *et al.*, 2010).

Les tests de binding permettent d'évaluer l'affinité du ligand pour le récepteur. Les deux méthodes principalement employées, les tests de saturation et le test de déplacement compétitif, permettent de déterminer la constante de dissociation (Kd) (concentration nécessaire pour saturer 50% des récepteurs), la concentration inhibant la fixation de 50% du ligand de référence (IC50) et la constante d'inhibition de dissociation (Ki) (essai OCDE n°493). Cependant, les tests de

binding ne donnent pas d'information sur la réponse induite et ne permettent pas de différencier les agonistes des antagonistes.

L'évaluation du profil de réponse de molécules dans un test biologique mesurant la transcription d'un gène ou d'une fonction cellulaire ER-régulée permet de comparer les molécules en fonction de leur efficacité (effet maximal induit, E_{max}) et de la concentration à laquelle l'effet est observé (puissance), souvent défini par l' EC_{50} (concentration induisant 50% de l'effet maximal). La figure 7 présente les principaux cas de figure : les agonistes (cas n°1), les agonistes partiels (cas n°2, plateau intermédiaire), les faibles agonistes (cas n°3, activité à fortes concentrations, pas de plateau), et les antagonistes (cas n°4, molécule co-exposée avec le ligand de référence). Le profil d'activité de composés estrogéniques est généralement mesuré *in vitro* avec des tests basés sur des systèmes avec gène rapporteur et des tests de prolifération cellulaire.

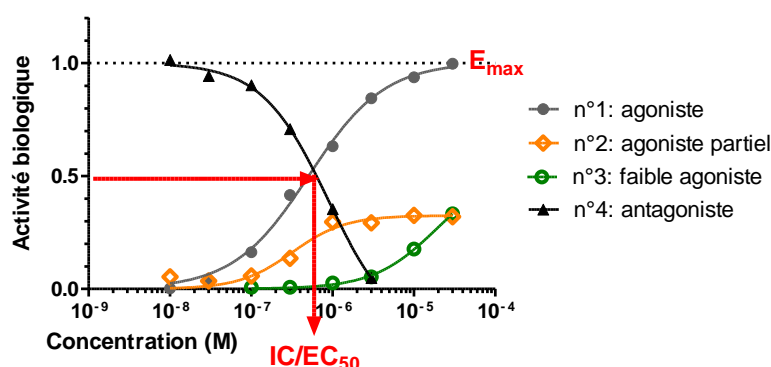


Figure 7: Exemples type de profils de réponse de ligands de ER. E_{max} : effet maximal, EC_{50}/IC_{50} : concentration induisant/inhibant 50% de l'effet maximal

2.2.3 Affinité des récepteurs des estrogènes à l'estradiol

L'étude de l'affinité de ligands endogènes aux ER de l'Homme et des poissons a fait l'objet de nombreuses études. L'affinité de l'E2 semble plus forte pour ER α de l'Homme ($0,13 \text{ nM} < IC_{50}/K_d < 0,23 \text{ nM}$) que pour le ER α du poisson, à l'image du vairon tête de boule ($K_d = 0,58 \text{ nM}$, (Rider *et al.*, 2009) et de la truite arc-en-ciel ($1,35 \text{ nM} < IC_{50} < 1,65 \text{ nM}$, Molina-Molina *et al.*, 2008; Petit *et al.*, 1995). Alors que l'E2 se lie chez l'Homme avec une meilleure affinité à ER α que ER β (Escande *et al.*, 2006; Gutendorf and Westendorf, 2001; Harris *et al.*, 2002; Molina-Molina *et al.*, 2008), l'inverse est signalé pour le tambour brésilien (Hawkins and Thomas, 2004), le barbut de rivière (Gale *et al.*, 2004), le medaka (Yost *et al.*, 2014) et le poisson zèbre (Menuet *et al.*, 2002).

Les différences d'affinité entre hER α et hER β ont été attribuées à des changements clé d'acides aminés dans le LBD (Matthews *et al.*, 2000). Une raison similaire a été suggérée pour les différences de sensibilité entre sous-type de ER du tambour brésilien (Hawkins *et al.*, 2004) et entre ER l'Homme et le poisson zèbre (Pinto *et al.*, 2014).

De plus, à la différence de l'Homme, l'augmentation de la température réduit l'affinité de l'E2 chez certaines espèces piscicoles, comme la truite (Hornung *et al.*, 2003), le tilapia (Tan *et al.*, 1999) et le vairon à tête-de-boule (Rider *et al.*, 2009). La thermolabilité du récepteur ER α ichthyen pourrait être due à des différences d'acides aminés clé dans des sous-parties du domaine E (Tan *et al.*, 1999).

L'activation des ER en réponse à la fixation de l'estradiol a été évaluée chez de nombreuses espèces de poisson et chez l'Homme *in vitro*. Chez les poissons, les ER β s sont en moyenne plus sensibles à l'E2 (0,01 nM < EC50 < 0,5 nM) que ER α (0,1 nM < EC50 < 1 nM), comme dans le cas du poisson zèbre (Cosnefroy *et al.*, 2012; Le Page *et al.*, 2006; Tohyama *et al.*, 2015), de l'épinoche (Tohyama *et al.*, 2015), du médaka (Tohyama *et al.*, 2015), du gardon (Katsu *et al.*, 2007), de la carpe (Katsu *et al.*, 2013; Tohyama *et al.*, 2015), et du tilapia (Davis *et al.*, 2010). A l'inverse des poissons, ER β chez l'Homme est 2 à 6 fois moins sensible à l'E2 (0,0065 nM < EC50 < 0,2 nM) que ER α (0,001 nM < EC50 < 0,05 nM) (Balaguer *et al.*, 1999; Molina-Molina *et al.*, 2008; Shanle and Xu, 2011).

Les différences de réponse à l'E2 entre sous-types de ER pour l'Homme et les poissons sont en accord avec les différences d'affinité présentées précédemment. De la même manière que pour l'affinité, une augmentation de la température peut diminuer la sensibilité de ER à l'E2 chez la truite et le poisson zèbre (Pinto *et al.*, 2014, Hornung *et al.*, 2003, Matthews *et al.* 2002).

2.3 Interactions entre ER et AhR

La voie de signalisation du récepteur des estrogènes peut interférer avec d'autres voies de signalisation comme celle du récepteur de la progestérone (Katzenellenbogen, 2000), des androgènes (Karamouzis *et al.*, 2016), ou de la dioxine AhR (Ohtake *et al.*, 2003). L'interaction des voies de signalisation de ER et AhR, la plus documentée à ce jour, sera prise comme exemple pour la suite.

2.3.1 Généralités

Le récepteur AhR (« aryl hydrocarbon receptor ») est un facteur de transcription de la famille des facteurs de transcription bHLH-PAS (« basic Helix-Loop-Helix/PER-ARNT-Sim »), impliqués dans la réponse aux signaux extérieurs (ex : polluants) et aux signaux physiologiques (ex : hypoxie et rythmes circadiens) (Bersten *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2015). Le récepteur AhR a été initialement décrit comme le récepteur de la dioxine et des composés dioxin-like (ex : dioxines, polychlorobiphényles plans (PCB), furanes, HAP). S'il est principalement décrit comme un récepteur de xénobiotiques, il possède aussi certains ligands endogènes, comme les dérivés du tryptophane (Denison and Nagy, 2003). Il a été montré que AhR avait une fonction clé dans de nombreux processus physiologiques comme le développement, l'immunité, la différenciation cellulaire et la reproduction (review dans Barouki *et al.*, 2007; Hahn, 2002).

2.3.2 Mode d'action de AhR

Sous forme inactivé, AhR est présent dans le cytoplasme au sein d'un complexe protéique contenant des protéines chaperonnes HSP90. Après fixation du ligand, le changement de conformation entraîne la dimérisation avec le facteur de translocation ARNT (« aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator ») et la migration de l'hétérodimère dans le noyau. Le complexe formé recrute des facteurs de co-activation pour se lier aux séquences XRE (« xenobiotic response element », aussi appelées DRE pour « dioxin response element ») et induire la transcription de gènes cibles. AhR induit principalement des enzymes du métabolisme des xénobiotiques de phase I (ex : Cyp1a) et de phase II (Hahn, 2001). D'autre part, AhR induit la transcription de AhRR (« AhR repressor »), capable d'entrer en compétition avec AhR pour se dimériser avec ARNT et se fixer aux DRE (Evans *et al.*, 2008; Karchner *et al.*, 2002).

A la différence de l'Homme qui n'exprime qu'un AhR, un ARNT et un AhRR, plusieurs isoformes sont décrites chez plusieurs espèces de poissons : AhR1a, AhR1b, AhR2, ARNT1, ARNT2, AhRR1 et AhRR2 (Evans *et al.*, 2008; Hahn *et al.*, 2009; Karchner *et al.*, 2002). Les isoformes de AhR ont des rôles distincts chez le poisson, et répondent différemment à la TCDD, qui est plus active sur l'induction de AhR2 que AhR1 (Bugel *et al.*, 2013).

2.3.3 Interactions avec la signalisation de ER

Il a été montré *in vitro* que le récepteur AhR activé pouvait recruter le récepteur ER pour former un hétérotrimère capable de moduler la transcription de gènes ER-régulés (Ohtake *et al.*, 2003). Ce phénomène dit de « cross-talk » entre ER et AhR aura des conséquences en termes d'activation ou d'inhibition de gènes qui seront dépendantes d'un certain nombre de facteurs liés au contexte cellulaire dans lequel il a lieu (i.e. présence ou non de cofacteurs transcriptionnels, taux de récepteurs exprimés, etc). Par exemple, dans les cellules humaines MCF-7 et Ishikawa, la dioxine seule exerce un effet estrogénique en l'absence d'estradiol (ER non lié) mais agit comme un anti-estrogène lorsque ER est lié à son ligand (Ohtake *et al.*, 2003 (Safe *et al.*, 2000) (Rüegg *et al.*, 2008). Plusieurs mécanismes, non exclusifs, ont été proposés pour expliquer les effets anti-estrogéniques des ligands de AhR, les principaux sont illustrés dans la figure 8: la formation d'un hétérotrimère avec ER (Ohtake *et al.* 2003), une augmentation de la dégradation de ER par le protéasome (Wormke *et al.* 2003), une compétition pour les coactivateurs (Rüegg *et al.* 2008, Brunberg *et al.* 2003), et la compétition pour se fixer sur les promoteurs de ER (Klinge *et al.* 1999).

Des interactions entre AhR et ER a été décrites chez les poissons *in vitro* (Bugel *et al.* 2013, Navas et Segner 2001, Gjernes *et al.* 2012) et *in vivo* (Cheshenko *et al.*, 2007; Navas *et al.*, 2004). L'activation de AhR est généralement associée à des effets anti-estrogéniques, tels qu'une diminution de l'induction de ER α ou de la vitellogénine.

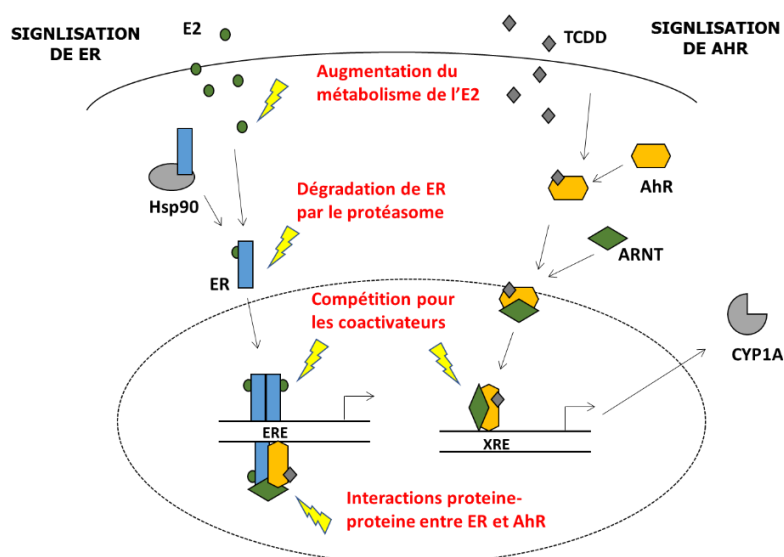


Figure 8: Possibles mécanismes d'interaction entre les voies de signalisation de ER et AhR (adapté de Matthews et Gustafsson, 2006).

De plus, l'interaction entre ER et AhR peut aussi affecter la signalisation de AhR. Dans des lignées cellulaires de mammifères, où l'activation de ER par E2 entraîne une diminution de la transcription du *cyp1a* et une diminution de l'activité enzymatique EROD dans les cellules humaines MCF-7 (Coumoul *et al.*, 2001) et de souris HC11 (Wihlen *et al.*, 2009). Chez les poissons, une interaction réciproque négative a été reportée dans des hépatocytes de truite arc-en ciel entre E2 et la β -naphtoflavone (Navas and Segner, 2000a), et dans des hépatocytes de saumon entre nonylphenol et PCB77 (Mortensen and Arukwe, 2007), ainsi qu'*in vivo* dans des larves de poisson zèbre entre E2 et dioxine (Cheshenko *et al.*, 2007).

3. Exemples de gènes ER-régulés

3.1 La vitellogénine

3.1.1 Fonction et structure

Chez les poissons téléostéens ovipares, les récepteurs des estrogènes sont impliqués dans la régulation de la production de la vitellogénine (vtg). La vitellogénine est une glycolipophosphoprotéine précurseur du sac vitellin du futur embryon. Elle est synthétisée principalement par le foie sous le contrôle de l'E2 produit par les follicules ovariens au cours de la gamétogénèse chez les femelles. Transportées par le sang, la vtg est incorporée dans l'oocyte puis subit des protéolyse successives pour donner les acides aminés qui serviront à la croissance de l'embryon (Matsubara *et al.*, 2003).

La vitellogénine est codée par de multiples gènes constituant une grande famille très diverse au sein de poisson téléostéens (Reading *et al.*, 2009). Chez le poisson zèbre, 7 gènes ont été identifiés sur 2 chromosomes distincts qui diffèrent par le type de vtg produite. Les type vtgA (codés par les *vtg 1et 4 à 7*) et vtgB (codé par *vtg2*) contiennent les domaines lipovitelline I (Lv I) et phosvitin (Pv) et ont environ 60% d'homologie, alors que le type vtgC (codé par *vtg3*) ne contient pas le domaine Pv (Wang *et al.*, 2005). Le profil d'expression des vtg diffère en fonction du sexe, du stade de développement et du statut reproducteur (Eide *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2009; Nelson and Habibi, 2013). Dans le foie de femelle de poisson zèbre mature, les ARNm des *vtg 1, 2, 4,5, 7* semblent être les plus induits et la *vtg3* n'est que très faiblement exprimée, alors que chez

les mâles de poisson zèbre mature, l'expression hépatique indiquée pour les vitellogenines semble très faible (*vtg1, 2, 5, 7*) voire non détectable pour la *vtg3* (Eide *et al.*, 2014; Meng *et al.*, 2010).

3.1.2 Régulation

In vitro, tous les sous-types de ER du poisson zèbre (Chen and Chan, 2016) et du médaka (Lee Pow *et al.*, 2016) sont capables d'induire la *vtg*, même si des différences de sensibilité entre sous-types sont notées. Dans des cultures primaires d'hépatocytes de poisson rouge, la répression des ER β a abolit l'induction de la *vtg* par l'E2 chez les mâles, mais n'a eu que peu, voire pas d'effets chez les femelles par rapport à ER α (Nelson and Habibi, 2010). Chez des embryons de poisson zèbre, où les 3 sous-types de ER étaient successivement réprimés, Griffin *et al.* (2013) ont montré que zfER α et zfER β 1 étaient nécessaires pour l'induction de la *vtg1* par l'E2 (Griffin *et al.*, 2013). Yost *et al.* (2014) suggèrent que les ER β sont nécessaires à l'initiation et au maintien de la transcription de ER α , responsable de la production de *vtg* (Yost *et al.*, 2014). De fait, il a été montré *in vitro* que les ER β du poisson zèbre et de l'achigan à grande bouche pouvaient réguler l'activité transcriptionnelle de ER α positivement (Menuet *et al.*, 2004) ou négativement (Sabo-Attwood *et al.*, 2007).

Même si l'activation séquentielle de la *vtg* est discutée par Griffin *et al.*, 2013, ces études indiquent que tous les sous-types sont susceptibles de réguler la transcription de *vtg*, et qu'au-delà du rôle connu de ER α , les ER β semblent nécessaires pour la production de *vtg* en réponse à l'E2 chez les poissons mâles (Griffin *et al.*, 2013; Nelson and Habibi, 2010). L'induction de la *vtg* par les ER, en particulier chez les poissons mâles, est utilisé comme marqueur d'exposition à des composés estrogéniques dans de nombreux tests (ex : OCDE n°234, 229) et chez les poissons sauvages (ex: Henneberg *et al.*, 2014; Vethaak *et al.*, 2005).

3.2 L'aromatase B

L'aromatase B est une enzyme clé de la stéroïdogénèse responsable de la conversion irréversible des androgènes en estrogènes (aromatation du cycle A, voir introduction A.1.1).

3.2.1 Expression et activité

Au stade embryo-larvaire, l'expression de l'aroB est basse chez le poisson zèbre (Menuet *et al.*, 2005), mais corrèle temporellement avec l'expression de ER dès 24-48 hpf (K. Mouriec *et al.*, 2009). Chez les poissons, l'aroB est principalement exprimée dans les cellules gliales radiales, cellules progéniteurs des neurones, ce qui suggère un rôle essentiel de l'estradiol dans la neurogénèse (Diotel *et al.*, 2010). Chez les mammifères, il a été montré que l'estradiol a de nombreux rôles dans le système nerveux central, parmi lesquels des fonctions neuro-protectrices, de neurogénèse, de plasticité synaptique (Azcoitia *et al.*, 2017; Garcia-Segura, 2009).

Chez le poisson, l'activité et l'expression de l'aroB sont particulièrement importantes au niveau des zones périventriculaires des bulbes olfactifs, du télencéphale, de l'aire pré-optique et dans les noyaux de l'hypothalamus (Pellegrini *et al.*, 2016). Ces zones sont impliquées dans la réception (bulbes olfactifs, noyaux de l'hypothalamus) et dans le traitement (télencéphale) des informations sensorielles (ex : visuelles, mécano-sensorielles, gustatives) pour les traduire en réponses comportementale, endocrine et somatique (Kotrschal *et al.*, 1998), suggérant les multiples fonctions des estrogènes. De plus, le poisson au stade adulte conserve une grande quantité de cellules radiales gliales (Pellegrini *et al.*, 2007). Dans la zone hypothalamus/aire pré-optique, l'activité de l'aroB est 100 à 1000 fois plus forte chez le poisson que chez l'Homme, indiquant un rôle important de cette enzyme dans le cerveau du poisson à l'âge adulte (Pasmanik and Callard, 1985).

3.2.2 Régulation

Chez les poissons ayant une reproduction saisonnière, comme le poisson chat, l'activité de l'aroB fluctue au cours du cycle reproducteur et reste positivement corrélée avec la gamétogénèse et à l'activité de l'aromatase A chez les femelles (González and Piferrer, 2003; Pasmanik and Callard, 1988). Le promoteur du gène *cyp19a1b* contient une séquence ERE et une ½ séquence ERE (Kazeto *et al.*, 2001). Le rôle des ER dans le contrôle transcriptionnel du *cyp19a1b* a été confirmée (Le Page *et al.*, 2006; Menuet *et al.*, 2005). Son expression est très inductible au stade embryo-larvaire par de nombreux xeno-estrogènes grâce à une boucle d'auto-régulation positive du récepteur des estrogènes (Diotel *et al.*, 2010; Hinfray *et al.*, 2006; Menuet *et al.*, 2005). De plus, l'expression de l'aroB est induite par des androgènes aromatisables (ex : testostérone) et certains

androgènes non aromatisable (ex : 5- α dihydrotestosterone) métabolisé en dérivés estrogéniques capables d'activer ER (Brion *et al.*, 2012; Cheshenko *et al.*, 2008; Karen Mouriec *et al.*, 2009). Cependant, l'expression du gène nécessite la présence du facteur glial X, un facteur neuro-glial spécifique qui se fixe sur une séquence régulatrice à proximité du ERE, ce qui confère une spécificité tissulaire de l'expression de l'aroB (Le Page *et al.*, 2008). De part sa forte sensibilité et inductibilité par l'estradiol et les xeno-estrogènes, ces résultats montrent l'intérêt d'étudier l'expression de l'aroB au stade embryon-larvaire chez le poisson pour évaluer une perturbation de la signalisation des estrogènes. En comparaison, l'expression et l'activité de l'aroB ne semblent pas être modulées par l'estradiol chez le poisson zèbre à l'âge adulte (Hinfray *et al.*, 2006).

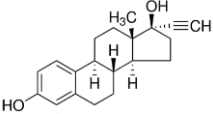
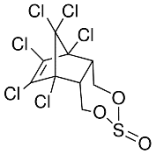
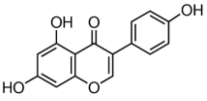
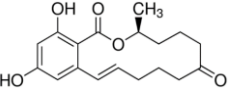
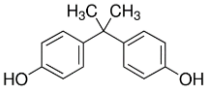
B. Evaluation des xeno-estrogènes

Cette partie a pour but de présenter les outils biologiques disponibles pour évaluer les composés estrogéniques seuls et en mélanges, en mettant l'accent sur les bio-essais *in vitro* et *in vivo* chez les poissons.

1. Xeno-estrogènes environnementaux

Les nombreuses études menées au cours des deux dernières décennies ont permis de mettre en évidence la vaste contamination de l'environnement aquatique par les contaminants organiques et d'identifier de nombreux composés estrogéniques de diverses origines (Petrovic *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2009). Des exemples de ligands environnementaux de ER et de leur occurrence dans les eaux de surface sont présentés dans le tableau I.

Tableau I: Exemples de ligands environnementaux de ER et de leur occurrence dans les eaux de surface.

Famille	Exemples de xeno-estrogènes	Exemple de structure et de niveau détecté dans les eaux de surface	
Médicaments et produits d'hygiène	Ethinylestradiol (EE2), Equilin, diethylstilbestrol (DES), mestranol, benzophenones, parabens	Ex : Ethinylestradiol (CAS 57-63-6)	Angleterre, UK : 0,06 – 0,18 ng/L (LOQ=0,05 ng/L) (Johnson <i>et al.</i> , 2012)
			
Pesticides organochlorés	DDT, <i>o,p'</i> -DDT, <i>p,p'</i> -DDE, metoxychlor, endosulfans	Ex: α -endosulfan (CAS 959-98-8)	Floride, USA : 0,21 – 54 ng/L (LOQ : 0,2 ng/L) Fréquence de détection : 81% (n= 88) (Harman-Fetcho <i>et al.</i> , 2005)
			
Phyto-estrogènes	daidzeine, coumestrol genisteine,	Ex : genisteine (CAS 446-72-0)	Review (monde): nd – 2650 ng/L (Jarosova <i>et al.</i> , 2015)
			
Mycro-estrogènes	Zearalenone, α/β -zearalanol	Ex : Zearalenone (CAS 17924-92-4)	Review (monde) : nd – 80,6 ng/L (Jarosova <i>et al.</i> , 2015)
			
Composés industriels	alkylphenol, bisphenols	Ex : Bisphenol A (CAS 80-05-7)	Europe : nd - 223 ng/L (LOQ=5 ng/L) Moyenne : 25 ng/L Fréquence de détection : 34% (n=122) (Loos <i>et al.</i> , 2009)
			

Les xeno-estrogènes retrouvés dans l’environnement aquatique ont de multiples sources et appartiennent à des familles distinctes. Par exemple, on retrouve parmi les xeno-estrogènes des médicaments (ex : EE2, diéthylstilbestrol) et des produits d’hygiène (ex : benzophénone) provenant principalement des rejets de STEP, mais aussi des composés naturels d’origines animale (ex : E2 et E1) et végétale (ex : génisteine et daidzéine), et des composés industriels (ex : bisphénols) et des pesticides (ex : endosulfan). Malgré les diversités de structures chimiques couvertes par ces molécules, les ligands de ER partagent un motif phénolique commun (Kinani *et al.*, 2008). La diversité des molécules estrogéniques potentiellement présentes dans l’environnement aquatique illustre la difficulté de les rechercher de manière exhaustive avec des méthodes analytiques chimiques ciblant chaque molécule de manière individuelle.

2. Bio-essais et activité estrogénique

De nombreuses méthodes *in vitro* et *in vivo* ont été décrites pour évaluer l’activité estrogénique de molécules, quelques exemples sont présentés dans la figure 9. Ces bio-essais s’appuient sur le mode d’action des estrogènes, de la liaison du ligand au récepteur (test de binding), l’activation du récepteur (tests de transactivation), à l’induction de gènes ER-régulés (ex : vitellogénine, aromatasase B) jusqu’aux effets qui peuvent en résulter, tels que la prolifération cellulaire, l’augmentation du poids de l’utérus chez les rongeurs, ou l’altération du développement sexuel et de la reproduction des poissons.

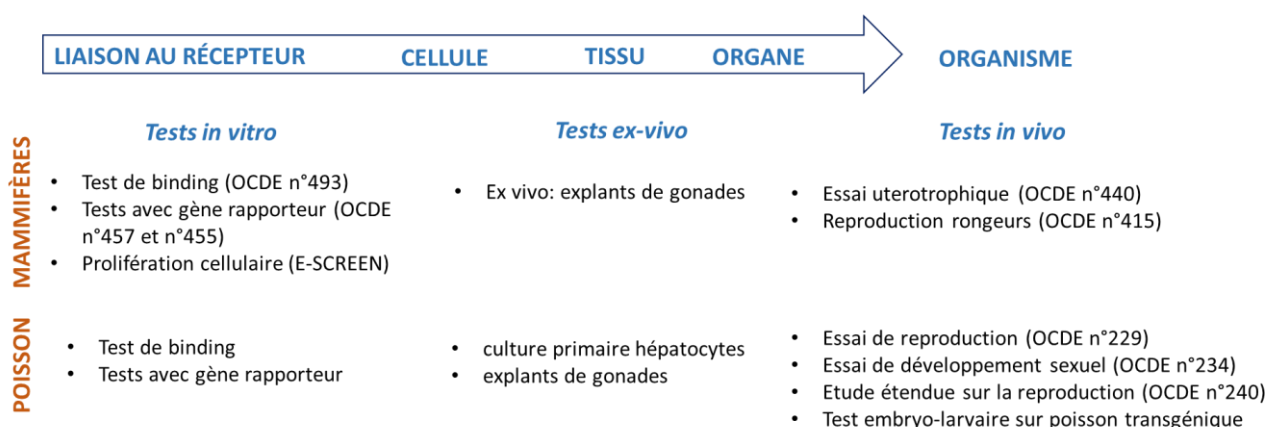


Figure 9: Exemples d’essais *in vitro* et *in vivo* pour évaluer les molécules estrogéniques chez les mammifères et les poissons. Les lignes OCDE sont mentionnées lorsqu’elles existent.

2.1 Bio-essais *in vitro*

Les principales méthodes développées pour évaluer les composés estrogéniques *in vitro* sont les tests de binding, de prolifération cellulaire et de transactivation (« transactivation assays », TA) basés sur des systèmes avec gène rapporteur. Les tests de TA seront plus approfondis dans cette partie.

2.1.1 Tests de binding

Les tests de binding permettent d'évaluer la liaison et l'affinité du ligand pour le récepteur (voir introduction A-2.2.2). Ils peuvent être réalisés à partir de préparations cellulaires (cellules vivantes ou extraits cellulaires) exprimant le récepteur (entier ou recombinant), ou encore d'homogénat de tissu contenant le(s) récepteur(s) natif(s). Ils permettent de déterminer la constante de dissociation (K_d) (concentration nécessaire pour saturer 50% des récepteurs), la concentration inhibant la fixation de 50% du ligand de référence (IC_{50}) et la constante d'inhibition de dissociation (K_i) (OECD, 2015a). Cependant, ils ne donnent pas d'informations sur la réponse induite et ne permettent pas de différencier les agonistes des antagonistes.

2.1.2 Tests de prolifération cellulaire

Les tests de prolifération cellulaire sont réalisés dans des lignées de cellules cancéreuses, telles que les cellules MCF-7 ou T47D, où la croissance des cellules est estrogéno-dépendante (ex : E-SCREEN, Soto *et al.*, 1995). Le test E-SCREEN est sensible mais il peut manquer de spécificité car de nombreux facteurs peuvent interférer (positivement ou négativement) avec la prolifération cellulaire indépendamment du ER (Leusch *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2011).

2.1.3 Tests de transactivation

Les TA *in vitro* sont des systèmes cellulaires transfectés avec un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur répondant à l'activation de ER. La mesure de l'expression du gène rapporteur (ou de l'activité de la protéine synthétisée) permet de quantifier spécifiquement l'activation de ER sur la base d'une courbe concentration-réponse, comme présenté dans la figure 10. Il est ainsi possible de déterminer le potentiel estrogénique relatif d'une molécule donnée

(« Relative Potency » REP) sur la base du ratio de l'EC₅₀ de la molécule de référence sur celui de la molécule testée. Les TA sont des méthodes rapides, sensibles, spécifiques, et quantitatives, et constituent de fait des outils de choix pour le criblage de molécules ou d'échantillons (ex : le programme ToxCast, Kavlock *et al.*, 2012). De nombreux tests de TA utilisés pour évaluer l'activité estrogénique de différentes molécules ont été développés au cours des deux dernières décennies. Le tableau II présente plusieurs tests établis pour évaluer la réponse des ER chez l'Homme et les poissons.

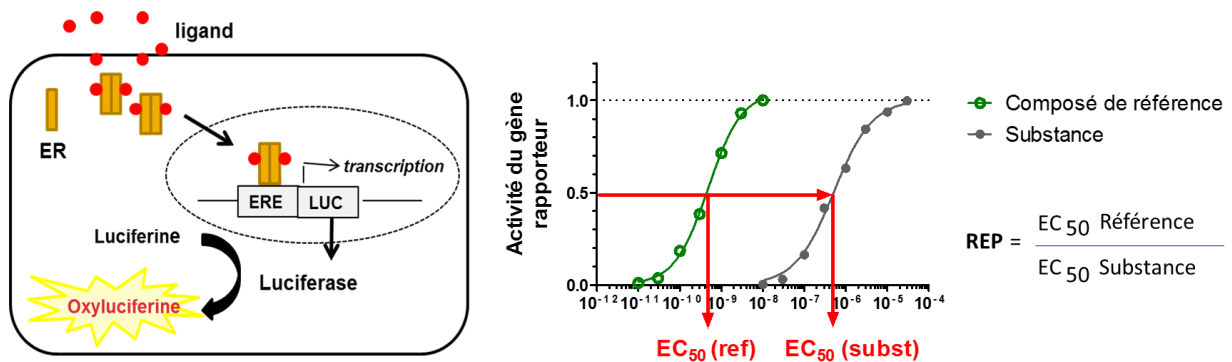


Figure 10: Principe d'un test de transactivation avec gène rapporteur basé sur l'utilisation de la luciférase pour évaluer l'activité d'une molécule.

La majorité des TA utilisés aujourd'hui sont basés sur des cellules de mammifères transfectées de manière stable pour évaluer l'activité de hER α , et dans une moindre mesure l'activité de hER β (Brennan *et al.*, 2016; Escande *et al.*, 2006). En parallèle, des tests de TA ont été construits pour caractériser la réponse *in vitro* des récepteurs ER des poissons. La réponse des différents sous-types de ER de nombreuses espèces a été évaluée, le poisson zèbre et la truite arc-en-ciel figurent parmi les espèces les plus étudiées (tableau II). Par rapport aux TA basés sur hER α , la grande majorité des tests chez le poisson sont des systèmes utilisant une transfection transitoire du récepteur d'intérêt dans des cellules à croissance rapide, telles que les cellules de mammifères cancéreuses, ce qui peut induire une variabilité inter-essais et être limitant dans une démarche de criblage. Seuls quelques modèles basés sur des cellules de poissons stablement transfectées avec le récepteur ER poisson ont été développés, comme les cellules RTG-2 (Ackermann *et al.*, 2002), PLHC-1 (Cosnefroy *et al.*, 2009) ou ZFL (Cosnefroy *et al.*, 2012).

Tableau II: Exemples et principales caractéristiques de lignées cellulaires à gènes rapporteurs développées pour évaluer l'activation de ER chez l'Homme et les poissons

Origine de ER	Sous-type de ER	Lignée (test)	Type tissulaire	Type de transfection	Système rapporteur	Référence
Homme (<i>H. sapiens</i>)	ER α	Levure (YES)	Saccharomyces cerevisiae	Stable	β -galactosidase	(Routledge and Sumpter, 1996)
	ER α	MCF-7 (MELN)	Cancer du sein	Stable	Luciferase	(Balaguer <i>et al.</i> , 1999)
	ER α , ER β	Hela (HELN)	Cancer du col de l'utérus	Stable	Luciferase	(Molina-Molina <i>et al.</i> , 2008; Pinto <i>et al.</i> , 2014)
	ER α	BG1 (BG1-LUC)	Ovaire	Stable	Luciferase	(Rogers and Denison, 2000)
	ER α	HEK-293 (GenBLAzer)	Rein embryonnaire	Stable	β -lactamase	(Huang <i>et al.</i> , 2011)
	ER α	T47D (T47D-KB Luc)	Cancer du sein	Stable	Luciferase	(Wilson <i>et al.</i> , 2004)
	ER α	T47D (ER-CALUX)	Cancer du sein	Stable	Luciferase	(Legler <i>et al.</i> , 1999)
	ER α	MCF-7 (MVLN)	Cancer du sein	Stable	Luciferase	(Demirpence <i>et al.</i> , 1993; Pons <i>et al.</i> , 1990)
	ER α	U2OS (ER α -CALUX)	Ostéocarcinome	Stable	Luciferase	(van der Linden <i>et al.</i> , 2008)
Poisson zèbre (<i>D. rerio</i>)	ER α , ER β 1, ER β 2	ZFL (ZELH)	Foie de poisson zèbre	Stable	Luciferase	(Cosnefroy <i>et al.</i> , 2012)
	ER α , ER β 1, ER β 2	HEK-293	Rein embryonnaire	Transitoire	Luciferase	(Legler <i>et al.</i> , 2002; Tohyama <i>et al.</i> , 2015)
	ER α , ER β 1, ER β 2	CHO	Ovaire de hamster	Transitoire	Luciferase	(Menuet <i>et al.</i> , 2002)
	ER α , ER β 1, ER β 2	U251-MG	Cellules gliales humaines	Transitoire	Luciferase	(Le Page <i>et al.</i> , 2006)
	ER α , ER β 1, ER β 2	Hela (HELN)	Cancer du col de l'utérus	Stable	Luciferase	(Pinto <i>et al.</i> , 2014)
Epinoche (<i>G. aculeatus</i>)	ER α , ER β 1, ER β 2	HEK-293	Rein embryonnaire	Transitoire	Luciferase	(Tohyama <i>et al.</i> , 2015)
Gambusie (<i>G. affinis affinis</i>)	ER α , ER β 1, ER β 2	HEK-293	Rein embryonnaire	Transitoire	Luciferase	(Katsu <i>et al.</i> , 2007)
Gardon (<i>R. rutilus</i>)	ER α , ER β 1, ER β 2	HEK-293	Rein embryonnaire	Transitoire	Luciferase	(Tohyama <i>et al.</i> , 2015)
Tilapia (<i>O. mossambicus</i>)	ER α , ER β 1, ER β 2	HEK-293	Rein embryonnaire	Transitoire	Luciferase	(Davis <i>et al.</i> , 2010)
Achigan à grande bouche (<i>M. salmonides</i>)	ER α , ER β 1, ER β 2	HEK-293	Rein embryonnaire	Transitoire	Luciferase	(Sabo-Attwood <i>et al.</i> , 2007)
Truite arc-en-ciel (<i>O. mykiss</i>)	ER α	Levure (YES)	Saccharomyces cerevisiae	Stable	β -galactosidase	(Petit <i>et al.</i> , 1997)
	ER α	Hela	Cancer du col de l'utérus	Stable	Luciferase	(Molina-Molina <i>et al.</i> , 2008)
	ER α	PLHC1	Foie de top minnow	Stable	Luciferase	(Cosnefroy <i>et al.</i> , 2009)
	ER α	RTG-2	Gonade de truite arc-en-ciel	Stable	Luciferase	(Ackermann <i>et al.</i> , 2002)
Medaka (<i>O. latipes</i>)	ER α , ER β 1, ER β 2	HEK-293	Rein embryonnaire	Transitoire	Luciferase	(Lange <i>et al.</i> , 2012; Tohyama <i>et al.</i> , 2015)
Carpe (<i>C. carpio</i>)	ER α , ER β 1, ER β 2	HEK-293	Rein embryonnaire	Transitoire	Luciferase	(Lange <i>et al.</i> , 2012; Tohyama <i>et al.</i> , 2015)

Parmi les premiers TA établis, figurent ceux basés sur l'utilisation de levures recombinantes exprimant le récepteur ER α humain, comme dans le test YES (Routledge and Sumpter, 1996) ou le récepteur ER α de la truite arc-en-ciel (Petit *et al.*, 1997). Organismes stables et faciles à cultiver, les levures ont l'inconvénient d'avoir une membrane peu perméable et un contexte cellulaire différent de ceux des vertébrés, ce qui entraîne un risque de faux négatifs (Leusch *et al.*, 2010).

La majorité des TA utilisés dans le criblage de molécules sont des systèmes *in vitro* basés sur des cellules de mammifères exprimant hER α . Ces lignées cellulaires ont une sensibilité pour l'E2 de l'ordre du pM (EC50 \sim 10 pM), 100 fois meilleure que pour le test YES (review dans Leusch *et al.*, 2010). La puissance relative (REP) des xeno-estrogènes par rapport à l'E2 *in vitro* varie d'un facteur 10 000 à 100 000 en fonction des composés. Par exemple, l'EE2 et le DES, des estrogènes de synthèse, ont des EC50 de l'ordre du pM, tandis que la genisteine et l' α -zearalenone ont des EC50 de l'ordre du nM et les alkylphenols et le bisphenol A ont des EC50 de l'ordre du μ M (ex: Gutendorf and Westendorf, 2001; Pinto *et al.*, 2014).

Il existe une bonne corrélation entre TA basés sur hER α pour les principaux xeno-estrogènes, à l'image du test de prolifération cellulaire E-SCREEN et test BG1-LUC (Dreier *et al.*, 2015), entre différents tests YES (Fang *et al.*, 2000), entre lignées HEK-293-hER α et BG1-LUC (R. Huang *et al.*, 2014), ou entre plusieurs tests (Kunz *et al.*, 2017). Cependant, le REP d'une molécule peut varier d'un modèle à l'autre, et parfois même au sein d'un même test en fonction du laboratoire (Jarosova *et al.*, 2014, Leusch *et al.*, 2010), montrant que l'extrapolation de l'activité d'une molécule entre deux TA peut entraîner une variabilité parfois importante. Le REP de l'E3, par exemple, est 15 à 143 fois plus faible dans le YES que dans les cellules de mammifères (Jarosova *et al.*, 2014).

Chez les poissons, la réponse des ER a été la plus étudiée pour le poisson zèbre et la truite arc-en-ciel. La figure 11 illustre le cas du poisson zèbre avec les réponses des différents sous-types de zfER à certains xeno-estrogènes pour 4 lignées cellulaires : les lignées U251-MG, HEK-293 et HELN issues de cellules mammifères, et la lignée ZELH issue de foie de poisson zèbre. Comme observé avec hER α , les différences de puissance relative entre xeno-estrogènes sont retrouvées pour les zfER avec un facteur 10 000 entre l'EC50 de l'EE2 et l'EC50 du BPA, quelle que soit la lignée

(figure 11). Les sous-types de zfERs n'ont pas tous les mêmes sensibilités aux xeno-estrogènes, comme par exemple pour l'EE2 plus actif sur les zfER β que sur zfER α .

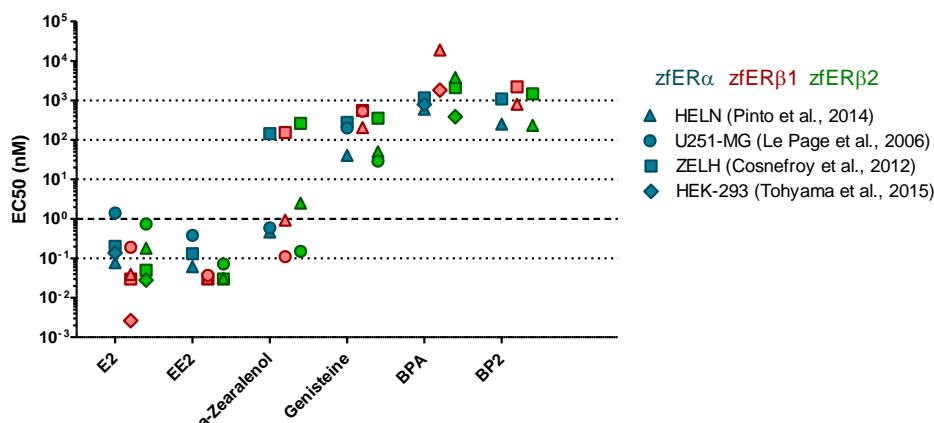


Figure 11: exemples de réponse des sous-types de zfER à des xeno-estrogènes dans différentes lignées cellulaires.

Si le mécanisme de liaison des xeno-estrogènes aux ER est conservé au sein des poissons, des différences de réponse entre sous-types de ER d'une même espèce et entre espèces de poisson sont parfois observées (Lange *et al.*, 2012, Toyahama *et al.*, 2015). Le BPA, par exemple, n'entraîne qu'une très faible activation des ER du gardon, alors qu'il entraîne l'activation des ER du médaka, du poisson zèbre et de l'épinoche (Tohyama *et al.*, 2015). D'autre part, les récepteurs ER ichtyens et humains répondent parfois avec des sélectivités inversées à certains composés. La génisteine et la benzophenone-2 (BP-2), par exemple, ont une meilleure affinité pour hER β que hER α (Pinto *et al.*, 2014, Westendorf et Gutendorf, 2001), mais chez le poisson zèbre, ces molécules sont 3 à 5 fois plus actives sur zfER α et zfER β 2 que sur zfER β 1 (Pinto *et al.*, 2014). Une observation similaire a été faite pour ER α de la truite arc-en-ciel qui a une sensibilité à la BP-2 similaire à hER β , et supérieure à hER α (Molina-Molina *et al.*, 2008).

Comme illustré dans la figure 11, la réponse de zfER peut changer en fonction de la lignée cellulaire où il est exprimé. Cela est particulièrement marquant pour l' α -zearalenol qui est 100 fois moins active dans les ZELH (cellules de foie de poisson zèbre, Cosnefroy *et al.*, 2012) que dans les cellules HELN (cellules Hela, Pinto *et al.*, 2014) ou U251-MG (cellules gliales, Le Page *et al.*, 2006). De la même manière, la réponse du ER α de la truite arc-en-ciel à l' α -zearalenol est 100 fois plus faible dans les cellules PLHC-1 (cellules de foie de vairon) que dans les cellules HELN (Cosnefroy *et al.*, 2009), suggérant un rôle du contexte cellulaire spécifique aux cellules de foie dans la réponse observée.

Chaque lignée cellulaire a conservé des caractéristiques biologiques (ex : cofacteurs, métabolisme) qui lui sont propres. Les cofacteurs (corépresseurs/coactivateurs) de ER varient en fonction du tissu, et sont susceptibles d'influencer la réponse du ER (McDonnell and Norris, 2002; Routledge *et al.*, 2000). De plus, le devenir de la molécule dans le système biologique est important à considérer. Dans les cellules T47D-KBluc, la 17- β HSD est fonctionnelle et peut convertir l'E1 en E2, ce qui explique que cette lignée soit particulièrement sensible à l'E1 (Bermudez *et al.*, 2012). La caractérisation du métabolisme de la benzophenone 2 et du bisphenol S dans les cellules ZELH-zfERs, MELN et T47D-KBluc a permis de montrer que les cellules de foie de poisson zèbre (ZELH) ont un profil métabolique distinct des MELN et T47D-KBluc, qualitativement proche du profil observé dans les cultures primaires d'hépatocytes de poisson zèbre (Le Fol *et al.*, 2015). De plus, la voie de signalisation AhR est inductible dans les cellules MCF-7, d'où sont issues les cellules MELN, pouvant entraîner des interactions avec la voie ER (Ohtake *et al.*, 2003).

2.1.4 Conclusion

Les tests *in vitro* représentent un niveau d'organisation biologique simple. Les systèmes cellulaires avec gène rapporteur permettent d'avoir une réponse sensible, spécifique et rapide. Néanmoins, le choix du système cellulaire et du sous-type de récepteur étudié peut avoir une influence sur l'activité d'une molécule donnée et donc, in fine, sur le diagnostic *in vitro*. De plus, à la différence de l'organisme entier, l'influence de la pharmacocinétique (absorption, distribution, métabolisme, élimination) est peu prise en compte *in vitro*, et les interactions entre organes sur la réponse aux xeno-estrogènes est inexistante. S'ils permettent de donner une information à la fois spécifique et sensible sur l'activité d'une molécule, des essais complémentaires *in vivo* sont donc nécessaires pour déterminer les effets à l'échelle de l'organisme.

2.2 Bio-essais *in vivo* chez le poisson

2.2.1 Tests réglementaires

Au niveau réglementaire, 4 essais pour évaluer les perturbateurs endocriniens chez le poisson *in vivo* bénéficient de lignes directrices OCDE : l'essai n°229 « essai à court terme de reproduction des poissons » (OCDE, 2009a), l'essai n°230 « essai de 21 jours sur les poissons » (OCDE, 2009b), l'essai n°234 « essai de développement sexuel des poissons » (OCDE, 2011) et

l'essai n°240 « étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez le médaka » (OCDE, 2015b). Le plus court de ces essais durent 21 jours (essais n°229 et 230). Les paramètres mesurés sont principalement la vtg plasmatique, le ratio phénotypique (essai n°234), la fécondité (essai n°229) et les caractères sexuels secondaires chez le médaka et le vairon à tête de boule (essai n°229, 230 et 240). Ces essais permettent de mettre en évidence le potentiel perturbateur endocrinien d'une molécule, et la mesure de la vtg plasmatique donne une indication sur l'estrogénicité. Bien qu'essentiels pour évaluer les effets estrogéniques, les tests *in vivo* disponibles sont exigeants en temps, organismes et moyens, et sont préférentiellement utilisés lors d'une deuxième phase d'évaluation, après des approches de screening.

2.2.2 Tests embryo-larvaires sur poissons transgéniques

Depuis plusieurs années, des tests embryo-larvaires sur lignées de poisson zèbre et de médaka transgéniques ont été développés pour évaluer spécifiquement l'action et les effets des xéno-estrogènes *in vivo* (Gong *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2015). La spécificité de réponse au niveau individuel combinée à un test de courte durée rend l'utilisation des poissons transgéniques au stade embryo-larvaire particulièrement intéressante pour évaluer les composés estrogéniques.

Différents modèles de poissons transgéniques ont été développés, dont certains sont présentés dans le tableau III. Construits par modification stable du génome, les poissons transgéniques expriment un gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur répondant à l'activation de ER. Le poisson zèbre et le médaka sont les deux espèces modèles utilisées pour établir des lignées transgéniques. Le poisson zèbre présente des caractéristiques très attrayantes qui en ont fait un vertébré modèle très utilisé en toxicologie, biologie et génétique (Segner *et al.*, 2013). Son génome est totalement séquencé, il est facile à élever, a un temps de génération court (3 à 6 mois), se reproduit tout au long de l'année au laboratoire et chaque femelle peut pondre jusqu'à 200 œufs par semaine. Les embryons sont de petite taille et translucides permettant le suivi visuel du développement des organes dans les premiers jours de vie (Stegeman *et al.*, 2010). Le médaka présente des caractéristiques similaires, mais à la différence du poisson zèbre, cette espèce a un déterminisme sexuel génétique qui rend possible l'évaluation des molécules en fonction du genre (Scholz *et al.*, 2005).

Tableau III: Exemples et caractéristiques principales de lignées de poissons transgéniques développées pour évaluer les xeno-estrogènes. ERE : estrogen response element, hpf : heure post fertilisation, hph : heure post éclosion, GFP/RFP : green/red fluorescent protein.

Espèce	Tissu cible quantification	Promoteur	Système rapporteur	Période d'exposition	E2 (nM) (paramètre)	Référence
Poisson zèbre	Poisson entier	ERE-Gal4	GFP	0 - 96 hpf	0,0091 (LOEC)	(Lee <i>et al.</i> , 2012)
	Poisson entier	ERE	GFP	4 – 120 hpf	-	(Green <i>et al.</i> , 2016)
	Foie	ERE-zvtg1	GFP	7 - 13 dpf	0,36 (LOEC)	(H. Chen <i>et al.</i> , 2010)
	Foie	ERE	GFP	1 - 3/5 dpf	1,8 (LOEC)	(Gorelick <i>et al.</i> , 2014; Gorelick and Halpern, 2011)
	Cerveau (Cellules gliales)	cyp19a1b	GFP	0 – 96 hpf	0,5 (EC50)	(Brion <i>et al.</i> , 2012; Tong <i>et al.</i> , 2009)
Medaka	Foie	Chg-L	GFP+RFP	4 – 10 dph	0,091 (LOEC)	(Salam <i>et al.</i> , 2008)
	Foie	Chg-H	GFP	0 -1 dph	0,63 (LOEC)	(Kurauchi <i>et al.</i> , 2005)
	Foie	Chg-H	GFP+RFP	0 -16 dph	0,18 (EC50)	(Scholz <i>et al.</i> , 2005)

Les lignées de poisson transgénique basées sur l'utilisation d'un promoteur synthétique (ERE) permettent d'évaluer l'activation de ER dans un grand nombre de tissus (ex : foie, muscles, cœur, Gorelick *et al.*, 2014). Toutefois, l'activation de ER dans ces modèles ne donnent pas d'information sur la réponse du tissu biologique en question, à la différence des lignées de poissons transgéniques construits avec un promoteur naturel (ex : *cyp19a1b*, *Chg-H* et *vgt1*) où une activation du gène peut être corrélée à une réponse spécifique. Dans le cas du poisson zèbre transgénique *cyp19a1b*-GFP, il a été montré que l'expression de la GFP corrélait parfaitement avec l'expression de la protéine AroB endogène mise en évidence par immuno-coloration (Tong *et al.*, 2009).

Si le premier modèle de poisson transgénique pour évaluer l'estrogénicité se basait sur l'utilisation de la luciférase comme gène rapporteur (Legler *et al.*, 2000), l'utilisation de protéines fluorescentes (Green ou Red Fluorescence Protein GFP, RFP) a été préférée par la suite car elles sont plus stables (8h contre 1h à 3h pour la luciférase), ne nécessitent pas le sacrifice de l'animal, ni l'addition de substrat pour faire la mesure (Lee *et al.*, 2015). L'activation de ER dans les modèles basés sur la GFP et RFP est déterminée en mesurant la fluorescence par microscopie de manière non invasive (photographie).

A l'exception d'une étude qui évalue l'activité de plus de 50 molécules (Brion *et al.*, 2012), il existe relativement peu d'information sur l'activité de xeno-estrogènes dans les différents modèles de poissons transgéniques. Le tableau IV présente la sensibilité de différentes lignées de poissons transgéniques à quelques composés estrogéniques. Les LOEC pour l'E2 sont généralement comprises entre 0,18 et 1,8 nM, alors qu'il y a un facteur 20 pour l'E1, un facteur 100 pour EE2, et même un facteur 1000 pour le DES entre les LOEC reportées en fonction des lignées de poisson. La sensibilité du modèle cyp19a1b-GFP à l'E1 et l'EE2 est similaire à ce qui est décrit en ce qui concerne l'induction de la vtg chez des poissons adultes : les REP de l'E1 et l'EE2 sont de 0,2 et 38 pour l'induction de la GFP (Brion *et al.*, 2012), et de 0,37 et 20 pour l'induction de la vtg chez des poissons adultes (Caldwell *et al.*, 2012).

Tableau IV: Sensibilité des principales lignées de poissons transgéniques aux composés estrogéniques. * : le cas pour le NP utilisé n'est pas systématiquement reporté. NA : inactif, (-) : non testé. E2 : estradiol, E1 : estrone, E3 : estriol, EE2 : ethinylestradiol, BPA ; bisphenol A, NP : nonylphenol, DES : diethylstilbestrol, GEN : genisteine.

Espèce	Modèle transgénique	Paramètre (nM)	E2	E1	EE2	BPA	NP*	DES	GEN
Poisson zèbre	cyp19a1b-GFP (Brion <i>et al.</i> 2012)	EC50	0,5	2,4	0,013	3303	406	0,01	2501
	Tg (5xERE :GFP) (Gorelick et Halpern 2011)	LOEC	1,8	37	0,0034	1000	NA	0,0037	180
	ERE-zvtg1 GFP (Chen <i>et al.</i> 2010)	LOEC	0,36	-	-	4380	NA (>45400)	3,72	-
	ERE-GFP casper (Green <i>et al.</i> , 2016)	EC50	-	-	0,018	1370	963	-	1715
Medaka	ChgH-GFP d-rR (Scholze <i>et al.</i> 2005)	LOEC	0,18	-	-	-	NA (>1835)	-	NA (>367)
	ChgH-GFP (Kurauchi <i>et al.</i> 2005)	LOEC	0,63	14,8	0,34	-	4500	-	-

Dans la grande majorité des études, l'information apportée par les modèles de poissons transgéniques est plutôt qualitative que quantitative (ex : Gorelick et Halpern 2011, Lee *et al.*, 2012). Dans certains modèles, il existe une forte variabilité interindividuelle (Legler *et al.*, 2000; Scholz *et al.*, 2005), et la sensibilité des lignées est parfois basse, en particulier pour les faibles agonistes (tableau IV). Afin d'augmenter la sensibilité, Lee *et al.* 2012 ont combiné le promoteur ERE avec un système Gal4 pour amplifier l'induction de la GFP. De la même manière, le modèle poisson zèbre cyp19a1b-GFP bénéficie de bonne sensibilité grâce à une boucle d'autorégulation

positive physiologique dans les cellules gliales, régulée par ER, qui permet d'amplifier la réponse mesurée (Brion *et al.*, 2012; Tong *et al.*, 2009). Récemment, des méthodes de lecture automatisée en plaque 96 puits ont été développées (Green *et al.*, 2016), ouvrant de nouvelles possibilités pour des approches de criblage.

3. Evaluation des xeno-estrogènes en mélange

Cette partie a pour but de présenter la méthodologie pour évaluer les effets de composés estrogéniques en mélanges reconstitués, ainsi que les principales études adressant cette question *in vitro* et *in vivo* chez le poisson.

3.1 Méthodologie

3.1.1 Approches mathématiques

L'approche théorique de l'évaluation d'effets combinés de composés a émergé au début du XXe siècle avec trois grands concepts : la sommation des effets (« effect summation » ES), la multiplication des effets introduit par Bliss en 1939 (« independent action » IA aussi appelé « response addition », « effect addition ») et l'addition des concentrations introduit par Loewe et Muischnek en 1926 (« concentration addition » CA, aussi appelé « dose addition »). Avec des approches et des hypothèses différentes, ces concepts ont été définis pour prédire des effets additifs, c'est-à-dire en l'absence d'interactions entre composés.

Les équations des 3 modèles d'additivité sont présentées ci-dessous, avec E l'effet du mélange, c la concentration de la molécule dans le mélange et EC_x l'effet de la molécule à la concentration c :

$$\begin{aligned} \text{Sommation des effets (ES) :} & \quad E-ES(C_{mixture}) = E(C_1) + E(C_2) + \dots + E(C_n) \\ \text{Multiplication des effets (IA) :} & \quad E-IA(C_{mixture}) = E(C_1) \times E(C_2) \times \dots \times E(C_n) \\ \text{Addition des concentrations (CA) :} & \quad E-CA(C_{mixture}) = c_1/EC_{x1} + c_2/EC_{x2} + \dots + c_n/EC_{xn} \end{aligned}$$

La somme des effets (ES) est la manière la plus simple d'appréhender l'interaction de deux molécules, car elle consiste à additionner les effets des molécules prises individuellement. Cependant, cette relation ne s'avère être vérifiée que pour les composés ayant une dose-réponse

linéaire passant par l'origine (Berenbaum, 1989). L'absence de considération pour le profil d'activité des composés, souvent testés en mono-dose, a mené de nombreux auteurs à parler erronément d'antagonisme ou de synergisme (Kortenkamp and Altenburger, 1998). Dans le cas de réponses non linéaires, les modèles CA et IA sont préférentiellement utilisés. Le modèle IA assume que les molécules en mélange induisent des effets similaires de manière indépendante les unes des autres. L'effet du mélange se traduit de manière probabiliste par la multiplication des effets. A la différence du modèle IA, le modèle CA est basé sur l'hypothèse que les composés en mélange ont un mode d'action similaire. Chaque composé peut être alors considéré comme une dilution du composé le plus actif, et exprimé en termes de puissance relative (REP) par rapport à celui-ci. Ainsi, l'effet d'un mélange est prédit en additionnant les concentrations des composés pondérés par leur puissance relative.

Combinés, les composés chimiques peuvent agir de manière additive mais peuvent aussi interagir entraînant un effet plus important (potentialisation, supra-additivité, synergisme) ou moins important (inhibition, infra-additivité, antagonisme) qu'attendu. Cependant, il n'existe pas aujourd'hui de modèle mathématique généraliste permettant de prédire la présence d'interactions. La mise en évidence d'une interaction passe donc nécessairement par la caractérisation de la déviation par rapport à l'hypothèse d'additivité initiale, évaluée avec des méthodes graphiques (ex : comparaison des intervalles de confiance, Scholze *et al.*, 2014) ou numériques (ex: Chou and Talalay, 1984; Jonker *et al.*, 2005).

3.1.2 Plan expérimental

Afin d'évaluer la validité des modèles d'additivité, différentes approches peuvent être utilisées. La technique la plus exhaustive consiste à tester toutes les combinaisons possibles de molécules en suivant un plan factoriel. Très coûteux en ressources (temps et matériels), le plan factoriel est surtout utilisé pour les mélanges binaires ou ternaires évalués *in vitro* (ex: Bermudez *et al.*, 2010). Aujourd'hui, l'approche préconisée et la plus communément utilisée consiste à réaliser des mélanges avec des ratios fixes entre les composés (Kortenkamp and Altenburger, 1998). Une fois le mélange constitué, il est testé en dilutions croissantes pour obtenir un profil de réponse comparable aux prédictions. Les ratios entre molécules peuvent être déterminés sur la base de leur activité (mélanges équipotents en EC_x), de leur concentration (mélanges

équimolaires), ou de leur occurrence environnementale (mélanges représentatifs d'une exposition donnée). On retrouve aussi des plans d'expérience en rayon qui consiste à tester seulement certaines combinaisons de molécules avec un ratio fixe interchangeable (ex: Hinfray *et al.*, 2016).

3.2 Evaluation des xeno-estrogènes en mélange

3.2.1 Mélanges de xeno-estrogènes *in vitro*

Les études évaluant des mélanges de molécules estrogéniques *in vitro* ont généralement testé moins de 10 composés, parmi lesquels les hormones naturelles et de synthèses (E1, E2, EE2), les alkylphenols, le bisphénol A et la génisteine sont les plus souvent retrouvés (Rajapakse *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2011). Les principaux tests utilisés sont le YES (Payne *et al.*, 2000; Rajapakse *et al.*, 2002) et le E-SCREEN (Rajapakse *et al.*, 2004; Scholze *et al.*, 2014), et dans une moindre mesure, les lignées cellulaires humaines avec gène rapporteur (Bermudez *et al.*, 2012; Ghisari and Bonfeld-Jorgensen, 2009). Une seule étude a évalué l'activité d'un mélange spécifiquement sur hER β (ER β -CALUX, Seeger *et al.*, 2016). Peu d'informations sont disponibles pour les effets de mélange sur la réponse des ER de poissons *in vitro*, à l'exception de deux études utilisant des cellules gliales humaines transfectées transitoirement avec les récepteurs de poisson zèbre (zfER α , zfER β 1, zfER β 2) et la luciférase sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b* (Hinfray *et al.*, 2016; Le Page *et al.*, 2006).

Dans la très grande majorité des études, les effets des mélanges de composés estrogéniques sont correctement prédits par le modèle de CA, que ce soit des mélanges équipotents (Frische *et al.*, 2009; Ghisari and Bonfeld-Jorgensen, 2009; Heneweer *et al.*, 2005), équimolaires (Demaegdt *et al.*, 2016; Payne *et al.*, 2000), ou réalisés sur la base de données d'exposition dit « mélanges environnementaux » (Evans *et al.*, 2012). Afin d'évaluer les effets des molécules estrogéniques à faibles concentrations, telles que retrouvées dans l'environnement, Silva *et al.* 2002 ont reconstitué un mélange équipotent de 8 molécules (comprenant une benzophénone, des PCB, le BPA, la génisteine, et le résorcinol) présentes à des concentrations inférieures à leur NOEC et EC01 (Silva *et al.*, 2002). Alors que chaque composé pris individuellement était inactif, combinés ensemble, le mélange entraînait un effet significatif sur la réponse du test YES.

Le concept de « *something from nothing* » introduit par cette étude, et confirmé par la suite (Rajapakse *et al.*, 2002; Scholze *et al.*, 2014; Seeger *et al.*, 2016), montre que, même à des concentrations très faibles, des molécules ciblant ER peuvent agir conjointement pour éliciter une réponse significative. De plus, les composés estrogéniques en mélanges peuvent influencer significativement la réponse de l'E2, que ce soit des mélanges binaires (Rajapakse *et al.*, 2001) ou de 11 faibles agonistes présents à leurs NOEC (Rajapakse *et al.*, 2002). Les effets aux faibles concentrations et les interactions avec les hormones endogènes montrent que les effets additifs des xéno-estrogènes sont importants à considérer dans l'évaluation du risque, et que l'absence de synergisme n'est pas synonyme d'absence d'effets.

Des déviations par rapport aux prédictions du modèle CA sont parfois reportées, ces effets étant généralement plus faibles qu'attendus et justifiés par l'activation d'enzymes du métabolisme (Silva *et al.*, 2011), par la présence de « modulateurs » ayant une estrogénicité minimale (Evans *et al.*, 2012) ou par l'addition de molécules interférentes (Frische *et al.*, 2009). A ce jour, un seul cas de synergisme majeur a été observé pour des mélanges de 2, 4 et 8 benzophénones testées à leurs NOEC et EC10 sur le test YES (Kunz and Fent, 2006). A l'exception de cette dernière étude, les déviations reportées ne dépassent généralement pas un facteur 5 par rapport à l'effet attendu, indiquant la robustesse du modèle de CA au regard de la variabilité biologique et expérimentale.

3.2.2 Mélanges de xeno-estrogènes *in vitro* et *in vivo* chez le poisson

Les études portant sur les effets combinés des xeno-estrogènes chez les poissons ont principalement évalué l'induction de la vitellogénine (mRNA ou VTG plasmatique) *in vitro* dans des cultures primaires d'hépatocytes (Petersen *et al.*, 2013; Petersen and Tollefsen, 2011) après 7 ou 14 jours d'exposition de poissons juvéniles (Correia *et al.*, 2007; Kunz and Fent, 2009; Thorpe *et al.*, 2003) ou adultes (Brian *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Peu d'études ont évalué l'induction de l'aromatase B *in vitro* (Hinfray *et al.*, 2016;) ou *in vivo* dans des lignées de poissons zèbres transgéniques au stade embryo-larvaire (Brion *et al.*, 2012; Hinfray *et al.*, 2016; Petersen *et al.*, 2013). La majorité des mélanges testés ne contenait pas plus de 5 molécules, avec généralement les hormones naturelles et de synthèse (E1, E2, E3, EE2), les alkylphenols (OP, NP) et le BPA présents en mélange équipotents. L'absence d'études évaluant l'additivité pour des

mélanges plus complexes (ex : 14 molécules, Scott *et al.*, 2017; ou 6 molécules, Crago *et al.*, 2015) se justifie par la nécessité d'avoir le profil d'activité de chaque molécule, ce qui exige du temps et des organismes plus le nombre de composés augmente, ce qui pose problème au regard de l'éthique et du bien-être animal.

Lorsque l'additivité a été évaluée avec le modèle CA, une bonne corrélation entre l'effet prédit et l'effet observé est généralement observée, indiquant l'absence d'interactions majeures entre molécules estrogéniques *in vivo* pour induire la vtg (Zhang *et al.*, 2009,2010, Sun *et al.*, 2009, Brian *et al.*, 2005, Thorpe *et al.*, 2001) ou l'aromatase B (Brion *et al.*, 2012; Petersen *et al.*, 2013). Brian *et al.* (2005) ont été les premiers à évaluer l'additivité d'un mélange de 5 composés *in vivo*. Ils ont montré que l'E2, EE2, NP, OP et le BPA en mélange équipotent à leur EC50, et en mélange à de très faibles concentrations (1/5 de l'EC50) avaient un effet additif sur l'induction de la VTG après 14 jours d'exposition de vairons à tête de boules adultes mâles. Une étude ultérieure a montré que ces mêmes 5 composés en mélange pouvaient affecter la fécondité des vairons à têtes de boules, même à des concentrations peu ou pas actives quand administrées isolément, illustrant les conséquences possibles sur la performance de la reproduction de poissons mâles de faibles concentrations de xeno-estrogènes (Brian *et al.*, 2007).

De légères déviations du modèle de CA sont parfois reportées *in vivo*, soit à fortes (Petersen *et al.*, 2013; Thorpe *et al.*, 2003) ou à faibles concentrations (Kunz and Fent, 2009). Les raisons proposées pour les déviations observées sont une métabolisation (Thorpe *et al.*, 2001) et une cytotoxicité plus importante (Petersen *et al.*, 2013; Thorpe *et al.*, 2003), ainsi qu'un possible antagonisme à faibles concentrations entre 3 filtres UV (Kunz and Fent, 2009).

3.2.3 Conclusion

Les composés estrogéniques en mélanges agissent majoritairement de manière additive sur l'activation des ER *in vitro* et sur l'induction de la vtg et de l'aromatase B *in vivo* chez le poisson. A la différence des molécules seules, l'effet d'un mélange dépend non seulement des concentrations de molécules présentes mais aussi du nombre de composés, de leur ratio et de leur puissance (Kortenkamp, 2007). Un même mélange peut induire des réponses différentes en fonction du modèle biologique, car chaque molécule n'y a pas nécessairement le même profil d'activité (ex: Evans *et al.*, 2012; Seeger *et al.*, 2016). Les xeno-estrogènes puissants (ex : E1, EE2)

étant généralement moins concentrés que les ligands faibles (ex : alkylphenols) dans l'écosystème aquatiques, la caractérisation des niveaux d'exposition est donc une étape essentielle pour évaluer le danger, et en conséquent le risque associé aux mélanges de xeno-estrogènes.

C. Bio-surveillance des xeno-estrogènes dans l'environnement

Cette partie présente tout d'abord le cadre législatif de la surveillance des ressources en eau en France avec l'implémentation de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE, Directive 2000/60/CE), et ses limites concernant l'évaluation de la contamination chimique des masses d'eau. Puis, les grands principes de la bio-analyse sont présentés et illustrés avec des exemples d'application dans l'évaluation la contamination de l'eau par les xeno-estrogènes.

1. Surveillance de l'eau en France

1.1 Introduction à la Directive Cadre sur l'Eau

Avec l'adoption de la DCE en 2000, transposée en loi nationale en 2004 (Loi n° 2004-338 du 21 avril 2004), et avec la loi sur l'eau et les milieux aquatiques (Loi n° 2006-1772 du 30 décembre 2006), la politique de la gestion de l'eau au niveau européen et national a sensiblement évoluée. A la différence des précédentes directives et lois, la DCE impose un cadre stratégique d'évaluation de l'état des masses d'eau à travers l'Europe avec une obligation de résultat : atteindre et maintenir le bon état des masses d'eau d'ici 2015. L'objectif initial de 2015 a été réévalué par la suite face aux difficultés d'implémentation au niveau national, prévu par le législateur dès le début (Directive 2000/60/CE, 2000). La DCE évolue par cycle de 6 ans, dont le premier s'est conclu en 2015 et le deuxième est en cours (2015 – 2021). En 2019 débutera la prochaine révision de la DCE pour préparer le 3^{ème} cycle de 2021-2027.

La DCE est une législation ambitieuse responsable d'un changement de paradigme important dans l'évaluation des ressources en eau (Voulvoulis *et al.*, 2017). Il n'est plus question de se restreindre au contrôle de la pollution, mais de considérer l'intégrité des écosystèmes aquatiques dans leur ensemble. Pour cela, la DCE reprend la notion d'évaluation de l'état de l'écosystème à l'échelle du bassin hydrographique, tel qu'appliqué en France depuis 1964, mais introduit de nouveaux objectifs de réduction de la pollution chimique et surtout de surveillance biologique.

Dans le cadre de la DCE, le bon état des eaux est déterminé sur la base du bon état chimique et écologique, tel que présenté dans la figure 12, en fonction des masses d'eau considérées (eau de surface : cours d'eau ou plan d'eau, eau littorale : côtière ou de transition, eau souterraine). Pour les eaux de surface, le bon état chimique est évalué sur le respect de normes de qualité environnementale (NQE) établies pour 45 molécules comprenant 33 molécules prioritaires (annexe X de la Directive 2000/60/CE et annexe II de la Directive 2008/105/CE) et 12 molécules prioritaires dangereuses (annexe I de la Directive 2013/39/CE). Le statut écologique est évalué par rapport à des masses d'eau de référence ne subissant pas ou peu de pressions anthropiques. Il est basé sur des éléments de qualité biologique (ex : macrophytes, ichthyofaunes), hydro-morphologiques (ex : régime hydrique), de qualité chimique et physico-chimiques (ex : température). Une fois les statuts chimique (2 catégories) et écologique (5 catégories) évalués, le statut du bassin hydrographique est déterminé par l'élément de qualité le plus mauvais (principe du « one-out-of-all »). Lorsque le bon état n'est pas atteint, une étude des pressions-impact doit être réalisée dans le but d'identifier les causes et d'entreprendre les mesures de restauration des masses d'eau nécessaires.

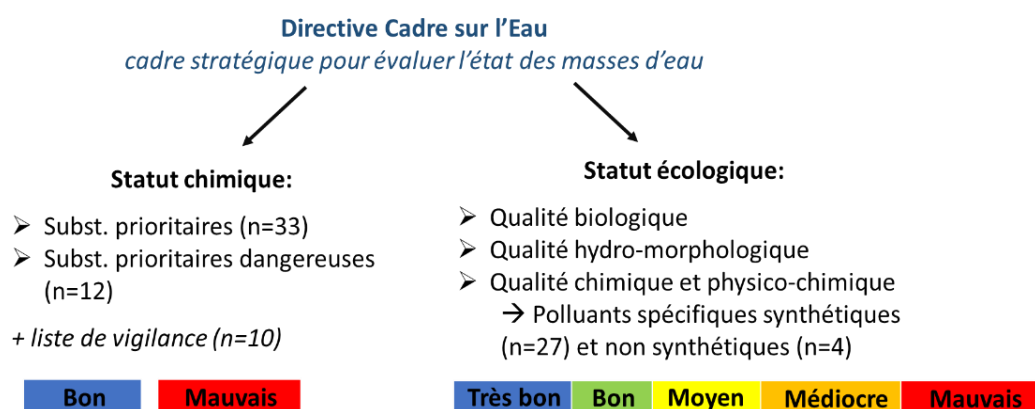


Figure 12: Principe de l'évaluation de l'état des masses d'eau de surface dans le cadre de la DCE en France.

A l'échelle nationale, on dénombre 12 bassins hydrographiques dont 7 en France métropolitaine, et autant d'agences associées. A chaque cycle de la DCE sont établis les schémas directeurs d'aménagement et de gestion des eaux (SDAGE) où sont définis le programme de mesures biologiques et chimiques, l'ensemble des stations du réseau de contrôle et de surveillance (la surveillance de base), et les plans de gestion du réseau de contrôle opérationnel (Carré *et al.*, 2017). En 2007, le réseau français comptait 2734 stations, avec 895 paramètres suivis

et plus de 4 million d'analyses faites par an, laissant entrevoir le coût et l'effort de gestion nécessaires pour répondre aux exigences de la DCE (Laronde and Petit, 2010).

1.2 Evaluation de la contamination chimique

1.2.1 Etat des lieux

La DCE impose un suivi régulier de 45 molécules à tous les états membres pour évaluer le statut chimique des masses d'eau avec comme critère de qualité le respect des NQE. Parmi ces 45 molécules régulées se trouvent les nonylphenols et octylphenols, régulées à cause de leurs activités PE (Sumpter and Jobling, 2013). En plus des molécules dangereuses, des polluants spécifiques de l'état écologique, définis comme « molécules pertinentes rejetées en quantité significative », ont été identifiés au niveau national pour chaque bassin hydrographique (Arrêté du 27 juillet 2015). La liste établie en 2015 pour la France contient 27 molécules (« polluants synthétiques ») et 4 métaux (« polluants non synthétiques ») surveillés spécifiquement dans certains bassins hydrographiques dans le cadre de l'évaluation de l'état écologique. Dans le cadre d'une surveillance prospective de la contamination de l'eau, la France a lancé un plan national de lutte contre les micropolluants dans la continuité de précédentes actions (Plan micropolluants 2016-2021 pour préserver la qualité des eaux et de la biodiversité, 2016). De plus, au niveau réglementaire, la France s'est dotée d'une liste de vigilance nationale comprenant 98 composés à quantifier dans les eaux de surface de métropole, parmi lesquelles certains PE comme les phtalates, les bisphenols A et S, l'estrone et la norethindrone (Arrêté du 7 août 2015).

1.2.2 Limites

L'inclusion d'une nouvelle molécule à surveiller dans le cadre de la DCE est un processus lent qui nécessite que le danger et l'exposition à la molécule en question soient bien caractérisés. Lors de la révision de la DCE en 2013 a été mis en place un système de liste de vigilance (« watch list ») avec l'objectif d'obtenir suffisamment de données de qualité sur la présence de certains polluants dans les eaux de surface européennes pour statuer sur leur inclusion future dans la DCE. La liste de vigilance est limitée à 10 molécules et est réévaluée tous les deux ans, une molécule ne pouvant y rester plus de 4 ans. Les informations d'occurrence obtenues doivent permettre au

législateur de statuer sur leur possible réglementation à l'échelle européenne au regard du danger qu'elles présentent.

Etablie en 2015, la première liste de vigilance contient 10 molécules dont deux hormones, l'E2 et l'EE2 (Commission Implementing Decision (EU) 2015/495). Même si les concentrations en l'E2 et l'EE2 dans les eaux de surface sont très faibles (Johnson *et al.*, 2013), ces molécules peuvent impacter les poissons qui y sont exposés chroniquement. En conséquence, les NQE proposées sont particulièrement basses : 0,4 ng/L et 0,035 ng/L pour l'E2 et l'EE2, respectivement. La quantification de ces composés à des concentrations aussi faibles au sein d'échantillons complexes nécessite l'utilisation de techniques analytiques très performantes, ce qui pose clairement un défi analytique (Hannah *et al.*, 2009; Loos, 2015).

Au total, on dénombre aujourd'hui 45 molécules prioritaires, 10 molécules sur la liste de vigilance européenne, 98 molécules sur la liste de vigilance française, et 27 polluants spécifiques de l'état écologique, soit près de 200 composés à surveiller légalement dans les masses d'eau françaises de métropole. Aussi longue sera la liste, elle ne pourra jamais être exhaustive de la contamination environnementale et prendre en compte toutes les molécules inconnues, telles que les produits de transformation et de dégradation ou les métabolites potentiellement dangereux. Concernant le risque posé par les xeno-estrogènes, il a été montré que l'E2 présent à des concentrations inférieures au seuil réglementaire proposé peut provoquer une réponse significative *in vitro* au sein de mélanges comprenant de multiples polluants environnementaux, estrogéniques et non estrogéniques (Carvalho *et al.*, 2014). Même à des concentrations considérées réglementairement comme protectrices, des effets de mélanges peuvent avoir lieu, démontrant les limites de l'approche actuelle basée sur les molécules prises individuellement.

Depuis plusieurs années, les outils biologiques, comprenant les bio-essais, sont proposés comme outils intégrateurs permettant de mieux rendre compte de la contamination chimique des masses d'eau (Brack *et al.*, 2017; Wernersson *et al.*, 2015). Les bio-essais permettent de prendre en compte les effets de mélange de molécules inconnues et de palier ainsi certaines limites inhérentes à l'analyse chimique ciblée.

2. Stratégie de bio-analyse pour évaluer les xeno-estrogènes

2.1 Principe général de la bio-analyse

Dans les approches de bio-analyse, l'objectif est de combiner les avantages des bio-essais et l'analyse chimique ciblée afin d'obtenir une vision de la contamination la plus holistique possible. Le tableau V présente les avantages et inconvénients de chaque méthode. Grâce aux analyses chimiques ciblées, il est possible d'identifier de nombreux composés au sein des échantillons, même présents sous forme de traces. Cependant cette technique ne permet pas d'avoir des informations sur le profil toxicologique des composés identifiés, ni de leurs potentiels effets de mélanges, à la différence des bio-essais qui fournissent une information biologique. En prenant en considération les effets combinés de polluants, les bio-essais permettent de pallier certaines limites de l'analyse chimique montrant leur complémentarité, et donc les avantages d'utiliser les deux approches en parallèle.

Tableau V: Avantages et inconvénients des bio-essais et de l'analyse chimique ciblée

	Avantages	Inconvénients
Bio-essais	<ul style="list-style-type: none"> -rapide -peu couteux -sensible -facile à mettre en place -donne une information toxicologique -prend en compte les effets de mélange 	<ul style="list-style-type: none"> -pas d'identification directe des composés actifs possible -peu de normalisation des procédures et méthodes -pas intégré à un cadre législatif
Analyse chimique ciblée	<ul style="list-style-type: none"> -sensible -spécifique à certaines molécules -identification possible des composés présents -méthode connue des régulateurs et gestionnaires 	<ul style="list-style-type: none"> - Peut être difficile à mettre en place et couteux : matériel de pointe et du personnel expérimenté - Ne détecte que ce qu'on recherche - Ne donne pas d'information sur les effets des molécules identifiées

Le principe de la bioanalyse est présenté dans la figure 13. De la même manière que pour une molécule seule, l'extrait organique est testé avec plusieurs dilutions afin d'obtenir une dose réponse. Le potentiel estrogénique est évalué en calculant l'équivalent toxique biologique (Bio-TEQ). Le bio-TEQ correspond au ratio de l'ECx de la molécule de référence sur l'ECx de l'échantillon, tel que présenté dans la figure 13.

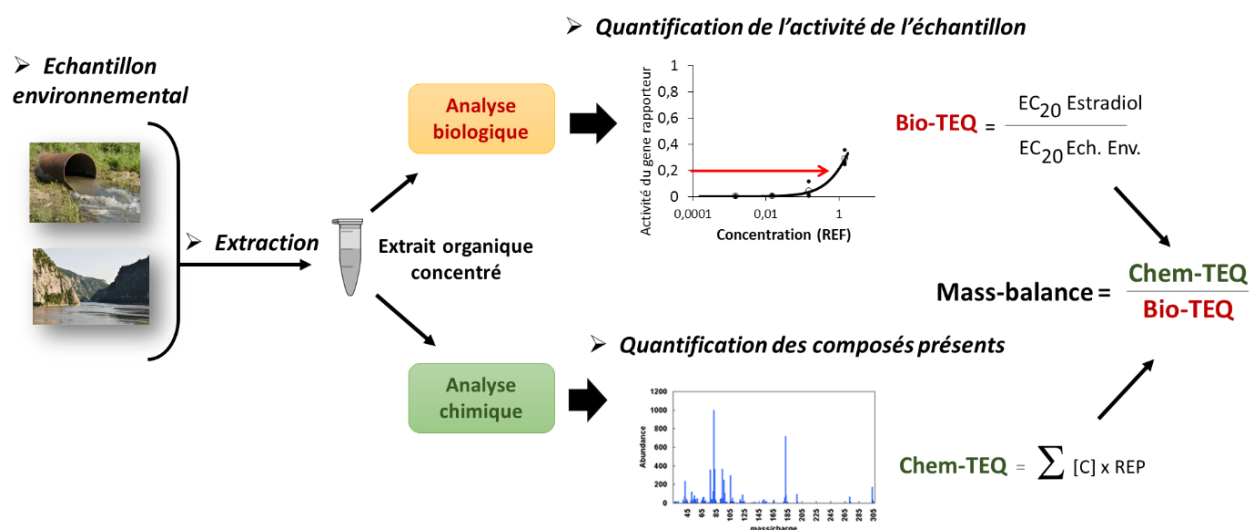


Figure 13: Principe général de la bio-analyse. Approche combinant analyses chimique et biologique pour l'évaluation de la présence de contaminants spécifiques dans un échantillon environnemental. Bio-TEQ : équivalent toxique biologique, Chem-TEQ : équivalent toxique chimique, MB: mass-balance.

L'approche des TEQ repose sur l'hypothèse que les molécules agissent de manière additive (Van den Berg *et al.*, 1998). Grâce à l'identification des composés actifs au sein de l'échantillon par analyse chimique ciblée, il est possible de calculer un équivalent toxique chimique (chem-TEQ) en additionnant les concentrations de composés actifs pondérés par leur puissance relative (REP), tel que présenté dans la figure 13. La comparaison des équivalents toxiques dérivés par la biologie et la chimie permet d'estimer la contribution des molécules identifiées à la réponse biologique mesurée (approche par « mass-balance »).

Dans le cas de l'activité estrogénique, la molécule de référence est généralement l'E2 et les TEQ sont exprimés en E2-équivalent (E2-Eq, Wagner *et al.*, 2013). Il existe dans la littérature de nombreuses méthodes pour dériver une ECx, comme les modélisations de dose-réponses linéaires (ex: Escher *et al.*, 2014) ou log-logistique (Creusot *et al.*, 2016). S'il n'existe pas de protocole de référence concernant le choix de l'ECx pour dériver les TEQ et les REP (Wagner *et al.*, 2013), l'utilisation d'EC10 ou d'EC20 est généralement préférée afin de considérer l'activité d'échantillons faiblement actifs pour lesquels une dose-réponse complète n'est pas obtenue.

Un autre point clé de la bio-analyse porte sur l'échantillonnage : le choix de la matrice (ex : eau, sédiment, biote) et du type d'échantillonnage. Pour les échantillons d'eau, des prélèvements ponctuels sont souvent réalisés, car simples à mettre en place, même si des capteurs passifs sont

aussi utilisés afin d'intégrer les flux de polluants au cours du temps. Pour les échantillons d'eau de surface ponctuels, une étape de concentration est souvent réalisée pour faciliter l'analyse. L'extraction en phase solide (« solid phase extraction » SPE) permet de capturer une large gamme de polluants organiques (ex : phase HLB), et elle est le plus souvent utilisée dans des démarches de bio-analyses. Récemment, un nouvel appareil permettant de combiner échantillonnage et extraction SPE in situ a été développé (Schulze *et al.*, 2017). Apportés sur site, cet appareil permet d'extraire de grands volumes (50L à 1000L, « large volume SPE » LV/SPE), de concentrer des matrices très diluées comme les eaux de surface, et de palier certains problèmes liés à l'échantillonnage et au stockage d'échantillons ponctuels (Schulze *et al.*, 2017).

2.2 Applications environnementales

De nombreux outils biologiques sont utilisés pour évaluer l'état de contamination des masses d'eau. Cette partie se focalise sur l'utilisation des tests de transactivation pour évaluer l'activité estrogénique des échantillons d'effluents de stations d'épuration et d'eau de surface, et de leur intégration dans une démarche de bio-monitoring incluant des approches spécifiques au poisson.

2.2.1 Estrogenicité des effluents de stations d'épuration

Des exemples d'études évaluant l'activité estrogénique d'effluents de stations d'épuration urbaines sont présentées dans le tableau VI. Dans la très grande majorité des échantillons d'effluents de STEP testés, une activité estrogénique a été mesurée avec des niveaux variant de 0,03 à 98 ng/L E2-Eq, et en moyenne quelques ng/L E2-Eq (tableau VI).

La variabilité entre les niveaux mesurés peut s'expliquer par différents facteurs liés à la période d'échantillonnage (ex : Aerni *et al.*, 2004) et à l'effluent, comme le type de STEP, le nombre d'habitants desservis par la STEP, l'existence ou non d'un traitement secondaire/tertiaire, etc. Le type de bio-essai peut, dans une moindre mesure, influencer la mesure finale. Par exemple, les E2-Eq quantifiés avec le test YES étaient en moyenne plus élevés que dans le test HEK-hER α (Pawlowski *et al.*, 2003). De récentes études inter-laboratoires comparant l'activité de plusieurs bio-essais *in vitro* montrent que la variabilité inter-tests est faible et que les niveaux d'activité

estrogénique quantifiés pour différents types d'échantillons se corrèlent bien (Kunz *et al.*, 2017, Käse *et al.*, 2017).

Tableau VI: Exemple d'études évaluant l'activité oestrogénique d'effluents de stations d'épuration urbaine. Les concentrations sont reportées en ng/L E2-Eq. (n): STEP urbaines et industrielles. LD : limite de détection. N : nombre d'échantillon.

Pays	N	Test	LD	Concentration (n actif/total)	Moyenne	Référence
Europe	75 ⁿ	MVLN	0,5	0,53 -17,9 (27/75)	0,9	(Jarošová <i>et al.</i> , 2014b)
France	4	MELN	-	2 – 24 (4/4)	12	(Cargouët <i>et al.</i> , 2004)
France	1	MELN	0,03	2,8 (1/1)	2,8	(Miège <i>et al.</i> , 2009)
France	6	MELN	0,09	1,9 – 8,2 (6/6)	3,9	(Creusot <i>et al.</i> , 2010a)
Etats-Unis	4	T47D-KBluc	-	1,3-2,0 (4/4)	1,5	Wehmas <i>et al.</i> , 2011
Pays Bas	13 ⁿ	ER-CALUX	0,136	< LD – 2,59 (12/13)	-	(Vethaak <i>et al.</i> , 2005)
Pays Bas	10	ER-CALUX	-	0,03 – 16,1 (9/10)	2,6	(Murk <i>et al.</i> , 2002)
		YES	-	0,095 – 15,8 (9/10)	3,1	
Canada	18 ⁿ	YES	-	9-98 (16/18)	48,9	(Fernandez <i>et al.</i> , 2007)
Suède	19	YES	0,1	0,1 - 14,9 (16/19)	4,9	(Svenson <i>et al.</i> , 2003)
Japon	3	YES	-	0,6-5,2 (3/3)	3,47	(Nakada <i>et al.</i> , 2004)
		YES	-	1,1 – 20,2 (9/9)	10,0	
Allemagne	9	HEK-hER α	-	0,1- 2,1 (9/9)	0,56	(Pawlowski <i>et al.</i> , 2003)
		HEK-hER β	-	0,028 – 2,7 (9/9)	0,77	

Les estrogènes stéroïdiens, en particulier l'E1, l'E2 et l'EE2, sont les principaux contributeurs de la réponse biologique mesurée (Desbrow *et al.*, 1998; Miège *et al.*, 2009; Nakada *et al.*, 2004; Snyder *et al.*, 2001). Lorsque d'autres xeno-estrogènes sont présents, ils contribuent en général moins à l'activité estrogénique quantifiée du fait de leur faible potentiel estrogénique (REP) par rapport aux estrogènes stéroïdiens (Aerni *et al.*, 2004; Jarošová *et al.*, 2014b; Nakada *et al.*, 2004).

2.2.2 Estrogénicité des eaux de surface

A la différence des effluents urbains, où la contamination par les xeno-estrogènes est relativement bien caractérisée, les eaux de surface reçoivent des contaminants de plusieurs sources, diffuses et ponctuelles, drainés tout au long du bassin versant et constituant des mélanges variables. Le tableau VII présente des exemples d'études évaluant l'activité estrogénique des eaux de surface à travers le monde. Les niveaux d'activité reportés sont généralement plus faibles que dans les effluents (< 1ng/L E2-Eq).

Tableau VII: Exemples d'études évaluant l'activité estrogénique d'échantillons ponctuels d'eau de surface à travers le monde. Les activités estrogéniques sont exprimées en ng/L E2-Eq. LOQ : limite de quantification, n : nombre d'échantillons.

Pays	n	Test utilisé	LOQ	Activité estrogénique (Échantillons actifs)	Moyenne	Référence
USA	6	T47D-KBluc	0,1	0,13 – 4,72 (6/6)	1,17	(Cavallin <i>et al.</i> , 2014)
USA	32	T47D-KBluc	0,032	0,095 – 116 (32/32)	5,9	(Conley <i>et al.</i> , 2017)
		BL-YES	0,2	0,24 – 4,1 (24/32)	1,2	
USA	38	T47D-KBluc	-	0,02 – 295 (35/38)	-	(Alvarez <i>et al.</i> , 2013)
		YES	-	0,05-4610 (9/38)	-	
Chine	12	YES	-	0,67-136 (10/12)	34,7	(Chen <i>et al.</i> , 2016)
Europe	18	MELN	0,024	0,04 – 1,85 (14/18)	0,43	(Tousova <i>et al.</i> , 2017)
France	7	MELN	-	0,30-4,52 (7/7)	1,07	(Cargouët <i>et al.</i> , 2004)
France	8	MELN	0,03	~ 1 (3/8)	~1	(Miège <i>et al.</i> , 2009)
USA	6	MCF-7 +ERE-LUC	1,4	6,8 (1/6)	6,8	(Kassotis <i>et al.</i> , 2015)
Australie	8	ER α -CALUX	0,016	0,03-0,15 (8/8)	~0,1	(Roberts <i>et al.</i> , 2015)
Pays-Bas	90	ER-CALUX	0,136	LD – 0,166 (85/90)	-	(Vethaak <i>et al.</i> , 2005)
République tchèque	10	hER α -Hela-9903	-	0,02-2,07 (9/10)	-	(Prochazkova <i>et al.</i> , 2017)

Aux Etats-Unis, Conley *et al.* (2017) constatent que les échantillons les plus actifs (3/23) provenaient de sites où les rejets de STEP constituaient 50 à 100% de la rivière. De nombreuses études ont de fait étudié l'impact des rejets de STEP sur les niveaux d'estrogénicité des eaux de surface. Par exemple, dans de petits cours d'eau suisses, Neale *et al.* (2017) montrent qu'il y a une activité estrogénique 2 à 5 fois plus forte en aval qu'en amont du rejet de l'effluent de STEP urbaine qui constitue 20% du débit de la rivière. Une observation similaire est faite pour la Seine en aval de la STEP d'Achères qui draine 8 millions d'équivalent habitants, avec une activité mesurée 6 fois plus élevée en aval qu'en amont (Cargouët *et al.*, 2004). Ces études confirment que les effluents de STEP peuvent contribuer de manière significative à l'estrogénicité des cours d'eau.

En plus de la quantité de molécules déversées par les rejets de STEP, ou provenant d'autres sources, le débit de la rivière est un facteur qui peut fortement influencer la concentration en polluants dans les eaux, et donc l'activité estrogénique mesurée (Johnson, 2010). Les niveaux d'activité estrogénique détectés varient d'un facteur 4 à 100 entre été/hiver (Afrique du Sud, Truter *et al.*, 2016) et entre période sèche/humide (Chine, Chen *et al.*, 2016). De la même manière,

Alvarez *et al.* (2013) observent une activité estrogénique plus forte dans les rivières proches de zones d'épandage d'engrais animal après des épisodes de pluies.

Dans les échantillons d'eau de surface, l'estrone est le composé le plus souvent retrouvé comme contributeur principal de l'activité estrogénique des eaux de rivières. L'E2 et l'EE2 sont en revanche beaucoup moins fréquemment détectés dans les rivières, à la différence des échantillons provenant d'effluents de STEP urbaines (ex : Conley *et al.*, 2017, Kassotis *et al.*, 2015, Chen *et al.*, 2016). Cependant, malgré une bonne sensibilité analytique, les composés identifiés ne suffisent pas toujours à expliquer la réponse biologique observée. Dans l'étude d'Alvarez *et al.* (2013), 69% des 38 échantillons étaient inférieurs à la limite de détection en analyse chimique ciblée pour les estrogènes stéroïdiens (LD=0,8 ng/L), alors que seulement 5% était négatif en *in vitro* avec le test T47D-KBLuc. D'autres xeno-estrogènes, tels que le bisphénol A (ex : Chen *et al.*, 2016) ou des phyto-estrogènes (ex : Prochazkova *et al.*, 2017), sont aussi retrouvés mais ils contribuent généralement très peu à l'activité mesurée. Dans l'étude de Chen *et al.* (2016), 10% à 65% de l'estrogénicité des 10 échantillons reste inexpliquée, alors que le BPA, E2, EE2, E1, DES, OP, et NP ont été recherchés et parfois quantifiés. De la même manière, les 10 molécules actives recherchées et parfois quantifiées dans l'étude de Tousova *et al.* (2017) n'ont permis d'expliquer de 1% à 77% de l'activité mesurée.

L'inadéquation entre molécules quantifiées et réponse mesurée *in vitro* peut être due à plusieurs facteurs comme la présence de molécules actives non identifiées par les analyses chimiques ciblées (Chen *et al.*, 2016), non recherchées (Prochazkova *et al.*, 2017) ou présentes à des concentrations inférieures à la LOQ (Alvarez *et al.*, 2013). De plus, l'approche par mass balance est basée sur l'hypothèse que les molécules ont des effets additifs, or la co-occurrence d'activités estrogénique et anti-oestrogénique dans certaines études (ex : Kassotis *et al.*, 2015; Tousova *et al.*, 2017) soulèvent la question d'interactions entre polluants environnementaux au sein de l'échantillon pour un bio-essai donné.

2.2.3 Utilisation de bio-essais poisson pour évaluer l'estrogénicité

La majorité des études réalisées jusqu'à présent ont été faites avec des bio-essais basés sur le récepteur ER α humain. Malgré des différences de sensibilité aux xéno-estrogènes entre ER humain et ichthyens (Aerni *et al.*, 2004; Cosnefroy *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2014), peu d'études

ont utilisés des bio-essais basés sur ER de poisson dans des démarches de bio-monitoring. Cependant, lorsque les réponses des bio-essais basé sur ER humain et sur ER poisson ont été comparées, des différences sont parfois constatées (Ihara *et al.*, 2014; Rutishauser *et al.*, 2004; Sonavane *et al.*, 2016). Dans le cas de Ihara *et al.* (2014), les échantillons de STEP étaient actifs sur les bio-essais basés sur ER α humain et ER α du medaka, mais les niveaux d'activité étaient parfois très différents. Les estrogènes stéroïdiens quantifiés ne permettaient pas d'expliquer ces différences, mais la présence d'une activité anti-estrogénique bien distincte entre les deux modèles semble contribuer aux différences observées. De plus, l'activité estrogénique mesurée *in vitro* sur le récepteur ER α du médaka corrélait mieux avec l'induction de la *vtg1* et de la *ChgH* *in vivo* chez le médaka mâle, que l'activité mesurée sur le modèle *in vitro* exprimant le récepteur hER α .

D'autre part, des bio-essais *in vitro* et *in vivo* basés sur le modèle du poisson zèbre ont été comparés avec un test MELN pour évaluer l'activité estrogénique d'échantillons d'eau de surface (Sonavane *et al.*, 2016). Alors que 12 des 20 échantillons étaient détectés par les tests *in vitro* humain (MELN) et poisson zèbre (ZELH-zfER β 2), 8 étaient sélectivement actifs sur le modèle ZELH-zfER β 2, qui expriment le sous-type zfER β 2, spécifique au poisson. De plus, l'activité de 3 échantillons parmi les plus estrogéniques a été confirmée *in vivo* sur des embryons de poisson zèbre transgénique *cyp19a1b-GFP* (Brion *et al.*, 2012), parmi lesquels un site était sélectivement actif sur les modèles poisson zèbre *in vitro* et *in vivo* (Sonavane *et al.* 2016). Jusqu'à présent, les tests embryo-larvaires avec des poissons transgéniques n'avaient été utilisés que sporadiquement et de manière qualitative pour évaluer l'activité estrogénique d'échantillons d'effluents de STEP (Kurauchi *et al.*, 2005) ou d'eau de surface (Gorelick *et al.*, 2014). Pour la première fois, l'activité estrogénique d'un échantillon environnemental a pu être quantifiée *in vivo* chez le poisson (Neale *et al.*, 2017b; Sonavane *et al.*, 2016).

2.2.4 Intégration des bio-essais dans un cadre législatif

La mesure de l'activité estrogénique n'est pas une finalité en soi, mais une étape pour évaluer la qualité chimique de l'eau. Pour intégrer les bio-essais dans une démarche de bio-surveillance, un cadre d'utilisation doit être établi. Différentes approches ont été récemment proposées pour combiner analyses chimiques ciblées et bio-analyse dans l'évaluation de la qualité

des milieux, à l'instar de Vethaak *et al.* (2017) pour l'évaluation du milieu marin et Van der Oost *et al.* (2017) pour l'évaluation des eaux de surface. Dans le cas de l'activité estrogénique, l'intégration des bio-essais passe par la définition d'une valeur seuil d'activité estrogénique. Les valeurs récemment proposées ont été établies pour des TA basés sur hER α à partir des données de toxicité chronique chez organismes aquatiques (Van der Oost *et al.*, 2017), et en particulier chez le poisson (Jarošová *et al.*, 2014a; Kunz *et al.*, 2015). Cependant, leur intégration dans un cadre législatif nécessite qu'un cadre applicatif soit clairement défini (ex : action déclenchée en cas de dépassement).

3. Conclusions et défis

Ces dernières années, de très nombreuses études environnementales ont montré l'utilité des bio-essais *in vitro* pour l'évaluation de l'estrogénicité des milieux. Si leur intérêt pour la surveillance de la qualité chimique des milieux, en complément des analyses chimiques ciblées, n'est plus contestée, il n'en demeure pas moins que certaines questions de recherche doivent être encore adressées pour améliorer le diagnostic fourni par ces outils et permettre leur utilisation future en bio-surveillance environnementale. Des études récentes comparant modèles humains et poissons suggèrent que les bio-essais ne donnent pas nécessairement le même diagnostic de la contamination par les xeno-estrogènes. La différence de réponse pourrait être liée aux spécificités de chaque modèle biologique : ER poisson ou humain, cellules mammifères ou cellules de poisson, et *in vitro* vs *in vivo*. Comprendre ces différences et leurs conséquences sur le diagnostic environnemental est nécessaire pour permettre une utilisation optimale des bio-essais dans l'évaluation de la qualité de l'eau.

DEMARCHE EXPERIMENTALE

A. Objectif

L'objectif général de ce travail s'inscrit dans une démarche d'évaluation des bio-essais *in vitro* et *in vivo* basés sur le poisson zèbre pour détecter et quantifier les xeno-estrogènes dans l'environnement aquatique, en adressant spécifiquement les différences inter-modèles humain et poisson zèbre.

La démarche expérimentale de la thèse est représentée dans la figure 14 et s'articule autour de 3 grandes parties: (1) l'évaluation de d'échantillons environnementaux d'eau de surface, (2) l'évaluation de polluants environnementaux communément retrouvés et pour lesquels peu d'information est disponible, (3) la caractérisation des effets de xeno-estrogènes modèles en présence de polluants environnementaux, estrogéniques et non estrogéniques, en mélanges simples et (4) au sein d'échantillons environnementaux.

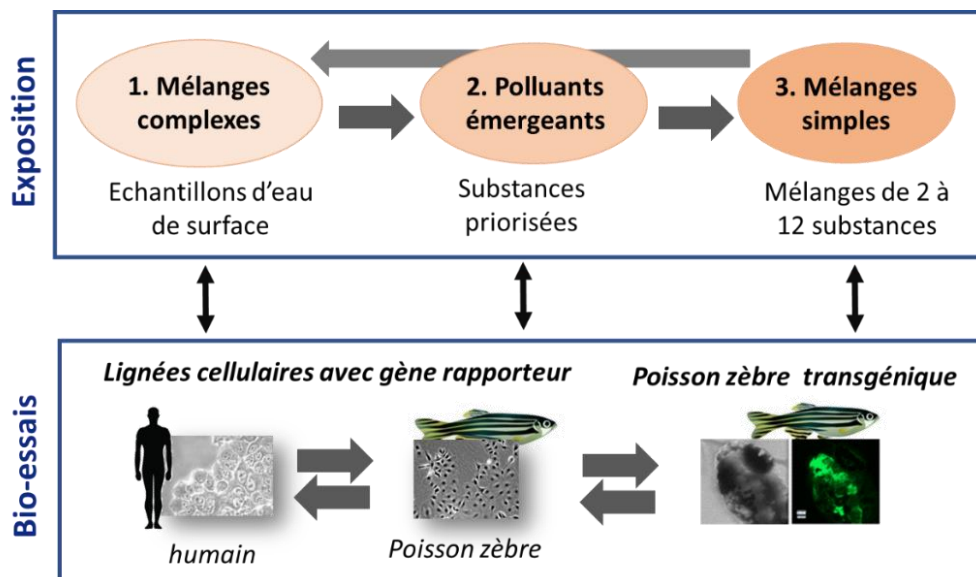


Figure 14: Démarche expérimentale de la thèse

B. Le projet SOLUTIONS

La thèse s'est effectuée en partie dans le cadre du programme européen FP-7 SOLUTIONS qui a servi de cadre applicatif des différents outils, en particulier concernant les polluants et les échantillons environnementaux.

1. Présentation

Le projet SOLUTIONS (www.solutions-project.eu, 2013-2018) regroupe plus de 40 partenaires européens et internationaux autour de la recherche et du développement de nouveaux outils, modèles et méthodes pour la gestion des polluants émergents dans les milieux aquatiques (Brack *et al.*, 2015). Le projet est divisé en 4 grands sous-projets (SP), présentés dans la figure 15: « concepts et solutions », « outils », « approches de modélisation », et enfin les « cas d'étude » pour confronter les outils et la modélisation à des situations environnementales (Brack *et al.*, 2015).

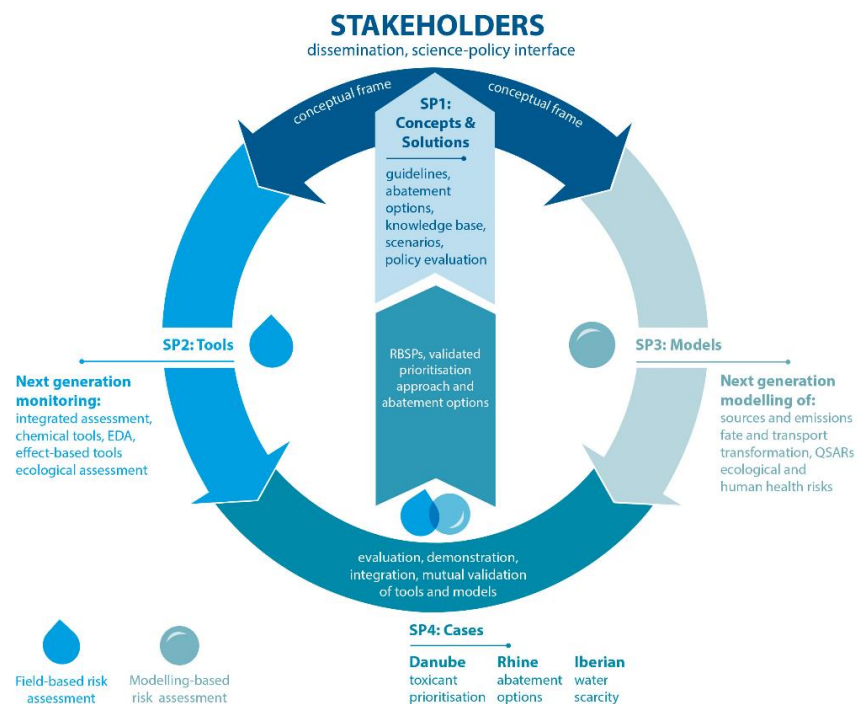


Figure 15: Représentation schématique de la structuration du projet européen SOLUTIONS (issu de Brack *et al.*, 2015).

Dans le cadre de la thèse, nous avons participé aux sous-projets « outils » et « cas d'études » avec comme objectifs de développer, appliquer et valider les bio-essais pour le monitoring environnemental. Une présentation schématique de la démarche utilisée est illustrée dans la figure 16. Tout d'abord, un travail de priorisation de molécules a été réalisé sur la base de données d'occurrence de contaminants dans l'environnement, leur mode d'action et leurs effets (Busch *et al.*, 2016). Les molécules priorisées ont été ensuite évaluées, seules puis en mélanges pour tester la capacité des bio-essais à détecter et quantifier les polluants d'intérêt au sein de mélanges représentatifs d'une situation environnementale. Dans le cadre du programme SOLUTIONS, de nombreux bio-essais couvrant de multiples paramètres, *in vitro* et *in vivo* ont été évalués (Altenburger *et al.*, 2015).

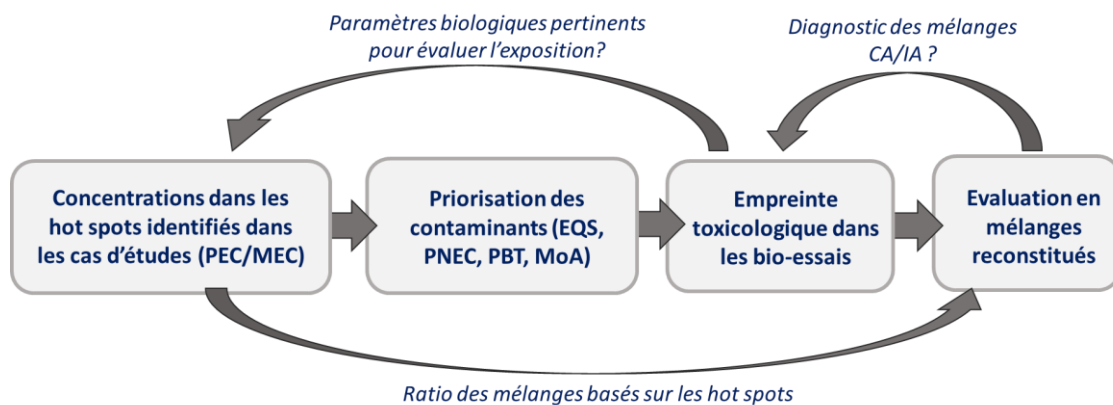


Figure 16: Démarche du work package de SOLUTIONS dédiés aux bio-essais (adapté de Altenburger *et al.*, 2015a)

2. Implications dans le cadre de la thèse

2.1 Choix des molécules

Dans le cadre du projet SOLUTIONS, une liste de 100 molécules priorisées a été établie à partir des données d'occurrence et de toxicité aiguë de 900 molécules recherchées dans trois bassins versants (travail de priorisation par Busch *et al.* 2016). Tenant compte de la faisabilité et des avis d'experts, cette liste a été réduite à 34 molécules, qui comprenaient entre autres des composés industriels, médicaments, pesticides et composés naturels. Ces molécules ont été testées au sein du groupe de travail « outils » afin d'obtenir l'empreinte toxicologique de polluants

environnementaux à l'aide d'une batterie de bio-essais couvrant de nombreux paramètres. Nous avons été impliqués avec les bio-essais MELN, PXR, ZELH α , ZELH β 2 et cyp19a1b-GFP.

2.2 Présentation des cas d'étude

Les bio-essais ont été appliqués dans deux cas d'études : le Joint Danube Survey 3 (JDS3) et Novi Sad. Leurs principales caractéristiques sont présentées dans le tableau VIII. Dans les deux cas, il s'agit d'échantillons d'eau de surface du Danube, prélevés et extraits sur place avec un appareil qui permet d'extraire en phase solide de grands volumes d'eau sur site (LVSPE, *large volume SPE*), particulièrement adapté pour des milieux très dilués comme le Danube (Schulze *et al.*, 2017).

Tableau VIII: Caractéristiques principales des cas d'étude du Danube et de Novi Sad

	Joint Danube Survey 3 (JDS3)	Novi Sad
Lieu	Bassin versant du Danube (14 pays)	Novi Sad (ville de 300 000 habitants, Serbie)
Type d'échantillon	Eau : Danube + affluents majoritaires	Eau : Danube
Date	Été 2013	Automne 2014
Echantillonnage	LVSPE : Extraction in situ	LVSPE : extraction in situ
Volume échantillonné	300 à 500 L	850 à 1000 L
Type d'étude	Pollution diffuse : étude longitudinale	Impact d'une source ponctuelle : amont et aval de rejet de STEP
Particularité	Joint Danube Survey 3 (JDS3) : campagne exceptionnelle qui a lieu tous les 6 ans	L'effluent non traité de la ville est directement rejeté dans le Danube
Nb d'échantillons	22 + blancs	3 + blancs
Nb de composés détectés au moins 1 fois/recherchés	94/272	125/276
Bio-essais utilisés à l'INERIS	PXR, MELN, ZELH β 2	MELN, ZELH β 2, zf-cyp19a1b-GFP

La JDS est une campagne exceptionnelle qui a lieu tous les 6 ans (2001 – 2007 – 2013), réalisée sur tout le Danube depuis l'Allemagne jusqu'à la mer Noire et qui a pour but d'obtenir des données harmonisées de qualité sur l'état du milieu aquatique à l'échelle du bassin versant. L'effort de coordination transnational des pays traversés par le Danube vise à améliorer la gestion du fleuve et à répondre aux exigences de la Directive Cadre sur l'Eau (Liška *et al.*, 2015). La répartition des stations d'échantillonnage est présentée dans la figure 17.



Figure 17 : Sites échantillonnés (points rouges) dans le cadre de la JDS3 (issu de Neale *et al.*, 2015)

La ville de Novi Sad, située sur le Danube, est la deuxième plus grande ville de Serbie avec près de 300 000 habitants. Elle a été choisie comme cas d'étude dans le cadre du projet SOLUTIONS car les eaux usées de la ville sont rejetées sans traitement dans le Danube (König *et al.*, 2017). A la différence de la JDS3, le but de cette étude était d'évaluer l'impact d'un rejet ponctuel de polluants sur la rivière.

C. Méthodologie

1. Modèles cellulaires *in vitro*

Les lignées cellulaires utilisées dans le cadre de la thèse sont présentées dans le tableau IX.

Tableau IX: Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées dans le cadre de la thèse

Lignée	Espèce	Tissu	Lignée cellulaire parentale	Récepteur	Molécule de référence	Référence
MELN	Humain	Cancer du sein	MCF-7	hER α	E2	Balaguer <i>et al.</i> 1999
ZELH α	Poisson zèbre	Foie	ZFL	zfER α	E2	Cosnefroy <i>et al.</i> 2012
ZELH β 1	Poisson zèbre	Foie	ZFL	zfER β 1	E2	Cosnefroy <i>et al.</i> 2012
ZELH β 2	Poisson zèbre	Foie	ZFL	zfER β 2	E2	Cosnefroy <i>et al.</i> 2012
HG5LN-hPXR	Humain	Cancer du col de l'utérus	HeLa	hPXR chimérique	SR12813	Lemaire <i>et al.</i> , 2006

Toutes les lignées cellulaires du tableau IX sont des tests de transactivation. Elles ont été stablement transfectées avec le récepteur d'intérêt qui contrôle l'expression du gène rapporteur de la luciférase. Le principe général des tests *in vitro* est présenté dans la figure 18. Les expériences sont faites en triplicats et la réponse des cellules est systématiquement vérifiée en testant la molécule de référence en dose-réponse.

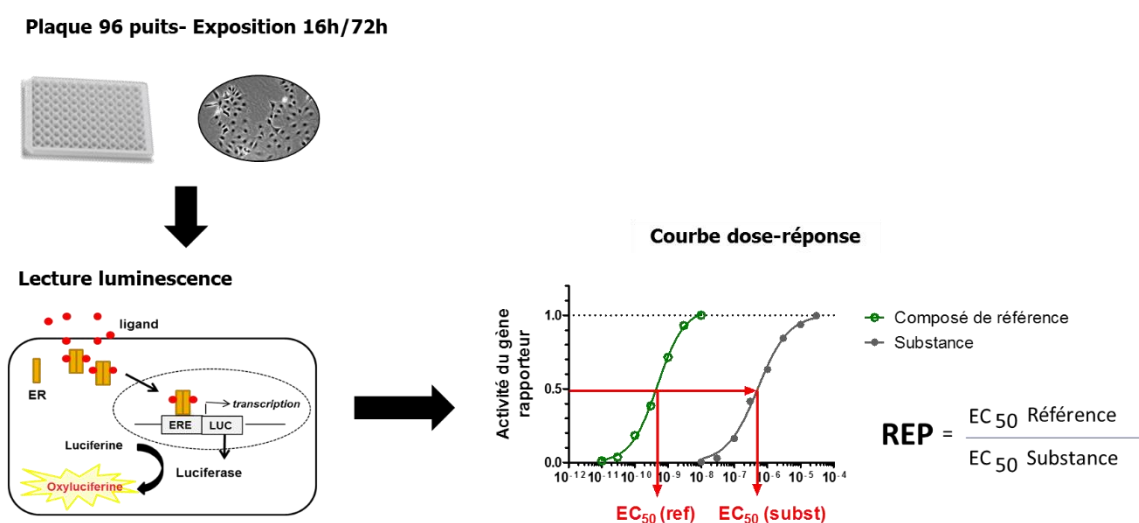


Figure 18: Représentation schématique de l'évaluation de l'activité d'une molécule dans les tests *in vitro*.

1.1 Lignée cellulaire ZELH-zfER

Les cellules ZELH α , ZELH β 1 et ZELH β 2 sont des cellules ZFL (issues d'une culture primaire d'hépatocytes de poisson zèbre) qui ont été d'abord stablement transfectées avec le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur synthétique ERE (produisant la lignée stable ZELH, sans récepteur), puis avec chaque sous-type de zfER (Cosnefroy *et al.*, 2012). Ces lignées ont été établies à l'INERIS (Cosnefroy, 2011) et caractérisées avec divers xeno-estrogènes connus (Cosnefroy *et al.*, 2012, thèse M. Sonavane, 2015).

Dans les cellules ZFL, aucune expression de zfER n'est détectée (Cosnefroy, 2011). Cependant, elles ont conservé une voie AhR inductible (Creusot *et al.*, 2015; Eide *et al.*, 2014; Wentworth *et al.*, 2004). De plus, le profil métabolique (enzymes de phase II) des ZFL est similaire à celui de cultures primaires d'hépatocytes de poisson zèbre, bien que quantitativement moins important (Le Fol *et al.*, 2015).

1.2 Lignée cellulaire MELN

La lignée MELN (Balaguer *et al.*, 1999) a été utilisée comme modèle humain d'évaluation de l'estrogénicité. Les cellules MELN sont dérivées de la lignée de cellules de cancer du sein MCF-7 qui expriment de manière endogène importante le récepteur hER α , mais pas de hER β fonctionnel (Balaguer, communication personnelle). La lignée MELN a été établie par transfection stable du gène rapporteur de la luciférase sous contrôle d'un promoteur synthétique ERE répondant à l'activation de hER α . La lignée MELN est bien caractérisée et est utilisée depuis longtemps pour évaluer des molécules seules (Balaguer *et al.*, 1999; Pillon *et al.*, 2005) et des échantillons environnementaux (Creusot *et al.*, 2013; Kinani *et al.*, 2010).

1.3 Lignée cellulaire PXR

La lignée HG5LN-hPXR a également été évaluée comme méthode biologique de détection de la présence de xénobiotiques dans le cadre du projet SOLUTIONS car cette lignée est sensible à de nombreuses familles de polluants environnementaux (Creusot *et al.*, 2010a; Lemaire *et al.*, 2006; Mnif *et al.*, 2007). Le récepteur pregnane-X (PXR) est un récepteur nucléaire qui, une fois activé, induit la transcription d'enzymes du métabolisme et particulièrement le CYP3A4,

responsable du métabolisme d'un grand nombre de médicaments chez l'Homme (Lemaire *et al.*, 2006).

La lignée a été établie à partir de cellules Hela de cancer du col de l'utérus, stablement transfectées une première fois avec le gène de la luciférase sous contrôle d'un promoteur synthétique Gal4 (cellules HG5LN) puis avec le récepteur PXR chimérique comprenant le domaine de liaison à l'ADN du Gal4 combiné au domaine de liaison au ligand (LBD) du PXR (Lemaire *et al.*, 2006). La protéine Gal4 est un facteur de transfection de la levure, son utilisation avec le LBD du hPXR permet de détecter spécifiquement son activation par des ligands de PXR sans interaction avec d'autres voies de signalisation intracellulaires potentiellement ciblées par le PXR (Lemaire *et al.*, 2006).

2. Modèle *in vivo* : le test EASZY

Le test EASZY (Endocrine Active Substance, acting through estrogen receptors, using transgenic *cyp19a1b*-GFP Zebrafish embryos) a été mis en place au cours de la dernière décennie au sein de l'INERIS (Brion *et al.*, 2012). Il est basé sur l'utilisation d'embryons de poisson zèbre transgéniques qui expriment la GFP sous le contrôle du promoteur du gène *cyp19a1b* qui code pour l'AroB. Chez le poisson, l'AroB présente la double particularité d'avoir une forte expression limitée aux cellules gliales radiales (progéniteurs des neurones) et d'être sous le contrôle exclusif de ER (Menuet *et al.*, 2005 ; Le Page *et al.*, 2008). La transcription du gène *cyp19a1b* est induite après fixation du récepteur ER activé sur l'ERE et du recrutement d'un facteur glial spécifique (Glial X factor) au niveau du Glial x factor Response Element (GxRE). L'activation de ER entraîne une boucle d'autorégulation positive qui permet d'augmenter la sensibilité de la détection au stade embryonnaire chez le poisson zèbre.

Le déroulement du test est présenté dans la figure 19. Les embryons (20 œufs/cristallin) sont exposés à partir de 3 heures post-fertilisation (hpf) jusqu'à 96 hpf, dans 25 mL de milieu pour les molécules seules (15 mL pour les échantillons environnementaux). Le témoin positif utilisé est l'éthinyl estradiol (EE2) à une concentration de 0,05 nM. Le milieu est renouvelé entièrement chaque jour. La lecture de la fluorescence se fait à J4 en photographiant la tête de chaque embryon (grossissement x10) en vue dorsale avec un microscope à fluorescence (Zeiss AxioImager.Z1

équipé d'un AxioCam Mrm camera Zeiss). Chaque photographie est analysée (AxioVision Imaging software) puis la fluorescence est quantifiée (ImageJ software). La densité de fluorescence détectée dans chaque image est ensuite validée manuellement.

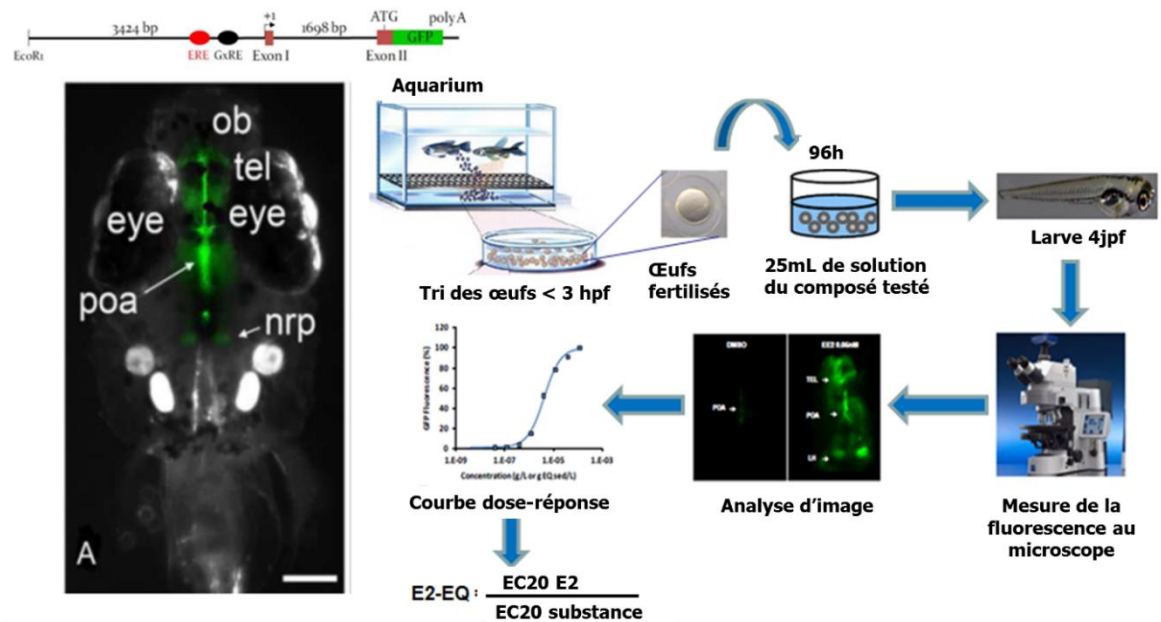


Figure 19: représentation schématique du test EASZY pour évaluer l'estrogénicité de molécules. Hpf : heure post-fécondation, jpf : jour post fécondation

3. Sensibilité des bio-essais

La sensibilité des modèles *in vitro* et *in vivo* pour évaluer l'estrogénicité est présentée dans le tableau X avec comme exemples, l'E2 et l'EE2.

Tableau X: Sensibilité des bio-essais à l'estradiol (E2) et à l'ethinyl estradiol (EE2). EC50 en nM (ng/L). Données issues de Brion et al., 2012 et Cosnefroy et al. 2012.

	Humain	Poisson zèbre			Test ESAZY
	MELN	ZELH α	ZELH β 1	ZELH β 2	
E2	0,02 (8,2)	0,2 (54)	0,03 (8,2)	0,02 (14)	0,5 (140)
EE2	0,015 (4,4)	0,13 (38)	0,03 (8,9)	0,03 (8,9)	0,01 (3,0)

Tous les modèles ont une très bonne sensibilité pour les estrogènes stéroïdiens (EC50 < nM) et sont donc adaptés pour la comparaison inter-espèces. *In vitro*, les lignées cellulaires MELN,

ZELH β 1, ZELH β 2 sont les plus sensibles. L'activité de l'EE2 est beaucoup plus importante *in vivo* dans le modèle de poisson zèbre transgénique *cyp19a1b-GFP* qu'*in vitro*, quelle que soit la lignée cellulaire considérée.

4. Analyse des données

4.1 Molécules seules

Les données expérimentales ont été normalisées entre 0 et 1 en soustrayant le niveau basal d'activité (control solvant) rapporté au niveau du témoin positif, tel que présenté dans l'équation (1). Les données expérimentales ont été ensuite analysées en utilisant l'équation de Hill dans la Macro Excel Regtox 7.0.7®, téléchargeable gratuitement à www.normalesup.org/~vindimian/fr_download.html. Dans le cas des molécules seules, les EC_x (EC pour « Effective Concentration » = concentration induisant X % de l'effet maximum induit par la molécule) ont été dérivées en modélisant les données avec le minimum fixé à 0. Dans le cas où aucun plateau d'activité n'était atteint (i.e. courbes incomplètes), le maximum de la modélisation a été fixé à 1 pour dériver des PC_x (PC pour « Positive Control » = concentration induisant x % de l'effet maximal induit par la molécule de référence).

$$\text{Effet} = \frac{\text{signal}_{\text{molécule/échantillon}} - \text{signal}_{\text{contrôle solvant}}}{\text{signal}_{\text{témoin positif}} - \text{signal}_{\text{contrôle solvant}}} \quad (1)$$

4.2 Echantillons environnementaux

Dans les cas des échantillons environnementaux, les données ont été systématiquement normalisées entre 0 et 1, comme pour les molécules seules, puis modélisées en fixant le minimum à 0, le maximum à 1 et utilisant la pente de la molécule de référence. Les valeurs dérivées sont des PC₂₀, utilisées pour calculer les Bio-TEQ, d'après la formule de la fig. 20. Afin d'évaluer la contribution des composés identifiés dans les échantillons à la réponse biologique mesurée (approche par « mass-balance », voir introduction C-2.2.1) des équivalents biologiques (Chem-

TEQ) ont été calculés. Pour cela, les PC20 (effet maximum <1) ou les EC50 (effet maximal = 1) des molécules individuelles ont été utilisées pour calculer les REP (REP= ECx référence/PCx molécule).

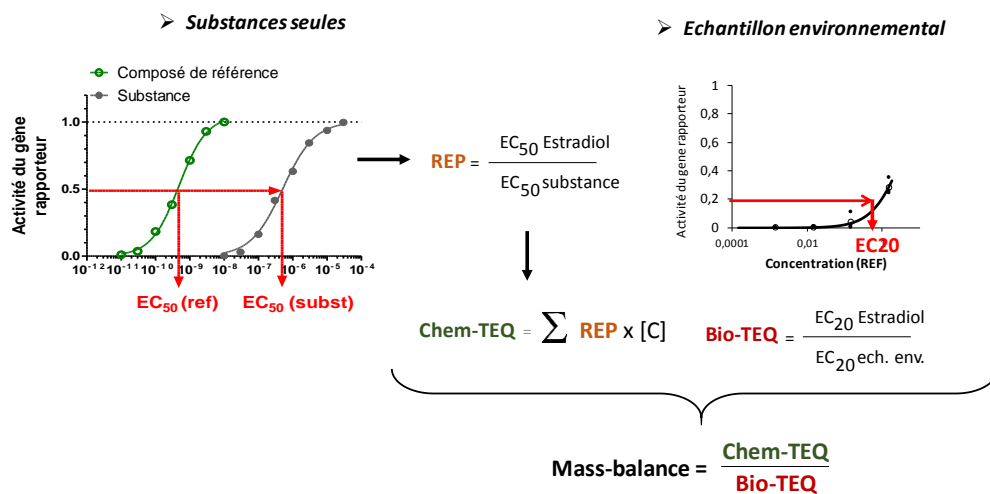


Figure 20: Principe du calcul d'équivalents biologique (Bio-TEQ) et chimique (Chem-TEQ) pour évaluer l'activité estrogénique d'un échantillon environnemental et déterminer la contribution des molécules actives quantifiées. REP : puissance relative de la molécule, [C] : concentration de la molécule dans l'échantillons.

4.3 Mélanges reconstitués

Dans le cadre de la thèse, nous avons été amenés à prédire et à évaluer les effets combinés des xéno-estrogènes en mélanges reconstitués. Les composés estrogéniques partagent un mode d'action similaire (activation de ER) bien décrit par le modèle d'addition des concentrations (CA), que nous avons utilisé ici. L'équation 2 (issu de Scholze *et al.*, 2014) illustre la formule utilisée pour prédire les effets additifs, avec C_i la concentration de la molécule i dans le mélange et EC_{xi} l'effet de la molécule i à la concentration C_i :

$$\sum_{i=1}^n \left(\frac{C_i}{EC_{xi}} \right) = 1 \quad (2)$$

Dans un premier temps, les données ont été modélisées à l'aide d'équations logistiques (Logit, Probit, Weibull, d'après Scholze *et al.*, 2001) utilisées dans le logiciel GraphPad Prism (v5), puis les paramètres dérivés ont ensuite été entrés dans une feuille de calcul Excel pour prédire les effets combinés. Les équations et la feuille de calcul Excel ont été établis et fournis par M. Scholze (Université de Brunel, UK) lors du workshop de 3 jours dédié à l'évaluation et à la prédiction des effets de mélanges, organisé dans le cadre du projet SOLUTIONS.

RESULTATS

A. Les bio-essais dans la bio-surveillance : apports et besoins

Un nombre important d'études a montré la faisabilité et la pertinence de l'utilisation bio-essais *in vitro* basés sur le récepteur hER pour évaluer l'œstrogénicité de matrices environnementales. Pour les matrices les plus concentrées, telles que les rejets d'eaux usées, l'intégration des bio-essais au sein d'approches bio-analytiques en combinaison avec des analyses chimiques ciblées a permis d'identifier les principaux contributeurs, i.e. les hormones stéroïdiennes. En revanche, il existe beaucoup moins d'information sur les niveaux d'activité estrogénique et l'identité des molécules responsables de la réponse mesurée dans un contexte de multi-contamination plus diffus, tel que les rivières et fleuves.

Dans le cadre du projet SOLUTIONS, nous avons appliqué le bio-essai MELN pour évaluer l'estrogénicité d'échantillons d'eau du Danube, fleuve représentatif d'un contexte de multi-contaminations avec une forte capacité de dilution. La comparaison des réponses mesurées avec l'analyse de plus de 250 polluants a permis d'identifier certains contributeurs chimiques mais a également permis de mettre en avant le manque d'information sur de nombreuses molécules, informations nécessaires pour mieux caractériser ce type de matrice.

1. Article n°1: *“Linking in vitro effects and detected organic micropollutants in surface water using mixture toxicity modelling”*

1.1 Contexte et objectif

De nombreux bio-essais sont aujourd'hui disponibles pour évaluer la qualité chimique de l'eau. Dans le cadre du projet SOLUTIONS, un panel de bio-essais reflétant différents modes d'action a été utilisé pour évaluer l'activité biologique de 25 échantillons d'eau de surface du Danube prélevés dans le cadre de la troisième campagne du programme international de surveillance du Danube (« Joint Danube Survey 3 », JDS3, Liška *et al.*, 2015). Dans cette campagne, les prélèvements ont été réalisés depuis l'Autriche jusqu'à la mer Noire. Entre 300 et 500 L d'eau ont été prélevés et extraits *in situ* par LVSPÉ, puis analysés dans les bio-essais et par analyses

chimiques (voir démarche expérimentale, B.2.2). Un des objectifs spécifiques de l'étude était d'évaluer la proportion de l'activité biologique mesurée expliquée par les molécules retrouvées. Pour cela, les résultats des bio-essais ont été comparés aux analyses de plus de 250 polluants recherchés dans les échantillons d'eau et dont 94 ont été quantifiés. Dans cette étude collaborative, nous avons contribué avec les bio-essais MELN et HG5LN-hPXR.

1.2 Principaux résultats

Les résultats du criblage d'échantillons montrent que les niveaux d'estrogénicité détectés par les MELN dans le Danube sont relativement faibles (< 0,1 ng/L E2-Eq), à l'exception du site JDS41 où il atteint 1,24 ng/L E2-Eq. Ce site est situé à la confluence de la Velika Morava et du Danube et a été identifié comme un site particulièrement pollué lors la JDS3 (Liška *et al.*, 2015). L'estrone et dans une moindre mesure la génistéine sont les principaux contributeurs de l'activité estrogénique mesurée. Cependant, dans la majorité des échantillons actifs (11/15), ils permettent d'expliquer moins de 20% de la réponse biologique mesurée, et particulièrement pour le site JDS41.

Dans la lignée PXR, une activité biologique est mesurée à 20 des 22 sites, comprise entre 0,125 et 4,61 ng/L SR-Eq. Les 13 molécules actives quantifiées expliquent moins de 0.1% de la réponse mesurée. De la même manière, les composés retrouvés n'expliquent que très peu la réponse des bio-essais sur le stress oxydant (test ARE-*bla*), l'activation de p53 (test p53RE-*bla*) et sur la mortalité embryonnaire (« fish embryo toxicity test »).

De manière générale, cette première évaluation montre que les bio-essais apportent une information complémentaire à l'analyse chimique en mesurant des mélanges de molécules actives non identifiées par la chimie analytique ciblée. Cependant, ces résultats mettent aussi en avant l'absence d'information sur l'activité de la grande majorité des molécules retrouvées dans les échantillons, suggérant la présence de molécules actives non identifiées jusqu'à présent.

1.3 Conclusion

- Les MELN peuvent détecter de faibles niveaux d'activité estrogénique
- Si l'estrone semble un contributeur majeur de l'activité estrogénique des eaux de surface à de nombreux sites, l'activité estrogénique reste parfois mal expliquée par les analyses ciblées
- Il existe un manque important d'informations sur l'activité estrogénique de nombreuses molécules retrouvées dans les échantillons environnementaux

Linking in Vitro Effects and Detected Organic Micropollutants in Surface Water Using Mixture-Toxicity Modeling

Peta A. Neale,^{*,†,‡} Selim Ait-Aissa,[§] Werner Brack,^{||,#} Nicolas Creusot,[§] Michael S. Denison,[⊥] Björn Deutschmann,[#] Klára Hilscherová,[∇] Henner Hollert,[#] Martin Krauss,^{||} Jiří Novák,[∇] Tobias Schulze,^{||} Thomas-Benjamin Seiler,[#] Helene Serra,[§] Ying Shao,[#] and Beate I. Escher^{‡,||,○}

[†]Smart Water Research Centre, School of Environment, Griffith University, Southport QLD 4222, Australia

[‡]National Research Centre for Environmental Toxicology (Entox), The University of Queensland, Brisbane QLD 4108, Australia

[§]Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques INERIS, Unité d'Ecotoxicologie, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

^{||}UFZ – Helmholtz Centre for Environmental Research, 04318 Leipzig, Germany

[⊥]Department of Environmental Toxicology, University of California, Davis, California 95616, United States

[#]Department of Ecosystem Analysis, Institute for Environmental Research, RWTH Aachen University, 52074 Aachen, Germany

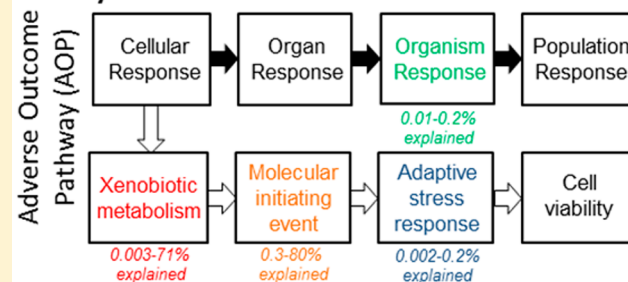
[∇]Research Centre for Toxic Compounds in the Environment (RECETOX), Masaryk University, Kamenice 753/S, 62500 Brno, Czech Republic

[○]Environmental Toxicology, Center for Applied Geosciences, Eberhard Karls University Tübingen, 72074 Tübingen, Germany

Supporting Information

ABSTRACT: Surface water can contain countless organic micropollutants, and targeted chemical analysis alone may only detect a small fraction of the chemicals present. Consequently, bioanalytical tools can be applied complementary to chemical analysis to detect the effects of complex chemical mixtures. In this study, bioassays indicative of activation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR), activation of the pregnane X receptor (PXR), activation of the estrogen receptor (ER), adaptive stress responses to oxidative stress (Nrf2), genotoxicity (p53) and inflammation (NF-κB) and the fish embryo toxicity test were applied along with chemical analysis to water extracts from the Danube River. Mixture-toxicity modeling was applied to determine the contribution of detected chemicals to the biological effect. Effect concentrations for between 0 to 13 detected chemicals could be found in the literature for the different bioassays. Detected chemicals explained less than 0.2% of the biological effect in the PXR activation, adaptive stress response, and fish embryo toxicity assays, while five chemicals explained up to 80% of ER activation, and three chemicals explained up to 71% of AhR activation. This study highlights the importance of fingerprinting the effects of detected chemicals.

How much of the biological effect can be explained by detected chemicals in surface water?



INTRODUCTION

Human-impacted rivers can contain a complex mixture of micropollutants, such as pharmaceuticals, pesticides, and industrial compounds, as well as their transformation products.^{1,2} The sources of these contaminants can include both point sources, such as wastewater effluent discharge, and diffuse sources, such as runoff from urban and agricultural areas.³ Given the diversity of micropollutants in water, targeted chemical analysis alone is insufficient to detect all chemicals present in the aquatic environment. Bioanalytical tools complement chemical analysis because they can provide information about the biological effects of chemicals present in a sample and reveal the presence of active compounds not detected by targeted analysis.

In vitro bioassays based on various cellular response pathways, including induction of xenobiotic metabolism,

receptor-mediated effects, adaptive stress responses, and cytotoxicity, have been applied to detect the presence of micropollutants in water samples.⁴⁻⁶ Although the activation of these endpoints does not necessarily translate into higher-level effects, biological response at the cellular level is a key step in the adverse outcome pathway.⁷ Furthermore, bioassays indicative of xenobiotic metabolism and repair and defense mechanisms can be applied as sensitive tools to detect the presence of micropollutants because effects in these endpoints often occur at lower concentrations than those causing cell death or damage.

Received: August 22, 2015

Revised: October 29, 2015

Accepted: October 30, 2015

Published: October 30, 2015

Bioanalytical tools also have the advantage that they can take into account mixture effects among chemicals rather than focusing on individual chemicals. The mixture effects that occur among chemicals can be categorized as concentration addition or independent action for chemicals acting according to the same or a different mode(s) of action, respectively, both of which assume no interaction among the mixture components, or synergism or antagonism, where the mixture components can interact.⁸ For environmental samples, such as surface water, which can contain many chemicals at low concentrations, synergism is rare; instead, concentration addition has been suggested as a conservative approach to evaluate the mixture toxicity of multicomponent mixtures not only for receptor-mediated effects⁹ but also for adaptive stress responses¹⁰ and cytotoxicity.¹¹ Mixtures that act in a concentration additive manner can be described using the bioanalytical equivalent concentration (BEQ) concept, which represents the concentration of a reference compound that elicits an equivalent response in a particular assay as the sample and can be determined from both bioassays and chemical analysis. By comparing the BEQ from bioanalysis (BEQ_{bio}) and the BEQ from chemical analysis (BEQ_{chem}), it is possible to determine the contribution of detected chemicals to the biological effect.¹² This approach has been applied to a wide range of water types including surface water,^{13,14} wastewater,^{6,14,15} recycled water,¹⁶ and swimming-pool water.¹⁷

In this study, a suite of bioanalytical tools was applied to water samples from the human-impacted Danube River. The BEQ concept was utilized as a simple mixture effect prediction model to determine the contribution of detected chemicals to the biological effect. The battery of bioassays follows previous recommendations on the selection of sensitive indicator bioassays that cover endpoints related to different stages of cellular toxicity pathways, including the induction of xenobiotic metabolism and receptor-mediated effects representing important molecular initiating events, as well as adaptive stress responses and cytotoxicity or other apical endpoints.⁴ Bioassays indicative of specific modes of action, such as estrogenic activity, have previously shown that a small number of chemicals often explain a high proportion of the biological effect in wastewater,^{14,16,18} but less is known about the explanatory power of known chemicals in other endpoints.

Activation of the ligand-dependent transcription factor aryl hydrocarbon receptor (AhR) was assessed using the CAFLUX assay.¹⁹ Although most applications focus on dioxin-like compounds, which are unlikely to be found in the water phase due to their hydrophobicity, around 16% of the 320 environmental compounds examined by Martin et al.²⁰ were found to induce AhR-dependent gene expression. Activation of the pregnane X receptor (PXR), which is an important factor in xenobiotic metabolism regulation, was assessed using the HGSLN-hPXR assay, and 73% of chemicals studied in Martin et al.²⁰ activated PXR. Activation of the estrogen receptor (ER) was assessed using the reporter gene MELN assay. A suite of bioassays indicative of adaptive stress responses reacting to oxidative stress (ARE-*bla*), genotoxicity (p53RE-*bla*), and inflammation (NF- κ B-*bla*) were also included. Adaptive stress response pathways are activated to restore the cell to homeostasis after damage.²¹ The oxidative stress response is mediated by Nrf2 and the antioxidant response element,²² and 26% of the 1859 chemicals in the United States Environmental Protection Agency (USEPA) ToxCast database were active in the ARE-*bla* assay.²³ The p53 response is activated after DNA damage, leading to either repair

or apoptosis,²⁴ and activation of p53 can indicate the presence of genotoxic carcinogens.²⁵ Approximately 15% of chemicals in the ToxCast database were active in the p53RE-*bla* assay.²³ The NF- κ B pathway is an important driver of the inflammatory response and can target cytochrome P450s, cytokines, and apoptosis regulators,²¹ and 3% of chemicals in the ToxCast database induced a response in the NF- κ B-*bla* assay.²³ Finally, the fish embryo toxicity (FET) test using zebrafish was applied complementary to the cell-based bioassays because it can provide information about the organism-level response. Apical endpoints in this test include embryo coagulation and lack of heartbeat,²⁶ and a recently published database containing 641 chemicals showed that 74% of reviewed chemicals caused mortality in the FET test.²⁷

The current study aimed to assess what fraction of the biological effects of the cellular toxicity pathway can be explained by the quantified chemicals with available effect data. We used samples from a large water body with high dilutions and low levels of micropollutants and stemming from very diverse sources to test the hypothesis that in these water types, there is typically not a dominant chemical or chemical group; instead, the effects are largely driven by the mixture effects of many chemicals. Large-volume solid-phase extraction (LVSPE) water extracts from the Danube River were analyzed in the bioassays introduced above to determine BEQ_{bio}. The effect analysis was complemented with targeted chemical analysis of 272 water relevant chemicals, including pesticides, pharmaceuticals, artificial sweeteners, steroidal hormones, and industrial compounds. The target list is by no means comprehensive but is based on previous targeted and nontargeted analysis of the Danube River.²⁸ Effect concentrations for the individual detected chemicals were collected from the literature to determine BEQ_{chem}. By comparing BEQ_{bio} and BEQ_{chem}, it was possible to determine the extent to which the detected chemicals contributed to the mixture effect in each bioassay.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Sampling. Sampling occurred during the third Joint Danube Survey (JDS3)²⁹ between August and September of 2013 using LVSPE (Maxx GmbH, Rangendingen, Germany).³⁰ The sampling locations, which included both the Danube River and its tributaries, are shown in Table S1 and Figure S1, along with detailed information about sample enrichment and extraction. Briefly, up to 500 L of water was passed through a stainless-steel chamber containing neutral sorbent Chromabond HR-X, anionic exchanger Chromabond HR-XAW, and cationic exchanger Chromabond HR-XCW (Macherey-Nagel, Dueren, Germany). After extraction, each solid phase was freeze-dried and then extracted with solvents, and the eluates were combined. The sample aliquots were reduced to dryness via rotary and nitrogen evaporation prior to shipping and then resuspended in either DMSO or methanol, depending on the assay.

Chemical Analysis. Target-screening analysis of the JDS sample extracts for 264 chemicals was performed by liquid chromatography high-resolution mass spectrometry (LC–HRMS) using an Agilent 1200 LC coupled to a Thermo LTQ Orbitrap XL. Analysis was run in both positive- and negative-mode electrospray ionization. For further details, see Hug et al.³¹ A total of eight steroidal hormones and industrial phenolic compounds were analyzed by LC–MS/MS using an Agilent 1260 LC coupled to a ABSciex QTrap 6500 instrument operated in negative-mode electrospray ionization. Further details are

Table 1. Overview of Bioassays Used in the Current Study

endpoint	assay	method reference	positive reference compound	maximum REF	data evaluation method	EC or LC value
activation of AhR	CAFLUX	Nagy et al. ¹⁹	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD)	500	linear concentration-effect curve	EC ₁₀
activation of PXR	HGSLN-hPXR	Lemaire et al. ⁴³ Creusot et al. ¹⁵	SR 12813 ^a	500	linear concentration-effect curve	EC ₁₀
activation of ER	MELN	Balaguer et al. ⁴⁴ Kinani et al. ⁴⁵	17β-estradiol	500	linear concentration-effect curve	EC ₁₀
oxidative stress response	ARE- <i>bla</i>	Invitrogen ⁴⁶	<i>tert</i> -butylhydroquinone (tBHQ)	500	linear concentration-effect curve	EC _{IR1.5}
p53 response	p53RE- <i>bla</i>	Neale et al. ⁴⁷	mitomycin	500	linear concentration-effect curve	EC _{IR1.5}
NF-κB response	NF-κB- <i>bla</i>	Jin et al. ⁴⁸	tumor necrosis factor alpha (TNFα)	250	linear concentration-effect curve	EC _{IR1.5}
mortality	Fish embryo toxicity (FET)	OECD ²⁶	3,4-dichloroaniline	1000	log–logistic concentration-effect curve	LC ₅₀

^aTetraethyl 2-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)ethenyl-1,1-bisphosphonate.

provided in Section S2 and Table S2. A full list of analyzed chemicals is provided in Table S3, along with method detection limits (MDL) for each chemical in units of nanogram per liter. For mixture modeling, the detected chemical concentration was converted to molar units.

Bioanalysis. Information about the studied bioassays and the derivation of effect concentrations can be found in Table 1 and Section S3. The data was expressed in units of relative enrichment factor (REF), which takes into account the sample enrichment by LVSPE and dilution in the assays. The data was expressed as concentration causing 10% effect (EC₁₀), effect concentration causing an induction ratio (IR) of 1.5 (EC_{IR1.5}), or concentration causing 50% mortality (LC₅₀). Linear concentration-effect curves were used to determine EC₁₀ and EC_{IR1.5}, while LC₅₀ was evaluated using log–logistic concentration-effect curves.⁴ Cytotoxicity was assessed in parallel for the AhR, ER, oxidative stress response, p53 response, and NF-κB assays, and cell viability EC₁₀ values were derived from log–logistic concentration-effect curves.³²

Bioanalytical Equivalent Concentrations. The LC and EC values were converted to BEQ_{bio} using eq 1 with the LC₅₀ or EC₁₀ or EC_{IR1.5} value of the reference compound (ref) and the matching LC₅₀ or EC₁₀ or EC_{IR1.5} value of the extract only.

$$\text{BEQ}_{\text{bio}} = \frac{\text{LC}_{50}(\text{ref})}{\text{LC}_{50}(\text{extract})} \text{ or } \frac{\text{EC}_{10}(\text{ref})}{\text{EC}_{10}(\text{extract})} \text{ or } \frac{\text{EC}_{\text{IR1.5}}(\text{ref})}{\text{EC}_{\text{IR1.5}}(\text{extract})} \quad (1)$$

The BEQ concept has been typically applied to log–logistic concentration-effect curves; however, for many environmental samples, linear concentration-effect curves may be more suitable for data evaluation. This is because environmental samples may only induce low effects and to obtain the 50% effect concentration one would have to either use an unfeasibly high enrichment factor or extrapolate the concentration-effect curves. For linear concentration-effect curves to remain valid, they should reach no more than 20 to 30% effect or have an IR no greater than 5 to ensure that they remain in the linear range of the curve. Linear concentration-effect curves have previously been shown to be a robust data evaluation method for environmental samples, individual chemicals, and chemical mixtures.¹⁰ It must be stressed that the BEQ concept is only valid if the slopes of the sample and reference compound are parallel in log–logistic concentration-effect curves.³³ However, parallel

slopes are not a requirement for linear concentration-effect curves with a common intercept at the effect axis because the BEQ is the ratio between concentrations at a given effect level and is, therefore, independent of the effect level. The EC value from a linear concentration-effect curve was calculated using eq 2 using the example of EC₁₀, but the same equation is applicable for EC₂₀; for example, with 20% used instead of 10% or EC_{IR1.5} with an IR of 1.5 as the effect benchmark. BEQ can then be calculated using eq 3, and although this example is for EC₁₀, this ratio is constant across the entire linear concentration-effect curve range.

$$\text{EC}_{10} = \frac{10\%}{\text{slope}} \quad (2)$$

$$\begin{aligned} \text{BEQ}_{\text{bio}} &= \frac{\text{EC}_{10}(\text{ref})}{\text{EC}_{10}(\text{extract})} \\ &= \frac{10\% \cdot \text{slope}(\text{extract})}{\text{slope}(\text{ref}) \cdot 10\%} \\ &= \frac{\text{slope}(\text{extract})}{\text{slope}(\text{ref})} \end{aligned} \quad (3)$$

To calculate BEQ_{chem}, it was first necessary to determine the relative effect potency (REP_i) of the detected chemicals (i). Because the EC values for the detected chemicals were generally provided as EC₅₀ values in the literature, it was necessary to use EC₅₀ values derived from log–logistic concentration-effect curves for the AhR, PXR, and ER assays. REP_i was calculated using eq 4, with the LC₅₀, EC₅₀, or EC_{IR1.5} value of the reference compound and the matching LC₅₀, EC₅₀, or EC_{IR1.5} value of detected chemical i.

$$\text{REP}_i = \frac{\text{LC}_{50}(\text{ref})}{\text{LC}_{50}(i)} \text{ or } \frac{\text{EC}_{50}(\text{ref})}{\text{EC}_{50}(i)} \text{ or } \frac{\text{EC}_{\text{IR1.5}}(\text{ref})}{\text{EC}_{\text{IR1.5}}(i)} \quad (4)$$

All LC values for the detected chemicals in the FET test were collected from Scholz et al.,²⁷ and the EC values were collected from the peer-reviewed literature (AhR, PXR, and ER assays) or the ToxCast database (oxidative stress response, p53 response, and NF-κB assays),²³ which includes over 1800 compounds in over 800 different assays. All ToxCast data was re-evaluated to determine EC_{IR1.5} using linear concentration-effect curves. Because each chemical in the ToxCast database was run multiple times, it was possible to determine the mean EC_{IR1.5} value and the associated standard deviation. BEQ_{chem} was

calculated for each JDS sample using REP_i and the detected concentration (M) (eq 5). The variability associated with BEQ_{chem} for the chemicals present in the ToxCast database was assessed using error propagation. EC and LC values collected from the literature generally did not include standard deviation, so it was not possible to determine the variability associated with BEQ_{chem} for the AhR, PXR, ER, and FET assays.

$$BEQ_{chem} = \sum_{i=1}^n REP_i \cdot C_i \quad (5)$$

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical Analysis. Of the 272 analyzed chemicals, 94 were detected at least once in the 22 JDS samples. The number of chemicals detected at each site ranged from 20 to 64. The sum of the molar concentration and number of detected chemicals at each site are shown in Figure 1A, with the concentrations in

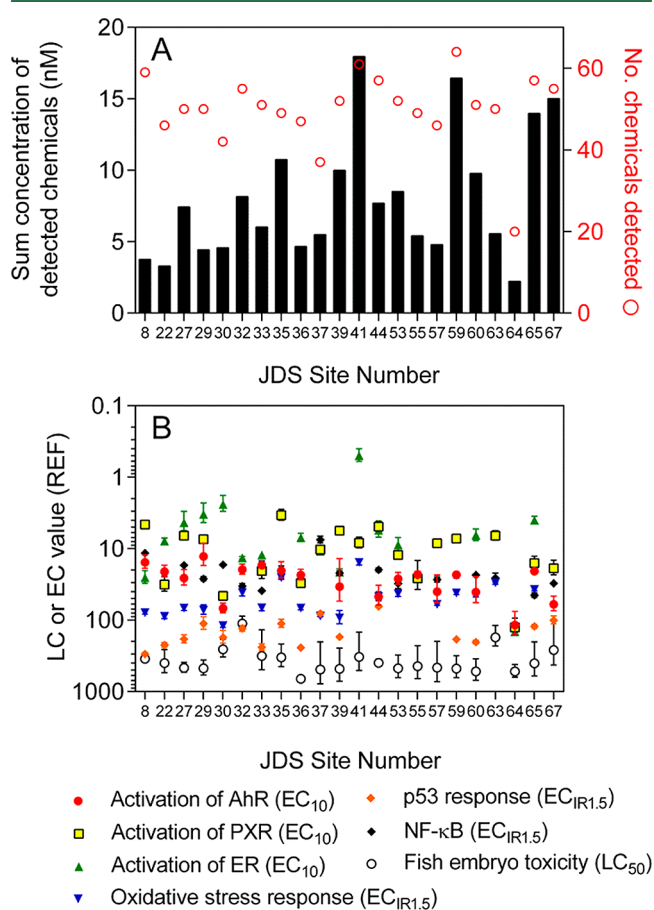


Figure 1. (A) The sum molar concentration of chemicals detected at each JDS site (black bars), along with the number of chemicals detected at each site (red circles), and (B) LC or EC values for all samples in units of relative enrichment factor (REF).

pM for each of the detected chemicals at the different sampling sites shown in Table S4. The most frequently detected chemicals were the artificial sweetener acesulfame, the industrial compounds triphenylphosphine oxide and 2-benzothiazolesulfonic acid, and the antimicrobial sulfamethoxazole, which were present at detectable levels at all studied sites. In all but one tributary, other common wastewater micropollutants, including carbamazepine and its transformation products, the corrosion

inhibitors benzotriazole and methylbenzotriazole, the artificial sweeteners cyclamate and sucralose, and several herbicides and transformation products (metolachlor, isoproturon, atrazine, and terbuthylazine-2-hydroxy) were detected. The antidiabetic pharmaceutical metformin was found at the highest concentrations, with concentrations up to 7.6 nM. Overall, chemical contamination was relatively low, with none of the detected chemicals exceeding the Water Framework Directive environmental-quality standards.³⁴

Bioanalysis. The EC and LC values for the different JDS water samples are shown in Figure 1B and Table S5, with the concentration-effect curves for all assays shown in Figure S2. The assays indicative of activation of ER, activation of PXR, activation of AhR, and the NF-κB response tended to be the most responsive, followed by the oxidative stress response. The p53 response occurred at higher effect concentrations. The least responsive assay was the FET test, which required a REF of 100 to 500 for 50% mortality or a REF of 50 to 300 for 10% mortality.

Although most samples did have a response in the assays, the effects were relatively low, with the EC values for the oxidative stress and AhR assays similar to previously benchmarked EC values for surface water.³⁵ Kittinger et al.³⁶ also only detected minimal effects in Danube River samples when assessing genotoxicity. Furthermore, ER activation, when expressed as BEQ_{bio} (0.02–1.1 pM), was lower than generally observed in wastewater effluent³⁷ due to dilution in the river, although one contaminated site, JDS 41 (BEQ_{bio} 4.7 pM), was identified by this assay.

JDS 64 had the lowest sum chemical concentration, and this corresponded to no effect at the maximum REF for the oxidative stress response, p53 response, and NF-κB assays, and only minimal effects at high concentrations in the other assays. Cell viability was assessed in parallel for most cell-based assays, and in most cases, there was negligible cytotoxicity in the studied concentration range. However, cytotoxicity did mask other endpoint manifestations at high REFs in some samples for the AhR (JDS 41 and 63), ER (JDS 35, 55, 57, 59, 63 and 67), oxidative stress response (JDS 55 and 67), p53 response (JDS 41, 55, 57 and 63), and NF-κB (JDS 36 and 41) assays. Hence, it was not possible to derive EC values for induction for these particular samples, but EC₁₀ values for cytotoxicity were calculated and are included in Table S5. JDS 41, which had the highest effect in the ER activation and oxidative stress response assays and was cytotoxic in several other assays, was the most polluted site with the highest amount of total detected chemical concentration. Overall, there was no significant relationship between effect and sum detected chemicals at each site for the different assays.

For mixture modeling, the EC and LC values were converted to BEQ_{bio} using the respective reference compounds for each assay (Table 2, Table S5). Although the EC or LC values give an indication of the sensitivity of the assay, BEQ_{bio} converts the effect into the concentration of reference compound that would elicit the same response as the sample mixture. Furthermore, the BEQ concept simplifies mixture-toxicity modeling.^{10,11}

Bioanalytical Equivalent Concentration from Chemical Analysis. Prior to calculating BEQ_{chem} , the published literature and ToxCast database were searched for EC or LC values for the detected chemicals. For each assay, between 0 and 13 literature EC or LC values could be found for the 94 detected chemicals (Table S6). Using the literature EC or LC values for each chemical and the EC or LC value of the assay reference compound, the REP_i was calculated using eq 4 (Table 3).

Table 2. BEQ_{bio} and BEQ_{chem} Values for Each Sample in the Different Bioassays with the Percentage of Effect That Can Be Explained by the Detected Chemicals

ID	activation of Ahr		activation of PXR		activation of ER		oxidative stress response		p53 response		fish embryo toxicity	
	BEQ _{bio} (M)	BEQ _{chem} (M)	% effect	BEQ _{bio} (M)	BEQ _{chem} (M)	% effect	BEQ _{bio} (M)	BEQ _{chem} (M)	% effect	BEQ _{bio} (M)	BEQ _{chem} (M)	% effect
8	4.40 × 10 ⁻¹⁴	1.94 × 10 ⁻¹⁵	4.4%	3.43 × 10 ⁻⁹	6.51 × 10 ⁻¹³	0.02%	9.61 × 10 ⁻¹⁴	1.79 × 10 ⁻¹⁴	19%	3.11 × 10 ⁻⁸	1.51 × 10 ⁻¹⁰	0.04%
22	3.28 × 10 ⁻¹⁴	<MDL	—	4.98 × 10 ⁻¹⁰	3.65 × 10 ⁻¹³	0.07%	3.14 × 10 ⁻¹³	1.45 × 10 ⁻¹⁴	4.6%	2.75 × 10 ⁻⁸	2.03 × 10 ⁻¹⁰	0.002%
27	2.65 × 10 ⁻¹⁴	1.44 × 10 ⁻¹⁵	5.4%	2.40 × 10 ⁻⁹	4.94 × 10 ⁻¹³	0.02%	5.67 × 10 ⁻¹³	1.04 × 10 ⁻¹⁴	1.8%	3.59 × 10 ⁻⁸	2.46 × 10 ⁻¹⁰	0.03%
29	5.37 × 10 ⁻¹⁴	<MDL	—	2.13 × 10 ⁻⁹	4.31 × 10 ⁻¹³	0.02%	7.44 × 10 ⁻¹³	3.96 × 10 ⁻¹⁴	5.3%	3.40 × 10 ⁻⁸	4.04 × 10 ⁻¹⁰	0.02%
30	1.01 × 10 ⁻¹⁴	<MDL	—	3.45 × 10 ⁻¹⁰	3.42 × 10 ⁻¹³	0.10%	1.03 × 10 ⁻¹²	4.32 × 10 ⁻¹⁴	4.2%	2.05 × 10 ⁻⁸	2.59 × 10 ⁻¹⁰	0.01%
32	3.50 × 10 ⁻¹⁴	6.38 × 10 ⁻¹⁵	18%	<3.17 × 10 ⁻¹¹	4.74 × 10 ⁻¹³	—	1.82 × 10 ⁻¹³	1.11 × 10 ⁻¹³	6.1%	5.93 × 10 ⁻⁸	3.47 × 10 ⁻¹⁰	0.07%
33	4.05 × 10 ⁻¹⁴	1.34 × 10 ⁻¹⁵	3.3%	7.72 × 10 ⁻¹⁰	4.82 × 10 ⁻¹³	0.06%	1.98 × 10 ⁻¹³	6.00 × 10 ⁻¹⁴	30%	3.62 × 10 ⁻⁸	1.89 × 10 ⁻¹⁰	0.07%
35	3.56 × 10 ⁻¹⁴	8.55 × 10 ⁻¹⁵	25%	4.61 × 10 ⁻⁹	6.45 × 10 ⁻¹³	0.01%	cytotox	3.07 × 10 ⁻¹⁴	—	9.58 × 10 ⁻⁸	1.31 × 10 ⁻¹¹	0.01%
36	2.94 × 10 ⁻¹⁴	<MDL	—	5.24 × 10 ⁻¹⁰	3.57 × 10 ⁻¹³	0.07%	3.47 × 10 ⁻¹³	2.37 × 10 ⁻¹⁴	6.8%	3.60 × 10 ⁻⁸	1.69 × 10 ⁻¹¹	0.05%
37	<1.25 × 10 ⁻¹⁴	<MDL	—	1.53 × 10 ⁻⁹	3.19 × 10 ⁻¹³	0.02%	2.25 × 10 ⁻¹³	1.68 × 10 ⁻¹⁴	7.4%	2.79 × 10 ⁻⁸	5.58 × 10 ⁻¹⁰	0.004%
39	2.02 × 10 ⁻¹⁴	1.02 × 10 ⁻¹⁴	50%	2.84 × 10 ⁻⁹	6.90 × 10 ⁻¹³	0.02%	1.15 × 10 ⁻¹³	4.63 × 10 ⁻¹⁴	40%	2.63 × 10 ⁻⁸	2.63 × 10 ⁻¹⁰	0.03%
41	cytotox	1.91 × 10 ⁻¹⁴	—	1.91 × 10 ⁻⁹	4.84 × 10 ⁻¹³	0.03%	4.56 × 10 ⁻¹²	1.43 × 10 ⁻¹³	3.1%	1.58 × 10 ⁻⁷	cytotox	1.18 × 10 ⁻¹³
44	1.85 × 10 ⁻¹⁴	1.08 × 10 ⁻¹⁴	59%	3.22 × 10 ⁻⁹	6.86 × 10 ⁻¹³	0.02%	4.47 × 10 ⁻¹³	3.06 × 10 ⁻¹⁴	6.8%	5.20 × 10 ⁻⁸	7.02 × 10 ⁻¹⁰	0.04%
53	2.59 × 10 ⁻¹⁴	1.48 × 10 ⁻¹⁵	5.7%	1.28 × 10 ⁻⁹	4.75 × 10 ⁻¹³	0.04%	2.73 × 10 ⁻¹³	3.68 × 10 ⁻¹⁴	1.4%	5.69 × 10 ⁻⁸	<1.01 × 10 ⁻¹⁰	0.01%
55	2.99 × 10 ⁻¹⁴	1.48 × 10 ⁻¹⁵	5.0%	6.08 × 10 ⁻¹⁰	5.16 × 10 ⁻¹³	0.08%	cytotox	<MDL	—	cytotox	2.82 × 10 ⁻¹²	—
57	1.71 × 10 ⁻¹⁴	1.22 × 10 ⁻¹⁵	7.1%	1.88 × 10 ⁻⁹	3.99 × 10 ⁻¹³	0.02%	cytotox	1.22 × 10 ⁻¹⁴	—	4.07 × 10 ⁻⁸	2.45 × 10 ⁻¹²	0.01%
59	2.96 × 10 ⁻¹⁴	2.05 × 10 ⁻¹⁴	69%	2.21 × 10 ⁻⁹	6.94 × 10 ⁻¹³	0.03%	cytotox	4.53 × 10 ⁻¹⁴	—	5.85 × 10 ⁻⁸	2.38 × 10 ⁻¹¹	0.04%
60	1.69 × 10 ⁻¹⁴	1.20 × 10 ⁻¹⁴	71%	<3.17 × 10 ⁻¹¹	4.42 × 10 ⁻¹³	—	3.77 × 10 ⁻¹³	1.19 × 10 ⁻¹⁵	0.31%	5.50 × 10 ⁻⁸	2.89 × 10 ⁻¹²	0.01%
63	cytotox	1.25 × 10 ⁻¹⁴	—	2.41 × 10 ⁻⁹	1.15 × 10 ⁻¹²	0.05%	cytotox	4.14 × 10 ⁻¹⁴	—	8.11 × 10 ⁻⁸	8.74 × 10 ⁻¹²	0.01%
64	5.87 × 10 ⁻¹⁵	<MDL	—	1.25 × 10 ⁻¹⁰	7.21 × 10 ⁻¹⁴	0.06%	1.69 × 10 ⁻¹⁴	1.36 × 10 ⁻¹⁴	80%	<4.99 × 10 ⁻⁹	1.99 × 10 ⁻¹²	—
65	3.33 × 10 ⁻¹⁴	7.48 × 10 ⁻¹⁵	22%	9.97 × 10 ⁻¹⁰	6.28 × 10 ⁻¹³	0.06%	6.15 × 10 ⁻¹³	4.76 × 10 ⁻¹⁴	7.7%	6.53 × 10 ⁻⁸	4.20 × 10 ⁻¹²	0.01%
67	1.14 × 10 ⁻¹⁴	2.20 × 10 ⁻¹⁵	19%	8.43 × 10 ⁻¹⁰	5.74 × 10 ⁻¹³	0.07%	cytotox	3.12 × 10 ⁻¹⁴	—	cytotox	2.91 × 10 ⁻¹¹	—

MDL: method detection limit; cytotox: induction was masked by cytotoxicity.

Table 3. Relative Effect Potencies (REP_i) for the Detected Chemicals in the Different Assays

assay: no. of chemicals: ref compd:	activation of AhR	activation of PXR	activation of ER	oxidative stress response	p53 response	fish embryo toxicity	
	3*	13	6	13	4	12	
	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	SR 12813 ^f	17β-estradiol	<i>tert</i> -butylhydroquinone (tBHQ)	mitomycin	3,4-dichloroaniline	
	detected chemical	detected chemical	detected chemical	detected chemical ^k	detected chemical ^k	detected chemical ^l	
	REP _i	REP _i	REP _i	REP _i	REP _i	REP _i	
	carbaryl ^a	3.33 × 10 ⁻⁶	bezafibrate ^d	6.21 × 10 ⁻⁴	benzophenone-3 ^g	7.04 × 10 ⁻⁷	2,4-dinitrophenol
	daidzein ^b	5.92 × 10 ⁻⁴	bisphenol A ^c	4.63 × 10 ⁻³	bisphenol A ^c	4.49 × 10 ⁻⁵	2-phenylphenol
	terbutylazine ^c	1.36 × 10 ⁻⁴	carbamazepine ^d	4.61 × 10 ⁻⁴	bisphenol S ^h	1.18 × 10 ⁻⁶	bisphenol A
			diclofenac ^d	1.02 × 10 ⁻³	daidzein ⁱ	6.47 × 10 ⁻⁵	carbaryl
			diuron ^e	2.61 × 10 ⁻³	estrone ^j	0.02	chlorophene
			erythromycin ^c	2.92 × 10 ⁻⁵	genistein ^j	5.35 × 10 ⁻⁴	daidzein
			estron ^e	3.92 × 10 ⁻³	diclofenac	0.06	diclofenac
			isoproturon ^e	1.67 × 10 ⁻³	genistein	0.74	genistein
			ketoprofen ^d	3.59 × 10 ⁻⁴	metolachlor	0.35	metolachlor
			metolachlor ^f	0.10	perfluoroheptanoic acid	0.03	perfluoroheptanoic acid
			prometryn ^d	8.71 × 10 ⁻³	tri(butoxyethyl) phosphate	0.14	tri(butoxyethyl) phosphate
			terbutylazine ^d	3.76 × 10 ⁻³	triclosan	0.18	triclosan
			triclosan ^d	0.02	triethyl citrate	0.04	triethyl citrate
							2,4-dinitrophenol
							atrazine
							caffeine
							carbamazepine
							carbaryl
							chlorotoluron
							diclofenac
							genistein
							metoprolol
							p-nitrophenol
							salicylic acid
							triclosan

*REP_i data from AhR CALUX using mouse hepatoma cell line ^fTetraethyl 2-(3,5-di-*tert*-butyl-4-hydroxyphenyl)ethenyl-1,1-bisphosphonate ^aDenison et al. ⁴⁹ ^bLong et al. ⁵⁰ ^cGhisari et al. ⁵¹ ^dCreusot et al. ¹⁵ ^eCreusot. ⁵² ^fJemaire et al. ⁴³ ^gMolina et al. ⁵³ ^hMolina-Molina et al. ⁵⁴ ⁱCurrent study. ^jPillon et al. ⁵⁵ ^kUSEPA ToxCast database. ²³ ^lScholz et al. ²⁷

LC₅₀ values at 48 h exposure for the FET test were collected for 12 chemicals from Scholtz et al.,²⁷ with REP_i calculated using the mean 3,4-dichloroaniline LC₅₀ value from the same study. A total of 13 EC values were collected from the literature for the PXR assay, while six EC values were available for the ER assay. Although no EC values were available for the detected chemicals in the AhR CAFLUX assay, EC values were available for three of the detected chemicals (terbuthylazine, carbaryl, and daidzein) in the mouse AhR CALUX assay. Although these assays focus on the same endpoint (reporter gene expression), they utilize different animal cell lines (rat hepatoma versus mouse hepatoma), and previous work has shown species-specific differences in responsiveness to some AhR ligands.³⁸ To account for differences in sensitivity between the mouse and rat AhR models, we also collected TCDD EC values from each study to calculate REP_i rather than using the TCDD EC value from the current study.

EC values for the oxidative stress response, p53 response, and NF-κB assays were collected from the ToxCast database.²³ A total of 486, 278, and 62 chemicals in the ToxCast database were active in the oxidative stress response, p53 response, and NF-κB assays, respectively (Figure 2). Of the 94 chemicals

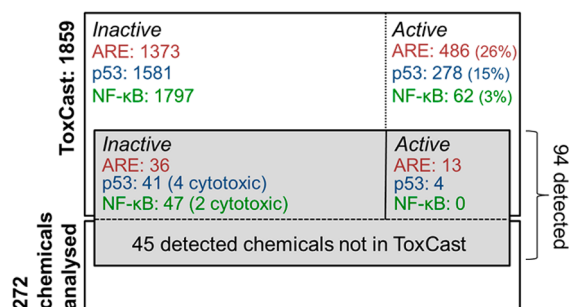


Figure 2. Overview of the active and inactive detected chemicals present in the ToxCast database in the oxidative stress response (ARE, red), p53 response (blue), and NF-κB response (green) assays.

detected in the JDS samples, 49 of these were also included in the ToxCast database. However, many of the detected compounds were not active in the assays, with 13 compounds active in the oxidative stress response assay, four compounds active in the p53 response assay, and none active in the NF-κB assay. EC_{IRI.5} values for the detected chemicals in the oxidative stress response and p53 response assays were calculated from raw emission data available in the ToxCast MySQL database. To derive REP_i for the detected chemicals, we used experimental EC_{IRI.5} values for reference compounds tBHQ and mitomycin.

Using REP_i and the detected chemical concentration, BEQ_{chem} was calculated using eq 5 for each water sample (Table 2). BEQ_{chem} could not be calculated for some samples for the AhR and ER bioassays because none of the chemicals with literature EC values were detected in the samples. Furthermore, it was not possible to derive BEQ_{chem} values for the NF-κB assay because none of the detected chemicals were active, despite the NF-κB assay being one of the more responsive for the JDS samples (Figure 1B). Only 3% of the 1859 chemicals in the ToxCast database were active in the NF-κB assay, compared to 26 and 15% of chemicals in oxidative stress response and p53 response assays, respectively (Figure 2). The NF-κB assay has been used for water quality monitoring in only one study,⁴ and it is still unclear what types of water-based pollutants induce a response in this assay.

Percent of Biological Effect That Can Be Explained by Chemical Analysis.

The comparison between BEQ_{bio} and BEQ_{chem} for each assay is shown in Table 2, although the contribution of the individual detected chemicals to the biological effect is shown in Figure 3. For some JDS samples, it was not possible to determine the contribution of detected chemicals to the biological effect, and this was attributed to either cytotoxicity masking the manifestation of other endpoints, no effect at the maximum REF, or the active chemicals being below the MDL.

The BEQ_{chem} for AhR activation was calculated using only three chemicals, but they explained between 3 and 71% of the biological effect (Figure 3A). The effect was mostly driven by the phytoestrogen daidzein, which has previously been shown to be a weak AhR activator in mouse cells but not in human cells,³⁹ and the herbicide terbuthylazine. The insecticide carbaryl only explained 0.5% of the effect in JDS 67. Similarly, the BEQ_{chem} for activation of ER could explain up to 80% of the effect, with the hormone estrone and the phytoestrogen genistein contributing significantly. Estrogenic effects in wastewater are often explained by the presence of potent natural and synthetic estrogenic hormones, such as 17β-estradiol and 17α-ethinylestradiol,^{14,18} but these compounds were below the detection limit in the current study. Previous studies have also attributed ER activation in river water to genistein.⁴⁰

In contrast, the detected chemicals could explain less than 0.2% of the biological effect in the adaptive stress response assays, PXR assay, and the FET test (Figure 3). A number of studies have also shown similarly low contributions of detected chemicals to the oxidative stress response in a range of water types, including wastewater and pool water.^{10,17,41} Genistein dominated the contribution of quantified chemicals to the biological effect for the oxidative stress response. Although carbaryl and the disinfectant chlorophene were detected in the JDS samples and are active in the oxidative stress response assay, they occurred only in samples in which cytotoxicity masked induction and could not be used to explain the biological effect. It has also been demonstrated that detected chemicals in surface water and wastewater can only explain a small fraction of PXR activity.¹⁵ However, for this receptor, the use of the concentration addition model may be limited because it has been recently demonstrated that, due to a large ligand-binding pocket, PXR can stably bind binary mixtures of certain weakly active chemicals, which leads to synergistic activation of target genes.⁴² The herbicide metolachlor mostly contributed to the effect in the PXR assay. The BEQ_{chem} versus BEQ_{bio} comparison for water samples has not been conducted previously for the p53 response or FET assays; thus, it was not possible to compare our results with the literature. Genistein and the industrial compound 2,4-dinitrophenol mostly contributed to the p53 response in samples collected from Austria to Serbia (JDS 8 to 39), while the fungicide carbendazim dominated the effect further downstream. Finally, 2,4-dinitrophenol and genistein together contributed up to 0.08% of the effect explained by quantified chemicals in the FET assay, though antimicrobial triclosan alone could explain up to 0.15% of the biological effect in JDS 59 (Figure 3).

The small contribution of detected chemicals to the biological response in the adaptive stress response and PXR assays is not surprising because many compounds can activate these endpoints, as discussed earlier. Furthermore, 471 out of 641 or 74%, of reviewed compounds in Scholtz et al.²⁷ had a response in the FET test. Consequently, many compounds are active in these assays, and, although comparability may have been

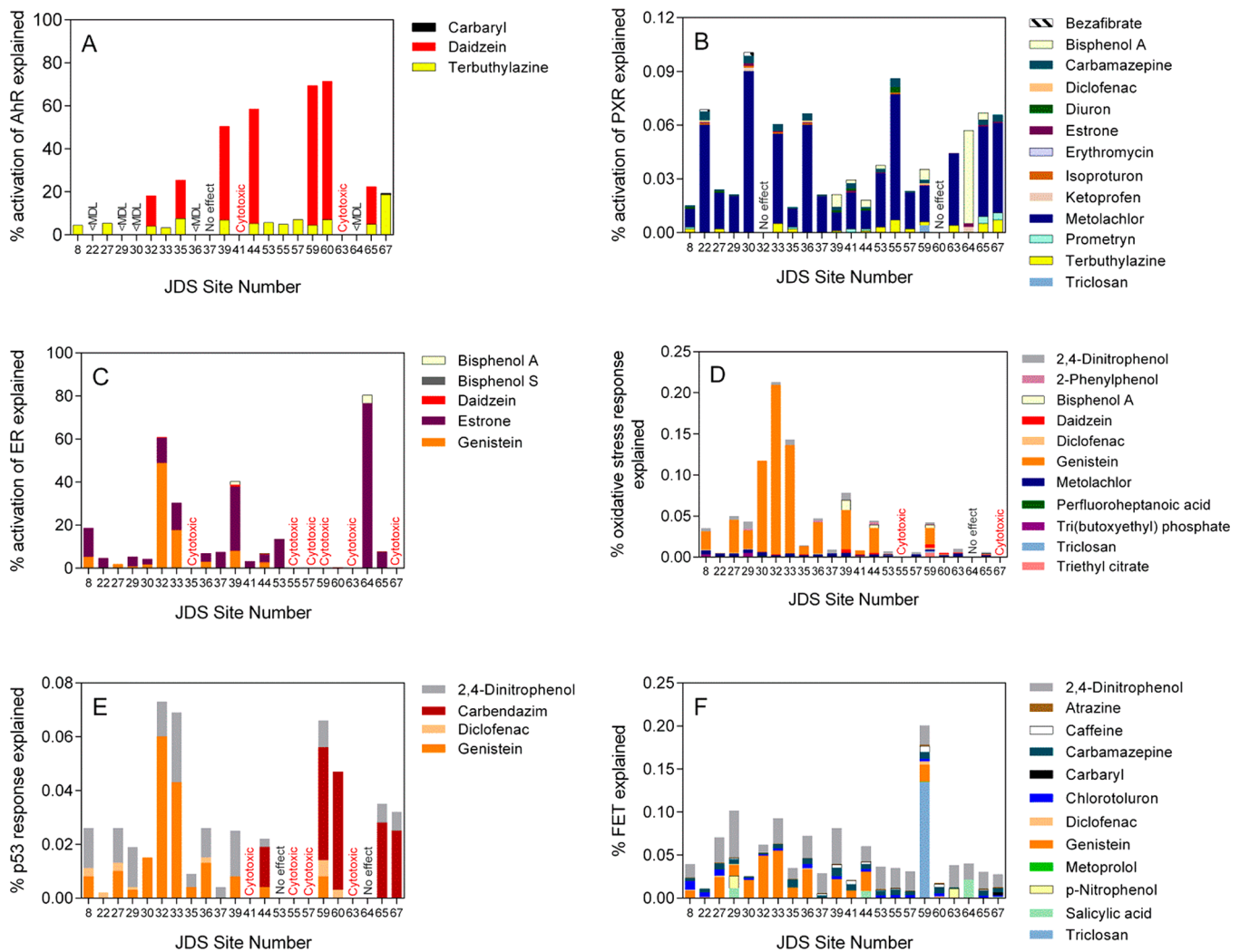


Figure 3. Percent of the biological effect explained by individual detected chemicals for (A) activation of AhR, (B) activation of PXR, (C) activation of ER, (D) oxidative stress response, (E) p53 response and (F) fish embryo toxicity (FET).

improved with more literature EC and LC values for the detected compounds, it is unlikely to have a significant influence on the comparison. In illustration of this point, if we assume that 74% of chemicals should have an effect in the FET test, then 70 of the 94 detected chemicals could be active in this assay. However, published LC values were only available for 12 of the detected chemicals. If we simply extrapolate the effect explained by the detected chemicals with available LC₅₀ values in each sample to all 70 detected chemicals without considering differences in potencies, we can still only explain up to 1.6% of the effect. This example does not take into consideration any differences in mode of action or chemical potency but simply aims to illustrate the potential for many compounds to contribute to effect in apical endpoints.

Limitations and Outlook. There are some limitations associated with the current study. Primarily, improved understanding of the contribution of the detected chemicals to the biological effect is hampered by the lack of REP_i values for detected chemicals. Out of the 94 detected chemicals in the JDS samples, between 0 and 13 corresponding EC or LC values could be found for the different assays. Although the USEPA ToxCast program provides EC values for a large number of compounds, many of these are not typical water pollutants, and only 52% of chemical detected in the JDS samples were present

in the ToxCast database. Many of the detected chemicals in the ToxCast database were not active in the adaptive stress response assays, but such information is not readily available for the other studied assays. However, this information is important as it makes a difference to the effect balance if a chemical's contribution is zero or if it is unknown. Consequently, fingerprinting the biological and toxicological effect(s) of commonly detected water pollutants is recommended to help fill in the knowledge gap. Furthermore, the available literature data stems from a number of different sources, and it is possible that the experimental protocols for the same assay may differ slightly, leading to potential differences in sensitivity or reproducibility. This limitation could be overcome by improved standardization of bioassays.

A specific limitation associated with the AhR assay is that the EC values available in the literature are based on the mouse AhR model, while BEQ_{bio} is based on the rat AhR model. Hence, potential differences in species sensitivity may be a source of variability for the comparison of BEQ_{bio} and BEQ_{chem}. A further limitation with using literature EC and LC values is that the error associated with the value is often not provided. This was the case for the AhR, PXR, ER, and FET assays, and consequently, it was not possible to calculate the error associated with the BEQ_{chem} values. It was possible to calculate the error associated with BEQ_{chem} for the oxidative stress response

and p53 response assays because the $EC_{IRI.5}$ values used to derive REP_i were re-evaluated from a series of replicate experiments from the ToxCast MySQL database (standard deviations associated with BEQ_{chem} are provided in Table S7).

This study demonstrated the applicability of the BEQ concept to assess the contribution of detected chemicals to the biological effect of chemical mixtures present in the Danube River. Because the detected chemicals could not explain a significant proportion of the effect, particularly in the adaptive stress response, PXR, and FET assays, this supports the application of bioanalytical tools complementary to chemical analysis for water quality monitoring. Furthermore, because targeted chemical analysis was applied, we cannot exclude the fact that we may not have targeted the most relevant chemicals. Consequently, further identification using tools such as effect-directed analysis may provide improved understanding about chemical stressors in the Danube River.

■ ASSOCIATED CONTENT

● Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.est.5b04083.

Figures showing the JDS sample sites and concentration-effect curves. Tables showing the Joint Danube Survey sampling sites and extracted water volumes, multiple-reaction monitoring transitions for LC-MS/MS, analyzed chemicals and their detection limit, EC and LC values for all samples in different bioassays, available literature EC and LC values, and BEQ_{chem} for oxidative stress and p53 response assays. Additional information about large-volume solid-phase extraction, LC-MS/MS analysis, and bioanalysis. (PDF)

Table showing detected chemicals and their method detection limit (MDL) in the different JDS samples. (XLSX)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +61 7 5552 7733; fax: +61 7 5552 7831; e-mail: p.neale@griffith.edu.au.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This study is part of the SOLUTIONS project that is supported by the European Union Seventh Framework Programme (FP7-ENV-2013-two-stage Collaborative project) under grant agreement number 603437. The study was also supported by the National Health and Medical Research Council (NHMRC) – European Union Collaborative Research Grant (APP1074775), the Federal Ministry of Education and Research (BMBF) under grant agreement number 02WRS1282C (Tox-Box) and the International Commission for the Protection of the Danube (ICPDR). The samples were collected as part of the Joint Danube Survey 3 (JDS3), which was conducted by ICPDR. Nils Klüver, UFZ, is thanked for useful discussions and provision of the FET data. Dayne Filer, USEPA, is thanked for assistance with the ToxCast database. Janet Tang, UQ, is thanked for experimental assistance with the NF- κ B assay. Margit Petre, Melis Muz, Riccardo Massai, Jörg Ahlheim, all UFZ, Jaroslav Slobodnik, EI, and Peter Tarabek, MU, are thanked for logistical and technical help.

■ REFERENCES

- (1) Kuzmanovic, M.; Ginebreda, A.; Petrovic, M.; Barcelo, D. Risk assessment based prioritization of 200 organic micropollutants in 4 Iberian rivers. *Sci. Total Environ.* **2015**, *503–504*, 289–299.
- (2) Loos, R.; Gawlik, B. M.; Locoro, G.; Rimaviciute, E.; Contini, S.; Bidoglio, G. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* **2009**, *157* (2), 561–568.
- (3) Heeb, F.; Singer, H.; Pernet-Coudrier, B.; Qi, W.; Liu, H.; Longree, P.; Müller, B.; Berg, M. Organic micropollutants in rivers downstream of the megacity Beijing: Sources and mass fluxes in a large-scale wastewater irrigation system. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (16), 8680–8688.
- (4) Escher, B. I.; Allinson, M.; Altenburger, R.; Bain, P. A.; Balaguer, P.; Busch, W.; Crago, J.; Denslow, N. D.; Dopp, E.; Hilscherova, K.; Humpage, A. R.; Kumar, A.; Grimaldi, M.; Jayasinghe, B. S.; Jarosova, B.; Jia, A.; Makarov, S.; Maruya, K. A.; Medvedev, A.; Mehinto, A. C.; Mendez, J. E.; Poulsen, A.; Prochazka, E.; Richard, J.; Schifferli, A.; Schlenk, D.; Scholz, S.; Shiraishi, F.; Snyder, S.; Su, G. Y.; Tang, J. Y. M.; van der Burg, B.; van der Linden, S. C.; Werner, I.; Westerheide, S. D.; Wong, C. K. C.; Yang, M.; Yeung, B. H. Y.; Zhang, X. W.; Leusch, F. D. L. Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with in vitro bioassays. *Environ. Sci. Technol.* **2014**, *48* (3), 1940–1956.
- (5) Jállová, V.; Jarošová, B.; Bláha, L.; Giesy, J. P.; Ocelka, T.; Grabic, R.; Jurčíková, J.; Vrana, B.; Hilscherová, K. Estrogen-, androgen- and aryl hydrocarbon receptor mediated activities in passive and composite samples from municipal waste and surface waters. *Environ. Int.* **2013**, *59*, 372–383.
- (6) Maletz, S.; Floehr, T.; Beier, S.; Klümper, C.; Brouwer, A.; Behnisch, P.; Higley, E.; Giesy, J. P.; Hecker, M.; Gebhardt, W.; Linnemann, V.; Pinnekamp, J.; Hollert, H. In vitro characterization of the effectiveness of enhanced sewage treatment processes to eliminate endocrine activity of hospital effluents. *Water Res.* **2013**, *47* (4), 1545–1557.
- (7) Ankley, G. T.; Bennett, R. S.; Erickson, R. J.; Hoff, D. J.; Hornung, M. W.; Johnson, R. D.; Mount, D. R.; Nichols, J. W.; Russom, C. L.; Schmieder, P. K.; Serrano, J. A.; Tietge, J. E.; Villeneuve, D. L. Adverse outcome pathways: A conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* **2010**, *29* (3), 730–741.
- (8) Backhaus, T.; Faust, M. Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: A conceptual framework. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (5), 2564–2573.
- (9) Kortenkamp, A. Ten years of mixing cocktails: A review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* **2007**, *115*, 98–105.
- (10) Escher, B. I.; van Daele, C.; Dutt, M.; Tang, J. Y. M.; Altenburger, R. Most oxidative stress response in water samples comes from unknown chemicals: The need for effect-based water quality trigger values. *Environ. Sci. Technol.* **2013**, *47* (13), 7002–7011.
- (11) Tang, J. Y. M.; McCarty, S.; Glenn, E.; Neale, P. A.; Warne, M. S. J.; Escher, B. I. Mixture effects of organic micropollutants present in water: Towards the development of effect-based water quality trigger values for baseline toxicity. *Water Res.* **2013**, *47* (10), 3300–3314.
- (12) Escher, B. I.; Leusch, F. D. L. *Bioanalytical Tools in Water Quality Assessment*. IWA Publishing: London, 2012.
- (13) Bengtson Nash, S. M.; Goddard, J.; Muller, J. F. Phytotoxicity of surface waters of the Thames and Brisbane River Estuaries: A combined chemical analysis and bioassay approach for the comparison of two systems. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21* (11), 2086–2093.
- (14) Murk, A. J.; Legler, J.; van Lipzig, M. M. H.; Meerman, J. H. N.; Belfroid, A. C.; Spenkelink, A.; van der Burg, B.; Rijs, G. B. J.; Vethaak, D. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* **2002**, *21* (1), 16–23.
- (15) Creusot, N.; Kinani, S.; Balaguer, P.; Tapie, N.; LeMenach, K.; Maillot-Marechal, E.; Porcher, J.-M.; Budzinski, H.; Ait-Aissa, S. Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic

emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396* (2), 569–583.

(16) Escher, B. I.; Lawrence, M.; Macova, M.; Mueller, J. F.; Poussade, Y.; Robillot, C.; Roux, A.; Gernjak, W. Evaluation of contaminant removal of reverse osmosis and advanced oxidation in full-scale operation by combining passive sampling with chemical analysis and bioanalytical tools. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, *45* (12), 5387–5394.

(17) Yeh, R. Y. L.; Farre, M. J.; Stalter, D.; Tang, J. Y. M.; Molendijk, J.; Escher, B. I. Bioanalytical and chemical evaluation of disinfection by-products in swimming pool water. *Water Res.* **2014**, *59*, 172–184.

(18) Rutishauser, B. V.; Pesonen, M.; Escher, B. I.; Ackermann, G. E.; Aerni, H. R.; Suter, M. J. F.; Eggen, R. I. L. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three in vitro assays and chemical analysis of steroids. *Environ. Toxicol. Chem.* **2004**, *23* (4), 857–864.

(19) Nagy, S. R.; Sanborn, J. R.; Hammock, B. D.; Denison, M. S. Development of a green fluorescent protein-based cell bioassay for the rapid and inexpensive detection and characterization of Ah receptor agonists. *Toxicol. Sci.* **2002**, *65* (2), 200–210.

(20) Martin, M. T.; Dix, D. J.; Judson, R. S.; Kavlock, R. J.; Reif, D. M.; Richard, A. M.; Rotroff, D. M.; Romanov, S.; Medvedev, A.; Poltoratskaya, N.; Gambarian, M.; Moeser, M.; Makarov, S. S.; Houck, K. A. Impact of environmental chemicals on key transcription regulators and correlation to toxicity end points within EPA's ToxCast program. *Chem. Res. Toxicol.* **2010**, *23* (3), 578–590.

(21) Simmons, S. O.; Fan, C.-Y.; Ramabhadran, R. Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening. *Toxicol. Sci.* **2009**, *111* (2), 202–225.

(22) Zhang, D. D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab. Rev.* **2006**, *38* (4), 769–789.

(23) US EPA. Interactive Chemical Safety for Sustainability (iCSS) Dashboard. <http://actor.epa.gov/dashboard/> (accessed 23rd March 2015).

(24) Knight, A. W.; Little, S.; Houck, K.; Dix, D.; Judson, R.; Richard, A.; McCarroll, N.; Akerman, G.; Yang, C.; Birrell, L.; Walmsley, R. M. Evaluation of high-throughput genotoxicity assays used in profiling the US EPA ToxCast™ chemicals. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2009**, *55* (2), 188–199.

(25) Duerksen-Hughes, P. J.; Yang, J.; Ozcan, O. p53 induction as a genotoxic test for twenty-five chemicals undergoing in vivo carcinogenicity testing. *Environ. Health Perspect.* **1999**, *107* (10), 805–812.

(26) OECD. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing: Paris, 2013.

(27) Scholz, S.; Ortmann, J.; Kluver, N.; Leonard, M. Extensive review of fish embryo acute toxicities for the prediction of GHS acute systemic toxicity categories. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *69* (3), 572–579.

(28) Schymanski, E. L.; Singer, H. P.; Slobodnik, J.; Ipolyi, I. M.; Oswald, P.; Krauss, M.; Schulze, T.; Haglund, P.; Letzel, T.; Grosse, S.; Thomaidis, N. S.; Bletsou, A.; Zwiener, C.; Ibanez, M.; Portoles, T.; de Boer, R.; Reid, M. J.; Onghena, M.; Kunkel, U.; Schulz, W.; Guillon, A.; Noyon, N.; Leroy, G.; Bados, P.; Bogianni, S.; Stipanicev, D.; Rostkowski, P.; Hollender, J. Non-target screening with high-resolution mass spectrometry: Critical review using a collaborative trial on water analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (21), 6237–6255.

(29) Liška, I.; Wagner, F.; Sengl, M.; Deutsch, K.; Slobodnik, J. *Joint Danube Survey 3 - A Comprehensive Analysis of Danube Water Quality*. International Commission for the Protection of the Danube River: Vienna, Austria, 2015.

(30) Schulze, T.; Krauss, M.; Novak, J.; Hilscherova, K.; Ait-Aissa, S.; Creusot, N.; Macova, M.; Neale, P. A.; Escher, B. I.; Gomes, T.; Tollefsen, K. E.; Tarcai, Z.; Shao, Y.; Deutschmann, B.; Seiler, T.-B.; Hollert, H.; Tarabek, P.; Tousova, Z.; Slobodnik, J.; Walz, K.-H.; Brack, W. Large Volume Sampling and Effect-Based Screening. In *Joint Danube Survey 3 - A Comprehensive Analysis of Danube Water Quality*;

Liška, I.; Wagner, F.; Sengl, M.; Deutsch, K.; Slobodnik, J., Eds; International Commission for the Protection of the Danube River: Vienna, Austria, 2015; pp 284–295.

(31) Hug, C.; Ulrich, N.; Schulze, T.; Brack, W.; Krauss, M. Identification of novel micropollutants in wastewater by a combination of suspect and nontarget screening. *Environ. Pollut.* **2014**, *184*, 25–32.

(32) Escher, B. I.; Dutt, M.; Maylin, E.; Tang, J. Y. M.; Toze, S.; Wolf, C. R.; Lang, M. Water quality assessment using the AREc32 reporter gene assay indicative of the oxidative stress response pathway. *J. Environ. Monit.* **2012**, *14* (11), 2877–2885.

(33) Villeneuve, D. L.; Blankenship, A. L.; Giesy, J. P. Derivation and application of relative potency estimates based on in vitro bioassay results. *Environ. Toxicol. Chem.* **2000**, *19* (11), 2835–2843.

(34) European Commission. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Off. J. Eur. Union*, 2013, L226/1–L226/17.

(35) Tang, J. Y. M.; Taulis, M.; Edebeli, J.; Leusch, F. D. L.; Jagals, P.; Jackson, G. P.; Escher, B. I. Chemical and bioanalytical assessment of coal seam gas associated water. *Environ. Chem.* **2015**, *12* (3), 267–285.

(36) Kittinger, C.; Baumert, R.; Folli, B.; Lipp, M.; Liebmann, A.; Kirschner, A.; Farnleitner, A. H.; Grisold, A. J.; Zarfel, G. E. Preliminary toxicological evaluation of the river Danube using in vitro bioassays. *Water* **2015**, *7* (5), 1959–1968.

(37) Jarošová, B.; Erseková, A.; Hilscherová, K.; Loos, R.; Gawlik, B. M.; Giesy, J. P.; Bláha, L. Europe-wide survey of estrogenicity in wastewater treatment plant effluents: the need for the effect-based monitoring. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2014**, *21* (18), 10970–10982.

(38) DeGroot, D.; He, G.; Fracalvieri, D.; Bonati, L.; Pandini, A.; Denison, M. S. AhR ligands: Promiscuity in binding and diversity in response. In *The Ah Receptor in Biology and Toxicology* Pohjanvirta, R., Ed.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, 2011; pp 63–79.

(39) Zhang, S.; Qin, C. H.; Safe, S. H. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: Effects of structure and cell context. *Environ. Health Perspect.* **2003**, *111* (16), 1877–1882.

(40) Kawanishi, M.; Takamura-Enya, T.; Ermawati, R.; Shimohara, C.; Sakamoto, M.; Matsukawa, K.; Matsuda, T.; Murahashi, T.; Matsui, S.; Wakabayashi, K.; Watanabe, T.; Tashiro, Y.; Yagi, T. Detection of genistein as an estrogenic contaminant of river water in Osaka. *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38* (23), 6424–6429.

(41) Tang, J. Y. M.; Busetti, F.; Charrois, J. W. A.; Escher, B. I. Which chemicals drive biological effects in wastewater and recycled water? *Water Res.* **2014**, *60*, 289–299.

(42) Delfosse, V.; Dendele, B.; Huet, T.; Grimaldi, M.; Boulahtouf, A.; Gerbal-Chaloin, S.; Beucher, B.; Roeklin, D.; Muller, C.; Rahmani, R.; Cavaillès, V.; Daujat-Chavanieu, M.; Vivat, V.; Pascussi, J. M.; Balaguer, P.; Bourguet, W. Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 8089.

(43) Lemaire, G.; Mnif, W.; Pascussi, J. M.; Pillon, A.; Rabenoelina, F.; Fenet, H.; Gomez, E.; Casellas, C.; Nicolas, J. C.; Cavaillès, V.; Duchesne, M. J.; Balaguer, P. Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system. *Toxicol. Sci.* **2006**, *91* (2), 501–509.

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

(45) Kinani, S.; Bouchonnet, S.; Creusot, N.; Bourcier, S.; Balaguer, P.; Porcher, J.-M.; Ait-Aissa, S. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environ. Pollut.* **2010**, *158* (1), 74–83.

(46) In vitro. CellSensor ARE-bla Hep G2 cell-based assay protocol. http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cellsensor_AREblaHepG2_man.pdf.

(47) Neale, P. A.; Stalter, D.; Tang, J. Y. M.; Escher, B. I. Bioanalytical evidence that chemicals in tattoo ink can induce adaptive stress responses. *J. Hazard. Mater.* **2015**, *296*, 192–200.

(48) Jin, L.; Gaus, C.; Escher, B. I. Adaptive stress response pathways induced by environmental mixtures of bioaccumulative chemicals in dugongs. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49* (11), 6963–6973.

(49) Denison, M. S.; Phelan, D.; Winter, G. M.; Ziccardi, M. H. Carbaryl, a carbamate insecticide, is a ligand for the hepatic Ah (dioxin) receptor. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1998**, *152* (2), 406–414.

(50) Long, M. H.; Kruger, T.; Ghisari, M.; Bonefeld-Jørgensen, E. C. Effects of selected phytoestrogens and their mixtures on the function of the thyroid hormone and the aryl hydrocarbon receptor. *Nutr. Cancer* **2012**, *64* (7), 1008–1019.

(51) Ghisari, M.; Long, M.; Tabbo, A.; Bonefeld-Jørgensen, E. C. Effects of currently used pesticides and their mixtures on the function of thyroid hormone and aryl hydrocarbon receptor in cell culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2015**, *284* (3), 292–303.

(52) Creusot, N. Contribution de l'approche effect directed analysis à l'identification de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques. Ph.D. Dissertation, University of Bordeaux, Bordeaux, France, 2011.

(53) Molina-Molina, J.-M.; Escande, A.; Pillon, A.; Gomez, E.; Pakdel, F.; Cavailles, V.; Olea, N.; Ait-Aissa, S.; Balaguer, P. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *232* (3), 384–395.

(54) Molina-Molina, J.-M.; Amaya, E.; Grimaldi, M.; Saenz, J.-M.; Real, M.; Fernandez, M. F.; Balaguer, P.; Olea, N. In vitro study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-A congeners and derivatives via nuclear receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, *272* (1), 127–136.

(55) Pillon, A.; Boussioux, A. M.; Escande, A.; Ait-Aissa, S.; Gomez, E.; Fenet, H.; Ruff, M.; Moras, D.; Vignon, F.; Duchesne, M. J.; Casellas, C.; Nicolas, J. C.; Balaguer, P. Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor-alpha: Application to environmental analysis. *Environ. Health Perspect.* **2005**, *113* (3), 278–284.

B. Renseigner l'activité de polluants environnementaux

Le nombre croissant de contaminants chimiques retrouvés dans les eaux de surface soulève le besoin de mieux caractériser leur réponse potentielle. Dans le cas d'étude du Danube, ce manque de connaissance représentait clairement une limite à l'interprétation des résultats des bio-essais. Dans ce chapitre, nous adressons l'évaluation de l'activité estrogénique de polluants environnementaux à l'aide de modèles *in vitro* (humains et poisson zèbre) et *in vivo* chez le poisson zèbre. Ces modèles ont été appliqués dans une démarche de criblage à un ensemble de 34 molécules prioritaires dans le cadre du projet SOLUTIONS (**article n°2**). Puis, un travail plus spécifique a été mené sur le triclosan, un contaminant émergent très présent dans l'environnement aquatique et qui est suspecté d'être un perturbateur endocrinien (**article n°3**).

1. **Article n°2: “Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water”**

1.1 Contexte et objectif

Dans le chapitre 1, nous avons constaté qu'il y avait un manque d'information sur l'activité des polluants détectés dans les échantillons environnementaux pour la plupart des bio-essais utilisés (**article n°1**). Réalisée dans le cadre du projet SOLUTIONS, cette étude a pour but d'évaluer l'activité de polluants environnementaux communément retrouvés dans les eaux de surface européennes à travers une batterie de bio-essais comprenant des tests *in vitro* et *in vivo*. Les 20 bio-essais de cette étude ont été choisis de manière à couvrir de multiples modes de toxicité, spécifiques (ex : activation d'un récepteur) et apicaux (ex : toxicité aigüe sur l'embryon de poisson).

Le choix des polluants évalués s'est effectué principalement sur trois critères : (1) le quotient de risque basé sur les concentrations mesurées dans les eaux de surface européennes et les données de toxicité aigüe sur algue, poisson, et daphnie (issu de Busch *et al.*, 2016), (2) l'existence d'une norme de qualité environnementale et (3) le mode d'action des composés. Au final, 34 molécules ont été sélectionnées, dont 32 figurent parmi les 214 polluants prioritaires par

Busch *et al.*, (2016). Les informations obtenues ont ensuite été utilisées pour mettre à jour la mass-balance des échantillons du Danube sur les bio-essais MELN et PXR (**article n°1**) et évaluer la contribution des nouvelles molécules identifiées dans l'activité biologique mesurée.

1.2 Principaux résultats

Les résultats du criblage sur nos différents bio-essais sont résumés dans le tableau XI. En complément, l'activité anti-estrogénique de certaines molécules a été évaluée dans les modèles *in vitro*, ainsi que dans les cellules ZELH, utilisées comme contrôle d'une inhibition non ER-spécifique de la luciférase (anti-estrogénicité et effets non spécifiques présentés et discutés dans le chapitre 3, **article n°5**).

Le criblage des 34 molécules sur la lignée hPXR a mis en évidence l'activité des deux tiers des molécules testées, confirmant la capacité de la lignée à répondre à de nombreux polluants environnementaux. Cependant, les 6 nouvelles molécules actives identifiées dans les échantillons de la JDS3 n'ont permis d'améliorer la mass-balance que de 0.1% dans le meilleur des cas. En moyenne, l'effet biologique expliqué par les 18 molécules actives restait inférieur à 0.2%. Ce résultat est en accord avec des études précédentes faites sur le même modèle (Creusot *et al.*, 2010, 2014 ; Kinani *et al.*, 2010). Le récepteur PXR présente la spécificité de pouvoir lier plusieurs molécules simultanément et entraîner un effet synergique sur l'activité transcriptionnelle (Delfosse *et al.*, 2015). En conséquent, il est possible que le concept d'additivité assumé dans le calcul de la mass-balance ne soit pas approprié pour rendre compte de l'activité des ligands de hPXR au sein d'échantillons environnementaux.

Dans les bio-essais d'estrogénicité *in vitro* MELN, ZELH α et ZELH β 2 et dans le test *in vivo* EASZY, la majorité des molécules testées sont inactives. Tous les modèles *in vitro* et *in vivo* basés sur le poisson zèbre détectent les mêmes xeno-estrogènes (le bisphénol A et la génistéine), mais certaines molécules sont différemment actives en fonction des modèles cellulaires. En particulier, le triphenyl phosphate (TPP), le benzo(a)pyrene (BaP), le 4-n-nonylphenol (4-n-NP) sont estrogéniques dans les MELN mais anti-estrogéniques dans les ZELH α et ZELH β 2 (tableau XI). Parmi les bio-essais pour évaluer l'estrogénicité dans l'article n°3 figure aussi la lignée de médaka transgénique ChgH-GFP (Kurauchi *et al.*, 2005). A la différence du test EASZY, le TPP et le

chlorophène sont actifs sur le modèle médaka mais la génistéine ne l'est pas. Dans son ensemble, le criblage illustre l'importance d'utiliser des données d'activité propres à chaque bio-essai dans un contexte de bio-analyse, car il peut y avoir des réponses différentes liées à chaque bio-essai (ex : espèce, stade de développement, durée d'exposition).

La mass-balance des échantillons de la JDS3 testés sur les cellules MELN a été réévaluée au regard des nouvelles données obtenues sur les molécules individuelles. Cette analyse conforte la forte contribution de l'estrone dont le REP a été réévalué à 0.11 (REP initial de 0.02 publié par Pillon *et al.*, 2005). En revanche, les autres molécules nouvellement identifiées comme actives contribuent très peu à l'activité mesurée. Pour certains échantillons, les molécules retrouvées expliquent toujours moins de 20% de l'activité mesurée, en particulier pour le site JDS41 qui est le plus actif (1,24 ng/L E2-Eq).

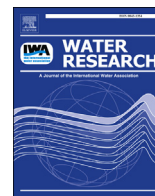
1.3 Conclusion

- On apporte de nouvelles informations sur l'activité PXR de polluants émergents
- Tous les bio-essais détectent correctement les ligands estrogéniques connus, le bisphénol A et la génistéine
- La grande majorité des polluants environnementaux testés n'est pas estrogénique dans les bio-essais *in vitro* et *in vivo*
- Le BaP, TPP et 4-n-NP ont des réponses opposées entre bio-essais *in vitro* humain et de poisson zèbre : estrogéniques en MELN mais anti-estrogéniques dans les ZELH-zfERs

Les différences inter-modèles observées pour certaines molécules soulèvent la question de facteurs modèle-spécifiques capables d'influencer la réponse estrogénique (ex : interaction entre ER et AhR dans le cas du BaP ?), et de leurs conséquences sur l'activité des xeno-estrogènes en mélange.

Tableau XI: Résultats du criblage de 34 molécules sur les bio-essais MELN, ZELH α , ZELH β 2, ZELH, PXR et dans le test EASZY. Molécules estrogéniques en vert, anti-estrogénique en orange, inactives en gris et non testées en blanc. Les résultats de l'in vitro sont exprimés en EC20/IC20 (μ M) correspondant à un minimum de 2 expériences indépendantes. Tests EASZY : EC50 (μ M).

	MELN		ZELH α		ZELH β 2		ZELH	EASZY	PXR
	ER	Anti-ER	ER	Anti-ER	ER	Anti-ER	Anti-LUC	ER	
Genisteine	0,025		0,4		0,017			2,5	0,67
Bisphenol A	0,087		1,4	7,96	0,38	5,15		3,3	5,3
Triphenylphosphate	2			0,71		0,69			0,96
4-n-Nonylphenol	0,67			1,9		1,9			
Benzo(a)pyrene	0,66			0,0051		1,25			
Diazinon	14,0								2,5
Chlorpyrifos	92,5					6,96			45,8
Terbutylazine	20								5,6
Cyprodinil		18		1,78		5,5	3,8		68,4
Chlorophene				6,49		3,9			24,5
Benzo(b)fluoranthene				2,83		0,68	1,46		
Propiconazole				4,38		5,21	1,99		2,8
Diclofenac									76,5
Diuron									<20%
Triclosan									5,1
Hexadecylpyridinium									1,9
Fipronil									0,66
Metolachlor									0,35
Carbamazepine									920
Acide méfenamique									11
Tebuconazole									2,6
Picoxystrobine									4,4
Flutamide									2,5
Carbendazim									
Triclocarban									
Acide perfluorooctanoïque									
Telmisartan									
2,4D									
Metoprolol									
Dinoseb									
Bezafibrate									
Acide clofibrrique									
1,2-Benzisothiazolinone									
Sulfamethoxazole									



Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: Fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water



Peta A. Neale^{a, b}, Rolf Altenburger^c, Selim Aït-Aïssa^d, François Brion^d, Wibke Busch^c, Gisela de Aragão Umbuzeiro^e, Michael S. Denison^f, David Du Pasquier^g, Klára Hilscherová^h, Henner Hollertⁱ, Daniel A. Morales^e, Jiří Novák^h, Rita Schlichting^c, Thomas-Benjamin Seilerⁱ, Helene Serra^d, Ying Shaoⁱ, Andrew J. Tindall^g, Knut Erik Tollefsen^j, Timothy D. Williams^k, Beate I. Escher^{b, c, l, *}

^a Australian Rivers Institute, Griffith School of Environment, Griffith University, Southport, QLD, 4222, Australia

^b The University of Queensland, National Research Centre for Environmental Toxicology (Entox), Brisbane, QLD, 4108, Australia

^c UFZ – Helmholtz Centre for Environmental Research, 04318 Leipzig, Germany

^d Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques INERIS, Unité d'Ecotoxicologie, 60550, Verneuil-en-Halatte, France

^e School of Technology, University of Campinas, Limeira, SP, 13484-332, Brazil

^f Department of Environmental Toxicology, University of California, Davis, CA, 95616, United States

^g WatchFrog, Bâtiment Genavenir 3, 1 rue Pierre Fontaine, 91000 Evry, France

^h Masaryk University, Research Centre for Toxic Compounds in the Environment (RECETOX), Kamenice 753/5, 62500 Brno, Czech Republic

ⁱ Department of Ecosystem Analysis, Institute for Environmental Research, RWTH Aachen University, 52074 Aachen, Germany

^j Norwegian Institute for Water Research NIVA, Gaustadalléen 21, 0349 Oslo, Norway

^k School of Biosciences, The University of Birmingham, Birmingham, B15 2TT, UK

^l Eberhard Karls University Tübingen, Environmental Toxicology, Center for Applied Geosciences, 72074 Tübingen, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2017

Received in revised form

4 June 2017

Accepted 7 July 2017

Available online 9 July 2017

Keywords:

In vitro

Cell-based bioassay

In vivo

Fish embryo toxicity test

ToxCast

Mixture toxicity

ABSTRACT

Surface waters can contain a diverse range of organic pollutants, including pesticides, pharmaceuticals and industrial compounds. While bioassays have been used for water quality monitoring, there is limited knowledge regarding the effects of individual micropollutants and their relationship to the overall mixture effect in water samples. In this study, a battery of *in vitro* bioassays based on human and fish cell lines and whole organism assays using bacteria, algae, daphnids and fish embryos was assembled for use in water quality monitoring. The selection of bioassays was guided by the principles of adverse outcome pathways in order to cover relevant steps in toxicity pathways known to be triggered by environmental water samples. The effects of 34 water pollutants, which were selected based on hazard quotients, available environmental quality standards and mode of action information, were fingerprinted in the bioassay test battery. There was a relatively good agreement between the experimental results and available literature effect data. The majority of the chemicals were active in the assays indicative of apical effects, while fewer chemicals had a response in the specific reporter gene assays, but these effects were typically triggered at lower concentrations. The single chemical effect data were used to improve published mixture toxicity modeling of water samples from the Danube River. While there was a slight increase in the fraction of the bioanalytical equivalents explained for the Danube River samples, for some endpoints less than 1% of the observed effect could be explained by the studied chemicals. The new mixture models essentially confirmed previous findings from many studies monitoring water quality using both chemical analysis and bioanalytical tools. In short, our results indicate that many more chemicals contribute to the biological effect than those that are typically quantified by chemical

* Corresponding author. UFZ – Helmholtz Centre for Environmental Research, Permoserstr. 15, 04318 Leipzig, Germany.

E-mail address: beate.escher@ufz.de (B.I. Escher).

monitoring programs or those regulated by environmental quality standards. This study not only demonstrates the utility of fingerprinting single chemicals for an improved understanding of the biological effect of pollutants, but also highlights the need to apply bioassays for water quality monitoring in order to prevent underestimation of the overall biological effect.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chemical pollution in rivers has been identified as a major threat to ecosystem and public health (Vörösmarty et al., 2010; Malaj et al., 2014). Busch et al. (2016) identified 426 different chemicals present in European rivers, including the Danube and Rhine. While the huge number of chemicals present in surface waters indicates that targeted chemical analysis alone is unsuitable for understanding the overall chemical burden, it is still the main approach used for water quality monitoring, e.g., in the European Union Water Framework Directive (WFD) (European Commission, 2011, 2012).

A diverse set of *in vivo*, *in vitro* and ecological indicators were proposed as monitoring tools within the WFD (Wernersson et al., 2015). *In vivo* bioassays have a long tradition of application in effluent assessment and water quality monitoring studies (Escher and Leusch, 2012). In contrast, *in vitro* cellular bioassays have mainly been applied to assess technical water treatment processes, such as sewage treatment (Prasse et al., 2015), advanced water treatment (Leusch and Snyder, 2015) and drinking water treatment (Neale et al., 2012). In most applications, *in vitro* bioassays are not being used as a direct link to the ecological health of aquatic organisms, but rather as a complementary analytical tool to detect and quantify chemicals via their response to environmental mixtures. The EU Project SOLUTIONS proposes to connect both approaches and employ bioassays for water quality monitoring whilst linking them to chemical assessment (Altenburger et al., 2015). Cell-based bioassays have also been proposed as part of the first tier screening step of a new conceptual framework for monitoring water contaminants in California (Maruya et al., 2016).

Programs such as the United States Environmental Protection Agency (US EPA) Toxicity Forecaster (ToxCast) and Toxicity Testing in the 21st Century (Tox21) have screened a large number of chemicals in more than a thousand *in vitro* assays (US EPA, 2015). These programs focus on human health assessment (Tice et al., 2013), with less attention on effects relevant to environmental risk assessment. More recently, Schroeder et al. (2016) proposed the application of the high-throughput screening tools used in ToxCast and Tox21 for environmental surveillance and water quality monitoring initiatives.

Consequently, the goal of the current study was to assemble a battery of bioassays that covers both the expected effects and safeguards against overlooking others with unidentified modes of action. Cellular assays based on different steps of cellular toxicity pathways were applied, as well as whole organism assays indicative of both apical and specific effects. Cellular effects are key parts of adverse outcome pathways (Ankley et al., 2010), with the studied bioassays covering induction of xenobiotic metabolism, receptor-mediated effects, reactive modes of action, induction of adaptive stress response pathways and cell viability. Assays using bacteria (*Aliivibrio fischeri* and *Salmonella enterica serovar typhimurium*), algae (*Chlamydomonas reinhardtii*), crustaceans (*Daphnia magna*), fish (embryonic *Danio rerio* and *Oryzias latipes*) and amphibians (embryonic *Xenopus laevis*) were applied, while cellular responses were evaluated using cultured fish cells (*Danio rerio*), as well as mammalian cells (human and rat cell lines), allowing comparison

with the existing US EPA ToxCast database (US EPA, 2015). Effect data from peer-reviewed literature and the US EPA ToxCast database were collected and compared with our experimental effect data. *In vitro* and whole organism specific effects were compared to determine if the studied pollutants acted as baseline toxicants, meaning they would result in non-specific effects, or would produce specific effects in the whole organism assays. The generated effects data were finally applied to improve mixture toxicity modeling for environmental water samples.

2. Assembling a bioanalytical test battery for surface water quality monitoring

Ideally, a bioanalytical test battery for water quality monitoring should be motivated by effects found typically in water and include assays covering a wide range of environmentally relevant modes of action and different stages of cellular toxicity pathways, as well as low-complexity whole-organism effects (Fig. 1). To narrow down the large number of available bioassays to a smaller list of indicator bioassays, a balance must be struck between the desire to cover all possible effects and practicability issues. Broad coverage of modes of action, inclusion of the contributions from all chemicals and relevance for ecological health through the alignment of the bioassays to relevant steps of adverse outcome pathways are desirable (Schroeder et al., 2016), as well as a focus on effects that have been previously observed in water samples (Escher et al., 2014). Practicability, assay robustness, applicability for less specialized laboratories and the possibility to run the assays in a high-throughput mode for low-volume tests were further considered (Escher and Leusch, 2012). Reducing the sample volume requirements for each test is also important as it facilitates routine monitoring by decreasing the total volume required at each sampling location.

A large screening study using more than a hundred individual *in vitro* bioassays as well as a multifactorial assay that quantifies the activation of 25 nuclear receptors and 45 transcription factors demonstrated that the estrogen receptor (ER), and to a lesser degree the glucocorticoid receptor (GR), were amongst the most responsive hormonal nuclear receptors in wastewater and surface water testing (Escher et al., 2014). Therefore, ER reporter gene assays were a prominent component of the test battery in this study and we included assays using human and fish cell lines (Table 1). Furthermore, surface water samples have also been shown to inhibit the androgen receptor (AR) (Escher et al., 2014; Jállová et al., 2013). Given the high relevance of hormone receptors, we added three transgenic assays that have been developed in recent years to assess hormone-mediated effects in early life-stage organisms (Brion et al., 2012; Fini et al., 2007; Spirhanzlova et al., 2016). Nuclear receptors triggering the activation of metabolism and other biological effects such as the aryl hydrocarbon receptor (AhR), the pregnane X receptor (PXR) and the peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR γ) were even more prominently activated by water sample extracts (Escher et al., 2014) and play a prominent role in the proposed test battery.

We also included reporter gene assays for activation of adaptive stress responses in the present study (Table 1, Fig. 1). Adaptive stress responses are key events (Simmons et al., 2009) and very

recent work has elucidated the key event relationships of the toxicologically relevant Nrf2- and p53-mediated adaptive stress responses in response to reference chemicals (Hiemstra et al., 2017; Wink et al., 2014, 2017). Nrf2, which activates the oxidative stress response, was most responsive in water samples in a large number of studies (Escher et al., 2012, 2014, 2015; König et al., 2017; Neale et al., 2015, 2017), while p53 activity was only occasionally detected in water samples (e.g., Yeh et al., 2014). A recent study using the Attagene battery as part of the ToxCast high-throughput screening assays identified this same transcription factor Nrf2 as being relevant for surface water quality monitoring and also identified the hypoxia pathway as relevant (Schroeder et al., 2016). A reporter gene assay for hypoxia was not included in the present effort but will be added to the test battery in the near future.

Mutagenicity, a reactive mode of action, is another important endpoint of ecological and human health relevance. With the exception of the p53 transcription factor assay, which is often masked by cytotoxicity when applied to surface water samples (e.g., Neale et al., 2017), available reporter gene assays are not suitable for detecting DNA damage. Instead, we included two protocols of the classic Ames assay in the present study (Table 1, Fig. 1). The Ames assay detects gene mutations and has been widely used for environmental and wastewater assessment (Claxton et al., 2010; Reifferscheid et al., 2012; Umbuzeiro et al., 2016).

Whole organism assays indicative of apical effects, such as algal growth inhibition, *Daphnia* immobilization and fish embryo toxicity (FET), are more widely used for water quality assessment than cellular assays to date and can provide information about effects on mortality, growth, development and reproduction (Di Paolo et al., 2016; Wernersson et al., 2015). They are comprehensive as they cover the effects from multiple toxicity pathways leading to the same apical endpoint. Consequently, whole organism assays integrate the mixture effects of all chemicals that are present in a sample, depending on their effect potency. Therefore, they constitute an important complement to the specific bioassays. In this study we have included the Microtox test, a rapid assay based on bioluminescence inhibition of bacteria that has been demonstrated to be a useful pre-screening tool for water samples (Tang et al., 2013), the algal growth inhibition test, the immobilization test with *Daphnia magna* and the fish embryo toxicity test with *Danio rerio* as typical representatives of apical endpoints and whole organism tests that are still legally considered to be *in vitro* test systems (Table 1, Fig. 1). This latter aspect is not only an important consideration for animal ethics but also because only *in vitro* assays

can be scaled up to high-throughput. In fact, several of the applied bioassays are already running on robotic systems in 384 well (cell-based assays) or 96 well (FET, algae) format, though they can also be run in a low-throughput mode, making the panel of indicator bioassays very versatile.

The panel of bioassays selected here is one possible example of a test battery design, but the reasoning provided above should be considered when designing any fit-for-purpose monitoring test battery. For example, the number of bioassays may be reduced for routine monitoring applications, whereas evaluation of highly impacted sites may require expansion of the number of bioassays to cover unusual responses triggered in whole organism endpoints. As specific and selective reporter gene assays will not capture all relevant modes of action, it is important to complement these endpoints with whole organism assays indicative of apical effects and to ensure that the bioassay battery covers different events/steps in selected toxicity pathways (Fig. 1).

3. Materials and methods

3.1. Chemical selection

A total of 34 water pollutants were selected for the current study (Table 2). Thirty-two of the chemicals were selected from the list of 214 chemicals identified as relevant river pollutants by Busch et al. (2016) due to their presence in European river systems and hazard quotients $> 10^{-4}$. The hazard quotients were calculated based on the 95th percentile measured environmental concentration and measured or predicted algal, daphnid and fish 5th percentile acute effect concentration data. Further details are available in Busch et al. (2016). In addition, the pharmaceutical flutamide and the fungicide picoxystrobin were also included to represent a potent anti-androgen and a respiration inhibitor, respectively. Picoxystrobin, which inhibits respiration by blocking electron transport, was added to complement the pesticide dinoseb, which also inhibits respiration but via uncoupling i.e., by protonophoric shuttle mechanisms.

The studied chemicals included pharmaceuticals, pesticides and industrial compounds, and the selection process was based on scoring (a) their rank in the hazard quotient list, (b) the availability of an environmental quality standard (EQS) from the WFD or at least a published proposed EQS, (c) a unique mode of action that is not covered by a higher ranked chemical, (d) diversity of chemical

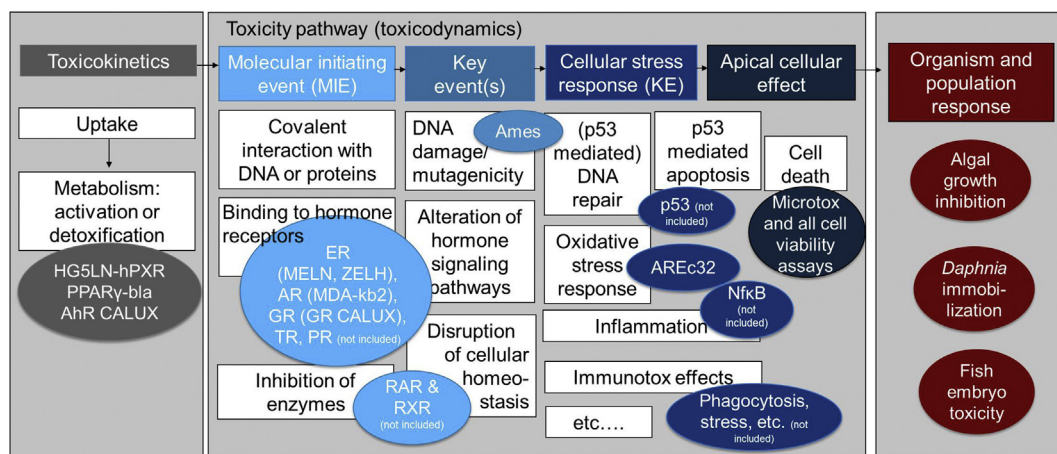


Fig. 1. Design of the panel of bioassays/biological endpoints (ovals) recommended for water quality assessment and where they are situated along the adverse outcome pathway (boxes). The cyp19a1b-GFP, ChgH-GFP and THbZIP-GFP assays were also included in the study, but are not shown in the figure.

Table 1

The applied assays with the number of chemicals tested per assay and the number of chemicals active in each assay.

Assay ID	Assay name	Measured endpoint or molecular target	Method reference	No. of tested chemicals	No. of active chemicals
1	AhR CALUX	Activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR)	Brennan et al. (2015)	18	7
2	HG5LN-hPXR	Activation of pregnane x receptor (PXR)	Lemaire et al. (2006)	34	20
3	PPAR γ -bla	Binding of chemicals to peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)	Invitrogen (2010)	18	4
4	MDA-kb2	Activation of androgen receptor (AR)	Wilson et al. (2002)	24	3
5	Anti-MDA-kb2	Inhibition of androgen receptor (AR)	Wilson et al. (2002)	25	12
6	MELN	Activation of estrogen receptor (ER)	Balaguer et al. (1999)	34	9
7	ZELH-zfERalpha	Activation of estrogen receptor (ER)	Cosnefroy et al. (2012)	34	2
8	ZELH-zfERbeta2	Activation of estrogen receptor (ER)	Cosnefroy et al. (2012)	34	2
9	GR CALUX	Activation of glucocorticoid receptor (GR)	Van der Linden et al. (2008)	20	0
10	cyp19a1b-GFP	cyp19a1b gene expression	Brion et al. (2012)	26	2
11	ChgH-GFP	Estrogen receptor (ER) modulation, modulation of steroidogenesis	Spirhanzlova et al. (2016)	24	17
12	THbZIP-GFP (XETA)	Modulation of thyroid hormone signaling	Fini et al. (2007)	20	9
13	Ames fluctuation test	Mutagenicity (+/-S9)	Reifferscheid et al. (2012)	22	1
14	Ames microplate agar	Mutagenicity (+/-S9)	DeMarini et al. (1989), Mortelmans and Zeiger (2000)	12	1
15	AREc32	Induction of oxidative stress response	Escher et al. (2012)	18	9
16	Microtox	Inhibition of bioluminescence	(Escher et al., 2017)	34	16
17	Algal growth inhibition	Growth inhibition	OECD (2011)	17	12
18	<i>Daphnia</i> immobilization test	Immobilization	OECD (2004)	17	15
19	FET (96 well plate)	Mortality	OECD (2013)	20	13
20	FET (glass vial)	Mortality	OECD (2013)	29	17

use groups, (e) a specific mode of action that is covered by the test battery, (f) a specific mode of action expected to lead to enhanced toxicity in the whole organism bioassays and (g) lack of rapid biodegradation based on BIOWIN™ (US EPA, 2008). The final scores for prioritization are given in Table S1 of the Supplementary Information.

A minimum score of three points was required to qualify a chemical for experimental analysis and preference was given to chemicals ranked in the top 100 of Busch et al. (2016). An exception was hexadecylpyridinium, which had a score of two, but was still included as it was the only surface active antiseptic compound and was ranked 2nd in Busch et al. (2016) based on its hazard quotient. The non-steroidal anti-androgenic compound flutamide only had a score of 2 because no information about its degradability was available in BIOWIN™. All other compounds, with the exception of hexadecylpyridinium, were not readily biodegradable according to BIOWIN™, which meets the expectation that more recalcitrant chemicals will be found in surface water. The antibiotic sulfamethoxazole was the only antibiotic selected despite its low rank in Busch et al. (2016) because no other sulfonamides were ranked higher and they are an important antibiotic group. Apart from these exceptions, all other chemicals were selected based on their high score. If chemicals with a similar structure and function had an equal score, the chemical ranked higher in Busch et al. (2016) was included.

3.2. Data mining

Effect data for the 34 selected chemicals were collected from either the peer reviewed literature or the US EPA ToxCast database (US EPA, 2015) for the studied bioassays. The effect data were categorized based on data availability and quality (Fig. S1). A chemical was considered active if it had a response in the studied assay, while a chemical was considered inactive if it was tested in a studied assay and had no effect (or was inactive up to cytotoxic concentrations). When experimental data were unavailable for the studied assay, but available in another assay covering the same mode of action, chemicals were assigned the class of likely active or

likely inactive, based on whether they produced an effect or not. If no experimental data were available, but the mode of action of the studied chemical and bioassays theoretically matched, the chemicals were assigned as potentially active or potentially inactive. Chemicals were considered as 'inactive' if they were only active in the whole organism assays indicative of apical effects at effect concentrations (EC) greater than 1 mM. The 1 mM cut-off was based on the highest tested chemical concentration in many assays in the ToxCast database. In some cases, no information could be found and the chemical was designated as 'no information available'.

3.3. Bioanalysis

Bioassays applied in this study are listed in Table 1. A summary of experimental conditions, test media and quality controls are provided in Table S2. Detailed standard operating procedures (SOP) of the bioassays, also detailing whether cytotoxicity controls were performed, are presented in the SI. All chemicals were run with at least two independent replicates in each assay, with each chemical assessed over a range of concentrations. Concentration-effect curves for each assay's positive reference compound are shown in Fig. S2. The assays were run by eight different laboratories and it should be noted that not all 34 selected chemicals were run in all assays, but the average coverage was 71% with the exact numbers tested given in Table 1 and the percentage tested given in Table S2. The coverage depended on the capacity of each laboratory and prior knowledge of the mechanism of action. For example, the algae growth inhibition assay focused on chemicals with known effects on photosynthesis or other modes of action likely to lead to substantial toxicity, with only 50% of the chemicals tested, while the Microtox assay was applied to all 34 chemicals. The chemical concentration ranges studied in the different assays are provided in Table S3, with the maximum tested concentrations selected based on the physicochemical properties of the studied chemicals including solubility.

Table 2
Summary of the selected test chemicals, their mode of action, proposed annual average concentration environmental quality standard (AA-EQS), maximum hazard quotient in Busch et al. (2016) and chemical score given in this study.

Chemical ID	Chemical	CAS No.	Molecular Weight (g/mol)	Chemical use group	Mode of action ^a	Annual Average Environmental Quality Standards ($\mu\text{g/L}$)	Maximum hazard quotient ^g (Busch et al., 2016)	Chemical score ^h
1	1,2-Benzisothiazolinone	2634-33-5	151.18	Biocide	Skin sensitization (soft electrophilic reactive toxicity) ^b		7.88×10^{-4}	6
2	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	94-75-7	221.04	Herbicide	Synthetic auxin	0.2 ^e	1.78×10^{-3}	4
3	4-Nonylphenol	104-40-5	220.35	Industrial Chemical	Endocrine disruption	0.043 ^e ; 0.3 ^f	2.14×10^{-2}	5
4	Benzo(a)pyrene	50-32-8	252.32	Combustion by-product	Nucleic acid damage	1.7×10^{-4f}	4.88×10^{-3}	4
5	Benzo(b)fluoranthene	205-99-2	252.31	Combustion by-product	Nucleic acid damage		3.34×10^{-3}	4
6	Bezafibrate	41859-67-0	361.83	Pharmaceutical	Lipid metabolism	2.3 ^e	4.15×10^{-2}	4
7	Bisphenol A	80-05-7	228.29	Industrial Chemical	Endocrine disruption	0.24 ^e	2.10×10^{-2}	5
8	Carbamazepine	298-46-4	236.28	Pharmaceutical	Ion channel modulation	2.0 ^e	1.48×10^{-3}	4
9	Carbendazim	10605-21-7	191.19	Fungicide	Mitosis, cell cycle	0.44 ^e	2.65×10^{-2}	4
10	Chlorophene	120-32-1	218.68	Industrial Chemical	Skin sensitization (soft electrophilic reactive toxicity) ^c		4.19×10^{-3}	5
11	Chlorpyrifos	2921-88-2	350.59	Insecticide	Neuroactive	4.6×10^{-4e}	1.07×10^{-1}	6
12	Clofibric acid	882-09-7	214.65	Herbicide	Synthetic auxin		5.64×10^{-3}	5
13	Cyprodinil	121552-61-2	225.29	Fungicide	Protein biosynthesis inhibition	0.33 ^e	5.34×10^{-3}	4
14	Diazinon	333-41-5	304.35	Insecticide	Neuroactive	0.012 ^e	4.67×10^0	5
15	Diclofenac	15307-86-5	296.15	Pharmaceutical	Antiinflammatory	0.05 ^e	6.77×10^{-2}	5
16	Dinoseb	88-85-7	240.21	Herbicide	Respiration inhibition, uncoupler of oxidative phosphorylation ^d		1.65×10^{-3}	5
17	Diuron	330-54-1	233.10	Herbicide	Photosynthesis inhibition	0.07 ^e ; 0.2 ^f	7.06×10^{-1}	6
18	Fipronil	120068-37-3	437.15	Insecticide	Neuroactive		1.44×10^{-1}	4
19	Flutamide	13311-84-7	276.21	Pharmaceutical	Endocrine disruption		–	2
20	Genistein	446-72-0	270.24	Phytoestrogen	Mitosis, cell cycle		6.13×10^{-4}	4
21	Hexadecylpyridinium	7773-52-6	304.54	Industrial Chemical	Cell membrane disruption		1.24×10^2	2
22	Mefenamic acid	61-68-7	241.29	Pharmaceutical	Antiinflammatory	1.0 ^e	8.70×10^{-2}	5
23	Metolachlor	51218-45-2	283.80	Herbicide	Mitosis, cell cycle		3.23×10^{-2}	4
24	Metoprolol	37350-58-6	267.37	Pharmaceutical	Beta blocker	8.6 ^e	3.51×10^{-4}	3
25	Perfluorooctanoic acid	335-67-1	414.07	Industrial Chemical	Carcinogen, Endocrine disruption, lipid metabolism		1.63×10^{-3}	3
26	Picoxystrobin	117428-22-5	367.32	Fungicide	Respiration inhibition		–	3
27	Propiconazole	60207-90-1	342.23	Fungicide	Sterol biosynthesis inhibition		3.49×10^{-2}	4
28	Sulfamethoxazole	723-46-6	253.28	Antibiotic	Antibiotic	0.6 ^e	9.81×10^{-4}	4
29	Tebuconazole	107534-96-3	307.82	Fungicide	Sterol biosynthesis inhibition	0.24 ^e	2.40×10^{-3}	4
30	Telmisartan	144701-48-4	514.62	Pharmaceutical	Angiotensin receptor or enzyme		3.09×10^2	4
31	Terbutylazine	5915-41-3	229.71	Herbicide	Photosynthesis inhibition	0.22 ^e	3.86×10^{-1}	4
32	Triclocarban	101-20-2	315.59	Biocide	Lipid metabolism		1.64×10^{-2}	3
33	Triclosan	3380-34-5	289.55	Biocide	Lipid metabolism, uncoupler of oxidative phosphorylation ^d	0.02 ^e	4.22×10^{-1}	4
34	Triphenylphosphate	115-86-6	326.29	Industrial Chemical	Neuroactive		2.01×10^{-2}	4

^a Busch et al. (2016).

^b Basketter et al. (1999).

^c Yamarik and Andersen (2004).

^d Spycher et al. (2008).

^e Proposed by Oekotoxzentrum (2017).

^f European Commission (2013).

^g Maximum hazard quotient in fish, daphnia or algae is presented.

^h Chemical score based on rank in the hazard quotient list, the availability of an EQS, a unique mode of action that is not covered by a higher ranked chemical, diversity of chemical use group, specific mode of action that is covered by the test battery, specific mode of action that leads to expectation of enhanced toxicity in the whole organism bioassays and not readily biodegradable based on BIOWIN. Further information is provided in Table S1.

3.4. Data evaluation

EC values were derived from concentration–effect curves, with different models applied depending on the assay type. All EC values were expressed in molar units. The data evaluation, which aimed to be as simple and standardized as possible across the entire panel of bioassays, was developed in a previous study (Escher et al., 2014). Briefly, for assays where a maximum effect could be reached, such as induction of xenobiotic metabolism, hormone-mediated effects and apical effects, the experimental % effect was calculated using Equation (1), where $\text{signal}_{\text{sample}}$ is the signal of the tested chemical, $\text{signal}_{\text{control}}$ is the signal of the solvent control and $\text{signal}_{\text{max}}$ is the maximum response of the positive reference compound in the assay. Signal refers to measured luminescence or fluorescence and is specific for each assay. Details are given in the SOPs of the assays in the SI.

$$\% \text{effect} = \frac{\text{signal}_{\text{sample}} - \text{signal}_{\text{control}}}{\text{signal}_{\text{max}} - \text{signal}_{\text{control}}} 100\% \quad (1)$$

Both linear and log-sigmoidal concentration–effect curves were applied to determine EC values for % effect data and only linear concentration–effect curves were applied to induction ratio (IR) effect data.

Log-sigmoidal concentration–effect curves (Equation (2)) were applied for the reference compounds in the reporter gene assays and for all chemicals in the bioassays indicative of apical effects. The concentration causing 50% effect (EC_{50}) was derived from the fit applied to the experimental data using Equation (2), where the slope and the EC_{50} value were the adjustable parameters.

$$\% \text{effect} = \frac{100\%}{1 + 10^{\text{slope}(\log \text{EC}_{50} - \log \text{concentration})}} \quad (2)$$

Log-sigmoidal concentration–effect curves are linear with respect to linear concentrations up to an effect level of approximately 40% (Escher et al., 2014). Linear concentration–effect curves (Equation (3)) were applied to determine the concentration causing 10% effect (EC_{10}) (Equation (4)) in the induction of xenobiotic metabolism, hormone-mediated effects and Ames fluctuation test assays because many of the tested compounds did not reach 50% effect in these assays and because in some cases cytotoxicity can mask the specific effect at high concentrations in reporter gene assays. Cytotoxicity was measured in parallel to induction for many cell-based reporter gene assays and concentrations that caused more than 10% cytotoxicity were excluded from the data evaluation in the reporter gene assays because they would produce false positive (“cytotoxicity burst” (Judson et al., 2016)) or false negative results (masking of effect by cytotoxicity).

$$\% \text{effect} = \text{concentration} \times \text{slope} \quad (3)$$

$$\text{EC}_{10} = \frac{10\%}{\text{slope}} \quad (4)$$

EC values derived from both linear and log-sigmoidal curves are shown in Fig. S3 for the AhR CALUX, HG5LN-hPXR, anti-MDA-kb2 and MELN assays, with both approaches yielding similar EC values. Linear concentration–effect curves are a necessity when cytotoxicity occurs at higher concentrations, but are also advantageous for the calculation of bioanalytical equivalent concentrations (BEQ), which requires in principle parallel log-sigmoidal concentration–effect curves, but this is not a restriction for linear concentration–effect curves as was discussed in more detail in Neale et al. (2015).

For those assays where a maximum effect could not be defined, such as the adaptive stress response (AREc32) and Ames microplate

agar assays, an IR was calculated using Equation (5). The concentration causing an induction ratio of 1.5 ($\text{EC}_{\text{IR}1.5}$) was determined for linear concentration–effect curves (Equation (6)) up to an IR of 5 using Equation (7).

$$\text{IR} = \frac{\text{signal}_{\text{sample}}}{\text{signal}_{\text{control}}} \quad (5)$$

$$\text{IR} = 1 + \text{concentration} \times \text{slope} \quad (6)$$

$$\text{EC}_{\text{IR}1.5} = \frac{0.5}{\text{slope}} \quad (7)$$

The MDA-kb2 assay was also conducted in antagonist mode (anti-MDA-kb2) and a suppression ratio (SR) was calculated for anti-MDA-kb2 using Equation (8), where $\text{signal}_{\text{agonist}}$ is the response of the agonist, which is typically the highest signal in the assay. A linear concentration–effect curve analogous to Equation (3) was used to derive the effect concentration causing a SR of 0.2 ($\text{EC}_{\text{SR}0.2}$) (Equation (9)).

$$\text{SR} = 1 - \frac{\text{signal}_{\text{sample}} - \text{signal}_{\text{control}}}{\text{signal}_{\text{agonist}} - \text{signal}_{\text{control}}} \quad (8)$$

$$\text{EC}_{\text{SR}0.2} = \frac{0.2}{\text{slope}} \quad (9)$$

The described data evaluation methods could not be applied to the ChgH-GFP (spiked mode only) or the THbZip-GFP (XETA) assays. Therefore, analysis of variance (ANOVA) or nonparametric testing was applied to assess whether the signal of the sample was statistically different from the control using either Dunnett's multiple comparison test (assuming Gaussian distribution) or Dunn's multiple comparison test (assuming non-Gaussian distribution). The lowest observable effect concentration (LOEC) was reported.

3.5. Quantitative structure- activity relationship

Experimental EC_{50} values for chemicals in assays indicative of apical effects (Microtox, algal growth inhibition, *Daphnia* immobilization test and FET assay) were compared with predicted EC_{50} values using QSARs for baseline toxicity from the literature. The aim of this analysis was to determine if a chemical had a specific or non-specific effect in the whole organism assay.

The liposome water partition constant K_{lipw} was used in the QSAR instead of the octanol-water partition constant K_{ow} to account for speciation and diversity of the chemicals as K_{lipw} are applicable for polar and nonpolar baseline toxicants (Escher and Schwarzenbach, 2002). For ionizable compounds, the K_{lipw} was replaced by the ionization-corrected liposome-water distribution ratio (D_{lipw}) with D_{lipw} for the studied chemicals provided in Table S4. The Microtox QSAR was developed by Escher et al. (2017) (Equation (10)), the algal growth inhibition (Equation (11)) and *Daphnia* immobilization test (Equation (12)) were rescaled from K_{ow} according to Escher and Schwarzenbach (2002). The algal growth inhibition QSAR was based on *Chlorella vulgaris*, but the experimental data were derived for *Chlamydomonas reinhardtii*. The FET QSAR was developed by Klüver et al. (2016) (Equation (13)).

$$\log\left(\frac{1}{\text{EC}_{50}(\text{M})}\right) (\text{Microtox}) = 0.75 \cdot \log D_{\text{lipw}} + 0.97 \quad (10)$$

$$\log\left(\frac{1}{EC_{50}(M)}\right) (\text{algal growth inhibition}) = 0.91 \cdot \log D_{lipw} + 0.63 \quad (11)$$

$$\log\left(\frac{1}{EC_{50}(M)}\right) (\text{Daphnia immobilization test}) = 0.77 \cdot \log D_{lipw} + 1.89 \quad (12)$$

$$\log\left(\frac{1}{EC_{50}(M)}\right) (\text{FET}) = 0.99 \cdot \log D_{lipw} + 0.78 \quad (13)$$

The toxic ratio (TR_i) was derived using Equation (14) from Verhaar et al. (1992), with a chemical with a TR of > 0.1 to < 10 considered a baseline toxicant, while a chemical with a $TR > 10$ was considered to have a specific effect in the assay.

$$TR_i = \frac{EC_{50\text{-baseline toxicity QSAR},i}}{EC_{50\text{-experimental},i}} \quad (14)$$

3.6. Mixture toxicity modeling

To compare different chemicals in one bioassay and as a basis for mixture toxicity modeling (Neale et al., 2015), the relative effect potency (REP_i) was calculated from the effect concentration of the reference compound divided by the effect concentration of compound i (Equation (15)). The REP_i can be defined for any effect concentration EC_x for any matching effect level x but it is only independent of effect level for linear concentration-effect curves (Neale et al., 2015) or if the slopes of the sigmoidal log-concentration-effect curves are similar for the reference compound and the compound of interest, i (Villeneuve et al., 2000).

$$REP_i = \frac{EC_x(\text{ref})}{EC_x(i)} \quad (15)$$

In mixture toxicity modeling we compare the bioanalytical equivalent concentrations from bioassays (BEQ_{bio} , Equation (16)) with the bioanalytical equivalent concentrations from chemical analysis (BEQ_{chem} , Equation (17)) for environmental samples using the detected concentration of an individual chemical (C_i) and its REP_i (Neale et al., 2015).

$$BEQ_{\text{bio}} = \frac{EC_x(\text{ref})}{EC_x(\text{sample})} \quad (16)$$

$$BEQ_{\text{chem}} = \sum_{i=1}^n REP_i \cdot C_i \quad (17)$$

4. Results

4.1. Availability of effect data in literature

A variable picture of available effect data emerged for the 34 selected chemicals in the 20 studied assays (Fig. S4, Table S5). Several of the studied compounds, including fipronil, carbendazim, bisphenol A, propiconazole, triclocarban, chlorophene, benzo(a)pyrene, benzo(b)fluoranthene and genistein, were expected to be active, likely active or potentially active in more than 50% of the

studied assays. In contrast, no information was available regarding the effect of telmisartan, hexadecylpyridinium, clofibrac acid and mefenamic acid in 50% or more of the selected assays. Data availability tended to be more comprehensive for the conventional ecotoxicology tests, such as the *Daphnia* immobilization test and the FET assay, while there was no information available regarding the effect for 50% or more of these relevant water contaminants for the HG5LN-hPXR, ZELH-zfERalpha, ZELH-zfERbeta2 and Cyp19a1b-GFP assays. The US EPA ToxCast database proved to be a valuable tool, with effect or likely effect data available for 33 of the 34 studied chemicals for the AhR CALUX, PPAR γ -bla, MDA-kb2 and AREc32 assays. Overall, the data mining exercise highlights the lack of effect data for many of the detected water pollutants, emphasizing the importance of fingerprinting their biological effects.

4.2. Experimental effect data

The experimental EC values for the studied chemicals are reported in Table 3, with a summary of the active and inactive chemicals shown in Fig. 2A and all concentration-effect curves provided in Figs. S5–S27. Twenty-four of the representative chemicals were run in 10 or more assays, with bisphenol A (70%), diazinon (55%), cyprodinil (50%) and triphenylphosphate (50%) active in 50% or more of the applied assays. In contrast, hexadecylpyridinium (20%), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (18%), telmisartan (15%) and triclocarban (17%) were active in 20% or less of the studied assays, while carbendazim was only active in the FET assay, despite being predicted to be active, likely active or potentially active in 50% of the assays and ranked at 16th in the list of potentially bioactive chemicals by Busch et al. (2016). The comparison between the experimental data and expected activity based on the data mining exercise is shown in Fig. 2B. While only a qualitative assessment was possible, between 39% and 100% of the experimental effect data matched the expected activity, with over 60% similarity observed for most assays (Table S6). The observed effects of the chemicals for each assay class are described below.

4.2.1. Induction of xenobiotic metabolism

Assays indicative of activation of AhR (AhR CALUX (ID 1)), activation of PXR (HG5LN-hPXR (ID 2)) and binding to PPAR γ (PPAR γ -bla (ID 3)) were applied in the current study. Seven of the 18 tested chemicals were active in the AhR CALUX assay, while 20 of the 34 chemicals were active in the HG5LN-hPXR assay, which fits with previous findings by Martin et al. (2010) that many environmental chemicals can activate AhR and PXR. In contrast, only 4 out of the 18 tested chemicals were active in the PPAR γ -bla assay, with the pharmaceutical telmisartan the only active compound that matched with the available effect data from the US EPA ToxCast database (US EPA, 2015).

4.2.2. Hormone receptor-mediated effects

In vitro assays indicative of activation and inhibition of AR (MDA-kb2 (ID 4), anti-MDA-kb2 (ID 5)), activation of ER (MELN (ID 6), ZELH-zfERalpha (ID 7), ZELH-zfERbeta2 (ID 8)) and activation of GR (GR CALUX (ID 9)) were included in the test battery. Twenty-four compounds were run in the MDA-kb2 assay, with only three chemicals, benzo(a)pyrene, benzo(b)fluoranthene and genistein, inducing more than 10% effect in the assay. The MDA-kb2 assay contains both AR and GR (Wilson et al., 2002), and the active samples were also analyzed in the presence of the AR antagonist flutamide, which suppressed the response, confirming that the three chemicals were indeed AR agonists (Fig. S9). In contrast, 12 of the 25 tested chemicals were active in the anti-MDA-kb2 assay, with seven of these active chemicals also reported to be active in the US EPA ToxCast database (US EPA, 2015). Between 2 and 9 of the

Table 3
 Effect concentrations EC (M) for the selected water pollutants in the studied assays. Lowest observable effect concentration (LOEC) reported for the ChgH-GFP (spiked) and THbZIP-GFP (XETA) assays. SE = standard error, CI = 95% confidence intervals.

Chemical	AhR CALUX (1)	HG5LN-hPXR (2)	PPAR γ -bla (3)	MDA-kb2 (4)	Anti-MDA-kb2 (5)	MELN (6)	ZELH-zfERalpha (7)	ZELH-zfERbeta2 (8)
	EC ₁₀ \pm SE	EC ₁₀ \pm SE	EC ₁₀ \pm SE	EC ₁₀ \pm SE	EC _{SRO.2} \pm SE	EC ₁₀ \pm SE	EC ₁₀ \pm SE	EC ₁₀ \pm SE
1,2-Benzisothiazolinone	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	–	–	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	–	$>2.00 \times 10^{-4}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
4-Nonylphenol	$(1.36 \pm 0.06) \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>1.07 \times 10^{-5}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$>6.67 \times 10^{-5}$	$(9.69 \pm 0.61) \times 10^{-7}$	$>1.00 \times 10^{-5}$	$>1.00 \times 10^{-5}$
Benzo(a)pyrene	$(8.38 \pm 0.55) \times 10^{-10}$	$>1.00 \times 10^{-5}$	$>4.61 \times 10^{-6}$	$(5.20 \pm 0.40) \times 10^{-6}$	$(1.29 \pm 0.14) \times 10^{-6}$	$(5.30 \pm 0.69) \times 10^{-7}$	$>1.00 \times 10^{-5}$	$>1.00 \times 10^{-5}$
Benzo(b)fluoranthene	$(8.23 \pm 0.94) \times 10^{-10}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.96 \times 10^{-6}$	$(5.08 \pm 0.69) \times 10^{-6}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$(7.26 \pm 1.35) \times 10^{-7}$	$>1.00 \times 10^{-5}$	$>1.00 \times 10^{-5}$
Bezafibrate	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	–	–	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Bisphenol A	$>4.47 \times 10^{-5}$	$(4.75 \pm 0.48) \times 10^{-6}$	$>2.51 \times 10^{-5}$	$>6.67 \times 10^{-5}$	$(1.72 \pm 0.24) \times 10^{-7}$	$(6.91 \pm 0.21) \times 10^{-8}$	$(1.41 \pm 0.19) \times 10^{-6}$	$(2.86 \pm 0.27) \times 10^{-6}$
Carbamazepine	–	$(3.63 \pm 0.32) \times 10^{-5}$	–	$>2.00 \times 10^{-4}$	$(5.37 \pm 1.48) \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Carbendazim	$>2.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-6}$	$>5.44 \times 10^{-6}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$>3.00 \times 10^{-6}$	$>3.00 \times 10^{-6}$	$>3.00 \times 10^{-6}$
Chlorophene	$>9.67 \times 10^{-5}$	$(1.02 \pm 0.06) \times 10^{-5}$	$>1.01 \times 10^{-5}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$(2.10 \pm 0.24) \times 10^{-7}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Chlorpyrifos	$(1.25 \pm 0.10) \times 10^{-6}$	$(5.11 \pm 0.34) \times 10^{-6}$	$>5.84 \times 10^{-5}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$(1.42 \pm 0.16) \times 10^{-5}$	$(8.91 \pm 0.41) \times 10^{-6}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Clofibrac acid	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	–	–	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Cyprodinil	$(6.36 \pm 0.88) \times 10^{-6}$	$(5.26 \pm 0.23) \times 10^{-6}$	$>4.21 \times 10^{-5}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$(1.34 \pm 0.36) \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Diazinon	$(1.35 \pm 0.06) \times 10^{-5}$	$(1.44 \pm 0.11) \times 10^{-6}$	$(5.30 \pm 0.46) \times 10^{-5}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$(8.77 \pm 0.58) \times 10^{-6}$	$(8.53 \pm 0.34) \times 10^{-6}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Diclofenac	$>1.37 \times 10^{-4}$	$(3.78 \pm 0.32) \times 10^{-5}$	$(1.21 \pm 0.09) \times 10^{-6}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$>6.67 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Dinoseb	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	–	–	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Diuron	–	$(3.64 \pm 0.34) \times 10^{-5}$	–	$>2.00 \times 10^{-4}$	$>5.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Fipronil	$>3.32 \times 10^{-6}$	$(6.35 \pm 0.78) \times 10^{-6}$	$>1.64 \times 10^{-6}$	$>2.22 \times 10^{-5}$	$(1.83 \pm 0.24) \times 10^{-6}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Flutamide	–	$(2.17 \pm 0.10) \times 10^{-6}$	–	–	$(2.07 \pm 0.08) \times 10^{-7}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Genistein	$>1.30 \times 10^{-5}$	$(1.24 \pm 0.13) \times 10^{-6}$	$>1.41 \times 10^{-5}$	$(4.14 \pm 0.42) \times 10^{-5}$	$>3.33 \times 10^{-5}$	$(1.22 \pm 0.23) \times 10^{-8}$	$(9.71 \pm 0.71) \times 10^{-7}$	$(2.54 \pm 0.37) \times 10^{-8}$
Hexadecylpyridinium	–	$(1.00 \pm 0.11) \times 10^{-6}$	–	$>1.00 \times 10^{-5}$	$>5.56 \times 10^{-7}$	$>1.00 \times 10^{-5}$	$>1.00 \times 10^{-5}$	$>1.00 \times 10^{-5}$
Mefenamic acid	–	$(1.08 \pm 0.06) \times 10^{-5}$	–	$>2.00 \times 10^{-4}$	$>6.67 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Metolachlor	–	$(2.68 \pm 0.11) \times 10^{-7}$	–	–	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Metoprolol	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	–	$>2.00 \times 10^{-4}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Perfluorooctanoic acid	$>1.18 \times 10^{-4}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>2.19 \times 10^{-5}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$>6.67 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Picoxystrobin	–	$(1.73 \pm 0.21) \times 10^{-5}$	–	–	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Propiconazole	$>2.20 \times 10^{-5}$	$(2.94 \pm 0.18) \times 10^{-6}$	$>2.23 \times 10^{-5}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$(2.87 \pm 0.39) \times 10^{-6}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Sulfamethoxazole	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	–	–	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Tebuconazole	–	$(1.88 \pm 0.27) \times 10^{-6}$	–	–	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Telmisartan	$(1.57 \pm 0.08) \times 10^{-5}$	$>5.00 \times 10^{-6}$	$(1.43 \pm 0.10) \times 10^{-7}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$>5.00 \times 10^{-5}$	$>5.00 \times 10^{-6}$	$>5.00 \times 10^{-6}$	$>5.00 \times 10^{-6}$
Terbutylazine	–	$(1.03 \pm 0.06) \times 10^{-5}$	–	–	–	$(1.52 \pm 0.06) \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Triclocarban	$>4.80 \times 10^{-6}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.31 \times 10^{-7}$	$>3.33 \times 10^{-6}$	$>2.22 \times 10^{-6}$	$>1.00 \times 10^{-5}$	$>1.00 \times 10^{-5}$	$>1.00 \times 10^{-5}$
Triclosan	$>8.50 \times 10^{-5}$	$(1.77 \pm 0.16) \times 10^{-6}$	$>2.05 \times 10^{-6}$	$>7.41 \times 10^{-6}$	$(6.52 \pm 0.68) \times 10^{-7}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>1.00 \times 10^{-5}$	$>1.00 \times 10^{-5}$
Triphenylphosphate	$>1.00 \times 10^{-6}$	$(9.10 \pm 0.26) \times 10^{-7}$	$(4.24 \pm 0.34) \times 10^{-6}$	$>2.00 \times 10^{-4}$	$(6.25 \pm 1.13) \times 10^{-6}$	$(1.71 \pm 0.09) \times 10^{-6}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$
Chemical	GR CALUX (9)	cyp19a1b-GFP (10)	ChgH-GFP (11)	THbZIP-GFP (XETA) (12)		Ames fluctuation test (13)	Ames microplate agar (14)	
	EC ₁₀ \pm SE	EC ₁₀ \pm SE (M)	EC ₁₀ (unspiked) (M)	LOEC (spiked) (M)	LOEC (unspiked) (M)	LOEC (spiked) (M)	EC ₁₀ \pm SE	EC _{IR1.5} \pm SE (M)
1,2-Benzisothiazolinone	–	–	–	–	–	–	–	–
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	$>4.52 \times 10^{-4}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>4.52 \times 10^{-4}$	3.39×10^{-4b}	$>4.52 \times 10^{-4}$	$>4.52 \times 10^{-4}$	–	–
4-Nonylphenol	$>2.84 \times 10^{-5}$	$>2.50 \times 10^{-6}$	$>2.27 \times 10^{-6}$	2.27×10^{-6b}	–	–	–	–
Benzo(a)pyrene	$>9.91 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-6}$	–	–	–	–	$(1.70 \pm 0.11) \times 10^{-7c}$	$(6.90 \pm 0.79) \times 10^{-6c}$
Benzo(b)fluoranthene	–	$>3.00 \times 10^{-6}$	$>3.96 \times 10^{-8}$	$>3.96 \times 10^{-8}$	$>3.96 \times 10^{-8}$	$>3.96 \times 10^{-8}$	$>9.91 \times 10^{-8}$	$>3.96 \times 10^{-3}$
Bezafibrate	$>2.76 \times 10^{-4}$	–	–	–	–	–	–	–
Bisphenol A	$>1.10 \times 10^{-4}$	$(1.58 \pm 0.09) \times 10^{-6}$	$(1.24 \pm 0.21) \times 10^{-5}$	2.19×10^{-6a}	1.64×10^{-5a}	1.64×10^{-5a}	$>1.10 \times 10^{-5}$	$>1.31 \times 10^{-2}$
Carbamazepine	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>1.27 \times 10^{-4}$	1.27×10^{-4a}	8.56×10^{-5a}	$>1.27 \times 10^{-4}$	$>4.23 \times 10^{-4}$	–
Carbendazim	$>2.64 \times 10^{-4}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>2.62 \times 10^{-6}$	$>2.62 \times 10^{-6}$	$>2.62 \times 10^{-6}$	$>2.62 \times 10^{-6}$	–	–

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Chemical	GR CALUX (9)	cyp19a1b-GFP (10)	ChgH-GFP (11)	ThbZIP-GFP (XETA) (12)		Ames fluctuation test (13)	Ames microplate agar (14)
Chlorophene	$>5.72 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-6}$	$(5.27 \pm 0.70) \times 10^{-6}$	4.57×10^{-6a}	$>9.14 \times 10^{-5}$	$>9.14 \times 10^{-5}$	$>1.43 \times 10^{-6}$
Chlorpyrifos	$>3.57 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-6}$	$>2.85 \times 10^{-6}$	2.85×10^{-6a}	1.43×10^{-6a}	7.13×10^{-6a}	$>2.85 \times 10^{-5}$
Clofibric acid	–	–	–	–	–	–	–
Cyprodinil	$>4.44 \times 10^{-4}$	$>1.00 \times 10^{-5}$	$>8.88 \times 10^{-6}$	4.44×10^{-6a}	–	–	$>1.61 \times 10^{-5}$
Diazinon	$>1.64 \times 10^{-5}$	$>1.00 \times 10^{-4}$	$>6.16 \times 10^{-5}$	8.21×10^{-6a}	4.11×10^{-5a}	$>6.16 \times 10^{-5}$	$>1.64 \times 10^{-5}$
Diclofenac	$>3.38 \times 10^{-5}$	$>1.00 \times 10^{-6}$	$>1.57 \times 10^{-4}$	1.57×10^{-4a}	$>1.59 \times 10^{-4}$	7.86×10^{-5b}	$>3.38 \times 10^{-5}$
Dinoseb	–	–	–	–	–	–	$>4.16 \times 10^{-7}$
Diuron	$>2.15 \times 10^{-4}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>8.58 \times 10^{-5}$	4.29×10^{-5a}	$>8.58 \times 10^{-5}$	$>8.58 \times 10^{-5}$	$>4.29 \times 10^{-5}$
Fipronil	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>2.29 \times 10^{-7}$	2.29×10^{-7a}	$>2.29 \times 10^{-6}$	$>2.29 \times 10^{-6}$	$>2.29 \times 10^{-7}$
Flutamide	–	–	–	–	–	–	$>3.62 \times 10^{-7}$
Genistein	$>2.31 \times 10^{-5}$	$(4.20 \pm 0.24) \times 10^{-7}$	$>3.70 \times 10^{-6}$	$>3.70 \times 10^{-6}$	$>3.70 \times 10^{-6}$	$>3.70 \times 10^{-6}$	$>4.63 \times 10^{-6}$
Hexadecylpyridinium	–	$>3.00 \times 10^{-7}$	$>2.79 \times 10^{-8}$	$>2.79 \times 10^{-8}$	$>2.79 \times 10^{-8}$	$>2.79 \times 10^{-8}$	–
Mefenamic acid	–	$>3.00 \times 10^{-6}$	$>4.14 \times 10^{-5}$	3.11×10^{-5a}	$>2.07 \times 10^{-6}$	2.07×10^{-6a}	–
Metolachlor	–	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.52 \times 10^{-5}$	$>3.52 \times 10^{-5}$	–	–	$>2.22 \times 10^{-8}$
Metoprolol	$>3.74 \times 10^{-4}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>1.02 \times 10^{-4}$	$>1.02 \times 10^{-4}$	5.11×10^{-5a}	5.11×10^{-5a}	$>3.74 \times 10^{-5}$
Perfluorooctanoic acid	$>1.12 \times 10^{-4}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>2.42 \times 10^{-4}$	1.81×10^{-4a}	2.42×10^{-4a}	$>2.42 \times 10^{-4}$	–
Picoxystrobin	–	–	–	–	–	–	–
Propiconazole	$>7.31 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>2.92 \times 10^{-6}$	2.92×10^{-7a}	$>2.92 \times 10^{-6}$	$>2.92 \times 10^{-6}$	$>7.31 \times 10^{-6}$
Sulfamethoxazole	–	–	–	–	–	–	$>3.95 \times 10^{-7}$
Tebuconazole	–	–	–	–	–	–	$>3.25 \times 10^{-7}$
Telmisartan	–	$>1.00 \times 10^{-6}$	$>9.72 \times 10^{-6}$	$>9.72 \times 10^{-6}$	–	–	–
Terbutylazine	$>4.35 \times 10^{-4}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	–	–	–	–	$>4.37 \times 10^{-7}$
Triclocarban	$>3.17 \times 10^{-4}$	$>3.00 \times 10^{-7}$	$>3.17 \times 10^{-6}$	1.58×10^{-6a}	$>1.59 \times 10^{-7}$	$>1.59 \times 10^{-7}$	–
Triclosan	$>2.16 \times 10^{-5}$	$>1.00 \times 10^{-6}$	$>1.73 \times 10^{-6}$	$>1.73 \times 10^{-6}$	$>1.73 \times 10^{-6}$	$>1.73 \times 10^{-6}$	$>1.08 \times 10^{-6}$
Triphenylphosphate	$>1.92 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$(2.08 \pm 0.20) \times 10^{-6}$	3.06×10^{-6a}	6.13×10^{-6a}	$>6.13 \times 10^{-6}$	$>1.92 \times 10^{-6}$
Chemical	AREC32 (15)	Microtox (16) (Escher et al., 2017)	Algae growth inhibition (17)	Daphnia immobilization test (18)	FET (96 well plate) (19)	FET (Glass vial) (20)	
	EC _{IR1.5} ± SE	EC ₅₀ (95% CI)	EC ₅₀ (95% CI)	EC ₅₀ (95% CI)	EC ₅₀ (95% CI)	EC ₅₀ (95% CI)	
1,2-Benzisothiazolinone	–	$1.62(1.44–1.83) \times 10^{-5}$	–	–	–	$2.14(1.94–2.37) \times 10^{-5}$	
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	–	$2.34(2.03–2.69) \times 10^{-3}$	–	–	–	$>7.71 \times 10^{-4}$	
4-Nonylphenol	$(6.73 \pm 0.73) \times 10^{-5}$	$>2.50 \times 10^{-5d}$	$6.78(6.48–7.08) \times 10^{-6}$	$7.21(6.80–7.64) \times 10^{-8}$	$2.71(2.10–3.51) \times 10^{-5}$	$5.09(4.54–5.69) \times 10^{-6}$	
Benzo(a)pyrene	$(2.22 \pm 0.10) \times 10^{-7}$	$>1.90 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-4}$	$5.12(4.46–5.87) \times 10^{-9}$	$>2.48 \times 10^{-5}$	$>3.94 \times 10^{-5}$	
Benzo(b)fluoranthene	$(2.33 \pm 0.16) \times 10^{-7}$	$>1.78 \times 10^{-5}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>1.19 \times 10^{-5}$	$>2.48 \times 10^{-5}$	$>1.92 \times 10^{-5}$	
Bezafibrate	–	$2.56(2.35–2.79) \times 10^{-3}$	–	–	$>2.76 \times 10^{-4}$	$>3.21 \times 10^{-5}$	
Bisphenol A	$(1.24 \pm 0.11) \times 10^{-4}$	$6.08(5.66–6.52) \times 10^{-5}$	$1.12(1.03–1.21) \times 10^{-4}$	$1.86(1.02–3.40) \times 10^{-5}$	$6.67(5.94–7.50) \times 10^{-5}$	$7.67(7.15–8.24) \times 10^{-5}$	
Carbamazepine	–	$7.41(6.29–8.72) \times 10^{-4}$	–	–	$1.59(1.13–2.25) \times 10^{-4}$	$>4.23 \times 10^{-4}$	
Carbendazim	$>1.24 \times 10^{-4}$	$>1.20 \times 10^{-2}$	–	–	–	$1.94(1.50–2.50) \times 10^{-6}$	
Chlorophene	$(7.49 \pm 0.71) \times 10^{-5}$	$2.42(2.13–2.75) \times 10^{-5}$	$1.26(1.18–1.36) \times 10^{-5}$	$2.21(1.93–2.53) \times 10^{-6}$	$2.07(1.74–2.46) \times 10^{-5}$	$1.13(1.05–1.23) \times 10^{-5}$	
Chlorpyrifos	$>1.31 \times 10^{-4}$	$>2.82 \times 10^{-4}$	$1.85(1.76–1.95) \times 10^{-5}$	$2.42(1.95–3.00) \times 10^{-10}$	$>2.84 \times 10^{-4}$	$>2.45 \times 10^{-5}$	
Clofibric acid	–	$2.07(1.98–2.16) \times 10^{-3}$	–	–	–	$>2.39 \times 10^{-3}$	
Cyprodinil	$(2.75 \pm 0.11) \times 10^{-5}$	$>4.57 \times 10^{-5d}$	$2.71(2.48–2.97) \times 10^{-5}$	$1.49(1.10–2.02) \times 10^{-7}$	$5.61(4.76–6.61) \times 10^{-6}$	$2.78(2.56–3.03) \times 10^{-6}$	
Diazinon	$>1.30 \times 10^{-4}$	$>1.12 \times 10^{-3}$	$2.51(2.36–2.66) \times 10^{-4}$	$4.86(4.29–5.49) \times 10^{-10}$	$2.36(2.24–2.50) \times 10^{-5}$	$1.84(1.49–2.27) \times 10^{-5}$	
Diclofenac	$>1.00 \times 10^{-3}$	$1.28(1.23–1.33) \times 10^{-4}$	$8.66(7.56–9.92) \times 10^{-4}$	$0.98(0.87–1.10) \times 10^{-4}$	$4.19(3.68–4.77) \times 10^{-5}$	$4.33(3.15–5.96) \times 10^{-5}$	
Dinoseb	–	$1.43(1.36–1.50) \times 10^{-5}$	–	–	–	–	
Diuron	–	$>1.54 \times 10^{-4d}$	$3.44(3.04–3.89) \times 10^{-7}$	$0.98(0.91–1.07) \times 10^{-4}$	$4.43(3.58–5.48) \times 10^{-5}$	$1.30(1.19–1.43) \times 10^{-5}$	
Fipronil	$>4.00 \times 10^{-4}$	$>3.47 \times 10^{-6d}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$0.96(0.62–1.49) \times 10^{-7}$	$>2.86 \times 10^{-5}$	$>4.61 \times 10^{-5}$	
Flutamide	–	$>4.67 \times 10^{-5d}$	–	–	–	–	
Genistein	$(7.15 \pm 0.46) \times 10^{-5}$	$>6.61 \times 10^{-4}$	$>3.00 \times 10^{-5}$	$>3.70 \times 10^{-5}$	$1.10(0.72–1.68) \times 10^{-5}$	$1.91(1.46–2.50) \times 10^{-5}$	
Hexadecylpyridinium	–	$8.34(7.72–9.63) \times 10^{-6}$	–	–	–	–	
Mefenamic acid	–	$3.55(3.29–3.38) \times 10^{-4}$	–	–	–	$0.92(0.61–1.39) \times 10^{-5}$	
Metolachlor	–	$7.33(6.65–8.09) \times 10^{-4}$	–	–	–	$2.51(1.56–4.05) \times 10^{-4}$	
Metoprolol	–	$>9.12 \times 10^{-3}$	$2.51(2.25–2.81) \times 10^{-3}$	$1.54(1.29–1.83) \times 10^{-3}$	$>3.74 \times 10^{-4}$	$>2.92 \times 10^{-3}$	
Perfluorooctanoic acid	$>3.79 \times 10^{-4}$	$4.45(4.23–4.69) \times 10^{-3}$	–	–	–	$2.16(1.98–2.35) \times 10^{-3}$	

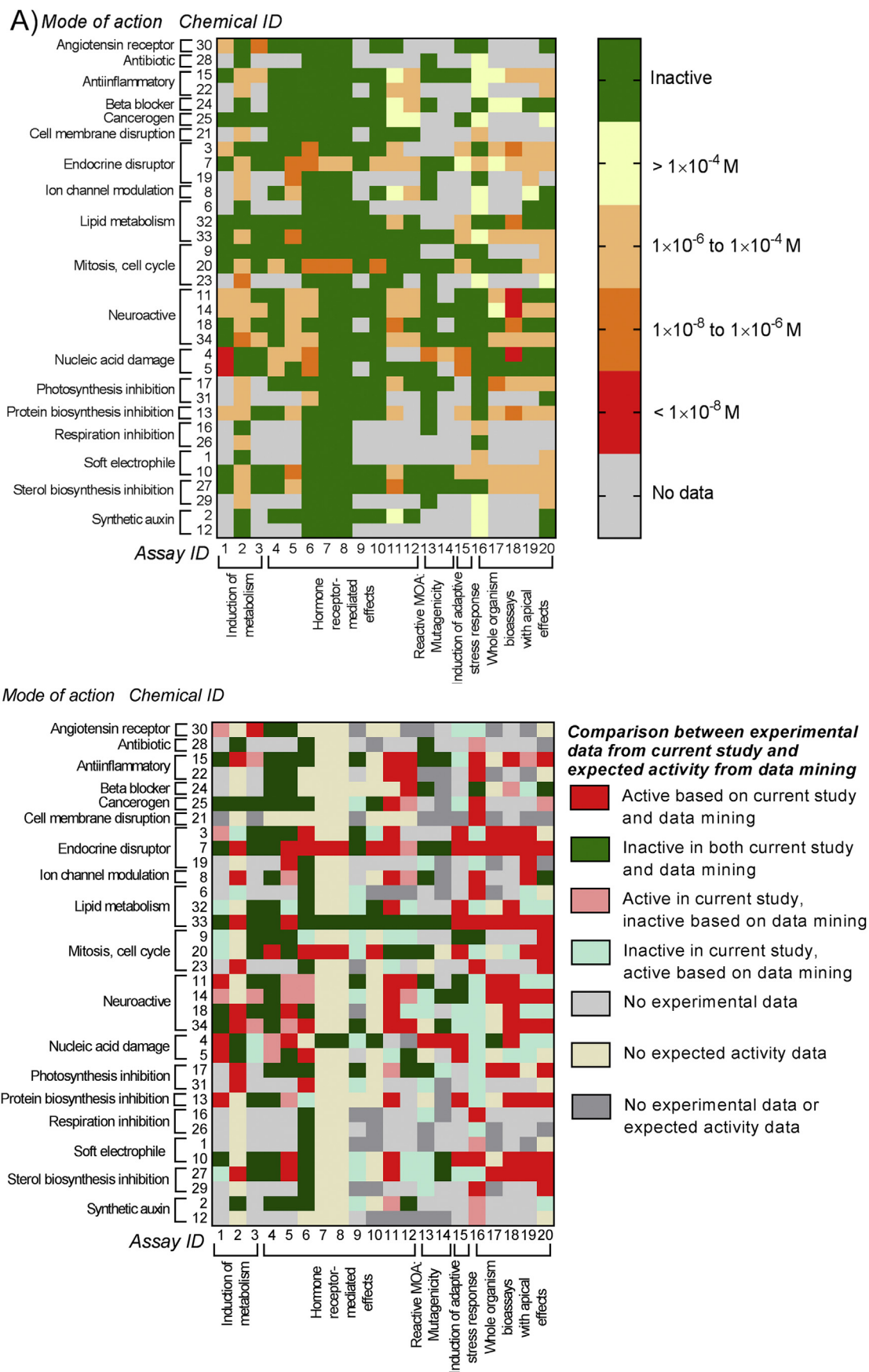


Fig. 2. A) Summary of experimental results of this study with the selected representative water pollutants. Active chemicals are grouped according to their effect concentration (EC) with yellow indicating least potent and red indicating most potent, inactive chemicals are shown in green, and grey indicates no experimental data (all EC values can be found in Table 3) and B) comparison between the experimental results from the current study and the expected activity based on the data mining exercise. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

concentration, while effects were only observed for metoprolol at concentrations above 1×10^{-3} M in the algae growth inhibition (ID 17) and *Daphnia* immobilization (ID 18) assays. Fipronil, triclocarban and benzo(a)pyrene only produced a positive response in the *Daphnia* immobilization assay, with no observed effect at the highest concentrations tested in the other apical assays.

5. Discussion

5.1. Suitability of the bioassay test battery to detect representative pollutants

The majority of assays indicative of induction of xenobiotic metabolism, adaptive stress responses and apical effects in whole organisms were able to detect a large number of studied chemicals compared to assays indicative of hormone receptor-mediated effects or reactive modes of action. In many cases, the same chemical was active in a number of assays, but at different concentrations (Fig. 2A). For example, consistent with mechanistic considerations, the endocrine-active chemical bisphenol A induced an effect at lower concentrations in the MELN, anti-MDA-kb2 and Cyp19a1b-GFP assays compared to the AREc32 assay and apical endpoints. While some modes of action, such as endocrine disruption, were well covered by assays indicative of specific effects, other modes of action were covered indirectly by the whole organism assays indicative of apical effects. This suggests that a single bioassay cannot be representative for all effects but the applied bioassay battery was generally suitable to detect the effect of the selected pollutants.

The discrepancy between expected and observed activity in the same bioassay (Fig. 2B) could be attributed to several factors including the quality of the expected activity data and solubility issues. For example, the experimental results from the GR CALUX assay had the lowest correspondence with the expected activity, but many of the chemicals expected to be potentially active were based on a theoretical match with mode of action from QSAR predictions, rather than being based on experimental data. Furthermore, many of the studied pollutants showed less effect than predicted in the Microtox assay due to the solubility cutoff for chemicals with high melting points, which is discussed in more detail in Escher et al. (2017) and which might also apply for other bioassays.

Bioassays are typically applied to enriched water samples, with solid-phase extraction commonly used. In order to assess whether the studied assays were suitable for detecting the individual compounds from the list of studied water contaminants at environmentally relevant concentrations, occurrence data were compared with the EC values. Busch et al. (2016) reported the 95th percentile of all measured environmental concentrations (MEC95) from six studies on European rivers, with the maximum MEC95 reprinted in Table S7. Based on the MEC95 values the MELN assay could potentially detect bisphenol A and genistein in water samples after 17 and 15-fold enrichment, respectively, while the *Daphnia* immobilization assay could detect chlorpyrifos and diazinon in water samples after 17 and 3-fold enrichment, respectively (Table S7). A larger number of assays, including AhR CALUX, HG5LN-hPXR, PPAR γ -bla, Anti-MDA-kb2, ZELH-zfERalpha and ZELH-zfERbeta2, are potentially able to detect more of the studied chemicals with up to 500-fold enrichment. However, it is important to note that in environmental samples, bioassays will not detect single compounds, but rather mixtures of compounds. Therefore, it does not mean that a particular bioassay is unsuitable for water quality monitoring if a single chemical is not detected. It is rather likely that none of the known pollutants cause an effect alone, but instead it is the mixture effect that will be detected by the assay. This is termed a “something from nothing” effect (Silva et al., 2002),

which has been demonstrated numerous times in defined mixture experiments where chemicals mixed at concentrations below their observable effect level show an effect in combination.

5.2. Comparing cellular effects with whole organism specific effects

Three *in vitro* assays indicative of activation of ER in a human cell line (MELN) and zebrafish cell lines (ZELH-zfERalpha and ZELH-zfERbeta2) and two whole organism assays indicative of ER-regulated effects in early life-stage fish. Cyp19a1b-GFP (zebrafish) and ChgH-GFP (medaka) were applied in the current study, allowing a comparison of estrogenic effects between different cell lines and different organisms. While 9 of the tested chemicals (diazinon, bisphenol A, triphenylphosphate, 4-nonylphenol, chlorpyrifos, benzo(a)pyrene, benzo(b)fluoranthene, terbutylazine and genistein) were active in the MELN assay, only two, bisphenol A and genistein, had a response in the ZELH-zfERalpha and ZELH-zfERbeta2 assays. This could be due to either species-specific differences in sensitivity or selectivity, as has previously been observed in environmental samples for the studied assays (Sonavane et al., 2016), and/or due to the higher metabolic capacity of the hepatic zebrafish cell line, which may potentially lead to more biotransformation of the test compounds than the MELN assay, which is based on a breast cancer cell line (Le Fol et al., 2015). At the organism level, the Cyp19a1b-GFP assay results were very consistent with the ZELH-zfERalpha and ZELH-zfERbeta2 assays, with bisphenol A and genistein able to induce the expression of ER-regulated aromatase in the developing brain. Other bisphenol compounds have also been shown to induce estrogenic responses in the studied zebrafish *in vitro* and whole organism assays (Le Fol et al., 2017). This emphasizes the relevance of applying fish-specific *in vitro* assays, as well as early life-stage organism assays, for environmental risk assessment.

The ChgH-GFP assay using medaka embryos also responded to bisphenol A, but genistein, which was active in all other estrogenic assays, did not induce a response in the ChgH-GFP assay. This has also been observed in a previous study and was attributed to the lower sensitivity of medaka to genistein, with reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) indicating no change in choriogenin H or vitellogenin transcription in the presence of genistein (Scholz et al., 2005). In addition to bisphenol A, EC₁₀ values could be determined for triphenylphosphate and chlorophene in unspiked mode, with triphenylphosphate also active in the MELN assay. The observed differences between the zebrafish and medaka assays may be due to differences in species sensitivity to (xeno)-estrogens. It is noteworthy that both transgenic models presented differences in sensitivity to the reference compound 17 α -ethinylestradiol (Fig. S2) and to some xenoestrogens (e.g. bisphenol A and genistein) (Figs. S14 and S15), thus highlighting the different intrinsic sensitivities in the estrogenic response. The exposure duration (96 h for the Cyp19a1b-GFP assay and 24 h for the ChgH-GFP assay), the tissue context (brain versus liver) and the metabolic capacity of the models may account for these differences. The variability in responsiveness and sensitivity of the many different estrogenicity assays is well known (Kunz et al., 2017) and can be used to investigate the exact toxic mechanisms and to differentiate true effects from assay interferences (Browne et al., 2015; Judson et al., 2015). In turn this does not mean that for water quality monitoring that many different assays indicative of the one endpoint should be used or that one assay should be favored over others. However, when undertaking mixture toxicity modeling or when deriving effect-based trigger values, one should use data from the same bioassay as the BEQ value will be specific for each assay (Escher et al., 2015).

5.3. Are the representative compounds acting specifically or as baseline toxicants on the apical endpoints?

The majority of tested chemicals were active in the whole organism assays indicative of apical effects given these endpoints cover effects of multiple toxicity pathways. To determine whether the tested chemicals were baseline toxicants in the studied assays ($0.1 < TR < 10$) or if they had a specific mode of action ($TR > 10$), the derived EC_{50} values were compared with EC_{50} values predicted by baseline toxicity QSARs (Fig. 3), with the TR calculated using Equation (14) (Table S8).

The majority of studied chemicals acted as baseline toxicants ($0.1 < TR < 10$) for the 30-min bioluminescence inhibition assay with *A. fischeri* (Microtox assay, Fig. 3A). The exceptions were 1,2-benzisothiazolinone, which had a TR of 488, and dinoseb, which had a TR of 22. 1,2-Benzisothiazolinone is a biocide and soft electrophile, while the pesticide dinoseb is a potent uncoupler, meaning that it can interfere with cellular energy transduction (Escher et al., 1996), and both can have a specific effect on bacteria, as supported by the higher TR. The antibiotic sulfamethoxazole had a TR of 4.8, thus was not considered as having a specific effect, which was also observed by Tang et al. (2013), although antibiotics are often specifically acting in bacteria. This may be due to the 30 min exposure duration, with previous studies showing that antibiotics often only have a specific effect on bacteria after longer exposure durations when growth becomes important (Backhaus et al., 1997).

Despite being based on a different algal species, the experimental data for *Chlamydomonas reinhardtii* fit well with the *Chlorella vulgaris* baseline toxicity QSAR predictions (Fig. 3B). The one chemical expected to be acting specifically was the photosystem II inhibitor diuron, which had a TR of 852, which confirms earlier studies identifying diuron to be specifically acting on growth in green algae (Neuwoehner et al., 2008).

Five chemicals, chlorpyrifos, diazinon, fipronil, cyprodinil and triclocarban, had a $TR > 10$ in the *Daphnia* immobilization assay (Fig. 3C). The most potent chemicals, chlorpyrifos ($TR = 123818$) and diazinon ($TR = 96043$), are both neuroactive chemicals that inhibit acetylcholinesterase (AChE), with previous studies showing that daphnids are particularly sensitive to the AChE inhibitors (Vaal et al., 2000).

Many chemicals act as baseline toxicants in the FET assay (Ellison et al., 2016; Klüver et al., 2016), with the majority of pollutants in our test set showing baseline toxicity. Three compounds, carbendazim, 1,2-benzisothiazolinone and mefenamic acid, had a $TR > 10$ in the FET assay (Fig. 3D). The fungicide carbendazim had a TR of 1775 and has previously been shown to have a specific effect in the FET assay (Schmidt et al., 2016). In contrast, the TR was less than 0.1 for 4-nonylphenol, which may be due to its hydrophobicity. The EC_{50} values of some of the more hydrophobic compounds, including 4-nonylphenol and triphenylphosphate, were lower in the FET assay conducted in glass vials than the FET assay run in 96 well polystyrene plates, despite both assays using a 48 h exposure period. Chemical sorption to the plastic may have reduced the bioavailable chemical concentration in the 96 well plate assay. This limitation could potentially be overcome through passive dosing, which has been recently applied to the FET assay using silicone O-rings (Vergauwen et al., 2015), though this approach has yet to be scaled down to the 96 well format.

5.4. Application of the fingerprinting data for mixture toxicity modeling

Recent work has focused on trying to understand mixture effects of known and analyzed chemicals compared to the overall risk of known mixtures in wastewater treatment plant effluent and

surface water and it appears that a small number of chemicals determine the overall risk (Backhaus and Karlsson, 2014; Munz et al., 2017). In case studies on water treatment and surface water, some industrial compounds, including benzothiazoles and fragrance chemicals, may be present at high concentrations, but they were often less potent than other chemicals and consequently contributed little to the observed biological effects (Tang et al., 2014). In another study, pesticides present at lower concentrations than pharmaceuticals were found to be the drivers of toxicity in aquatic organisms (Munz et al., 2017).

Another approach is to additionally quantify the contribution of detected chemicals to the observed effect in a bioassay. This helps to not only apportion the toxicity to the various known constituents of the mixture, but also to estimate the contribution of unknown chemicals in the mixture effect of the entire water sample. This approach is termed iceberg modeling, because it allows a quantification of the unknown chemicals contribution to the effect of the mixture without having to identify them. Both modeling approaches for mixture effects can be combined as we have demonstrated in previous studies (Neale et al., 2015, 2017; Tang et al., 2013, Tang et al., 2014) but this approach is limited by the lack of effect data for commonly detected chemicals. As a result, it is often unclear whether the detected chemicals are active, and potentially contributing to the effect, or inactive in the applied assays. This knowledge gap can be overcome by fingerprinting the effects of relevant chemicals in bioassays. Consequently, the generated effect data from the current study can be applied for improved mixture toxicity modeling.

If the majority of chemicals in mixtures are acting in a concentration additive manner, which has been confirmed for most reporter gene assays and is also supported by the design principle of a reporter gene assay that is based on a single mode of action, BEQ values from bioanalysis (BEQ_{bio} , Equation (16)) can be compared to BEQ values from chemical analysis (BEQ_{chem} , Equation (17)) (Neale et al., 2015). This approach has been applied to a range of water types, using initially estrogenicity assays (Aerni et al., 2004; Leusch et al., 2010; Murk et al., 2002) but later other reporter gene assays, such as those that detect additional hormonal effects (König et al., 2017), PXR and AhR activity (Creusot et al., 2010) or adaptive stress responses (Escher et al., 2013; Tang et al., 2014).

It is more daring to apply the iceberg-modeling concept to apical endpoints in whole organism tests because, as demonstrated in Section 5.3, single chemicals can have very high TR, which would mean that diverse modes of action are involved and that the mixture model of concentration addition would not necessarily apply. However, in those studies simulating environmental mixtures using the Microtox assay, water pollutants were typically well described by the mixture toxicity model of concentration addition (Escher et al., 2017; Tang et al., 2013), therefore the iceberg-modeling approach should also be feasible for this endpoint. Likewise for the investigated water pollutants, the TRs in the FET assays were fairly low, which means that potential specific effects were not of high potency; therefore, it can be expected that deviations from the model of concentration addition would not be substantial.

In contrast, for algae and daphnia, some of the water pollutants that were tested here had high TRs and therefore the assumption of concentration addition can be challenged. In practice, we observed that concentration addition was a robust tool for algal toxicity when considering typical water pollutants at concentrations encountered in environmental water samples (Tang et al., 2013), but this remains to be confirmed for daphnids. Ongoing experiments with defined mixtures of the water pollutants presented

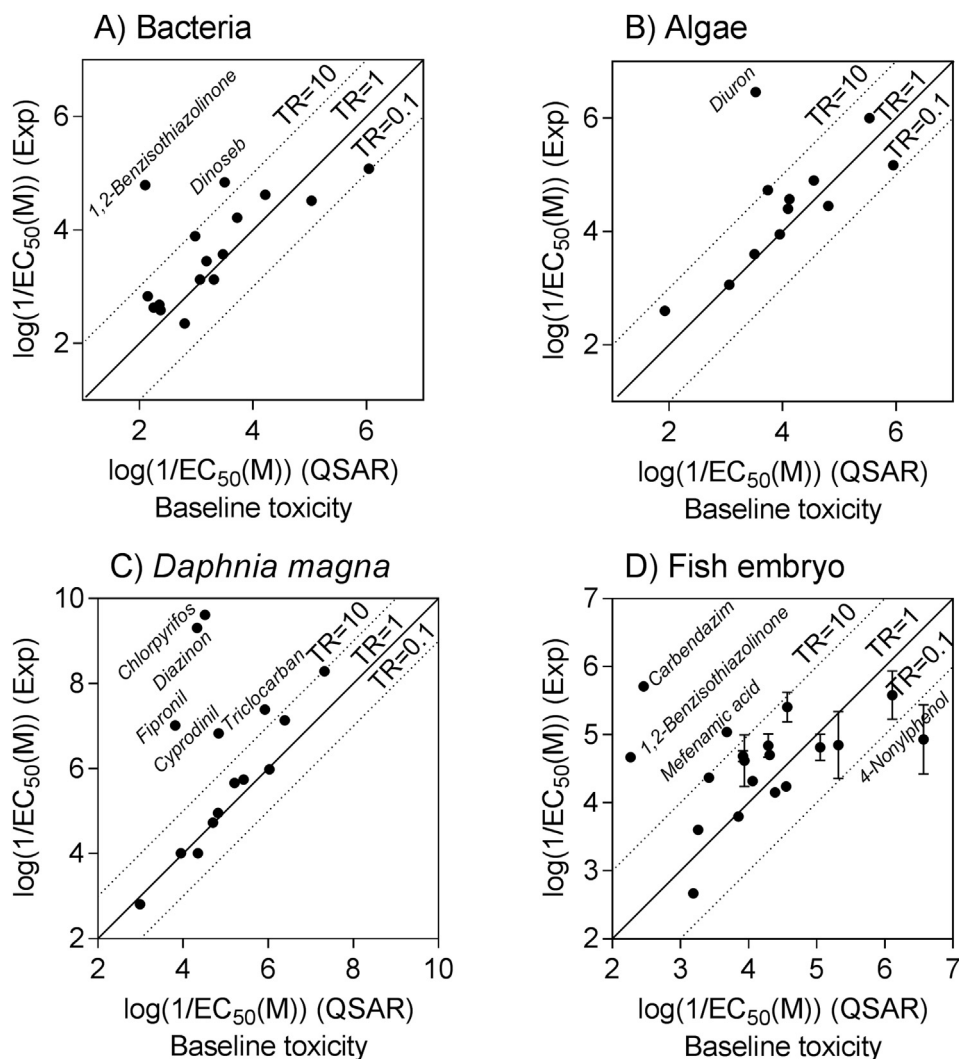


Fig. 3. Experimental $\log(1/EC_{50})$ values versus QSAR-predicted $\log(1/EC_{50})$ baseline toxicity values for A) Microtox, B) algal growth inhibition, C) *Daphnia* immobilization test and D) 48 h FET. Note 48 h FET experimental $\log(1/EC_{50})$ values are the average of two assays. TR = toxic ratio.

here, carried out within the framework of the EU project SOLUTIONS (www.solutions-project.eu) will hopefully shed more light on these questions.

Using the EC values fingerprinted in the current study, mixture toxicity modeling of Danube River samples previously presented in Neale et al. (2015) was revised for the HG5LN-hPXR, MELN and FET assays. The revised REP_i values are shown in Table S9, while the REP_i values used previously can be found in Table 3 of Neale et al. (2015).

The percentage of effect explained by individual detected chemicals for both existing and revised mixture toxicity modeling is shown in Fig. 4. EC values in the HG5LN-hPXR assay are now available for 17 of the detected chemicals, but even with the additional chemicals, only 0.2% of PXR activation can be explained. Previously, there was no information about the effect of genistein in the HG5LN-hPXR assay, but using the new effect data genistein was found to contribute to over half of the explained effect in some of the samples. A similar picture emerges for the FET assay; although EC values are now available for 19 chemicals, they account for less than 0.4% of the observed effect. Since a large number of chemicals can produce a response in both of these assays, the low fraction of effect that can be explained is not surprising, even with EC values for up to 19 chemicals. In contrast, much of the observed effect in

the MELN assay at some sites can already be explained, with the new EC values having a negligible effect as diazinon and terbuthylazine are weakly active in the assay. It should be noted that the contribution of some of the detected chemicals changed with the revised EC values, with some chemicals found to be more or less potent than the previously published. For example, estrone was found to be more potent in the MELN assay than previously reported by Pillon et al. (2005). This exercise highlights the importance of applying effect-based tools for water quality assessment as targeted chemical analysis alone often provides a limited view of the chemical burden.

6. Conclusions

A battery of bioassays covering different modes of action was assembled in the current study to detect the effects of representative water pollutants. It is important to stress that the exact type of bioassay is not essential but a diverse panel of bioassays that includes apical endpoints is essential, as well as specific bioassays indicative of crucial steps in toxicity pathways relevant for micro-pollutants occurring in surface water. This is why the selection of bioassays was also guided by what types of effects were detected in the surface water samples.

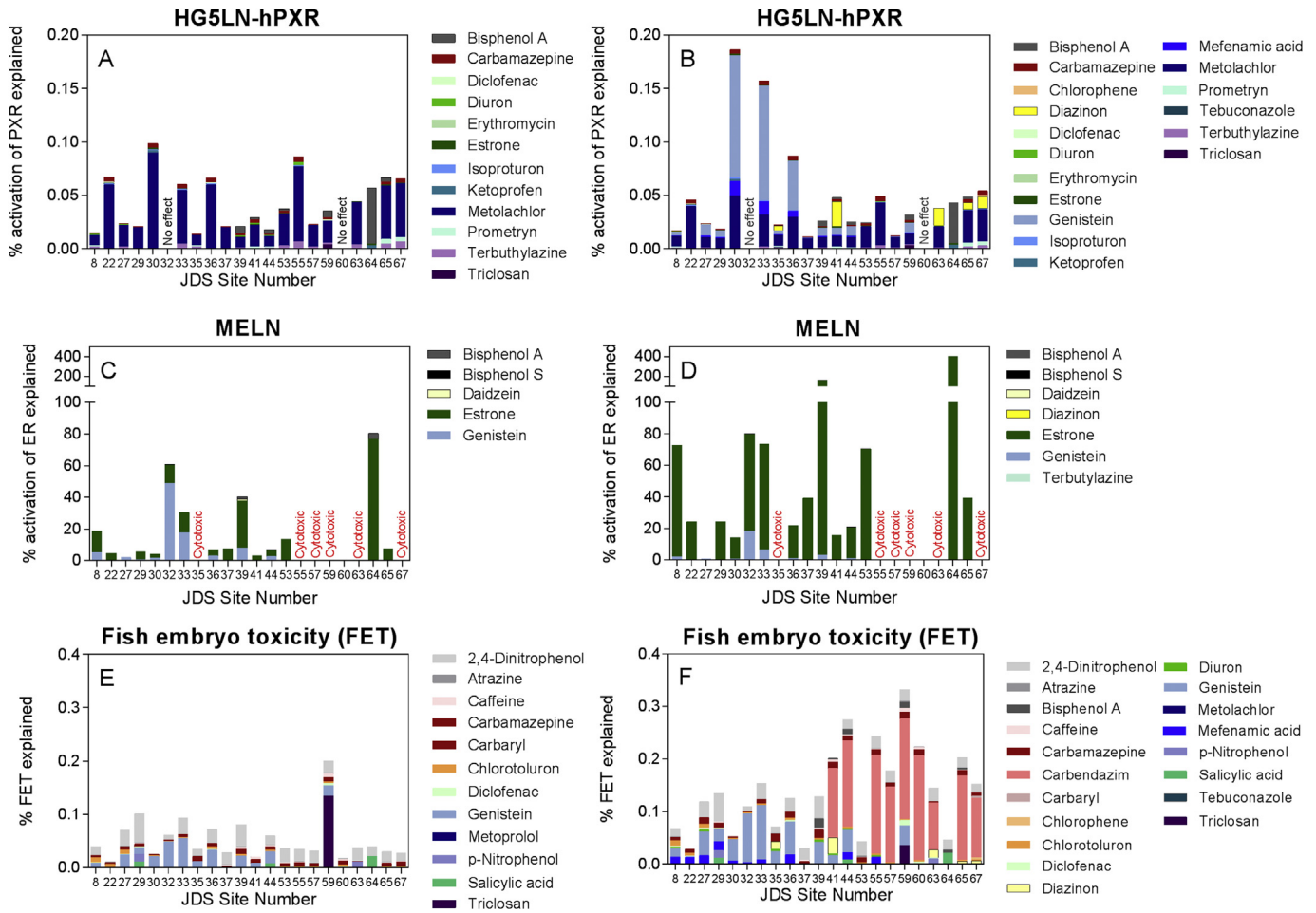


Fig. 4. Percent effect elucidated by enriched water samples from different sites of the Danube River explained by detected chemicals for HG5LN-hPXR based on A) literature EC values and B) EC values measured in the present study, MELN based on C) literature EC values and D) EC values measured in the present study and FET based on E) literature EC values and F) EC values measured in the present study (Fig. 4A, C and E are reprinted with permission from Neale et al. (2015). Linking *in vitro* effects and detected organic micropollutants in surface water using mixture-toxicity modeling. Environmental Science & Technology, 49(24): 14614–14624. Copyright 2015 American Chemical Society).

All studied chemicals were active in at least one of the applied assays, with the industrial compound bisphenol A active in 70% of the studied assays. As expected, more chemicals were active in the assays indicative of apical effects, but the concentrations at which some chemicals induced an effect were much lower in assays that were based on a specific pathway/mechanism. For example, genistein and bisphenol A were more responsive in the ER mediated assays compared to the whole organism assays. These patterns illustrate how important it is to combine bioassays with apical endpoints and specific pathway endpoints to comprehensively capture the hazard potential of micropollutants in surface water.

There was reasonable agreement between the experimental results and the expected activity, though the data mining exercise highlighted the lack of available data, particularly for some recently developed mechanism-based assays, which is a common limitation of such investigations. Effect data for individual chemicals are required as input parameters for mixture toxicity modeling and the data generated in the current study will be applied in ongoing and future studies to assess the mixture effects of representative pollutants in river and other water samples.

Acknowledgements

The project SOLUTIONS is supported by the European Union

Seventh Framework Programme (FP7-ENV-2013-two-stage Collaborative project) under grant agreement number 603437. Neale was supported by the National Health and Medical Research Council (NHMRC) – European Union Collaborative Research Grant (APP1074775). Umbuzeiro and Morales acknowledge Fapesp for research funding (2015/24758-5 and 2013/16956-6); Morales thanks CAPES for PhD fellowship and Shao thanks CSC for a PhD fellowship. Hollert, Seiler and Shao would like to kindly thank Nikon Deutschland GmbH, Promega Corporation and ibs tecnomara GmbH for their contribution to this study as a partner of the Students Lab "Fascinating Environment" at Aachen Biology and Biotechnology (ABbt). We thank Maria König (UFZ), Christin Kühnert (UFZ), Janet Krüger (UFZ), Ana Catarina Almeida (NIVA), José Zwarg (FT/UNICAMP), Leticia Ferreira (FT/UNICAMP) and Elodie Paillard (WatchFrog) for experimental assistance and Nils Klüver (UFZ) for helpful discussions.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.016>.

References

Aerni, H.R., Kobler, B., Rutishauser, B.V., Wettstein, F.E., Fischer, R., Giger, W.,

- Hungerbühler, A., Marazuela, M.D., Peter, A., Schonenberger, R., Vogeli, A.C., Suter, M.J.F., Eggen, R.I.L., 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (3), 688–696.
- Altenburger, R., Ait-Aïssa, S., Antczak, P., Backhaus, T., Barcelo, D., Seiler, T.-B., Brion, F., Busch, W., Chipman, K., de Alda, M.L., de Aragao Umbuzeiro, G., Escher, B.I., Falciani, F., Faust, M., Focks, A., Hilscherová, K., Hollender, J., Hollert, H., Jäger, F., Jahnke, A., Kortenkamp, A., Krauss, M., Lemkine, G.F., Munthe, J., Neumann, S., Schymanski, E.L., Scrimshaw, M., Segner, H., Slobodnik, J., Smedes, F., Kugathas, S., Teodorovic, I., Tindall, A.J., Tollefsen, K.E., Walz, K.-H., Williams, T.D., Van den Brink, P.J., van Gils, J., Vrana, B., Zhang, X., Brack, W., 2015. Future water quality monitoring - adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. *Sci. Total Environ.* 512–513, 540–551.
- Ankley, G.T., Bennett, R.S., Erickson, R.J., Hoff, D.J., Hornung, M.W., Johnson, R.D., Mount, D.R., Nichols, J.W., Russom, C.L., Schmieder, P.K., Serrano, J.A., Tietge, J.E., Villeneuve, D.L., 2010. Adverse outcome pathways: a conceptual framework to support ecotoxicology research and risk assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 29 (3), 730–741.
- Backhaus, T., Froehner, K., Altenburger, R., Grimme, L.H., 1997. Toxicity testing with *Vibrio fischeri*: a comparison between the long term (24 h) and the short term (30 min) bioassay. *Chemosphere* 35 (12), 2925–2938.
- Backhaus, T., Karlsson, M., 2014. Screening level mixture risk assessment of pharmaceuticals in STP effluents. *Water Res.* 49, 157–165.
- Balaguer, P., Francois, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A.M., Pons, M., Nicolas, J.C., Casellas, C., 1999. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci. Total Environ.* 233 (1–3), 47–56.
- Basketter, D.A., Rodford, R., Kimber, I., Smith, I., Wahlberg, J.E., 1999. Skin sensitization risk assessment: a comparative evaluation of 3 isothiazolinone biocides. *Contact Derm.* 40 (3), 150–154.
- Brennan, J.C., He, G.C., Tsutsumi, T., Zhao, J., Wirth, E., Fulton, M.H., Denison, M.S., 2015. Development of species-specific Ah receptor-responsive third generation CALUX cell lines with enhanced responsiveness and improved detection limits. *Environ. Sci. Technol.* 49 (19), 11903–11912.
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.K., Chung, B.C., Kah, O., 2012. Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures *in vivo* using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. *Plos One* 7 (5), e36069.
- Browne, P., Judson, R.S., Casey, W.M., Kleinstreuer, N.C., Thomas, R.S., 2015. Screening chemicals for estrogen receptor bioactivity using a computational model. *Environ. Sci. Technol.* 49 (14), 8804–8814.
- Busch, W., Schmidt, S., Kuhne, R., Schulze, T., Krauss, M., Altenburger, R., 2016. Micropollutants in European rivers: a mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (8), 1887–1899.
- Claxton, L.D., Umbuzeiro, G.D.A., DeMarini, D.M., 2010. The *Salmonella* mutagenicity assay: the stethoscope of genetic toxicology for the 21st century. *Environ. Health Perspect.* 118, 1515–1522.
- Cosnefroy, A., Brion, F., Maillot-Marechal, E., Porcher, J.M., Pakdel, F., Balaguer, P., Ait-Aïssa, S., 2012. Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. *Toxicol. Sci.* 125 (2), 439–449.
- Creusot, N., Kinani, S., Balaguer, P., Tapie, N., LeMenach, K., Maillot-Maréchal, E., Porcher, J.M., Budzinski, H., Ait-Aïssa, S., 2010. Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2), 569–583.
- DeMarini, D.M., Dallas, M.M., Lewtas, J., 1989. Cytotoxicity and effect on mutagenicity of buffers in a microsuspension assay. *Teratog. Carcin. Mut.* 9 (5), 287–295.
- Di Paolo, C., Ottermanns, R., Keiter, S., Ait-Aïssa, S., Bluhm, K., Brack, W., Breitholtz, M., Buchinger, S., Carere, M., Chalon, C., Cousin, X., Dulio, V., Escher, B.I., Hamers, T., Hilscherová, K., Jarque, S., Jonas, A., Maillot-Marechal, E., Marneffe, Y., Nguyen, M.T., Pandard, P., Schifferli, A., Schulze, T., Seidensticker, S., Seiler, T.B., Tang, J., van der Oost, R., Vermeirssen, E., Zoukova, R., Zwart, N., Hollert, H., 2016. Bioassay battery interlaboratory investigation of emerging contaminants in spiked water extracts - towards the implementation of bio-analytical monitoring tools in water quality assessment and monitoring. *Water Res.* 104, 473–484.
- Ellison, C.M., Piechota, P., Madden, J.C., Enoch, S.J., Cronin, M.T.D., 2016. Adverse outcome pathway (AOP) informed modeling of aquatic toxicology: QSARs, read-across, and interspecies verification of modes of action. *Environ. Sci. Technol.* 50 (7), 3995–4007.
- Escher, B.I., Snozzi, M., Schwarzenbach, R.P., 1996. Uptake, speciation, and uncoupling activity of substituted phenols in energy transducing membranes. *Environ. Sci. Technol.* 30 (10), 3071–3079.
- Escher, B.I., Schwarzenbach, R.P., 2002. Mechanistic studies on baseline toxicity and uncoupling of organic compounds as a basis for modeling effective membrane concentrations in aquatic organisms. *Aquat. Sci.* 64 (1), 20–35.
- Escher, B.I., Dutt, M., Maylin, E., Tang, J.Y.M., Toze, S., Wolf, C.R., Lang, M., 2012. Water quality assessment using the AREC32 reporter gene assay indicative of the oxidative stress response pathway. *J. Environ. Monit.* 14 (11), 2877–2885.
- Escher, B.I., Leusch, F.D.L., 2012. *Bioanalytical Tools in Water Quality Assessment*. IWA Publishing, London.
- Escher, B.I., van Daele, C., Dutt, M., Tang, J.Y.M., Altenburger, R., 2013. Most oxidative stress response in water samples comes from unknown chemicals: the need for effect-based water quality trigger values. *Environ. Sci. Technol.* 47 (13), 7002–7011.
- Escher, B.I., Allinson, M., Altenburger, R., Bain, P.A., Balaguer, P., Busch, W., Crago, J., Denslow, N.D., Dopp, E., Hilscherová, K., Humpage, A.R., Kumar, A., Grimaldi, M., Jayasinghe, B.S., Jarosova, B., Jia, A., Makarov, S., Maruya, K.A., Medvedev, A., Mehinto, A.C., Mendez, J.E., Poulsen, A., Prochazka, E., Richard, J., Schifferli, A., Schlenk, D., Scholz, S., Shiraish, F., Snyder, S., Su, G.Y., Tang, J.Y.M., van der Burg, B., van der Linden, S.C., Werner, I., Westerheide, S.D., Wong, C.K.C., Yang, M., Yeung, B.H.Y., Zhang, X.W., Leusch, F.D.L., 2014. Benchmarking organic micropollutants in wastewater, recycled water and drinking water with *in vitro* bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 48 (3), 1940–1956.
- Escher, B.I., Neale, P.A., Leusch, F.D.L., 2015. Effect-based trigger values for *in vitro* bioassays: reading across from existing water quality guideline values. *Water Res.* 81 (0), 137–148.
- Escher, B.I., Baumer, A., König, M., Kühnert, C., Mayer, P., Klüver, N., 2017. General baseline toxicity QSAR for nonpolar, polar and ionisable chemicals in the bioluminescence inhibition assay with *Aliivibrio fischeri*. *Env. Sci. Process. Impact* 19 (3), 414–428.
- European Commission, 2011. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Guidance Document No. 27. Technical guidance for deriving environmental quality standards, Brussels.
- European Commission, 2012. Proposal for a Directive of the European Parliament and the Council Amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as Regards Priority Substances in the Field of Water Policy. COM/2011/0876 final - 2011/0429 (COD), Brussels.
- European Commission, 2013. Directive 2013/39/EU of the European Parliament and the Council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. *Off. J. Eur. Union.* L226/221 L226/217.
- 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.* 41 (16), 5908–5914.
- Hiemstra, S., Niemeijer, M., Koedoot, E., Wink, S., Pip, J.E., Vlasveld, M., de Zeeuw, E., van Os, B., White, A., van de Water, B., 2017. Comprehensive landscape of Nrf2 and p53 pathway activation dynamics by oxidative stress and DNA damage. *Chem. Res. Toxicol.* 30 (4), 923–933.
- Invitrogen, 2010. GeneBLAZer® PPAR Gamma 293H DA and PPAR Gamma-UAS-bla 293H Cell-based Assay Protocol. Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA.
- Jálová, V., Jarosová, B., Bláha, L., Giesy, J.P., Ocelka, T., Grabic, R., Jurčíková, J., Vrana, B., Hilscherová, K., 2013. Estrogen-, androgen- and aryl hydrocarbon receptor mediated activities in passive and composite samples from municipal waste and surface waters. *Environ. Int.* 59, 372–383.
- Judson, R., Houck, K., Martin, M., Richard, A.M., Knudsen, T.B., Shah, I., Little, S., Wambaugh, J., Setzer, R.W., Kothya, P., Phuong, J., Filer, D., Smith, D., Reif, D., Rotroff, D., Kleinstreuer, N., Sipes, N., Xia, M.H., Huang, R.L., Crofton, K., Thomas, R.S., 2016. Analysis of the effects of cell stress and cytotoxicity on *in vitro* assay activity across a diverse chemical and assay space. *Toxicol. Sci.* 152 (2), 323–339.
- Judson, R.S., Magpantay, F.M., Chickarmane, V., Haskell, C., Tania, N., Taylor, J., Xia, M.H., Huang, R.L., Rotroff, D.M., Filer, D.L., Houck, K.A., Martin, M.T., Sipes, N., Richard, A.M., Mansouri, K., Setzer, R.W., Knudsen, T.B., Crofton, K., Thomas, R.S., 2015. Integrated model of chemical perturbations of a biological pathway using 18 *in vitro* high-throughput screening assays for the estrogen receptor. *Toxicol. Sci.* 148 (1), 137–154.
- Klüver, N., Vogts, C., Altenburger, R., Escher, B.I., Scholz, S., 2016. Development of a general baseline toxicity QSAR model for the fish embryo acute toxicity test. *Chemosphere* 164, 164–173.
- König, M., Escher, B.I., Neale, P.A., Krauss, M., Hilscherová, K., Novák, J., Teodorović, I., Schulze, T., Seidensticker, S., Kamal Hashmi, M.A., Ahlheim, J., Brack, W., 2017. Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of *in vitro* bioassays and chemical analysis. *Environ. Pollut.* 220, 1220–1230.
- Kunz, P.Y., Simon, E., Creusot, N., Jayasinghe, B.S., Kienle, C., Maletz, S., Schifferli, A., Schönlau, C., Ait-Aïssa, S., Denslow, N.D., Hollert, H., Werner, I., Vermeirssen, E.L.M., 2017. Effect-based tools for monitoring estrogenic mixtures: evaluation of five *in vitro* bioassays. *Water Res.* 110, 378–388.
- Le Fol, V., Ait-Aïssa, S., Cabaton, N., Dolo, L., Grimaldi, M., Balaguer, P., Perdu, E., Debrauwer, L., Brion, F., Zalko, D., 2015. Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-S in zebrafish and human *in vitro* models used for toxicity and estrogenicity screening. *Environ. Sci. Technol.* 49 (6), 3860–3868.
- Le Fol, V., Ait-Aïssa, S., Sonavane, M., Porcher, J.-M., Balaguer, P., Cravedi, J.-P., Zalko, D., Brion, F., 2017. *In vitro* and *in vivo* estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142, 150–156.
- Lemaire, G., Mnif, W., Pascucci, J.M., Pillon, A., Rabenoelina, F., Fenet, H., Gomez, E., Casellas, C., Nicolas, J.C., Cavailles, V., Duchesne, M.J., Balaguer, P., 2006. Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system. *Toxicol. Sci.* 91 (2), 501–509.
- Leusch, F.D.L., De Jager, C., Levi, Y., Lim, R., Puijker, L., Sacher, F., Tremblay, L.A., Wilson, V.S., Chapman, H.F., 2010. Comparison of five *in vitro* bioassays to measure estrogenic activity in environmental waters. *Environ. Sci. Technol.* 44 (10), 3853–3860.
- Leusch, F.D.L., Khan, S.J., Laingam, S., Prochazka, E., Frosco, S., Trang, T., Chapman, H.F., Humpage, A., 2014. Assessment of the application of bio-analytical tools as surrogate measure of chemical contaminants in recycled

- water. *Water Res.* 49, 300–315.
- Leusch, F.D.L., Snyder, S.A., 2015. Bioanalytical tools: half a century of application for potable reuse. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 1, 606–621.
- Malaj, E., von der Ohe, P.C., Grote, M., Kuhne, R., Mondy, C.P., Usseglio-Polatera, P., Brack, W., Schafer, R.B., 2014. Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111 (26), 9549–9554.
- Martin, M.T., Dix, D.J., Judson, R.S., Kavlock, R.J., Reif, D.M., Richard, A.M., Rotroff, D.M., Romanov, S., Medvedev, A., Poltoratskaya, N., Gambarian, M., Moeser, M., Makarov, S.S., Houck, K.A., 2010. Impact of environmental chemicals on key transcription regulators and correlation to toxicity end points within EPA's ToxCast program. *Chem. Res. Toxicol.* 23 (3), 578–590.
- Maruya, K.A., Dodder, N.G., Mehinto, A.C., Denslow, N.D., Schlenk, D., Snyder, S.A., Weisberg, S.B., 2016. A tiered, integrated biological and chemical monitoring framework for contaminants of emerging concern in aquatic ecosystems. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 12 (3), 540–547.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res. Fund. Mol. Mech. Mut.* 455 (1–2), 29–60.
- Munz, N.A., Burdon, F.J., de Zwart, D., Junghans, M., Melo, L., Reyes, M., Schonenberger, U., Singer, H.P., Spycher, B., Hollender, J., Stamm, C., 2017. Pesticides drive risk of micropollutants in wastewater-impacted streams during low flow conditions. *Water Res.* 110, 366–377.
- Murk, A.J., Legler, J., van Lipzig, M.M.H., Meerman, J.H.N., Belfroid, A.C., Spenkelink, A., van der Burg, B., Rijs, G.B.J., Vethaak, D., 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (1), 16–23.
- Neale, P.A., Antony, A., Bartkow, M., Farre, M., Heitz, A., Kristiana, I., Tang, J.Y.M., Escher, B.I., 2012. Bioanalytical assessment of the formation of disinfection by-products in a drinking water treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* 46 (18), 10317–10325.
- Neale, P.A., Ait-Aïssa, S., Brack, W., Creusot, N., Denison, M.S., Deutschmann, B., Hilscherová, K., Hollert, H., Krauss, M., Novak, J., Schulze, T., Seiler, T.-B., Serra, H., Shao, Y., Escher, B.I., 2015. Linking *in vitro* effects and detected organic micropollutants in surface water using mixture-toxicity modeling. *Environ. Sci. Technol.* 49 (24), 14614–14624.
- Neale, P.A., Munz, N.A., Ait-Aïssa, S., Altenburger, R., Brion, F., Busch, W., Escher, B.I., Hilscherová, K., Kienle, C., Novak, J., Seiler, T.B., Shao, Y., Stamm, C., Hollender, J., 2017. Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. *Sci. Total Environ.* 576, 785–795.
- Neuwoehner, J., Junghans, M., Koller, M., Escher, B.I., 2008. QSAR analysis and specific endpoints for classifying the physiological modes of action of biocides in synchronous green algae. *Aquat. Toxicol.* 90 (1), 8–18.
- OECD, 2004. Test No. 202: Daphnia Sp. Acute Immobilisation Test. OECD Publishing, Paris.
- OECD, 2011. Test No. 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD Publishing, Paris.
- OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing, Paris.
- Okotoxentrum, 2017. Proposals for Acute and Chronic Quality Standards. <http://www.ecotoxcentre.ch/expert-service/quality-standards/proposals-for-acute-and-chronic-quality-standards/> (Accessed 26 February 2017).
- Pillon, A., Boussioux, A.M., Escande, A., Ait-Aïssa, S., Gomez, E., Fenet, H., Ruff, M., Moras, D., Vignon, F., Duchesne, M.J., Casellas, C., Nicolas, J.C., Balaguer, P., 2005. Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor alpha: application to environmental analysis. *Environ. Health Perspect.* 113 (3), 278–284.
- Prasse, C., Stalter, D., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., 2015. Spoilt for choice: a critical review on the chemical and biological assessment of current wastewater treatment technologies. *Water Res.* 87, 237–270.
- Reifferscheid, G., Maes, H.M., Allner, B., Badurova, J., Belkin, S., Bluhm, K., Brauer, F., Bressling, J., Domeneghetti, S., Elad, T., Fluckiger-Isler, S., Grummt, H.J., Guertler, R., Hecht, A., Heringa, M.B., Hollert, H., Huber, S., Kramer, M., Magdeburg, A., Ratte, H.T., Sauerborn-Klobucar, R., Sokolowski, A., Soldan, P., Smital, T., Stalter, D., Venier, P., Ziemann, C., Zipperle, J., Buchinger, S., 2012. International round-robin study on the Ames fluctuation test. *Environ. Mol. Mutagen* 53 (3), 185–197.
- Schmidt, S., Busch, W., Altenburger, R., Küster, E., 2016. Mixture toxicity of water contaminants-effect analysis using the zebrafish embryo assay (*Danio rerio*). *Chemosphere* 152, 503–512.
- Scholz, S., Kurauchi, K., Kinoshita, M., Oshima, Y., Ozato, K., Schirmer, K., Wakamatsu, Y., 2005. Analysis of estrogenic effects by quantification of green fluorescent protein in juvenile fish of a transgenic medaka. *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (10), 2553–2561.
- Schroeder, A.L., Ankley, G.T., Houck, K.A., Villeneuve, D.L., 2016. Environmental surveillance and monitoring—the next frontiers for high-throughput toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (3), 513–525.
- Silva, E., Rajapakse, N., Kortenkamp, A., 2002. Something from “nothing” - eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* 36 (8), 1751–1756.
- Simmons, S.O., Fan, C.-Y., Ramabhadran, R., 2009. Cellular stress response pathway system as a sentinel ensemble in toxicological screening. *Toxicol. Sci.* 111 (2), 202–225.
- Sonavane, M., Creusot, N., Maillot-Maréchal, E., Péry, A., Brion, F., Ait-Aïssa, S., 2016. Zebrafish-based reporter gene assays reveal different estrogenic activities in river waters compared to a conventional human-derived assay. *Sci. Total Environ.* 550, 934–939.
- Spiranzlova, P., Leleu, M., Sebillot, A., Lemkine, G.F., Iguchi, T., Demeneix, B.A., Tindall, A.J., 2016. Oestrogen reporter transgenic medaka for non-invasive evaluation of aromatase activity. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 179, 64–71.
- Spycher, S., Smejtek, P., Netzeva, T.I., Escher, B.I., 2008. Toward a class-independent quantitative structure - activity relationship model for uncouplers of oxidative phosphorylation. *Chem. Res. Toxicol.* 21 (4), 911–927.
- Tang, J.Y.M., McCarty, S., Glenn, E., Neale, P.A., Warne, M.S.J., Escher, B.I., 2013. Mixture effects of organic micropollutants present in water: towards the development of effect-based water quality trigger values for baseline toxicity. *Water Res.* 47 (10), 3300–3314.
- Tang, J.Y.M., Busetti, F., Charrois, J.W.A., Escher, B.I., 2014. Which chemicals drive biological effects in wastewater and recycled water? *Water Res.* 60, 289–299.
- Tice, R.R., Austin, C.P., Kavlock, R.J., Bucher, J.R., 2013. Improving the human hazard characterization of chemicals: a Tox21 update. *Environ. Health Perspect.* 121 (7), 756–765.
- Umbuzeiro, G.D.A., Heringa, M., Zeiger, E., 2016. *In vitro* genotoxicity testing: significance and use in environmental monitoring. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 1–22.
- US EPA, 2008. Estimation Programs Interface Suite for Windows, v4.1. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
- US EPA, 2015. Interactive Chemical Safety for Sustainability (ICSS) Dashboard V2. <http://actor.epa.gov/dashboard/> (Accessed 5 January 2016).
- Vaal, M.A., Van Leeuwen, C.J., Hoekstra, J.A., Hermens, J.L.M., 2000. Variation in sensitivity of aquatic species to toxicants: practical consequences for effect assessment of chemical substances. *Environ. Manag.* 25 (4), 415–423.
- Van der Linden, S.C., Heringa, M.B., Man, H.Y., Sonneveld, E., Puijker, L.M., Brouwer, A., Van der Burg, B., 2008. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 42 (15), 5814–5820.
- Vergauwen, L., Schmidt, S.N., Stinckens, E., Maho, W., Blust, R., Mayer, P., Covaci, A., Knäpen, D., 2015. A high throughput passive dosing format for the Fish Embryo Acute Toxicity test. *Chemosphere* 139, 9–17.
- Verhaar, H.J.M., Vanleeuwen, C.J., Hermens, J.L.M., 1992. Classifying environmental pollutants 1. Structure-activity-relationships for prediction of aquatic toxicity. *Chemosphere* 25 (4), 471–491.
- Villeneuve, D.L., Blankenship, A.L., Giesy, J.P., 2000. Derivation and application of relative potency estimates based on *in vitro* bioassay results. *Environ. Toxicol. Chem.* 19 (11), 2835–2843.
- Vörösmarty, C.J., McIntyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S.E., Sullivan, C.A., Liermann, C.R., Davies, P.M., 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467 (7315), 555–561.
- Wernersson, A.-S., Carere, M., Maggi, C., Tusil, P., Soldan, P., James, A., Sanchez, W., Dulio, V., Broeg, K., Reifferscheid, G., Buchinger, S., Maas, H., Van Der Grimming, E., O'Toole, S., Ausili, A., Manfra, L., Marziali, L., Polesello, S., Lacchetti, I., Mancini, L., Lilja, K., Linderth, M., Lundeberg, T., Fjällborg, B., Porsbring, T., Larsson, D.J., Bengtsson-Palme, J., Förlin, L., Kienle, C., Kunz, P., Vermeirssen, E., Werner, I., Robinson, C.D., Lyons, B., Katsiadaki, I., Whalley, C., den Haan, K., Messiaen, M., Clayton, H., Lettieri, T., Carvalho, R.N., Gawlik, B.M., Hollert, H., Di Paolo, C., Brack, W., Kammann, U., Kase, R., 2015. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Env. Sci. Eur.* 27 (7), 1–11.
- Wilson, V.S., Bobseine, K., Lambright, C.R., Gray, L.E., 2002. A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicol. Sci.* 66 (1), 69–81.
- Wink, S., Hiemstra, S., Huppelschoten, S., Danen, E., Niemeijer, M., Hendriks, G., Vrieling, H., Herpers, B., van de Water, B., 2014. Quantitative high content imaging of cellular adaptive stress response pathways in toxicity for chemical safety assessment. *Chem. Res. Toxicol.* 27 (3), 338–355.
- Wink, S., Hiemstra, S., Herpers, B., van de Water, B., 2017. High-content imaging-based BAC-GFP toxicity pathway reporters to assess chemical adversity liabilities. *Archives Toxicol.* 91 (3), 1367–1383.
- Yamarik, T.A., Andersen, F.A., Cosmetic Ingredient Review E., 2004. Safety assessment of dichlorophene and chlorophene. *Int. J. Toxicol.* 23, 1–27.
- Yeh, R.Y.L., Farre, M.J., Stalter, D., Tang, J.Y.M., Molendijk, J., Escher, B.I., 2014. Bio-analytical and chemical evaluation of disinfection by-products in swimming pool water. *Water Res.* 59, 172–184.

2. Article n°3: “Lack of (anti)estrogenicity of triclosan in zebrafish in vitro and in vivo reporter gene assay”

2.1 Contexte et objectifs

Le triclosan (TCS) est un agent antibactérien utilisé dans de nombreux produits d'hygiène personnelle. Rejeté en continu par les stations d'épuration, il est communément retrouvé dans l'environnement aquatique. De nombreuses études ont mis évidence que cette molécule avait des effets, entre autres, sur la voie de signalisation des estrogènes, des androgènes et sur l'axe thyroïdien (Dann et Hontela, 2011; Yueh et Tukey, 2016). Face à son potentiel PE, le risque posé par le triclosan est actuellement réévalué par de nombreuses agences réglementaires. Par exemple, depuis 2016, l'agence américaine FDA (« Food and Drug Administration ») et l'Union Européenne ont interdit à la vente certains produits d'hygiène en contenant (Commission Implementing Decision (EU) 2016/110; US Food and Drug Organisation, 2016).

De manière générale, les mécanismes responsables des effets estrogéniques du triclosan sont mal compris, et les informations concernant sa capacité à activer ou antagoniser ER sont parfois contradictoires (Yueh et Tukey, 2016). Dans les tests *in vitro* basé sur des cellules mammifères exprimant hER α , il est à la fois décrit comme estrogénique (Henry et Fair, 2013), anti-estrogénique (Ahn *et al.*, 2008), avec des effets prolifératifs (Henry et Fair, 2013) et anti-prolifératifs (Gee *et al.*, 2008). Chez le poisson, le TCS induit la VTG chez les poissons mâles dans certaines études uniquement, et plus spécifiquement à faibles concentrations sans effet sur le succès de la reproduction (Raut and Angus, 2010 ; Ishibashi *et al.*, 2004). Le triclosan étant communément retrouvé dans l'environnement, le but de cette étude est d'évaluer la capacité estrogénique et anti-estrogénique du triclosan dans les bio-essais *in vitro* MELN et ZELH-zfERs et dans le test *in vivo* EASZY et d'apporter des informations mécanistiques sur l'activité de cette molécule spécifiquement sur les ER du poisson zèbre.

2.2 Principaux résultats

Nous observons que le triclosan n'active pas ni antagonise la réponse ER, quel que soit le bio-essai. Cependant, à 1 μ M, le triclosan interfère avec la réponse à l'E2 chez les larves de poisson zèbre, et spécifiquement à faibles concentrations d'E2. De plus, lors du test EASZY, nous avons observé qu'une majorité des larves exposées à la plus forte concentration de TCS (1 μ M) présentait des défauts de nages. Bien que qualitative, cette information est en accord avec les effets du triclosan sur le développement musculosquelettique des poissons (Cherednichenko *et al.*, 2012).

2.3 Conclusions

- Le triclosan n'interfère pas avec les récepteurs des œstrogènes humains et de poisson zèbre *in vitro*
- *In vivo*, le triclosan n'a pas d'effet (anti)estrogénique dans le bio-essai cyp19a1b-GFP mais peut interférer avec la réponse à l'estradiol.

ARTICLE n°3

Lack of (anti)estrogenicity of triclosan in zebrafish *in vitro* and *in vivo* reporter gene assays

H. Serra^{1,2}, F. Brion¹, H. Budzinski², S. Aït-Aïssa^{1*}

¹ Institut National de l'environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité d'Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

² Université de Bordeaux, EPOC-UMR 5805, 33405 Talence, France

* Corresponding author

INTRODUCTION

Triclosan (TCS) is chlorinated phenolic chemical used as a wide spectrum antimicrobial agent in many personal care products, such as in cosmetics. Around 400 tons of TCS were used in Europe in 2007, reflecting its extensive application over the last decades (Scientific committee on consumer safety (SCCS), 2010). As a household chemical, TCS enters into the aquatic environment mainly through waste water treatment plant effluent releases after incomplete removal by adsorption to sewage sludge (Dann and Hontela, 2011). TCS is commonly detected in WWTP effluents (Loos *et al.*, 2013) and in river water where it was reported to occur at concentrations ranging from the ng/L range up to 2.3 µg/L (Brausch and Rand, 2011; Kolpin *et al.*, 2002; Schultz *et al.*, 2012).

TCS toxicity *in vivo* has been well studied, particularly regarding its endocrine disrupting capacity. TCS was shown to interfere with the thyroid, estrogen and androgen signaling pathways in several organisms, including frogs, rat and fish, raising concern among scientists and regulators about its effects in human and wild life (Dann and Hontela, 2011; Triclosan - Substance evaluation - CoRAP - ECHA). In fish, TCS was first suggested to be an androgenic chemical, as Foran *et al.* (2000) observed a tendency of TCS to induce a biased sex ratio toward males after exposure of medaka fry to 100 µg/L. TCS endocrine disrupting effects were further investigated, with regard to its estrogenicity. Raut and Angus (2010) and Ishibashi *et al.* (2004) reported the induction

vitellogenin (VTG) in male mosquito fish and medaka, respectively, after exposure to 100 µg/L TCS. The VTG induction was however observed at the low concentrations tested. Furthermore, the reproductive success of medaka exposed for 21 days up to 200 µg/L was not impacted (Ishibashi *et al.*, 2004) and TCS did not induce VTG in male fathead minnow exposed for 21 days up to 450 ng/L (Schultz *et al.* 2012). A recent *in vitro* study comparing ERα ligand binding domain affinity of several fish species to estrogenic chemicals showed that TCS activated selectively some fish ERα, suggesting possible fish-species specific sensitivity toward TCS (Miyagawa *et al.*, 2014).

Numerous studies addressed the *in vitro* estrogenic effects of TCS in transactivation (TA) and proliferative assays with, however, contrasting outcomes. For instance, TCS was found to transactivate hERα in transitory transfected monkey cells (H. Huang *et al.*, 2014) and to promote MCF-7 cell growth up to 80% of positive control effect at 75 µM (Henry and Fair, 2013). The proliferative effect of TCS in MCF-7 cells was associated with changes in expression of endogenous target genes pS2 and hERα similar to E2 response (Henry and Fair, 2013) and was blocked by addition of ICI (Kim *et al.*, 2016). While TCS was reported to compete with E2 to bind recombinant hERα/hERβ (Gee *et al.*, 2008), suggesting the involvement of ER in TCS response, other studies suggested the lack of agonist activity of TCS toward hERα in similar TA and described TCS as anti-estrogenic (Ahn *et al.*, 2008; Gee *et al.*, 2008).

To date, most *in vitro* studies on TCS anti(estrogenic) effects originate from mammalian test systems. Despite much information obtained so far suggesting the involvement of ER signaling in TCS response, the underlying mechanism of its estrogen-related effects remains unclear. In addition, TCS is widely and worldwide detected in the aquatic environment, but only few mechanistic studies focused on ER signaling pathway in fish. Therefore, our study aims at investigating TCS interaction with ER signaling using *in vivo* and *in vivo* zebrafish ER reporter gene assays, addressing both TCS estrogenic and anti-estrogenic effects, and comparing the response with a well-studied human reporter cell line. For this purpose, we exposed (1) zebrafish liver cell lines stably transfected to express selectively zfERα (ZELHα), zfERβ1 (ZELHβ1) or zfERβ2 (ZELHβ2), (2) human breast cancer MCF-7 cells expressing endogenous hERα (MELN) and (3) *in vivo* transgenic *cyp19a1b-GFP* zebrafish embryos, which express *cyp19a1b* gene under the strict regulation of ER in radial glial cells, to TCS in presence and absence of estradiol (E2).

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and reagents

17 β -estradiol (E2, CAS n°50-28-2), ethinylestradiol (EE2, CAS n°57-63-6) and triclosan (TCS, CAS n°3380-34-5) were purchased from Sigma-Aldrich (France). Dimethylsulfoxide (DMSO), Leibovitz 15 culture medium (L-15), fetal calf serum (FCS), 4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), epidermal growth factor (EGF), G418, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) and D-luciferin were purchased from Sigma Aldrich (St-Quentin Fallavier, France); Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM HG) powder, F-12 nutrient mixture (Ham's F12) powder, penicillin and streptomycin were from Gibco (France); insulin, hygromycin B and sodium bicarbonate were from Dominique Dutscher (France).

***In vitro* assays: cell culture, luciferase and cell viability assays**

The zebrafish *in vitro* assays were derived from the zebrafish liver (ZFL) cell line that was stably transfected first by an ERE-driven luciferase gene, yielding the ZELH cell line, and then by zFER α subtype, yielding the ZELH-zFER α , by zFER β 1 subtype yielding the ZELH-zFER β 1 cell lines or by zFER β 2 subtype yielding the ZELH β 2 cell lines (Cosnefroy *et al.*, 2012). Establishment of these cell models and their response to different classes of well-known xeno-estrogens have been previously described (Cosnefroy *et al.*, 2012, Sonavane *et al.*, 2016). In addition, the ZFL and ZELH cell lines were used as ER-negative controls. In addition to the zebrafish cell models, we used the human-derived MELN cell line (Balaguer *et al.*, 1999) kindly provided by Dr. Patrick Balaguer (INSERM Montpellier, France). The MELN cells are derived from the MCF-7 cells, which endogenously express the hER α , but no functional hER β (P. Balaguer, *personal communication*).

Conditions for routine cell culture and exposure to chemicals have been detailed previously (Balaguer *et al.*, 1999, Cosnefroy *et al.*, 2012, Sonavane *et al.* 2016). Briefly, ZELH-zFERs cells were seeded in 96-well white opaque culture plates (Greiner CellStar™, Dutscher, France) at 25,000 cells per well in phenol red free LDF-DCC medium (containing 50% of L-15, 35% of DMEM HG, 15% of Ham's F12, 15 mM of HEPES, 0.15 g/l of sodium bicarbonate, 0.01 mg/ml of insulin, 50 ng/ml of EGF and 50 U/ml of penicillin and streptomycin antibiotics, 5% v/v stripped FCS). MELN were seeded at 80,000 cells per well cell line in steroid-free DMEM medium. Cells were left to adhere

for 24 h. Then, they were exposed in triplicates to serial dilutions of test compound for either 72 h at 28 °C for zebrafish cells or 16h at 37°C for MELN cells. After exposure, luciferase activity was measured. The medium was removed and replaced by 50 µl per well of medium containing 0.3 mM luciferin. The luminescence signal was measured in living cells using a microtiter plate luminometer (Synergy H4, BioTek). The effect of test chemicals on cell viability was assessed by using the 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (Mosmann 1983). After cell exposure, culture medium was removed and replaced by 100 µL of medium containing 0.5 mg/mL MTT. Cells were incubated for 3 h. In metabolically active cells, MTT is reduced onto a blue formazan precipitate, which was dissolved by adding 100 µL of DMSO after removal of MTT containing medium. Plates were then read at 570 nm against a 640 nm reference wavelength on a microplate reader (KC-4, BioTek Instruments, France) and results were expressed as absorbance relative to control cells.

In vivo zebrafish bioassays

In vivo (anti)estrogenicity of TCS was assessed using the transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish line previously developed (Tong *et al.*, 2009) and well characterized with different classes of estrogens and xeno-estrogen compounds (Brion *et al.*, 2012). The assay procedure for individual chemical testing has been described in detail by Brion *et al.* (2012). In brief, 20 fertilized transgenic eggs were selected for each experimental group and exposed for 96 h in 25 ml of acclimated water in glass crystallizers. Serial dilutions were tested with a final volume of solvent (DMSO) of 0.01% v/v, a concentration without any effects on embryo development or GFP expression. In each experimental series, positive (EE2 0.05 nM) and DMSO controls were included as separate experimental groups. Exposed embryos were incubated at 28 °C, under semi-static conditions with daily complete renewal of medium. After the exposure period, each zebrafish larva was photographed using a Zeiss AxioImager.Z1 microscope equipped with an AxioCam Mrm camera (Zeiss GmbH, Gottingen, Germany) to measure GFP expression in the brain. Image analysis was performed using the ImageJ software, and fluorescence data was treated exactly as previously described (Brion *et al.*, 2012).

Data analysis

Dose-response curves were fitted to the experimental data using the Hill equation as provided in the RegTox 7.5 Microsoft Excel™ macro, freely available at

http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_download.html. Significant effects in luciferase induction, GFP intensity and cell viability in exposed conditions were determined by comparing each condition to solvent control (estrogenic effects) or to E2 control (antiestrogenic effects) applying a non-parametric bilateral mann-Withney statistical test with α set at 5%. Furthermore, DMSO and water controls of zebrafish *cyp19ab-GFP* larvae were pooled together when no significant differences were observed applying a non-parametric bilateral mann-Withney statistical test with α set at 5%.

RESULTS

Triclosan does not alter zfER transactivation in vitro.

During the experiments, the reporter cell lines responded to E2 in the range of sensitivity previously reported, as illustrated in fig. 1 (Cosnefroy *et al.*, 2012; Sonavane *et al.*, 2016). Across all the ZELH-zfERs cell lines and MELN cell line, exposure to TCS from 0.01 to 10 μM did not induce zfER transactivation (fig. 2A, B, C, D). To assess TCS anti-estrogenic effect, cells were co-exposed to increasing concentrations of TCS in presence of E2 at a concentration inducing 80% of maximal response. E2-induced ER transactivation remained unaffected by addition of TCS up to 10 μM in the MELN, ZELH α and ZELH cells, while a slight but significant decrease in E2-induced luciferase activity was observed in ZELH β 1 and ZELH β 2 cells at 10 μM (fig. 2A, B, C, D). Above 10 μM , luciferase activity was significantly decreased by TCS in all the reporter cell lines, in presence or absence of E2. The decreased luciferase activity at 30 μM paralleled the decreased in cell viability measured by MTT in every cell lines, including in the ZFL and ZELH parent cell lines (fig. 2E and F).

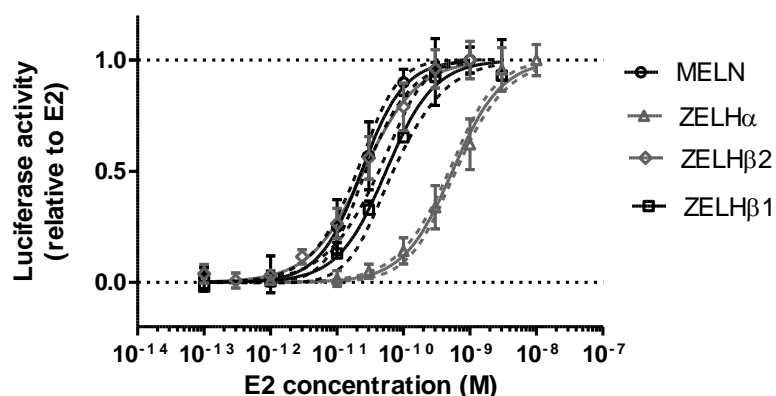


Fig. 1: Luciferase induction by E2 in MELN, ZELH α , ZELH β 1 and ZELH β 2 cell lines. Data represent the mean \pm SD and Hill fitting curve with 95% confidence interval belt.

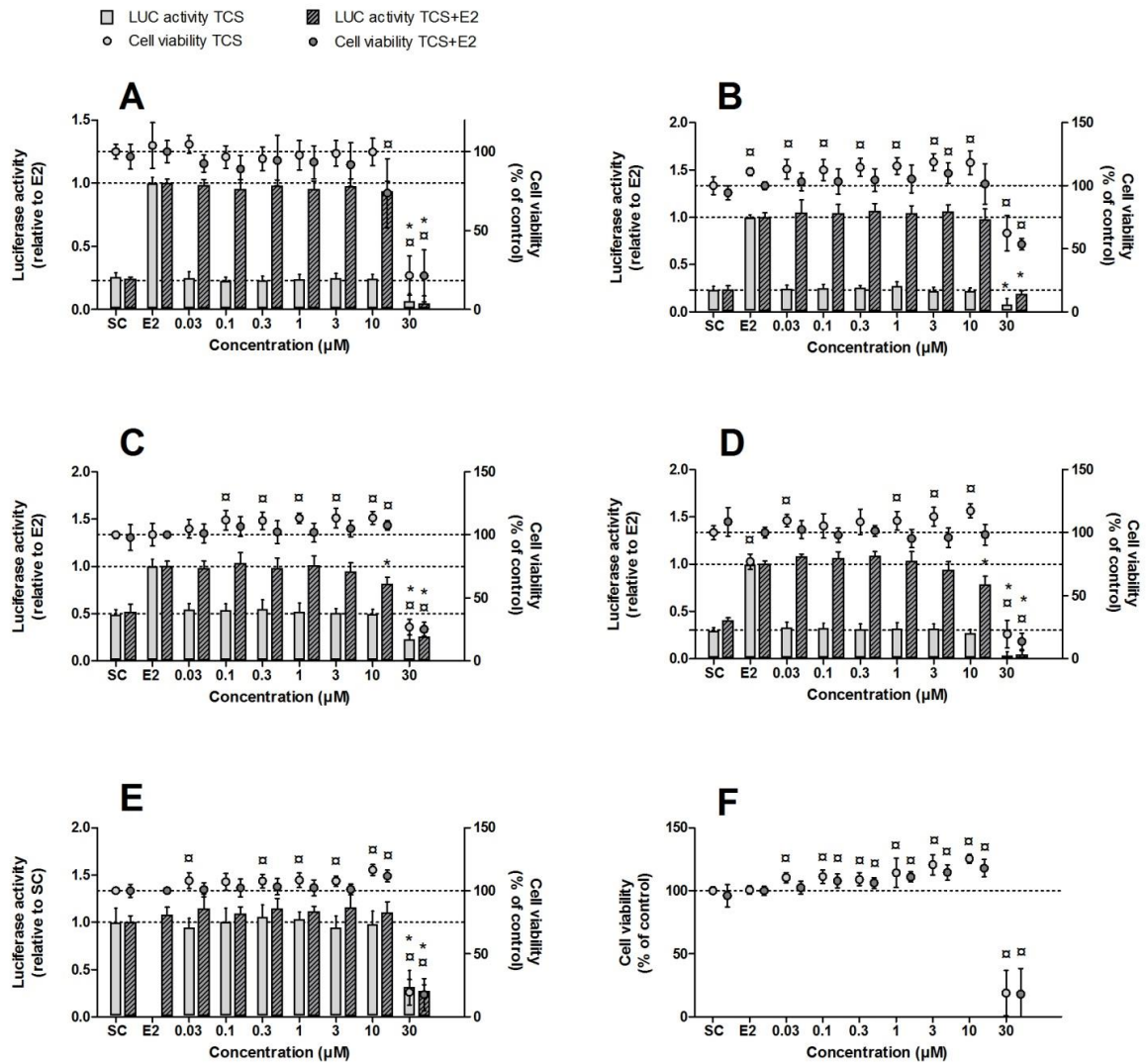


Fig. 2. Response of MELN (A), ZELH α (B), ZELH β 1 (C), ZELH β 2 (D), ZELH (E) and ZFL (F) cells to TCS. Cells were exposed for 24h (MELN) or 72h (ZELH-zfERs) to TCS (0.03 to 30 μ M) in presence or absence of E2. MELN, ZELH β 1 and ZELH β 2 cells were co-exposed to TCS + E2 0.1 nM, and ZELH α , ZELH and ZFL cells to TCS + E2 1 nM. Data represent the mean (+SD) of a minimum of 2 independent experiments normalized to E2 positive control for luciferase activity. α : response significantly different from control cell viability, *: response significantly different from control luciferase activity (Mann-Whitney, α =5%).

Triclosan does not alter zfER activity in in vivo zf-cyp19a1b zebrafish larvae

Zebrafish embryos were exposed from 3hpf to 96 hpf with daily renewal of water. The mortality in positive, negative controls and in exposed groups was below 20% in each experiment. The GFP intensity measured on day 4 in living zebrafish larvae showed that TCS induced a small significant increase in *cyp19a1b* expression, but only at the lowest concentration of 0.03 μ M (fig.

3A). At 1 μM , GFP intensity was significantly decreased compared control level. To assess the effects of TCS on E2-induced GFP intensity, zebrafish embryos were exposed to TCS in presence of E2 10 nM. TCS has no significant effects on E2-induced *cyp19a1b* expression from 0.03 to 0.3 μM , but significantly decreased by 30% the E2-induced-GFP intensity at 1 μM (fig. 3A). We further investigated the effects of TCS 1 μM on E2 dose-response induction of GFP. TCS did not significantly decrease E2-induced GFP intensity, despite the 17% decrease observed at E2 10 nM (p -value = 0.10). However, TCS 1 μM induced a slight but significant 2-fold increase in E2 0.625 nM response, which was confirmed in two independent experiments (fig. 3B).

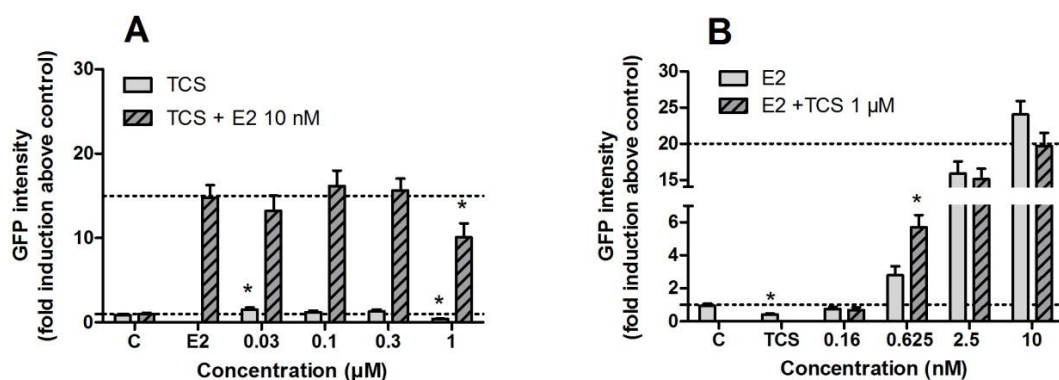


Fig. 3. Effect of TCS on *cyp19a1b* expression in transgenic zebrafish larvae. Embryos were exposed from 3hpf for 96h with daily renewal of medium, GFP intensity was measured on day 4 on living organisms by fluorescence microscopy. (A) zebrafish embryos were exposed to TCS from 0.03 to 1 μM alone or in co-exposure to E2 10 nM. (B) Zebrafish embryos were exposed to E2 from 0.16 to 10 nM alone or in presence of TCS 1 μM . Data represent the mean \pm SEM of a minimum of 1 experiment. “*”: response significantly different from control group (Mann Withney, $p < 0.05$).

DISCUSSION

The results from the *in vitro* assays in ZELH-zfERs and MELN reporter cell lines demonstrate the lack of agonist and antagonist activity of TCS toward zfER and hER α in the range of concentrations tested (0.03 – 10 μM nominal concentrations). As small significant decrease in E2-induced luciferase activity was observed at TCS 10 μM in ZELH β 1 and ZELH β 2 cells. However, the decrease was low and occurred close to cytotoxic concentrations, suggesting TCS impacts on luciferase activity rather than a direct effect on zfER activation. There is many information regarding TCS estrogenic and anti-estrogenic effects *in vitro*. The absence of ER transactivation by

TCS alone in the zebrafish reporter cell lines is in agreement with previous studies based on human cells transfected with recombinant fish or human ER α (Ahn *et al.*, 2008; Gee *et al.*, 2008; Miyagawa *et al.*, 2014). To our knowledge, no information on zfER β 1 and zfER β 2 subtypes implication in TCS response are available so far, impeding any comparison. Contrasting with the lack of estrogenic effects, the absence of anti-estrogenic activity observed in the zebrafish and human reporter cell lines differs from previous reports. Except one study showing no effect of TCS on EE2-induced hER α activation in cancer cells (Louis *et al.* 2013), several *in vitro* studies described TCS as anti-estrogenic in TA and proliferative assays (Ahn *et al.* 2008, Gee *et al.* 2008, Henry *et al.* 2011). To our knowledge no information on anti-estrogenic effect of TCS on fish ER has been previously reported, thus, differences between test systems, i.e. organism (fish vs human), tissue (cancer cells vs hepatocytes) and ER subtype (ER α vs ER β 1/ β 2), may contribute to the differences observed.

In the present study, we noticed a decrease in reporter gene activity at 30 μ M TCS, irrespectively of E2 in all the cell lines, which paralleled a marked decrease in cell viability. TCS was shown to induce a caspase-dependent apoptosis in neuronal cells (Park *et al.*, 2016; Szychowski *et al.*, 2015) and to reduce cell viability by targeting cell proliferation in mouse embryonic stem cells (Chen *et al.*, 2015) and in MCF-7 cells (Liu *et al.*, 2002). Thus, the decreased cell viability observed in ZFL-derived cells and in MELN cells at 30 μ M is in agreement with the broad cellular toxicity of TCS reported in the high μ M range.

TCS (anti)estrogenic effects were further investigated *in vivo* using transgenic zebrafish embryos that express GFP under the control of *cyp19a1b* promoter in radial glial cells (Brion *et al.* 2012). *Cyp19a1b* codes for the brain aromatase (aromatase B) responsible of the conversion of androgens into estrogens and which expression is highly inducible by ER agonists at the embryonic stage through an auto-regulatory loop (Le Page *et al.*, 2008; Menuet *et al.*, 2005). In the present study, we showed that TCS did not induce *cyp19a1b* expression and did not significantly reduced 10 nM E2-induced *cyp19a1b* expression from 0.03 to 1 μ M. These results are in line with the *in vitro* data obtained in this study in the same model species.

At 1 μ M, TCS significantly decreased GFP intensity as compared to other tested concentrations. To our knowledge, no chemical has been reported to decrease basal *cyp19a1b*

expression in zebrafish embryos. Interestingly, TCS is known to target the thyroid axis in many organisms, including in fish at the larval and adult stages (Pinto *et al.*, 2013; Schnitzler *et al.*, 2016). Thyroid hormones are essential to central nervous system development and function (Di Liegro, 2008). For instance, triiodothyronine (T3) is necessary for oligodendrocytes and astrocytes differentiation from glial cells (Noda, 2015). TCS was shown to alter the thyroid system of *Cyprinodon variegates* larvae, including T3 levels (Schnitzler *et al.*, 2016). Thus, we may hypothesize that the decrease in GFP intensity observed at 1 μ M TCS may result from neuro-developmental toxicity, including toxic effects toward radial glial cells supporting GFP intensity. In addition, we noticed the predominance of lethargy and swimming alterations in zebrafish larvae exposed to 1 μ M TCS, irrespectively from E2 10 nM addition. Albeit qualitative, these observations are in agreement with fathead minnow and rainbow trout embryo-larval developmental toxicity reported in the same range of concentrations (Cherednichenko *et al.*, 2012; Orvos *et al.*, 2002). Alteration of swimming behavior in larvae was shown to be specific mode of action of TCS in fish, as TCS targets the ryanodine receptor channels involve in calcium release from the endoplasmic, impairing excitation-contraction coupling in skeletal muscles of fish (Ahn *et al.*, 2008; Brennan *et al.*, 2005; Cherednichenko *et al.*, 2012; Fritsch *et al.*, 2013).

As TCS at 1 μ M induced specific effects and decreased GFP expression compared to other test concentrations, we further tested the effect of TCS 1 μ M on *cyp19a1b* induction at lower E2 concentrations. Our results indicate that TCS 1 μ M did not decrease E2-induced GFP intensity from 0.16 to 10 nM E2. However, a slight significant 2-fold increase in GFP intensity was measured when TCS 1 μ M was co-exposed to E2 0.625 nM. Similar low dose effects and non-monotonic responses were previously described in fish regarding VTG induction by TCS in male medaka and mosquito fish (Ishibashi *et al.* 2004, Raut et Agnus 2010). In mammals, several authors suggested that TCS may interact with circulating hormones and thus increase the action of estrogens (Feng *et al.*, 2016; Zorrilla *et al.*, 2009). For instance, TCS was shown to potentiate the EE2 response in the rat uterotrophic assay (Louis *et al.*, 2013; Stoker *et al.*, 2010).

Among all possible TCS toxicity pathways, our study addressed the very specific effect of TCS on zFER transactivation in zebrafish reporter gene assays. Our results demonstrated that TCS lacks agonist and antagonist activities toward zFER in *in vitro* and *in vivo*, and toward hER α *in vitro* in reporter gene assays. At 1 μ M, TCS interfered with low E2 concentration in transgenic zebrafish

larvae, suggesting that modulation of E2 response may occur in zebrafish, but irrespectively of direct binding and transactivation of zfERs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is supported by INERIS and by SOLUTIONS Project from the European Union Seventh Framework Program (FP7-ENV-2013-two-stage Collaborative project) under grant agreement 603437. We would like to thank Emmanuelle Maillot-Marechal and Benjamin Piccini for technical support.

REFERENCES

- Ahn, K.C., Zhao, B., Chen, J., Cherednichenko, G., Sanmarti, E., Denison, M.S., Lasley, B., Pessah, I.N., Kultz, D., Chang, D.P.Y., Gee, S.J., Hammock, B.D., 2008. *In vitro* biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: Receptor-based bioassay screens. *Environ. Health Perspect.* 116, 1203–1210. doi:10.1289/ehp.11200
- Balaguer, P., Francois, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A.M., Pons, M., Nicolas, J.C., Casellas, C., 1999. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci. Total Environ.* 233, 47–56. doi:10.1016/S0048-9697(99)00178-3
- Brausch, J.M., Rand, G.M., 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82, 1518–1532. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.018
- Brennan, C., Mangoli, M., Dyer, C.E.F., Ashworth, R., 2005. Acetylcholine and calcium signalling regulates muscle fibre formation in the zebrafish embryo. *J. Cell Sci.* 118, 5181–5190. doi:10.1242/jcs.02625
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.-K., Chung, B., Kah, O., 2012. Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures *In vivo* Using Transgenic (cyp19a1b-GFP) Zebrafish Embryos. *Plos One* 7, e36069. doi:10.1371/journal.pone.0036069
- Chen, X., Xu, B., Han, X., Mao, Z., Chen, M., Du, G., Talbot, P., Wang, X., Xia, Y., 2015. The effects of triclosan on pluripotency factors and development of mouse embryonic stem cells and zebrafish. *Arch. Toxicol.* 89, 635–646. doi:10.1007/s00204-014-1270-2
- Cherednichenko, G., Zhang, R., Bannister, R.A., Timofeyev, V., Li, N., Fritsch, E.B., Feng, W., Barrientos, G.C., Schebb, N.H., Hammock, B.D., Beam, K.G., Chiamvimonvat, N., Pessah, I.N., 2012. Triclosan impairs excitation-contraction coupling and Ca²⁺ dynamics in striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 14158–14163. doi:10.1073/pnas.1211314109
- Cosnefroy, A., Brion, F., Maillot-Maréchal, E., Porcher, J.-M., Pakdel, F., Balaguer, P., Aït-Aïssa, S., 2012. Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 125, 439–449. doi:10.1093/toxsci/kfr297
- Dann, A.B., Hontela, A., 2011. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J. Appl. Toxicol.* 31, 285–311. doi:10.1002/jat.1660
- Di Liegro, I., 2008. Thyroid hormones and the central nervous system of mammals (Review). *Mol. Med. Rep.* 1, 279–295.
- Feng, Y., Zhang, P., Zhang, Z., Shi, J., Jiao, Z., Shao, B., 2016. Endocrine Disrupting Effects of Triclosan on the Placenta in Pregnant Rats. *Plos One* 11, e0154758. doi:10.1371/journal.pone.0154758
- Foran, C.M., Bennett, E.R., Benson, W.H., 2000. Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Mar. Environ. Res.* 50, 153–156. doi:10.1016/S0141-1136(00)00080-5
- Fritsch, E.B., Connon, R.E., Werner, I., Davies, R.E., Beggel, S., Feng, W., Pessah, I.N., 2013. Triclosan Impairs Swimming Behavior and Alters Expression of Excitation-Contraction Coupling Proteins in Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.* 47, 2008–2017. doi:10.1021/es303790b

- Gee, R.H., Charles, A., Taylor, N., Darbre, P.D., 2008. Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. *J. Appl. Toxicol.* 28, 78–91. doi:10.1002/jat.1316
- Huang, H., Du, G., Zhang, W., Hu, J., Wu, D., Song, L., Xia, Y., Wang, X., 2014. The *in vitro* estrogenic activities of triclosan and triclocarban. *J. Appl. Toxicol.* 34, 1060–1067. doi:10.1002/jat.3012
- Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., Takao, Y., Arizono, K., 2004. Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquat. Toxicol.* 67, 167–179. doi:10.1016/j.aquatox.2003.12.005
- Kim, S.-H., Hwang, K.-A., Choi, K.-C., 2016. Treatment with kaempferol suppresses breast cancer cell growth caused by estrogen and triclosan in cellular and xenograft breast cancer models. *J. Nutr. Biochem.* 28, 70–82. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.09.027
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211. doi:10.1021/es011055j
- Le Page, Y., Menuet, A., Kah, O., Pakdel, F., 2008. Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1549–1557. doi:10.1002/mrd.20892
- Liu, B.Q., Wang, Y.Q., Fillgrove, K.L., Anderson, V.E., 2002. Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase *in vitro* and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49, 187–193. doi:10.1007/s00280-001-0399-x
- Loos, R., Carvalho, R., Antonio, D.C., Cornero, S., Locoro, G., Tavazzi, S., Paracchini, B., Ghiani, M., Lettieri, T., Blaha, L., Jarosova, B., Voorspoels, S., Servaes, K., Haglund, P., Fick, J., Lindberg, R.H., Schwesig, D., Gawlik, B.M., 2013. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Res.* 47, 6475–6487. doi:10.1016/j.watres.2013.08.024
- Louis, G.W., Hallinger, D.R., Stoker, T.E., 2013. The effect of triclosan on the uterotrophic response to extended doses of ethinyl estradiol in the weanling rat. *Reprod. Toxicol.* 36, 71–77. doi:10.1016/j.reprotox.2012.12.001
- Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.M., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J. Comp. Neurol.* 485, 304–320. doi:10.1002/cne.20497
- Miyagawa, S., Lange, A., Hirakawa, I., Tohyama, S., Ogino, Y., Mizutani, T., Kagami, Y., Kusano, T., Ihara, M., Tanaka, H., Tatarazako, N., Ohta, Y., Katsu, Y., Tyler, C.R., Iguchi, T., 2014. Differing species responsiveness of estrogenic contaminants in fish is conferred by the ligand binding domain of the estrogen receptor. *Environ. Sci. Technol.* 48, 5254–5263. doi:10.1021/es5002659
- Noda, M., 2015. Possible role of glial cells in the relationship between thyroid dysfunction and mental disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 194. doi:10.3339/fncel.2015.00194
- Orvos, D.R., Versteeg, D.J., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A., Cunningham, V., 2002. Aquatic toxicity of triclosan. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1338–1349. doi:10.1897/1551-5028(2002)021<1338:ATOT>2.0.CO;2
- Park, B.K., Gonzales, E.L.T., Yang, S.M., Bang, M., Choi, C.S., Shin, C.Y., 2016. Effects of Triclosan on Neural Stem Cell Viability and Survival. *Biomol. Ther.* 24, 99–107. doi:10.4062/biomolther.2015.164

- Pinto, P.I.S., Guerreiro, E.M., Power, D.M., 2013. Triclosan interferes with the thyroid axis in the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Res.* 2, 60–69. doi:10.1039/c2tx20005h
- Raut, S.A., Angus, R.A., 2010. Triclosan Has Endocrine-Disrupting Effects in Male Western Mosquitofish, *Gambusia Affinis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1287–1291. doi:10.1002/etc.150
- Schnitzler, J.G., Frédérich, B., Dussenne, M., Klaren, P.H.M., Silvestre, F., Das, K., 2016. Triclosan exposure results in alterations of thyroid hormone status and retarded early development and metamorphosis in *Cyprinodon variegatus*. *Aquat. Toxicol.* 181, 1–10. doi:10.1016/j.aquatox.2016.10.019
- Schultz, M.M., Bartell, S.E., Schoenfuss, H.L., 2012. Effects of triclosan and triclocarban, two ubiquitous environmental contaminants, on anatomy, physiology, and behavior of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 114–124. doi:10.1007/s00244-011-9748-x
- Scientific committee on consumer safety (SCCS), 2010. Opinion on triclosan - Antimicrobial resistance (No. SCCP/1251/09).
- Sonavane, M., Creusot, N., Maillot-Maréchal, E., Péry, A., Brion, F., Aït-Aïssa, S., 2016. Zebrafish-based reporter gene assays reveal different estrogenic activities in river waters compared to a conventional human-derived assay. *Sci. Total Environ.* 550, 934–939. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.187
- Stoker, T.E., Gibson, E.K., Zorrilla, L.M., 2010. Triclosan exposure modulates estrogen-dependent responses in the female wistar rat. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 117, 45–53. doi:10.1093/toxsci/kfq180
- Szychowski, K.A., Sitarz, A.M., Wojtowicz, A.K., 2015. Triclosan induces Fas receptor-dependent apoptosis in mouse neocortical neurons *in vitro*. *Neuroscience* 284, 192–201. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.10.001
- Tong, S.-K., Mouriec, K., Kuo, M.-W., Pellegrini, E., Gueguen, M.-M., Brion, F., Kah, O., Chung, B., 2009. A cyp19a1b-GFP (Aromatase B) Transgenic Zebrafish Line That Expresses GFP in Radial Glial Cells. *Genesis* 47, 67–73. doi:10.1002/dvg.20459
- Triclosan - Substance evaluation - CoRAP - ECHA [WWW Document], n.d. URL <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/evaluation/community-rolling-action-plan/corap-table/-/dislist/details/0b0236e1807e4774> (accessed 3.28.17).
- Zorrilla, L.M., Gibson, E.K., Jeffay, S.C., Crofton, K.M., Setzer, W.R., Cooper, R.L., Stoker, T.E., 2009. The Effects of Triclosan on Puberty and Thyroid Hormones in Male Wistar Rats. *Toxicol. Sci.* 107, 56–64. doi:10.1093/toxsci/kfn225

C. Evaluer les xeno-estrogènes en mélanges avec des polluants environnementaux

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer dans nos bio-essais l'activité estrogénique de xéno-estrogènes lorsqu'ils sont présents au sein de mélanges. Nous avons adressé deux cas de figures : (1) l'influence de ligands de AhR sur la réponse estrogénique (**article n°4**), et (2) la détection de xéno-estrogènes au sein d'un mélange de 12 molécules comprenant des molécules non actives et inhibitrices par une approche incluant une modélisation des effets additifs des xeno-estrogènes (**article n°5**).

1. Article n°4: *“Interference between AhR and ER signalling pathways in human in vitro and zebrafish in vitro and in vivo bioassays used for estrogenicity monitoring”*

1.1 Contexte et objectifs

Les contaminants environnementaux peuvent affecter le système endocrinien par de nombreux mécanismes, à l'image les dioxines et composés dioxine-like qui sont capables d'interférer avec la signalisation de ER. Comme nous l'avons vu dans **l'article n°3**, le ligand de AhR BaP était estrogénique dans les MELN mais anti-estrogénique dans les ZELH-zfERs, soulevant la question de l'implication de AhR dans la réponse des ZELH-zfERs, d'autant que les ZELH-zfERs proviennent de cellules de foie de poisson zèbre où les genes *ahr2* et *cyp1a* sont inductibles (Eide *et al.*, 2014).

L'objectif de cette étude est d'évaluer une possible interaction entre ER et AhR dans les modèles utilisés pour évaluer l'estrogénicité environnementale *in vitro* et *in vivo*. Pour cela, les bio-essais ont été exposés à la TCDD et à l'E2, seul, en combinaison et en présence d'antagoniste de ER (ICI) ou de AhR (CH223191). L'interaction réciproque entre les deux voies de signalisation a été évaluée en mesurant l'activité de la luciférase (*in vitro*), EROD (*in vitro*) et l'intensité de la GFP (test ESAZY), ainsi que l'expression de gènes endogènes ER- (*pS2*, *vtg1-5* et *vtg7*, *cyp19a1b*) et AhR-régulés (*ahr*, *ahr2*, *cyp1a*). Ce travail est le fruit d'une collaboration avec Patrice Gonzalez et

son équipe (laboratoire EPOC/OASU, Université de Bordeaux) concernant l'approche moléculaire (PCR) de l'étude.

1.2 Principaux résultats

D'une manière générale, nous observons qu'il y a une interaction réciproque entre les voies AhR et ER dans tous les modèles étudiés avec des différences marquées entre bio-essais *in vitro* humain et poisson zèbre et une bonne concordance entre modèles *in vitro* et *in vivo* de poisson zèbre.

Sur la voie ER, la TCDD, seule et en présence d'E2, induit une augmentation de l'activité luciférase sur les MELN qui est abolie par l'antagoniste de AhR, le CH223191, confirmant le rôle de AhR. A l'inverse, la TCDD diminue l'activité de la luciférase induite par l'E2 dans les ZELH-zfERs et dans les larves *cyp19a1b*-GFP. *In vitro*, l'anti-estrogénicité est beaucoup plus marquée sur l'activité de la luciférase dans les ZELH α que dans les ZELH β 2. A 72h d'exposition, le CH223191 ne permet pas de lever significativement l'effet anti-estrogénique *in vitro*, mais restaure partiellement l'activité de la GFP dans les larves de poisson zèbre.

Ces interactions croisées sont également retrouvées, dans une certaine mesure, sur l'expression de gènes endogènes cibles de ces récepteurs. Dans les cellules MELN, l'expression de *pS2* est différemment affectée par la TCDD : seule, la TCDD diminue l'expression de *pS2* et n'a aucun effet en présence d'E2. Dans les ZELH α , seule l'expression induite par l'E2 de la *vtg3* est diminuée par la TCDD à 72h d'exposition, et son expression est restaurée en présence de CH223191. Dans les ZELH β 2, seule l'expression induite par l'E2 de la *vtg5* est diminuée en présence de TCDD, et son niveau d'expression n'est pas modifié en présence de CH223191. Comparée aux résultats obtenus à 24h d'exposition, l'anti-estrogénicité de la TCDD sur l'expression de *vtg5* s'est amplifiée à 72h et n'est plus antagonisée par le CH223191. Dans les larves de poisson zèbre, le profil d'expression de *cyp19a1b* est totalement similaire au profil d'expression de la GFP, et en présence de CH223191, l'effet anti-estrogénique de la TCDD est totalement levé.

Sur la voie AhR, l'activité EROD est inhibée par l'E2 dans les MELN et l'addition de l'antagoniste de ER, l'ICI, permet de lever cette inhibition et même de potentialiser l'activité EROD. Ce résultat est confirmé au niveau transcriptionnel avec l'expression du *cyp1a*, montrant

l'implication de ER dans la régulation transcriptionnelle du *cyp1a*. Dans les cellules ZELH α , l'activité EROD est aussi inhibée par l'E2, mais l'addition d'ICI ne permet de restaurer que partiellement l'activité EROD. Contrairement aux cellules MELN, l'expression de *cyp1a* n'est pas modulée par l'E2 ni par l'ICI dans les ZELH-zfERs. Cependant, une interaction négative entre E2 et TCDD est observée sur l'expression de *ahr2* à 72h d'exposition, non modifiée par l'antagoniste de ER, l'ICI. Dans les ZELH β 2, aucune activité EROD n'est détectée, alors que la TCDD induit l'expression du *cyp1a*. Comme dans les ZELH α , l'expression induite par la TCDD du *cyp1a* est peu affectée par l'E2, mais une interaction négative est observée au niveau transcriptionnel pour *ahr2* à 72h d'exposition. L'addition d'ICI bloque partiellement l'effet de l'E2 sur l'expression de *ahr2*. De la même manière, l'expression du *cyp1a* induite par la TCDD n'est pas affectée par l'E2 ou l'ICI dans les larves transgéniques. Cependant, l'E2 et plus fortement la TCDD induisent une diminution de l'expression de *ahr2* dans les larves. En co-exposition avec la TCDD, l'E2 diminue l'inhibition de l'expression de *ahr2*, qui est partiellement restaurée en bloquant ER avec l'ICI.

Dans son ensemble, ces résultats indiquent que l'interaction entre la TCDD et l'E2 est variable en fonction du temps d'exposition et du gène ciblé (luciférase vs gènes endogènes), montrant une dynamique complexe d'interaction entre les deux voies de signalisation dans les bio-essais.

1.3 Conclusion

- Il y a une interaction réciproque entre les signalisations de AhR et ER dans tous les bio-essais
- La TCDD induit des effets opposés sur la réponse à l'E2 entre bio-essais : inhibition dans les modèles poisson zèbre mais activation sur les MELN
- Les effets mesurés *in vitro* en cellules ZELH-zfERs sont retrouvés *in vivo* chez l'embryon, attestant de la pertinence des bio-essais *in vitro* pour révéler des effets chez cette espèce modèle.

ARTICLE n°4

Interference between AhR and ER signalling pathways in human *in vitro* and zebrafish *in vitro* and *in vivo* bioassays used for estrogenicity monitoring

Hélène Serra^{1,2}, François Brion¹, Hélène Budzinski², Guillemine Daffe³, Patrice Gonzalez³, Selim Aït-Aïssa^{1*}

¹Institut National de l'Environnement Industriel et des risques (INERIS), unité Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, Verneuil-en-Halatte, France

² UMR-CNRS EPOC/LPTC, Université de Bordeaux, Talence, France

³ UMR-CNRS EPOC/OASU, Université de Bordeaux, Arcachon, France

* Corresponding author. E-mail: selim.ait-aissa@ineris.fr

INTRODUCTION

Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) represent a wide range of environmental contaminants that interfere with the endocrine system through multiple modes of action (Kabir *et al.*, 2015). Among them, direct binding of chemicals with the estrogen receptor (ER) is a well-identified key molecular event that mediates transcriptional activation of target genes involved in cell and tissue endocrine responses in vertebrates (Nelson and Habibi, 2013). While a number of environmental compounds are direct (ant)agonist ligands of the estrogen receptors (ERs) (e.g. reviewed in Kiyama and Wada-Kiyama, 2015), other contaminant-activated mechanisms, such as activation of other nuclear receptors or transcription factors, such as the aryl hydrocarbon receptor (AhR), can interfere with and modulate the ER-signaling pathway (Matthews and Gustafsson, 2006; Ohtake *et al.*, 2003).

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polyhalogenated aromatic hydrocarbons (PHAHs) are typical environmental AhR ligands. They exert their primary effects through binding to AhR which heterodimerizes with AhR nuclear translocator (ARNT) and activates the transcription of several genes of biotransformation enzymes including the cytochrome P4501A (CYP1A) (Denison and Nagy, 2003). Ligand activated-AhR can also interact with (un)liganded ER to

form an heterotrimer that binds to estrogen response elements (ERE), and thereby modulates the transcription of ER-regulated genes. Such mechanism has been demonstrated *in vitro* in human breast cancer cells and *in vivo* to induce proliferation of endometrial cells and uterine growth in ovariectomized mouse (Ohtake *et al.*, 2003; Rüegg *et al.*, 2008; Safe *et al.*, 2000; Wormke *et al.*, 2003).

Given the ubiquitous nature of ER and AhR ligands in the aquatic environment, it is important to consider their interactions and their effects on the endocrine system in fish for hazard and risk assessment of these compounds. However, cross-talk between ER and AhR pathways has been less studied in fish than in mammals, although there are some evidences that activated AhR inhibits ER-regulated gene expression both *in vitro* and *in vivo* (Bugel *et al.*, 2013; Cheshenko *et al.*, 2007; Navas and Segner, 2000b; Smeets *et al.*, 1999). Conversely, some PCB congeners were described to induce *in vitro* the transcription of ER-dependent genes in salmon hepatocytes (Mortensen and Arukwe, 2008, 2007) and to potentiate *in vivo* estrogenic responses in salmon co-exposed with PCB and the xeno-oestrogen nonylphenol (Arukwe *et al.*, 2001). Moreover, the inhibitory effect of (xeno)-estrogens on AhR mediated responses has been described in rainbow trout suggesting that ER/AhR cross-talk could be bi-directional (Mortensen and Arukwe, 2008; Navas and Segner, 2000a). Thus, there is a need to further investigate the interactions between ER and AhR and their consequences on the regulation of ER- and AhR-regulated genes in fish.

This study aimed at characterising the ER-AhR interference in a set of human- and fish-based bioassays that are routinely used for estrogenicity monitoring. For this purpose, we assessed the effect of typical ER and AhR ligands (E2 and TCDD, respectively), on ER- and AhR-mediated response in different *in vitro* and *in vivo* zebrafish ER-reporter gene bioassays. The study was conducted using established zebrafish liver (ZFL) cells stably transfected with luciferase (Luc) reporter gene and zebrafish ER α (ZELH α cells) or zebrafish ER β 2 (ZELH β 2 cells) (Cosnefroy *et al.*, 2012; Sonavane *et al.*, 2016). ZFL cells express functional AhR2 (Wentworth *et al.*, 2004) and inducible *cyp1a* mRNA expression (Eide *et al.*, 2014). To determine whether the cross-talk could be observed at the organism level, *in vivo* experiments were conducted in transgenic zebrafish embryos expressing GFP under control of *cyp19a1b* promoter (Brion *et al.*, 2012; Tong *et al.*, 2009). For comparison purpose, experiments were also conducted *in vitro* in MCF-7 cells stably

transfected with estrogen-regulated luciferase gene (MELN cells, Balaguer *et al.*, 1999), in which ER/AhR interactions have been evidenced (Ohtake *et al.*, 2003). Effects on ER pathway were investigated by assessing both reporter gene activity in the different models and endogenous gene expression, i.e. *pS2* in MELN cells, *vtg1-5* and *vtg7* in ZELH α and ZELH β 2 cells, and *cyp19a1b* in zebrafish embryos. AhR signaling pathway was investigated by measuring EROD activity, and *ahr* (MELN cells), *ahr2* (zebrafish bioassays) and *cyp1a* expression.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and bioreagents

17 β -estradiol (E2), 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), α -naphthoflavone (α NF), 7-ethoxyresorufin (7-ERF), dimethylsulfoxide (DMSO), Leibovitz 15 culture medium (L-15), fetal calf serum (FCS), 4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), epidermal growth factor (EGF), G418, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) and D-luciferin were purchased from Sigma Aldrich (St-Quentin Fallavier, France); Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM HG) powder, F-12 nutrient mixture (Ham's F12) powder, penicillin and streptomycin were purchased from Gibco (France); insulin, hygromycin B and sodium bicarbonate were purchased from Dominique Dutscher (France), RNAlater was purchased from Thermo Fisher Scientific (France) and ICI 182,780 was purchased from TOCRIS (France).

In vitro assays and cell culture

The zebrafish *in vitro* assays were derived from the zebrafish liver cell (ZFL) line that was stably transfected by first an ERE-driven luciferase reporter gene, yielding the ZELH cell line, and then by zfER α or zfER β 2 subtype, yielding the ZELH α and ZELH β 2 cell lines, respectively (Cosnefroy *et al.*, 2012). Establishment of these cell models and their response to different classes of well-known xeno-estrogens have been previously described (Cosnefroy *et al.*, 2012, Sonavane *et al.*, 2016). In addition, the ZFL and ZELH cell lines were used as control cell lines with no functional ER. The human-derived MELN cell line (Balaguer *et al.*, 1999) was kindly provided by Dr. Patrick Balaguer (INSERM Montpellier, France). The MELN cells are MCF-7 cells stably transfected by an ERE-driven luciferase reporter gene and express endogenous hER α , but no functional hER β (P. Balaguer, *personal communication*).

Conditions for routine cell culture and exposure to chemicals and environmental extracts have been detailed previously (Cosnefroy *et al.*, 2012, Creusot *et al.*, 2014,). Briefly, cells were seeded in 96-well white opaque culture plates (Greiner CellStar™, Dutscher, France) at 25,000 cells per well for all ZELH-zfER cell lines in phenol red free LDF-DCC medium (containing 50% of L-15, 35% of DMEM HG, 15% of Ham's F12, 15 mM of HEPES, 0.15 g/l of sodium bicarbonate, 0.01 mg/ml of insulin, 50 ng/ml of EGF and 50 U/ml of penicillin and streptomycin antibiotics, 5% v/v stripped FCS), and at 80,000 cells per well for MELN cell line in steroid-free DMEM medium. Cells were left to adhere for 24 h. Then, they were exposed in triplicates to serial dilutions of test compound for either 72 h at 28 °C for zebrafish cells or 16 h at 37 °C for the MELN cell line. For PCR analysis, MELN cells were exposed as previously mentioned but in 5 replicates per condition. The exposure protocole for ZELH-zfERs cells was slightly adapted. ZELH-zfERs were seeded in 48-well plates at 50,000 cells per well and exposed either for 24h or 72h in 5 replicates per condition. At the end of the exposure, the cells were washed with PBS, the medium was removed and replaced by 50 µL (MELN) or 150 µL trypsin few minutes. Trypsin action was stopped by excess of medium and the cells were transferred into a 1.5 mL-tube and centrifugated at 180g for 5 min at 4°C. The supernatant was then removed and replaced by excess of RNAlater solution. The extracted cells were kept 24h at 4°C and then transferred at -80°C until analysis.

Luciferase and EROD measurements

Luciferase and EROD activities were measured subsequently in intact living cells, enabling combined assessment of both responses within the same wells. For luciferase activity, the medium was removed and replaced by 50 µl per well of medium containing 0.3 mM luciferin. The luminescence signal was measured in intact living cells using a microtiter plate luminometer (Synergy H4, BioTek). EROD assay was performed as previously described by Laville *et al.* (2004). The medium was removed and replaced by 100 µL of medium containing 7 mM 7-ERF. After fluorescence measurement, cells were washed twice with PBS and the plates were kept frozen for 1 h at -80 °C. Total cellular proteins were then determined with the fluorescamine assay (Lorenzen and Kennedy 1993), using bovine serum albumin (BSA) as standard. EROD activities were expressed as pmol resorufin/ min/mg protein.

Cell viability

The effect of test chemicals on cell viability was assessed by using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (Mosmann 1983). After cell exposure, culture medium was removed and replaced by 100 μ L of medium containing 0.5 mg/mL MTT. Cells were incubated for 3 h. In living cells, MTT is reduced onto a blue formazan precipitate, which was dissolved by adding 100 μ L of DMSO after removal of MTT containing medium. Plates were then read at 570 nm against a 640-nm reference wavelength on a microplate reader (KC-4, BioTek Instruments, France) and results were expressed in absorbance unit relative to control cells.

In vivo bioassay and exposure

In vivo (anti)estrogenicity of TCS was assessed using the transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish line previously developed (Tong *et al.*, 2009) and well characterized with different classes of estrogens and xeno-estrogen compounds (Brion *et al.*, 2012). The assay procedure for individual chemical testing has been described in detail by Brion *et al.* (2012). In brief, 20 fertilized transgenic eggs were selected for each experimental group and exposed for 96 h in 25 ml of acclimated water in glass crystallizers. Serial dilutions were tested with a final volume of solvent (DMSO) of 0.01% v/v, a concentration without any effects on embryo development or GFP expression. In each experimental series, positive (EE2 0.05 nM) and DMSO controls were included as separate experimental groups. Exposed embryos were incubated at 28 °C, under semi-static conditions with daily complete renewal of medium. After the exposure period, each zebrafish larva was photographed using a Zeiss AxioImager.Z1 microscope equipped with an AxioCam Mrm camera (Zeiss GmbH, Gottingen, Germany) to measure GFP expression in the brain. Image analysis was performed using the ImageJ software, and fluorescence data was treated exactly as previously described (Brion *et al.*, 2012). For PCR analysis, subsequently to photography, larvae were anesthetized in cold water and pooled by 2 in RNA later solution. Zebrafish larvae were kept at 4°C for 24h, and then stored at -80°C until analysis.

Gene transcription

Gene transcription analysis was carried out on cells and zebrafish larvae. Total RNA was extracted from each replicate (5 replicates/condition) using the «SV Total RNA Isolation System kit» according to the manufacturer's instructions (Promega). First-strand cDNA was synthesized using « GoScript Reverse Transcription System » (Promega). Briefly, 10 μ L of total RNA (2 μ g) was

mixed with 1 µL of an oligo dT solution [1 µM] and 1 µL of an hexanucleotides solution [1 µM]. Samples were placed in a thermocycler (Eppendorf Mastercycler) for 5 min at 70 °C and then 5 min at 4 °C to linearize RNAs and allow primers to fix. Then, 8 µL of a mixture containing: 1 µL of reverse transcriptase [1U /µL], 4 µL of GoScript 5x reaction buffer, 1.5 µL of MgCl₂ [25mM], 1 µL of PCR Nucleotide Mix [10 mM] and 0.5 µL of Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor, were added to each tube and homogenized. The samples were then placed in the thermocycler for 5 min at 25 °C, followed by 1h at 42 °C for cDNA synthesis. The cDNA extracts were then stored at -20 °C until their used in real-time quantitative PCR reactions. Real time-quantitative PCR (RT-qPCR) based on SYBRGreen Fluorescence was carried out using GoTaq® qPCR Master Mix kit (Promega). PCR reactions contained 17 µL of a mixture of Nuclease-Free Water and GoTaq® qPCR Master Mix containing the SyberGreen fluorescent dye, 2 µL of specific primer pairs mix (200 µM each) and 1µL of cDNA .PCR primer-pair sequences for target genes are given in tab. SI 1: *ahr*, *pS2* and *cyp1a* in MELN cells, *vtg1-5* and *7*, *ahr2*, *cyp1a* in ZELH-zfERs cells, and *cyp19a1b*, *ahr2* and *cyp1a* in zebrafish larvae. PCR run included a first denaturation step of 10 min at 95 °C followed by 40 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C and 30 s at 72 °C, followed by a melting curve analysis post run to check for PCR product specificity. According to Livak and Schmittgen (2001), the delta CT (ΔCT) value was calculated by subtracting the averaged threshold cycle (CT) value of the three housekeeping genes (*rpl3α*, *Ef1α* and β -actin) from the CT value of the target gene.

Statistics and data analysis

For EROD and luciferase activities, the reporter gene signal was normalized between 0 and 1, as described in Eq. 1, with $signal_{condition}$ the signal of the tested condition, $signal_{control}$ the signal of the solvent control and $signal_{positive}$ the signal of the positive control:

$$Response = \frac{signal_{condition} - signal_{control}}{signal_{positive} - signal_{control}} \quad (1)$$

Concentration-response curves were fitted to all replicates pooled together with a minimum of 2 independent experiments using Hill equation in GraphPad Prism v5. For GFP analysis, data were expressed as fold induction above DMSO control. Significant differences between two treatments were performed using Mann Withney non parametric test ($\alpha=5\%$).

RESULTS

ER- and AhR-mediated responses to the reference ligands E2 and TCDD in MELN and ZELH-zfER cell lines

In all cell models, E2 and TCDD alone induced dose-dependent ER- or AhR-mediated response, as assessed by measuring luciferase (Fig. 1A) or EROD activity (Fig. 1B), respectively, hence confirming the functionality of both pathways in the cell lines.

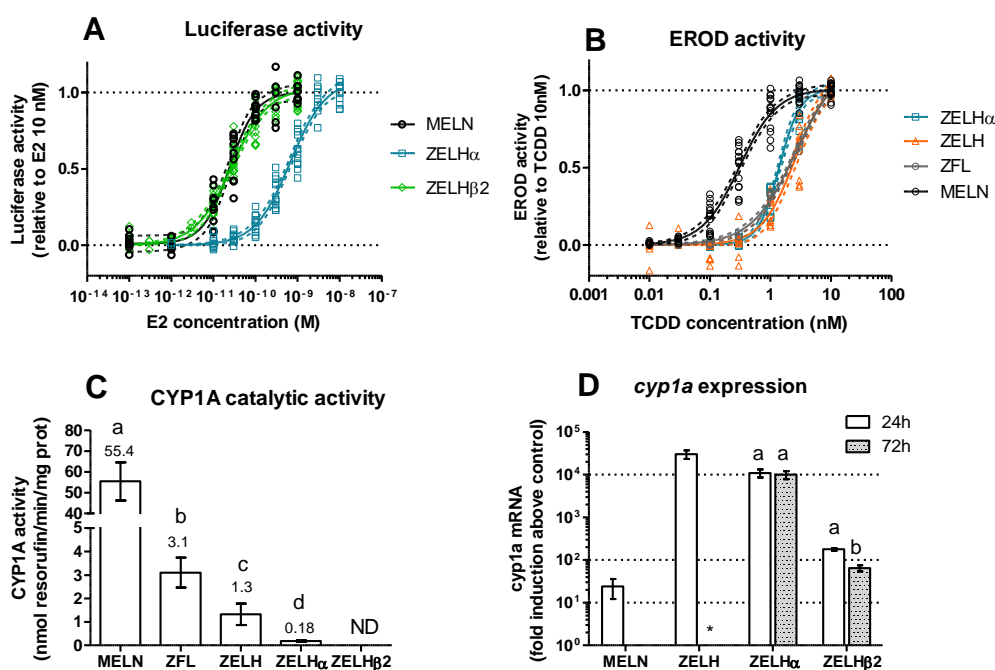


Fig. 1: Induction of ER- and AhR signalling by their respective ligands in MELN, ZFL, ZELH, ZELH α and ZELH β 2 reporter cell lines. E2-induced luciferase (A) and TCDD-induced EROD (B) activity: data represent all replicates of a minimum of 2 experiments done in triplicate, fitted with Hill model (+ 95% confidence interval belt). (C): maximal CYP1A catalytic activity induced by TCDD 10 nM (mean \pm SD of all replicates of a minimum of 2 experiments done in triplicates). No basal EROD activity could be detected in ZELH-zfERs cells. (D): cyp1a mRNA levels at TCDD 10 nM in fold induction above DMSO control levels (mean \pm SD of a minimum of 4 replicates). Different letters indicate a significant difference between two groups (*) no cyp1a mRNA detected in DMSO control in ZELH cells at 72h.

An exception was noticed however for ZELH β 2 cells, in which no EROD catalytic activity could be detected, both in control and TCDD-treated cells (figure 1C). When assessing cyp1a mRNA expression, significant induction levels (about 150-fold) were measured after TCDD exposure (figure 1D) suggesting that this cell line indeed expresses functional AhR. Nevertheless, cyp1a induction levels in ZELH β 2 were lower than in ZELH α (about 10,000-fold) or even in ZELH cells

(about 30,000-fold). The same pattern was observed when comparing induced EROD activity in the different zebrafish cell lines (figure 1C). Comparison of ZELH-zfERs cells with ZELH cells suggests that *de novo* expression of zfER in ZFL cell context has influenced the transcriptional activity of AhR. However, a possible clonal effect after consecutive clone selection during stable transfection process cannot be excluded.

TCDD has different effects on ER signaling in zebrafish and human reporter cell lines

Effect of TCDD on ERE-driven luciferase activity

In MELN cells, TCDD alone induced a dose-dependent increase in ERE-driven luciferase activity, up to 40% the effect of E2 (figure 2A). The same activating effect was observed after co-exposure to E2, suggesting a positive cross-talk in this cell line (figure 2B). In contrast, in zebrafish cells, TCDD alone had no effect in both ZELH α and ZELH β 2 cells (figure 2A). However, when co-exposed with E2, a clear and significant inhibitory effect was noted suggesting a negative cross-talk of TCDD on ER-signaling in both zebrafish cell lines (figures 2C and 2D).

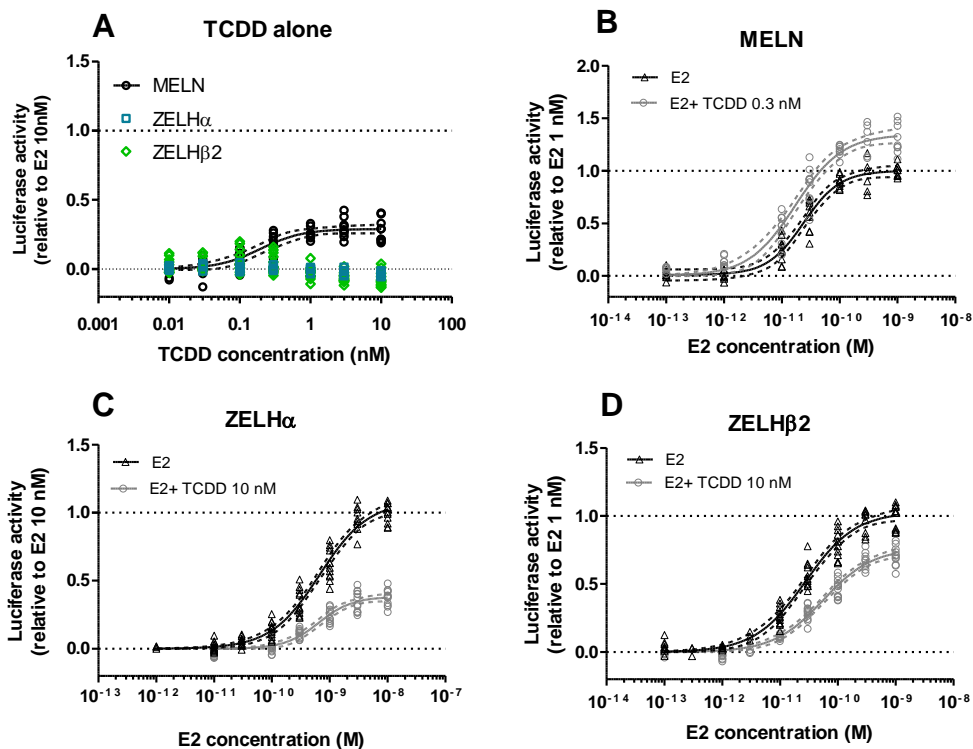


Fig. 2: Effect of TCDD on E2-induced luciferase activity. The cell lines were exposed either to TCDD alone (A). Then, MELN (B), ZELH α (C) and ZELH β 2 (D) cells were exposed to E2 alone (black triangles) and in presence of fixed concentration of TCDD (grey open circles). Data represent all the replicates of a minimum of 3 independent experiments done in triplicates, fitted with Hill nonlinear regression model (+/- 95% confidence interval belt).

The AhR antagonists CH223191 and α NF were further used to investigate the role of AhR in the observed cross-talk (Fig. 3). In MELN cells, CH223191 and α NF blocked the TCDD-induced luciferase activity, suggesting the involvement of AhR in the estrogenic response observed (Fig. 3A and 3D). In contrast, less clear effect of AhR antagonists were observed in zebrafish cells, only α NF could partially block TCDD anti-estrogenic effects in ZELH α cells (Fig. 3E).

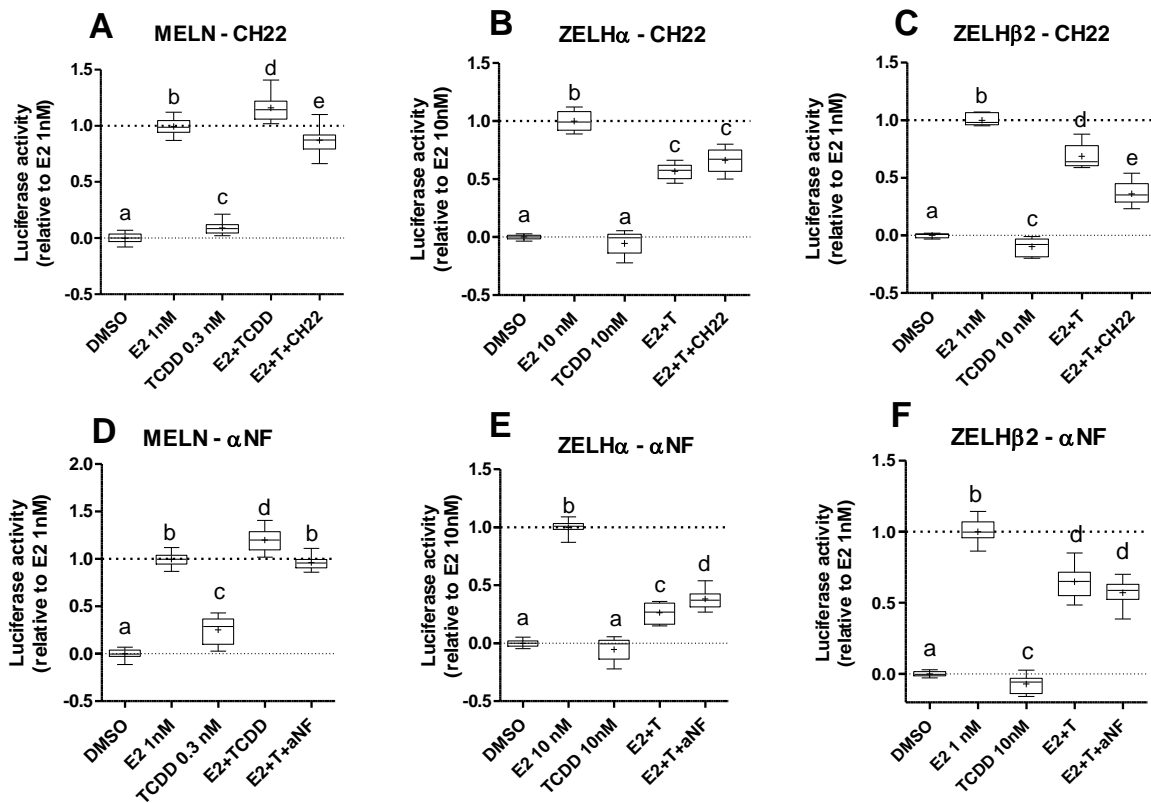


Fig. 3 Effect of AhR antagonists in E2 and TCDD interaction on luciferase activity at 24h in MELN cells, and at 72h in ZELH α and ZELH β 2 cells. A, B, C: luciferase activity in response to E2, TCDD, E2+TCDD, or E2+TCDD with CH223191 at 1 μ M (MELN) or 10 μ M (ZELH α and ZELH β 2 cells) or with α NF (10 μ M) in MELN (A,D), ZELH α (B,E), and ZELH β 2 (C,F) cells. Box plots (whiskers: 2.5 to 97.5 percentile) represent all replicates of a minimum of 3 independent experiments done in triplicates. Different letters denote a statistical significant difference between two group (Mann-Whitney, α =5%).

Effect of TCDD on ER-regulated endogenous genes

We further investigated whether TCDD could also modulate the expression of ER-regulated endogenous genes. In MELN cells, *pS2* was selected as an ER regulated gene in MCF-7 cells (e.g. Ohtake *et al.*, 2003). E2 significantly up-regulated *pS2* gene expression by 2-fold (figure 4A).

Contrasting with luciferase activity, TCDD alone slightly decreased pS2 basal expression compared to solvent control, but had no significant effects when co-exposed with E2, or with E2 and CH223191 (figure 4A).

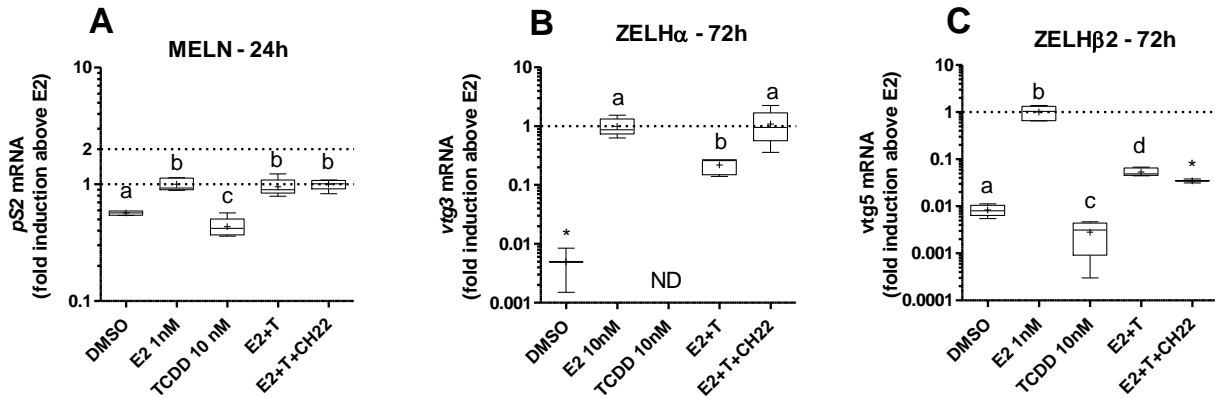


Fig. 4: Effect of AhR antagonist in E2 and TCDD interaction on endogenous gene expression at 24h in MELN cells, and at 72h in ZELH α and ZELH β 2 cells. mRNA levels of pS2 in MELN cells (A), vtg3 in ZELH α (B), and vtg5 in ZELH β 2 cells (C) in response to E2, TCDD, E2+TCDD, or E2+TCDD with CH223191 at 1 μ M (MELN) or 10 μ M (ZELH α and ZELH β 2 cells) ($n= 4$ to 5 replicates). Different letters denote a statistical significant difference between two group (Mann-Whitney, $\alpha=5\%$).

In ZELH-zfER cells, we selected several vtg genes (*vtg1- 5* and *vtg7*) that were previously described to be expressed in zebrafish hepatic cell context (Eide *et al.*, 2014). Basic mRNA levels in control ZELH, ZELH α and ZELH β 2 cells were overall very low or even undetectable, which confirmed the previous observations on ZFL (Eide *et al.*, 2014). Interestingly, except *vtg2*, all examined vtg genes were significantly induced by E2 after 24 h and/or 72 h in ZELH α and ZELH β 2 (Fig SI 1) but not in ZELH cells that express no functional ER (data not shown). This result confirms the functionality of the newly expressed zfERs on endogenous ZFL cell response. Furthermore, TCDD significantly decreased E2-induced *vtg3* in ZELH α and *vtg5* in ZELH β 2 cells after 72h of exposure. In ZELH α cells, the effect of TCDD was rescued by addition of CH223191, suggesting the involvement of AhR in the negative crosstalk (figure 4B). In ZELH β 2 cells, CH223191 rescued the anti-estrogenic effect of TCDD on *vtg5* expression at 24h of exposure (figure SI 2), but enhanced its anti-estrogenic effect at 72h of exposure. A similar trend as observed for luciferase activity in ZELH β 2 at 72h of exposure (figure 4D).

E2 has similar modulation of TCDD-induced EROD activity in zebrafish and human cell lines but has distinct transcriptional effects on *cyp1a* expression

Effect of E2 on EROD activity

In both MELN and ZELH α cell lines, TCDD-induced EROD activity was reduced by E2, with a maximal effect down to 60% in MELN cells (figure 5B) and to 75% in ZELH α cells (figure 5C). TCDD alone induced a slight but significant decrease in basal EROD activity in MELN cells (figure 5A). As noted above, no EROD activity was detectable in ZELH β 2 cells irrespectively of E2 addition (data not shown). To assess the involvement of ER in the inhibitory effect of E2 on EROD activity, cells were co-exposed with ICI 182,780 (ICI), a mammalian ER antagonist. Addition of ICI rescued the inhibiting effect of E2 in MELN cells and even caused a significant increase in TCDD-induced EROD activity compared to TCDD alone (figure 6A), which indicates a direct involvement of ER in E2 effect. The inhibiting effect of E2 was also partially blocked by addition of ICI in ZELH α cells (figure 6B).

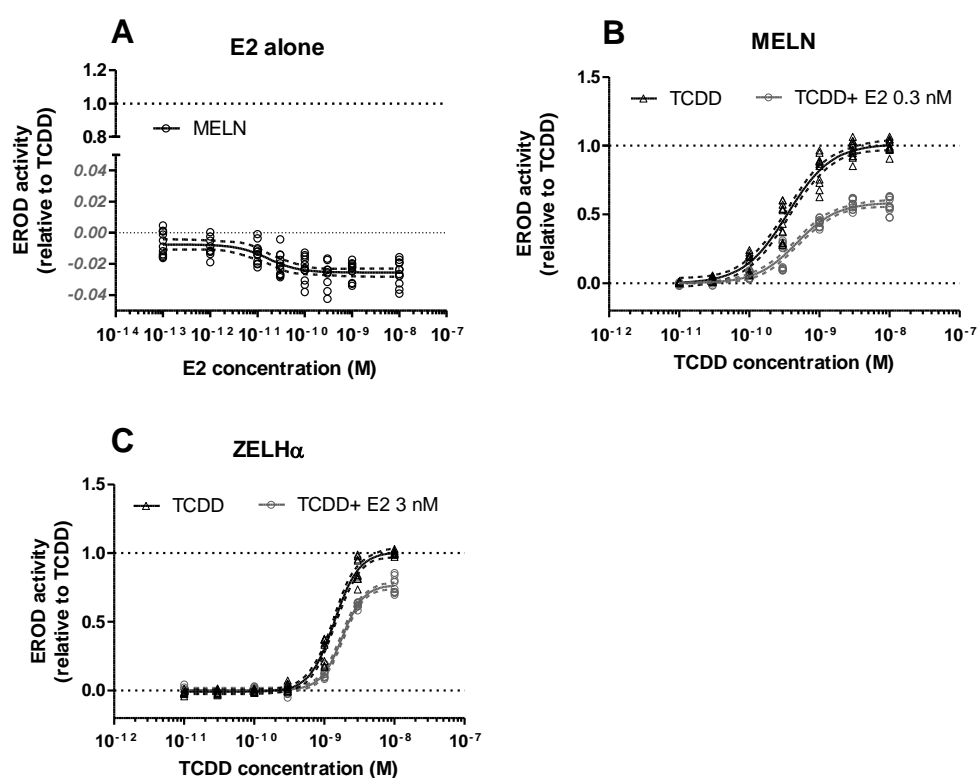


Fig. 5: Effect of E2 on TCDD-induced EROD activity. Cells were exposed to E2 alone (A), no basal EROD activity detected in ZELH α cells. MELN (B) and ZELH α (C) cells were exposed to TCDD alone (black triangles) or in presence of fixed concentration of E2 (grey open circles). Data represent all the replicates of a minimum of 3 independent experiments done in triplicates, fitted with Hill nonlinear regression model (+/- 95% confidence interval belt).

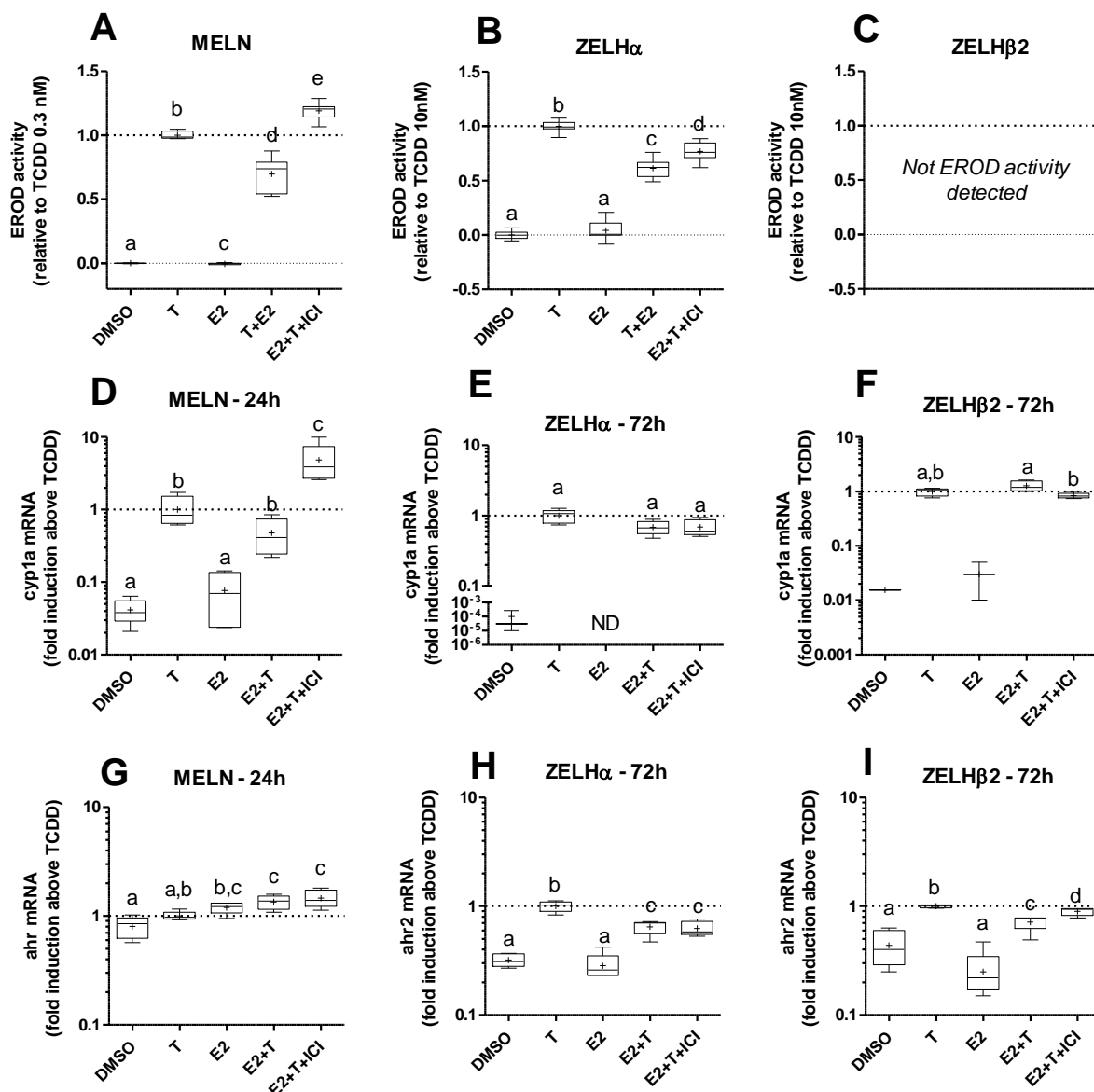


Fig. 6: Effect of the ER antagonist ICI 182,178 (ICI) on EROD activity and *cyp1a* and *ahr/ahr2* gene expression at 24h in MELN cells, and at 72h in ZELH α and ZELH β 2 cells. A, B, C: effect of ER antagonist ICI on EROD activity in MELN (A), ZELH α (B), and ZELH β 2 (C) cells. Box plots (whiskers: 2.5 to 97.5 percentile) represent all replicates of a minimum of 3 independent experiments done in triplicates. D, E, F: *cyp1a* mRNA levels in MELN cells (D), ZELH α (E), and ZELH β 2 cells (F) in response to E2, TCDD, E2+TCDD, or E2+TCDD with ICI ($n = 4$ to 5 replicates). G, H, I: mRNA levels of *ahr* in MELN cells (D), and *ahr2* in ZELH α (E) and ZELH β 2 cells (F) in response to E2, TCDD, E2+TCDD, or E2+TCDD with ICI ($n = 4$ to 5 replicates). Different letters denote a statistical significant difference between two groups (Mann-Whitney, $\alpha = 5\%$).

Effect of E2 on AhR-regulated endogenous genes

When assessing AhR target genes in MELN cells, E2 tended to reduce TCDD-induced *cyp1a* expression, but the effect did not reach statistical significance. However, ICI significantly up-regulated by 4-fold *cyp1a* expression compared to TCDD (Fig. 6D), as seen for EROD activity (figure

6A), hence suggesting the involvement of ER in the transcriptional regulation of CYP1A in MELN cells. *ahr* mRNA levels were not enhanced by TCDD in MELN cells, but co-exposure with E2 and then with E2 and ICI very slightly but significantly increased its expression (Fig. 6G).

In contrast to human cells, *cyp1a* mRNA levels in zebrafish cells were similar among all treatment containing TCDD, including after co-exposure with ICI, suggesting no or little interference of zfER α or zfER β 2 on transcriptional regulation of CYP1A (figures 6E and 6F, respectively). In comparison, TCDD-induced *ahr2* expression was significantly reduced by E2 in both ZELH α and ZELH β 2 cells at 72h of exposure (figure 6H and 6I). Addition of ICI partially restored TCDD response in ZELH β 2 cells (figure 6I).

***In vivo* effects of TCDD on *cyp19a1b* and *cyp1a* expression in transgenic zebrafish larvae**

Our *in vitro* data suggest important cross-species differences on the effect of AhR on ER-regulated genes. To further investigate this effect at the organism level, we used an *in vivo* reporter gene assay based on transgenic zebrafish embryos expressing GFP under control of *cyp19a1b* constitutive promoter in radial glial cells (Tong *et al.*, 2009, Brion *et al.* 2012). *Cyp19a1b*-driven GFP intensity and *cyp19a1b* mRNA expression were used to investigate ER signaling, and *cyp1a* and *ahr2* mRNA expression as indicator of AhR signaling. The figure 7 shows that co-exposure to TCDD 0.05 nM and E2 10 nM lead to a significant decrease in both GFP intensity (figure 7A) and *cyp19a1b* mRNA (figure 7B) compared to E2 levels. Thus, the anti-estrogenic effect of TCDD observed in zebrafish cell lines was confirmed *in vivo* at the transcriptional level using both the reporter and endogenous gene response. Addition of CH223191 significantly rescued the anti-estrogenic effect of TCDD on *cyp19a1b* mRNA levels (Fig 7B), with a similar effect observed in the GFP expression (fig. 7A), thus indicating the involvement of AhR in TCDD anti-estrogenic effect. Furthermore, we observed that embryos treated with CH223191 had a reduced occurrence of TCDD-related phenotypical toxicity (e.g. oedema). In comparison, addition of α NF, a partial AhR agonist, did not reduced significantly TCDD anti-estrogenic effect on *cyp19a1b* expression.

To investigate the reciprocity of cross-interaction, *cyp1a* and *ahr2* expression was also measured in zebrafish embryos, as illustrated in Fig. 7C and 7D. As observed in ZELH-zfERs cells, *cyp1a* expression was significantly induced by TCDD in zebrafish embryos, and this induction was not modulated by E2, or any AhR or ER antagonists. In contrast, *ahr2* expression was highly

sensitive to E2 and TCDD. Compared to control, *ahr2* mRNA levels were down-regulated by 50-fold by E2 10 nM and by 10,000-fold by TCDD 0.05 nM. Combination of E2 and TCDD significantly led to an intermediary effect level between TCDD and E2 effect alone. Addition of CH223191 totally restored *ahr2* expression to a level similar to E2 alone, likely due to a removal of AhR-mediated effect of TCDD. Addition of ICI significantly reduced the effect of E2 on TCDD response,

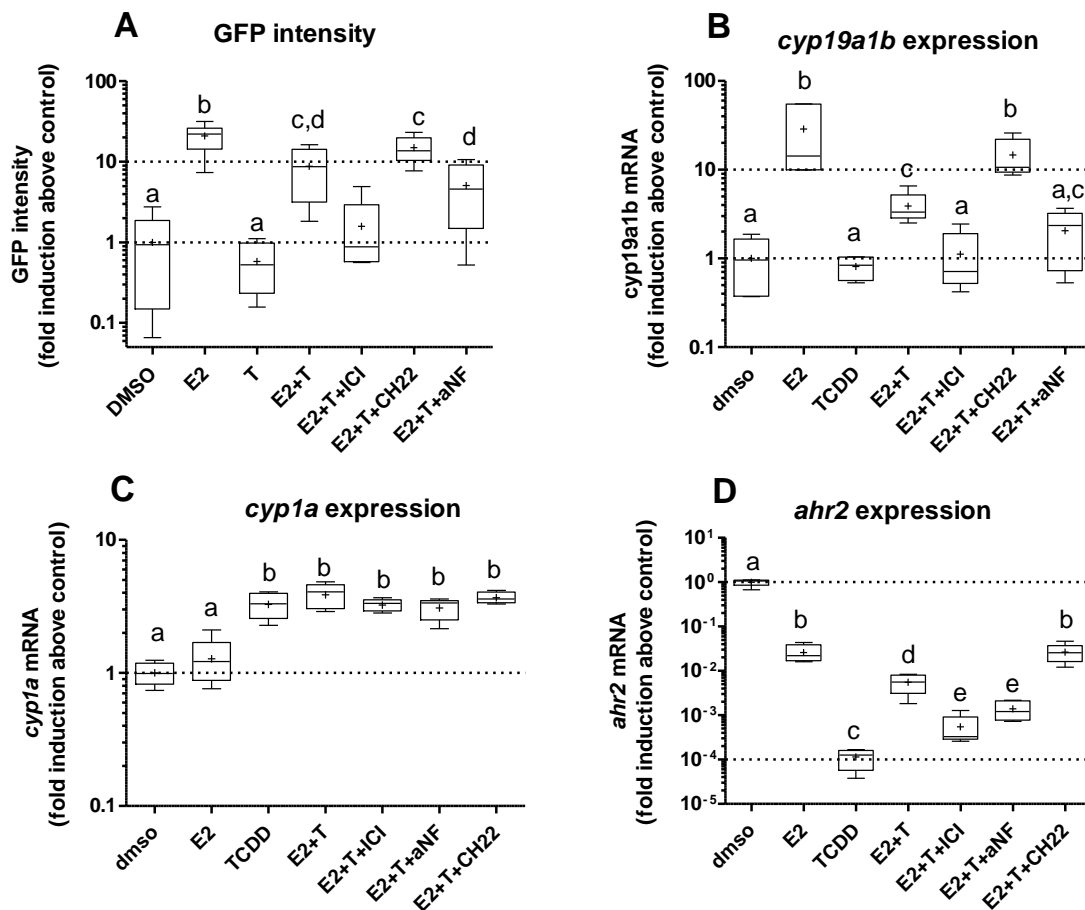


Fig. 7: In vivo interaction between AhR and ER in transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryos. 4hpf old embryos were exposed for 96h to E2 (10 nM), TCDD (0.05 nM), E2+TCDD, E2+TCDD with ICI (1 μ M), or CH223191 (0.5 μ M), or α -naphthoflavone (0.5 μ M). A: GFP intensity in transgenic zebrafish embryos representative of a experiment (n= 5 to 19) repeated twice. B, C, D: *cyp19a1b* (B), *cyp1a* (C) and *ahr2* (D) mRNA in transgenic zebrafish (n=4 to 5 replicates). Box plots (whiskers: 2.5 to 97.5 percentile) represent all replicates. Different letters denote a statistical significant difference between two groups (Mann-Whitney, $\alpha=5\%$).

which indicates the involvement of ER in the interaction.

DISCUSSION

Our study aimed at characterising interaction between ER and AhR signaling in zebrafish and human ER-based reporter gene bioassays that are commonly used for estrogenic screening.

By monitoring both gene activity (ER-driven luciferase or GFP and TCDD-induced EROD activities) and ER- and AhR-regulated gene expression, we show that such interactions occurred in all ER-reporter gene systems, with marked differences between *in vitro* human and zebrafish-based bioassays, and very good agreement between *in vitro* and *in vivo* zebrafish assays. Some specific variations were also noted depending on the assessed endpoint (i.e. reporter vs endogenous gene).

Opposite effect of TCDD on reporter gene activity in zebrafish and human based bioassays

In MELN cells, TCDD exhibited estrogenic effects on luciferase activity, alone and in presence of E2, in agreement with previous reports (Balaguer 1999, Ohtake *et al.*, 2003). Liganded AhR was shown to recruit unliganded hER α to ER-regulated promoter leading to induction of estrogenic response (Ohtake *et al.*, 2003). Involvement of AhR in the estrogenic response in MELN cells was evidenced by addition of AhR antagonist CH223191 or AhR partial agonist α -NF (figure 3), which blocked the induced luciferase activity. In contrast with reporter gene activity, TCDD alone induced a down-regulation of *pS2* expression in MELN cells, and did not modulate E2-induced *pS2* expression. In MCF-7 cells, 3-methylchloranthene (3MC) up-regulated *pS2* expression alone, but had anti-estrogenic effect in presence of E2 (Ohtake *et al.*, 2003). Differences between AhR ligands (TCDD vs 3MC) and cell culture/exposure systems may account for the differences observed with MELN cells.

Contrasting with human cells, TCDD had a marked anti-estrogenic effect on E2-induced luciferase activity in ZELH α and, to a lesser extent, in ZELH β 2 cells. Anti-estrogenic effects of AhR ligands on ER response have been previously reported in fish hepatocytes, such as inhibition of *vtg* induction in primary cultures of fish hepatocytes by β -naphthoflavone (Grans *et al.*, 2010; Navas and Segner, 2000a) or by PCB-77 (Chang *et al.*, 2014; Mortensen *et al.*, 2006). To assess the relevance of luciferase inhibition in zebrafish hepatocytes, *vtg1-5* and *7* gene expression was assessed in presence of E2 and E2+TCDD. Our results indicate that most *vtg* genes were detected in response to E2 in both cell lines, except for *vtg2*. The effect of E2 was indeed mediated by zfER since no *vtg* induction by E2 was noted in ZELH cells, in line with previous reports in parental ZFL cells (Eide *et al.*, 2014).

Interestingly, TCDD anti-estrogenic effect was only observed for *vtg3* expression in ZELH α cells, while in ZELH β 2 cells, *vtg4*, 5 and 7 at 24h of exposure and *vtg5* at 72h of exposure were down-regulated by TCDD. Lee Pow *et al.* (2016) showed that medaka ER β 2 was the most potent ER subtype on inducing luciferase activity driven by VTG type I or VTG type II promoter. Interestingly, *vtg4,5* and 7 belong to VTG type II, while *vtg3* belong to VTG type III in zebrafish (Wang *et al.* 2005). In ZELH cells, which is representative of zebrafish liver cell context, it is likely that promoter-specific context may have influenced the transcriptional activity of AhR/zfER complex leading to differential action of TCDD on ER-regulated genes. Furthermore, it has been shown that zfERs subtypes are differently regulated in zebrafish liver, with zfER α , but not zfEReta2, being upregulated by E2 and zfERbeta1 being downregulated by E2 (Menuet *et al.* 2002). Further experiments assessing the expression of the different receptor subtypes, at both mRNA and protein levels, would be warranted to better understand the differences between zebrafish cell models.

We further investigated the *in vivo* effect of TCDD on ER response using transgenic zebrafish expressing GFP under control of ER-regulated *cyp19a1b* promoter in radial glial cells (Tong *et al.*, 2009, Brion *et al.*, 2012). In zebrafish larvae, TCDD exhibited an anti-estrogenic effect on E2-induced evidenced by both *cyp19a1b* mRNA levels and *cyp19a1b*-driven GFP; this effect was rescued by CH223191 showing the involvement of AhR (figure 7). Similar anti-estrogenic effect of TCDD on brain aromatase expression has been previously reported in wild type zebrafish (Cheshenko *et al.*, 2007). Interestingly, GFP expression and *cyp19a1b* expression had similar response profile, illustrating the suitability of the transgenic zebrafish line to study modulation of ER response *in vivo*. Moreover, this *in vivo* observation was in perfect agreement with *in vitro* results on zebrafish cell lines, which strengthens the relevance of using *in vitro* fish-derived models to fish-specific effect.

Evidence for a bi-directional crosstalk between AhR and ER signalling in reporter gene assays

The comparison of human and zebrafish bioassays showed differences in CYP1A response. MELN cells were the most sensitivity to TCDD-induced EROD activity, and had the highest CYP1A catalytic activity. In comparison, all ZFL-derived cells, except ZELH β 2 cells, had similar sensitivity to EROD induction but with low CYP1A catalytic activity compared to MELN. The high induction of

cyp1a expression in ZFL-derived cells might compensate the low catalytic capacity of the zebrafish CYP1A enzyme. Compared to other fish cell lines, no basal EROD activity was detected in ZFL (Creusot *et al.*, 2015; Miranda *et al.*, 1993).

Furthermore, it is remarkable that *de novo* expression of zfER in ZFL cells led to a reduced EROD activity and *cyp1a* inducibility, especially in ZELHbeta2 cells. It is likely that zfER compete with AhR for transcriptional cofactors leading to lower responsiveness of AhR pathway. Lack of EROD activity, despite a functional AhR signaling might be the consequence of post-transcriptional regulation or reduced catalytic activity reaching levels below the EROD detection limits. Furthermore, an indirect effect of zfERβ2 transfection in ZELH cells cannot be excluded (e.g. insertion in key *cyp1a* regulatory sequence). Further experiments using transient transfection would be helpful to test this hypothesis.

In mammalian models, ERα was shown to have an important role in AhR dependent transcription, such as in regulating *cyp1a* expression and related EROD activity (Beischlag and Perdew, 2005; Wihlen *et al.*, 2009). In the present study, a direct involvement of hERα in *cyp1a* transcriptional regulation was observed in MELN cells, in which ICI enhanced both basal and TCDD-induced *cyp1a* mRNA and EROD levels. Our data confirm the role of hERα in induced AhR signaling in MELN cells, illustrating the bi-directional crosstalk between both signaling pathways. In zebrafish cells, E2 decreased the TCDD-induced EROD activity but without impacting significantly TCDD-induced *cyp1a* expression. Addition of ICI partially restored the EROD activity, but did not impact *cyp1a* expression. The lack of *cyp1a* transcriptional modulation by E2 and/or zfERα would argue in favor of an interaction of E2 with CYP1A catalytic activity, as E2 is known to be a substrate of CYP1A family. Compared to *cyp1a*, TCDD-induced *ahr2* expression was reduced by addition of E2 at 72h of exposure in both zebrafish cell lines, and was not (ZELHα cells) or only partially rescued (ZELHβ2 cells) by addition of ICI. Thus, we observed a bidirectional crosstalk in zebrafish reporter gene assays, but with different effects on AhR-signaling depending on the cell line and the AhR-regulated gene selected.

The same pattern was again observed in zebrafish embryos, where TCDD-induced *cyp1a* expression was not impacted by E2, nor by ICI, as observed *in vitro*. A previous internal study showed no effect of E2 10 nM on TCDD induced EROD activity in wild type zebrafish larvae, nor

modulation by ICI (data not shown), comforting the idea of *cyp1a* gene expression and EROD activity in zebrafish larvae is not very sensitive to E2. However, our study shows that TCDD and E2 interacted on *ahr2* induction in zebrafish larvae. TCDD drastically decreased *ahr2* mRNA, which was significantly reduced by addition of E2. Blocking ER with ICI partially restored *ahr2* to levels close to TCDD levels, indicating that a crosstalk of ER on AhR response was also observed in zebrafish embryos.

Implications for estrogenicity assessment

Altogether, this study illustrated that constitutive AhR signaling pathway can be induced in ER-based reporter gene bioassays and interfere with ER response, leading to cell type-, species- and promoter-specific interactions. The cell type and promoter-specific interaction between E2 and TCDD illustrates the need to properly characterize the response of each model, as marked differences can be observed depending on the endpoint selected (Wihlen *et al.*, 2009). Anti-estrogenic effects of TCDD were well detected in all zebrafish-based bioassays showing the relevance of the test systems to study modulation of ER response by AhR ligands in this model species.

Numerous *in vitro* bioassays are routinely applied to assess the estrogenic activity of environmental samples, in which AhR ligands are ubiquitous pollutants. Our results suggest that co-occurrence of AhR and ER ligands may interfere with ER response in all ER-reporter gene assays, which may eventually lead to different outcomes depending on the cell lines used. Thus, a good knowledge of ER-reporter systems is needed to properly characterize the response of chemicals, especially in complex mixtures, such as in environmental samples.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is supported by INERIS and by SOLUTIONS Project from the European Union Seventh Framework Program (FP7-ENV-2013-two-stage Collaborative project) under grant agreement 603437. We would like to thank Emmanuelle Maillot-Marechal and Benjamin Piccini for technical support.

REFERENCES

- Arukwe, A., Yadetie, F., Male, R., Goksøyr, A., 2001. *In vivo* modulation of nonylphenol-induced zonagenesis and vitellogenesis by the antiestrogen, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-77) in juvenile fish. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10, 5–15. doi:10.1016/S1382-6689(01)00063-1
- Balaguer, P., Francois, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A.M., Pons, M., Nicolas, J.C., Casellas, C., 1999. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci. Total Environ.* 233, 47–56. doi:10.1016/S0048-9697(99)00178-3
- Beischlag, T.V., Perdew, G.H., 2005. ER α -AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *J. Biol. Chem.* 280, 21607–21611. doi:10.1074/jbc.C500090200
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.-K., Chung, B., Kah, O., 2012. Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures *In vivo* Using Transgenic (*cyp19a1b*-GFP) Zebrafish Embryos. *Plos One* 7, e36069. doi:10.1371/journal.pone.0036069
- Brunnberg, S., Pettersson, K., Rydin, E., Matthews, J., Hanberg, A., Pongratz, I., 2003. The basic helix–loop–helix–PAS protein ARNT functions as a potent coactivator of estrogen receptor-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 6517–6522. doi:10.1073/pnas.1136688100
- Bugel, S.M., White, L.A., Cooper, K.R., 2013. Inhibition of vitellogenin gene induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin is mediated by aryl hydrocarbon receptor 2 (AHR2) in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 126, 1–8. doi:10.1016/j.aquatox.2012.09.019
- Chang, Z., Lu, M., Kim, S.-S., Park, J.-S., 2014. Potential role of HSP90 in mediating the interactions between estrogen receptor (ER) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Toxicol. Lett.* 226, 6–13. doi:10.1016/j.toxlet.2014.01.032
- Cheshenko, K., Brion, F., Le Page, Y., Hinfray, N., Pakdel, F., Kah, O., Segner, H., Eggen, R.I.L., 2007. Expression of zebra fish aromatase *cyp19a* and *cyp19b* genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. Sci.* 96, 255–267. doi:10.1093/toxsci/kfm003
- Cosnefroy, A., Brion, F., Maillot-Maréchal, E., Porcher, J.-M., Pakdel, F., Balaguer, P., Aït-Aïssa, S., 2012. Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 125, 439–449. doi:10.1093/toxsci/kfr297
- Creusot, N., Brion, F., Piccini, B., Budzinski, H., Porcher, J.M., Aït-Aïssa, S., 2015. BFCOD activity in fish cell lines and zebrafish embryos and its modulation by chemical ligands of human aryl hydrocarbon and nuclear receptors. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 16393–16404. doi:10.1007/s11356-014-3882-8
- Denison, M.S., Nagy, S.R., 2003. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 309–334. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828

- Eide, M., Rusten, M., Male, R., Jensen, K.H.M., Goksoyr, A., 2014. A characterization of the ZFL cell line and primary hepatocytes as *in vitro* liver cell models for the zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 147, 7–17. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.023
- Grans, J., Wassmur, B., Celander, M.C., 2010. One-way inhibiting cross-talk between arylhydrocarbon receptor (AhR) and estrogen receptor (ER) signaling in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 100, 263–270. doi:10.1016/j.aquatox.2010.07.024
- Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Delfosse, V., Thouennon, E., Bourguet, W., Balaguer, P., 2015. Reporter Cell Lines for the Characterization of the Interactions between Human Nuclear Receptors and Endocrine Disruptors. *Front. Endocrinol.* 6, 62. doi:10.3389/fendo.2015.00062
- Hahn, M.E., 2001. Dioxin toxicology and the aryl hydrocarbon receptor: Insights from fish and other non-traditional models. *Mar. Biotechnol.* 3, S224–S238. doi:10.1007/s10126-001-0045-Y
- Iwanari, M., Nakajima, M., Kizu, R., Hayakawa, K., Yokoi, T., 2002. Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences. *Arch. Toxicol.* 76, 287–298. doi:10.1007/s00204-002-0340-z
- Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 241–258. doi:10.1016/j.etap.2015.06.009
- Kiyama, R., Wada-Kiyama, Y., 2015. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environ. Int.* 83, 11–40. doi:10.1016/j.envint.2015.05.012
- Klinge, C.M., Bowers, J.L., Kulakosky, P.C., Kamboj, K.K., Swanson, H.I., 1999. The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements. *Mol. Cell. Endocrinol.* 157, 105–119.
- Lee Pow, C.S.D., Yost, E.E., Aday, D., Kullman, S.W., 2016. Sharing the Roles: An Assessment of Japanese Medaka Estrogen Receptors in Vitellogenin Induction. *Environ. Sci. Technol.* doi:10.1021/acs.est.6b01968
- Lee, Y., Jin, Y., Lim, W., Ji, S., Choi, S., Jang, S., Lee, S., 2003. A ginsenoside-Rh1, a component of ginseng saponin, activates estrogen receptor in human breast carcinoma MCF-7 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84, 463–468.
- Matthews, J., Celius, T., Halgren, R., Zacharewski, T., 2000. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 223–234. doi:10.1016/S0960-0760(00)00126-6
- Matthews, J., Gustafsson, J.-Å., 2006. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl. Recept. Signal.* 4. doi:10.1621/nrs.04016
- Miranda, C.L., Collodi, P., Zhao, X., Barnes, D.W., Buhler, D.R., 1993. Regulation of Cytochrome P450 Expression in a Novel Liver Cell Line from Zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Arch. Biochem. Biophys.* 305, 320–327. doi:10.1006/abbi.1993.1429

- Mortensen, A.S., Arukwe, A., 2008. Estrogenic effect of dioxin-like aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonist (PCB congener 126) in salmon hepatocytes. *Mar. Environ. Res.* 66, 119–120. doi:10.1016/j.marenvres.2008.02.041
- Mortensen, A.S., Arukwe, A., 2007. Interactions Between Estrogen- and Ah-Receptor Signalling Pathways in Primary Culture of Salmon Hepatocytes Exposed to Nonylphenol and 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (Congener 77). *Comp. Hepatol.* 6, 2. doi:10.1186/1476-5926-6-2
- Mortensen, A.S., Tolfsen, C.C., Arukwe, A., 2006. Gene Expression Patterns in Estrogen (Nonylphenol) and Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists (PCB-77) Interaction Using Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Primary Hepatocyte Culture. *J. Toxicol. Environ. Health A* 69, 1–19. doi:10.1080/15287390500257792
- Navas, J.M., Segner, H., 2000a. Antiestrogenicity of beta-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquat. Toxicol.* 51, 79–92. doi:10.1016/S0166-445X(00)00100-4
- Navas, J.M., Segner, H., 2000b. Modulation of trout 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity by estradiol and octylphenol. *Mar. Environ. Res.* 50, 157–162.
- Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2013. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 15–24. doi:10.1016/j.ygcen.2013.03.032
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S., 2003. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545–550. doi:10.1038/nature01606
- Rüegg, J., Swedenborg, E., Wahlström, D., Escande, A., Balaguer, P., Pettersson, K., Pongratz, I., 2008. The transcription factor aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator functions as an estrogen receptor beta-selective coactivator, and its recruitment to alternative pathways mediates antiestrogenic effects of dioxin. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 22, 304–316. doi:10.1210/me.2007-0128
- Safe, S., Wormke, M., Samudio, I., 2000. Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 295–306.
- Smeets, J.M.W., Rankouhi, T.R., Nichols, K.M., Komen, H., Kaminski, N.E., Giesy, J.P., van den Berg, M., 1999. *In vitro* Vitellogenin Production by Carp (*Cyprinus carpio*) Hepatocytes as a Screening Method for Determining (Anti)Estrogenic Activity of Xenobiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157, 68–76. doi:10.1006/taap.1999.8663
- Sonavane, M., Creusot, N., Maillot-Maréchal, E., Péry, A., Brion, F., Aït-Aïssa, S., 2016. Zebrafish-based reporter gene assays reveal different estrogenic activities in river waters compared to a conventional human-derived assay. *Sci. Total Environ.* 550, 934–939. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.187
- Tong, S.-K., Mouriec, K., Kuo, M.-W., Pellegrini, E., Gueguen, M.-M., Brion, F., Kah, O., Chung, B., 2009. A cyp19a1b-GFP (Aromatase B) Transgenic Zebrafish Line That Expresses GFP in Radial Glial Cells. *Genesis* 47, 67–73. doi:10.1002/dvg.20459

- Wentworth, J.N., Buzzeo, R., Pollenz, R.S., 2004. Functional characterization of aryl hydrocarbon receptor (zfAHR2) localization and degradation in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem. Pharmacol.* 67, 1363–1372. doi:10.1016/j.bcp.2003.12.002
- Wihlen, B., Ahmed, S., Inzunza, J., Matthews, J., 2009. Estrogen Receptor Subtype- and Promoter-Specific Modulation of Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Transcription. *Mol. Cancer Res.* 7, 977–986. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0396
- Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R., Safe, S., 2003. The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor α through activation of proteasomes. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1843–1855. doi:10.1128/MCB.23.6.1843-1855.2003

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table SI 1. PCR primer-pair sequences of targeted genes.

	GENE	PRIMER F (5' – 3')	PRIMER R (5' – 3')	REF.
Housekeeping genes	<i>β-actin</i>	AAGTGCACGTGGACA	GTTTAGGTTGGTCGTTTCGTTTGA	(Gentes <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Ef1α</i>	GGGAAAGGAAAAGACCCACA	CGCTCGGCCTTCAGTT	(Gentes <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Rpl13α</i>	ACCCTTCCCGTGGATCA	GTGGGTTTCAGACGCACA	(Gentes <i>et al.</i> , 2015)
MELN	<i>pS2</i>	GCGAAGCTTGCCACCATGGAGAA CAAGG	GCGGATCCACGAACGGTGTCTGTCG AA	(Lee <i>et al.</i> , 2003)
	<i>ahr</i>	CATGCTTTGGTCTTTTATGC	TTCCCTTTCTTTTCTGTCC	(Iwanari <i>et al.</i> , 2002)
	<i>cyp1a1</i>	TCTTTCTTCTCCTGGCTATC	CTGTCTTCCCTTCACTCT	(Iwanari <i>et al.</i> , 2002)
Zebrafish	<i>vtg1</i>	CATCTTATGCTGGTGATTTGTCA	CTTGAGCTTGAACCTGAACCTGA	Eide <i>et al.</i> , 2014
	<i>vtg2</i>	GGTGACTGGAAGATCCAAG	TCATGCGGCATTGGCTGG	Eide <i>et al.</i> , 2014
	<i>vtg3</i>	TTAGAACCAGCAAAGGATGC	CATCTTTTTCTCCTTAAATAC	Eide <i>et al.</i> , 2014
	<i>vtg4</i>	GAGAGACTGCCAAAAATTGCCT	GGAGAGAAAATCCTTATCAATGGT G	Eide <i>et al.</i> , 2014
	<i>vtg5</i>	CCAAAAATTGTCACCACTTATGCT	CTTCATTCTCCATGATATGCTTA	Eide <i>et al.</i> , 2014
	<i>vtg7</i>	CCATCTCAGAAGTCCTTTG	CAAACATTCTTGAAAAATGAAGA TA	Eide <i>et al.</i> , 2014
	<i>cyp19a1b</i>	ACTAAGCAAGTCTCCGCTGTGTA CC	TTTAAACATACCTATGCATTGCAGA CC	
	<i>cyp1a</i>	GCATTACGATACGTTTCGATAAGGA C	GCTCCGAATAGGTCATTGACGAT	Eide <i>et al.</i> , 2014
	<i>ahr2</i>	TATCGACACAAGAGGGAAGG	TGAAGACGGTTAATCCACTC	Eide <i>et al.</i> , 2014

Fig. SI1: Influence of TCDD on E2-induced *vtg1-5* and *vtg7* gene expression in ZELH α (A, B) and ZELH β 2 (C, D) cells at 24h and 72h of exposure. Data represent the mean \pm SD of 4 to 5 replicates. (*) denotes a statistical difference between E2 (dark grey) and E2+TCDD (light grey). ND: low/not detected levels

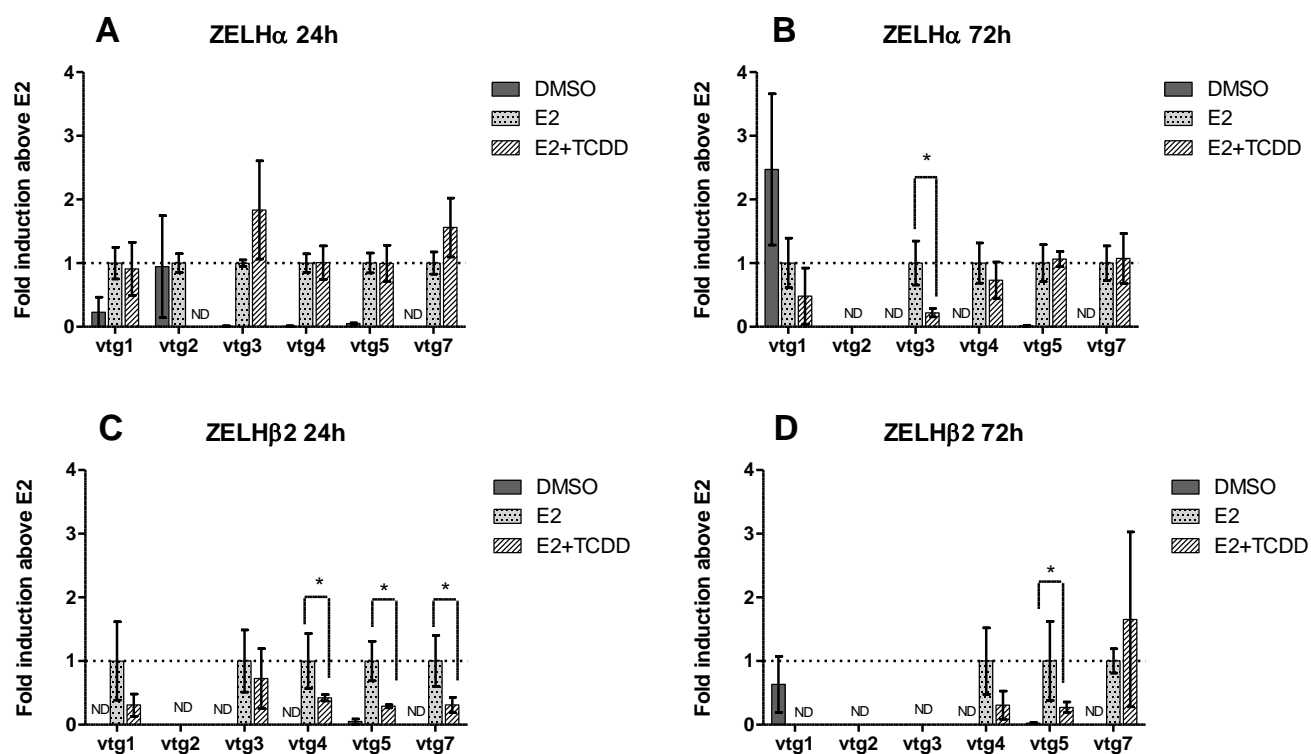


Fig. SI2: Role of AhR in TCDD inhibition of E2-induced *vtg3* mRNA in ZELH α cells (A) and on *vtg5* mRNA in ZELH β 2 cells (B) at 24h of exposure. Box plots (whiskers: 2.5 to 97.5 percentile) represent 4 to 5 replicates, ND: not detected. Different letters denote a statistical difference between two groups (Mann-Whitney, $\alpha=5\%$).

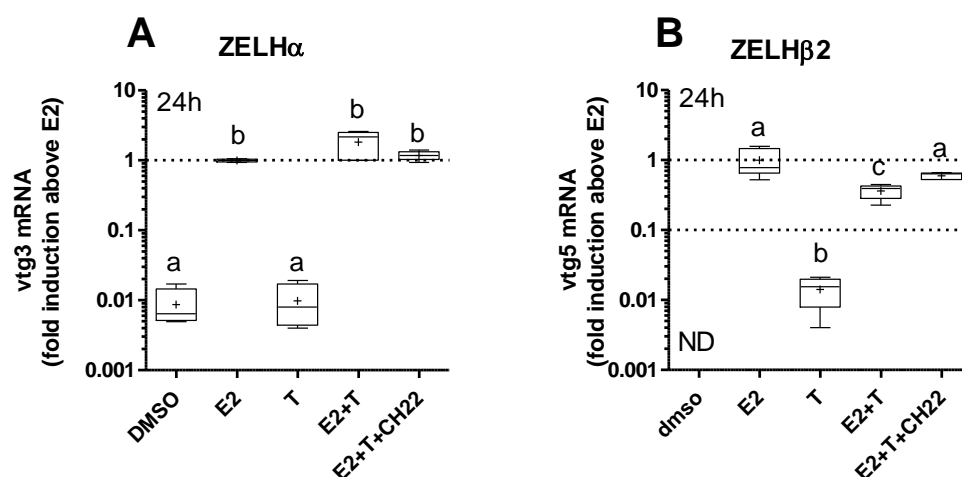


Fig. SI3: Role of ER in TCDD effect on ER response in MELN (A, B), ZELH α (C), and ZELH β 2 cells (D, E, F). Effect of E2 and TCDD in presence of AhR partial agonist α -naphthoflavone (10 μ M) on mRNA levels of *ps2* in MELN cells (A), and *vtg5* in ZELH β 2 cells at 24h (B) and 72h (C). Box plots (whiskers: 2.5 to 97.5 percentile) represent 4 to 5 replicates. Different letters denote a statistical significant difference between two group (Mann-Whitney, $\alpha=5\%$). ND: not detected.

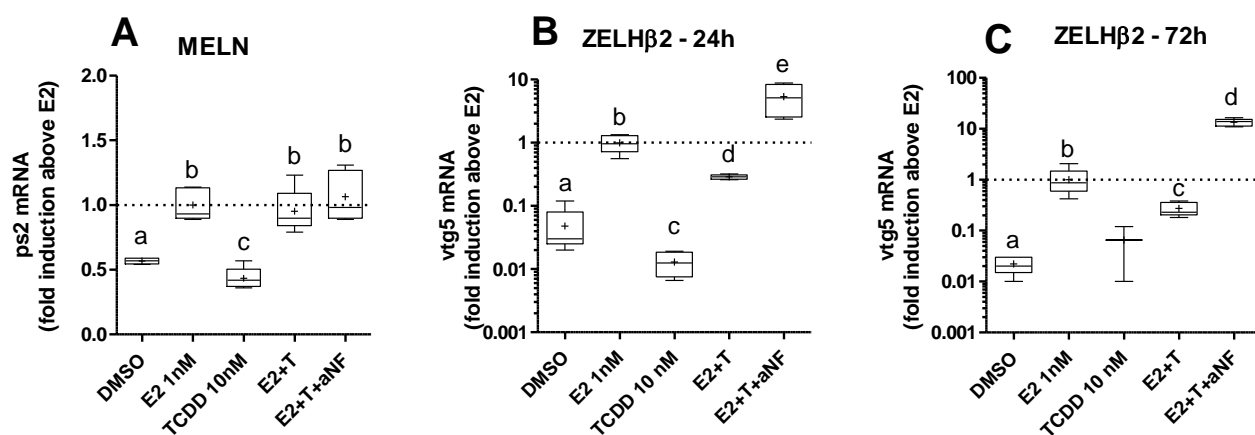


Fig. S14: Role of ER in E2 and TCDD interaction on *cyp1a* and *ahr2* gene expression at 24h in ZELH α (A, C) and ZELH β 2 cells (B, D). Cells were exposed to E2, TCDD, E2+TCDD, and E2+TCDD with ICI. Box plots (whiskers: 2.5 to 97.5 percentile) represent 4 to 5 replicates, different letters denote a statistical significant difference between two groups (Mann-Whitney, $\alpha=5\%$). (*) indicates n<4, no statistical analysis was performed.

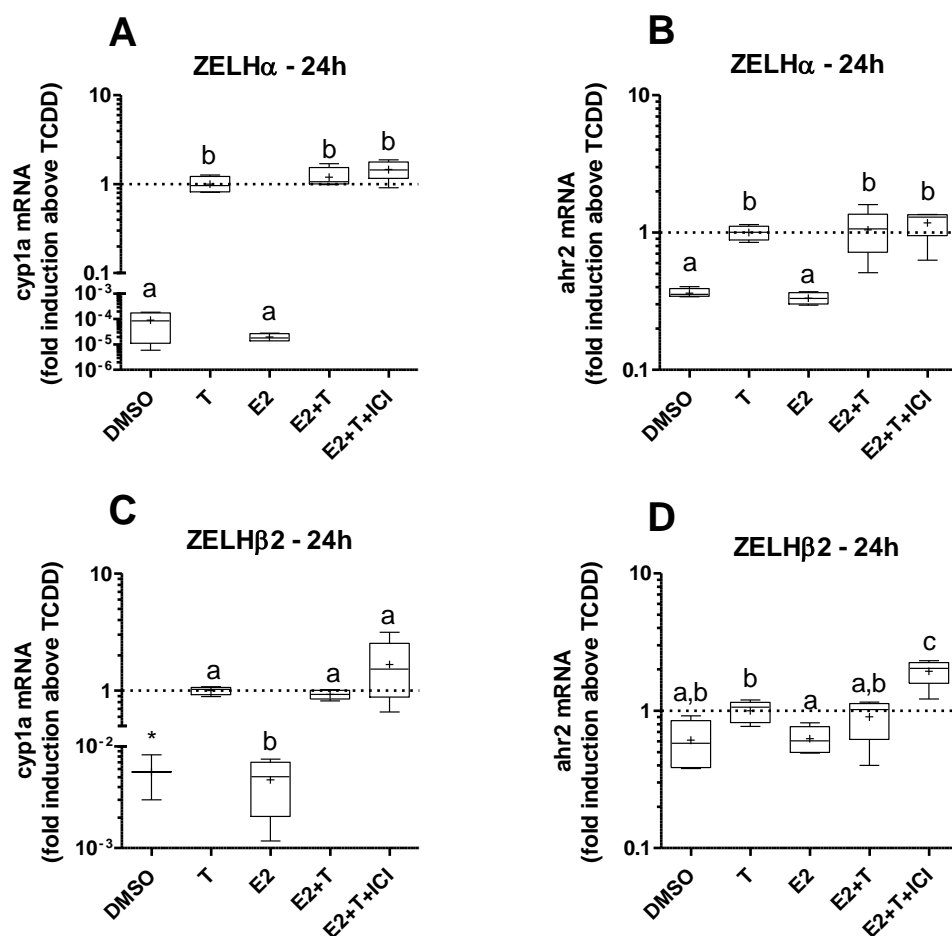


Fig. S15: Effect of E2 on TCDD response in ZELH cells. EROD activity (A), *cyp1a* mRNA at 24h (B) and 72h (C) of exposure, and *ahr2* mRNA at 24h (D) and 72h (E) of exposure. Box plots (whiskers: 2.5 to 97.5 percentile) represent 4 to 5 replicates, different letters denote a statistical significant difference between two groups (Mann-Whitney, $\alpha=5\%$). ND: not detected.

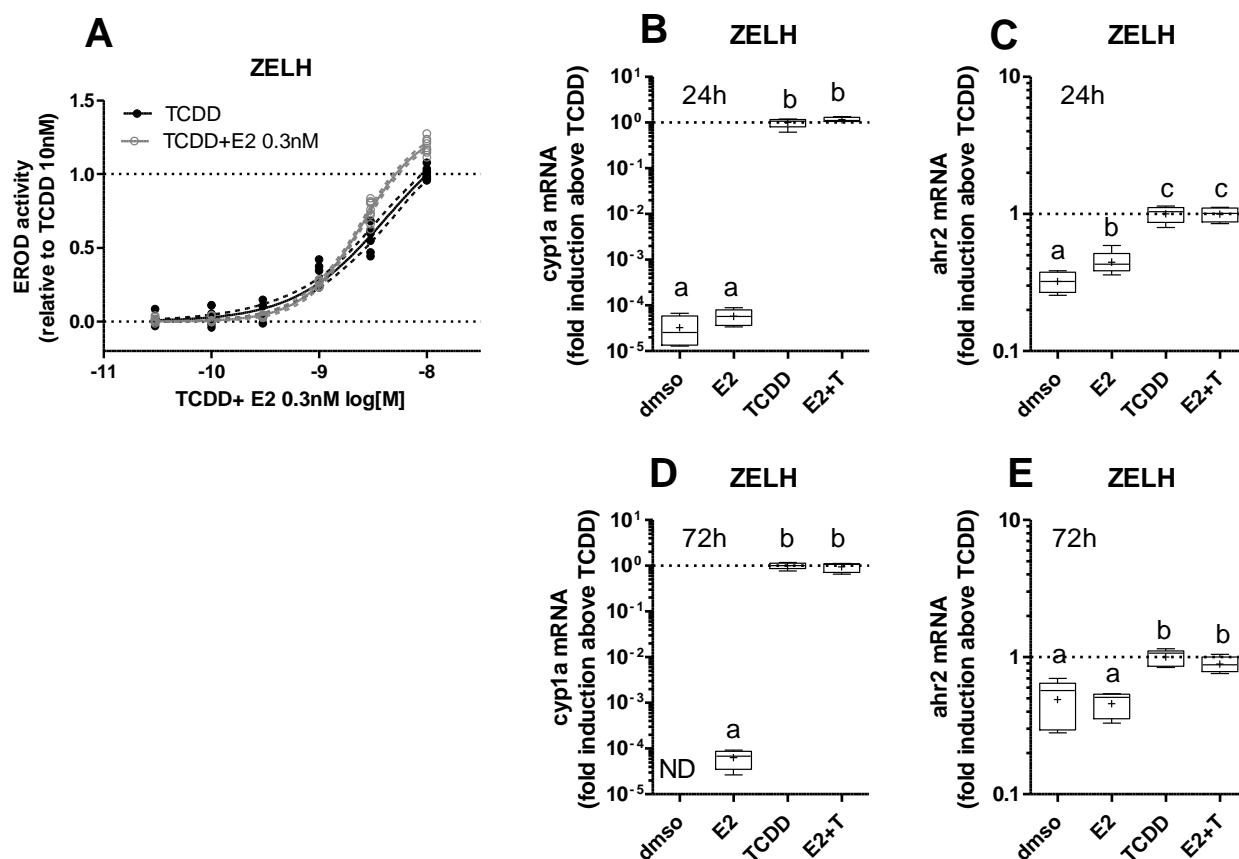
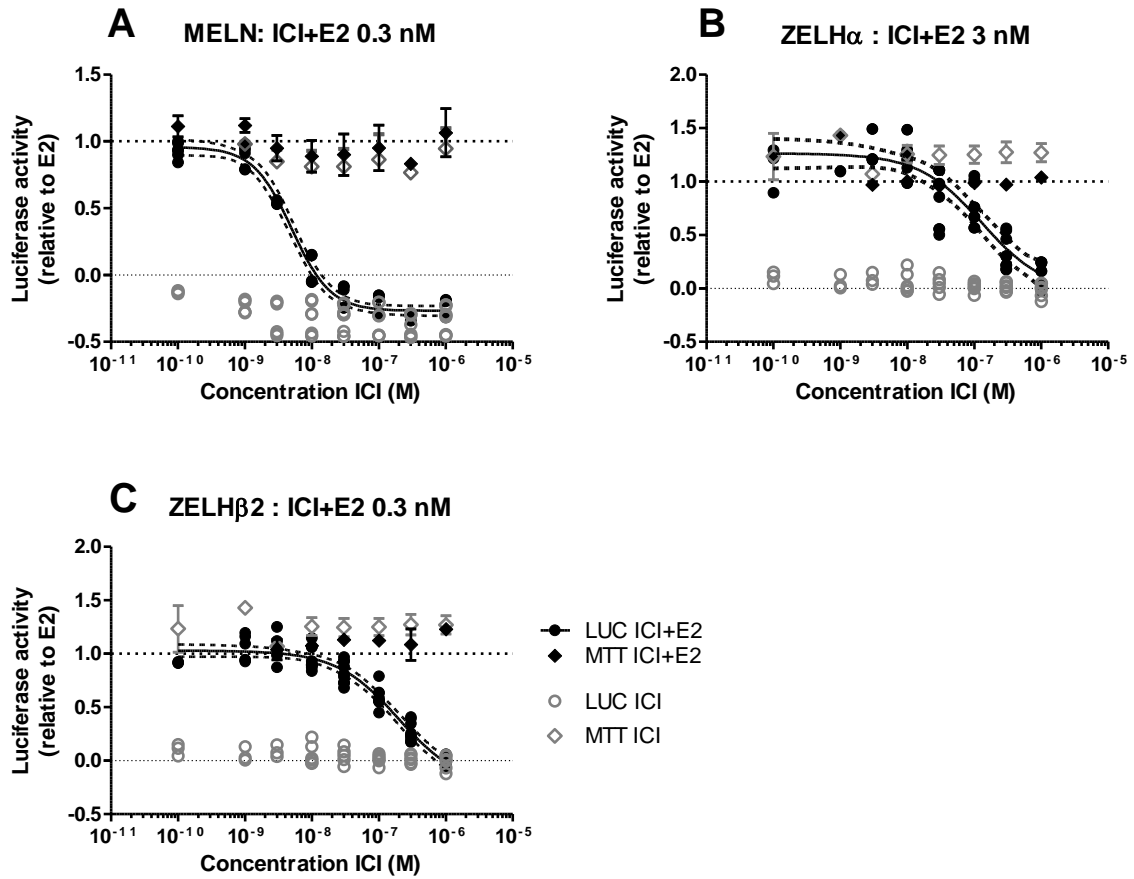


Fig. SI6: Inhibition of E2-induced luciferase activity by ICI in MELN, ZELH α and ZELH β 2 cells. Circles represent the luciferase activity induced by ICI alone (grey empty circle) or ICI+E2 (full black circles). Diamonds represent the cell viability results for ICI alone (grey empty diamond) or ICI+E2 (full black diamonds).



2. Article n°5: “*Different responses of in vitro zebrafish- and human-based estrogenicity bioassays to selected environmental contaminants and their mixtures*”

2.1 Contexte et objectifs

Dans l’environnement, les xeno-estrogènes sont présent sous forme de mélanges avec de nombreux autres composés. Alors que les effets additifs des estrogènes ont été principalement étudiés dans des situations peu représentatives d’une situation environnementale (ex : mélanges équipotents), une autre approche a été appliquée dans le cadre du projet européen SOLUTIONS. Dans le cadre de l’évaluation des bio-essais, deux mélanges de 12 polluants environnementaux ont été définis dans le but de montrer la capacité des bio-essais à détecter les effets additifs des molécules actives au sein de mélanges de molécules inactives (Altenburger *et al.*, in prep). Chaque mélange comportait les mêmes 12 molécules mais avec des ratios fixes différents. Une introduction à la démarche de l’étude est présentée en annexe I.

Dans le cas de l’activité estrogénique, l’objectif de cette étude était de comparer la capacité des bio-essais *in vitro* MELN et ZELH-zfERs à détecter les effets combinés du bisphénol A et de la génistéine au sein d’un mélange de polluants environnementaux. L’activité estrogénique et anti-estrogénique a été évaluée pour chaque mélange afin de tenir compte d’une interaction possible sur la réponse oestrogénique. Le modèle de concentration addition (CA) a été utilisé afin de prédire et d’évaluer les effets additifs des molécules actives ensemble et au sein des mélanges de 12 composés.

2.2 Principaux résultats

En combinaison binaire avec les mêmes ratios que dans les deux mélanges, le bisphénol A et la génistéine ont des effets additifs dans tous les modèles. Au sein des mélanges de 12 polluants, les effets combinés des xeno-estrogènes sont bien détectés dans les MELN. Dans les ZELH β 2, aucune activité estrogénique n’est détectée pour le mélange 1, bien qu’attendue, et une activité plus faible qu’attendue est mesurée pour le mélange 2. Dans les deux cas, une forte inhibition de

l'activité induite par la luciférase était observée, bien prédites par les molécules inhibitrices identifiées (TPP, chlorophene, propiconazole).

Afin de mettre en évidence l'effet des molécules inhibitrices, les cellules ZELH α et ZELH β 2 ont été exposées aux bisphenol A et à la génisteine en présence des inhibiteurs identifiés (mélange de 4 à 5 composés). Le résultat de cette évaluation montre que les molécules inhibitrices sont bien responsables de la déviation de l'activité estrogénique attendue dans les ZELH β 2, et dans une moindre mesure dans les ZELH α .

2.3 Conclusion

- Le bisphenol A et la génisteine ont des effets additifs dans les ZELH-zfERs
- Les MELN détectent bien les effets additifs des xeno-estrogènes au sein des mélanges reconstitués
- En mélanges, les molécules inhibant spécifiquement l'activité induite de la luciférase peuvent moduler négativement la réponse estrogénique aux xeno-estrogènes dans les ZELH-zfERs

ARTICLE n°5

Different responses of *in vitro* zebrafish- and human-based estrogenicity bioassays to selected environmental contaminants and their mixtures

Hélène Serra^{1,2}, Martin Scholze³, Rolf Altenburger⁴, Wibke Busch⁴, Hélène Budzinski², François Brion¹, Selim Aït-Aïssa^{1,*}

¹Institut National de l'Environnement Industriel et des risques (INERIS), unité Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, 60550 Verneuil-en-Halatte, France

² UMR-CNRS EPOC/LPTC, Université de Bordeaux, Talence, France

³Brunel University London, Uxbridge, United Kingdom

⁴UFZ– Helmholtz Centre for Environmental Research, Leipzig, Germany

*Corresponding author

ABSTRACT

This study aimed to compare the ability of *in vitro* zebrafish ZELH α and ZELH β 2 and human MELN ER reporter gene assays to detect combined effect of xeno-estrogens in mixtures. For that purpose, two fixed-ratio mixtures were designed with 12 environmentally relevant surface water pollutants covering diverse modes of action, including bisphenol A and genistein as ER agonist. Bisphenol A and genistein had additive effects in all cell models, well predicted by CA model. When replaced in a context of multiple contaminants within the 12-component mixtures, we observed a higher influence of non-estrogenic chemicals in ZELH-zfERs cells, which interacted negatively with zfER activation and decreased the expected response. This study shows that the same set of xeno-estrogens within an environmental relevant mixture can results in different mixture effects, highlighting the need to consider bioassay specificities (e.g. fish vs human ER, cell context) in environmental bio-monitoring.

KEY WORDS: Estrogenicity, mixtures, *in vitro*, human, zebrafish

INTRODUCTION

The contamination of the aquatic environment by endocrine disrupting chemicals (EDC), in particular by xeno-estrogens (XE), has become a major concern because of their capacity to adversely affect wild organisms, such as fish (Sumpter, 2005). Estrogenic chemicals mediate their effects by the estrogen receptor (ER) through a well conserved mode of action among vertebrates (Nelson and Habibi, 2013). Activated ER binds specific DNA sequence and regulates the transcription of target genes involved in physiological processes such as growth, development and reproduction (Segner *et al.*, 2013). A wide range of estrogenic chemicals such as alkylphenols, bisphenols, phytoestrogens or natural and synthetic hormones were identified in river waters (Jarošová *et al.*, 2015; Kolpin *et al.*, 2002; Loos *et al.*, 2009). In order to complement target chemical analysis, *in vitro* bioassays, such as reporter gene assays, are suggested as valuable tools for xeno-estrogens monitoring in environmental matrices as they were shown to be rapid and sensitive to quantify estrogenic activity of (unknown) active chemicals within complex mixtures such as urban effluents and surface water (Conley *et al.*, 2017; Neale *et al.*, 2015).

To date, most of *in vitro* bioassays used in bio-monitoring are reporter gene assays based on human ER α (hER α) activation expressed in mammalian or yeast cells (Kunz *et al.*, 2015, Leusch *et al.*, 2017). Compared to human that have 2 ER subtypes (ER α and ER β), most teleost fish express ER α and 2 ER β subtypes, i.e. ER β 1 and ER β 2, originating from an ancient whole genome duplication event (Hoegg *et al.*, 2004; Tohyama *et al.*, 2016). Studies comparing fish and human ERs transactivation *in vitro* showed differences in sensitivity and selectivity between ER-subtype and species to known xeno-estrogens (Cosnefroy *et al.*, 2012; Molina-Molina *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2014). Changes in key amino acids in ER ligand binding domain are believed to be responsible for the different affinity of fish and human ER (Hawkins and Thomas, 2004; Matthews *et al.*, 2000). Furthermore, ER response can be influenced by the cell context, such as ER- and cell-specific transcription co-factors recruitment (McDonnell and Norris, 2002) or metabolism (Le Fol *et al.*, 2015). The few studies using fish-based *in vitro* reporter gene assays in bio-monitoring showed that, in some cases, they can respond differently qualitatively and quantitatively than human-based bioassays to water and effluent samples (Sonavane *et al.*, 2016, Ihara *et al.*, 2014, Rutischauer *et al.*, 2004). For instance, using the recently developed ZELH β 2 *in vitro* bioassay, we reported that some surface water extracts were active on ZELH β 2 cells but lacked estrogenic

activity in human-based cells (Sonavane *et al.*, 2016). These results suggest that cross-species differences and bioassays specific factors (e.g. cell context) may affect the quantification of xeno-estrogens in complex mixtures.

The model of concentration addition (CA, Loewe et Muischnek, 1926), which assumes that chemicals sharing similar mode of action have additive effect, has been shown to predict well the combined action of xeno-estrogens mixtures in *in vitro* mammalian (Ghisari and Bonefeld-Jorgensen, 2009; Rajapakse *et al.*, 2004; Scholze *et al.*, 2014; Seeger *et al.*, 2016) and fish systems (Petersen and Tollefsen, 2011; Hinfrey *et al.*, 2016; Le Page *et al.*, 2006). However, in certain scenarios, deviations from CA prediction are observed (Evans *et al.*, 2012; Frische *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2011). Different hypotheses have been formulated such as an increased metabolism of xeno-estrogens (Silva *et al.*, 2011, Petersen and Tollefsen, 2011), modulating effects by chemicals having minimal to no estrogenic activity (Evans *et al.*, 2012) or interactions with toxic chemicals (Frische *et al.*, 2009). In the case of environmental contamination, xeno-estrogens co-occur with many other chemicals with diverse mode of action (Busch *et al.*, 2016; Loos *et al.*, 2009; Neale *et al.*, 2015), which might interfere with ER response in a given bioassay through multiple ways such as cytotoxicity or activation of other intracellular signaling pathways. Given the complexity of environmental contamination, there is a need to better understand the response of fish and human-based bioassays to xeno-estrogens within mixtures of chemicals representative of aquatic contamination.

In this context, our study aimed to assess the ability of zebrafish and human-based *in vitro* reporter gene assays to detect combined activity of xeno-estrogens within a mixture of environmentally relevant surface water pollutants. As part of a bioassay benchmarking exercise (Altenburger *et al.*, in prep), two fixed-ratio mixtures of 12 chemicals with dissimilar mode of actions were designed (Tab. 1), in which genistein, a phytoestrogen, and bisphenol A were selected as environmental xeno-estrogens. For each chemical and mixture, both estrogenic and anti-estrogenic activities were assessed in parallel in zebrafish (ZELH α and ZELH β 2 cells) and human-based (MELN cells) bioassays to account for possible negative modulation on ER response. Concentration Addition (CA) model (Loewe et Muischnek, 1926) and extended CA model (Scholze *et al.*, 2014) were applied to predict and assess the combined effects of xeno-estrogens.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and reagents

17 β -estradiol (E2), triclosan (TCS) were purchased from Sigma-Aldrich (France). Bisphenol A (BPA), Genistein, propiconazole, diclofenac, diazinon, diuron, cyprodinil, triphenylphosphate (TPP), benzo(a)pyrene (BaP), benzo(b)fluoranthene (BbF), chlorophene, hydroxy-tamoxifen (OH-TAM). Dimethylsulfoxide (DMSO), Leibovitz 15 culture medium (L-15), fetal calf serum (FCS), 4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), epidermal growth factor (EGF), G418, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) and D-luciferin were purchased from Sigma Aldrich (St-Quentin Fallavier, France); Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM HG) powder, F-12 nutrient mixture (Ham's F12) powder, penicillin and streptomycin were from Gibco (France); insulin, hygromycin B and sodium bicarbonate were from Dominique Dutscher (France).

In vitro bioassays

Cell culture, luciferase and cell viability assays

The zebrafish *in vitro* assays were derived from the zebrafish liver (ZFL) cell line. ZFL were stably transfected, first, with an ERE-driven firefly luciferase gene, yielding the ZELH cell line, and then with zfER α subtype, yielding the ZELH-zfER α , or with zfER β 2 subtype yielding the ZELH β 2 cell lines (Cosnefroy *et al.*, 2012). Establishment of these cell models and their response to different classes of well-known xeno-estrogens have been previously described (Cosnefroy *et al.*, 2012, Sonavane *et al.*, 2016). In addition, the ZELH cell line was used as ER-negative control for non-specific luciferase modulation. The human-derived MELN cell line (Balaguer *et al.*, 1999) kindly provided by Dr. Patrick Balaguer (INSERM Montpellier, France) was used to compare the fish cells with an established mammalian cell model. The MELN cells are derived from the breast cancer MCF-7 cells, which endogenously express the hER α , but no functional hER β (P. Balaguer, *personal communication*), and were stably transfected with an ERE-driven firefly luciferase reporter gene.

Conditions for routine cell culture have been detailed previously (Balaguer *et al.*, 1999, Cosnefroy *et al.*, 2012). For exposure experiments, ZELH-derived cells were seeded in 96-well white opaque culture plates (Greiner CellStar™, Dutscher, France) at 25,000 cells per well in phenol red free LDF-DCC medium (containing L-15 50%, DMEM HG 35%, Ham's F12 15%, HEPES

15 mM, 0.15 g/L sodium bicarbonate, 0.01 mg/mL insulin, 50 ng/mL EGF, 50 U/mL penicillin and streptomycin antibiotics, 5% v/v stripped FCS). MELN were seeded at 80,000 cells per well in steroid-free DMEM medium. Cells were left to adhere for 24 h. Then, they were exposed in triplicates to serial dilutions of test compound for either 72 h at 28 °C for zebrafish cells or 16h at 37°C for MELN cells. Each plate included both solvent and positive controls. After exposure, culture medium was removed and replaced by 50 µl per well of medium containing 0.3 mM luciferin. The luminescence signal was measured in living cells using a microtiter plate luminometer (Synergy H4, BioTek). The effect of test chemicals on cell viability was assessed by using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay (Mosmann 1983). After cell exposure, culture medium was removed and replaced by 100 µL of medium containing 0.5 mg/mL MTT. Cells were incubated for 1 h to 3 h. In metabolically active cells, MTT is reduced onto a blue formazan precipitate, which is dissolved by adding 100 µL of DMSO after removal of MTT containing medium. Plates were read at 570 nm against a 640nm reference wavelength on a microplate reader (KC-4, BioTek Instruments, France) and results are expressed as absorbance relative to control cells.

***In vitro* testing of single chemicals and mixtures**

The mixture compositions are given in Tab. 1. Single chemical and 2-,3- and 5-component mixtures testing were done in DMSO and respecting a maximal solvent concentration of 0,1% v/v or 0,15% v/v (in case of co-exposure with E2). The 12-component mixtures were received already prepared in methanol (as part of a round robin test on bioassays, Altenburger *et al.*, in prep). M1 and M2 were tested with a maximal solvent concentration of 0,1% or 0,15% (in co-exposure with E2) which correspond to a maximal concentration of 124 µM of M1, and 15.1 µM of M2. The response of MELN cells to TPP and BPA in DMSO and in methanol were similar (data not shown), thus, no significant effect of the solvent is expected. Stock solutions in DMSO and methanol were stable at 4°C for up to 3 months.

Table 1: Concentrations (in M) of the 12 chemicals in M1 and M2 at the highest concentration tested in vitro and their respective proportions.

	Mixture 1 (M1)		Mixture 2 (M2)	
	Concentration (M)	proportion	Concentration (M)	proportion
BaP	6,00E-08	0,05%	9,47E-09	0,06%
BbF	1,00E-07	0,08%	9,51E-09	0,06%
BPA	7,00E-07	0,58%	4,17E-06	27,70%
Chlorophene	9,00E-06	7,50%	6,40E-06	42,51%
Cyprodinil	1,00E-06	0,83%	1,87E-07	1,24%
Diazinon	6,00E-09	0,00%	1,96E-08	0,13%
Diclofenac	3,00E-05	24,99%	2,90E-06	19,26%
Diuron	6,00E-07	0,50%	2,08E-07	1,38%
Genistein	1,00E-07	0,08%	4,47E-07	2,97%
Propiconazole	6,00E-05	49,97%	8,48E-08	0,56%
TPP	1,50E-05	12,49%	2,32E-07	1,54%
Triclosan	3,50E-06	2,92%	3,89E-07	2,58%
[mixture]	1.2E-4	100%	1.51E-5	100%

Data analysis

Single chemical testing

For all single compound responses, luciferase activity was normalized between 0 and 1, as described in Eq. 1, where $signal_{chemical}$ is the signal of the tested chemical, $signal_{control}$ is the signal of the solvent control and $signal_{E2}$ is the signal of the maximal response of E2 positive control:

$$Effect = \frac{signal_{chemical} - signal_{control}}{signal_{E2} - signal_{control}} \quad (1)$$

Concentration-response curves were fitted to all replicates pooled together with a minimum of 2 independent experiments. Single chemical data were analyzed by fitting Hill Equation to describe their effects. A 3-parameter Hill equation model (RegTox 7.5 Microsoft Excel™ macro freely available at http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_download.html) was used to estimate the EC20/IC20 and EC50/IC50, the slope and the maximal effect of each active substance. For activating chemicals not reaching a plateau level, the maximal effect was fixed to

1, and a positive control value (PC20 and PC50) was derived instead of an EC value. For inhibiting chemicals, hydroxy-tamoxifen (OH-TAM) was used as a control. For inhibiting chemicals not reaching a plateau level, the maximal effect was fixed to 0.

Mixture prediction based on CA model

For mixture prediction, single data were fitted with log-logistic function (logit). CA model was used to predict the additive effects of activating and inhibiting chemicals separately, as described in Scholze *et al.* (2014) using eq. (2), with C_i chemical concentration i in the mixture, and EC_{xi} the response of the substance i at C_i :

$$\sum_{i=1}^n \left(\frac{C_i}{EC_{xi}} \right) = 1 \quad (2)$$

Estradiol-equivalent (E2-Eq) derivation

E2-Eq of the 12-component mixtures were calculated based on chemical information (E2-Eq predicted) and measured effects (E2-Eq observed). Hill equation was used to derive the EC20 of the mixture by fixing the minimum and the maximum of the response to 0 and 1, respectively, and fixing the slope to the one of E2. The E2-Eq observed was calculated as the ratio of EC20 of E2 to the EC20 of the mixture, and expressed in mol/L. The E2-Eq predicted was calculated as the ratio of EC20 of E2 to the predicted EC20 of the mixture based on CA prediction, and expressed in mol/L.

RESULTS

Activation and inhibition of ER response by single chemicals

The experimental parameters of ER activation by single chemicals on MELN, ZELH α and ZELH β 2 cells are presented in Tab. 2. All individual concentration-response data, including E2, are provided in supp. materials (Fig. SI 1). The phytoestrogen genistein and BPA were the most potent XE, but with different sensitivity and efficacy depending on the cell lines. MELN cells were the most responsive cells to BPA (EC50=0.32 μ M, maximal effect of 86% of E2 response), while ZELH α and ZELH β 2 cells showed similar sensitivity with an EC50 of 2.8 μ M and 1 μ M, respectively, and a maximum induction around 30 % of E2 response (Tab. 2). In case of genistein, MELN cells were

again the most responsive ($EC_{50}=0.052 \mu\text{M}$), followed by ZELH β 2 cells ($EC_{50}=0.16 \mu\text{M}$) and ZELH α cells ($EC_{50}=2.6 \mu\text{M}$). No other chemicals showed any estrogenic response up to $30 \mu\text{M}$ in the ZELH-zfERs cells, while TPP, BaP and diazinon induced ER activation in MELN cells with a PC20 of $2.0 \mu\text{M}$, $0.66 \mu\text{M}$ and $14 \mu\text{M}$, respectively.

Table 2: Parameters derived from Hill fitting curves for chemicals inducing ER activation in MELN, ZELH α and ZELH β 2 cell. (*) indicates that a PC20/PC50 instead of EC20/EC50 was derived.

		EC20 μM (95% CI)	EC50 μM (95% CI)	Max (95% CI)	slope
ZELH α	E2	1.3×10^{-4} (1.09×10^{-4} - 1.4×10^{-4})	4.03×10^{-4} (3.53×10^{-4} - 4.14×10^{-4})	1	1.24 (1.13 - 1.34)
	BPA	1.4 (0.87- 2.6)	2.8 (2.1 - 4.4)	0.26 (0.23 - 0.31)	2.1 (1.1 - 11)
	Genistein	0.4 * (0.29 - 0.47)	2.63 * (2.1 - 3.0)	0.77	0.77 (0.63 - 0.87)
ZELH β 2	E2	6.4×10^{-6} (4.87×10^{-6} - 7.15×10^{-6})	2.33×10^{-5} (1.90×10^{-5} - 2.35×10^{-5})	1	1.08 (0.97 - 1.22)
	BPA	0.38 (0.20 - 0.55)	1.02 (0.64 - 2.4)	0.32 (0.20-0.46)	1.4 (0.70 - 2.2)
	Genistein	0.017* (0.011- 0.024)	0.158 * (0.13 - 0.19)	0.75	0.62 (0.54 - 0.70)
MELN	E2	3.5×10^{-6} (2.7×10^{-6} - 4.17×10^{-6})	1.1×10^{-5} (9.4×10^{-6} - 1.2×10^{-5})	1	1.20 (1.09 - 1.37)
	BPA	0.087 (0.065- 0.12)	0.32 (0.26 - 0.43)	0.86 (0.79- 0.92)	1.1 (0.82- 1.4)
	Genistein	0.025*(0.016- 0.0033)	0.052 * (0.039-0.061)	1.06	1.9 (1.4 - 2.5)
	TPP	2.0 * (1.6 - 3.0)	-	0.48	1.0 (0.51- 0.81)
	BaP	0.66 * (0.62 - 1.1)	2.2 * (2.0 - 3.0)	0.54	1.2 (1.0 - 1.7)
	Diazinon	14.0 * (13.4 - 16.7)	-	0.33	0.94 (0.85 - 1.2)

To investigate the capacity of chemicals to decrease E2-induced response, the cells were exposed to each compound in the presence of E2 at a concentration saturating 80% of ER (i.e. 80%-100% of E2 maximal response). The ZELH cells were used additionally as a control for non-specific luciferase inhibition, and cytotoxicity was systematically measured in parallel. The experimental parameters of E2-inhibiting chemicals are presented in Tab. 3. All individual concentration-response data, including OH-TAM control, are provided in supp. materials (Fig. SI 2).

Table 3: Parameters derived from Hill fitting curves for chemicals inhibiting E2-induced luciferase activity in MELN, ZELH α , ZELH β 2 and ZELH cells.

		EC20 μ M (95% CI)	EC50 μ M (95% CI)	Min	Slope
ZELH α	OH-TAM	1.61x10 ⁻³ (1.13x10 ⁻³ – 2.72x10 ⁻³)	5.71 x10 ⁻³ (4.74x10 ⁻³ – 8.09x10 ⁻²)	0	1.09 (0.81-1.57)
	BPA	7.96 (3.5- 13.1)	-	0.62	1.196 (0.68-1.9)
	Propiconazole	4.38 (1.72- 12.4)	19.6 (1.72- 12.4)	0.51	0.920 (0.65- 2.33)
	TPP	0.717 (0.102 - 1.48)	1.62 (0.552- 2.4)	0.01	1.705 (0.8-3.17)
	BaP	0.0051 (0.0025- 0.013)	0.18 (0.13- 0.32)	0.27	0.391 (0.31-0.49)
	BbF	2.83 (1.52 - 3.08)	-	0.67	8.377 (0.94- 13)
	Chlorophene	6.49 (1.73 – 12.4)	18.8 (12- 20.9)	0.42	1.306 (0.65-2.35)
	Cyprodinil	1.78 (0.774 - 3.05)	5.50 (3.80- 7.59)	0.05	1.230 (0.84-1.93)
ZELH β 2	OH-TAM	1.92x10 ⁻³ (1.52x10 ⁻³ – 2.73x10 ⁻³)	6.3 x10 ⁻³ (5.53x10 ⁻³ – 8.02x10 ⁻³)	0	1.16 (1.48-0.93)
	BPA	5.15 (1.53 - 9.3)	21.3 (14.5-30.8)	0.51	0.976 (0.58-1.53)
	Propiconazole	5.21 (3.8 - 7.5)	10.5 (8.98- 12.5)	0.08	1.973 (1.47-3.37)
	TPP	0.69 (0.35- 1.12)	2.30 (1.67- 2.93)	0.2	1.150 (0.87- 1.51)
	BaP	1.25 (0.88-2.7)	2.32 (1.86-2.67)	0	2.23 (1.73-3.83)
	BbF	0.68 (0.18-1.4)	4.74 (2.77-6.99)	0.46	0.712 (0.47. 1.04)
	Chlorophene	3.9 (2.2-6.6)	10.2 (8.34-13.4)	0.58	1.429 (0.904-2.87)
Cyprodinil	5.5 (3.7-9.0)	9.59 (8.00-11)	0	2.503 (1.67-13.25)	
MELN	OH-TAM	6.43x10 ⁻³ (5.58x10 ⁻³ – 9.10x10 ⁻³)	9.82 x10 ⁻³ (9.06x10 ⁻³ – 1.02x10 ⁻²)	0	3.28 (2.69-14.6)
	Diclofenac	17.5 (9.9 - 27)	-	0.64	1.52 (0.71 - 5.38)
	Cyprodinil	4.63 (3.78 - 6.62)	8.25 (7.18 - 9.59)	0.06	2.40 (1.76 - 4.39)
ZELH	BbF	1.46 (0.68 - 2.38)	4.82 (3.41 - 9.25)	0.66	1.161 (0.60 - 2.34)
	Cyprodinil	3.80 (1.86 - 6.69)	9.18 (6.67 – 13.1)	0.22	1.570 (0.98 - 2.82)
	TPP	8.85 (6.45 – 11.6)	22.0 (18.3 – 26.6)	0.41	1.52 (1.12 - 2.03)
	Propiconazole	1.99 (0.085 - 5.4)	1.75E-05 (5.3 – 27.5)	0.44	0.64 (0.33 - 0.96)

The chemicals that decreased E2-induced response had distinct profiles depending on the bioassays. Overall, several inhibiting chemicals were identified, mainly in ZELH-zfERs cells. Some chemicals were suspected to be true antagonists as no effect on cell viability and ZELH cells were observed, such as TPP and BaP that induced a marked decrease in E2 response in ZELH α and

ZELHβ2 cells up to 10 μM. Conversely, BbF, propiconazole, and chlorophene decreased E2-induced luciferase activity by 40% to 90% in a non-specific manner in ZELH-zfERα, ZELHβ2 and in ZELH cells too. Cyprodinil decreased E2-induced luciferase activity across all the cell lines with similar sensitivity (Tab. 3, Fig. S13). BPA slightly decreased E2 response at high concentrations in ZELHβ2 cells without impacting cell viability. A similar tendency was observed for ZELHα cells.

Different effects of the 12-component mixtures in human and zebrafish-based bioassays

The composition of the 12-component mixtures is given in Tab. 1. While genistein/BPA concentration ratio is similar for both mixtures (1/7 in M1, 1/9 in M2), their proportion compared to the other chemicals is higher in M2 (30%) than in M1 (<1%). Based on single chemical data, CA model was applied to predict combined effects on ER activation or ER inhibition. The identified drivers of effect and their respective expected contributions to the mixture responses (toxic unit) are presented in Tab. 4.

Table 4: The predicted 3 most active chemicals identified based on CA for M1 and M2 concentrations in MELN, ZELHα and ZELHβ2 cell lines. Toxic Unit (TU) indicates of proportion of the effect predicted to be explained by each chemical at the maximal concentration tested in M1 and M2. ER activation: luciferase activation. ER inhibition: E2-induced luciferase inhibition.

	Mixture 1		Mixture 2	
	ER activation (TU, %)	ER inhibition (TU, %)	ER activation (TU, %)	ER inhibition (TU, %)
MELN	BPA (14) Genistein (84) TPP (2)	Diclofenac (86) Cyprodinil (13)	BPA (9) Genistein (90)	-
ZELHα	BPA (75) Genistein (25)	TPP (64) Propico (31) Chlorophene (5)	BPA (82) Genistein (18)	TPP (26) BaP (14) Chlorophene (54)
ZELHβ2	BPA (9) Genistein (91)	TPP (39) Propico (51) Chlorophene (7)	BPA (17) Genistein (83)	TPP (8) BPA (25) Chlorophene (63)

The estrogenic activity of M1 detected in MELN cells was in good agreement with the predicted estrogenic response based on CA (Fig. 1A). In comparison, no estrogenic activity was detected neither in ZELHα nor ZELHβ2 cells. The lack of ER response in ZELHα cells is in good agreement with CA prediction (Fig. 1B), however, in ZELHβ2 cells, a maximal effect of 30% was predicted by CA model (Fig. 1C). In comparison, an estrogenic activity was detected in all bioassays in response to M2. As for M1, the observed effect in MELN cells was in good agreement with CA

prediction (fig 1D). In ZELH α cells, the observed effect fitted CA prediction up to 20% (fig. 1E), while in ZELH β 2 cells, the response was lower than predicted (Fig. 1F). When co-exposed with E2, a strong inhibition of ER response was observed for both mixtures in ZELH α and ZELH β 2 cells, well predicted by the identified drivers of effects (Tab. 4). In addition, M1 but not M2 induced a decrease in luciferase activity in ZELH cells (fig. S14).

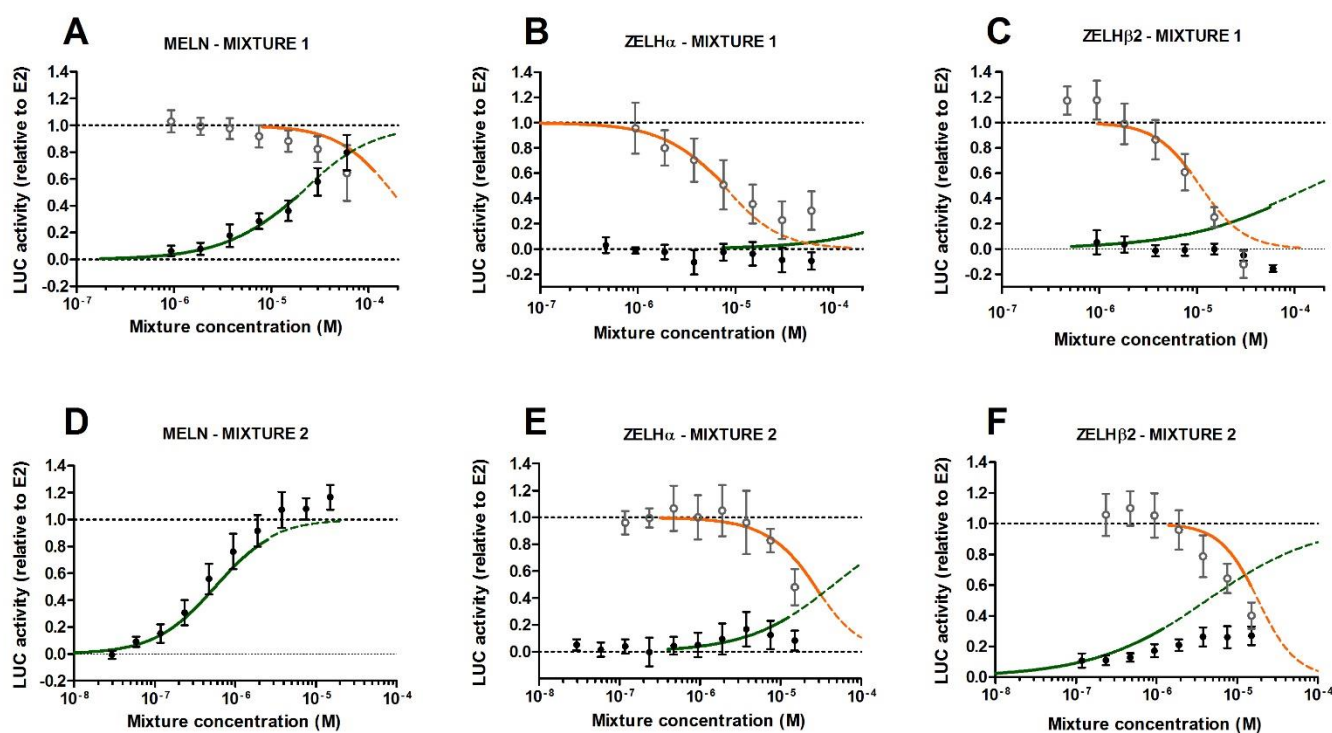


Figure 1: Predicted vs observed effects of M1 and M2 on MELN (A,D), ZELH α (B,E) and ZELH β 2 (C,F) cells. Mixture effects were predicted according to CA for ER activation (green line) or ER inhibition (orange line) based on identified active chemicals presented on each graph. The green dotted line represents CA prediction beyond CA validity limit. Measured effects for ER activation (black circles) and for E2-induced ER inhibition (co-exposure with E2 0,1 nM, grey open circles) are represented by the mean \pm SD from at least 2 independent experiments done in triplicates and pooled. Cytotoxic concentrations (measured by MTT) were removed.

Unravelling the mixture effects

As a marked deviation from CA prediction was observed for both mixtures in ZELH β 2 cells, and no previous study has investigated the additivity of xeno-estrogens in ZELH-zfERs cells, we tested the additive effects of BPA and genistein based on their respective mixture ratios. The fig. 2A and 2C show that BPA and genistein have additive effects in the range of concentration tested in M1 and M2 on ZELH β 2 cells. Also, a good agreement between observed and predicted responses was noted for the pooled inhibiting chemicals of M1 (TPP, propiconazole and chlorophene, Fig. 2A) and M2 (TPP, BPA and chlorophene, Fig. 2C). Then, to assess the impact of the inhibiting chemicals on ER response, BPA and genistein were pooled with the inhibiting chemicals of M1 or M2. The 5-component mixtures results show that a deviation from CA predicted and expected ER response was observed in ZELH β 2 cells (Fig. 2B and 2D), with a similar response pattern as the 12-component mixtures, confirming that the deviation from CA additivity was due to inhibiting chemicals.

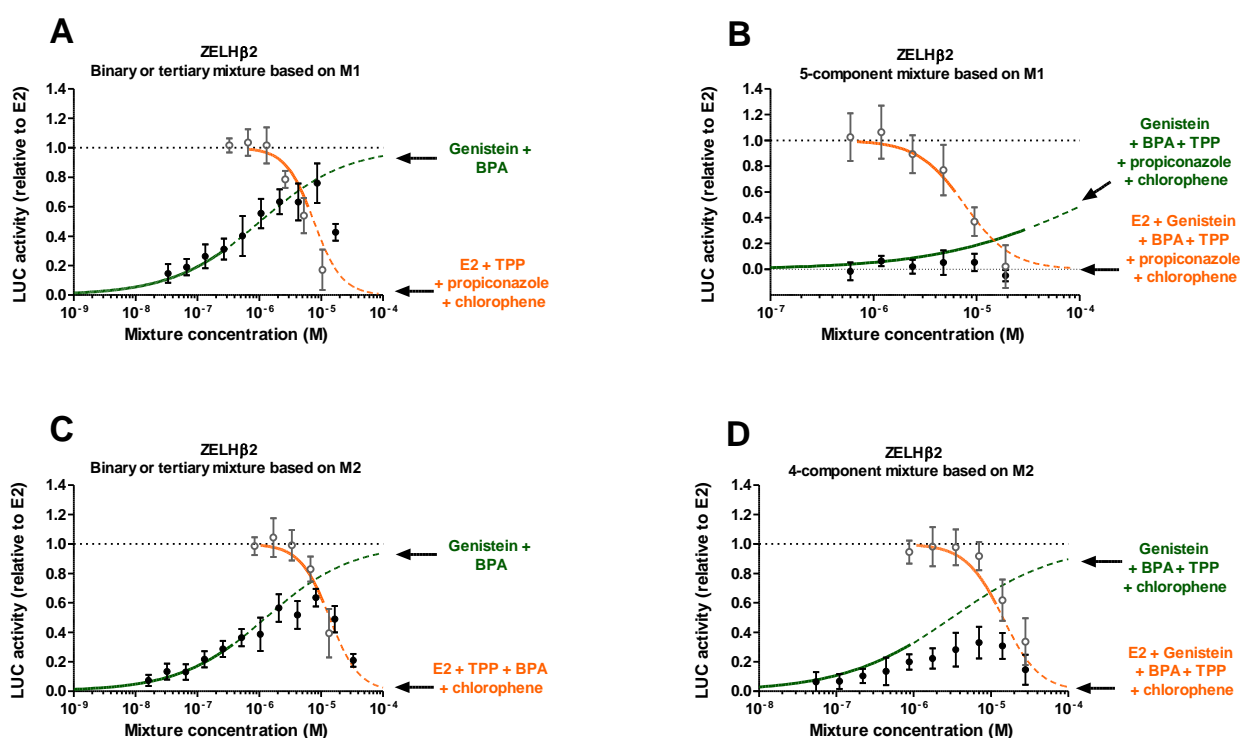


Figure 2: Predicted and observed effects of BPA, genistein and the identified drivers of inhibition on ZELH-zfER β 2 cells, tested either separately (A, C), pooled together (B,D) based on M1 (A,B) and M2 (C,D) ratios. The drivers of inhibition identified for each mixture are presented in Table 4. Mixture effects were predicted according to CA for activating (green line) or inhibiting (orange line) chemicals. The dotted lines represent CA prediction beyond CA validity limit. Measured effects for ER activation (black circles) and for E2-induced ER inhibition (co-exposure with E2 0.1 nM, grey open circles) are represented by the mean \pm SD from at least 2 independent experiments done in triplicates and pooled. Cytotoxic concentrations (measured by MTT) were removed.

The same approach was applied with the other cell lines. In MELN cells, the combined effect of BPA, genistein and TPP was well predicted by CA (Fig. SI5A), however CA prediction slightly overestimated the estrogenic response of the binary mixture of BPA and genistein (fig. SI 5C and 5D). In ZELH α cells, additive effects were well predicted by CA for BPA and genistein, as well as for inhibiting chemicals in M1 (TPP, propiconazole, chlorophene) and M2 (TPP, BaP, chlorophene) (Fig. SI6). When co-exposed with the inhibiting chemicals of M2, BPA+genistein expected ER maximal response was decreased from 60% to 40%, but negligible effects were observed at low concentrations (Fig. SI6).

Table 5: Observed vs CA predicted mixture effects and E2-Eq derivation for M1 and M2 in MELN, ZELH-zfER α , ZELH β 2 cell lines. Obs: observed, Pred: predicted, NE: no effect measured, (-) no effect predicted, ND: not derived.

		ER activation (μ M)		ER inhibition (μ M)		E2-Eq derivation (μ M)		
		EC20(Obs) (CI 95%)	EC20(pred)	IC20(Obs) (CI 95%)	IC20(pred)	E2-Eq (obs)	E2-Eq (pred)	Ratio E2-Eq obs/pred
M1	MELN	5.24 (4.35-5.18)	5.66	29.8 (24.5-36.6)	18.3	1.06	0.98	0.93
	ZELH α	NE	381	2.15 (1.41-3.13)	2.81	NE	0.20	ND
	ZELH β 2	NE	16.2	4.96 (4.56-6.49)	5.2	NE	0.28	ND
M2	MELN	0.18 (0.16-0.19)	0.17	NE	-	31.5	33	1.05
	ZELH α	4.23 (3.0-5.4)	8.48	8.30 (6.95-10.8)	9.88	18.4	9.2	0.5
	ZELH β 2	1.73 (1.26-1.67)	0.445	4.51 (4.29-6.44)	8.55	2.66	10	3.9

Detection of xeno-estrogens: E2-Eq derivation

As the 12-component mixtures were designed to mimic an environmental surface water sample, we compared predicted and observed estrogenic response in terms of E2-Eq. The observed and predicted mixture parameters for ER activation and inhibition are presented in Tab. 4, along with the predicted and observed E2-Eq. Overall, M2 was predicted to be 30 to 50 more estrogenic than M1, and the predicted E2-Eq was about 3 times higher in MELN cells than in ZELH-zfERs cells, reflecting different sensitivity to xeno-estrogens. In MELN cells, a very good agreement between predicted and observed E2-Eq was noticed, in line with mixture effects observed in Fig. 1. Conversely, in ZELH β 2 cells, inhibiting chemicals masked the detection of xeno-estrogens in M1 and decreased it in M2 (4-fold deviation in the E2-Eq derived), while the IC20 observed was similar for both mixtures.

DISCUSSION

Different estrogenic response of fish and mammalian-based bioassays have been observed for effluent (Ihara *et al.*, 2014; Rutishauser *et al.*, 2004) and surface water samples (Sonavane *et al.*, 2016), questioning the underlying reasons for such fish-specific response to complex environmental mixtures. In this study, the differences between zebrafish ZELH-zfERs and human MELN cells responses were investigated from a theoretical point of view using two mixtures of known chemicals. As part a of bioassay benchmarking exercise (Altenburger *et al.*, in prep), two fixed-ratio mixtures were designed with 12 prioritized environmentally relevant surface water pollutants previously characterized in MELN and ZELH-zfERs cells (Busch *et al.*, 2016; Neale *et al.*, 2017), which included the ER environmental ligands BPA and genistein. Using the same mixtures, marked differences were observed in the estrogenic response that was well quantified in MELN cells, but not in ZELH β 2 cells. By unravelling the mixture effect, we demonstrated that chemicals lacking estrogenic activity but negatively interfering with zfERs response influenced the detection and quantification of estrogenic chemicals in ZELH β 2 cells, leading to an underestimation of the mixture estrogenic activity.

Combined effects of xeno-estrogens in MELN and ZELH-zfERs cells

Combined effects of xeno-estrogens have been extensively investigated in *in vitro* human-based bioassays and were shown to be well predicted by CA model (Ghisari and Bonefeld-Jorgensen, 2009; Rajapakse *et al.*, 2004; Seeger *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2011, Scholze *et al.*, 2014). In MELN cells, the additive effects of xeno-estrogens were well predicted for both 12-component mixtures with CA and extended CA models, confirming previous results obtained on the same cell line (Creusot *et al.*, 2016).

Additivity of xeno-estrogens was reported in different fish *in vitro* and *in vivo* test systems for ER-regulated genes, ie. vitellogenin (Brian *et al.*, 2005; Petersen and Tollefsen, 2011; Thorpe *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2010) and brain aromatase cyp19a1b (Brion *et al.*, 2012; Petersen *et al.*, 2013, Le Page *et al.*, 2006, Hinfray *et al.*, 2016,). In ZELH α and ZELH β 2 cells, we report for the first time the additive effect of the genistein and BPA binary mixture, showing the suitability of ZELH-zfERs cells to study combined effects of xeno-estrogens. BPA acts as a partial agonist in ZELH-zfERs cells, inducing a maximal response around 30% of E2 maximal response, as previously observed and discussed (Le Fol *et al.*, 2017a), while genistein induced up to 75% of E2 maximal response. As

partial agonism of BPA was suspected in ZELH β 2 cells, we additionally compared the CA and extended CA predictions with the full logistic model (FLM, Ezechias and Cajthaml, 2016) and the generalized concentration addition (GCA, Howard and Webster, 2009) predictions as they were specifically developed to take into account partial agonists. FLM and GCA better predicted the maximal response reached by the binary mixture of BPA and genistein, in particular for M2, while CA and extended CA models provided more accurate predictions at low concentrations (Fig. S17), as previously reported (Schlotz *et al.*, 2017).

While BPA and genistein had additive effects in ZELH β 2 cells, their estrogenic activity in presence of 10 other non-estrogenic chemicals in the 12-component mixtures was lower than expected. Influence of negative modulators on estrogenic response have been shown *in vitro* when xeno-estrogens were combined with chemicals at cytotoxic concentrations (so called “toxic masking effect”, Frische *et al.*, 2009), with anti-estrogenic chemicals (Yang *et al.*, 2015) and with chemicals having minimal to no estrogenic response (Evans *et al.*, 2012). By unravelling the mixture response, we evidenced that chemicals negatively interfering with zfER response were responsible for the deviation from expected additive response in ZELH β 2 cells.

Different responses of MELN and ZELH-zfERs bioassays: influence of inhibiting chemicals

Among inhibiting chemicals, TPP and BaP were identified as specific ER-luciferase inhibitors in ZELH α and ZELH β 2 cells (i.e. no effect on cytotoxicity and no luciferase inhibition in ZELH cells in parallel). Interestingly, both chemicals had opposite response profiles in MELN and ZELH-zfERs cells, activating ER response in MELN cells, but decreasing it in zebrafish-based bioassays. BaP is a well-known AhR ligand (Denison and Nagy, 2003). Direct physical interaction between liganded AhR and ER has been demonstrated in different cell types expressing both receptors, leading to the formation of an ER-AhR-ARNT heterotrimer and to the subsequent modulation of ER-regulated gene expression (Ohtake *et al.*, 2003). In fish, AhR ligands such as β -naphthoflavone, dioxin or BaP were shown to exert anti-estrogenic effects through this cross-talk mechanism (Cheshenko *et al.*, 2007; Navas and Segner, 2000b). In previous experiments, we observed that TCDD, the prototypical AhR ligand, decreased E2-induced response in ZELH-zfERs cells, while it increased it in MELN cells (unpublished data). The occurrence of such ER-AhR crosstalk in our *in vitro* bioassays indicates that differential modulation of ER-luciferase could, at least partially, explained the opposite observed effects of BaP in ZELH-zfERs and MELN cells.

TPP was shown to induce hER α activation *in vitro* in CHO-K1 cells in the low μ M range (Kojima *et al.*, 2013), as observed in the MELN cells (this study and Creusot *et al.*, 2016). In ZELH-zfERs cells, TPP lacked ER agonist activity, as observed in transgenic zebrafish embryos (Neale *et al.*, 2017a), but decreased E2-induced response by 90% at 10 μ M (current study). Influence of tissue-specific responses (e.g. metabolism, Kojima *et al.*, 2016), and cross-species differences may account for the differences observed between MELN and ZELH-zfERs cells. Further studies using receptor binding assay would be warranted to better characterize zfER interaction with TPP.

In such reporter cell-based models, an inhibition of reporter gene activity can be either an ER-dependent mechanism due to binding with antagonists or partial agonists (ex: Yang *et al.*, 2015) or non-ER-dependent mechanism due to cytotoxicity (e.g. Frische *et al.*, 2009) or luciferase inhibition (e.g. Auld and Inglese, 2004). In the zebrafish-based bioassays, such non-ER specific interactions with luciferase activity were suggested for chlorophene, BbF, propiconazole and cyprodinil. Few information on (anti)estrogenicity of chlorophene and cyprodinil are available. Lack of ER agonist activity was reported in the YES assay for cyprodinil (Medjakovic *et al.*, 2014) and in ER-CALUX assay for chlorophene (Houtman *et al.*, 2004), as observed in the current study. Interestingly, cyprodinil decreased luciferase activity in a dose-dependent manner across all bioassays irrespectively of E2 induction (Fig. SI 3). The anilinopyrimidinic pesticide shares structural similarities with known luciferase inhibitors (Auld and Inglese, 2004) and was reported to impact firefly luciferase activity via ATP production *in vitro* (Coleman *et al.*, 2012), which suggests a direct interaction with luciferase leading to its inhibition. In case of propiconazole, a weak estrogenic activity was reported at 10 μ M and above in MVLN cells (Kjeldsen *et al.*, 2013), while both proliferative and anti-proliferative effects were reported in MCF-7 proliferative assay (Kjærstad *et al.*, 2010). It is noteworthy that diazinon induced a weak ER response in MELN cells, as previously observed in BG1 cells (Kojima *et al.*, 2005), and that triclosan, a chemical suspected to be a xeno-estrogens (Dann et Hontela, 2011), showed no (anti)estrogenic activity across the bioassays (further discussed in Serra *et al.*, in prep).

MELN cells originate from MCF-7 breast cancer cells, while ZELH-zfERs cells were established from zebrafish liver cells. Both MELN and ZELH-zfERs cells remain metabolically active but with distinct metabolic capacities and profiles (Creusot *et al.*, 2015; Le Fol *et al.*, 2015). Some chemicals among the 12 selected for the mixtures were shown to activate AhR (e.g. BaP, BbF,

cyprodinil) and hPXR (e.g. cyprodinil, TPP, propiconazole) which mediate the transcription of phase I metabolic enzymes, such as CYP1A and CYP3A, respectively (Neale *et al.*, 2017). Activated metabolic pathways are likely to have differently influenced the intracellular fate of xeno-estrogens in the bioassays, resulting in different mixture responses. For instance, an increased metabolism was hypothesized to cause the negative deviation from CA prediction in the E-SCREEN (Silva *et al.*, 2011) and in primary rainbow trout hepatocytes (Petersen and Tollefsen, 2011). Internal concentrations of the 12 chemicals in ZELH-zfERs cells at the end of the exposure period would be needed to assess whether an increased metabolism of BPA and genistein contributed to the deviation from CA prediction.

Zebrafish- vs human-based bioassays: potential implications for environmental bio-monitoring

Aquatic organisms, such as fish, are continuously exposed to a wide diversity of chemicals covering different modes of action, including xeno-estrogens (Loos *et al.*, 2009, Busch *et al.*, 2016). *In vitro* ER-reporter gene assays have been used to screen for surface water estrogenic activity, providing information on the occurrence of xeno-estrogens within environmental mixtures (e.g. Neale *et al.*, 2015, Conley *et al.*, 2017). Given the complex chemical contamination of the aquatic system, the response of *in vitro* bioassay to environmental samples is a result of the combined effects of xeno-estrogens potentially balanced by interactions with non-estrogenic chemicals, raising the question of the relevance of such interactions and the consequences in terms of environmental monitoring.

Comparing *in vitro* and *in vivo* medaka-based bioassays response to effluent samples, Ihara *et al.* (2015) showed that the estrogenic activity measured in the medaka-based *in vitro* bioassay was a better predictor of the *in vivo* VTG induction in adult male medaka than the estrogenic activity measured in the human-based bioassay (Ihara *et al.*, 2015). Similar concordance between *in vitro* and *in vivo* estrogenic activity of surface water extracts was observed with zebrafish-based models (Sonavane *et al.*, 2016). These studies suggest that *in vitro* fish-specific response could better reflect an *in vivo* fish response. To further investigate the biological relevance of the *in vitro* ZELH-zfERs response to the mixtures, both 12-chemical mixtures were also tested *in vivo* in transgenic zebrafish embryos expressing GFP under control of *cyp19a1b* promoter in radial glial cells (Altenburger *et al.*, in prep, Brion *et al.*, 2012). However, no estrogenic response could be

detected for both mixtures because of a high mortality, especially for M1, suggesting that the 12-component mixtures might be as much or more hazardous to zebrafish embryos than expected combined effect of estrogenic chemicals.

To conclude, we showed that *in vitro* zebrafish and human-based bioassays are both suitable to assess additivity of xeno-estrogens. However, when xeno-estrogens were within the 12-chemical mixtures, the estrogenic activity quantified was the result of a mixture effect that took into account inhibiting chemicals. Because of distinct sensitivity to environmental pollutants, MELN and ZELH-zfERs cells provided complementary information on the chemicals in the 12-component mixtures. ZELH-zfERs cells have kept metabolic capacity qualitatively similar to those observed in primary culture of zebrafish hepatocytes, suggesting the good representativeness of ZELH-derived cells to a fish liver metabolism (Le Fol *et al.*, 2015). When replaced in a context of environmental contamination and surface water monitoring, this study shows that a mindful consideration of the ER-based bioassay specificities (e.g. fish vs human ER, influence of the cell context) is needed to ensure a proper interpretation of results, as environmental chemicals may interfere with ER response in a cell-specific manner.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the EU Seventh Framework Programme as a part of SOLUTIONS project (FP7-ENV-2013-two-stage) under grant agreement number 603437, and by the French Ministry of Ecology (P190-Ecotoxicologie).

REFERENCES

- Auld, D.S., Inglese, J., 2004. Interferences with Luciferase Reporter Enzymes, in: Sittampalam, G.S., Coussens, N.P., Nelson, H., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M., Inglese, J., Iversen, P.W., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Minor, L., Napper, A., Peltier, J.M., Riss, T., Trask, O.J., Weidner, J. (Eds.), Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).
- Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., Backhaus, T., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Runnalls, T., Bonfà, A., Marcomini, A., Sumpter, J.P., 2005. Accurate Prediction of the Response of Freshwater Fish to a Mixture of Estrogenic Chemicals. *Environ. Health Perspect.* 113, 721–728. doi:10.1289/ehp.7598
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.-K., Chung, B., Kah, O., 2012. Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures *In vivo* Using Transgenic (cyp19a1b-GFP) Zebrafish Embryos. *Plos One* 7, e36069. doi:10.1371/journal.pone.0036069
- Busch, W., Schmidt, S., Kuehne, R., Schulze, T., Krauss, M., Altenburger, R., 2016. Micropollutants in European rivers: A mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1887–1899. doi:10.1002/etc.3460
- Cheshenko, K., Brion, F., Le Page, Y., Hinfrey, N., Pakdel, F., Kah, O., Segner, H., Eggen, R.I.L., 2007. Expression of zebra fish aromatase cyp19a and cyp19b genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. Sci.* 96, 255–267. doi:10.1093/toxsci/kfm003
- Coleman, M.D., O’Neil, J.D., Woehrling, E.K., Ndunge, O.B.A., Hill, E.J., Menache, A., Reiss, C.J., 2012. A Preliminary Investigation into the Impact of a Pesticide Combination on Human Neuronal and Glial Cell Lines *In vitro*. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0042768
- Conley, J.M., Evans, N., Cardon, M.C., Rosenblum, L., Iwanowicz, L.R., Hartig, P.C., Schenck, K.M., Bradley, P.M., Wilson, V.S., 2017. Occurrence and *In vitro* Bioactivity of Estrogen, Androgen, and Glucocorticoid Compounds in a Nationwide Screen of United States Stream Waters. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4781–4791. doi:10.1021/acs.est.6b06515
- Cosnefroy, A., Brion, F., Maillot-Marechal, E., Porcher, J.-M., Pakdel, F., Balaguer, P., Ait-Aissa, S., 2012. Selective Activation of Zebrafish Estrogen Receptor Subtypes by Chemicals by Using Stable Reporter Gene Assay Developed in a Zebrafish Liver Cell Line. *Toxicol. Sci.* 125, 439–449. doi:10.1093/toxsci/kfr297
- Creusot, N., Brion, F., Piccini, B., Budzinski, H., Porcher, J.M., Ait-Aissa, S., 2015. BFCOD activity in fish cell lines and zebrafish embryos and its modulation by chemical ligands of human aryl hydrocarbon and nuclear receptors. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 16393–16404. doi:10.1007/s11356-014-3882-8
- Creusot, N., Dévier, M.-H., Budzinski, H., Ait-Aissa, S., 2016. Evaluation of an extraction method for a mixture of endocrine disruptors in sediment using chemical and *in vitro* biological analyses. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 10349–10360. doi:10.1007/s11356-016-6062-1
- Dann, A.B., Hontela, A., 2011. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J. Appl. Toxicol.* 31, 285–311. doi:10.1002/jat.1660

- Denison, M.S., Nagy, S.R., 2003. Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by Structurally Diverse Exogenous and Endogenous Chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 309–334. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828
- Escher, B.I., Allinson, M., Altenburger, R., Bain, P.A., Balaguer, P., Busch, W., Crago, J., Denslow, N.D., Dopp, E., Hilscherova, K., Humpage, A.R., Kumar, A., Grimaldi, M., Jayasinghe, B.S., Jarosova, B., Jia, A., Makarov, S., Maruya, K.A., Medvedev, A., Mehinto, A.C., Mendez, J.E., Poulsen, A., Prochazka, E., Richard, J., Schifferli, A., Schlenk, D., Scholz, S., Shiraish, F., Snyder, S., Su, G., Tang, J.Y.M., van der Burg, B., van der Linden, S.C., Werner, I., Westerheide, S.D., Wong, C.K.C., Yang, M., Yeung, B.H.Y., Zhang, X., Leusch, F.D.L., 2014. Benchmarking Organic Micropollutants in Wastewater, Recycled Water and Drinking Water with *In vitro* Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1940–1956. doi:10.1021/es403899t
- Evans, R.M., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2012. Additive Mixture Effects of Estrogenic Chemicals in Human Cell-Based Assays Can Be Influenced by Inclusion of Chemicals with Differing Effect Profiles. *PLOS ONE* 7, e43606. doi:10.1371/journal.pone.0043606
- Ezechias, M., Cajthaml, T., 2016. Novel full logistic model for estimation of the estrogenic activity of chemical mixtures. *Toxicology* 359, 58–70. doi:10.1016/j.tox.2016.06.017
- Frische, T., Faust, M., Meyer, W., Backhaus, T., 2009. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 593–603. doi:10.1007/s11356-009-0184-7
- Ghisari, M., Bonefeld-Jorgensen, E.C., 2009. Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicol. Lett.* 189, 67–77. doi:10.1016/j.toxlet.2009.05.004
- Hawkins, M.B., Thomas, P., 2004. The unusual binding properties of the third distinct teleost estrogen receptor subtype ER β are accompanied by highly conserved amino acid changes in the ligand binding domain. *Endocrinology* 145, 2968–2977. doi:10.1210/en.2003.0806
- Hinfray, N., Tebby, C., Garoche, C., Piccini, B., Bourguine, G., Aït-Aïssa, S., Kah, O., Pakdel, F., Brion, F., 2016. Additive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on brain aromatase (cyp19a1b) in zebrafish specific *in vitro* and *in vivo* bioassays. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 307, 108–114. doi:10.1016/j.taap.2016.07.023
- Hoegg, S., Brinkmann, H., Taylor, J.S., Meyer, A., 2004. Phylogenetic Timing of the Fish-Specific Genome Duplication Correlates with the Diversification of Teleost Fish. *J. Mol. Evol.* 59, 190–203. doi:10.1007/s00239-004-2613-z
- Houtman, C.J., Van Oostveen, A.M., Brouwer, A., Lamoree, M.H., Legler, J., 2004. Identification of estrogenic compounds in fish bile using bioassay-directed fractionation. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6415–6423. doi:10.1021/es049750p
- Howard, G.J., Webster, T.F., 2009. Generalized concentration addition: A method for examining mixtures containing partial agonists. *J. Theor. Biol.* 259, 469–477. doi:10.1016/j.jtbi.2009.03.030
- Jarošová, B., Javůrek, J., Adamovský, O., Hilscherová, K., 2015. Phytoestrogens and mycoestrogens in surface waters--Their sources, occurrence, and potential contribution to estrogenic activity. *Environ. Int.* 81, 26–44. doi:10.1016/j.envint.2015.03.019
- Kjærstad, M.B., Taxvig, C., Nellemann, C., Vinggaard, A.M., Andersen, H.R., 2010. Endocrine disrupting effects *in vitro* of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Reprod. Toxicol.* 30, 573–582. doi:10.1016/j.reprotox.2010.07.009

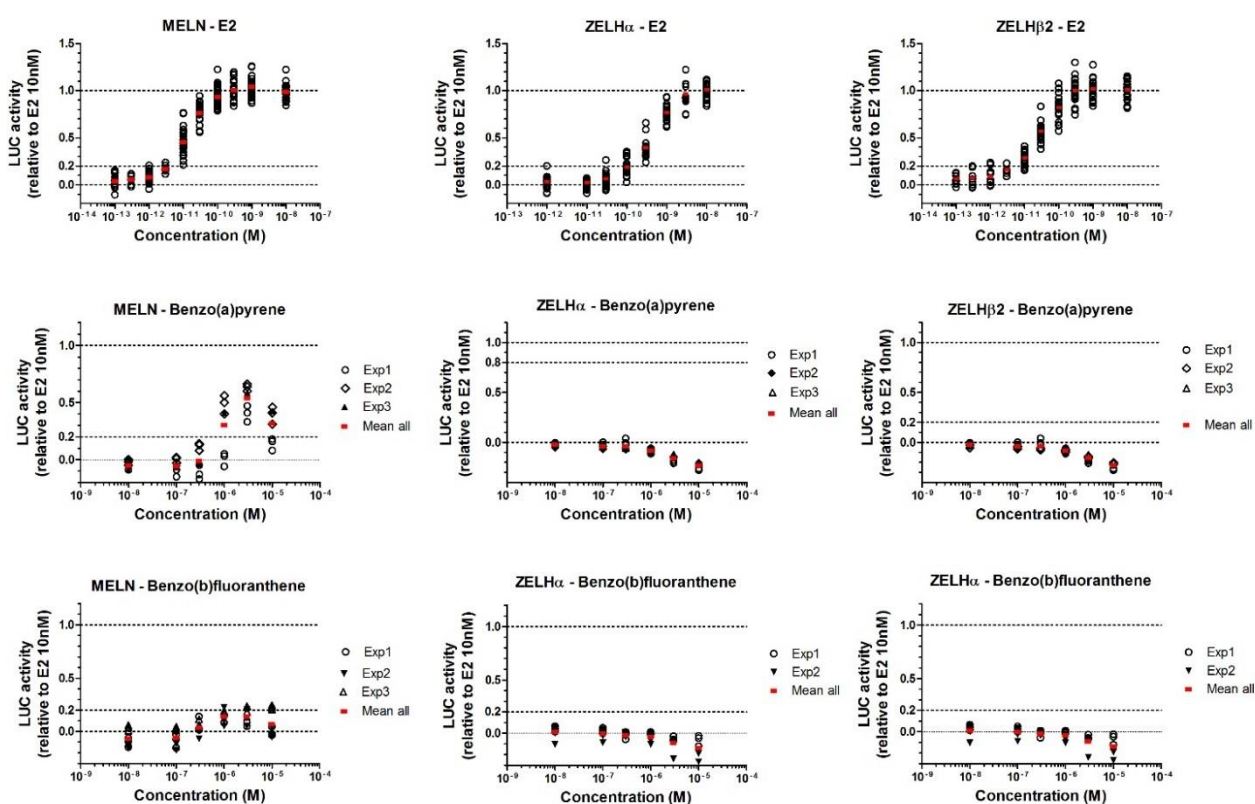
- Kjeldsen, L.S., Ghisari, M., Bonefeld-Jørgensen, E.C., 2013. Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 453–464. doi:10.1016/j.taap.2013.06.028
- Kojima, H., Takeuchi, S., Itoh, T., Iida, M., Kobayashi, S., Yoshida, T., 2013. *In vitro* endocrine disruption potential of organophosphate flame retardants via human nuclear receptors. *Toxicology* 314, 76–83. doi:10.1016/j.cox.2013.09.004
- Kojima, H., Takeuchi, S., Van den Eede, N., Coyaci, A., 2016. Effects of primary metabolites of organophosphate flame retardants on transcriptional activity via human nuclear receptors. *Toxicol. Lett.* 245, 31–39. doi:10.1016/j.toxlet.2016.01.004
- Kojima, M., * K.F., Sasaki, M., Nakamura, M., Tsuji, M., Nishiyama, T., 2005. Evaluation of estrogenic activities of pesticides using an *in vitro* reporter gene assay. *Int. J. Environ. Health Res.* 15, 271–280. doi:10.1080/09603120500155765
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211. doi:10.1021/es011055j
- Le Fol, V., Aït-Aïssa, S., Cabaton, N., Dolo, L., Grimaldi, M., Balaguer, P., Perdu, E., Debrauwer, L., Brion, F., Zalko, D., 2015. Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-s in zebrafish and human *in vitro* models used for toxicity and estrogenicity screening. *Environ. Sci. Technol.* 49, 3860–3868. doi:10.1021/es505302c
- Le Fol, V., Aït-Aïssa, S., Sonavane, M., Porcher, J.-M., Balaguer, P., Cravedi, J.-P., Zalko, D., Brion, F., 2017. *In vitro* and *in vivo* estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142, 150–156. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.04.009
- Le Page, Y., Scholze, M., Kah, O., Pakdel, F., 2006. Assessment of Xenoestrogens Using Three Distinct Estrogen Receptors and the Zebrafish Brain Aromatase Gene in a Highly Responsive Glial Cell System. *Environ. Health Perspect.* 114, 752–758. doi:10.1289/ehp.8141
- Loewe S, Muischnek H (1926) Über Kombinationswirkungen I. Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 114: 313–326
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G., 2009. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* 157, 561–568. doi:10.1016/j.envpol.2008.09.020
- Matthews, J., Celius, T., Halgren, R., Zacharewski, T., 2000. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 223–234. doi:10.1016/S0960-0760(00)00126-6
- McDonnell, D.P., Norris, J.D., 2002. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 296, 1642–1644. doi:10.1126/science.1071884
- Medjakovic, S., Zochling, A., Gerster, P., Ivanova, M.M., Teng, Y., Klinge, C.M., Schildberger, B., Gartner, M., Jungbauer, A., 2014. Effect of nonpersistent pesticides on estrogen receptor, androgen receptor, and aryl hydrocarbon receptor. *Environ. Toxicol.* 29, 1201–1216. doi:10.1002/tox.21852
- Molina-Molina, J.-M., Escande, A., Pillon, A., Gomez, E., Pakdel, F., Cavallès, V., Olea, N., Aït-Aïssa, S., Balaguer, P., 2008. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific *in vitro* bioassays. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 384–395. doi:10.1016/j.taap.2008.07.017

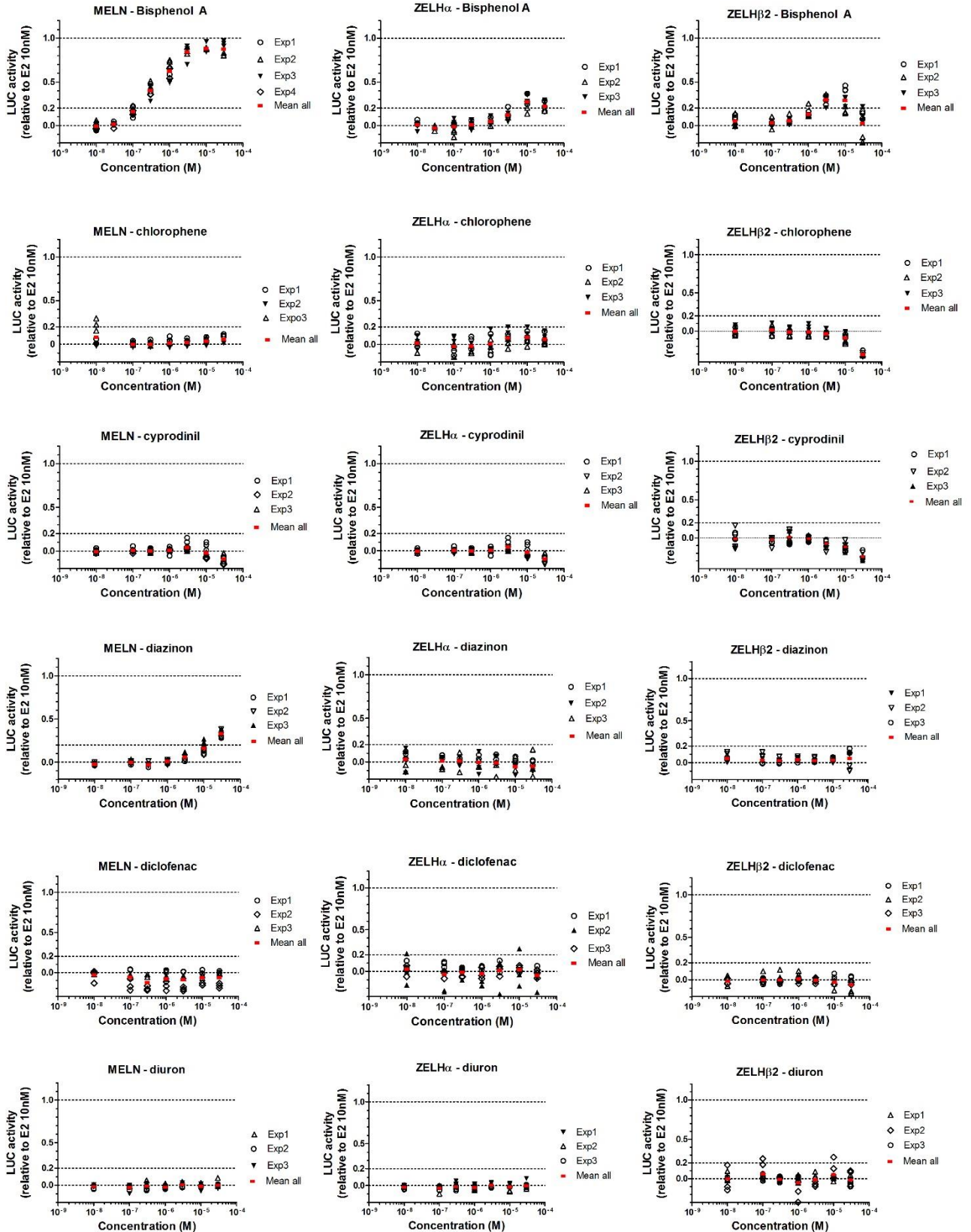
- Navas, J.M., Segner, H., 2000. Antiestrogenicity of β -naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquat. Toxicol.* 51, 79–92. doi:10.1016/S0166-445X(00)00100-4
- Neale, P.A., Ait-Aïssa, S., Brack, W., Creusot, N., Denison, M.S., Deutschmann, B., Hilscherova, K., Hollert, H., Krauss, M., Novak, J., Schulze, T., Seiler, T.-B., Serra, H., Shao, Y., Escher, B.I., 2015. Linking *in vitro* Effects and Detected Organic Micropollutants in Surface Water Using Mixture-Toxicity Modeling. *Environ. Sci. Technol.* 49, 14614–14624. doi:10.1021/acs.est.5b04083
- Neale, P.A., Altenburger, R., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Busch, W., de Aragão Umbuzeiro, G., Denison, M.S., Du Pasquier, D., Hilscherová, K., Hollert, H., Morales, D.A., Novák, J., Schlichting, R., Seiler, T.-B., Serra, H., Shao, Y., Tindall, A.J., Tollefsen, K.E., Williams, T.D., Escher, B.I., 2017. Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: Fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water. *Water Res.* 123, 734–750. doi:10.1016/j.watres.2017.07.016
- Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2013. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 15–24. doi:10.1016/j.ygcen.2013.03.032
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S., 2003. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545–550. doi:10.1038/nature01606
- Petersen, K., Fetter, E., Kah, O., Brion, F., Scholz, S., Tollefsen, K.E., 2013. Transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos as a tool for assessing combined effects of oestrogenic chemicals. *Aquat. Toxicol.* 138, 88–97. doi:10.1016/j.aquatox.2013.05.001
- Petersen, K., Tollefsen, K.E., 2011. Assessing combined toxicity of estrogen receptor agonists in a primary culture of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 101, 186–195. doi:10.1016/j.aquatox.2010.09.018
- Pinto, C., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Pakdel, F., Brion, F., Aït-Aïssa, S., Cavaillès, V., Bourguet, W., Gustafsson, J.-A., Bondesson, M., Balaguer, P., 2014. Selectivity of natural, synthetic and environmental estrogens for zebrafish estrogen receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 280, 60–69. doi:10.1016/j.taap.2014.07.020
- Rajapakse, N., Silva, E., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2004. Deviation from additivity with estrogenic mixtures containing 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol detected in the E-SCREEN assay. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6343–6352.
- 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, 241–248. doi:10.1002/etc.5620150303
- Rutishauser, B.V., Pesonen, M., Escher, B.I., Ackermann, G.E., Aerni, H.-R., Suter, M.J.-F., Eggen, R.I.L., 2004. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three *in vitro* assays and chemical analysis of steroids. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 857–864. doi:10.1897/03-286
- Schlotz, N., Kim, G.-J., Jäger, S., Günther, S., Lamy, E., 2017. *In vitro* observations and in silico predictions of xenoestrogen mixture effects in T47D-based receptor transactivation and proliferation assays. *Toxicol. In vitro.* doi:10.1016/j.tiv.2017.08.017

- Scholze, M., Silva, E., Kortenkamp, A., 2014. Extending the Applicability of the Dose Addition Model to the Assessment of Chemical Mixtures of Partial Agonists by Using a Novel Toxic Unit Extrapolation Method. *PLOS ONE* 9, e88808. doi:10.1371/journal.pone.0088808
- Seeger, B., Klawonn, F., Bekale, B.N., Steinberg, P., 2016. Mixture Effects of Estrogenic Pesticides at the Human Estrogen Receptor α and β . *PLOS ONE* 11, e0147490. doi:10.1371/journal.pone.0147490
- Segner, H., Casanova-Nakayama, A., Kase, R., Tyler, C.R., 2013. Impact of environmental estrogens on fish considering the diversity of estrogen signaling. *Gen. Comp. Endocrinol.* 191, 190–201. doi:10.1016/j.ygcen.2013.05.015
- Silva, E., Rajapakse, N., Scholze, M., Backhaus, T., Ermler, S., Kortenkamp, A., 2011. Joint Effects of Heterogeneous Estrogenic Chemicals in the E-Screen—Exploring the Applicability of Concentration Addition. *Toxicol. Sci.* 122, 383–394. doi:10.1093/toxsci/kfr103
- Sonavane, M., Creusot, N., Maillot-Marechal, E., Pery, A., Brion, F., Ait-Aissa, S., 2016. Zebrafish-based reporter gene assays reveal different estrogenic activities in river waters compared to a conventional human-derived assay. *Sci. Total Environ.* 550, 934–939. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.187
- Sumpter, J.P., 2005. Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 33, 9–16. doi:10.1002/aheh.200400555
- Thorpe, K.L., Cummings, R.I., Hutchinson, T.H., Scholze, M., Brighty, G., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1142–1149.
- Tohyama, S., Miyagawa, S., Lange, A., Ogino, Y., Mizutani, T., Ihara, M., Tanaka, H., Tatarazako, N., Kobayashi, T., Tyler, C.R., Iguchi, T., 2016. Evolution of estrogen receptors in ray-finned fish and their comparative responses to estrogenic substances. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 158, 189–197. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.12.009
- Yang, R., Li, N., Rao, K., Ma, M., Wang, Z., 2015. Combined action of estrogen receptor agonists and antagonists in two-hybrid recombinant yeast *in vitro*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 228–235. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.09.025
- Zhang, H., Kong, F.-X., Yu, Y., Shi, X.-L., Zhang, M., Tian, H.-E., 2010. Assessing the combination effects of environmental estrogens in fish. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 19, 1476–1486. doi:10.1007/s10646-010-0533-9

SUPPORTING INFORMATION

Figure SI1: Response of the 12 chemicals on ER activation in MELN, ZELH α and ZELH β 2 cells. Data represent each replicate and their mean (red dash) of at least 2 independent experiments done in triplicates. Chemicals were tested in the 10 nM - 30 μ M range, except for genistein (from 1 nM). The horizontal dotted line at 20% figures the threshold of effect.





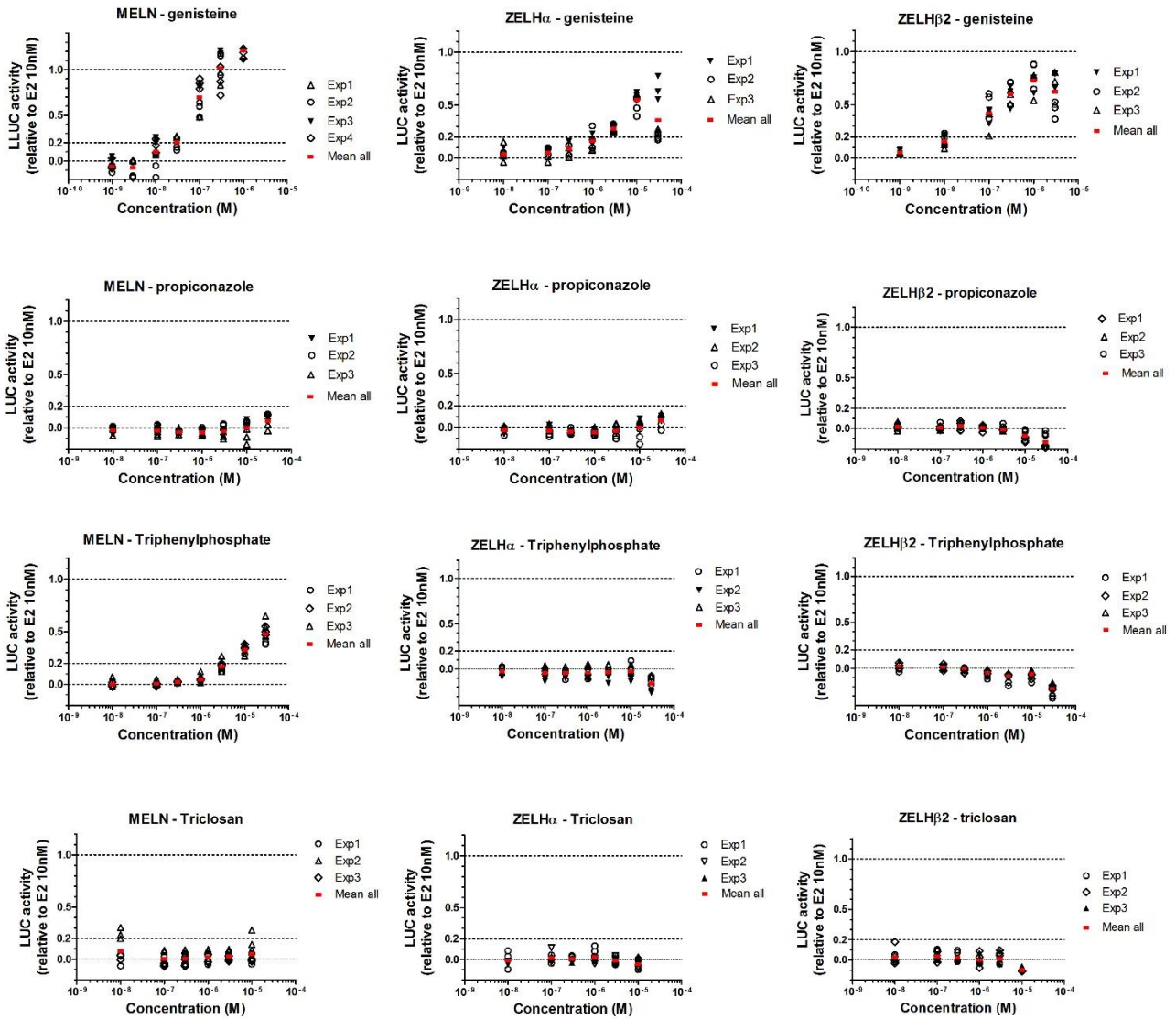
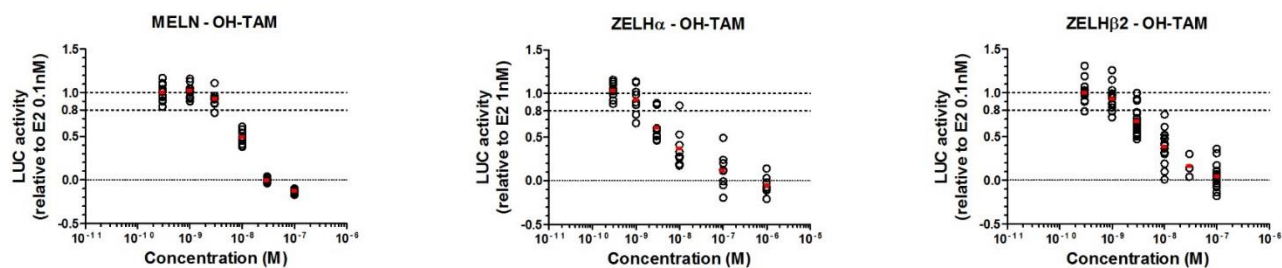
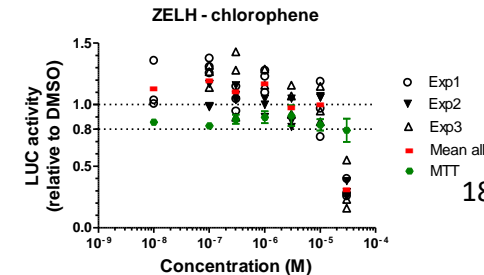
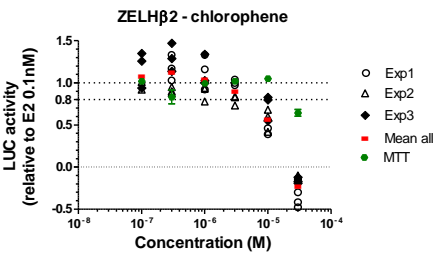
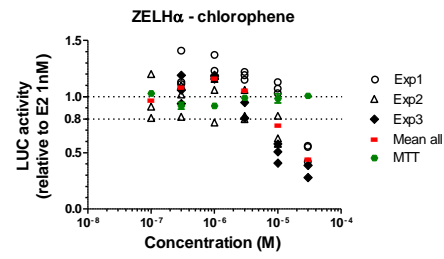
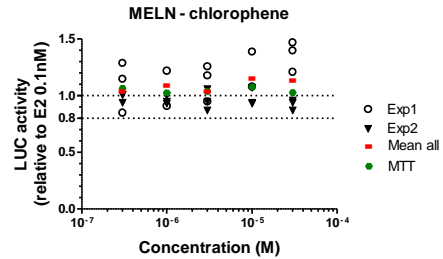
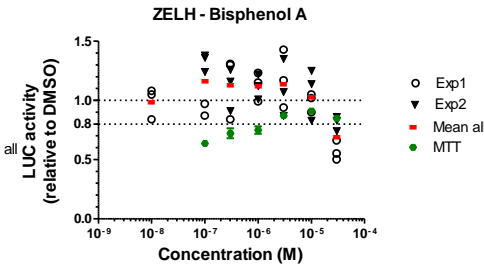
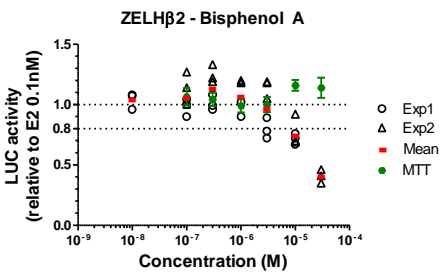
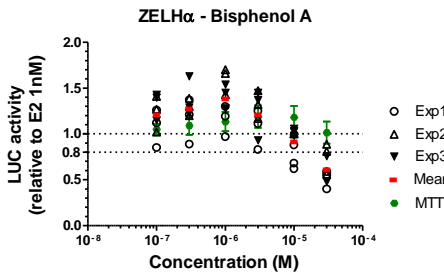
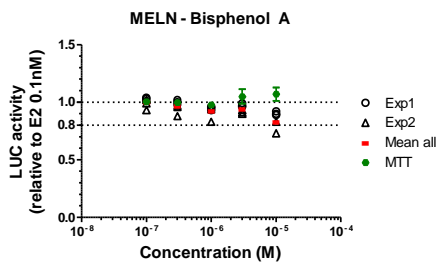
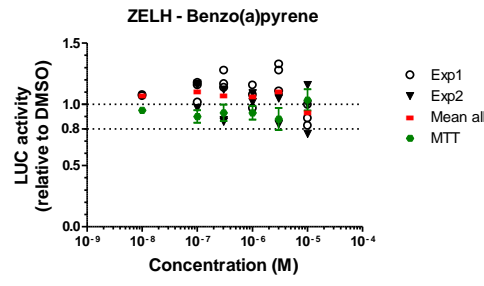
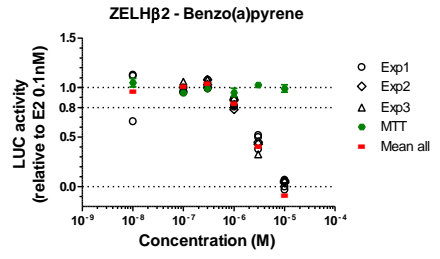
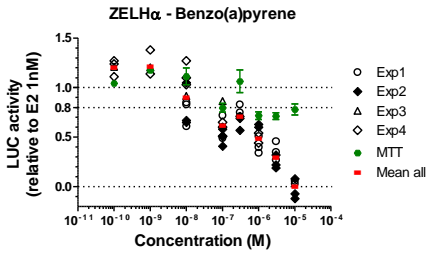
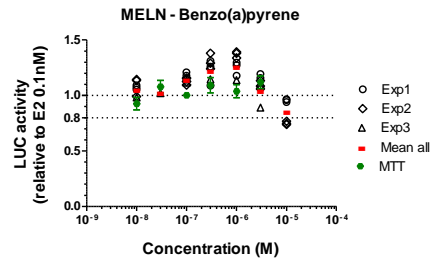
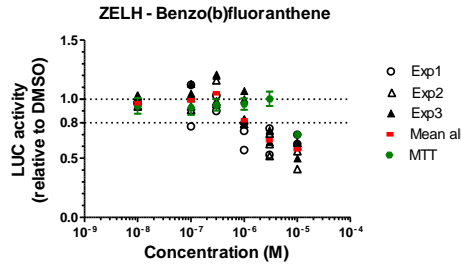
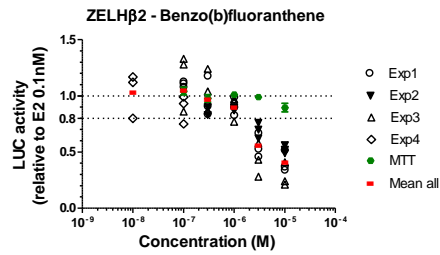
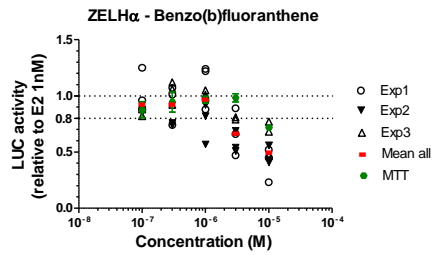
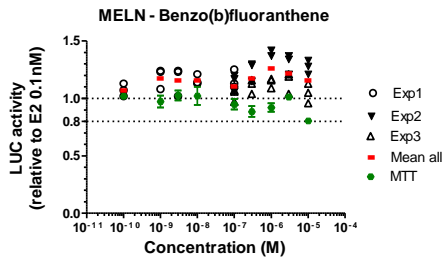
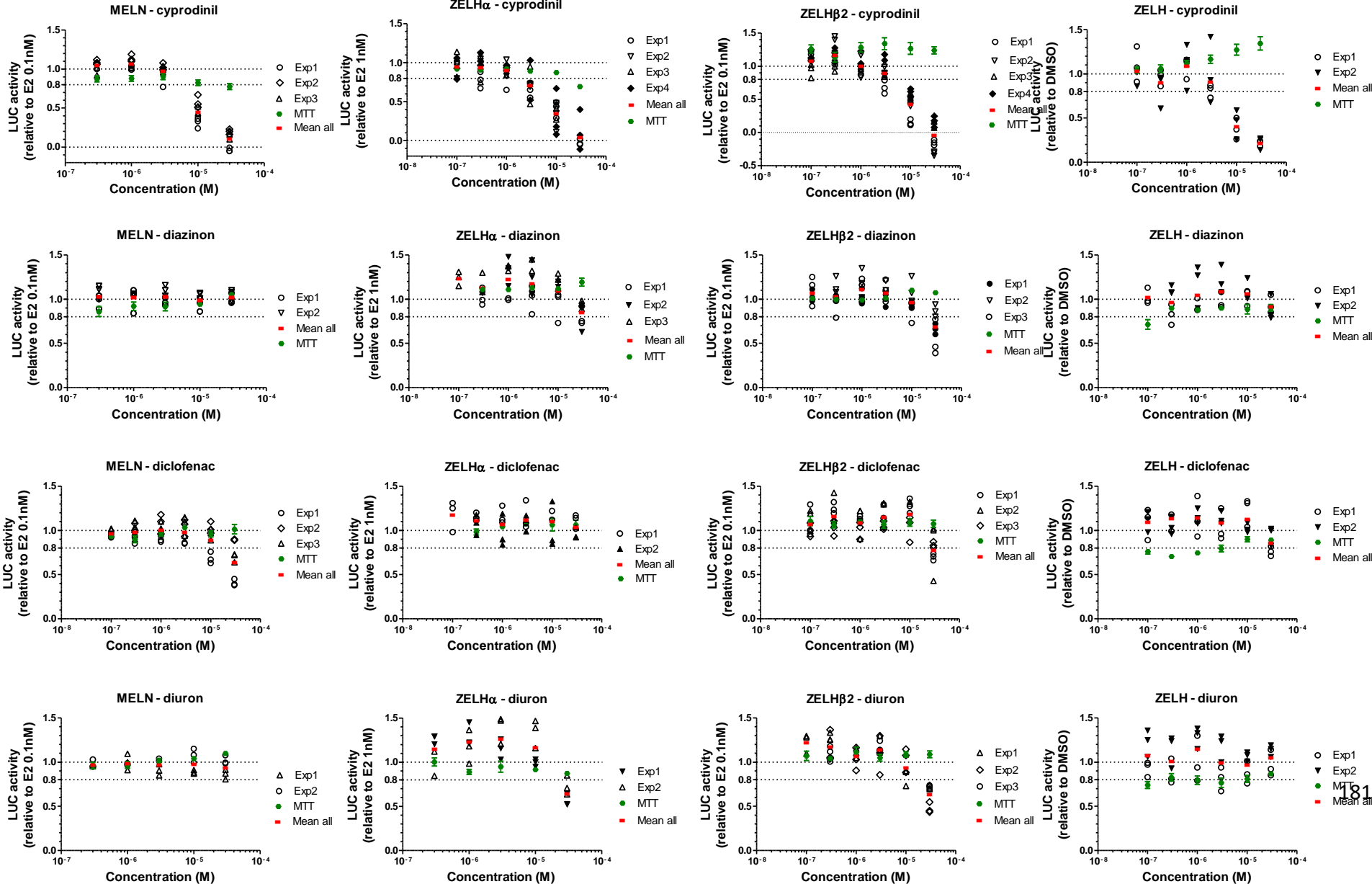


Figure SI2: Response of the 12 chemicals on E2-induced ER inhibition in MELN, ZELH-zfER α , ZELH β 2 and ZELH cells. Data represent each replicate and the mean (red dash) of at least 2 independent experiments done in triplicates. Chemicals were tested in the 10 nM - 30 μ M range. Cell viability (MTT) was measured for at least one experiment and is represented in green full circles (mean + SD). The horizontal dotted line at 80% figures the threshold of effect.







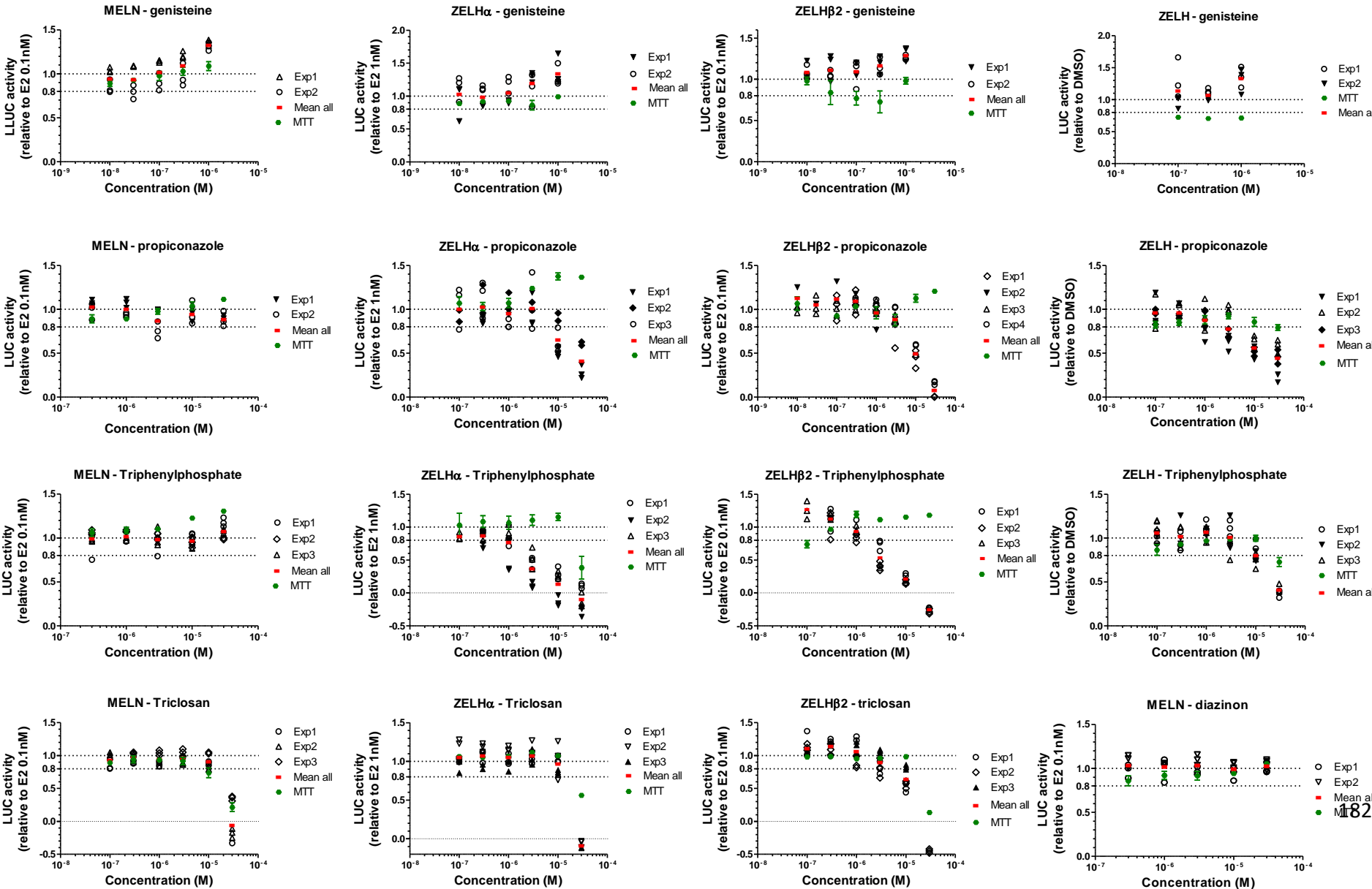


Figure SI3: Cyprodinil response in MELN, ZELH-zfER α , ZELH β 2 and ZELH cells in presence (antiER) or absence (ER) of E2. ER: luciferase induction relative to DMSO control, antiER: luciferase induction relative to E2 positive control.

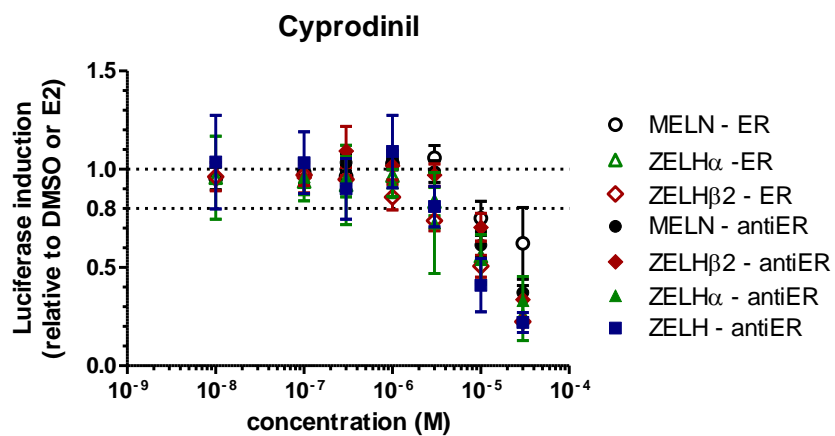


Figure S14: Predicted vs observed combined effects of inhibiting chemicals tested either separately (A,C), or in the 12-component mixtures (B,D) on ZELH cells for mixture 1 (A,B) and mixture 2 (C,D). The chemicals identified for each mixture are presented on the graph. Mixture effects were predicted according to CA for inhibitors (orange line). Measured effects in absence (black circles) or in presence of E2 (co-exposure with E2 at 1 nM, grey open circles) are represented by the mean \pm SD from at least 2 independent experiments done in triplicates and pooled. Cytotoxic concentrations (measured by MTT) were removed.

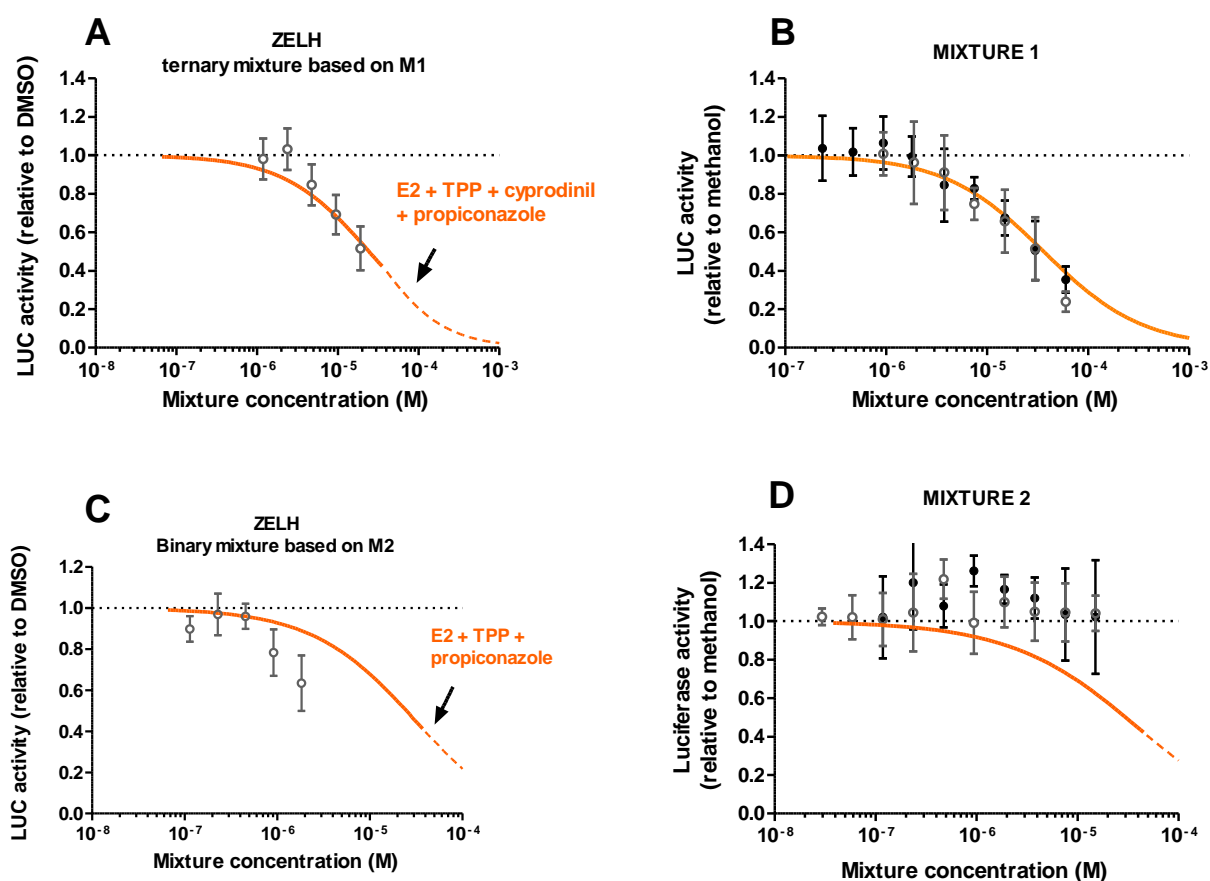


Figure SI5: Predicted vs observed combined effects of activating and inhibiting chemicals of M1 tested either separately (A), or together (B) on MELN cells. The identified active chemicals for each mixture are presented on each graph. Combined effects of Genistein and BPA tested with the same ratio as in M1 (C) and in M2 (D). Mixture effects were predicted according to CA for activating (green line) and inhibiting (orange line) chemicals, the dotted lines represent CA prediction beyond CA validity limit. Measured effects in absence (black circles) or in presence of E2 (co-exposure with E2 at 0.1 nM, grey open circles) are represented by the mean \pm SD from at least 2 independent experiments done in triplicates and pooled. Cytotoxic concentrations (measured by MTT) were removed.

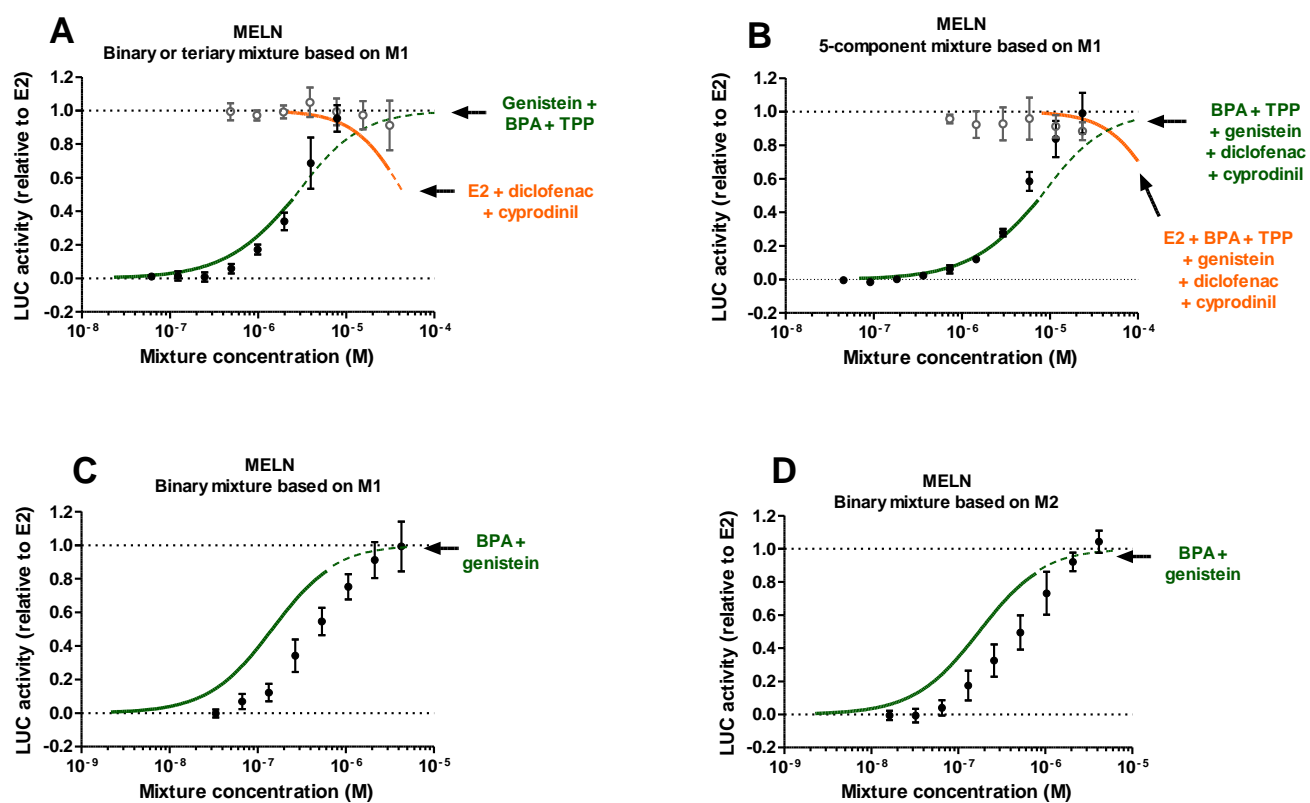


Figure S16: Predicted and observed effects of BPA, genistein and the identified drivers of inhibition on ZELH α cells, tested either separately (A, C), pooled together (B,D) based on M1 (A,B) and M2 (C,D) ratios. The drivers of inhibition identified for each mixture are presented in Table 4. Mixture effects were predicted according to CA for activating (green line) or inhibiting (orange line) chemicals, the dotted lines represent CA prediction beyond CA validity limit. Measured effects for ER activation (black circles) and for E2-induced ER inhibition (co-exposure with E2 1 nM, grey open circles) are represented by the mean \pm SD from at least 2 independent experiments done in triplicates and pooled. Cytotoxic concentrations (measured by MTT) were removed.

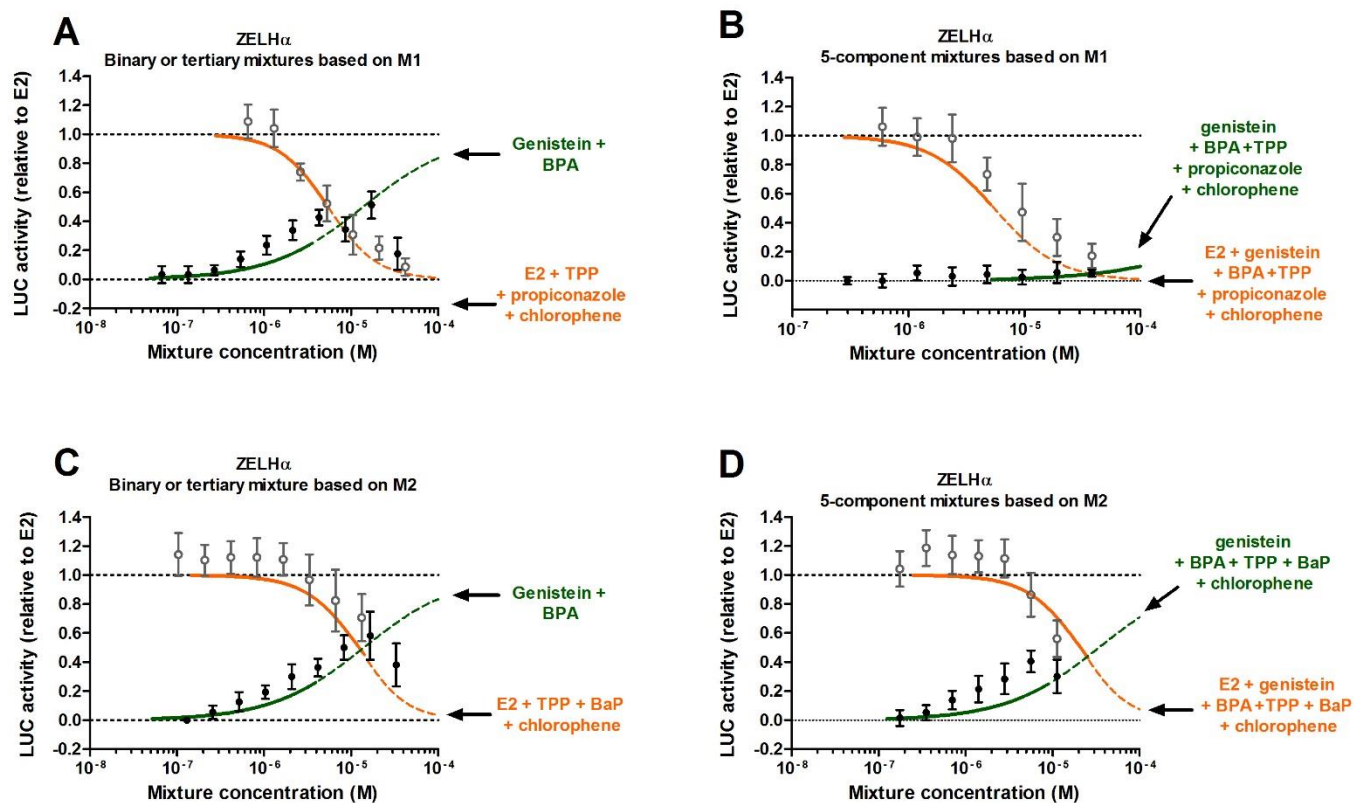
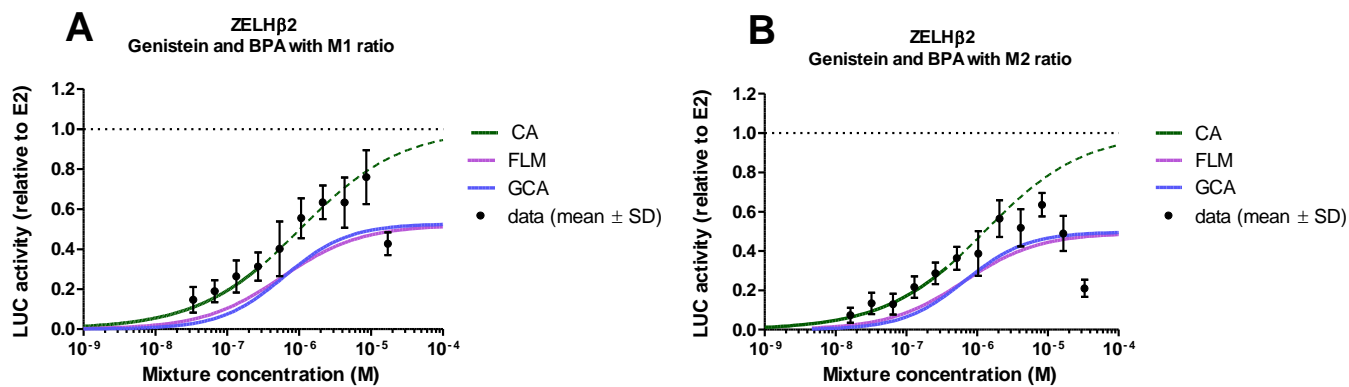


Figure SI7: Comparison of CA, GCA and FLM predictions for the binary mixture BPA+genistein and observed response in ZELH β 2 cells at M1 mixture ratio (A) and M2 mixture ratio (B).



D. Comparaison des bio-essais en réponse à des échantillons environnementaux

1. Article n°6: “Comparing zebrafish- and human-based bioassays for estrogenicity screening of river water samples: the Danube as a case-study”

1.1 Contexte et objectifs

Au départ du travail de thèse, il avait été constaté que les cellules ZELH β 2 répondaient quantitativement et parfois qualitativement différemment des cellules MELN aux échantillons environnementaux (Sonanave *et al.*, 2016). Au regard des différences inter-modèles observées pour les molécules seules et les mélanges simples, le but de cette étude était de comparer la réponse des bio-essais MELN et ZELH β 2 à des échantillons d'eau de surface. Dans un premier temps, les échantillons de la JDS3 évalués dans l'article n°1 ont été testés sur les cellules ZELH β 2. Afin d'aller plus loin, le cas d'étude de Novi Sad a été choisi pour évaluer l'influence de l'anti-estrogénicité et comparer la réponse des modèles *in vitro* à l'activité oestrogénique *in vivo* avec le test EASZY. Novi Sad est la deuxième ville de Serbie (300 000 habitants) et les eaux usées de la ville sont rejetées sans traitement dans le Danube (voir démarche expérimentale, B.2.2). Les deux cas d'études du projet SOLUTIONS ont été caractérisés biologiquement et chimiquement, ce qui a permis une comparaison approfondie des différences inter-modèles.

1.2 Résultats et discussion

Le criblage des échantillons de la JDS3 sur ZELH β 2 a montré que le bio-essai pouvait détecter de faibles niveaux d'activité estrogénique (<0,1 ng/L E2-Eq). Le site le plus actif sur les MELN était également bien détecté par les ZELH β 2 (JDS41). Cependant, la comparaison des deux modèles *in vitro* montre que les cellules ZELH β 2 (8/22) ont détecté moins d'échantillons actifs que les cellules MELN (15/22). De plus, si certains sites sont détectés de la même manière par les deux bio-essais (n=10), d'autres sont sélectivement actifs sur MELN (n=10) ou sur ZELH β 2 (n=2). L'estrone est le principal contributeur de l'activité estrogénique mesurée dans les deux bio-essais (comme observé dans l'article n°1 et n°3). Cependant, les xeno-estrogènes détectés ne

permettent pas d'expliquer les différences de réponse pour les échantillons sélectivement actif sur un modèle biologique. Ces résultats suggèrent que d'autres facteurs spécifiques à chaque bio-essai ont influencé la réponse aux xéno-estrogènes présents dans les échantillons.

Dans le cas d'étude de Novi Sad, l'échantillon prélevé à proximité du rejet de l'effluent d'eau usée de la ville était le plus actif *in vitro* et le seul actif *in vivo*. Les estrogènes stéroïdiens (E2, l'E1 et l'E3) étaient les principaux contributeurs identifiés. Une bonne corrélation entre l'activité estrogénique mesurée et prédite a été observée pour les MELN et pour le test EASZY, cependant, l'activité mesurée dans les cellules ZELH β 2 est 7 fois plus faible qu'attendue. Cependant, la faible activité anti-estrogénique mesurée ne permet pas d'expliquer la déviation de la réponse observée.

1.3 Conclusion

- Les sites les plus contaminés sont bien détectés par tous les modèles, y compris par le test EASZY, mais les échantillons faiblement actifs sont mieux détectés avec les MELN
- Les différences de sensibilité entre les cellules MELN et ZELH β 2 ne sont pas expliquées par les xéno-estrogènes identifiés

ARTICLE n°6

Comparing zebrafish- and human-based bioassays for estrogenicity screening of river water samples: the Danube as a case-study

Helene Serra^{1,2}, François Brion¹, Hélène Budzinski², Tobias Schulze³, Werner Brack³, Selim Aït-Aïssa^{1*}

¹Institut National de l'Environnement Industriel et des risques (INERIS), Verneuil-en-Halatte, France

² Université de Bordeaux, Talence, France

³UFZ– Helmholtz Centre for Environmental Research, Leipzig, Germany

* corresponding author

INTRODUCTION

Over the last decades, the occurrence of endocrine disrupting chemicals (EDC) in the aquatic environment has raised concern because of their adverse effects in aquatic organisms (Sumpter, 2005). EDC mediate their effects through multiple mechanisms, among which interaction with the estrogen receptor (ER) is well documented in vertebrates, such as fish (Sumpter and Jobling, 2013). ER is a nuclear receptor acting as a ligand-dependent transcription factor that modulates the expression of target genes involved in physiological processes, such as growth and reproduction (Segner *et al.*, 2013). Given the many environmental pollutants identified as xeno-estrogens (e.g. reviewed in Kiyama and Wada-Kiyama, 2015), chemical analysis targeting a define list of analytes is often not sufficient to characterize xeno-estrogenic contamination in an environmental mixture. Bioassays are therefore often applied to provide a more holistic view of xeno-estrogen contamination. Bioassays capture the activity of both known and unknown xeno-estrogens present in a given sample and thus complement the information provided by chemical analysis of selected key compounds (Altenburger *et al.*, 2015). They have been successfully applied to monitor estrogenic activity in many matrices such as waste waters

(Jarošová *et al.*, 2014b), drinking water (Escher *et al.*, 2014), and surface water (Vethaak *et al.*, 2005).

Most of currently used bioassays are *in vitro* reporter gene assays based on human ER α activation in mammalian or yeast cells (Kunz *et al.*, 2015; Leusch *et al.*, 2017). Compared to human that express two ER subtypes, ER α and ER β , most teleost fish express at least 3 ER subtypes, ER α , ER β 1 and ER β 2 (Tohyama *et al.*, 2016). ER mode of action is well conserved among vertebrates, however fish and human ER subtypes may have different sensitivity and selectivity towards xeno-estrogens (Cosnefroy *et al.*, 2009; Matthews *et al.*, 2000; Molina-Molina *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2014). Furthermore, transactivation of ER can be modulated by the cellular context, such as the presence of cell-specific transcriptional cofactors (Routledge *et al.*, 2000) or cell-specific metabolism (Le Fol *et al.*, 2015). Despite different response to xeno-estrogens, very few studies so far compared fish and human-based bioassays in bio-monitoring studies. For instance, when waste water effluent samples were screened on human or medaka ER α expressing cells, most samples were active on both cell lines, but some were significantly more potent on medaka ER α (Ihara *et al.*, 2014). These differences could not be fully explained by the steroidal estrogens identified, and the authors further suggested the influence of species-specific sensitivity to anti-estrogenic chemicals (Ihara *et al.*, 2015). Recently, we reported that some surface water extracts were active on zebrafish *in vitro* ZELH β 2 cells but lacked estrogenic activity in human-based cells (Sonavane *et al.*, 2016). These results suggest that cross-species differences and bioassays specific cellular factors may influence the activity of xeno-estrogens and thus their detection within complex mixtures. However more data issued from different environmental contexts are still needed to further document such hypothesis which may have implication in the refinement of bioanalytical tools in environmental monitoring. (Sonavane *et al.*, 2016)

In that context, our study aimed at investigating and comparing the response of fish- and human-based reporter gene bioassays to assess estrogenicity of surface water samples from the Danube river, which is representative of a large water body context with high dilutions and low micropollutants concentrations originating from diverse sources (Liška *et al.*, 2015). The water sample extracts originating from two case-studies, namely the Joint Danube Survey (JDS, Neale *et al.*, 2015) and Novi Sad city (König *et al.*, 2017), were analyzed by two *in vitro* bioassays, namely, zebrafish liver cells (ZFL) stably transfected with the estrogen receptor zFER β 2 (ZELH β 2 cells) and

the human-based MELN cells constitutively expressing hER α (Balaguer *et al.*, 1999). In addition, an *in vivo* assay using transgenic zebrafish embryos expressing GFP under the control of ER-regulated *cyp19a1b* promoter was further used to assess an impact at the organism level at selected sites (Brion *et al.* 2012). Information provided by the different bioassays is discussed in regard to 1) the frequency of detection and the quantification of estrogenic activity and 2) the relative contribution of selected xeno-estrogens identified in the samples, by using both mass-balance analysis and concentration-addition prediction (Loewe et Muischnek, 1926).

MATERIAL AND METHODS

Chemicals and reagents

17 β -estradiol (E2), ethinylestradiol (EE2) and hydroxy-tamoxifen (OH-TAM) were purchased from Sigma-Aldrich (France). Dimethylsulfoxide (DMSO), Leibovitz 15 culture medium (L-15), fetal calf serum (FCS), 4-(2-hydroxy-ethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), epidermal growth factor (EGF), G418, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) and D-luciferin were purchased from Sigma Aldrich (St-Quentin Fallavier, France); Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM HG) powder, F-12 nutrient mixture (Ham's F12) powder, penicillin and streptomycin were from Gibco (France); insulin, hygromycin B and sodium bicarbonate were from Dominique Dutscher (France).

Study sites, sampling and extraction procedure

Two sets of Danube River water samples collected and prepared during the Joint Danube Survey 3 (JDS, 22 samples) and Novi Sad (NS, 3 samples) campaigns were used in this study. Site description and collection and preparation of water samples were described in detail previously (Neale *et al.* 2015, König *et al.* 2017). In brief, sampling of the JDS was carried out between August and September 2013 in Danube River and some tributaries from Austria to Romania (Liška *et al.*, 2015, Neale *et al.*, 2015). The city of Novi Sad city (300 000 inhabitants, Serbia), located on the Danube River, was selected to investigate the impact of untreated municipal effluent release on the Danube river (König *et al.*, 2017). The Novi Sad sites investigated were selected as follow: NS1 2 km upstream the effluent release, NS2 200 m downstream the effluent release, and NS3 7 km downstream the effluent release. In both case-studies, the samples were collected using a on-site solid phase extraction (SPE) device designed to sample and extract large volume (LV) of water on

site (LVSP device, Schulze *et al.*, 2017). About 500 L of water were extracted and concentrated at each site in JDS (Neale *et al.*, 2015), and 850 L to 1000 L at NS sites (König *et al.* 2017). The organic extracts were reduced to dryness before shipping, then resuspended in DMSO and stored at -20°C before bio-analysis. Further information on study sites, sampling procedures and extraction methods are provided in Neale *et al.* (2015) and König *et al.* (2017).

In vitro bioassays

The zebrafish *in vitro* assays were derived from the zebrafish liver (ZFL) cell line. ZFL cells were stably transfected first by an ERE-driven luciferase gene, yielding the ZELH cell line, and then by zfER β 2 subtype yielding the ZELH β 2 cell lines (Cosnefroy *et al.*, 2012). Establishment of this cell model and its response to different classes of well-known xeno-estrogens have been previously described. In addition, we used the human-derived MELN cell line (Balaguer *et al.*, 1999) kindly provided by Dr. Patrick Balaguer (INSERM Montpellier, France). The MELN cells are derived from the breast cancer MCF-7 cells, which endogenously express the hER α , but no functional hER β (P. Balaguer, *personal communication*), and were stably transfected with an ERE-driven firefly luciferase reporter gene.

Conditions for routine cell culture and exposure to chemicals have been detailed previously (Sonavane *et al.*, 2016). Briefly, ZELH-zfERs cells were seeded in 96-well white opaque culture plates (Greiner CellStar™, Dutscher, France) at 25,000 cells per well in phenol red free LDF-DCC medium (containing L-15 50%, DMEM HG 35%, Ham's F12 15%, HEPES 15 mM, 0.15 g/L sodium bicarbonate, 0.01 mg/mL insulin, 50 ng/mL EGF, 50 U/mL penicillin and streptomycin antibiotics, 5% v/v stripped FCS). MELN were seeded at 80,000 cells per well in steroid- and phenol red-free DMEM medium. Cells were left to adhere for 24 h, and then exposed for either 72 h at 28 °C for zebrafish cells or 16h at 37°C for MELN cells. Cell were exposed in triplicates to serial dilutions of sample extracts to obtain a final DMSO concentration in the well plate of 0.5% (v/v). To assess anti-estrogenic activity at selected sites, ZELH β 2 and MELN cells were co-exposed to the sample in presence of 0.1 nM E2, i.e. a concentration saturating 80% to 100% of ER. Each plate included both solvent and positive controls. After exposure, culture medium was removed and replaced by 50 μ l per well of medium containing 0.3 mM D-luciferin. The luminescence signal was measured in living cells using a microtiter plate luminometer (Synergy H4, BioTek). The effect of samples on cell viability was assessed by using the 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium

bromide (MTT) assay (Mosmann 1983). After cell exposure, culture medium was removed and replaced by 100 μ L of medium containing 0.5 mg/mL MTT. Cells were incubated for 1 h to 3 h. In metabolically active cells, MTT is reduced onto a blue formazan precipitate, which is dissolved by adding 100 μ L of DMSO after removal of MTT containing medium. Plates were read at 570 nm against a 640 nm reference wavelength on a microplate reader (KC-4, BioTek Instruments, France) and results are expressed as absorbance relative to control cells.

In vivo zebrafish bioassay

The estrogenic activity of Novi Sad samples was assessed *in vivo* using the transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish line recently developed (Tong *et al.*, 2009) and well characterized with different classes of xeno-estrogen compounds (Brion *et al.*, 2012). The assay procedure for sample testing has been described in Sonavane *et al.* (2016). In brief, 15 fertilized transgenic eggs were selected for each experimental group and exposed for 96 h in 15 ml of acclimated water in glass crystallizers. Serial dilutions were tested with a final volume of solvent (DMSO) of 0.1% v/v, a concentration without effects on embryo development or GFP expression. In each experimental series, positive (EE2 0.05 nM) and DMSO controls were included as separate experimental groups. Exposed embryos were incubated at 28 °C, under semi-static conditions with daily complete renewal of medium. After the exposure period, each zebrafish larva was photographed using a Zeiss AxioImager.Z1 microscope equipped with an AxioCam Mrm camera (Zeiss GmbH, Gottingen, Germany) to measure GFP expression in the brain. Image analysis was performed using the ImageJ software, and fluorescence data was treated exactly as previously described (Brion *et al.*, 2012).

Data analysis

Sample concentration data are expressed in relative enrichment factor (REF) that considers sample enrichment in LVSPÉ and further dilution in the test system. For all data, the reporter gene signal (luciferase activity in the *in vitro* bioassays and GFP intensity in the *in vivo* bioassay) was normalized between 0 and 1, as described in Eq. 1, with $signal_{sample}$ the signal of the tested sample, $signal_{control}$ the signal of the solvent control and $signal_{positive}$ the signal of the positive control:

$$Response = \frac{signal_{sample} - signal_{control}}{signal_{positive} - signal_{control}} \quad (1)$$

Concentration-response curves were fitted to all replicates pooled together with a minimum of 2 independent experiments using Hill equation in RegTox 7.5 Microsoft Excel™ macro (freely available at http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_download.html). Positive control 20 (PC20, concentration corresponding to 20% response of that of positive control) were estimated for samples reaching 20% effect by fixing the minimum and the maximum of the sample response to 0 and 1, respectively, and fixing the slope to the one of E2. The biological estradiol-equivalent (Bio-EEQ) was calculated as the ratio of EC20/IC20 of positive control (E2 for estrogenic activity, OH-TAM for anti-estrogenic activity) to the PC20 of the sample, expressed in EEQ ng/L, as presented in equation. 2:

$$Bio - EEQ = \frac{EC20/IC20_{positive\ control}}{PC20_{sample}} \quad (2)$$

To assess the contribution of detected chemicals to the biological response observed, chemical equivalents (Chem-EEQ) were calculated for estrogenic chemicals. The Chem-EEQ was calculated as the sum of the concentration of each active chemical weighted by its relative estrogenic potency (REP), as presented in equation (3):

$$Chem - EEQ = \sum_i^n REP_i \times C_i \quad (3)$$

The REP defined as the ratio of PC20 of E2 to the PC20 of the chemical, or EC50 when no PC20 was available (indicated in Tab. SI4). The contribution of the active chemicals to the biological response was assessed by dividing the Chem-EEQ by the Bio-EEQ, expressed in %. As an alternative method for comparing chemical and bioassay data, the concentration addition (CA) model (Loewe et Muischnek, 1926) was used to predict the combined effects of identified estrogenic chemicals and compared with observed activity. For that purpose, single chemical data were fitted with logit non-linear regression model in GraphPad Prism v.5. The logit parameters derived were then used in an Excel template to predict the combined estrogenic response based on the concentration and mixture ratios of the active chemicals identified in each sample. For simplification purpose, only the active chemicals contributing to more than 5% of the predicted response at REF=1 were used in CA prediction. Logit equation and the Excel template were kindly provided by Martin Scholze (Brunel University, UK).

RESULTS

In vitro and in vivo estrogenic activity of Danube water extracts

Estrogenic activity in JDS and NS samples derived from MELN and ZELH β 2 cell bioassays are presented in Fig. 1. The individual concentration-response curves are given in Fig. SI 1 for MELN cells, and in Fig SI 2 for ZELH β 2 cells. In the present study, we re-evaluated MELN JDS raw data with Hill model, and found a good agreement with the Bio-EEQ derived based on EC10 value and linear regression model published in Neale *et al.* (2015) (data not shown). Therefore, Bio-EEQ for JDS samples on MELN cells in the present study refer to data from Neale *et al.* (2015).

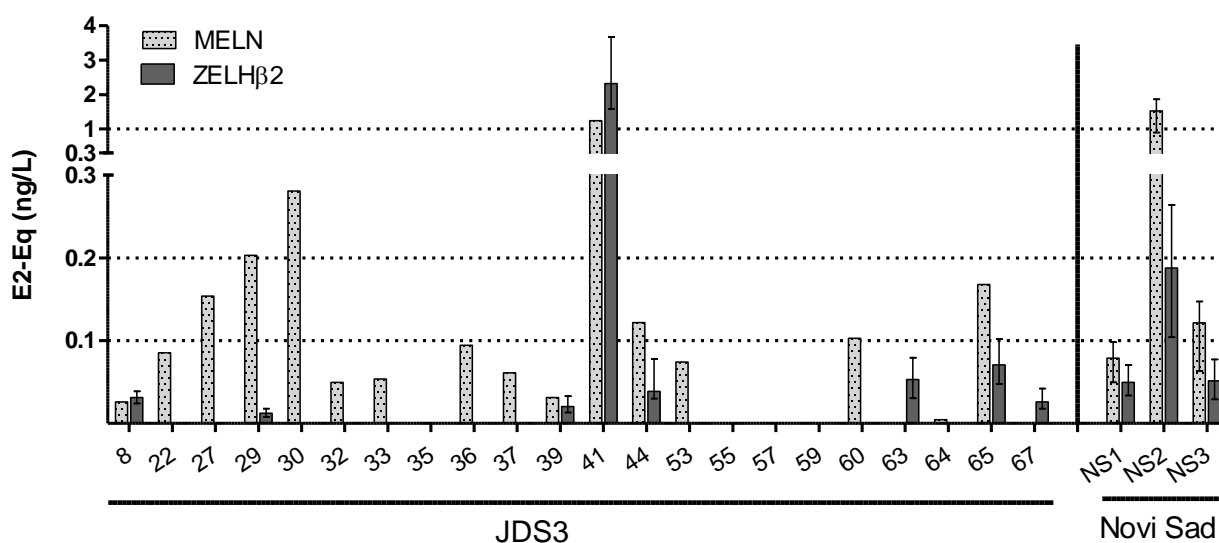


Figure 1: Estrogenic activity of JDS and Novi Sad samples in MELN (bright grey) and ZELH β 2 (dark grey). The error bars represent the upper or lower 95% CI on the Bio-EEQ. MELN data originate from Neale *et al.* (2015).

Overall, in most samples and for both bioassays, the estrogenic activity measured was relatively low, mostly below 0.3 EEQ ng/L, which may reflect the high dilution context of the Danube. Higher estrogenic activity was noted at JDS41 site, located at the confluence of the Morava river, a tributary of the Danube, and at NS2 site, located 200 m downstream from Novi Sad effluent release.

Although overall response patterns were similar between human and zebrafish assay, some differences could be highlighted. In MELN cells, 15 out of 22 JDS samples were positive with an estrogenic activity ranging from 0.0046 EEQ ng/L (JDS64) to 1.24 EEQ ng/L (JDS41). In comparison, only 8 samples were active on ZELH β 2 cells with an estrogenic activity ranging from

0.012 (JDS29) to 2.3 EEQ ng/L (JDS41). Interestingly, 10 samples had similar response pattern on both bioassays (6 active and 4 inactive), whereas 2 samples (i.e. JDS63, 67) were selectively active in ZELH β 2 cells and 10 (e.g. JDS22, 27, 30) were only active in MELN cells.

In Novi Sad samples, the estrogenic activity pattern was similar between MELN and ZELH β 2 assays, with a peak of activity detected just after the effluent release (NS2 site) and then a dilution of the signal at the downstream NS3 site. However, it is noticeable that NS2 sample showed higher estrogenic activity in MELN cells (1.52 EEQ ng/L) than in ZELH β 2 cells (0.19 EEQ ng/L, Fig. 1). NS samples were also tested *in vivo* in transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryos. NS2 estrogenic activity was confirmed and reached 3.3 EEQ ng/L (Fig. 2C) while NS1 and NS3 were inactive in this assay (data not shown). This result confirms the high estrogenic potency of NS2 sample and its ability to impact fish embryo.

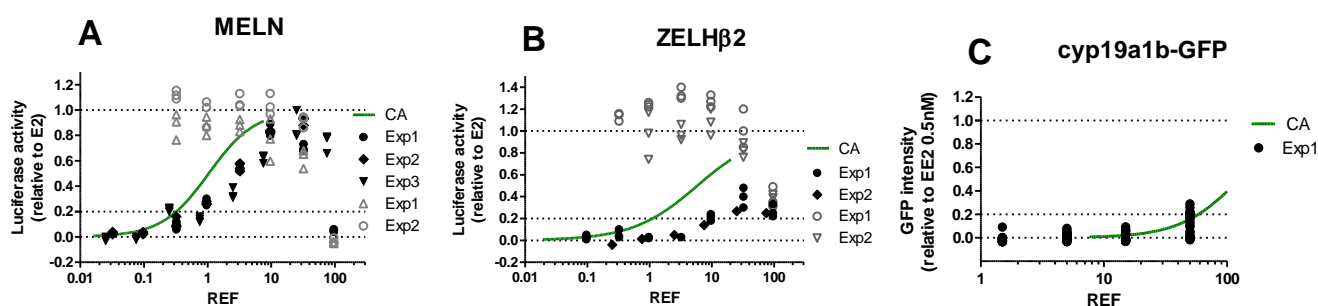


Figure 2: Estrogenic (filled symbols) and antiestrogenic (empty symbols) activities of Novi Sad NS2 sample on MELN cells (A), ZELH β 2 cells (B) and in transgenic zebrafish embryos (C). The green line represents concentration addition (CA) prediction based on main active xeno-estrogens identified in the sample (contribution >5% of the response at REF=1)

To evaluate the possible presence of antiestrogenic compounds in NS extracts that could have differentially influenced the response in *in vitro* bioassays, we further assessed the anti-estrogenic activity of NS samples in MELN and ZELH β 2 cells. In both assays, an inhibiting effect in NS2 was noted but at much higher REF concentrations (i.e. > 30 REF) than those required to exert an agonistic response, i.e. > 3 REF (Fig 2A and 2B). Similar patterns were noted for NS2 and NS3 (Fig.2 and SI 3). Therefore, although interferences of ER-specific inhibiting substances cannot be excluded in ZELH cells, they had likely minor impact on the response.

The active chemicals identified only partially explained the fish-specific responses

Among the more than 100 chemicals detected in both case-studies (König *et al.*, 2017; Neale *et al.*, 2015), information on *in vitro* and *in vivo* estrogenic activity was available for up to 36 chemicals, among which 6 to 9 were estrogenic in at least one bioassay (Neale *et al.*, 2017). The concentrations of 9 active chemicals at the 25 sampling sites are presented in Tab. SI 3. The REP values of these xeno-estrogens (provided in Tab. SI 4) were used to calculate chemical estrogen-equivalents (Chem-EEQ) and the ratio of Chem-EEQ to Bio-EEQ was used to determine the contribution of the xeno-estrogens to the biological response measured.

In MELN cells, estrone was the main potent xeno-estrogen identified in JDS samples, along with genistein (Neale *et al.*, 2017). They explained 14% to 163% of biological response observed in most samples, except at JDS27 and JDS60 (<1%, no estrone detected), and at JDS64 (409%, very weak estrogenic response) (Tab. SI 1). Based on chemical information, 5 samples were predicted to have an estrogenic activity ranging from 0.18 to 0.58 ng EEQ ng/L in MELN cells, but were not detected due to cytotoxic masking effect. Conversely, JDS27 and JDS60 were active in MELN cells albeit no significant contributors could be identified.

In addition to the classical mass-balance approach, the CA model was used to predict the combined effects of individual xeno-estrogens at the mixture ratio of each sample. The predicted estrogenic response was plotted against observed data for JDS samples (Fig. SI 1 and SI 2) and for Novi Sad samples (Fig. 2 and Fig. SI 3). The estrogenic activity of 2 samples were in good agreement with CA up to 20% (JDS8, 33), in line with the mass-balance analysis results (73% to 74%). CA clearly underestimated the estrogenic response of 5 samples (JDS29, 30, 41, 44, 65), again in line with the mass-balance analysis (<50% of response explained). However, there is more uncertainty on the correlation between and observed response for JDS22, 32, 36, 39 likely because of the very weak response measured.

In ZELH β 2 cells, estrone and genistein explained 11% to 136% of the observed biological response, except for JDS29 (503%), JDS39 (306%) and JDS67 (214%) for which the biological activity was lower than predicted by chemical data. 11 samples were predicted to be active in ZELH β 2 cells with levels ranging from 0.22 to 0.65 EEQ ng/L, but were not detected (Tab. SI 1). The active samples were further compared with the CA prediction curve. As in MELN cells, the maximal

induction never reached more than 50% ER maximal response. Comparison of observed and CA predicted responses indicates that the samples having a mass balance between 77% and 136% (JDS8, 44, 63, 65) were in good agreement with CA prediction up to 20%, while CA overestimated the estrogenic response of JDS29, 39 and 67, in line with the mass-balance analysis.

In Novi Sad case-study, genistein was detected at all sites but explained only a small fraction of the observed response (Fig. 3, Tab. SI 2). In NS2 sample, steroidal estrogens (E1, E2, E3) were identified as the main drivers of response (Fig. 3). The xeno-estrogens in NS2 sample were adequately detected in MELN cells (contribution of 88% to the biological response) and in zebrafish embryos (108% of the biological response explained). However, in ZELH β 2 cells the response measured was about 6 times lower than predicted based on Chem-EEQ, suggesting an influence of non-identified chemicals that negatively interfered with the estrogenic response. The observed and CA predicted responses for NS2 sample (green line of Fig. 2) were in good agreement up to 20% in MELN cells and in zebrafish embryos, while CA clearly overestimated ZELH β 2 response.

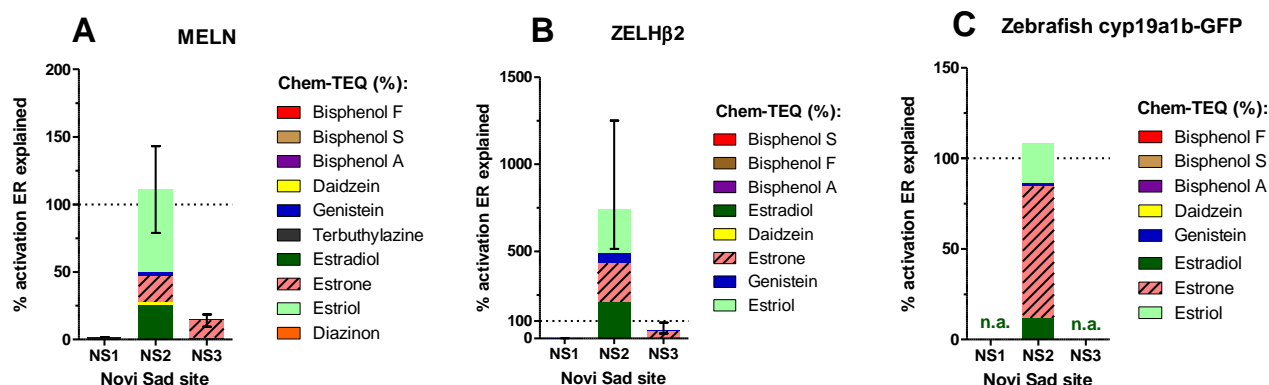


Figure 3: Contribution of identified xeno-estrogens to the estrogenic activity measured in Novi Sad samples for MELN (A), zebrafish *cyp19a1b*-GFP (B) and ZELH β 2 (C) cells. Values indicate the Bio-EEQ calculated (EEQ ng/L). n.a.: not active. The error bars are calculated by dividing the Chem-EEQ by the upper or lower 95% CI of the Bio-EEQ.

DISCUSSION

While human-based bioassays are widely applied to monitor xeno-estrogens in environmental matrices (Kunz *et al.*, 2015; Leusch *et al.*, 2017), very few studies investigated possible inter-species differences in bio-monitoring using fish-based bioassays (Ihara *et al.*, 2015;

Rutishauser *et al.*, 2004; Sonavane *et al.*, 2016). Therefore, the aim of the study was to compare the capacity of human and zebrafish-based *in vitro* bioassays to quantify estrogenic activity in river water samples.

Taking the Danube as case-study representative a of large river with high dilution, our results show that most water samples screened had a very low estrogenic activity (mostly below <0,2 EEQ ng/L) and that MELN cells performed better to detect the low levels of estrogenic activity than ZELH β 2 cells. 19 out of 25 samples were active in MELN cells against 10 out of 25 in ZELH β 2 cells. Interestingly, 10 samples were only active in MELN cells, while 2 were only detected in ZELH β 2 cells. We previously reported different response of MELN and ZELH β 2 cells for POCIS extracts deployed in French rivers (Sonavane *et al.*, 2016). 8 out 20 samples were only estrogenic in ZELH β 2 cells, which suggested the presence of xeno-estrogens specifically active in the zebrafish-based bioassay. In the current study, information on active chemicals were available. Estrone and/or genistein were the most frequently detected xeno-estrogens and the main contributors to the response measured, in agreement with previous studies investigating surface water estrogenic activity using *in vitro* bioassays (Alvarez *et al.*, 2013; Conley *et al.*, 2017). In JDS samples, since estrone and/or genistein were detected in most of the samples that were selectively active in MELN or ZELH β 2 cells, it is likely that other non-identified compounds present in the extracts interfered with ER response within the cells.

We recently compared MELN and ZELH β 2 cells response to bisphenol A and genistein in mixture with 10 non-estrogenic environmentally relevant chemicals (Serra *et al.*, in prep). Among the 10 non-estrogenic chemicals, some pollutants specifically inhibited the E2-induced luciferase activity in ZELH β 2 cells but not in MELN cells (e.g. triphenyl phosphate, propiconazole). As a result, these inhibiting chemicals decreased the expected ZELH β 2 response when mixed with the xeno-estrogens, showing interactions of chemicals having opposite effects on the bioassay response (Serra *et al.*, in prep). Interestingly, differences between fish ER and human ER α estrogenic activity have been previously observed for effluent samples (Ihara *et al.*, 2014), and the anti-estrogenic activity, more pronounced either in the fish or human assay, was suggested to contribute to the differences observed (Ihara *et al.*, 2015). In the current study, 1/3 (3/8) of the active JDS samples on ZELH β 2 cells had a decreased estrogenic response compared to CA prediction curve (mass-

balance > 200%), whenever an activity was detected, suggesting a possible negative interaction on ER response.

Despite distinct capacities to detect low levels of estrogenic activity, both cell lines quantified a high estrogenic activity at JDS41 and NS2 sites. JDS41 site is located at the confluence of the Danube and the Velika Morava, in Serbia, and was identified as a highly contaminated site in the JDS survey (Liška *et al.*, 2015; Neale *et al.*, 2015). The estrogenic activity measured in MELN cells (0.74 EEQ ng/L) and in ZELH β 2 cells (2.3 EEQ ng/L) was higher than predicted based on the identified xeno-estrogens (Chem-EEQ < 0.3 EEQ ng/L), showing the complementarity of both chemical and biological approaches to assess contamination by xeno-estrogens at that site. NS2 site was situated 200m downstream the untreated effluent release of Novi Sad city (300 000 inhabitants, König *et al.*, 2017). Compared with NS1 and NS3, a higher estrogenic activity was quantified for NS2 site in MELN cells (1.52 EEQ ng/L) and in ZELH β 2 cells (0.19 EEQ ng/L), in agreement with previous reported results in *in vitro* bioassays hER α -based GenBLAzer (0.26 EEQ ng/L) and BG1Luc4E(2) (0.67 EEQ ng/L) (König *et al.*, 2017). E2, E1, and E3 were identified as the main driver of response. While MELN cells quantified well the steroid estrogens additive effects, however, the estrogenic activity measured in ZELH β 2 cells was much lower than predicted (mass-balance > 700%). In this sample, the anti-estrogenic activity was assessed and revealed a low inhibition of E2-induced response occurring at high REF. Thus, the deviation of predicted response does not seem to be the consequence of co-occurrence of estrogenic and anti-estrogenic activity.

To further investigate the zebrafish-based bioassay response, transgenic *cyp19a1b*-GFP zebrafish embryos were used to assess the *in vivo* effect of NS samples (Brion *et al.*, 2012). This transgenic zebrafish model has been previously successfully used to quantify estrogenic activity of surface waters (Sonavane *et al.*, 2016) and effluents samples (Neale *et al.*, 2017b). In this transgenic fish, GFP is under the control of *cyp19a1b* promoter which is an ER-regulated gene that encodes for the brain aromatase responsible for the conversion of steroidal androgens into estrogens (Pellegrini *et al.*, 2005). The use of the zebrafish *in vivo* bioassay confirmed the estrogenic activity of NS2 sample, which was in good agreement with the expected response based on CA. Thus, the different performance of ZELH β 2 cells compared to MELN cells for NS2 sample might be a bioassay-specific pattern. ZELH β 2 cells originate from zebrafish liver (ZFL) cells and remain metabolically inducible with similar response profile as zebrafish primary hepatocytes,

but with different response profile compared to MELN cells (Creusot *et al.*, 2015; Le Fol *et al.*, 2015). It is likely that bioassay-specific factors, such as metabolic capacity and sensitivity to co-occurring chemicals in the samples may have contributed to the different response observed in ZELH β 2 and MELN cells.

By comparing human and zebrafish-based *in vitro* bioassays, we observed that both cell lines performed qualitatively differently to quantify estrogenic activity in samples issues from a large river with high dilution with both detected well the highest contaminated sites. This observation confirmed previous results obtained on the same models assessing passive sampling water extracts (Sonavane *et al.*, 2016), and with other fish cell lines applied to effluents (Ihara *et al.*, 2014; Rutishauser *et al.*, 2004). The different performances of *in vitro* bioassays could not be explained by the xeno-estrogens identified, suggesting that other factors such as bioassay-specific interactions and/or presence of unidentified active substances influenced the ER response to the complex mixtures. Further research would be warranted to better characterized the underlying reasons for fish-specific bioassay response.

REFERENCES

- Altenburger, R., Ait-Aïssa, S., Antczak, P., Backhaus, T., Barceló, D., Seiler, T.-B., Brion, F., Busch, W., Chipman, K., López de Alda, M., Umbuzeiro, G. de A., Escher, B.I., Falciani, F., Faust, M., Focks, A., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Jäger, F., Jahnke, A., Kortenkamp, A., Krauss, M., Lemkine, G.F., Munthe, J., Neumann, S., Schymanski, E.L., Scrimshaw, M., Segner, H., Slobodnik, J., Smedes, F., Kughathas, S., Teodorovic, I., Tindall, A.J., Tollefsen, K.E., Walz, K.-H., Williams, T.D., Van den Brink, P.J., van Gils, J., Vrana, B., Zhang, X., Brack, W., 2015. Future water quality monitoring--adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. *Sci. Total Environ.* 512–513, 540–551. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.057
- Alvarez, D.A., Shappell, N.W., Billey, L.O., Bermudez, D.S., Wilson, V.S., Kolpin, D.W., Perkins, S.D., Evans, N., Foreman, W.T., Gray, J.L., Shipitalo, M.J., Meyer, M.T., 2013. Bioassay of estrogenicity and chemical analyses of estrogens in streams across the United States associated with livestock operations. *Water Res.* 47, 3347–3363. doi:10.1016/j.watres.2013.03.028
- Balaguer, P., Francois, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A.M., Pons, M., Nicolas, J.C., Casellas, C., 1999. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci. Total Environ.* 233, 47–56. doi:10.1016/S0048-9697(99)00178-3
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.-K., Chung, B., Kah, O., 2012. Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures *In vivo* Using Transgenic (cyp19a1b-GFP) Zebrafish Embryos. *Plos One* 7, e36069. doi:10.1371/journal.pone.0036069
- Conley, J.M., Evans, N., Cardon, M.C., Rosenblum, L., Iwanowicz, L.R., Hartig, P.C., Schenck, K.M., Bradley, P.M., Wilson, V.S., 2017. Occurrence and *In vitro* Bioactivity of Estrogen, Androgen, and Glucocorticoid Compounds in a Nationwide Screen of United States Stream Waters. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4781–4791. doi:10.1021/acs.est.6b06515
- Cosnefroy, A., Brion, F., Guillet, B., Laville, N., Porcher, J.M., Balaguer, P., Aït-Aïssa, S., 2009. A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 23, 1450–1454. doi:10.1016/j.tiv.2009.07.003
- Cosnefroy, A., Brion, F., Maillot-Maréchal, E., Porcher, J.-M., Pakdel, F., Balaguer, P., Aït-Aïssa, S., 2012. Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 125, 439–449. doi:10.1093/toxsci/kfr297
- Creusot, N., Brion, F., Piccini, B., Budzinski, H., Porcher, J.M., Aït-Aïssa, S., 2015. BFCOD activity in fish cell lines and zebrafish embryos and its modulation by chemical ligands of human aryl hydrocarbon and nuclear receptors. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 16393–16404. doi:10.1007/s11356-014-3882-8
- Escher, B.I., Allinson, M., Altenburger, R., Bain, P.A., Balaguer, P., Busch, W., Crago, J., Denslow, N.D., Dopp, E., Hilscherova, K., Humpage, A.R., Kumar, A., Grimaldi, M., Jayasinghe, B.S., Jarosova, B., Jia, A., Makarov, S., Maruya, K.A., Medvedev, A., Mehinto, A.C., Mendez, J.E., Poulsen, A., Prochazka, E., Richard, J., Schifferli, A., Schlenk, D., Scholz, S., Shiraish, F., Snyder, S., Su, G., Tang, J.Y.M., van der Burg, B., van der Linden, S.C., Werner, I., Westerheide, S.D., Wong, C.K.C., Yang, M., Yeung, B.H.Y., Zhang, X., Leusch, F.D.L., 2014.

- Benchmarking Organic Micropollutants in Wastewater, Recycled Water and Drinking Water with *In vitro* Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1940–1956. doi:10.1021/es403899t
- Ihara, M., Ihara, M.O., Kumar, V., Narumiya, M., Hanamoto, S., Nakada, N., Yamashita, N., Miyagawa, S., Iguchi, T., Tanaka, H., 2014. Co-occurrence of Estrogenic and Antiestrogenic Activities in Wastewater: Quantitative Evaluation of Balance by *in vitro* ER α Reporter Gene Assay and Chemical Analysis. *Environ. Sci. Technol.* 48, 6366–6373. doi:10.1021/es5014938
- Ihara, M., Kitamura, T., Kumar, V., Park, C.-B., Ihara, M.O., Lee, S.-J., Yamashita, N., Miyagawa, S., Iguchi, T., Okamoto, S., Suzuki, Y., Tanaka, H., 2015. Evaluation of Estrogenic Activity of Wastewater: Comparison Among *In vitro* ER α Reporter Gene Assay, *In vivo* Vitellogenin Induction, and Chemical Analysis. *Environ. Sci. Technol.* 49, 6319–6326. doi:10.1021/acs.est.5b01027
- Jarošová, B., Erseková, A., Hilscherová, K., Loos, R., Gawlik, B.M., Giesy, J.P., Bláha, L., 2014. Europe-wide survey of estrogenicity in wastewater treatment plant effluents: the need for the effect-based monitoring. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 10970–10982. doi:10.1007/s11356-014-3056-8
- Kiyama, R., Wada-Kiyama, Y., 2015. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environ. Int.* 83, 11–40. doi:10.1016/j.envint.2015.05.012
- König, M., Escher, B.I., Neale, P.A., Krauss, M., Hilscherová, K., Novák, J., Teodorović, I., Schulze, T., Seidensticker, S., Kamal Hashmi, M.A., Ahlheim, J., Brack, W., 2017. Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of *in vitro* bioassays and chemical analysis. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 220, 1220–1230. doi:10.1016/j.envpol.2016.11.011
- Kunz, P.Y., Kienle, C., Carere, M., Homazava, N., Kase, R., 2015. *In vitro* bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 106, 107–115. doi:10.1016/j.jpba.2014.11.018
- Le Fol, V., Aït-Aïssa, S., Cabaton, N., Dolo, L., Grimaldi, M., Balaguer, P., Perdu, E., Debrauwer, L., Brion, F., Zalko, D., 2015. Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-s in zebrafish and human *in vitro* models used for toxicity and estrogenicity screening. *Environ. Sci. Technol.* 49, 3860–3868. doi:10.1021/es505302c
- Leusch, F.D.L., Neale, P.A., Hebert, A., Scheurer, M., Schriks, M.C.M., 2017. Analysis of the sensitivity of *in vitro* bioassays for androgenic, progestagenic, glucocorticoid, thyroid and estrogenic activity: Suitability for drinking and environmental waters. *Environ. Int.* 99, 120–130. doi:10.1016/j.envint.2016.12.014
- Liška, I., Wagner, F., Sengl, M., Deutsch, K., Slobodník, J., 2015. Joint Danube Survey 3. A Comprehensive Analysis of Danube Water Quality. International Commission for the Protection of the Danube River (ICPDR).
- Matthews, J., Celius, T., Halgren, R., Zacharewski, T., 2000. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 223–234. doi:10.1016/S0960-0760(00)00126-6

- Molina-Molina, J.-M., Escande, A., Pillon, A., Gomez, E., Pakdel, F., Cavallès, V., Olea, N., Aït-Aïssa, S., Balaguer, P., 2008. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific *in vitro* bioassays. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 384–395. doi:10.1016/j.taap.2008.07.017
- Neale, P.A., Aït-Aïssa, S., Brack, W., Creusot, N., Denison, M.S., Deutschmann, B., Hilscherova, K., Hollert, H., Krauss, M., Novak, J., Schulze, T., Seiler, T.-B., Serra, H., Shao, Y., Escher, B.I., 2015. Linking *in vitro* Effects and Detected Organic Micropollutants in Surface Water Using Mixture-Toxicity Modeling. *Environ. Sci. Technol.* 49, 14614–14624. doi:10.1021/acs.est.5b04083
- Neale, P.A., Munz, N.A., Aït-Aïssa, S., Altenburger, R., Brion, F., Busch, W., Escher, B.I., Hilscherová, K., Kienle, C., Novák, J., Seiler, T.-B., Shao, Y., Stamm, C., Hollender, J., 2017. Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. *Sci. Total Environ.* 576, 785–795. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.141
- Pellegrini, E., Menuet, A., Lethimonier, C., Adrio, F., Gueguen, M.-M., Tascon, C., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 5th International Symposium on Fish Endocrinology 142, 60–66. doi:10.1016/j.ygcen.2004.12.003
- Pinto, C., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Pakdel, F., Brion, F., Aït-Aïssa, S., Cavallès, V., Bourguet, W., Gustafsson, J.-A., Bondesson, M., Balaguer, P., 2014. Selectivity of natural, synthetic and environmental estrogens for zebrafish estrogen receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 280, 60–69. doi:10.1016/j.taap.2014.07.020
- Routledge, E.J., White, R., Parker, M.G., Sumpter, J.P., 2000. Differential Effects of Xenoestrogens on Coactivator Recruitment by Estrogen Receptor (ER) α and ER β . *J. Biol. Chem.* 275, 35986–35993. doi:10.1074/jbc.M006777200
- Rutishauser, B.V., Pesonen, M., Escher, B.I., Ackermann, G.E., Aerni, H.-R., Suter, M.J.-F., Eggen, R.I.L., 2004. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three *in vitro* assays and chemical analysis of steroids. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 857–864. doi:10.1897/03-286
- Schulze, T., Ahel, M., Ahlheim, J., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Di Paolo, C., Froment, J., Hidasí, A.O., Hollender, J., Hollert, H., Hu, M., Kloß, A., Koprivica, S., Krauss, M., Muz, M., Oswald, P., Pêtre, M., Schollée, J.E., Seiler, T.-B., Shao, Y., Slobodnik, J., Sonavane, M., Suter, M.J.-F., Tollefsen, K.E., Tousova, Z., Walz, K.-H., Brack, W., 2017. Assessment of a novel device for onsite integrative large-volume solid phase extraction of water samples to enable a comprehensive chemical and effect-based analysis. *Sci. Total Environ.* 581, 350–358. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.12.140
- Segner, H., Casanova-Nakayama, A., Kase, R., Tyler, C.R., 2013. Impact of environmental estrogens on fish considering the diversity of estrogen signaling. *Gen. Comp. Endocrinol.* 191, 190–201. doi:10.1016/j.ygcen.2013.05.015
- Sonavane, M., Creusot, N., Maillot-Maréchal, E., Péry, A., Brion, F., Aït-Aïssa, S., 2016. Zebrafish-based reporter gene assays reveal different estrogenic activities in river waters compared to a conventional human-derived assay. *Sci. Total Environ.* 550, 934–939. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.187

- Sumpter, J.P., 2005. Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 33, 9–16. doi:10.1002/aheh.200400555
- Sumpter, J.P., Jobling, S., 2013. The occurrence, causes, and consequences of estrogens in the aquatic environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 249–251. doi:10.1002/etc.2084
- Tohyama, S., Miyagawa, S., Lange, A., Ogino, Y., Mizutani, T., Ihara, M., Tanaka, H., Tatarazako, N., Kobayashi, T., Tyler, C.R., Iguchi, T., 2016. Evolution of estrogen receptors in ray-finned fish and their comparative responses to estrogenic substances. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 158, 189–197. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.12.009
- Tong, S.-K., Mouriec, K., Kuo, M.-W., Pellegrini, E., Gueguen, M.-M., Brion, F., Kah, O., Chung, B., 2009. A *cyp19a1b*-GFP (Aromatase B) Transgenic Zebrafish Line That Expresses GFP in Radial Glial Cells. *Genesis* 47, 67–73. doi:10.1002/dvg.20459
- Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M., Kuiper, R.V., Legler, J., Murk, T.A.J., Peijnenburg, W., Verhaar, H.J.M., de Voogt, P., 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* 59, 511–524. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.12.053

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Table SI 1: Biological activity of Joint Danube Survey (JDS) samples on MELN and ZELHβ2 cells.

n.a.: not active. Bio-EEQ and Chem-EEQ for MELN cell line originate from Neale *et al.* (2015) and Neale *et al.* (2017), respectively. Bio-EEQ (95% CI) and Chem-EEQ are expressed in EEQ ng/L . The error on the % of response explained (% effect) is calculated by dividing the Chem-EEQ by the upper or lower limit of the 95%-CI of the Bio-EEQ.

JDS	MELN (LOQ : 0.002)			ZELHβ2 (LOQ : 0.002)		
	Bio-EEQ	Chem-EEQ	% effect	Bio-EEQ	Chem-EEQ	% effect
8	0.026	0.019	73%	0.031 (0.024 - 0.039)	0.024	77% (62 - 99)
22	0.085	0.021	24%	n.a.	0.026	-
27	0.15	<LOQ	1%	n.a.	< LOQ	-
29	0.20	0.050	25%	0.012 (0.008 - 0.018)	0.062	503% (347 - 774)
30	0.28	0.040	14%	n.a.	0.051	-
32	0.049	0.040	80%	n.a.	0.054	-
33	0.054	0.040	74%	n.a.	0.051	-
35	n.a.	0.034	-	n.a.	0.042	-
36	0.094	0.021	22%	n.a.	0.026	-
37	0.061	0.024	39%	n.a.	0.030	-
39	0.031	0.051	163%	0.021 (0.013 - 0.033)	0.063	306% (192 - 478)
41	1.24	0.20	16%	2.318 (1.58 - 3.67)	0.244	11% (7 -15)
44	0.12	0.026	21%	0.039 (0.030 - 0.078)	0.032	82% (41 - 107)
53	0.074	0.053	71%	n.a.	0.065	-
55	n.a.	<LOQ	-	n.a.	<LOQ	-
57	n.a.	0.018	-	n.a.	0.022	-
59	n.a.	0.050	-	n.a.	0.062	-
60	0.103	<LOQ	0%	n.a.	<LOQ	-
63	n.a.	0.058	-	0.053 (0.030 - 0.080)	0.072	136% (91 - 238)
64	0.0046	0.019	409%	n.a.	0.023	-
65	0.168	0.066	39%	0.071 (0.048 - 0.10)	0.082	116% (80 - 170)
67	n.a.	0.045	-	0.026 (0.018 - 0.042)	0.056	214%(132 - 311)

Table SI 2: Biological activity of Novi Sad samples *in vitro* on MELN, ZELH β 2 cells and *in vivo* in zebrafish *cyp19a1b*-GFP. Bio-EEQ (95% CI) and Chem-EEQ are in EEQ ng/L. n.a.: not active. The error on the % of response explained (% effect) was calculated by dividing the Chem-EEQ by the upper or lower limit of the 95%-CI of the Bio-EEQ.

	MELN (LOQ: 0.005)			ZELH β 2 (LOQ: 0.008)			Zebrafish <i>cyp19a1b</i> -GFP		
	Bio-EEQ	Chem-EEQ	% effect	Bio-EEQ	Chem-EEQ	% effect	Bio-EEQ	Chem-EEQ	% effect
NS1	0.079 (0.060-0.11)	<LOQ	2% (1.6 – 2.9)	0.050 (0.029-0.065)	<LOQ	2% (1 - 3)	n.a.	0.0011	
NS2	1.52 (1.19-2.15)	1.76	115% (81.7 – 148.1)	0.19 (0.11-0.27)	1.39	743% (514 -1251)	3.3 (1.8 – 4.9)	3.58	108% (73 – 199)
NS3	0.12 (0.095-0.18)	0.021	18% (11.9 – 22.3)	0.051 (0.025-0.074)	0.025	48% (37 - 97)	n.a.	0.127	

Table SI 3: Concentration of the identified estrogenic chemicals in JDS and Novi Sad sampling sites. Data reported in ng/L. MDL: method detection limits (ng/L), n.a.: not analyzed. BPF: bisphenol F, BPS: bisphenol S, BPA: bisphenol A, GEN: genistein, DAID: daidzein, DIAZI: diazinon, TER: terbutylazine. JDS data from Neale *et al.* (2017) and Novi Sad Data from König *et al.* (2017).

	E2	E1	E3	BPF	BPS	BPA	DAID	DIAZI	GEN	TER
CAS	50-28-2	53-16-7	50-27-1	620-92-8	80-09-1	80-05-7	486-66-8	333-41-5	446-72-0	5915-41-3
MDL JDS	0.4	0.1	1	1	8	4.4	7.9	3.3	7.4	6.8
08	<MDL	0,1699	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	2,4318	3,2939
22	<MDL	0,1899	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
27	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	5,1338	2,4303
29	<MDL	0,4497	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	2,7020	<MDL
30	<MDL	0,3498	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	8,3762	<MDL
32	<MDL	0,2798	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	2,0336	<MDL	44,8532	2,4076
33	<MDL	0,3298	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	17,5630	2,2605
35	<MDL	0,2998	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	2,5420	5,6603	3,5126	4,3539
36	<MDL	0,1799	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	5,1338	<MDL
37	<MDL	0,2199	<MDL	<MDL	2,5030	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
39	<MDL	0,4497	<MDL	<MDL	<MDL	9,8075	3,8130	<MDL	4,5934	2,3518
41	<MDL	1,7789	<MDL	<MDL	<MDL	2,0374	8,1344	12,0154	2,7020	<MDL
44	<MDL	0,2199	<MDL	<MDL	<MDL	6,9711	4,3214	<MDL	5,6742	1,6495
53	<MDL	0,4797	<MDL	<MDL	<MDL	1,0986	<MDL	<MDL	<MDL	2,5075
55	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	2,5058
57	<MDL	0,1599	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	2,0723
59	<MDL	0,4397	<MDL	<MDL	<MDL	6,9412	8,1344	<MDL	4,3232	2,2334
60	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	4,5756	<MDL	<MDL	2,0201
63	<MDL	0,5297	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	4,0672	11,1678	<MDL	5,1579
64	<MDL	0,1699	<MDL	<MDL	<MDL	3,2259	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL
65	<MDL	0,5996	<MDL	<MDL	<MDL	1,9975	2,5420	1,5950	<MDL	2,7887
67	<MDL	0,4097	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	2,5366	<MDL	3,6184
MDL	0.3	0.1	1	1	0.2	1	2	1	2	1.6
NS1	<MDL	<MDL	<MDL	<MDL	0.3	4.4	2.2	4.4	2.3	5.0
NS2	0.4	3.1	12.2	2.8	5.1	29.0	470.2	6.2	308.6	3.8
NS3	<MDL	0.2	<MDL	<MDL	0.5	4.5	14.6	4.4	8.1	5.1

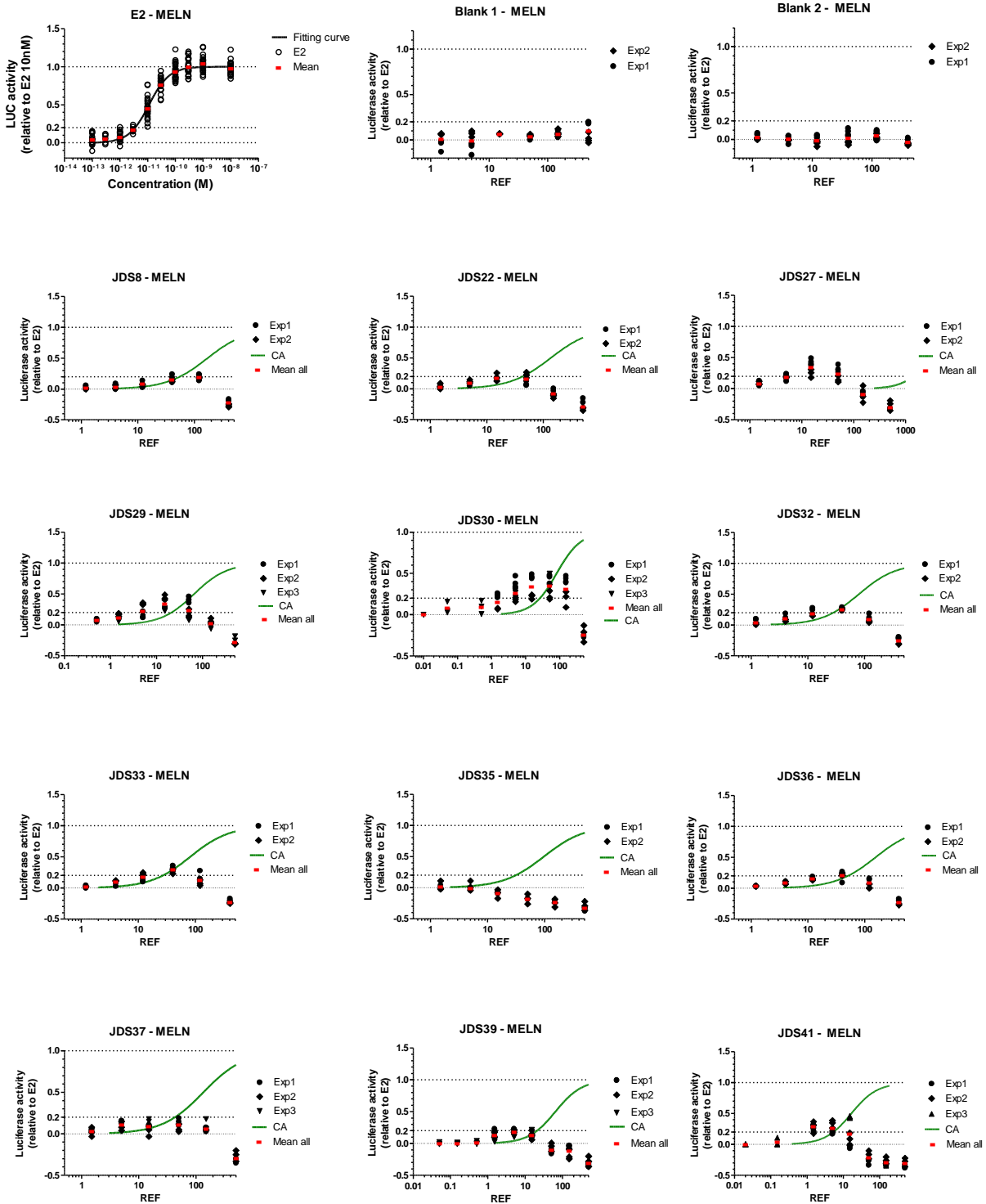
Table SI 4: Relative potency (REP) of the chemicals identified in the samples for each bioassay.

(^a): from Neale *et al.* (2017), (^b): from Molina-Molina *et al.* (2008) and Molina-Molina *et al.*(2013),

(^c) this study, (^d)

Chemical	MELN	ZELHβ2	Zebrafish cyp19a1b-GFP
Estrone	0,110 ^a	0,136 ^c	0,36 ^c
Estriol	0,077 ^a	0,039 ^c	0,01 ^c
Bisphenol F	1.43E-5 ^b	5,14E-06 ^c	4,00E-04 ^c
Bisphenol S	1,18E-06 ^a	6,69E-06 ^c	EC50 > 60 μM ^d
Bisphenol A	3,50E-05 ^a	3,57E-06 ^c	1,44E-04 ^c
Daidzein	6,50E-05 ^a	9,22E-06 ^c	inactive
Diazinon	2,80E-07 ^a	Inactif	Inactive
Genistein	2,00E-04 ^a	3,47E-04 ^c	1,91E-04 ^c
Terbutylazine	1,60E-07 ^a	Inactif	Inactive

Fig SI 1: Dose-response curve of E2 and JDS samples on ZELHβ2 cells. Data are expressed in relative enrichment factor (REF). The red dot represents the mean of all replicates of a minimum of 2 independent experiments. The green line represents CA prediction curve based on the main estrogenic chemical identified (contribution >5% of the response at REF=1).



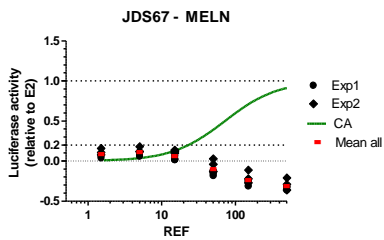
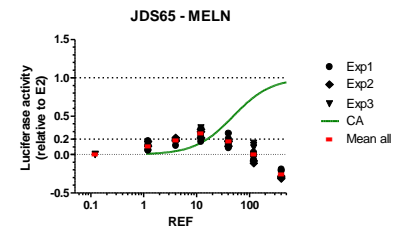
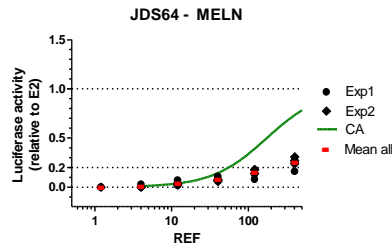
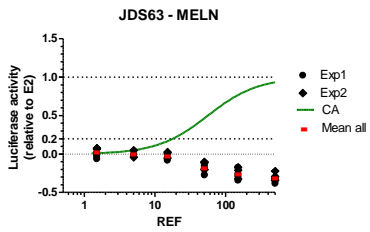
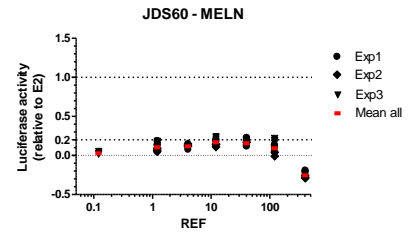
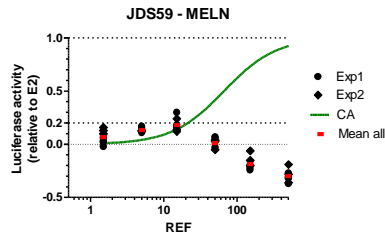
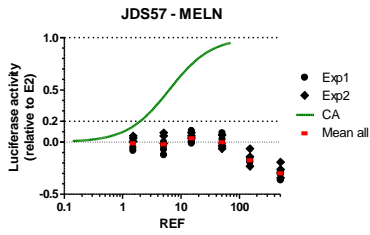
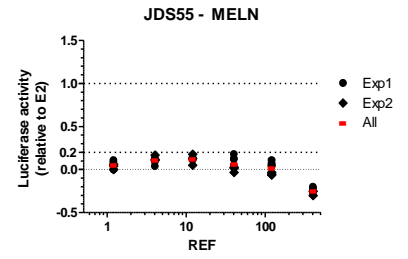
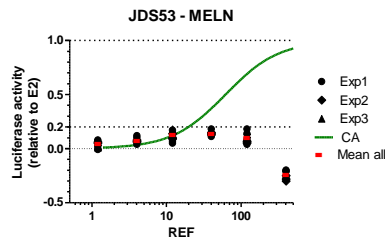
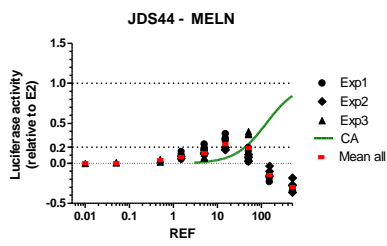
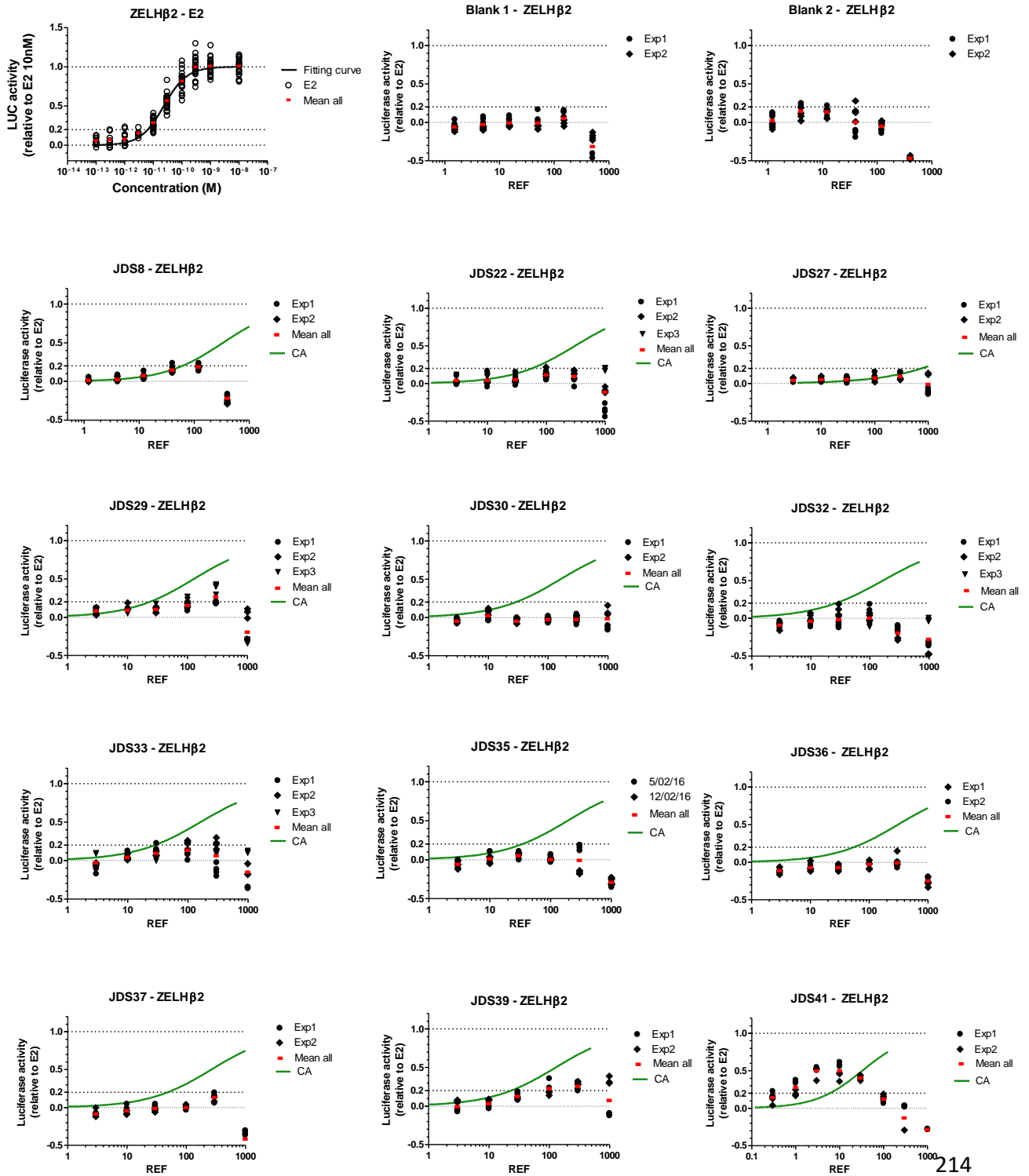


Fig SI 2: Dose-response curve of E2 and JDS samples on ZELH β 2 cells. Data are expressed in relative enrichment factor (REF). The red dot represents the mean of all replicates of a minimum of 2 independent experiments. The green line represents CA prediction curve based on the estrogenic chemical identified. (contribution >5% of the response at REF=1)



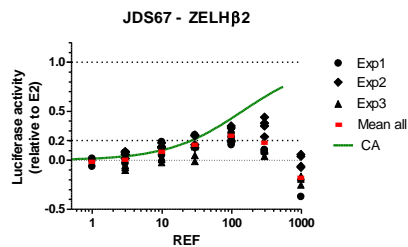
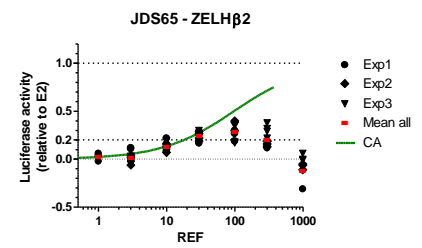
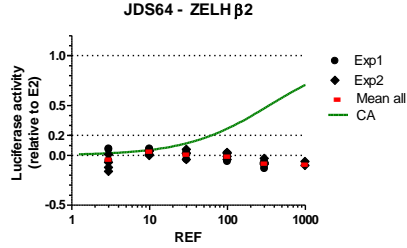
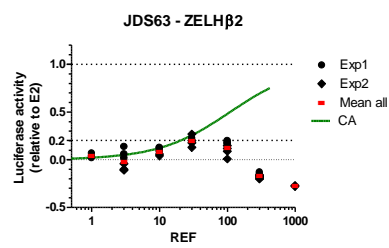
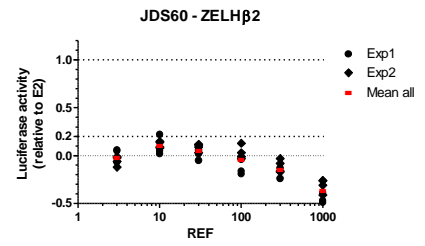
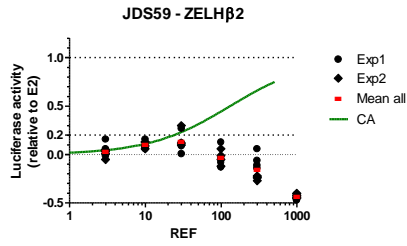
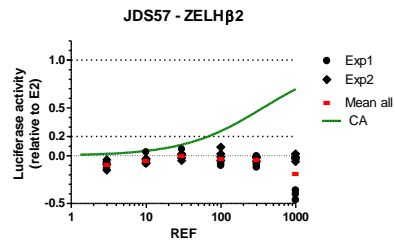
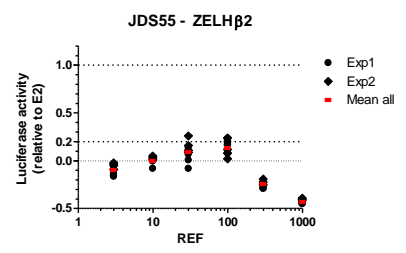
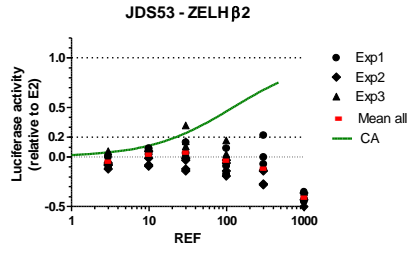
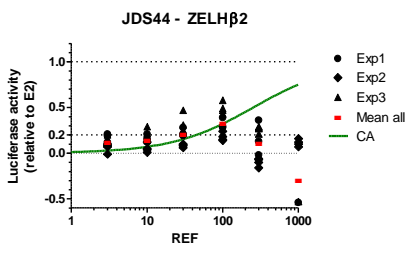
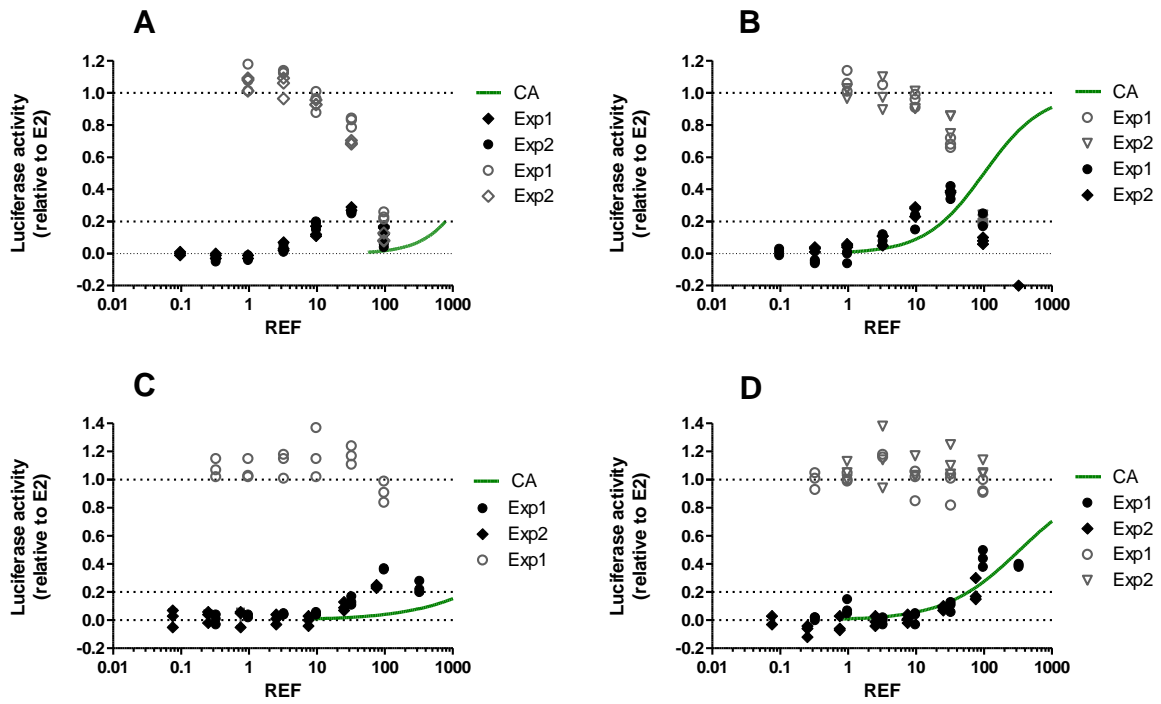


Figure SI3: Estrogenic and anti-estrogenic activity of Novi Sad N1 (A, C) and N3 (B, D) samples on MELN cells (A, B), ZELH β 2 (C, D) cells and zebrafish *cyp19a1b*-GFP embryos. The green line represents concentration addition (CA) prediction based on main active xeno-estrogens identified (contribution >5% of the response at REF=1).



DISCUSSION GÉNÉRALE

Au cours des dernières années, les bio-essais basés sur l'activation de ER se sont avérés être des outils pertinents pour pallier certaines limites de l'analyse chimique ciblée et apporter une meilleure compréhension de la contamination environnementale par les molécules oestrogéniques. La majorité des bio-essais aujourd'hui utilisés dans le bio-monitoring sont des tests de transactivation *in vitro* basés sur des cellules de mammifères exprimant le récepteur des oestrogènes humain ER α . Cependant, des différences de sensibilité entre bio-essais basés sur le ER de l'Homme et des poissons ont été observées pour des xeno-estrogènes seuls (Cosnefroy *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2014), mais aussi pour des échantillons environnementaux (Ihara *et al.*, 2015, Sonavane *et al.*, 2016), montrant le besoin d'améliorer notre compréhension du diagnostic environnemental fourni par ces outils.

Le travail de thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de l'INERIS portant sur l'évaluation des bio-essais *in vitro* et *in vivo* basés sur le poisson zèbre pour quantifier les composés estrogéniques dans l'environnement aquatique. Dans le cadre de la thèse, nous avons évalué les différences inter-modèles avec une attention particulière pour les polluants présents dans les eaux de surface pour lesquels il existait un manque d'information dans les bio-essais. Afin de mieux représenter une situation environnementale, ces polluants ont été testés seuls mais aussi en mélange avec des molécules estrogéniques modèles dans le but d'évaluer leur capacité à moduler la réponse de ER. Ces informations ont ensuite été confrontées aux données des échantillons environnementaux afin de discuter leur apport dans un contexte de bio-surveillance.

EVALUATION DES DIFFERENCES INTER-MODELES : BIO-ESSAIS HUMAIN VS POISSON ZEBRE

Au départ de ce travail de thèse, les bio-essais poisson zèbre avaient été bien caractérisés pour les xéno-estrogènes connus mais relativement peu pour d'autres familles de composés (Brion *et al.*, 2012, Cosnefroy *et al.*, 2012). Sur la base d'un travail de priorisation de polluants environnementaux mené dans le cadre du projet SOLUTIONS (Busch *et al.*, 2016), nous avons évalué l'activité de 34 polluants couvrant diverses familles chimiques (**articles n°2 et 3**).

Une majorité des 34 molécules testées ne présentait aucune activité oestrogénique, quel que soit le bio-essai utilisé. Cependant, dans ce travail, nous observons aussi des différences inter-modèles cellulaires notables en ce qui concerne l'activité ER et anti-ER de certaines molécules seules. Par exemple, le BaP, le TPP et le 4-n-NP étaient sélectivement oestrogéniques dans les

MELN mais anti-estrogéniques dans les ZELH α et ZELH β 2. Si les différences de sensibilité inter-espèces constituent un facteur important (Hotchkiss et al 2008), d'autres facteurs plus spécifiques du contexte cellulaire ont également certainement influencé le devenir des molécules testées et *in fine* leurs activités biologiques. Le BaP, et dans une moindre mesure le TPP étant des activateurs de AhR (Neale *et al.*, 2015), nous avons testé l'hypothèse de l'implication d'une interférence entre voies ER et AhR dans nos modèles.

L'interaction entre AhR et ER a été évaluée dans les bio-essais *in vitro* et *in vivo* avec la dioxine et l'E2 comme ligands modèles (**article n°4**). Les résultats obtenus ont permis de confirmer que la dioxine entraînait, d'une part, des effets anti-estrogéniques dans les bio-essais poissons zèbre, et d'autre part, pro-oestrogéniques dans les cellules MELN. L'induction de la luciférase par la dioxine dans les MELN avait déjà décrite précédemment (Balaguer *et al.*, 1999, These Escande 2007). Dans les ZELH-zfERs, les effets anti-estrogéniques de la dioxine étaient particulièrement marqués dans les ZELH α . De manière intéressante, ce cross-talk négatif a été également retrouvé *in vivo* dans le modèle embryonnaire cyp19a1b-GFP, montrant la bonne cohérence des modèles poisson-zèbre entre eux.

La présence d'une voie AhR inductible dans les cellules ZELH-zfER démontre que la réponse de ER peut être modulée négativement par la présence de ligands de AhR. De manière indirecte, ces résultats pourraient expliquer l'observation d'une activité anti-estrogénique de certaines molécules comme le BaP ou le TPP dans les modèles ZELH-zfERs. Il pourrait être intéressant de suivre leur activité AhR au sein des cellules MELN et ZELH-zfERs pour appuyer cette hypothèse. D'autre part, la voie AhR peut aussi conduire à la production de dérivés hydroxylés du BaP et du TPP, dont certains sont décrit comme interagissant avec ER (Hayakawa *et al.*, 2007; Kojima *et al.*, 2016). Evaluer l'activité des dérivés hydroxylés du TPP apporterait des informations intéressantes sur le rôle du métabolisme de phase I dans l'activité de ces molécules dans les différents systèmes cellulaires.

Le métabolisme des xénobiotiques peut jouer un rôle important dans le devenir des xeno-estrogènes au niveau intra-cellulaire et moduler ainsi leur disponibilité pour lier et activer ER. Des travaux récents portant sur le bisphenol S et la benzophenone 2 ont ainsi montré des capacités de biotransformation différentes entre les cellules ZELH-zfER et MELN, les cellules de poisson zèbre

ayant conservées des capacités métaboliques qualitativement proches de celles de cellules hépatiques primaires de poisson zèbre (Le Fol *et al.*, 2015) et de larves de poisson zèbre (Le Fol *et al.*, 2017b). Si ces résultats vont dans le sens de nos conclusions en termes de proximité des bio-essais poisson zèbre, une meilleure caractérisation du devenir des xeno-estrogènes au sein des modèles cellulaires permettrait d'approfondir nos connaissances, en particulier pour les molécules anti-estrogéniques.

Dans une démarche de criblage, l'utilisation du modèle cellulaire ZELH exprimant la luciférase mais pas de récepteur ER fonctionnel s'est avérée être utile pour identifier les molécules capables d'induire une réponse non spécifique du récepteur des estrogènes. C'est le cas du BbF et du propiconazole qui inhibent l'activité de la luciférase dans les ZELH α , ZELH β 2 et dans les cellules ZELH (**article n°5**). D'autre part, nous avons observé que le cyprodinil inhibait l'activité de la luciférase dans les modèles MELN, ZELH α , ZELH β 2 et ZELH indépendamment de l'addition d'E2, et sans affecter la viabilité cellulaire. La luciférase de luciole (« firefly luciferase ») utilisée dans tous les bio-essais *in vitro* de ce travail est une enzyme ATP-dépendante dont l'activité peut être sélectivement inhibée par certaines molécules (ex : le resveratrol, Auld and Inglese, 2004; Bakhtiarova *et al.*, 2006). Dans des approches de criblage haut débit, 1% à 5% des molécules seraient des inhibiteurs de la luciférase de luciole, indiquant que ce mécanisme d'interférence bien caractérisé n'est si pas rare (ex : 3% parmi 70 000 molécules testées, Auld *et al.*, 2008). Tenir compte d'un effet non-spécifique sur le système rapporteur est essentiel pour éviter une interprétation erronée de l'activité d'une molécule, particulièrement dans le cas de test d'antagonisme. Dans notre étude, il serait pertinent d'évaluer l'activité anti-estrogénique des molécules identifiées comme inhibiteur de la luciférase dans le modèle embryonnaire cyp19a1b-GFP pour conclure sur la validité toxicologique des résultats observés *in vitro*.

EVALUATION DES DIFFERENCES INTER-MODELES A DES MELANGES ENVIRONNEMENTAUX

Dans l'environnement aquatique les xéno-estrogènes sont présents au milieu d'une multitude de composés ayant divers modes d'action et effets potentiels. Afin de simuler une contamination environnementale, deux mélanges de 12 molécules ont été définis pour déterminer la capacité des bio-essais à quantifier l'activité combinée de xeno-estrogènes au sein des mélanges incluant des molécules non-estrogéniques (**article n°5**). Si l'additivité entre

molécules oestrogéniques a pu être confirmée dans tous les modèles cellulaires (et pour la première fois dans le cas des cellules ZELH-zfER), des différences sont observées dans le cas de mélanges reconstitués. Dans les MELN, l'activité estrogénique des xeno-estrogènes était bien détectée au sein des mélanges, tandis que dans les cellules ZELH-zfERs, elle était masquée par une forte activité anti-estrogénique due à la présence de composés comme le TPP et le propiconazole. Dans cette approche théorique d'un mélange complexe, les résultats obtenus indiquent que les différences de réponse entre les cellules MELN et ZELH β 2 peuvent s'expliquer par l'activité des molécules ayant un profil de réponse bio-essai spécifique. Cette hypothèse avait été suggérée pour expliquer la sélectivité de l'activité estrogénique sur les modèles poisson zèbre pour certains extraits de POCIS (Sonavane *et al.*, 2016) ou d'échantillons d'eau de rivières (Projet EDA-EMERGE, Thèse M. Sonavane, 2015).

Dans ce travail de thèse, nous avons testé 25 extraits d'échantillons d'eau du Danube. Ces échantillons représentent un contexte environnemental unique par la quantité de pays traversés (de l'Autriche à la Roumanie), par la variabilité de la pollution (ponctuelle et diffuse, urbaine, industrielle et agricole), et par la forte capacité de dilution du fleuve. La figure 21 **Figure 21** résume l'activité des échantillons d'eau de surface du projet EDA-EMERGE (15 échantillons, rivières moyennes, thèse de M. Sovanave 2015) et de ce travail de thèse (25 échantillons, contexte fluvial) arbitrairement classée en 5 catégories : inactifs, très faiblement actifs (<0,1 ng/L E2-Eq), peu actifs (0,1 à 0,3 ng/L E2-Eq), actifs (0,3 à 1 ng/L E2-Eq) et très actifs (> 1 ng/L E2-Eq). Les échantillons des deux campagnes ont été prélevés et extraits avec la même technique de LVSPÉ, avec 50 L échantillonnés dans la campagne EDA-EMERGE, 300 L à 500 L pour la JDS3 et 850 L à 1000L pour Novi Sad. La figure 21 montre que la majorité des échantillons actifs d'EDA-EMERGE a une activité estrogénique supérieure à 0,1 ng/L d'E2-Eq, alors que l'activité des échantillons du Danube (JDS3 et Novi Sad) est principalement inférieure à 0,3 voire 0,1 ng/L E2-Eq, ce qui reflète la faible estrogénicité du Danube dans son ensemble. La plus forte prévalence d'échantillons actifs dans les cellules ZELH β 2 (i.e. > 0.3 ng/L E2-Eq) pour les échantillons d'EDA-EMERGE n'est pas retrouvée dans les échantillons de JDS3 et de Novi Sad, mais les sites les plus contaminés sont relativement bien identifiés par les deux bio-essais.

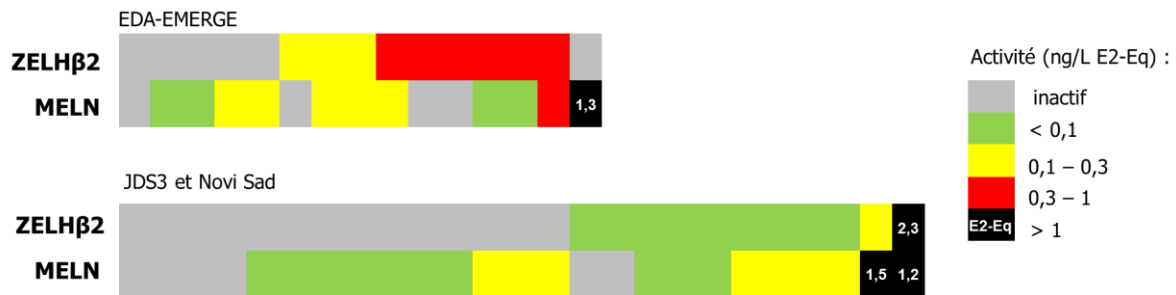


Figure 21: Comparaison de l'activité estrogénique d'extraits d'eaux de surface sur les cellules ZELH β 2 et MELN. Les résultats de la campagne terrain du projet EDA-EMERGE sont issus de la thèse de Manoj Sonavane (2015).

Dans la campagne JDS3, nous avons observé que les échantillons les moins actifs étaient mieux détectés dans les cellules MELN que les cellules ZELH β 2, sans que les xeno-estrogènes identifiés ne permettent d'expliquer les différences de réponse (**article n°6**). Ces résultats suggèrent que d'autres molécules non identifiées et présentes dans les extraits ont influencé la réponse aux xeno-estrogènes de manière bio-essai spécifique. Une hypothèse soulevée au cours de cette thèse concerne la présence de molécules ayant une activité anti-oestrogénique spécifiquement dans les cellules ZELH-zfERs. Toutefois les informations fournies par les analyses chimiques ciblées n'ont pas permis d'identifier des candidats potentiels. Le cyprodinil et le BaP n'ont pas été recherchés, le TPP, le 4-n-NP, le propiconazole n'ont pas été détectés et le chlorophène a été quantifié uniquement sur le site JDS67. Un métabolite du TPP, le diphénylphosphate (DPP), a été retrouvé dans 50% des sites. Cependant, il était autant présent dans des échantillons actifs (4/8) que dans les échantillons non détectés (7/12) dans les cellules ZELH β 2. Au-delà des molécules connues, les échantillons de JDS3 ont par ailleurs été évalués pour l'activation de AhR dans le bio-essai CAFLUX (cellules de rat H4IIE) dans le cadre du projet SOLUTIONS (**article n°1**). Pour tester l'hypothèse d'un lien possible entre activation de AhR et de ER, les données d'activités estrogéniques mesurées et prédites pour les cellules MELN et ZELH β 2 ont été comparées à l'activité AhR du test CAFLUX. Cependant, aucune corrélation claire n'a pu être mise en évidence.

De manière générale, nous observons que si les bio-essais MELN et ZELH β 2 ont les mêmes capacités à détecter les effets combinés des xeno-estrogènes et les sites très pollués (ex : Novi Sad), leur réponse peut être sensiblement différente pour des échantillons peu concentrés où l'influence du contexte cellulaire et de l'espèce semble jouer un rôle important. Cela pose la question de la pertinence biologique de la réponse mesurée avec ces bio-essais.

PERTINENCE ECOTOXICOLOGIQUE DES BIO-ESSAIS BASES SUR LE POISSON ZEBRE

Les bio-essais basés sur le poisson zèbre utilisés dans ce travail de thèse permettent d'évaluer l'activité des molécules oestrogéniques dans un contexte physiologique propre au poisson zèbre : des cellules de foie (ZFL) et le contexte neuro-glial chez l'embryon (test ESAZY). Le foie, principal organe de détoxification, est impliqué chez les femelles dans la production de choriogénine et vitellogénine sous le contrôle des estrogènes. La régulation de la production de vtg par ER est d'ailleurs utilisée comme biomarqueur d'exposition des poissons mâles à des composés estrogéniques. D'autre part, l'aromatase B est une enzyme clé de la stéroïdogénèse qui permet la production d'estradiol sous le contrôle des ER. Son expression tissulaire spécifique dans les cellules gliales radiales, progéniteurs des neurones, montre l'importance de cette enzyme dans la neurogénèse et les processus neuro-endocrines. L'induction de l'aromatase B au stade embryon-larvaire où elle est peu exprimée en fait donc un marqueur intéressant de la perturbation estrogénique.

Bien que provenant de contextes tissulaires distincts, les informations obtenues dans le cadre de la thèse montrent une bonne correspondance de la réponse estrogénique des bio-essais *in vitro* ZELH-zfERs et *in vivo* cyp19a1b-GFP. Ils ont détecté les mêmes molécules actives (et inactives) dans le criblage de polluants (**article n°2 et 3**), et la dioxine a induit un cross-talk négatif dans tous les bio-essais poisson zèbre. Dans le cas des échantillons environnementaux, l'activité estrogénique a été confirmée pour l'échantillon le plus actif de Novi Sad (**article n°6**), confirmant la tendance observée dans les travaux précédents où le test *in vivo* détectait plus spécifiquement les échantillons les plus actifs (Thèse M. Sonavane, 2015). La capacité des bio-essais poisson zèbre à détecter et quantifier des molécules oestrogéniques spécifiquement actives chez le poisson a également été suggérée, en particulier pour un site situé en aval d'un rejet industriel impacté par des progestatifs de synthèse (Creusot *et al.*, 2014), où une activité significative était détectée sur les modèles ZELH β 2 et cyp19a1b-GFP mais pas sur le modèle humain MELN (Sonavane *et al.*, 2016).

A la différence des bio-essais *in vitro*, le modèle *in vivo* présente l'avantage de pouvoir prendre en compte les processus d'absorption, distribution, métabolisme et élimination, et de rendre compte d'autres voies de toxicité à l'échelle de l'organisme. Par exemple, nous avons

observé que le triclosan a modifié les capacités de nage des larves (**article n°3**), ce qui concorde avec la toxicité musculaire connue de la molécule capable d'interagir avec les récepteurs de la ryanodine impliqué dans la contraction musculaire (Cherednichenko *et al.*, 2012; Fritsch *et al.*, 2013). De plus, lorsque les larves ont été exposées aux mélanges reconstitués de 12 molécules, une forte mortalité a été observée, indiquant qu'au delà des xeno-estrogènes, les mélanges étaient avant tout extrêmement toxiques chez les embryons de poisson (Altenburger *et al.*, in prep, annexe I). Dans une démarche intégrée d'évaluation du danger, le modèle embryonnaire de poisson zèbre cyp19a1b-GFP est un outil de choix qui apporte des informations mécanistiques sur les xeno-estrogènes mais aussi des informations de toxicité développementale et aiguë. Ces résultats montrent l'avantage de combiner tests *in vitro* et *in vivo*, car ils apportent des informations complémentaires sur la contamination de l'échantillon.

INTEGRATION DES BIO-ESSAIS BASES SUR LE POISSON ZEBRE EN BIOSURVEILLANCE

Dans le cadre de la bio-surveillance de la qualité de l'eau, les bio-essais apportent une information à l'interface entre réponse biologique et évaluation de l'exposition. Pour la surveillance de la contamination chimique, telle qu'envisagée dans la DCE, l'objectif est d'évaluer la présence de molécules prioritaires de la manière la plus sensible et spécifique possible. Les informations obtenues au cours de la thèse suggèrent que les cellules MELN sont les plus appropriées pour rendre compte de la présence des xeno-estrogènes connus. De fait, les MELN permettent de détecter et quantifier l'activité estrogénique des principaux xeno-estrogènes qui sont actifs à la fois sur hER α et sur zfERs (ex : estrogènes stéroïdiens, phytoestrogènes) au sein de mélange contenant des polluants non-estrogéniques (**articles n°5 et 6**).

Si on sort du cadre de la détection des xéno-estrogènes connus, les bio-essais offrent aussi la possibilité de détecter des molécules dont l'activité est non documentée jusqu'à ce jour et susceptibles d'entraîner des effets en mélanges avec d'autres molécules (ex : anti-estrogènes). Ainsi, l'utilisation de bio-essais poisson zèbre permet de commencer à comprendre les effets des polluants environnementaux en mélange (ex : interaction AhR/ER) de part leur contexte biologique proche de celui des organismes à protéger : les poissons. Dans ce sens, ces outils semblent particulièrement pertinents et adaptés dans une démarche de diagnostic environnemental.

Afin de permettre l'utilisation des bio-essais dans un cadre réglementaire, il est nécessaire de définir un cadre d'application avec des règles d'interprétation, à l'instar des NQE pour les molécules prioritaires. Différentes valeurs seuils d'activité estrogénique comprises entre 0,3 et 0,5 ng/ E2-EQ ont été récemment proposées ; le tableau XII synthétise les différentes approches utilisées.

Tableau XII: Méthodes utilisées pour dériver des valeurs seuils d'activité oestrogénique pour les échantillons environnementaux. SSD : species sensitivity distribution. HC5% concentration dangereuse pour 5% des organismes, PNEC : predicted no effect concentration.

EXPOSITION	DANGER		Valeur proposée (E2-Eq ng/L)	Référence
	Provenance des données de toxicité	Méthode de détermination		
Tous les xeno-estrogènes convertis en E2-Eq	Tous les organismes aquatiques	HC5% dérivé par SSD avec toutes les données	0,52	(van der Oost <i>et al.</i> , 2017)
E2 (basé sur la liste de vigilance européenne)	Poisson	NQE de l'E2 dérivée par SSD pour la toxicité chronique de l'E2 chez le poisson	0,4	(Kunz <i>et al.</i> , 2015)
Stéroïde le plus sensible (EE2) + proportion d'occurrence dans les effluents de STEP	Poisson	PNEC dérivé par SSD de toxicité chronique de l'EE2 chez le poisson	0,3	(Jarošová <i>et al.</i> , 2014a)
Activité estrogénique <i>in vitro</i> d'échantillons environnementaux	Poisson	Activité estrogénique d'échantillons <i>in vivo</i> dans le test EASZY	0,2 à 0,5	Brion, 2017 dans (Käse et Carere, 2017)

La majorité des valeurs seuils proposées ont été dérivées à partir des données d'effets de xéno-estrogènes connus, soit chez tous les organismes aquatiques (Van der Oost, 2017) ou plus spécifiquement chez le poisson en prenant en compte les effets sur la reproduction (Jarošová *et al.*, 2014a; Kunz *et al.*, 2015). Ces données ont été ensuite utilisées pour effectuer une distribution cumulée de la sensibilité des espèces (« SSD » : species sensitivity distribution) ce qui a permis de dériver une NQE (Kunz *et al.*, 2015), une concentration prédite sans effets (PNEC « predicted no-effect concentration », Cadwell *et al.*, 2012) ou une concentration dangereuse (HC5% « hazardous concentration », van der Oost *et al.*, 2017), convertie en estradiol équivalents sur les modèles *in vitro* exprimant hER α . Alors que ces valeurs seuils sont dérivées à partir de données sur les molécules seules, une autre approche, récemment proposée par notre laboratoire, consiste à comparer de manière empirique l'activité estrogénique d'échantillons environnementaux *in vitro* et *in vivo* avec le test EASZY. De cette façon, le danger est évalué de manière plus holistique,

en tenant compte des effets de mélanges et des molécules inconnues sur un organisme représentatif du taxon particulièrement sensible aux xéno-estrogènes. Appliquée à 35 échantillons d'eau de surface et d'eau usée dans le cadre du projet européen « *Effect-based and chemical analytical monitoring for the steroidal estrogens* » (Käse and Carere, 2017), cette approche a permis de dériver des valeurs seuils comprises entre 0,2 et 0,5 ng/L E2-Eq. La bonne concordance entre réponse *in vitro* et *in vivo* observée jusqu'à présent pour les échantillons les plus actifs conforte la démarche proposée (ex : **article n°6**).

L'avantage majeur des bio-essais, à la différence de l'analyse chimique ciblée, est de pouvoir prendre en compte l'action combinée de polluants sur l'activation de ER sans connaître leur identité. Cependant, chaque modèle biologique conserve des spécificités propres en termes de détection des molécules estrogéniques. Il est donc important de combiner bio-essais *in vitro* et *in vivo* pour obtenir une information intégrée de la contamination environnementale. Des schémas d'utilisation des bio-essais dans des démarches d'évaluation de la qualité chimique de l'eau ont été récemment proposés (Maruya *et al.*, 2016; van der Oost *et al.*, 2017; Vethaak *et al.*, 2017). Ils se structurent autour d'une batterie de bio-essais couvrant différents modes d'action/effets couplés à des analyses chimiques ciblées et non ciblées. Ces stratégies de bio-analyses montrent les possibilités offertes par les outils biologiques pour améliorer la compréhension de la contamination chimique. Cependant, si l'utilisation des bio-essais pour évaluer l'estrogénicité dans un cadre législatif est envisagée, leur intégration dans un cadre réglementaire induira un changement de paradigme important dans l'évaluation de la qualité chimique des milieux, en passant d'une évaluation de l'exposition substance par substance à une évaluation de l'effet d'un mélange de substances.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Un des objectifs de ce travail de thèse était d'améliorer notre compréhension des différences de réponse entre bio-essais humain et poisson zèbre pour évaluer la contamination par les xeno-estrogènes dans l'environnement. Dans ce cadre, les bio-essais humain MELN et poisson zèbre *in vitro* (ZELH α , ZELH β 2) et *in vivo* (test EASZY) ont été choisis pour évaluer l'activité estrogénique de polluants environnementaux retrouvés dans l'environnement. Ces polluants ont été testés seuls mais aussi en présence de xeno-estrogènes modèles pour évaluer leur capacité à interférer avec la réponse estrogénique. En combinant analyses moléculaires, cellulaires et approches prédictives, ce travail montre que des interactions entre molécules estrogéniques et non-estrogéniques peuvent avoir lieu de manière bio-essai spécifique. En conséquent, les spécificités biologiques des bio-essais sont importantes à prendre en compte car elles sont susceptibles d'influencer la réponse aux xeno-estrogènes au sein de mélanges contenant de multiples polluants.

A travers les différences approches (molécules seules, mélanges simples, échantillons environnementaux), une bonne cohérence de réponse a été observée entre les différents modèles poisson zèbre, conformant leur utilisation combinée dans une démarche d'évaluation de la contamination du compartiment aquatique. De fait, à la différence des tests *in vitro*, le test EASZY fournit une information à l'échelle de l'organisme, susceptible d'être impactée par d'autres voies de toxicité et fournit ainsi des informations complémentaires sur la toxicité aigue de l'échantillon.

Appliqués dans une approche de bio-monitoring, les bio-essais poissons peuvent répondre différemment à la présence de xeno-estrogènes que des cellules humaines exprimant hER α . Bien que les informations apportées au cours de cette thèse montrent que ces différences ont potentiellement un fondement toxicologique ou physiologique, il n'en reste pas moins que la réponse d'un bio-essai à des échantillons environnementaux peut être parfois complexe à interpréter. Par conséquent, une démarche intégrée combinant bio-essais *in vitro* et *in vivo* semble pertinente pour combiner des informations complémentaires sur le risque chimique lié à ces matrices.

REFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ackermann, G.E., Brombacher, E., Fent, K., 2002. Development of a fish reporter gene system for the assessment of estrogenic compounds and sewage treatment plant effluents. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1864–1875. doi:10.1002/etc.5620210914
- Aerni, H.-R., Kobler, B., Rutishauser, B.V., Wettstein, F.E., Fischer, R., Giger, W., Hungerbühler, A., Marazuela, M.D., Peter, A., Schönenberger, R., Vögeli, A.C., Suter, M.J.-F., Eggen, R.I.L., 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 688–696. doi:10.1007/s00216-003-2276-4
- Ahn, K.C., Zhao, B., Chen, J., Cherednichenko, G., Sanmarti, E., Denison, M.S., Lasley, B., Pessah, I.N., Kultz, D., Chang, D.P.Y., Gee, S.J., Hammock, B.D., 2008. *In vitro* biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: Receptor-based bioassay screens. *Environ. Health Perspect.* 116, 1203–1210. doi:10.1289/ehp.11200
- Altenburger, R., Ait-Aissa, S., Antczak, P., Backhaus, T., Barceló, D., Seiler, T.-B., Brion, F., Busch, W., Chipman, K., de Alda, M.L., de Aragão Umbuzeiro, G., Escher, B.I., Falciani, F., Faust, M., Focks, A., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Jäger, F., Jahnke, A., Kortenkamp, A., Krauss, M., Lemkine, G.F., Munthe, J., Neumann, S., Schymanski, E.L., Scrimshaw, M., Segner, H., Slobodnik, J., Smedes, F., Kughathas, S., Teodorovic, I., Tindall, A.J., Tollefsen, K.E., Walz, K.-H., Williams, T.D., Van den Brink, P.J., van Gils, J., Vrana, B., Zhang, X., Brack, W., 2015. Future water quality monitoring--adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. *Sci. Total Environ.* 512–513, 540–551. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.057
- Alvarez, D.A., Shappell, N.W., Billee, L.O., Bermudez, D.S., Wilson, V.S., Kolpin, D.W., Perkins, S.D., Evans, N., Foreman, W.T., Gray, J.L., Shipitalo, M.J., Meyer, M.T., 2013. Bioassay of estrogenicity and chemical analyses of estrogens in streams across the United States associated with livestock operations. *Water Res.* 47, 3347–3363. doi:10.1016/j.watres.2013.03.028
- Arrêté du 7 août 2015 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 établissant le programme de surveillance de l'état des eaux en application de l'article R. 212-22 du code de l'environnement, n.d.
- Arrêté du 27 juillet 2015 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface pris en application des articles R. 212-10, R. 212-11 et R. 212-18 du code de l'environnement, n.d.
- Arukwe, A., Yadetie, F., Male, R., Goksøyr, A., 2001. *In vivo* modulation of nonylphenol-induced zonagenesis and vitellogenesis by the antiestrogen, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB-77) in juvenile fish. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 10, 5–15. doi:10.1016/S1382-6689(01)00063-1
- Auld, D.S., Inglese, J., 2004. Interferences with Luciferase Reporter Enzymes, in: Sittampalam, G.S., Coussens, N.P., Nelson, H., Arkin, M., Auld, D., Austin, C., Bejcek, B., Glicksman, M., Inglese, J., Iversen, P.W., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Minor, L., Napper, A., Peltier, J.M., Riss, T., Trask, O.J., Weidner, J. (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD).
- Auld, D.S., Southall, N.T., Jadhav, A., Johnson, R.L., Diller, D.J., Simeonov, A., Austin, C.P., Inglese, J., 2008. Characterization of Chemical Libraries for Luciferase Inhibitory Activity. *J. Med. Chem.* 51, 2372–2386. doi:10.1021/jm701302v
- Azcoitia, I., Arevalo, M.A., Garcia-Segura, L.M., 2017. Neural-derived estradiol regulates brain plasticity. *J. Chem. Neuroanat.* doi:10.1016/j.jchemneu.2017.04.004
- Bakhtiarova, A., Taslimi, P., Elliman, S.J., Kosinski, P.A., Hubbard, B., Kavana, M., Kemp, D.M., 2006. Resveratrol inhibits firefly luciferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 481–484. doi:10.1016/j.bbrc.2006.10.057

- Balaguer, P., Francois, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A.M., Pons, M., Nicolas, J.C., Casellas, C., 1999. Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Sci. Total Environ.* 233, 47–56. doi:10.1016/S0048-9697(99)00178-3
- Barouki, R., Coumoul, X., Fernandez-Salguero, P.M., 2007. The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett.* 581, 3608–3615. doi:10.1016/j.febslet.2007.03.046
- Beischlag, T.V., Perdew, G.H., 2005. ER α -AHR-ARNT protein-protein interactions mediate estradiol-dependent transrepression of dioxin-inducible gene transcription. *J. Biol. Chem.* 280, 21607–21611. doi:10.1074/jbc.C500090200
- Berenbaum, M.C., 1989. What is synergy? *Pharmacol. Rev.* 41, 93–141.
- Bermudez, D.S., Gray, L.E., Wilson, V.S., 2012. Modelling defined mixtures of environmental oestrogens found in domestic animal and sewage treatment effluents using an *in vitro* oestrogen-mediated transcriptional activation assay (T47D-KBluc). *Int. J. Androl.* 35, 397–406. doi:10.1111/j.1365-2605.2012.01278.x
- Bermudez, D.S., Gray, L.E., Wilson, V.S., 2010. Modeling the Interaction of Binary and Ternary Mixtures of Estradiol with Bisphenol A and Bisphenol AF in an *In vitro* Estrogen-Mediated Transcriptional Activation Assay (T47D-KBluc). *Toxicol. Sci.* 116, 477–487. doi:10.1093/toxsci/kfq156
- Bersten, D.C., Sullivan, A.E., Peet, D.J., Whitelaw, M.L., 2013. bHLH-PAS proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 13, 827–841. doi:10.1038/nrc3621
- Björnström, L., Sjöberg, M., 2005. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Mol. Endocrinol.* 19, 833–842. doi:10.1210/me.2004-0486
- Bliss, C.I., 1939. The Toxicity of Poisons Applied Jointly¹. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585–615. doi:10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x
- Brack, W., Ait-Aissa, S., Burgess, R.M., Busch, W., Creusot, N., Di Paolo, C., Escher, B.I., Mark Hewitt, L., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Jonker, W., Kool, J., Lamoree, M., Muschket, M., Neumann, S., Rostkowski, P., Ruttkies, C., Schollee, J., Schymanski, E.L., Schulze, T., Seiler, T.-B., Tindall, A.J., De Aragão Umbuzeiro, G., Vrana, B., Krauss, M., 2016. Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments — An in-depth overview. *Sci. Total Environ.* 544, 1073–1118. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.11.102
- Brack, W., Altenburger, R., Schüürmann, G., Krauss, M., López Herráez, D., van Gils, J., Slobodnik, J., Munthe, J., Gawlik, B.M., van Wezel, A., Schriks, M., Hollender, J., Tollefsen, K.E., Mekenyan, O., Dimitrov, S., Bunke, D., Cousins, I., Posthuma, L., van den Brink, P.J., López de Alda, M., Barceló, D., Faust, M., Kortenkamp, A., Scrimshaw, M., Ignatova, S., Engelen, G., Massmann, G., Lemkine, G., Teodorovic, I., Walz, K.-H., Dulio, V., Jonker, M.T.O., Jäger, F., Chipman, K., Falciani, F., Liska, I., Rooke, D., Zhang, X., Hollert, H., Vrana, B., Hilscherova, K., Kramer, K., Neumann, S., Hammerbacher, R., Backhaus, T., Mack, J., Segner, H., Escher, B., de Aragão Umbuzeiro, G., 2015. The SOLUTIONS project: challenges and responses for present and future emerging pollutants in land and water resources management. *Sci. Total Environ.* 503–504, 22–31. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.143
- Brack, W., Dulio, V., Agerstrand, M., Allan, I., Altenburger, R., Brinkmann, M., Bunke, D., Burgess, R.M., Cousins, I., Escher, B.I., Hernandez, F.J., Hewitt, L.M., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Kase, R., Klauer, B., Lindim, C., Herraez, D.L., Mieke, C., Munthe, J., O'Toole, S., Posthuma, L., Ruedel, H., Schaefer, R.B., Sengl, M., Smedes, F., van de Meent, D., van den Brink, P.J., van Gils, J., van Wezel, A.P., Vethaak, A.D., Vermeirssen, E., von der Ohe, P.C., Vrana, B., 2017. Towards the review of the European Union Water Framework Directive: Recommendations for more efficient assessment and management of chemical contamination in European surface water resources. *Sci. Total Environ.* 576, 720–737. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.104
- Brausch, J.M., Rand, G.M., 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82, 1518–1532. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.018
- Brennan, C., Mangoli, M., Dyer, C.E.F., Ashworth, R., 2005. Acetylcholine and calcium signalling regulates muscle fibre formation in the zebrafish embryo. *J. Cell Sci.* 118, 5181–5190. doi:10.1242/jcs.02625

- Brennan, J.C., Bassal, A., He, G., Denison, M.S., 2016. Development of a recombinant human ovarian (BG1) cell line containing estrogen receptor α and β for improved detection of estrogenic/antiestrogenic chemicals., Development of a recombinant human ovarian (BG1) cell line containing estrogen receptor α and β for improved detection of estrogenic/antiestrogenic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem. Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 35, 35, 91, 91–100. doi:10.1002/etc.3146, 10.1002/etc.3146
- Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., Backhaus, T., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Runnalls, T., Bonfà, A., Marcomini, A., Sumpter, J.P., 2005. Accurate Prediction of the Response of Freshwater Fish to a Mixture of Estrogenic Chemicals. *Environ. Health Perspect.* 113, 721–728. doi:10.1289/ehp.7598
- Brian, J.V., Harris, C.A., Scholze, M., Kortenkamp, A., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Marcomini, A., Sumpter, J.P., 2007. Evidence of estrogenic mixture effects on the reproductive performance of fish. *Environ. Sci. Technol.* 41, 337–344.
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.-K., Chung, B., Kah, O., 2012a. Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures *In vivo* Using Transgenic (cyp19a1b-GFP) Zebrafish Embryos. *Plos One* 7, e36069. doi:10.1371/journal.pone.0036069
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.-K., Chung, B., Kah, O., 2012b. Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures *In vivo* Using Transgenic (cyp19a1b-GFP) Zebrafish Embryos. *Plos One* 7, e36069. doi:10.1371/journal.pone.0036069
- Brunnberg, S., Pettersson, K., Rydin, E., Matthews, J., Hanberg, A., Pongratz, I., 2003. The basic helix–loop–helix–PAS protein ARNT functions as a potent coactivator of estrogen receptor-dependent transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 6517–6522. doi:10.1073/pnas.1136688100
- Bugel, S.M., White, L.A., Cooper, K.R., 2013. Inhibition of vitellogenin gene induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin is mediated by aryl hydrocarbon receptor 2 (AHR2) in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 126, 1–8. doi:10.1016/j.aquatox.2012.09.019
- Busch, W., Schmidt, S., Kuehne, R., Schulze, T., Krauss, M., Altenburger, R., 2016. Micropollutants in European rivers: A mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1887–1899. doi:10.1002/etc.3460
- Caldwell, D.J., Mastrocco, F., Anderson, P.D., Länge, R., Sumpter, J.P., 2012. Predicted-no-effect concentrations for the steroid estrogens estrone, 17 β -estradiol, estriol, and 17 α -ethinylestradiol. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1396–1406. doi:10.1002/etc.1825
- Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y., 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci. Total Environ.* 324, 55–66. doi:10.1016/j.scitotenv.2003.10.035
- Carré, C., Meybeck, M., Esculier, F., 2017. The Water Framework Directive's "percentage of surface water bodies at good status": unveiling the hidden side of a "hyperindicator." *Ecol. Indic.* 78, 371–380. doi:10.1016/j.ecolind.2017.03.021
- Carvalho, R.N., Arukwe, A., Ait-Aissa, S., Bado-Nilles, A., Balzamo, S., Baun, A., Belkin, S., Blaha, L., Brion, F., Conti, D., Creusot, N., Essig, Y., Ferrero, V.E.V., Flander-Putrlle, V., Fürhacker, M., Grillari-Voglauer, R., Hogstrand, C., Jonáš, A., Kharlyngdoh, J.B., Loos, R., Lundebye, A.-K., Modig, C., Olsson, P.-E., Pillai, S., Polak, N., Potalivo, M., Sanchez, W., Schifferli, A., Schirmer, K., Sforzini, S., Stürzenbaum, S.R., Søfteland, L., Turk, V., Viarengo, A., Werner, I., Yagur-Kroll, S., Zounková, R., Lettieri, T., 2014. Mixtures of Chemical Pollutants at European Legislation Safety Concentrations: How Safe Are They? *Toxicol. Sci.* 141, 218–233. doi:10.1093/toxsci/kfu118
- Cavallin, J.E., Durhan, E.J., Evans, N., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Kolpin, D.W., Kolodziej, E.P., Foreman, W.T., LaLone, C.A., Makynen, E.A., Seidl, S.M., Thomas, L.M., Villeneuve, D.L., Weberg, M.A., Wilson, V.S., Ankley, G.T., 2014. Integrated assessment of runoff from livestock farming operations: Analytical chemistry, *in vitro* bioassays, and *in vivo* fish exposures. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 1849–1857. doi:10.1002/etc.2627

- CE, 2000. Directive 2000/60/CE [WWW Document]. URL <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/fr/ALL/?uri=CELEX%3A32000L0060> (accessed 10.8.17).
- CE, n.d. Directive 2008/105/CE du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau [WWW Document]. URL <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A32008L0105> (accessed 10.8.17).
- Chang, Z., Lu, M., Kim, S.-S., Park, J.-S., 2014. Potential role of HSP90 in mediating the interactions between estrogen receptor (ER) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) signaling pathways. *Toxicol. Lett.* 226, 6–13. doi:10.1016/j.toxlet.2014.01.032
- Chen, H., Hu, J., Yang, J., Wang, Y., Xu, H., Jiang, Q., Gong, Y., Gu, Y., Song, H., 2010. Generation of a fluorescent transgenic zebrafish for detection of environmental estrogens. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 96, 53–61. doi:10.1016/j.aquatox.2009.09.015
- Chen, S.X., Bogerd, J., García-López, Á., de Jonge, H., Waal, D., P, P., Hong, W.S., Schulz, R.W., 2010. Molecular Cloning and Functional Characterization of a Zebrafish Nuclear Progesterone Receptor. *Biol. Reprod.* 82, 171–181. doi:10.1095/biolreprod.109.077644
- Chen, X., Xu, B., Han, X., Mao, Z., Chen, M., Du, G., Talbot, P., Wang, X., Xia, Y., 2015. The effects of triclosan on pluripotency factors and development of mouse embryonic stem cells and zebrafish. *Arch. Toxicol.* 89, 635–646. doi:10.1007/s00204-014-1270-2
- Chen, X.-W., Zhao, J.-L., Liu, Y.-S., Hu, L.-X., Liu, S.-S., Ying, G.-G., 2016. Evaluation of estrogenic activity in the Pearl River by using effect-directed analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 21692–21702. doi:10.1007/s11356-016-7377-7
- Chen, Y.Y., Chan, K.M., 2016. Regulation of vitellogenin (*vtg1*) and estrogen receptor (*er*) gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) following the administration of Cd²⁺ and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Chemosphere* 147, 467–476. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.12.083
- Cherednichenko, G., Zhang, R., Bannister, R.A., Timofeyev, V., Li, N., Fritsch, E.B., Feng, W., Barrientos, G.C., Schebb, N.H., Hammock, B.D., Beam, K.G., Chiamvimonvat, N., Pessah, I.N., 2012. Triclosan impairs excitation-contraction coupling and Ca²⁺ dynamics in striated muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 14158–14163. doi:10.1073/pnas.1211314109
- Cheshenko, K., Brion, F., Le Page, Y., Hinfray, N., Pakdel, F., Kah, O., Segner, H., Eggen, R.I.L., 2007. Expression of zebra fish aromatase *cyp19a* and *cyp19b* genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. Sci.* 96, 255–267. doi:10.1093/toxsci/kfm003
- Cheshenko, K., Pakdel, F., Segner, H., Kah, O., Eggen, R.I.L., 2008. Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 155, 31–62. doi:10.1016/j.ygcen.2007.03.005
- Chou, T.C., Talalay, P., 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* 22, 27–55.
- Coleman, M.D., O'Neil, J.D., Woehrling, E.K., Ndunge, O.B.A., Hill, E.J., Menache, A., Reiss, C.J., 2012. A Preliminary Investigation into the Impact of a Pesticide Combination on Human Neuronal and Glial Cell Lines *In vitro*. *PLoS ONE* 7. doi:10.1371/journal.pone.0042768
- Conley, J.M., Evans, N., Cardon, M.C., Rosenblum, L., Iwanowicz, L.R., Hartig, P.C., Schenck, K.M., Bradley, P.M., Wilson, V.S., 2017. Occurrence and *In vitro* Bioactivity of Estrogen, Androgen, and Glucocorticoid Compounds in a Nationwide Screen of United States Stream Waters. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4781–4791. doi:10.1021/acs.est.6b06515
- Correia, A.D., Freitas, S., Scholze, M., Goncalves, J.F., Booij, P., Lamoree, M.H., Mañanós, E., Reis-Henriques, M.A., 2007. Mixtures of Estrogenic Chemicals Enhance Vitellogenic Response in Sea Bass. *Environ. Health Perspect.* 115, 115–121. doi:10.1289/ehp.9359

- Cosnefroy, A., Brion, F., Guillet, B., Laville, N., Porcher, J.M., Balaguer, P., Aït-Aïssa, S., 2009. A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* 23, 1450–1454. doi:10.1016/j.tiv.2009.07.003
- Cosnefroy, A., Brion, F., Maillot-Maréchal, E., Porcher, J.-M., Pakdel, F., Balaguer, P., Aït-Aïssa, S., 2012. Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 125, 439–449. doi:10.1093/toxsci/kfr297
- Coumoul, X., Diry, M., Robillot, C., Barouki, R., 2001. Differential Regulation of Cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a Combination of Dioxin and Pesticides in the Breast Tumor Cell Line MCF-7. *Cancer Res.* 61, 3942–3948.
- Crago, J., Tran, K., Budicin, A., Schreiber, B., Lavado, R., Schlenk, D., 2015. Exploring the Impacts of Two Separate Mixtures of Pesticide and Surfactants on Estrogenic Activity in Male Fathead Minnows and Rainbow Trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 362–370. doi:10.1007/s00244-014-0098-3
- Creusot, N., Ait-Aïssa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, J.-M., Budzinski, H., 2014. Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3649–3657. doi:10.1021/es405313r
- Creusot, N., Brion, F., Piccini, B., Budzinski, H., Porcher, J.M., Aït-Aïssa, S., 2015. BFCOD activity in fish cell lines and zebrafish embryos and its modulation by chemical ligands of human aryl hydrocarbon and nuclear receptors. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 22, 16393–16404. doi:10.1007/s11356-014-3882-8
- Creusot, N., Budzinski, H., Balaguer, P., Kinani, S., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S., 2013. Effect-directed analysis of endocrine-disrupting compounds in multi-contaminated sediment: identification of novel ligands of estrogen and pregnane X receptors. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 2553–2566. doi:10.1007/s00216-013-6708-5
- Creusot, N., Dévier, M.-H., Budzinski, H., Aït-Aïssa, S., 2016. Evaluation of an extraction method for a mixture of endocrine disrupters in sediment using chemical and *in vitro* biological analyses. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 10349–10360. doi:10.1007/s11356-016-6062-1
- Creusot, N., Kinani, S., Balaguer, P., Tapie, N., LeMenach, K., Maillot-Marechal, E., Porcher, J.-M., Budzinski, H., Ait-Aïssa, S., 2010a. Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 569–583. doi:10.1007/s00216-009-3310-y
- Creusot, N., Kinani, S., Balaguer, P., Tapie, N., LeMenach, K., Maillot-Maréchal, E., Porcher, J.-M., Budzinski, H., Aït-Aïssa, S., 2010b. Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 569–583. doi:10.1007/s00216-009-3310-y
- Dann, A.B., Hontela, A., 2011. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J. Appl. Toxicol.* 31, 285–311. doi:10.1002/jat.1660
- Davis, L.K., Katsu, Y., Iguchi, T., Lerner, D.T., Hirano, T., Grau, E.G., 2010. Transcriptional activity and biological effects of mammalian estrogen receptor ligands on three hepatic estrogen receptors in Mozambique tilapia. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 122, 272–278. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.05.009
- Delfosse, V., Dendele, B., Huet, T., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Gerbal-Chaloin, S., Beucher, B., Roecklin, D., Muller, C., Rahmani, R., Cavailles, V., Daujat-Chavanieu, M., Vivat, V., Pascussi, J.-M., Balaguer, P., Bourguet, W., 2015. Synergistic activation of human pregnane X receptor by binary cocktails of pharmaceutical and environmental compounds. *Nat. Commun.* 6, 8089. doi:10.1038/ncomms9089
- Demaegdt, H., Daminet, B., Evrard, A., Scippo, M.-L., Muller, M., Pussemier, L., Callebaut, A., Vandermeiren, K., 2016. Endocrine activity of mycotoxins and mycotoxin mixtures. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* 96, 107–116. doi:10.1016/j.fct.2016.07.033

- Demirpence, E., Duchesne, M.J., Badia, E., Gagne, D., Pons, M., 1993. MVLN cells: a bioluminescent MCE-7-derived cell line to study the modulation of estrogenic activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 46, 355–364.
- Denison, M.S., Nagy, S.R., 2003. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by structurally diverse exogenous and endogenous chemicals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 43, 309–334. doi:10.1146/annurev.pharmtox.43.100901.135828
- Desbrow, C., Routledge, E.J., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Waldock, M., 1998. Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and *in vitro* Biological Screening. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1549–1558. doi:10.1021/es9707973
- Dévier, M.-H., Mazellier, P., Aït-Aïssa, S., Budzinski, H., 2011. New challenges in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures. *Comptes Rendus Chim., Green and sustainable chemistry* 14, 766–779. doi:10.1016/j.crci.2011.04.006
- Di Liegro, I., 2008. Thyroid hormones and the central nervous system of mammals (Review). *Mol. Med. Rep.* 1, 279–295.
- Diotel, N., Do Rego, J.-L., Anglade, I., Vaillant, C., Pellegrini, E., Gueguen, M.-M., Mironov, S., Vaudry, H., Kah, O., 2011. Activity and expression of steroidogenic enzymes in the brain of adult zebrafish. *Eur. J. Neurosci.* 34, 45–56. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07731.x
- Diotel, N., Le Page, Y., Mouriec, K., Tong, S.-K., Pellegrini, E., Vaillant, C., Anglade, I., Brion, F., Pakdel, F., Chung, B., Kah, O., 2010. Aromatase in the brain of teleost fish: expression, regulation and putative functions. *Front. Neuroendocrinol.* 31, 172–192. doi:10.1016/j.yfrne.2010.01.003
- Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau [WWW Document], n.d. URL <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/ALL/?uri=celex%3A32013L0039> (accessed 10.8.17).
- Dreier, D.A., Connors, K.A., Brooks, B.W., 2015. Comparative endpoint sensitivity of *in vitro* estrogen agonist assays. *Regul. Toxicol. Pharmacol. RTP* 72, 185–193. doi:10.1016/j.yrtph.2015.04.009
- Eide, M., Rusten, M., Male, R., Jensen, K.H.M., Goksoyr, A., 2014. A characterization of the ZFL cell line and primary hepatocytes as *in vitro* liver cell models for the zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 147, 7–17. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.023
- Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J.P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J.C., Cavailles, V., Balaguer, P., 2006. Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor α or β . *Biochem. Pharmacol.* 71, 1459–1469. doi:10.1016/j.bcp.2006.02.002
- Escher, B.I., Allinson, M., Altenburger, R., Bain, P.A., Balaguer, P., Busch, W., Crago, J., Denslow, N.D., Dopp, E., Hilscherova, K., Humpage, A.R., Kumar, A., Grimaldi, M., Jayasinghe, B.S., Jarosova, B., Jia, A., Makarov, S., Maruya, K.A., Medvedev, A., Mehinto, A.C., Mendez, J.E., Poulsen, A., Prochazka, E., Richard, J., Schifferli, A., Schlenk, D., Scholz, S., Shiraish, F., Snyder, S., Su, G., Tang, J.Y.M., van der Burg, B., van der Linden, S.C., Werner, I., Westerheide, S.D., Wong, C.K.C., Yang, M., Yeung, B.H.Y., Zhang, X., Leusch, F.D.L., 2014. Benchmarking Organic Micropollutants in Wastewater, Recycled Water and Drinking Water with *In vitro* Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1940–1956. doi:10.1021/es403899t
- EU, 2016. Commission Implementing Decision (EU) 2016/110 of 27 January 2016 not approving triclosan as an existing active substance for use in biocidal products for product-type 1 [WWW Document]. URL http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3AOJ.L_.2016.021.01.0086.01.ENG (accessed 10.8.17).
- Evans, B.R., Karchner, S.I., Allan, L.L., Pollenz, R.S., Tanguay, R.L., Jenny, M.J., Sherr, D.H., Hahn, M.E., 2008. Repression of Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) Signaling by AHR Repressor: Role of DNA Binding and Competition for AHR Nuclear Translocator. *Mol. Pharmacol.* 73, 387–398. doi:10.1124/mol.107.040204

- Evans, R.M., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2012. Additive Mixture Effects of Estrogenic Chemicals in Human Cell-Based Assays Can Be Influenced by Inclusion of Chemicals with Differing Effect Profiles. *PLOS ONE* 7, e43606. doi:10.1371/journal.pone.0043606
- Ezechias, M., Cajthaml, T., 2016. Novel full logistic model for estimation of the estrogenic activity of chemical mixtures. *Toxicology* 359, 58–70. doi:10.1016/j.tox.2016.06.017
- Fang, H., Tong, W., Perkins, R., Soto, A.M., Prechtel, N.V., Sheehan, D.M., 2000. Quantitative comparisons of *in vitro* assays for estrogenic activities. *Environ. Health Perspect.* 108, 723–729.
- Feng, Y., Zhang, P., Zhang, Z., Shi, J., Jiao, Z., Shao, B., 2016. Endocrine Disrupting Effects of Triclosan on the Placenta in Pregnant Rats. *Plos One* 11, e0154758. doi:10.1371/journal.pone.0154758
- Fernandez, M.P., Ikonomou, M.G., Buchanan, I., 2007. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Sci. Total Environ.* 373, 250–269. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.11.018
- Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Moreno Acosta, O.D., Strüssmann, C.A., Somoza, G.M., 2013. Environmental stress-induced testis differentiation: androgen as a by-product of cortisol inactivation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 36–44. doi:10.1016/j.ygcen.2013.05.024
- Foran, C.M., Bennett, E.R., Benson, W.H., 2000. Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Mar. Environ. Res.* 50, 153–156. doi:10.1016/S0141-1136(00)00080-5
- Foreman, J.C., Johansen, T., Gibb, A.J., 2010. *Textbook of Receptor Pharmacology*, Third Edition. CRC Press.
- Frische, T., Faust, M., Meyer, W., Backhaus, T., 2009. Toxic masking and synergistic modulation of the estrogenic activity of chemical mixtures in a yeast estrogen screen (YES). *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 16, 593–603. doi:10.1007/s11356-009-0184-7
- Fritsch, E.B., Connon, R.E., Werner, I., Davies, R.E., Beggel, S., Feng, W., Pessah, I.N., 2013. Triclosan Impairs Swimming Behavior and Alters Expression of Excitation-Contraction Coupling Proteins in Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Environ. Sci. Technol.* 47, 2008–2017. doi:10.1021/es303790b
- Gale, W.L., Patiño, R., Maule, A.G., 2004. Interaction of xenobiotics with estrogen receptors α and β and a putative plasma sex hormone-binding globulin from channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 136, 338–345. doi:10.1016/j.ygcen.2004.01.009
- Garcia-Segura, L.M., 2009. *Hormones and Brain Plasticity*. Oxford University Press.
- Gee, R.H., Charles, A., Taylor, N., Darbre, P.D., 2008. Oestrogenic and androgenic activity of triclosan in breast cancer cells. *J. Appl. Toxicol.* 28, 78–91. doi:10.1002/jat.1316
- Ghisari, M., Bonfeld-Jorgensen, E.C., 2009. Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicol. Lett.* 189, 67–77. doi:10.1016/j.toxlet.2009.05.004
- Gong, Z., Ju, B., Wan, H., 2001. Green fluorescent protein (GFP) transgenic fish and their applications. *Genetica* 111, 213–225. doi:10.1023/A:1013796810782
- González, A., Piferrer, F., 2003. Aromatase activity in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) brain. Distribution and changes in relation to age, sex, and the annual reproductive cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132, 223–230. doi:10.1016/S0016-6480(03)00086-8
- Gorelick, D.A., Halpern, M.E., 2011. Visualization of estrogen receptor transcriptional activation in zebrafish. *Endocrinology* 152, 2690–2703. doi:10.1210/en.2010-1257
- Gorelick, D.A., Iwanowicz, L.R., Hung, A.L., Blazer, V.S., Halpern, M.E., 2014. Transgenic Zebrafish Reveal Tissue-Specific Differences in Estrogen Signaling in Response to Environmental Water Samples. *Environ. Health Perspect.* 122, 356–362. doi:10.1289/ehp.1307329
- Grans, J., Wassmur, B., Celander, M.C., 2010. One-way inhibiting cross-talk between arylhydrocarbon receptor (AhR) and estrogen receptor (ER) signaling in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *Aquat. Toxicol.* 100, 263–270. doi:10.1016/j.aquatox.2010.07.024

- Gray, K.A., Yates, B., Seal, R.L., Wright, M.W., Bruford, E.A., 2015. Genenames.org: the HGNC resources in 2015. *Nucleic Acids Res.* 43, D1079–D1085. doi:10.1093/nar/gku1071
- Green, J.M., Metz, J., Lee, O., Trznadel, M., Takesono, A., Brown, A.R., Owen, S.F., Kudoh, T., Tyler, C.R., 2016. High-Content and Semi-Automated Quantification of Responses to Estrogenic Chemicals Using a Novel Translucent Transgenic Zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* 50, 6536–6545. doi:10.1021/acs.est.6b01243
- Griffin, L.B., January, K.E., Ho, K.W., Cotter, K.A., Callard, G.V., 2013. Morpholino-mediated knockdown of ER α , ER β a, and ER β b mRNAs in zebrafish (*Danio rerio*) embryos reveals differential regulation of estrogen-inducible genes. *Endocrinology* 154, 4158–4169. doi:10.1210/en.2013-1446
- Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Delfosse, V., Thouennon, E., Bourguet, W., Balaguer, P., 2015. Reporter Cell Lines for the Characterization of the Interactions between Human Nuclear Receptors and Endocrine Disruptors. *Front. Endocrinol.* 6, 62. doi:10.3389/fendo.2015.00062
- Gutendorf, B., Westendorf, J., 2001. Comparison of an array of *in vitro* assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166, 79–89.
- Hahn, M.E., 2002. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem. Biol. Interact.* 141, 131–160. doi:10.1016/S0009-2797(02)00070-4
- Hahn, M.E., 2001. Dioxin toxicology and the aryl hydrocarbon receptor: Insights from fish and other non-traditional models. *Mar. Biotechnol.* 3, S224–S238. doi:10.1007/s10126-001-0045-Y
- Hahn, M.E., Allan, L.L., Sherr, D.H., 2009. Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: complex interactions involving the AHR repressor. *Biochem. Pharmacol.* 77, 485–497. doi:10.1016/j.bcp.2008.09.016
- Hannah, R., D’Aco, V.J., Anderson, P.D., Buzby, M.E., Caldwell, D.J., Cunningham, V.L., Ericson, J.F., Johnson, A.C., Parke, N.J., Samuelian, J.H., Sumpter, J.P., 2009. EXPOSURE ASSESSMENT OF 17 α -ETHINYLESTRADIOL IN SURFACE WATERS OF THE UNITED STATES AND EUROPE. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2725–2732. doi:10.1897/08-622.1
- Harman-Fetcho, J.A., Hapeman, C.J., McConnell, L.L., Potter, T.L., Rice, C.P., Sadeghi, A.M., Smith, R.D., Bialek, K., Sefton, K.A., Schaffer, B.A., Curry, R., 2005. Pesticide occurrence in selected South Florida canals and biscayne bay during high agricultural activity. *J. Agric. Food Chem.* 53, 6040–6048. doi:10.1021/jf047803g
- Harris, H.A., Bapat, A.R., Gonder, D.S., Frail, D.E., 2002. The ligand binding profiles of estrogen receptors α and beta are species dependent. *Steroids* 67, 379–384.
- Hawkins, M.B., Thomas, P., 2004. The unusual binding properties of the third distinct teleost estrogen receptor subtype ER beta a are accompanied by highly conserved amino acid changes in the ligand binding domain. *Endocrinology* 145, 2968–2977. doi:10.1210/en.2003.0806
- Hawkins, M.B., Thornton, J.W., Crews, D., Skipper, J.K., Dotte, A., Thomas, P., 2000. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10751–10756. doi:10.1073/pnas.97.20.10751
- Hayakawa, K., Onoda, Y., Tachikawa, C., Hosoi, S., Yoshita, M., Chung, S.W., Kizu, R., Toriba, A., Kameda, T., Tang, N., 2007. Estrogenic/Antiestrogenic Activities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Monohydroxylated Derivatives by Yeast Two-Hybrid Assay. *J. Health Sci.* 53, 562–570. doi:10.1248/jhs.53.562
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J., Tujague, M., Ström, A., Treuter, E., Warner, M., Gustafsson, J.-Å., 2007. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol. Rev.* 87, 905–931. doi:10.1152/physrev.00026.2006
- Heneweer, M., Muusse, M., van den Berg, M., Sanderson, J.T., 2005. Additive estrogenic effects of mixtures of frequently used UV filters on pS2-gene transcription in MCF-7 cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208, 170–177. doi:10.1016/j.taap.2005.02.006

- Henneberg, A., Bender, K., Blaha, L., Giebner, S., Kuch, B., Köhler, H.-R., Maier, D., Oehlmann, J., Richter, D., Scheurer, M., Schulte-Oehlmann, U., Sieratowicz, A., Ziebart, S., Triebkorn, R., 2014. Are *In vitro* Methods for the Detection of Endocrine Potentials in the Aquatic Environment Predictive for *In vivo* Effects? Outcomes of the Projects SchussenAktiv and SchussenAktivplus in the Lake Constance Area, Germany. PLOS ONE 9, e98307. doi:10.1371/journal.pone.0098307
- Hinfray, N., Palluel, O., Turies, C., Cousin, C., Porcher, J.M., Brion, F., 2006. Brain and gonadal aromatase as potential targets of endocrine disrupting chemicals in a model species, the zebrafish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. 21, 332–337. doi:10.1002/tox.20203
- Hinfray, N., Tebby, C., Garoche, C., Piccini, B., Bourguine, G., Aït-Aïssa, S., Kah, O., Pakdel, F., Brion, F., 2016. Additive effects of levonorgestrel and ethinylestradiol on brain aromatase (*cyp19a1b*) in zebrafish specific *in vitro* and *in vivo* bioassays. Toxicol. Appl. Pharmacol. 307, 108–114. doi:10.1016/j.taap.2016.07.023
- Hoegg, S., Brinkmann, H., Taylor, J.S., Meyer, A., 2004. Phylogenetic Timing of the Fish-Specific Genome Duplication Correlates with the Diversification of Teleost Fish. J. Mol. Evol. 59, 190–203. doi:10.1007/s00239-004-2613-z
- Hornung, M.W., Ankley, G.T., Schmieder, P.K., 2003. Induction of an estrogen-responsive reporter gene in rainbow trout hepatoma cells (RTH 149) at 11 or 18°C. Environ. Toxicol. Chem. 22, 866–871. doi:10.1002/etc.5620220426
- Houtman, C.J., Van Oostveen, A.M., Brouwer, A., Lamoree, M.H., Legler, J., 2004. Identification of estrogenic compounds in fish bile using bioassay-directed fractionation. Environ. Sci. Technol. 38, 6415–6423. doi:10.1021/es049750p
- Howard, G.J., Webster, T.F., 2009. Generalized concentration addition: A method for examining mixtures containing partial agonists. J. Theor. Biol. 259, 469–477. doi:10.1016/j.jtbi.2009.03.030
- Huang, H., Du, G., Zhang, W., Hu, J., Wu, D., Song, L., Xia, Y., Wang, X., 2014. The *in vitro* estrogenic activities of triclosan and triclocarban. J. Appl. Toxicol. 34, 1060–1067. doi:10.1002/jat.3012
- Huang, R., Sakamuru, S., Martin, M.T., Reif, D.M., Judson, R.S., Houck, K.A., Casey, W., Hsieh, J.-H., Shockley, K.R., Ceger, P., Fostel, J., Witt, K.L., Tong, W., Rotroff, D.M., Zhao, T., Shinn, P., Simeonov, A., Dix, D.J., Austin, C.P., Kavlock, R.J., Tice, R.R., Xia, M., 2014. Profiling of the Tox21 10K compound library for agonists and antagonists of the estrogen receptor α signaling pathway. Sci. Rep. 4, srep05664. doi:10.1038/srep05664
- Huang, R., Xia, M., Cho, M.-H., Sakamuru, S., Shinn, P., Houck, K.A., Dix, D.J., Judson, R.S., Witt, K.L., Kavlock, R.J., Tice, R.R., Austin, C.P., 2011. Chemical Genomics Profiling of Environmental Chemical Modulation of Human Nuclear Receptors. Environ. Health Perspect. 119, 1142–1148. doi:10.1289/ehp.1002952
- Ihara, M., Ihara, M.O., Kumar, V., Narumiya, M., Hanamoto, S., Nakada, N., Yamashita, N., Miyagawa, S., Iguchi, T., Tanaka, H., 2014. Co-occurrence of Estrogenic and Antiestrogenic Activities in Wastewater: Quantitative Evaluation of Balance by *in vitro* ER α Reporter Gene Assay and Chemical Analysis. Environ. Sci. Technol. 48, 6366–6373. doi:10.1021/es5014938
- Ihara, M., Kitamura, T., Kumar, V., Park, C.-B., Ihara, M.O., Lee, S.-J., Yamashita, N., Miyagawa, S., Iguchi, T., Okamoto, S., Suzuki, Y., Tanaka, H., 2015. Evaluation of Estrogenic Activity of Wastewater: Comparison Among *In vitro* ER α Reporter Gene Assay, *In vivo* Vitellogenin Induction, and Chemical Analysis. Environ. Sci. Technol. 49, 6319–6326. doi:10.1021/acs.est.5b01027
- Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., Takao, Y., Arizono, K., 2004. Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. Aquat. Toxicol. 67, 167–179. doi:10.1016/j.aquatox.2003.12.005
- Iwanari, M., Nakajima, M., Kizu, R., Hayakawa, K., Yokoi, T., 2002. Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences. Arch. Toxicol. 76, 287–298. doi:10.1007/s00204-002-0340-z

- James, M.O., 2011. Steroid catabolism in marine and freshwater fish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, Special Issue on Steroid Metabolism in Marine Organisms 127, 167–175. doi:10.1016/j.jsmb.2010.10.003
- Jarošová, B., Bláha, L., Giesy, J.P., Hilscherová, K., 2014a. What level of estrogenic activity determined by *in vitro* assays in municipal waste waters can be considered as safe? *Environ. Int.* 64, 98–109. doi:10.1016/j.envint.2013.12.009
- Jarošová, B., Erseková, A., Hilscherová, K., Loos, R., Gawlik, B.M., Giesy, J.P., Bláha, L., 2014b. Europe-wide survey of estrogenicity in wastewater treatment plant effluents: the need for the effect-based monitoring. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 10970–10982. doi:10.1007/s11356-014-3056-8
- Jarošová, B., Javůrek, J., Adamovský, O., Hilscherová, K., 2015. Phytoestrogens and mycoestrogens in surface waters—Their sources, occurrence, and potential contribution to estrogenic activity. *Environ. Int.* 81, 26–44. doi:10.1016/j.envint.2015.03.019
- Jin, Y., Chen, R., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z., 2009. Induction of estrogen-responsive gene transcription in the embryo, larval, juvenile and adult life stages of zebrafish as biomarkers of short-term exposure to endocrine disrupting chemicals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 150, 414–420. doi:10.1016/j.cbpc.2009.06.006
- Jobling, S., Beresford, N., Nolan, M., Rodgers-Gray, T., Brighty, G.C., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2002. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol. Reprod.* 66, 272–281. doi:10.1095/biolreprod66.2.272
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environ. Sci. Technol.* 32, 2498–2506. doi:10.1021/es9710870
- Johnson, A.C., 2010. Natural Variations in Flow Are Critical in Determining Concentrations of Point Source Contaminants in Rivers: An Estrogen Example. *Environ. Sci. Technol.* 44, 7865–7870. doi:10.1021/es101799j
- Johnson, A.C., Dumont, E., Williams, R.J., Oldenkamp, R., Cisowska, I., Sumpter, J.P., 2013. Do concentrations of ethinylestradiol, estradiol, and diclofenac in European rivers exceed proposed EU environmental quality standards? *Environ. Sci. Technol.* 47, 12297–12304. doi:10.1021/es4030035
- Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2701–2713. doi:10.1897/04-431R.1
- Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 40, 241–258. doi:10.1016/j.etap.2015.06.009
- Karamouzis, M.V., Papavassiliou, K.A., Adamopoulos, C., Papavassiliou, A.G., 2016. Targeting Androgen/Estrogen Receptors Crosstalk in Cancer. *Trends Cancer* 2, 35–48. doi:10.1016/j.trecan.2015.12.001
- Karchner, S.I., Franks, D.G., Powell, W.H., Hahn, M.E., 2002. Regulatory interactions among three members of the vertebrate aryl hydrocarbon receptor family: AHR repressor, AHR1, and AHR2. *J. Biol. Chem.* 277, 6949–6959. doi:10.1074/jbc.M110779200
- Käse, R., Carere, M., n.d. Effect-based and chemical analytical monitoring for the steroidal estrogens [WWW Document]. Oekotoxzentrum. URL <http://www.ecotoxcentre.ch/> (accessed 10.10.17).
- Kassotis, C.D., Alvarez, D.A., Taylor, J.A., vom Saal, F.S., Nagel, S.C., Tillitt, D.E., 2015. Characterization of Missouri surface waters near point sources of pollution reveals potential novel atmospheric route of exposure for bisphenol A and wastewater hormonal activity pattern. *Sci. Total Environ.* 524–525, 384–393. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.04.013
- Katsu, Y., Hinago, M., Sone, K., Urushitani, H., Guillette, L.J., Iguchi, T., 2007. *In vitro* assessment of transcriptional activation of the estrogen and androgen receptors of mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 276, 10–17. doi:10.1016/j.mce.2007.06.004

- Katsu, Y., Lange, A., Miyagawa, S., Urushitani, H., Tatarazako, N., Kawashima, Y., Tyler, C.R., Iguchi, T., 2013. Cloning, expression and functional characterization of carp, *Cyprinus carpio*, estrogen receptors and their differential activations by estrogens. *J. Appl. Toxicol.* 33, 41–49. doi:10.1002/jat.1707
- Katzenellenbogen, B.S., 2000. Mechanisms of action and cross-talk between estrogen receptor and progesterone receptor pathways. *J. Soc. Gynecol. Investig.* 7, S33-37.
- Kavlock, R., Chandler, K., Houck, K., Hunter, S., Judson, R., Kleinstreuer, N., Knudsen, T., Martin, M., Padilla, S., Reif, D., Richard, A., Rotroff, D., Sipes, N., Dix, D., 2012. Update on EPA's ToxCast Program: Providing High Throughput Decision Support Tools for Chemical Risk Management. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 1287–1302. doi:10.1021/tx3000939
- Kazeto, Y., Ijiri, S., Place, A.R., Zohar, Y., Trant, J.M., 2001. The 5'-flanking regions of CYP19A1 and CYP19A2 in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 503–508. doi:10.1006/bbrc.2001.5796
- Kidd, K.A., Blanchfield, P.J., Mills, K.H., Palace, V.P., Evans, R.E., Lazorchak, J.M., Flick, R.W., 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 8897–8901. doi:10.1073/pnas.0609568104
- Kim, S.-H., Hwang, K.-A., Choi, K.-C., 2016. Treatment with kaempferol suppresses breast cancer cell growth caused by estrogen and triclosan in cellular and xenograft breast cancer models. *J. Nutr. Biochem.* 28, 70–82. doi:10.1016/j.jnutbio.2015.09.027
- Kinani, S., Bouchonnet, S., Bourcier, S., Creusot, N., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S., 2008. Extraction and purification procedures for simultaneous quantification of phenolic xenoestrogens and steroid estrogens in river sediment by gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 22, 3651–3661. doi:10.1002/rcm.3771
- Kinani, S., Bouchonnet, S., Creusot, N., Bourcier, S., Balaguer, P., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S., 2010. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 158, 74–83. doi:10.1016/j.envpol.2009.07.041
- Kiyama, R., Wada-Kiyama, Y., 2015. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environ. Int.* 83, 11–40. doi:10.1016/j.envint.2015.05.012
- Kjærstad, M.B., Taxvig, C., Nellesmann, C., Vinggaard, A.M., Andersen, H.R., 2010. Endocrine disrupting effects *in vitro* of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Reprod. Toxicol.* 30, 573–582. doi:10.1016/j.reprotox.2010.07.009
- Kjeldsen, L.S., Ghisari, M., Bonefeld-Jørgensen, E.C., 2013. Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 272, 453–464. doi:10.1016/j.taap.2013.06.028
- Klinge, C.M., Bowers, J.L., Kulakosky, P.C., Kamboj, K.K., Swanson, H.I., 1999. The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements. *Mol. Cell. Endocrinol.* 157, 105–119.
- Kojima, H., Takeuchi, S., Itoh, T., Iida, M., Kobayashi, S., Yoshida, T., 2013. *In vitro* endocrine disruption potential of organophosphate flame retardants via human nuclear receptors. *Toxicology* 314, 76–83. doi:10.1016/j.cox.2013.09.004
- Kojima, H., Takeuchi, S., Van den Eede, N., Coyaci, A., 2016. Effects of primary metabolites of organophosphate flame retardants on transcriptional activity via human nuclear receptors. *Toxicol. Lett.* 245, 31–39. doi:10.1016/j.toxlet.2016.01.004
- Kojima, M., * K.F., Sasaki, M., Nakamura, M., Tsuji, M., Nishiyama, T., 2005. Evaluation of estrogenic activities of pesticides using an *in vitro* reporter gene assay. *Int. J. Environ. Health Res.* 15, 271–280. doi:10.1080/09603120500155765
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Buxton, H.T., 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1202–1211. doi:10.1021/es011055j

- König, M., Escher, B.I., Neale, P.A., Krauss, M., Hilscherová, K., Novák, J., Teodorović, I., Schulze, T., Seidensticker, S., Kamal Hashmi, M.A., Ahlheim, J., Brack, W., 2017. Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of *in vitro* bioassays and chemical analysis. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 220, 1220–1230. doi:10.1016/j.envpol.2016.11.011
- Kortenkamp, A., 2007. Ten Years of Mixing Cocktails: A Review of Combination Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals. *Environ. Health Perspect.* 115, 98–105. doi:10.1289/ehp.9357
- Kortenkamp, A., Altenburger, R., 1998. Synergisms with mixtures of xenoestrogens: a reevaluation using the method of isoboles. *Sci. Total Environ.* 221, 59–73.
- Kotrschal, K., Staaden, M.J.V., Huber, R., 1998. Fish Brains: Evolution and Environmental Relationships. *Rev. Fish Biol. Fish.* 8, 373–408. doi:10.1023/A:1008839605380
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 5925–5930.
- Kunz, P.Y., Fent, K., 2009. Estrogenic activity of ternary UV filter mixtures in fish (*Pimephales promelas*) — An analysis with nonlinear isobolograms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234, 77–88. doi:10.1016/j.taap.2008.09.032
- Kunz, P.Y., Fent, K., 2006. Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217, 86–99. doi:10.1016/j.taap.2006.07.014
- Kunz, P.Y., Kienle, C., Carere, M., Homazava, N., Kase, R., 2015. *In vitro* bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 106, 107–115. doi:10.1016/j.jpba.2014.11.018
- Kunz, P.Y., Simon, E., Creusot, N., Jayasinghe, B.S., Kienle, C., Maletz, S., Schifferli, A., Schönlau, C., Aït-Aïssa, S., Denslow, N.D., Hollert, H., Werner, I., Vermeirssen, E.L.M., 2017. Effect-based tools for monitoring estrogenic mixtures: Evaluation of five *in vitro* bioassays. *Water Res.* 110, 378–388. doi:10.1016/j.watres.2016.10.062
- Kurauchi, K., Nakaguchi, Y., Tsutsumi, M., Hori, H., Kurihara, R., Hashimoto, S., Ohnuma, R., Yamamoto, Y., Matsuoka, S., Kawai, S., Hirata, T., Kinoshita, M., 2005. *In vivo* Visual Reporter System for Detection of Estrogen-Like Substances by Transgenic Medaka. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2762–2768. doi:10.1021/es0486465
- Lange, A., Katsu, Y., Miyagawa, S., Ogino, Y., Urushitani, H., Kobayashi, T., Hirai, T., Shears, J.A., Nagae, M., Yamamoto, J., Ohnishi, Y., Oka, T., Tatarazako, N., Ohta, Y., Tyler, C.R., Iguchi, T., 2012. Comparative responsiveness to natural and synthetic estrogens of fish species commonly used in the laboratory and field monitoring. *Aquat. Toxicol.* 109, 250–258. doi:10.1016/j.aquatox.2011.09.004
- Laronde, S., Petit, K., 2010. Bilan national des efforts de surveillance de la qualité des cours d'eau. ONEMA.
- Laudet, V., 1997. Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor. *J. Mol. Endocrinol.* 19, 207–226.
- Le Fol, V., Aït-Aïssa, S., Cabaton, N., Dolo, L., Grimaldi, M., Balaguer, P., Perdu, E., Debrauwer, L., Brion, F., Zalko, D., 2015. Cell-specific biotransformation of benzophenone-2 and bisphenol-s in zebrafish and human *in vitro* models used for toxicity and estrogenicity screening. *Environ. Sci. Technol.* 49, 3860–3868. doi:10.1021/es505302c
- Le Fol, V., Aït-Aïssa, S., Sonavane, M., Porcher, J.-M., Balaguer, P., Cravedi, J.-P., Zalko, D., Brion, F., 2017a. *In vitro* and *in vivo* estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 142, 150–156. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.04.009
- Le Fol, V., Brion, F., Hillenweck, A., Perdu, E., Bruel, S., Aït-Aïssa, S., Cravedi, J.-P., Zalko, D., 2017b. Comparison of the *In vivo* Biotransformation of Two Emerging Estrogenic Contaminants, BP2 and BPS, in Zebrafish Embryos and Adults. *Int. J. Mol. Sci.* 18. doi:10.3390/ijms18040704

- Le Page, Y., Menuet, A., Kah, O., Pakdel, F., 2008. Characterization of a cis-acting element involved in cell-specific expression of the zebrafish brain aromatase gene. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1549–1557. doi:10.1002/mrd.20892
- Le Page, Y., Scholze, M., Kah, O., Pakdel, F., 2006. Assessment of Xenoestrogens Using Three Distinct Estrogen Receptors and the Zebrafish Brain Aromatase Gene in a Highly Responsive Glial Cell System. *Environ. Health Perspect.* 114, 752–758. doi:10.1289/ehp.8141
- Lee, O., Green, J.M., Tyler, C.R., 2015. Transgenic fish systems and their application in ecotoxicology. *Crit. Rev. Toxicol.* 45, 124–141. doi:10.3109/10408444.2014.965805
- Lee, O., Takesono, A., Tada, M., Tyler, C.R., Kudoh, T., 2012. Biosensor Zebrafish Provide New Insights into Potential Health Effects of Environmental Estrogens. *Environ. Health Perspect.* 120, 990–996. doi:10.1289/ehp.1104433
- Lee Pow, C.S.D., Yost, E.E., Aday, D., Kullman, S.W., 2016. Sharing the Roles: An Assessment of Japanese Medaka Estrogen Receptors in Vitellogenin Induction. *Environ. Sci. Technol.* doi:10.1021/acs.est.6b01968
- Lee, Y., Jin, Y., Lim, W., Ji, S., Choi, S., Jang, S., Lee, S., 2003. A ginsenoside-Rh1, a component of ginseng saponin, activates estrogen receptor in human breast carcinoma MCF-7 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84, 463–468.
- Legler, J., Broekhof, J.L.M., Brouwer, A., Lanser, P.H., Murk, A.J., van der Saag, P.T., Vethaak, A.D., Wester, P., Zivkovic, D., van der Burg, B., 2000. A Novel *in vivo* Bioassay for (Xeno-)estrogens Using Transgenic Zebrafish. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4439–4444. doi:10.1021/es0000605
- 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. Off. J. Soc. Toxicol.* 48, 55–66.
- Legler, J., Zeinstra, L.M., Schuitemaker, F., Lanser, P.H., Bogerd, J., Brouwer, A., Vethaak, A.D., De Voogt, P., Murk, A.J., Van der Burg, B., 2002. Comparison of *in vivo* and *in vitro* reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4410–4415. doi:10.1021/es010323a
- Lemaire, G., Mnif, W., Pascussi, J.M., Pillon, A., Rabenoelina, F., Fenet, H., Gomez, E., Casellas, C., Nicolas, J.C., Cavailles, V., Duchesne, M.J., Balaguer, P., 2006. Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system. *Toxicol. Sci.* 91, 501–509. doi:10.1093/toxsci/kfj173
- Leusch, F.D.L., De Jager, C., Levi, Y., Lim, R., Puijker, L., Sacher, F., Tremblay, L.A., Wilson, V.S., Chapman, H.F., 2010. Comparison of Five *in vitro* Bioassays to Measure Estrogenic Activity in Environmental Waters. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3853–3860. doi:10.1021/es903899d
- Leusch, F.D.L., Neale, P.A., Hebert, A., Scheurer, M., Schriks, M.C.M., 2017. Analysis of the sensitivity of *in vitro* bioassays for androgenic, progestagenic, glucocorticoid, thyroid and estrogenic activity: Suitability for drinking and environmental waters. *Environ. Int.* 99, 120–130. doi:10.1016/j.envint.2016.12.014
- Liška, I., Wagner, F., Sengl, M., Deutsch, K., Slobodník, J., 2015. Joint Danube Survey 3. A Comprehensive Analysis of Danube Water Quality. International Commission for the Protection of the Danube River (ICPDR).
- Liu, B.Q., Wang, Y.Q., Fillgrove, K.L., Anderson, V.E., 2002. Triclosan inhibits enoyl-reductase of type I fatty acid synthase *in vitro* and is cytotoxic to MCF-7 and SKBr-3 breast cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49, 187–193. doi:10.1007/s00280-001-0399-x
- Loi n° 2004-338 du 21 avril 2004 portant transposition de la directive 2000/60/ CE du Parlement européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau, n.d.
- Loi n° 2006-1772 du 30 décembre 2006 sur l'eau et les milieux aquatiques, n.d.
- Loos, R., 2015. Analytical methods for possible WFD 1st watch list substances. Publications Office of the European Union. doi:10.2788/723416

- Loos, R., Carvalho, R., Antonio, D.C., Cornero, S., Locoro, G., Tavazzi, S., Paracchini, B., Ghiani, M., Lettieri, T., Blaha, L., Jarosova, B., Voorspoels, S., Servaes, K., Haglund, P., Fick, J., Lindberg, R.H., Schwesig, D., Gawlik, B.M., 2013. EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Res.* 47, 6475–6487. doi:10.1016/j.watres.2013.08.024
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G., 2009. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* 157, 561–568. doi:10.1016/j.envpol.2008.09.020
- Louis, G.W., Hallinger, D.R., Stoker, T.E., 2013. The effect of triclosan on the uterotrophic response to extended doses of ethinyl estradiol in the weanling rat. *Reprod. Toxicol.* 36, 71–77. doi:10.1016/j.reprotox.2012.12.001
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdà, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol., Fish Reproduction* 165, 367–389. doi:10.1016/j.ygcen.2009.05.022
- Maruya, K.A., Dodder, N.G., Mehinto, A.C., Denslow, N.D., Schlenk, D., Snyder, S.A., Weisberg, S.B., 2016. A tiered, integrated biological and chemical monitoring framework for contaminants of emerging concern in aquatic ecosystems. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 12, 540–547. doi:10.1002/ieam.1702
- Matsubara, T., Nagae, M., Ohkubo, N., Andoh, T., Sawaguchi, S., Hiramatsu, N., Sullivan, C.V., Hara, A., 2003. Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 295–299. doi:10.1023/B:FISH.0000030559.71954.37
- Matthews, J., Celius, T., Halgren, R., Zacharewski, T., 2000. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 74, 223–234. doi:10.1016/S0960-0760(00)00126-6
- Matthews, J., Gustafsson, J.-Å., 2006. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl. Recept. Signal.* 4. doi:10.1621/nrs.04016
- McDonnell, D.P., Norris, J.D., 2002. Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 296, 1642–1644. doi:10.1126/science.1071884
- Medjakovic, S., Zoehling, A., Gerster, P., Ivanova, M.M., Teng, Y., Klinge, C.M., Schildberger, B., Gartner, M., Jungbauer, A., 2014. Effect of nonpersistent pesticides on estrogen receptor, androgen receptor, and aryl hydrocarbon receptor. *Environ. Toxicol.* 29, 1201–1216. doi:10.1002/tox.21852
- Meng, X., Bartholomew, C., Craft, J.A., 2010. Differential expression of vitellogenin and oestrogen receptor genes in the liver of zebrafish, *Danio rerio*. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 625–630. doi:10.1007/s00216-009-3112-2
- Menuet, A., Le Page, Y., Torres, O., Kern, L., Kah, O., Pakdel, F., 2004. Analysis of the estrogen regulation of the zebrafish estrogen receptor (ER) reveals distinct effects of ER α , ERbeta1 and ERbeta2. *J. Mol. Endocrinol.* 32, 975–986.
- Menuet, A., Pellegrini, E., Anglade, I., Blaise, O., Laudet, V., Kah, O., Pakdel, F., 2002. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: Binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. *Biol. Reprod.* 66, 1881–1892. doi:10.1095/biolreprod66.6.1881
- Menuet, A., Pellegrini, E., Brion, F., Gueguen, M.M., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene. *J. Comp. Neurol.* 485, 304–320. doi:10.1002/cne.20497
- Miège, C., Gabet, V., Coquery, M., Karolak, S., Jugan, M.-L., Oziol, L., Levi, Y., Chevreuil, M., 2009. Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. *TrAC Trends Anal. Chem., In-situ trialing and validation of ecological and chemical water measurements* 28, 186–195. doi:10.1016/j.trac.2008.11.007
- Mills, L.J., Chichester, C., 2005. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Sci. Total Environ.* 343, 1–34. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.12.070

- Miranda, C.L., Collodi, P., Zhao, X., Barnes, D.W., Buhler, D.R., 1993. Regulation of Cytochrome P450 Expression in a Novel Liver Cell Line from Zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Arch. Biochem. Biophys.* 305, 320–327. doi:10.1006/abbi.1993.1429
- Miyagawa, S., Lange, A., Hirakawa, I., Tohyama, S., Ogino, Y., Mizutani, T., Kagami, Y., Kusano, T., Ihara, M., Tanaka, H., Tatarazako, N., Ohta, Y., Katsu, Y., Tyler, C.R., Iguchi, T., 2014. Differing species responsiveness of estrogenic contaminants in fish is conferred by the ligand binding domain of the estrogen receptor. *Environ. Sci. Technol.* 48, 5254–5263. doi:10.1021/es5002659
- Mnif, W., Pascussi, J.-M., Pillon, A., Escande, A., Bartegi, A., Nicolas, J.-C., Cavaillès, V., Duchesne, M.-J., Balaguer, P., 2007. Estrogens and antiestrogens activate hPXR. *Toxicol. Lett.* 170, 19–29. doi:10.1016/j.toxlet.2006.11.016
- Molina-Molina, J.-M., Escande, A., Pillon, A., Gomez, E., Pakdel, F., Cavaillès, V., Olea, N., Ait-Aïssa, S., Balaguer, P., 2008. Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific *in vitro* bioassays. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232, 384–395. doi:10.1016/j.taap.2008.07.017
- Mortensen, A.S., Arukwe, A., 2008. Estrogenic effect of dioxin-like aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonist (PCB congener 126) in salmon hepatocytes. *Mar. Environ. Res.* 66, 119–120. doi:10.1016/j.marenvres.2008.02.041
- Mortensen, A.S., Arukwe, A., 2007. Interactions Between Estrogen- and Ah-Receptor Signalling Pathways in Primary Culture of Salmon Hepatocytes Exposed to Nonylphenol and 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (Congener 77). *Comp. Hepatol.* 6, 2. doi:10.1186/1476-5926-6-2
- Mortensen, A.S., Tolfsen, C.C., Arukwe, A., 2006. Gene Expression Patterns in Estrogen (Nonylphenol) and Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists (PCB-77) Interaction Using Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Primary Hepatocyte Culture. *J. Toxicol. Environ. Health A* 69, 1–19. doi:10.1080/15287390500257792
- Mouriec, K., Gueguen, M.-M., Manuel, C., Percevault, F., Thieulant, M.-L., Pakdel, F., Kah, O., 2009. Androgens Upregulate *cyp19a1b* (Aromatase B) Gene Expression in the Brain of Zebrafish (*Danio rerio*) Through Estrogen Receptors. *Biol. Reprod.* 80, 889–896. doi:10.1095/biolreprod.108.073643
- Mouriec, K., Lareyre, J.J., Tong, S.K., Le Page, Y., Vaillant, C., Pellegrini, E., Pakdel, F., Chung, B.C., Kah, O., Anglade, I., 2009. Early regulation of brain aromatase (*cyp19a1b*) by estrogen receptors during zebrafish development. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 238, 2641–2651. doi:10.1002/dvdy.22069
- Murk, A.J., Legler, J., van Lipzig, M.M.H., Meerman, J.H.N., Belfroid, A.C., Spenkeliink, A., van der Burg, B., Rijs, G.B.J., Vethaak, D., 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 16–23. doi:10.1002/etc.5620210103
- Nagahama, Y., 2002. Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38, 217–229. doi:10.1387/ijdb.7981031
- Nagler, J.J., Cavileer, T., Sullivan, J., Cyr, D.G., Rexroad, C., 2007. The complete nuclear estrogen receptor family in the rainbow trout: Discovery of the novel ER α 2 and both ER β isoforms. *Gene* 392, 164–173. doi:10.1016/j.gene.2006.12.030
- Nakada, N., Nyunoya, H., Nakamura, M., Hara, A., Iguchi, T., Takada, H., 2004. Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 2807–2815. doi:10.1897/03-699.1
- Navas, J.M., Segner, H., 2000a. Modulation of trout 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity by estradiol and octylphenol. *Mar. Environ. Res.* 50, 157–162.
- Navas, J.M., Segner, H., 2000b. Antiestrogenicity of beta-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor. *Aquat. Toxicol.* 51, 79–92. doi:10.1016/S0166-445X(00)00100-4
- Navas, J.M., Zanuy, S., Segner, H., Carrillo, M., 2004. beta-Naphthoflavone alters normal plasma levels of vitellogenin, 17 beta-estradiol and luteinizing hormone in sea bass broodstock. *Aquat. Toxicol.* 67, 337–345. doi:10.1016/j.aquatox.2004.01.016

- Neale, P.A., Ait-Aïssa, S., Brack, W., Creusot, N., Denison, M.S., Deutschmann, B., Hilscherova, K., Hollert, H., Krauss, M., Novak, J., Schulze, T., Seiler, T.-B., Serra, H., Shao, Y., Escher, B.I., 2015. Linking *in vitro* Effects and Detected Organic Micropollutants in Surface Water Using Mixture-Toxicity Modeling. *Environ. Sci. Technol.* 49, 14614–14624. doi:10.1021/acs.est.5b04083
- Neale, P.A., Altenburger, R., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Busch, W., de Aragão Umbuzeiro, G., Denison, M.S., Du Pasquier, D., Hilscherová, K., Hollert, H., Morales, D.A., Novák, J., Schlichting, R., Seiler, T.-B., Serra, H., Shao, Y., Tindall, A.J., Tollefsen, K.E., Williams, T.D., Escher, B.I., 2017a. Development of a bioanalytical test battery for water quality monitoring: Fingerprinting identified micropollutants and their contribution to effects in surface water. *Water Res.* 123, 734–750. doi:10.1016/j.watres.2017.07.016
- Neale, P.A., Munz, N.A., Aït-Aïssa, S., Altenburger, R., Brion, F., Busch, W., Escher, B.I., Hilscherová, K., Kienle, C., Novák, J., Seiler, T.-B., Shao, Y., Stamm, C., Hollender, J., 2017b. Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. *Sci. Total Environ.* 576, 785–795. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.141
- Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2013. Estrogen receptor function and regulation in fish and other vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 15–24. doi:10.1016/j.ygcen.2013.03.032
- Nelson, E.R., Habibi, H.R., 2010. Functional significance of nuclear estrogen receptor subtypes in the liver of goldfish. *Endocrinology* 151, 1668–1676. doi:10.1210/en.2009-1447
- Noda, M., 2015. Possible role of glial cells in the relationship between thyroid dysfunction and mental disorders. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 194. doi:10.3339/fncel.2015.00194
- Norris, D.O., Carr, J.A., 2013. *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press.
- OECD, 2015a. Essai n° 493 : Ligne directrice axée sur la performance pour les essais *in vitro* faisant appel au récepteur d'oestrogène recombinant humain (hrER) pour la détection des substances ayant une affinité de liaison avec les récepteurs des oestrogènes. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2015b. Test No. 240: Étude étendue de toxicité pour la reproduction sur une génération chez médaka (MEOGRT). Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2011. Test No. 234: Fish Sexual Development Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2009a. Essai n° 229 : Essai à court terme de reproduction des poissons. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- OECD, 2009b. Test No. 230: 21-day Fish Assay. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S., 2003. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545–550. doi:10.1038/nature01606
- Orvos, D.R., Versteeg, D.J., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A., Cunningham, V., 2002. Aquatic toxicity of triclosan. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1338–1349. doi:10.1897/1551-5028(2002)021<1338:ATOT>2.0.CO;2
- Park, B.K., Gonzales, E.L.T., Yang, S.M., Bang, M., Choi, C.S., Shin, C.Y., 2016. Effects of Triclosan on Neural Stem Cell Viability and Survival. *Biomol. Ther.* 24, 99–107. doi:10.4062/biomolther.2015.164
- Pasmanik, M., Callard, G.V., 1988. Changes in Brain Aromatase and 5 α -Reductase Activities Correlate Significantly with Seasonal Reproductive Cycles in Goldfish (*Carassius auratus*). *Endocrinology* 122, 1349–1356. doi:10.1210/endo-122-4-1349
- Pasmanik, M., Callard, G.V., 1985. Aromatase and 5 α -reductase in the teleost brain, spinal cord, and pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60, 244–251.

- Pawlowski, S., Ternes, T., Bonerz, M., Kluczka, T., van der Burg, B., Nau, H., Erdinger, L., Braunbeck, T., 2003. Combined *in situ* and *in vitro* assessment of the estrogenic activity of sewage and surface water samples. *Toxicol. Sci.* 75, 57–65. doi:10.1093/toxsci/kfg162
- Payne, J., Rajapakse, N., Wilkins, M., Kortenkamp, A., 2000. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. *Environ. Health Perspect.* 108, 983–987.
- Pellegrini, E., Diotel, N., Vaillant-Capitaine, C., Pérez Maria, R., Gueguen, M.-M., Nasri, A., Cano Nicolau, J., Kah, O., 2016. Steroid modulation of neurogenesis: Focus on radial glial cells in zebrafish. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol., SI: Steroids & Nervous System* 160, 27–36. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.06.011
- Pellegrini, E., Menuet, A., Lethimonier, C., Adrio, F., Gueguen, M.-M., Tascon, C., Anglade, I., Pakdel, F., Kah, O., 2005. Relationships between aromatase and estrogen receptors in the brain of teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol., 5th International Symposium on Fish Endocrinology* 142, 60–66. doi:10.1016/j.ygcen.2004.12.003
- Pellegrini, E., Mouriec, K., Anglade, I., Menuet, A., Le Page, Y., Gueguen, M.-M., Marmignon, M.-H., Brion, F., Pakdel, F., Kah, O., 2007. Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 501, 150–167. doi:10.1002/cne.21222
- Petersen, K., Fetter, E., Kah, O., Brion, F., Scholz, S., Tollefsen, K.E., 2013. Transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos as a tool for assessing combined effects of oestrogenic chemicals. *Aquat. Toxicol.* 138, 88–97. doi:10.1016/j.aquatox.2013.05.001
- Petersen, K., Tollefsen, K.E., 2011. Assessing combined toxicity of estrogen receptor agonists in a primary culture of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 101, 186–195. doi:10.1016/j.aquatox.2010.09.018
- Petit, F., Le Goff, P., Cravedi, J.P., Valotaire, Y., Pakdel, F., 1997. Two complementary bioassays for screening the estrogenic potency of xenobiotics: recombinant yeast for trout estrogen receptor and trout hepatocyte cultures. *J. Mol. Endocrinol.* 19, 321–335. doi:10.1677/jme.0.0190321
- Petit, F., Valotaire, Y., Pakdel, F., 1995. Differential functional activities of rainbow trout and human estrogen receptors expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 233, 584–592.
- Petrovic, M., Eljarrat, E., Alda, M.J.L. de, Barceló, D., 2004. Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data. *Anal. Bioanal. Chem.* 378, 549–562. doi:10.1007/s00216-003-2184-7
- Pillon, A., Boussioux, A.-M., Escande, A., Aït-Aïssa, S., Gomez, E., Fenet, H., Ruff, M., Moras, D., Vignon, F., Duchesne, M.-J., Casellas, C., Nicolas, J.-C., Balaguer, P., 2005. Binding of Estrogenic Compounds to Recombinant Estrogen Receptor- α : Application to Environmental Analysis. *Environ. Health Perspect.* 113, 278–284. doi:10.1289/ehp.7522
- Pinto, C., Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Pakdel, F., Brion, F., Aït-Aïssa, S., Cavaillès, V., Bourguet, W., Gustafsson, J.-A., Bondesson, M., Balaguer, P., 2014. Selectivity of natural, synthetic and environmental estrogens for zebrafish estrogen receptors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 280, 60–69. doi:10.1016/j.taap.2014.07.020
- Pinto, P.I.S., Guerreiro, E.M., Power, D.M., 2013. Triclosan interferes with the thyroid axis in the zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol. Res.* 2, 60–69. doi:10.1039/c2tx20005h
- Plan micropolluants 2016-2021 pour préserver la qualité des eaux et de la biodiversité, 2016.
- Pons, M., Gagne, D., Nicolas, J.C., Mehtali, M., 1990. A new cellular model of response to estrogens: a bioluminescent test to characterize (anti) estrogen molecules. *BioTechniques* 9, 450–459.
- Prochazkova, T., Sychrova, E., Javurkova, B., Vecerkova, J., Kohoutek, J., Lepsova-Skacelova, O., Blaha, L., Hilscherova, K., 2017. Phytoestrogens and sterols in waters with cyanobacterial blooms - Analytical methods and estrogenic potencies. *Chemosphere* 170, 104–112. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.12.006

- Prossnitz, E.R., Barton, M., 2011. The G protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* 7, 715–726. doi:10.1038/nrendo.2011.122
- Rajapakse, N., Ong, D., Kortenkamp, A., 2001. Defining the Impact of Weakly Estrogenic Chemicals on the Action of Steroidal Estrogens. *Toxicol. Sci.* 60, 296–304. doi:10.1093/toxsci/60.2.296
- Rajapakse, N., Silva, E., Kortenkamp, A., 2002. Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ. Health Perspect.* 110, 917–921.
- Rajapakse, N., Silva, E., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2004. Deviation from additivity with estrogenic mixtures containing 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol detected in the E-SCREEN assay. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6343–6352.
- Raut, S.A., Angus, R.A., 2010. Triclosan Has Endocrine-Disrupting Effects in Male Western Mosquitofish, *Gambusia Affinis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1287–1291. doi:10.1002/etc.150
- Reading, B.J., Hiramatsu, N., Sawaguchi, S., Matsubara, T., Hara, A., Lively, M.O., Sullivan, C.V., 2009. Conserved and Variant Molecular and Functional Features of Multiple Egg Yolk Precursor Proteins (Vitellogenins) in White Perch (*Morone americana*) and other Teleosts. *Mar. Biotechnol.* 11, 169. doi:10.1007/s10126-008-9133-6
- Rider, C.V., Hartig, P.C., Cardon, M.C., Wilson, V.S., 2009. Comparison of chemical binding to recombinant fathead minnow and human estrogen receptors α in whole cell and cell-free binding assays. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2175–2181. doi:10.1897/09-018.1
- Roberts, J., Bain, P.A., Kumar, A., Hepplewhite, C., Ellis, D.J., Christy, A.G., Beavis, S.G., 2015. Tracking multiple modes of endocrine activity in Australia's largest inland sewage treatment plant and effluent-receiving environment using a panel of *in vitro* bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 2271–2281. doi:10.1002/etc.3051
- Rogers, J.M., Denison, M.S., 2000. Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals. *In Vitro. Mol. Toxicol.* 13, 67–82.
- Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 1996a. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 241–248. doi:10.1002/etc.5620150303
- Routledge, E.J., Sumpter, J.P., 1996b. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 241–248. doi:10.1002/etc.5620150303
- Routledge, E.J., White, R., Parker, M.G., Sumpter, J.P., 2000. Differential Effects of Xenoestrogens on Coactivator Recruitment by Estrogen Receptor (ER) α and ER β . *J. Biol. Chem.* 275, 35986–35993. doi:10.1074/jbc.M006777200
- Rüegg, J., Swedenborg, E., Wahlström, D., Escande, A., Balaguer, P., Pettersson, K., Pongratz, I., 2008. The transcription factor aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator functions as an estrogen receptor beta-selective coactivator, and its recruitment to alternative pathways mediates antiestrogenic effects of dioxin. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 22, 304–316. doi:10.1210/me.2007-0128
- Rutishauser, B.V., Pesonen, M., Escher, B.I., Ackermann, G.E., Aerni, H.-R., Suter, M.J.-F., Eggen, R.I.L., 2004. Comparative analysis of estrogenic activity in sewage treatment plant effluents involving three *in vitro* assays and chemical analysis of steroids. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 857–864. doi:10.1897/03-286
- Sabo-Attwood, T., Blum, J.L., Kroll, K.J., Patel, V., Birkholz, D., Szabo, N.J., Fisher, S.Z., McKenna, R., Campbell-Thompson, M., Denslow, N.D., 2007. Distinct expression and activity profiles of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) estrogen receptors in response to estradiol and nonylphenol. *J. Mol. Endocrinol.* 39, 223–237. doi:10.1677/JME-07-0038

- Safe, S., Wormke, M., Samudio, I., 2000. Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 5, 295–306.
- Salam, M.A., Sawada, T., Ohya, T., Ninomiya, K., Hayashi, S., 2008. Detection of environmental estrogenicity using transgenic medaka hatchlings (*Oryzias latipes*) expressing the GFP-tagged choriogenin L Gene. *J. Environ. Sci. Health Part A* 43, 272–277. doi:10.1080/10934520701792761
- Sanchez, W., Sremski, W., Piccini, B., Palluel, O., Maillot-Maréchal, E., Betoulle, S., Jaffal, A., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Thybaud, E., Hinfray, N., Porcher, J.-M., 2011. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environ. Int.* 37, 1342–1348. doi:10.1016/j.envint.2011.06.002
- Sanderson, T., van, den B.M., 2009. Interactions of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway. *Pure Appl. Chem.* 75, 1957–1971. doi:10.1351/pac200375111957
- Schlotz, N., Kim, G.-J., Jäger, S., Günther, S., Lamy, E., 2017. *In vitro* observations and in silico predictions of xenoestrogen mixture effects in T47D-based receptor transactivation and proliferation assays. *Toxicol. In vitro.* doi:10.1016/j.tiv.2017.08.017
- Schnitzler, J.G., Frédéric, B., Dussenne, M., Klaren, P.H.M., Silvestre, F., Das, K., 2016. Triclosan exposure results in alterations of thyroid hormone status and retarded early development and metamorphosis in *Cyprinodon variegatus*. *Aquat. Toxicol.* 181, 1–10. doi:10.1016/j.aquatox.2016.10.019
- Scholz, S., Kurauchi, K., Kinoshita, M., Oshima, Y., Ozato, K., Schirmer, K., Wakamatsu, Y., 2005. Analysis of estrogenic effects by quantification of green fluorescent protein in juvenile fish of a transgenic medaka. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2553–2561. doi:10.1897/04-525R.1
- Scholze, M., Boedeker, W., Faust, M., Backhaus, T., Altenburger, R., Grimme, L.H., 2001. A general best-fit method for concentration-response curves and the estimation of low-effect concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 448–457.
- Scholze, M., Silva, E., Kortenkamp, A., 2014. Extending the Applicability of the Dose Addition Model to the Assessment of Chemical Mixtures of Partial Agonists by Using a Novel Toxic Unit Extrapolation Method. *PLOS ONE* 9, e88808. doi:10.1371/journal.pone.0088808
- Schultz, M.M., Bartell, S.E., Schoenfuss, H.L., 2012. Effects of triclosan and triclocarban, two ubiquitous environmental contaminants, on anatomy, physiology, and behavior of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 63, 114–124. doi:10.1007/s00244-011-9748-x
- Schulz, R.W., de França, L.R., Lareyre, J.-J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol., Fish Reproduction* 165, 390–411. doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.013
- Schulze, T., Ahel, M., Ahlheim, J., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Di Paolo, C., Froment, J., Hidasi, A.O., Hollender, J., Hollert, H., Hu, M., Kloß, A., Koprivica, S., Krauss, M., Muz, M., Oswald, P., Pêtre, M., Schollée, J.E., Seiler, T.-B., Shao, Y., Slobodnik, J., Sonavane, M., Suter, M.J.-F., Tollefsen, K.E., Tousova, Z., Walz, K.-H., Brack, W., 2017. Assessment of a novel device for onsite integrative large-volume solid phase extraction of water samples to enable a comprehensive chemical and effect-based analysis. *Sci. Total Environ.* 581, 350–358. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.12.140
- Scientific committee on consumer safety (SCCS), 2010. Opinion on triclosan - Antimicrobial resistance (No. SCCP/1251/09).
- Scott, P.D., Coleman, H.M., Colville, A., Lim, R., Matthews, B., McDonald, J.A., Miranda, A., Neale, P.A., Nuggeoda, D., Tremblay, L.A., Leusch, F.D.L., 2017. Assessing the potential for trace organic contaminants commonly found in Australian rivers to induce vitellogenin in the native rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) and the introduced mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 185, 105–120. doi:10.1016/j.aquatox.2017.02.008
- Seeger, B., Klawonn, F., Bekale, B.N., Steinberg, P., 2016. Mixture Effects of Estrogenic Pesticides at the Human Estrogen Receptor α and β . *PLOS ONE* 11, e0147490. doi:10.1371/journal.pone.0147490

- Segner, H., Casanova-Nakayama, A., Kase, R., Tyler, C.R., 2013. Impact of environmental estrogens on fish considering the diversity of estrogen signaling. *Gen. Comp. Endocrinol.* 191, 190–201. doi:10.1016/j.ygcen.2013.05.015
- Shanle, E.K., Xu, W., 2011. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 6–19. doi:10.1021/tx100231n
- Sharma, V.K., Anquandah, G.A.K., Yngard, R.A., Kim, H., Fekete, J., Bouzek, K., Ray, A.K., Golovko, D., 2009. Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: A review on occurrence, fate, and treatment. *J. Environ. Sci. Health Part A* 44, 423–442. doi:10.1080/10934520902719704
- Silva, E., Rajapakse, N., Kortenkamp, A., 2002. Something from “nothing”—eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1751–1756.
- Silva, E., Rajapakse, N., Scholze, M., Backhaus, T., Ermler, S., Kortenkamp, A., 2011. Joint Effects of Heterogeneous Estrogenic Chemicals in the E-Screen—Exploring the Applicability of Concentration Addition. *Toxicol. Sci.* 122, 383–394. doi:10.1093/toxsci/kfr103
- Smeets, J.M.W., Rankouhi, T.R., Nichols, K.M., Komen, H., Kaminski, N.E., Giesy, J.P., van den Berg, M., 1999. *In vitro* Vitellogenin Production by Carp (*Cyprinus carpio*) Hepatocytes as a Screening Method for Determining (Anti)Estrogenic Activity of Xenobiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 157, 68–76. doi:10.1006/taap.1999.8663
- Snyder, S.A., Villeneuve, D.L., Snyder, E.M., Giesy, J.P., 2001. Identification and Quantification of Estrogen Receptor Agonists in Wastewater Effluents. *Environ. Sci. Technol.* 35, 3620–3625. doi:10.1021/es001254n
- Sonavane, M. 2015. Intérêt d'une approche combinant bioessais *in vitro* et *in vivo* chez le poisson zèbre pour l'identification de perturbateurs endocriniens dans l'environnement aquatiques. Thèse
- Sonavane, M., Creusot, N., Maillot-Marechal, E., Pery, A., Brion, F., Ait-Aissa, S., 2016. Zebrafish-based reporter gene assays reveal different estrogenic activities in river waters compared to a conventional human-derived assay. *Sci. Total Environ.* 550, 934–939. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.01.187
- 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 Suppl 7, 113–122.
- Stegeman, J.J., Goldstone, J.V., Hahn, M.E., 2010. 10 - Perspectives on zebrafish as a model in environmental toxicology, in: Perry, S.F., Ekker, M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (Eds.), *Fish Physiology, Zebrafish*. Academic Press, pp. 367–439. doi:10.1016/S1546-5098(10)02910-9
- Stoker, T.E., Gibson, E.K., Zorrilla, L.M., 2010. Triclosan exposure modulates estrogen-dependent responses in the female wistar rat. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 117, 45–53. doi:10.1093/toxsci/kfq180
- Sumpter, J.P., 2005. Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 33, 9–16. doi:10.1002/aheh.200400555
- Sumpter, J.P., Jobling, S., 2013. The occurrence, causes, and consequences of estrogens in the aquatic environment. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 249–251. doi:10.1002/etc.2084
- Sun, L., Zha, J., Wang, Z., 2009. Effects of binary mixtures of estrogen and antiestrogens on Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Aquat. Toxicol.* 93, 83–89. doi:10.1016/j.aquatox.2009.03.010
- Svenson, A., Allard, A.S., Ek, M., 2003. Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Res.* 37, 4433–4443. doi:10.1016/S0043-1354(03)00395-6
- Szychowski, K.A., Sitarz, A.M., Wojtowicz, A.K., 2015. Triclosan induces Fas receptor-dependent apoptosis in mouse neocortical neurons *in vitro*. *Neuroscience* 284, 192–201. doi:10.1016/j.neuroscience.2014.10.001

- Tan, N.S., Frecer, V., Lam, T.J., Ding, J.L., 1999. Temperature dependence of estrogen binding: importance of a subzone in the ligand binding domain of a novel piscine estrogen receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1452, 103–120.
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E.J., Dong, J., 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146, 624–632. doi:10.1210/en.2004-1064
- Thorpe, K.L., Cummings, R.I., Hutchinson, T.H., Scholze, M., Brighty, G., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2003. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1142–1149.
- Thorpe, K.L., Hutchinson, T.H., Hetheridge, M.J., Scholze, M., Sumpter, J.P., Tyler, C.R., 2001. Assessing the biological potency of binary mixtures of environmental estrogens using vitellogenin induction in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Sci. Technol.* 35, 2476–2481.
- Tian, J., Feng, Y., Fu, H., Xie, H.Q., Jiang, J.X., Zhao, B., 2015. The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Key Bridging Molecule of External and Internal Chemical Signals. *Environ. Sci. Technol.* 49, 9518–9531. doi:10.1021/acs.est.5b00385
- Tohyama, S., Miyagawa, S., Lange, A., Ogino, Y., Mizutani, T., Ihara, M., Tanaka, H., Tatarazako, N., Kobayashi, T., Tyler, C.R., Iguchi, T., 2016. Evolution of estrogen receptors in ray-finned fish and their comparative responses to estrogenic substances. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 158, 189–197. doi:10.1016/j.jsbmb.2015.12.009
- Tohyama, S., Miyagawa, S., Lange, A., Ogino, Y., Mizutani, T., Tatarazako, N., Katsu, Y., Ihara, M., Tanaka, H., Ishibashi, H., Kobayashi, T., Tyler, C.R., Iguchi, T., 2015. Understanding the molecular basis for differences in responses of fish estrogen receptor subtypes to environmental estrogens. *Environ. Sci. Technol.* 49, 7439–7447. doi:10.1021/acs.est.5b00704
- Tokarz, J., Möller, G., Hrabě de Angelis, M., Adamski, J., 2015. Steroids in teleost fishes: A functional point of view. *Steroids, Steroidogenesis: The Classics and Beyond* 103, 123–144. doi:10.1016/j.steroids.2015.06.011
- Tong, S.-K., Mouriec, K., Kuo, M.-W., Pellegrini, E., Gueguen, M.-M., Brion, F., Kah, O., Chung, B., 2009. A cyp19a1b-GFP (Aromatase B) Transgenic Zebrafish Line That Expresses GFP in Radial Glial Cells. *Genesis* 47, 67–73. doi:10.1002/dvg.20459
- Tousova, Z., Oswald, P., Slobodnik, J., Blaha, L., Muz, M., Hu, M., Brack, W., Krauss, M., Di Paolo, C., Tarcai, Z., Seiler, T.-B., Hollert, H., Koprivica, S., Ahel, M., Schollée, J.E., Hollender, J., Suter, M.J.-F., Hidasí, A.O., Schirmer, K., Sonavane, M., Ait-Aissa, S., Creusot, N., Brion, F., Froment, J., Almeida, A.C., Thomas, K., Tollefsen, K.E., Tufi, S., Ouyang, X., Leonards, P., Lamoree, M., Torrens, V.O., Kolkman, A., Schriks, M., Spirhanzlova, P., Tindall, A., Schulze, T., 2017. European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants in European surface waters. *Sci. Total Environ.* 601, 1849–1868. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.032
- Triclosan - Substance evaluation - CoRAP - ECHA [WWW Document], n.d. URL <https://echa.europa.eu/information-on-chemicals/evaluation/community-rolling-action-plan/corap-table/-/dislist/details/0b0236e1807e4774> (accessed 3.28.17).
- Truter, J.C., Wyk, J.H. van, Oberholster, P.J., Botha, A.-M., Klerk, A.R. de, 2016. An *In vitro* and *In vivo* Assessment of Endocrine Disruptive Activity in a Major South African River. *Water. Air. Soil Pollut.* 227, 54. doi:10.1007/s11270-016-2748-8
- UE, 2015. Commission Implementing Decision (EU) 2015/495 of 20 March 2015 establishing a watch list of substances for Union-wide monitoring in the field of water policy [WWW Document]. URL http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=uriserv%3A0J.L_.2015.078.01.0040.01.ENG (accessed 10.8.17).
- US Food and Drug Organisation, 2016. Safety and Effectiveness of Consumer Antiseptics; Topical Antimicrobial Drug Products for Over-the-Counter Human Use [WWW Document]. Fed. Regist. URL <https://www.federalregister.gov/documents/2016/09/06/2016-21337/safety-and-effectiveness-of-consumer-antiseptics-topical-antimicrobial-drug-products-for> (accessed 10.7.17).

- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T., Brunström, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J.P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W., Kubiak, T., Larsen, J.C., van Leeuwen, F.X., Liem, A.K., Nolt, C., Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T., 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.* 106, 775–792.
- van der Linden, S.C., Heringa, M.B., Man, H.-Y., Sonneveld, E., Puijker, L.M., Brouwer, A., van der Burg, B., 2008. Detection of Multiple Hormonal Activities in Wastewater Effluents and Surface Water, Using a Panel of Steroid Receptor CALUX Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5814–5820. doi:10.1021/es702897y
- van der Oost, R., Sileno, G., Suárez-Muñoz, M., Nguyen, M.T., Besselink, H., Brouwer, A., 2017. SIMONI (smart integrated monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part i-model design and effect-based trigger values. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 2385–2399. doi:10.1002/etc.3836
- Vethaak, A.D., Davies, I.M., Thain, J.E., Gubbins, M.J., Martinez-Gomez, C., Robinson, C.D., Moffat, C.F., Burgeot, T., Maes, T., Wosniok, W., Giltrap, M., Lang, T., Hylland, K., 2017. Integrated indicator framework and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment. *Mar. Environ. Res.* 124, 11–20. doi:10.1016/j.marenvres.2015.09.010
- Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M., Kuiper, R.V., Legler, J., Murk, T.A.J., Peijnenburg, W., Verhaar, H.J.M., de Voogt, P., 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* 59, 511–524. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.12.053
- Voulvoulis, N., Arpon, K.D., Giakoumis, T., 2017. The EU Water Framework Directive: From great expectations to problems with implementation. *Sci. Total Environ.* 575, 358–366. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.09.228
- Wagner, M., Vermeirssen, E.L.M., Buchinger, S., Behr, M., Magdeburg, A., Oehlmann, J., 2013. Deriving bio-equivalents from *in vitro* bioassays: Assessment of existing uncertainties and strategies to improve accuracy and reporting. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1906–1917. doi:10.1002/etc.2256
- Wang, H., Tan, J.T.T., Emelyanov, A., Korzh, V., Gong, Z., 2005. Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene* 356, 91–100. doi:10.1016/j.gene.2005.03.041
- Wehmas, L.C., Cavallin, J.E., Durhan, E.J., Kahl, M.D., Martinovic, D., Mayasich, J., Tuominen, T., Villeneuve, D.L., Ankley, G.T., 2011. Screening complex effluents for estrogenic activity with the T47D-KBluc cell bioassay: Assay optimization and comparison with *in vivo* responses in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 439–445. doi:10.1002/etc.388
- Wentworth, J.N., Buzzeo, R., Pollenz, R.S., 2004. Functional characterization of aryl hydrocarbon receptor (zAHR2) localization and degradation in zebrafish (*Danio rerio*). *Biochem. Pharmacol.* 67, 1363–1372. doi:10.1016/j.bcp.2003.12.002
- Wernersson, A.-S., Carere, M., Maggi, C., Tusil, P., Soldan, P., James, A., Sanchez, W., Dulio, V., Broeg, K., Reifferscheid, G., Buchinger, S., Maas, H., Grinten, E.V.D., O’Toole, S., Ausili, A., Manfra, L., Marziali, L., Polesello, S., Lacchetti, I., Mancini, L., Lilja, K., Linderoth, M., Lundeberg, T., Fjällborg, B., Porsbring, T., Larsson, D.J., Bengtsson-Palme, J., Förlin, L., Kienle, C., Kunz, P., Vermeirssen, E., Werner, I., Robinson, C.D., Lyons, B., Katsiadaki, I., Whalley, C., Haan, K. den, Messiaen, M., Clayton, H., Lettieri, T., Carvalho, R.N., Gawlik, B.M., Hollert, H., Paolo, C.D., Brack, W., Kammann, U., Kase, R., 2015. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environ. Sci. Eur.* 27, 7. doi:10.1186/s12302-015-0039-4
- WHO/IPCS 2002. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors WHO/PCS/EDC/02.2, <http://www.who.int/ipcs/publications/en/ch1.pdf>
- Wihlen, B., Ahmed, S., Inzunza, J., Matthews, J., 2009. Estrogen Receptor Subtype- and Promoter-Specific Modulation of Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Transcription. *Mol. Cancer Res.* 7, 977–986. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0396

- Wilson, V.S., Bobseine, K., Gray, L.E., 2004. Development and characterization of a cell line that stably expresses an estrogen-responsive luciferase reporter for the detection of estrogen receptor agonist and antagonists. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 81, 69–77. doi:10.1093/toxsci/kfh180
- Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R., Safe, S., 2003. The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor α through activation of proteasomes. *Mol. Cell. Biol.* 23, 1843–1855. doi:10.1128/MCB.23.6.1843-1855.2003
- Xu, C., Li, C.Y.-T., Kong, A.-N.T., 2005. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.* 28, 249. doi:10.1007/BF02977789
- Yang, R., Li, N., Rao, K., Ma, M., Wang, Z., 2015. Combined action of estrogen receptor agonists and antagonists in two-hybrid recombinant yeast *in vitro*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 111, 228–235. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.09.025
- Yost, E.E., Lee Pow, C., Hawkins, M.B., Kullman, S.W., 2014. Bridging the gap from screening assays to estrogenic effects in fish: potential roles of multiple estrogen receptor subtypes. *Environ. Sci. Technol.* 48, 5211–5219. doi:10.1021/es404093n
- Yueh, M.-F., Tukey, R.H., 2016. Triclosan: A Widespread Environmental Toxicant with Many Biological Effects. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 56, 251–272. doi:10.1146/annurev-pharmtox-010715-103417
- Zhang, H., Kong, F.-X., Wang, S.-H., Yu, Y., Zhang, M., 2009. Vitellogenin induction by a mixture of steroidal estrogens in freshwater fishes and relevant risk assessment. *Environ. Toxicol.* 24, 484–491. doi:10.1002/tox.20453
- Zhang, H., Kong, F.-X., Yu, Y., Shi, X.-L., Zhang, M., Tian, H.-E., 2010. Assessing the combination effects of environmental estrogens in fish. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 19, 1476–1486. doi:10.1007/s10646-010-0533-9
- Zorrilla, L.M., Gibson, E.K., Jeffay, S.C., Crofton, K.M., Setzer, W.R., Cooper, R.L., Stoker, T.E., 2009. The Effects of Triclosan on Puberty and Thyroid Hormones in Male Wistar Rats. *Toxicol. Sci.* 107, 56–64. doi:10.1093/toxsci/kfn225

ANNEXE

Introduction au plan expérimental des mélanges reconstitués

L'étude présentée dans l'article n°5 a été réalisée dans la continuité d'une étude propre au programme SOLUTIONS visant à démontrer la capacité de multiples bio-essais à détecter les effets combinés de plusieurs contaminants au sein d'un échantillon synthétique représentatif d'une contamination multiple (Altenburger *et al.*, in prep). Le tableau XIII présente les 17 bio-essais utilisés dans cette étude.

Tableau XIII : Bio-essais *in vitro* et *in vivo* utilisés dans l'étude sur les mélanges reconstitués.

Niveau biologique	Système biologique		Effet observé	Référence
Récepteur cellulaire	Cellules mammifères et de poisson	Activation/inhibition de récepteur nucléaire	Biotransformation (HG5LN-hPXR)	Lemaire <i>et al.</i> 2006
			Activité estrogénique (MELN)	Balaguer <i>et al.</i> 1999
			Activité estrogénique (ZELH-zfER α , ZELH-zfER β 2)	Cosnefroy <i>et al.</i> 2012
			Activité (anti)androgénique	Jalova <i>et al.</i> 2013 (MDA-kB2)
			Activité glucocorticoïde	
Réponse cellulaire	<i>Salmonella typhimurium</i>	Test de Ames	Mutagenicité	Umbezeiro <i>et al.</i> , 2011, Reiferscheid <i>et al.</i> , 2012
	Cellules mammifères	Nrf2 protein (activation AREc32)	Stress oxydatif	Wang <i>et al.</i> 2006 Escher <i>et al.</i> 2012
Organisme (activation de récepteur)	Embryons de poisson zèbre	Estrogenicité cyp19a1b-GFP	Activité estrogénique	Brion <i>et al.</i> 2012
	Embryons de médaka	Estrogenicité chgh-GFP	Activité (anti)estrogénique	Spirhanzlova <i>et al.</i> 2016
Organisme (effets apicaux)	Algues	Growth	Effets apicaux	Almeida <i>et al.</i> (in press)
	Daphnies	Mobilité	Effets apicaux	Williams <i>et al.</i> 2011
	Embryons de poisson zèbre	Development	Effets apicaux	Klüver <i>et al.</i> 2011
	Microtox	Energie, métabolisme	Effets apicaux	

Les molécules des deux mélanges synthétiques ont été choisies sur la base du criblage de 34 molécules (article n°2) afin de permettre à chaque bio-essai présenté dans le tableau XIII de pouvoir détecter au moins deux molécules actives parmi les 12. Le tableau XIV présente les 12 molécules du mélange avec leur mode d'action associé.

Tableau XIV: 12 composés choisis pour les mélanges reconstitués (issu de Busch et al. 2016).

Composé	CAS RN	Usage	Famille chimique	Mode d'action
Diazinon	333-41-5	Pesticide	Organophosphate	Neuro-toxique
Diclofenac	15307-86-5	Médicament	Neutral Organics	Anti-inflammatoire
Bisphenol A	80-05-7	Composé industriel	Phenols	Perturbateur endocrinien
Propiconazole	60207-90-1	Pesticide	Triazole	Inhibition de la synthèse des stérols
Triphenylphosphate	115-86-6	Composé industriel	Esters	Neuro-toxique
Diuron	330-54-1	Pesticide	Phenylurée	Inhibition de la photosynthèse
Chlorophene	120-32-1	Pesticide	Chloro-phenol	Non spécifique
Benzo(a)pyrene	50-32-8	Composé industriel	HAP	Dommmages à l'ADN
Benzo(b)fluoranthene	205-99-2	Composé industriel	HAP	Dommmages à l'ADN
Triclosan	3380-34-5	Biocide	Chloro-phenol	Altération du métabolisme des lipides
Cyprodinil	121552-61-2	Pesticide	Pyrimidine	Inhibition de la synthèse des protéines
Genisteine	446-72-0	Médicament	Isoflavone	Perturbateur endocrinien

Sur la base des informations d'activité de chaque molécule dans chacun des bio-essais, deux mélanges avec des ratios fixes ont été reconstitués. Le premier mélange (M1) a été défini de manière à optimiser la détection dans tous les bio-essais. Le deuxième mélange (M2) a été défini avec les ratios entre molécules représentatifs d'une contamination environnementale. Le tableau XV présente les deux mélanges, ainsi que les bio-essais susceptibles d'être les plus sensibles, et donc de détecter les molécules du mélange. Les modèles additifs (CA ou IA, en fonction des paramètres mesurés) ont été ensuite utilisés afin d'évaluer la capacité des bio-essais à détecter les effets additifs des molécules actives au sein de chaque mélange synthétique.

Tableau XV : Ratios utilisés pour la réalisation des mélanges M1 et M2, et bio-essais susceptibles de capturer les effets de chaque composé. Les MEC 95 proviennent de Busch et al., 2016.

Composé	Ratio de M1	Ratio de M2	MEC 95 [mol/L]	Sensibilité la plus forte attendue
Diazinon	4.997E-05	1.303E-03	2.0 E-11	Daphnie
Diclofenac	2.499E-01	1.928E-01	3.0 E-09	Poisson zèbre
Bisphenol A	5.830E-03	2.768E-01	4.2 E-09	Activité estrogénique
Propiconazole	4.997E-01	5.630E-03	8.5 E-11	Activité anti-androgénique, biotransformation
Triphenylphosphate	1.249E-01	1.537E-02	2.3 E-10	Daphnies, poisson zèbre, biotransformation
Diuron	4.997E-03	1.384E-02	2.1 E-10	Algues
Chlorophene	7.496E-02	4.251E-01	6.4 E-09	Activité anti-androgénique
Benzo(a)pyrene	4.997E-04	6.289E-04	9.47134E-12	Daphnie, test d'Ames
Benzo(b)fluoranthene	8.329E-04	6.315E-04	9.47134E-12	Stress oxydatif
Triclosan	2.915E-02	2.583E-02	3.89017E-10	Algue, poisson zèbre, activité anti-androgénique
Cyprodinil	8.329E-03	1.242E-02	1.87019E-10	Daphnies
Genisteine	8.329E-04	2.968E-02	4.4708E-10	Activité estrogénique

Résumé

L'objectif de ce travail de thèse est d'évaluer le potentiel de nouveaux bio-essais *in vitro* et *in vivo* basés sur le poisson zèbre pour la biosurveillance de la contamination chimique de l'eau par les xeno-estrogènes. Pour cela, les bio-essais ont été appliqués pour évaluer les effets de polluants aquatiques environnementaux seuls, mais aussi en mélanges simples (reconstitués) et complexes (échantillons environnementaux). L'évaluation d'échantillons d'eau à travers les bio-essais *in vitro* humain (MELN) et poisson zèbre (ZELH-zfER β 2) a montré des différences qualitatives et quantitatives de réponse, non expliquées par les molécules estrogéniques détectées. Afin de mieux comprendre ces différences, l'activité de polluants aquatiques a été caractérisée sur les différents modèles, individuellement et au sein de mélanges de 2 à 12 polluants, combinant molécules estrogéniques et non estrogéniques pour simuler des situations environnementales. Les résultats obtenus montrent que les bio-essais basés sur le poisson zèbre répondent différemment, et parfois de manière opposée, au modèle humain MELN aux mélanges reconstitués. Ces différences s'expliquent par des sensibilités différentes à certaines molécules entraînant des interactions avec la réponse aux xeno-œstrogènes spécifiques à chaque modèle biologique. Dans son ensemble, ce travail montre que les particularités biologiques de chaque bio-essai peuvent influencer la réponse des xeno-estrogènes quand présents au sein de mélange avec d'autres polluants. Ces résultats sont discutés au regard de l'utilisation de bio-essais dans l'évaluation de la contamination chimique des masses d'eau.

Abstract

This PhD thesis aims at assessing the potential of innovative *in vitro* and *in vivo* zebrafish-based bioassays for biomonitoring of surface water contamination by xeno-estrogens. For this purpose, the bioassays were applied to assess the effect of environmentally relevant surface water pollutants, alone and in simple (artificial) and complex (environmental samples) mixtures. The screening of surface water samples in zebrafish- (ZELH-zfER β 2 cells) and human-based (MELN cells) bioassays revealed qualitative and quantitative differences which could not be entirely explained by the xeno-estrogens identified. To better understand the response of bioassays to complex environmental mixtures, the activity of environmentally relevant surface water pollutants was characterized across the bioassays, alone and in 2 to 12-component mixtures combining estrogenic and non-estrogenic chemicals to simulate an environmental contamination. The results indicate that zebrafish-based bioassays have a different and even in some cases an opposite response to the simple mixtures compared with the human-based bioassay MELN. These differences are explained by different sensitivity to some pollutants leading to bioassay-specific interactions with estrogen receptor activation. Altogether, this work shows that the biological particularities of each bioassay can influence the response to estrogenic chemicals when mixed with other environmental pollutants, opening the discussion regarding their implementation in chemical water biomonitoring.