



HAL
open science

Développement et applications de l'analyse dirigée par l'effet pour la recherche et l'identification de contaminants à risque pour les écosystèmes aquatiques

Caroline Gardia-Parège

► To cite this version:

Caroline Gardia-Parège. Développement et applications de l'analyse dirigée par l'effet pour la recherche et l'identification de contaminants à risque pour les écosystèmes aquatiques. Chimie analytique. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0063 . tel-01226807

HAL Id: tel-01226807

<https://theses.hal.science/tel-01226807v1>

Submitted on 10 Nov 2015

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
SPÉCIALITÉ SCIENCES CHIMIQUES
Spécialité Chimie Analytique et Environnementale

Par **Caroline GARDIA-PAREGE**

**DEVELOPPEMENT ET APPLICATIONS DE L'ANALYSE
DIRIGÉE PAR L'EFFET POUR LA RECHERCHE ET
L'IDENTIFICATION DE CONTAMINANTS A RISQUE
POUR LES ÉCOSYSTEMES AQUATIQUES**

Sous la direction de : Dr Hélène BUDZINSKI, Pr Patrick MAZELLIER,
(Encadrante scientifique : Dr Marie-Hélène DÉVIER)

Soutenue le 10 Avril 2015

Membres du jury :

Dr. HERNANDEZ-RAQUET, Guillermina	Directrice de recherche, INSA	Présidente du jury
Pr. GOMEZ, Eléna	Professeur, Université Montpellier I	Rapportrice
Pr. LE BIZEC, Bruno	Professeur, ONIRIS	Rapporteur
Dr. AÏT-AÏSSA, Sélim	Ingénieur de recherche, INERIS	Examineur
Dr. BALAGUER, Patrick	Directeur de recherche, IRCM	Examineur

Affiliation

Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC)
UMR 5805 CNRS

Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'environnement (LPTC)

Université de Bordeaux
Batiment A12, 2^{ème} étage Ouest
351 cours de la Libération
33405 Talence
France

Résumé

Développement et applications de l'analyse dirigée par l'effet pour la recherche et l'identification de contaminants à risque pour les écosystèmes aquatiques

Les méthodes actuellement disponibles pour la surveillance de la qualité du milieu se réfèrent au suivi de composés définis par les réglementations et ne permettent pas d'appréhender l'(éco)toxicité réelle de tous les composés présents dans l'environnement (*e.g.* composés inconnus, produits de transformation, effets de mélange...). Dans ce contexte, une méthode d'analyse pluridisciplinaire intégrative, l'analyse dirigée par l'effet (EDA), a été développée. Cette approche bio-analytique vise à établir un lien de causalité entre une exposition aux contaminants et l'effet biologique observé. La démarche est basée sur la simplification séquentielle d'un échantillon guidée par les bio-essais afin d'individualiser puis identifier, par des techniques analytiques chimiques performantes, les composés biologiquement actifs. Les objectifs de cette thèse ont porté sur (1) le développement et la validation d'une méthodologie, allant du pré-traitement jusqu'au fractionnement, adaptée à différentes matrices environnementales ; (2) la mise en place d'une stratégie d'identification moléculaire par spectrométrie de masse haute résolution ; (3) l'application de la démarche EDA à plusieurs échantillons afin d'illustrer l'adaptabilité et l'apport d'une telle méthode à des problématiques environnementales. Ces travaux de thèse permettent de disposer aujourd'hui d'une démarche bio-analytique complète de la préparation d'échantillon à l'identification de molécules, et adaptée à tous types d'échantillons. Les différentes études environnementales réalisées au cours de ces travaux ont permis, entre autre, d'établir une liste de composés divers non recherchés pouvant représenter un risque pour l'environnement.

Mots clés : Analyse dirigée par l'effet (EDA), spectrométrie de masse haute résolution, perturbateurs endocriniens, tests *in vitro*.

Abstract

Development and application of Effect-Directed Analysis to the research and the identification of organic compounds at risk for the aquatic ecosystems

To date, environmental risk assessment is based on targeted chemical analyses. These analyses allow the detection of known active compounds and this preselected set does not often explain the observed toxic effects in complex environmental samples (e.g. unknown compounds, transformation product, cocktail effect...). For an integrative contamination assessment, a multidisciplinary approach, Effect-Directed Analysis (EDA) was developed. This approach combining biological tools and chemical analyses allows determining active compounds and identifying them in such environmental complex mixtures. EDA aims at the establishment of cause-effect relationships by sequential reduction of the complexity of environmental mixtures, eventually to individual toxicants. The aims of this thesis were (1) to develop and to validate the EDA-based strategy on various environmental complex samples; (2) to set up an identification strategy for identifying non targeted or unknown molecules using high resolution mass spectrometry; (3) to prove the usefulness of EDA approach for the identification of active compounds in environmental complex samples. This thesis work provides to a complete bio-analytical approach from the preparation step of samples to the identification of molecules. The potential of this tool was fully confirmed on various environmental studies. These investigations allowed establishing a list of non-target compounds which can represent a risk for the environment.

Keywords : Effect-Directed Analysis (EDA), high resolution mass spectrometry, endocrine disrupting chemicals, *in vitro* bioassays

Remerciements

Je souhaite témoigner ma reconnaissance...

... aux membres du jury,

Mme Eléna Gomez, professeur à l'Université de Montpellier I et M Bruno Le Bizec, professeur à l'ONIRIS et directeur du LABERCA, qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer mon travail en tant que rapporteurs. Je vous remercie pour le temps et l'attention que vous avez consacrés à la lecture du manuscrit et pour les échanges pertinents et constructifs que nous avons eus lors de la soutenance. Je souhaite également adresser mes sincères remerciements à Mme Guillermina Hernandez-Raquet, directrice de recherche à l'INSA à Toulouse, M Patrick Balaguer, directeur de recherche à IRCM à Montpellier, M Selim Aït-Aïssa, ingénieur de recherche à l'INERIS à Verneuil-en-Halatte. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Votre présence le jour de la soutenance me tenait beaucoup à cœur.

... à mes directeurs de thèse

En premier lieu, merci Hélène ! Difficile pour moi de synthétiser en quelques lignes ma gratitude. J'ai eu l'honneur de travailler avec toi et je t'en suis tellement reconnaissante. Par où commencer ? Merci de m'avoir communiqué ta passion pour la chimie analytique. Merci pour ce beau sujet de thèse qui m'a captivé. Merci pour tous ces moments passés ensemble aussi bien pour parler de sciences que d'autres choses. Merci infiniment de t'investir autant, tous les jours, pour nous offrir des conditions de travail excellentes avec un matériel analytique de pointe qui nous permet de réaliser de belles choses ! Je te remercie également de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis de présenter mes travaux dans de nombreux congrès. Merci pour tout cela et t'en d'autres...

Je souhaite également adresser mes plus sincères remerciements à Marie-Hélène qui a largement contribué à ces travaux de thèse et à ma formation EDA. Merci pour ta disponibilité et tes précieux conseils. J'ai adoré travailler à tes côtés ! Je garde un super souvenir de notre virée à Bilbao où nous étions perdues sur la côte Basque à rechercher désespérément l'hôtel (sans chauffage, mais avec vu sur la mer).

Mille mercis à toutes les deux ! Je n'aurais pu espérer mieux comme directrices de thèse.

Je tiens à remercier Patrick M. Même si tu as suivi cette thèse de loin, je voulais te remercier pour ta gentillesse et ton écoute.

... à ceux qui ont contribué à ses travaux

L'approche EDA est une démarche pluridisciplinaire, c'est pourquoi je tenais à remercier tous ceux qui ont contribué à la partie biologique du travail.

Merci à l'INERIS de m'avoir accueilli à plusieurs reprises au sein de l'unité ECOT à Verneuil-en-Halatte. J'ai passé à chaque fois un super séjour auprès de toute l'équipe, toujours plus enrichissant et rempli de bonne humeur. Je souhaite remercier, en particulier, Sélim Aït-Aïssa, Emmanuelle Maillot-Maréchal et Nicolas Creusot pour leurs disponibilités et leurs investissements dans ce travail.

Sélim encore merci pour ton aide sur les tests *in vitro*, tes conseils pertinents et toutes les discussions (et les fous rires) que nous avons eu. Tu as quasiment été un directeur de thèse pour moi. Merci beaucoup !

Manue, merci pour ta formation, ton énergie, travailler avec toi fut un réel plaisir.

Nico, merci pour tout. Tu es mon prédécesseur EDA et tu m'as beaucoup appris. Je suis heureuse de t'avoir rencontré. J'espère que notre amitié perdurera encore longtemps.

Je tiens également à adresser ma reconnaissance à Patrick Balaguer. Je voulais sincèrement te remercier pour les échanges constructifs qui ont jalonné mon parcours.

Merci à toutes les autres personnes (et elles sont nombreuses) qui ont collaboré aux différents projets.

... à ceux qui ont partagé mon quotidien de thésard

Un immense merci à tous les membres du LPTC ! J'ai rencontré des personnes formidables, toutes différentes, qui m'ont permis d'évoluer dans une atmosphère conviviale et dynamique.

Merci Karyn, pour ta patience, ta rigueur, ta réactivité et ton enthousiasme. Tu es une personne super sur qui on peut compter.

Merci Patrick, pour ton savoir-faire. Tu m'as beaucoup appris et je t'en suis reconnaissante. Merci aussi pour ta disponibilité (même le week-end) et ton aide pour dompter les appareils analytiques.

Je voudrais également remercier Manu pour m'avoir appuyé sur le LC-QTOF. J'ai beaucoup d'anecdotes gravées dans ma mémoire sur toutes les péripéties que nous avons rencontré. Mais ce qui me restera est ta gentillesse.

Merci Sylvie, même si nous n'avons finalement que peu travaillé ensemble, sauf vers la fin sur les hormones. J'aimerais te remercier pour ta bienveillance quotidienne, ta bonne humeur et ta façon d'être.

Je voudrais aussi remercier Laurent et Pierre VD, pour avoir animé mes longues séances d'évaporation sous le flux d'argon ; Pierre L.; Nath T.; Maylis; Nadia et Claire.

La thèse permet également de créer de belles camaraderies. C'est pourquoi je tenais à remercier : Perrine, Yann, Hugues, Julie, Seb, Justine, Baptiste, Thomas, Mohammed. Il m'est impossible d'oublier de remercier Mathilde, Laura, Vincent, Max, Gaby, Nath D., Caro SL, Julien(s), Sophie, Jérémy(s), Lucas, Mylène pour le quotidien au labo de cette fin de thèse. Une pensée sincère pour ceux qui sont partis mais qui ont également contribué à l'« ambiance » de ces quelques années : Imillia, Céciline, Marion-Justine, Ninette, Jonathan, Caro M., Iris, Matthieu, Rami. Un peu plus particulièrement, je tenais à remercier Amélie et Coralie, heureuse de vous avoir rencontré au sein du LPTC. Nos rapports de collègue ont évolué en une amitié sincère. Je vous remercie pour vos conseils avisés et votre amitié.

...à mes amis,

Bien sûr, merci à mes amis de longue date : Flo, Nolwennita, Osmond, Sandy, Pauline. Merci d'avoir été là, de m'avoir écouté, soutenu et changé les idées quand le moral n'était pas au beau fixe.

... à ma famille,

Un IMMENSE merci à ma famille ! Sans vous je doute que j'aurais été jusque là. Merci à mon père, ma mère et mon frère pour votre soutien inconditionnel qui a été mon moteur quotidien. Et surtout merci pour votre amour.

Comme promis une petite dédicace à ma puce, Océane, je te remercie d'avoir égaillé certains de mes week-ends avec ta belle insouciance.

... à toi,

Merci d'être là tout simplement.

Liste des articles

➤ Article publié

- ❖ Gardia-Parège C., Dévier M-H., Balaguer P., Hernandez-Raquet G., Budzinski H. Apport de l'analyse dirigée par l'effet (« Effect-Directed Analysis », EDA) à la recherche et l'identification de Perturbateurs endocriniens dans les lisiers porcins destinés à l'épandage agricole. *ARET-Actualités*, (2015), 35-45

➤ Articles en préparation

- ❖ Gardia-Parège C., Dévier M-H., Creusot N., Maillot-Maréchal E., Balaguer P., Mazellier P., Aït-Aïssa S., Budzinski H. (en cours de préparation). Assessing in vitro activities and identification of endocrine-disrupting compounds in wastewater treatment plant using effect-directed analysis.
- ❖ Gardia-Parège C., Creusot N., Dévier M-H., Mazellier P., Aït-Aïssa S., Budzinski H. (en cours de préparation). High-resolution mass spectrometric identification of emerging pharmaceutical pollutants in a river impacted by an industrial effluent combining passive sampling and effect-directed analysis.
- ❖ Gardia-Parège C., Dévier M-H., Geneste E., Pardon P., Morin B., Mazellier P., Fessard V., Ledreux A., Bernard C., Sérandour A-L., Krys S., Budzinski H. (en cours de préparation). Identification of potential toxic compounds in marine shellfish using Effect-Directed Analysis approach and detection by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry.
- ❖ Gardia-Parège C., Dévier M-H., Hernandez-Raquet G., Mazellier P., Balaguer P., Budzinski H. (en cours de préparation). Profils biologiques de boues de stations d'épuration urbaines associés à l'identification de perturbateurs endocriniens par l'analyse dirigée par l'effet

Communications

➤ Liste des communications orales

- ❖ Creusot N., Dévier M-H., **Gardia-Parège C.**, Porcher J-M., Budzinski H., Aït-Aïssa S. Identification of active synthetic steroid compounds in impacted river downstream from pharmaceutical industry (2012). Congrès international SETAC 2012 (6th SETAC World Congress / SETAC Europe 22nd Annual Meeting), 20-24 Mai 2012, Berlin, Allemagne.
- ❖ **Gardia-Parège C.**, Maillot-Maréchal E., Aït-Aïssa S., Creusot N., Dévier M-H., Balaguer P., Mazellier P., Budzinski H. Evaluations des activités endocrines et dioxin-like de différentes eaux de stations d'épuration françaises pour la mise en place d'analyses dirigées par des bioessais(EDA, Effect-Directed Analysis) : Projet Ecopi (2012). Colloque national de la SEFA (Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée), 4-5 juillet 2012, Lyon, France.
- ❖ Creusot N., Porcher J-M., **Gardia-Parège C.**, Budzinski H., Aït-Aïssa S. Stratégie bio-analytique de type EDA pour l'identification de contaminants émergents dans les milieux aquatiques: Etude de cas en aval d'un rejet industriel (2012). Colloque national de la SEFA (Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée), 4-5 juillet 2012, Lyon, France.
- ❖ **Gardia-Parège C.**, Dévier M-H., Creusot N., Aït-Aïssa S., Cachot J., Hernandez-Raquet G., Balaguer P., Budzinski H. Application of bioanalytical approach (EDA, Effect-Directed Analysis) for the identification of toxic compounds in complex mixture (2012). Congrès international de la SBCN 2012 (Society for BioChromatography and Nanoseparations), Bioseparation and characterisation, 23-26 octobre 2012, Bordeaux, France.
- ❖ **Gardia-Parège C.**, Dévier M-H., Hernandez-Raquet G., Balaguer P., Budzinski H. Effect-Directed Analysis approach (EDA) for the identification of active compounds in pig manure (2013). Congrès international 23rd SETAC Europe Annual Meeting, 12-16 Mai 2013, Glasgow, Royaume-Unis.
- ❖ **Gardia-Parège C.**, Dévier M-H., Creusot N., Aït-Aïssa S., Balaguer P., Hernandez-Raquet G., Mazellier P., Budzinski H. Application de l'analyse dirigée par l'effet (Effect directed analysis, EDA) à l'évaluation de la qualité du milieu et l'identification de perturbateurs endocriniens dans les écosystèmes aquatiques (2013). Colloque national de l'ARET (Association pour la Recherche En Toxicologie), 20-21 juin 2013, Paris, France.

Communications

- ❖ Dévier M-H, **Gardia-Parège C.**, Geneste E., Patrick P., Mazellier P., Morin B., Creusot N., Aït-Aïssa S., Balaguer P., Krysz S., Fessard V., Bernard C., Budzinski H. Les apports de l'approche bioanalytique EDA (Effect-Directed Analysis) dans l'identification des composés toxiques dans l'environnement (2013). Colloque national de l'ARET (Association pour la Recherche En Toxicologie), 20-21 juin 2013, Paris, France.
- ❖ Budzinski H., **Gardia-Parège C.**, Dévier M-H, Creusot N., Aït-Aïssa S. Effect-directed analysis (EDA) case study applied to endocrine disrupter identification in a river impacted by industrial discharges (2013). Congrès international Chemical mixtures conference, 10-11 décembre 2013, Paris, France.
- ❖ Dévier M-H, **Gardia-Parège C.**, Creusot N., Aït-Aïssa S., Budzinski H. Identification of emerging pharmaceutical pollutants in a river impacted by an industrial effluent combining passive sampling and effect-directed analysis (2014). Congrès international 24th SETAC Europe Annual Meeting, 11-15 Mai 2014, Bâle, Suisse.
- ❖ **Gardia-Parège C.**, Dévier M-H, Creusot N., Aït-Aïssa S., Budzinski H. Identification of emerging pharmaceutical pollutants and human metabolites in urban wastewater treatment plant using Effect Directed Analysis (2014). Congrès international 20th IMSC (International Mass Spectrometry Conference), 24-29 août 2014, Genève, Suisse.
- ❖ Morin S., Kim Tiam S., Pesce S., Moreira A., Eon M., **Gardia-Parège C.**, Budzinski H., Mazella N. Echantillonneurs passifs : évaluation de l'exposition des biofilms aux mélanges de pesticides, et du risque écotoxique dans les cours d'eau. SMART Talks on Hydrosystems and communities, 4 Novembre 2014, Cestas, France.
- ❖ Morin S., Kim Tiam S., Pesce S., Moreira A., Eon M., **Gardia-Parège C.**, Budzinski H., Mazella N. Echantillonneurs passifs : évaluation de l'exposition des biofilms aux mélanges de pesticides, et du risque écotoxique dans les cours d'eau. 5ème Séminaire d'Ecotoxicologie de l'INRA, 25-27 Novembre 2014, Biarritz, France.
- ❖ Morin S., Kim Tiam S., Pesce S., Moreira A., Eon M., **Gardia-Parège C.**, Budzinski H., Mazella N. Complex communities exposed to multiple pollutants: using passive sampler extracts in periphyton ecotoxicology. SETAC Europe 25th Annual Meeting, 3-7 Mai 2015, Barcelone, Espagne.

Communications

➤ Liste des communications par affiches :

- ❖ **Gardia-Parège C.**, Dévier M-H., Le Ménach K., Creusot N., Aï-Aïssa S., Budzinski H. L'analyse dirigée par les bioessais (EDA) pour l'identification des composés toxiques dans l'environnement (2011) Groupe de Recherche Execo, 7-8 avril 2011, Arcachon, France.
- ❖ Dévier M-H., **Gardia-Parège C.**, Tapie N., Creusot N., Le Ménach K., Aï-Aïssa S., Budzinski H. Association capteurs passifs et bioessais: une méthode alternative de surveillance des rejets et des masses d'eau (2011) Groupe de Recherche Execo, 7-8 avril 2011, Arcachon, France.
- ❖ **Gardia-Parège C.**, Maillot-Maréchal E., Aït-Aïssa S., Creusot N., Dévier M-H., Balaguer P., Mazellier P., Budzinski H. Activités endocrines et *dioxin-like* de différentes eaux de stations d'épuration françaises pour l'application d'analyses dirigées par des bioessais (EDA *Effect-Directed Analysis*) dans le cadre du projet ECOPI (2012). Colloque national ANTIOPEs, Ecotoxicologie et Toxicologie environnementale : nouveaux concepts, nouveaux outils, 19-20 mars 2012, Avignon, France.
- ❖ Grimaldi M., Boulahtouf A., Bellet V., Creusot N., **Gardia-Parège C.**, Jondeau-Cabaton A., Zalko D., Antignac J-P., Hernandez-Raquet G., Budzinski H., Aït-Aïssa S., Balaguer P. Mise en évidence de la présence d'androgènes associée à des activités antagonistes sur d'autres récepteurs stéroïdiens dans des eaux de stations d'épuration : Projet Ecopi (2012). Colloque national ANTIOPEs, Ecotoxicologie et Toxicologie environnementale : nouveaux concepts, nouveaux outils, 19-20 mars 2012, Avignon, France.
- ❖ **Gardia-Parège C.**, Dévier M-H., Geneste E., Pardon P., Budzinski H. Application de l'analyse dirigée par l'effet (« Effect-Directed Analysis », EDA) à l'identification de perturbateurs endocriniens dans les écosystèmes aquatiques (2013) Journée d'échanges scientifiques EPOC 2013, 26-25 avril 2013, Gujan-Mestras, France.
- ❖ **Gardia-Parège C.**, Dévier M-H., Creusot N., Le Menach K., Aït Aïssa S., Budzinski H. Development of Normal Phase - High Performance Liquid Chromatography (NP-HPLC) fractionation for the isolation of active compounds in sediment sample (2013) Congrès international 23rd SETAC Europe Annual Meeting, 12-16 Mai 2013, Glasgow, Royaume-Unis.

Distinction

- ❖ **Prix des techniques innovantes pour l'environnement – Pollutec ADEME 2014** pour les travaux concernant « L'analyse dirigée par l'effet (*Effect-Directed Analysis*, EDA), une méthode intégrative, pour l'identification de composés toxiques dans l'environnement»

SOMMAIRE

Résumé.....	i
Liste des articles.....	xi
Communications.....	xiii
Liste des abréviations.....	xxv
Structuration du manuscrit.....	1
Chapitre 1 : Introduction générale.....	3
1 La surveillance des polluants organiques dans le milieu aquatique.....	7
1.1 Les enjeux et les techniques actuelles.....	7
1.2 Les limitations.....	11
2 Une meilleure appréhension de la contamination grâce aux approches bio-analytiques.....	12
Chapitre 2 L'analyse dirigée par l'effet.....	15
1 L'historique de la méthode.....	19
2 Principe général de l'approche EDA.....	21
3 L'état de l'art sur le plan Européen et en France.....	25
4 Les quatre étapes principales de l'approche EDA.....	27
4.1 L'évaluation du profil biologique de l'échantillon.....	27
4.1.1 Les outils biologiques de type <i>in vitro</i>	27
4.1.2 Les outils plus représentatifs de l'impact environnemental : les modèles <i>in vivo</i>	32
4.1.3 Le choix du test biologique.....	35
4.2 Les techniques de préparation de l'échantillon.....	36
4.2.1 La notion de biodisponibilité.....	37
4.2.2 L'extraction.....	39
4.2.3 Le fractionnement.....	45
4.3 Les outils d'identification moléculaire.....	47
4.3.1 Généralités.....	47
4.3.2 Les analyses ciblées.....	47
4.3.3 Les analyses non ciblées.....	48
4.4 L'étape de confirmation.....	51
4.4.1 La confirmation de l'identification chimique.....	51
4.4.2 La confirmation biologique.....	51
5 Les limites actuelles de l'approche.....	52
Les objectifs des travaux de thèse.....	56

Chapitre 3 : Matériels & Méthodes	59
1 Les programmes de recherche et les sites d'étude associés.....	61
1.1 Études portant sur les STEP.....	61
1.1.1 Le programme ÉTIAGE.....	61
1.1.2 Le projet MED-SEINE.....	64
1.1.3 Le projet TOXSTEP.....	65
1.1.4 Le projet ECOPI.....	66
1.1.5 Le projet Echibioteb.....	67
1.1.6 Étude sur les boues de STEP non associée à un projet.....	68
1.2 Les lisiers porcins	68
1.3 Études basées sur le milieu naturel	69
1.4 Étude appliquée au <i>biota</i> : le Programme National Arcachon (PNA).....	70
2 Les outils biologiques employés.....	71
2.1 Bio-essais basés sur la détection de perturbateurs endocriniens.....	71
2.1.1 Les lignées cellulaires.....	71
2.1.2 Les conditions de culture cellulaire.....	74
2.1.3 Exposition des cellules et analyse des échantillons.....	74
2.2 Bio-essais utilisés pour évaluer la cytotoxicité, test MTT.....	76
2.2.1 Le principe du test MTT.....	76
2.2.2 Test MTT sur lignées cellulaires basées sur l'expression de gènes rapporteurs	76
2.2.3 Test MTT réalisé dans le cadre du projet PNA	77
3 Produits chimiques et solvants pour la préparation et l'analyse chimique des échantillons.....	78
4 La préparation des échantillons	78
4.1 Assurance qualité pour la préparation des échantillons.....	78
4.2 Préparation des matrices solides	79
4.3 Préparation des matrices liquides.....	81
4.3.1 Échantillonnage.....	81
4.3.2 Extraction des composés	82
4.4 Les échantillonneurs passifs de type POCIS	83
4.4.1 Préparation des POCIS.....	83
4.4.2 Extraction des composés	84
4.5 Préparation du <i>biota</i> , cas appliqué aux bivalves.....	84
5 Les procédures de fractionnement.....	85
5.1 Le fractionnement par SPE : fractionnement primaire pour matrice solide	85
5.2 Le fractionnement par chromatographie liquide.....	86
5.2.1 Assurance qualité pour la préparation des fractions par HPLC.....	87
5.2.2 Fractionnement en RP-HPLC.....	87
5.2.3 Fractionnement en NP-HPLC.....	88
6 L'identification des composés	89
6.1 Assurance qualité lors des analyses chimiques.....	89
6.1.1 Généralités.....	90
6.1.2 Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....	91
6.1.3 Polluants organiques persistants.....	91
6.1.4 Médicaments	91

6.1.5	Stéroïdes	92
6.1.6	Pesticides	92
6.2	Les analyses non ciblées par spectrométrie de masse haute résolution	92
6.2.1	Méthode analytique en LC-QTOF.....	92
6.2.2	Méthode analytique en GC-QTOF	95
6.3	La quantification des composés	96
6.3.1	Quantification par dilution isotopique	96
6.3.2	Quantification par étalonnage externe	97
6.3.3	Quantification par ajouts dosés	98

Chapitre 4 : Développements et validations méthodologiques..... 99

1	Influence des processus de préparation des échantillons sur l'activité biologique mesurée : cas des matrices liquides.....	103
1.1	Le prélèvement.....	104
1.2	La conservation de l'échantillon	105
1.2.1	La filtration.....	105
1.2.2	Le matériel de conservation de l'échantillon.....	106
1.3	L'extraction.....	108
1.3.1	Choix de l'extraction	108
1.3.2	Validation des solvants d'élution	109
1.3.3	Influence de la déconjugaison	111
1.4	Conclusion	112
2	Développement et validation du fractionnement par HPLC	112
2.1	Profils chromatographiques de référence.....	114
2.2	Validation au regard des activités biologiques	116
2.3	Conclusion	119

Chapitre 5 Identification moléculaire par spectrométrie de masse haute résolution : LC-QTOF/GC-QTOF..... 121

1	Assurance qualité pour les analyses chimiques non ciblées.....	125
1.1	Précaution à apporter aux matériels	125
1.2	Vérification et calibration instrumentales	126
1.3	Traitements des données analytiques : contrôle des « faux positifs »	127
2	Évaluation des performances instrumentales	128
2.1	La résolution	128
2.2	L'erreur en masse.....	130
2.3	Les limites de détection	131
3	La stratégies d'identification	132
3.1	Caractérisation moléculaire par LC-QTOF.....	132
3.1.1	L'acquisition des données	132
3.1.2	Le traitement des données	135
3.2	Identification par GC-QTOF.....	140
4	Freins à la caractérisation moléculaire	143
4.1	La recherche des ions et l'attribution des formules brutes.....	143
4.1.1	Difficultés mis en évidence en LC-QTOF.....	143
4.1.2	Obstacle rencontré en GC-QTOF.....	146

4.2	Le manque d'informations structurales	146
4.3	Les limites des bibliothèques spectrales et des logiciels <i>in silico</i>	149
4.3.1	Les banques de données	149
4.3.2	Les aides <i>in silico</i> à l'identification.....	150
4.4	La disponibilité des étalons analytiques.....	150
5	Les différents niveaux d'identification.....	151
6	Positionnement de la démarche au sein des connaissances actuelles en HRMS.....	151
7	Conclusion.....	153
Chapitre 6 : Application de l'approche EDA.....		155
Partie I.....		159
1	Etude exploratoire sur les urines humaines comme source de contamination	165
1.1	Caractérisation des activités biologiques générées par l'urine humaine	165
1.1.1	Impact de la déconjugaison sur les activités biologiques	165
1.1.2	Présence de ligands agonistes et antagonistes de différents récepteurs nucléaires..	168
1.2	Identification de composés endogènes dans les urines humaines.....	171
1.3	Conclusion	173
2	Les stations d'épurations urbaines, vecteurs de perturbateurs endocriniens	173
2.1	Évaluation des activités biologiques présentes dans les stations d'épuration urbaines	174
2.2	Détection de perturbateurs endocriniens et autres composés dans les eaux usées brutes et traitées urbaines	176
2.3	Conclusion	181
3	Devenir des composés organiques actifs dans les eaux usées suite aux procédés de traitement.....	182
3.1	Abattement des perturbateurs endocriniens dans les eaux usées traitées par deux procédés secondaires, les boues activées et les biofiltres.....	182
3.2	Assainissement des effluents par un traitement tertiaire avancé, le charbon actif	184
3.3	Conclusion	186
4	Contamination du milieu récepteur, étude de cas lié aux rejets industriels : la rivière « La Dore ».....	187
4.1	Occurrence et activités biologiques des molécules identifiées	187
4.2	Présence de composés inconnus	190
4.3	Conclusion	191
	Bilan	193
Article n°1 <i>Assessing in vitro activities and identification of endocrine-disrupting compounds in wastewater treatment plant using Effect-Directed Analysis</i>		197
Article n°2 <i>High-resolution mass spectrometric identification of emerging pharmaceutical pollutants in a river impacted by an industrial effluent combining passive sampling and Effect-Directed Analysis</i>.....		235

Partie II	261
1 Etude des activités biologiques et identification de composés à risque dans les boues de stations d'épuration urbaines	267
1.1 Activité <i>dioxine-like</i> et ligands associés	268
1.2 Activité œstrogénique et identification de composés œstrogéno-mimétiques.....	270
1.3 Activation des récepteurs X des prégnanes par les extraits de boues	271
1.4 Conclusion	272
2 Devenir des activités biologiques et des composés organiques dans les boues au cours du traitement des eaux usées et des déchets	272
2.1 Evolution de activités biologiques dans les boues au cours du procédé d'assainissement.....	273
2.2 Identification de molécules candidates aux activités biologiques observées dans une boue compostée	275
2.2.1 Composés connus et non ciblés pouvant expliquer l'activité <i>dioxine-like</i> et androgénique agoniste	276
2.2.2 Candidats à l'activité œstrogénique et <i>dioxine-like</i>	278
2.2.3 Phtalates et muscs, ligands antagonistes aux récepteurs androgéniques	279
2.3 Conclusion	282
3 Recherche et identification de perturbateurs endocriniens dans les lisiers porcins. 282	
3.1 Détection de composés connus dans les fractions de lisier.....	283
3.2 Recherche de molécules non ciblées par LC-QTOF.....	284
3.3 Conclusion	285
Bilan	286
 Article n°3 <i>Profils biologiques de boues de stations d'épuration urbaines associés à l'identification de perturbateurs endocriniens par l'analyse dirigée par l'effet</i>	289
 Article n°4 <i>Apport de l'analyse dirigée par l'effet (« effect-directed analysis », EDA) à la recherche et l'identification de perturbateurs endocriniens dans les lisiers porcins destinés à l'épandage agricole</i>	321
 Partie III	343
 Article n°5 <i>Identification of potential toxic compounds in marine shellfish using Effect-Directed Analysis approach and detection by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry</i>	347
 Conclusion générale	375
 Références bibliographiques	386
 ANNEXES	423

Liste des abréviations

AhR : récepteur des hydrocarbures aromatiques	MS : spectromètre de masse
AKP : alkyphénols	MS/MS : spectromètre de masse
AR : récepteur des androgènes	OCP : pesticides organochlorés
ASE : <i>accelerated solvent extraction</i>	PCB : polychlorobiphényles
Bio-TEQ : équivalent toxique biologique	PE : perturbateurs endocriniens
Chem-TEQ : équivalent toxique chimique	POCIS : <i>polar organic compound integrative sampler</i>
DCE : directive cadre sur l'eau	PNEC : <i>predicted no effect concentration</i>
EDA : <i>effect directed analysis</i>	PR : récepteur des progestagènes
EPA : <i>environmental protection agency</i>	PXR : récepteurs des prégnanes et des xénobiotiques
ER : récepteur des œstrogènes	Q : analyseur quadripole
EROD : éthoxyrésorufine-O-dééthylase	QqQ : triple quadripole
GR : récepteur des glucocorticoïdes	Q-TOF : spectromètre de masse hybride quadripole/temps de vol
GC : chromatographie en phase gazeuse	RMN : résonance magnétique nucléaire
HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques	SIM : <i>single ion monitoring</i>
HPLC : chromatographie liquide haute pression	SPE : extraction sur phase solide
LDPE : <i>low density lipoprotein</i>	SPMD : <i>semi permeable membrane device</i>
LLE : extraction liquide/liquide	STEP : station d'épuration
MBA : <i>mass balance analysis</i>	TEF : <i>toxic equivalent factor</i> ou facteur de toxicité équivalent
MeOH : méthanol	TEQ : <i>toxic equivalent</i> ou équivalent toxique
MR : récepteurs aux minéralocorticoïdes	UPLC : <i>ultra performance liquid chromatography</i>
NQE : norme de qualité environnementale	

Structuration du manuscrit

Ce manuscrit de thèse s'articule en six chapitres :

- i. Le premier chapitre est une introduction générale qui décrit le contexte de l'étude. Il présente tout d'abord les enjeux et les techniques employés en routine dans la surveillance des micropolluants dans les écosystèmes aquatiques, puis cite les limites que possèdent les outils actuels. Enfin, il introduit les approches bio-analytiques comme méthodes alternatives pour l'évaluation des risques environnementaux.
- ii. Le chapitre 2 est une synthèse de la bibliographie portant sur l'analyse dirigée par l'effet. Il expose dans un premier temps l'historique de la méthode, son principe et fait un bilan sur les recherches effectuées aujourd'hui en Europe et plus particulièrement en France. Dans un second temps, l'approche est présentée en détails. Les développements et techniques mis en place actuellement pour chaque étape de la démarche sont décrits dans cette partie. Les limitations de l'analyse dirigée par l'effet clotent ce chapitre. La revue de la bibliographie permet de présenter les enjeux majeurs de cette technique et débouche sur les objectifs de ces travaux de thèse.
- iii. Le troisième chapitre décrit les outils employés ainsi que les protocoles utilisés pour la mise en œuvre de l'analyse dirigée par l'effet durant ce travail.
- iv. Le quatrième chapitre expose les développements menés sur la préparation des échantillons. Il présente l'influence du prélèvement, de la conservation et de l'extraction des matrices liquides sur l'activité biologique. Le développement et la validation des fractionnements réalisés par chromatographie en phase liquide sont également décrits dans ce chapitre.
- v. Le chapitre 5 décrit la stratégie établie pour identifier les composés par spectrométrie de masse haute résolution. Il présente, en plus, les performances instrumentales, les limites rencontrées et le positionnement de la démarche mise en place vis-à-vis de la littérature scientifique.
- vi. Le dernier chapitre expose les principaux résultats obtenus pendant ces travaux de thèse et s'organise en 3 parties. Ce chapitre vise à montrer l'intérêt d'employer l'analyse dirigée par l'effet pour répondre à certaines préoccupations environnementales et illustre la polyvalence de cette démarche.

Enfin, ce manuscrit se termine sur une conclusion générale qui synthétise les résultats obtenus et pose un regard critique sur l'analyse dirigée par l'effet permettant de dégager différentes perspectives de recherche.

Chapitre 1

*Introduction générale :
L'évaluation des risques dans
les écosystèmes aquatiques*

Chapitre 1 – Introduction générale : L'évaluation des risques dans les écosystèmes aquatiques

1	La surveillance des polluants organiques dans le milieu aquatique.....	7
1.1	Les enjeux et les techniques actuelles	7
1.2	Les limitations	11
2	Une meilleure appréhension de la contamination grâce aux approches bio-analytiques..	12

Chapitre 1 – Introduction générale : L'évaluation des risques dans les écosystèmes aquatiques

Avant-propos

Ce chapitre vise à donner quelques éléments de contexte afin de mieux comprendre la nécessité de mettre en place une approche de type bio-analytique pour évaluer les risques environnementaux et ainsi comprendre l'intérêt de ces travaux de thèse. Les projets abordés se focalisent sur les écosystèmes aquatiques. Ce chapitre expose les problématiques existantes et les techniques actuelles pour appréhender et permettre un suivi de la contamination dans ce milieu. Les limites aujourd'hui rencontrées pour l'évaluation et la surveillance des risques seront également abordés. Enfin, ce chapitre se clôturera par l'introduction de techniques plus intégratives, les approches bio-analytiques, pour tenter d'estimer de façon plus réaliste la contamination chimique.

1 La surveillance des polluants organiques dans le milieu aquatique

1.1 Les enjeux et les techniques actuelles

Le terme « pic hydrique », en analogie avec le terme de « pic pétrolier », fait, de nos jours, parti du vocabulaire des environmentalistes. À la différence du pétrole, l'eau est un élément renouvelable mais ses disponibilités et son renouvellement ne permettent pas de compenser les utilisations humaines excessives. Sur l'ensemble de l'eau disponible sur terre 1 % seulement est de l'eau douce. Le terme de « pic hydrique » signifie que l'homme atteint les limites naturelles de disponibilité en eau et qu'au-delà de ce point, les ressources seront en déclin (Palaniappan et Gleick, 2009). Ces mêmes auteurs précisent qu'en 2020, afin répondre aux besoins de la population croissante, la consommation en eau douce dans le monde devrait augmenter de 40 %. En plus de sa raréfaction s'ajoute des problèmes liés à sa qualité. En 2003, le Programme mondial pour l'évaluation de l'eau des Nations Unies publiait que dans le monde, chaque jour, deux millions de tonnes d'eaux usées et de déchets industriels et agricoles sont déversés dans les écosystèmes aquatiques (World Water Assessment Programme, 2003). La carte présentée en Figure 1, illustre ce propos et montre les pressions anthropiques exercées sur l'eau et les écosystèmes aquatiques dans le monde en soulignant les disparités entre les continents.

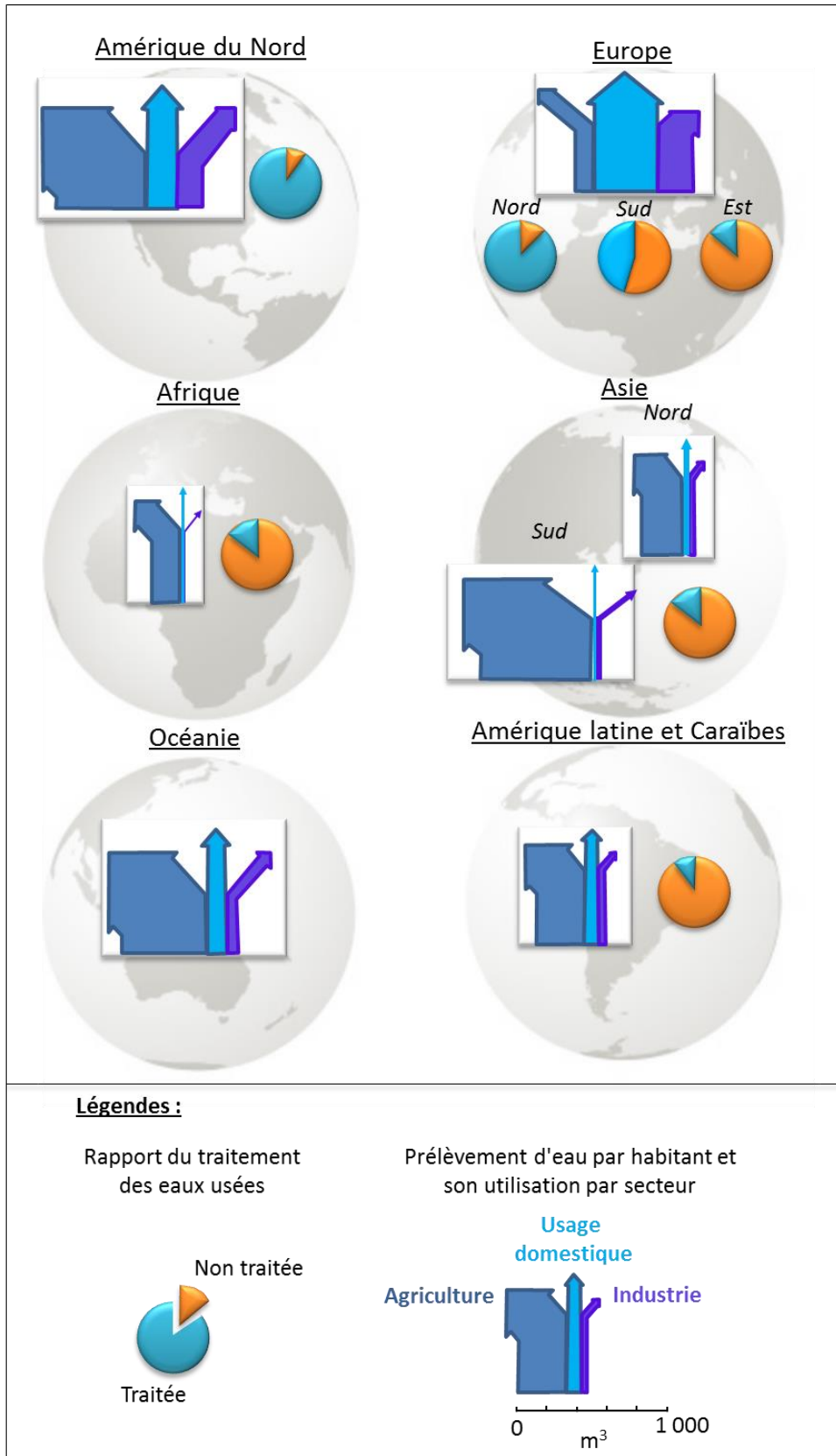


Figure 1 : Exemples de pressions anthropiques exercées sur les écosystèmes aquatiques (adapté de(UNEP/GRID-Arendal, 2010; UNEP/GRID-Arendal and Ahlenius, 2010).

L'absence de traitements des eaux usées et des déchets entraîne le relargage d'une quantité importante de minéraux, de composés organiques et de métaux ayant un impact sur la qualité du milieu.

Face à ces constats, il est plus que primordial de préserver l'eau en termes de quantité mais également de qualité. Aujourd'hui, des réglementations existent à l'échelle mondiale comme européenne. En 2001, la Convention de Stockholm a été adoptée ; en 2014, 152 pays ont approuvé cette convention visant à diminuer voire stopper la production de polluants organiques persistants (*i.e* pesticides organochlorés ; polychlorobiphényles, PCB ; dioxines ; furanes ; perfluorooctane sulfonique, PFOS) (www.pops.int). Sur le plan européen, depuis 1976, la directive européenne 76/464/CEE, abrogée en 2000 par la Directive 2000/60/CE ou Directive Cadre sur l'Eau (DCE), vise à réduire les rejets de substances dangereuses dans le milieu aquatique (*Directive n°76/464/CEE, 1976, Directive n°2000/60/CE, 2000*). La DCE a pour objectif de définir l'état écologique et chimique de chaque cours d'eau européen et d'en restaurer le « bon état ».

Des directives pour l'évaluation du risque environnemental ont été éditées par l'Agence de protection environnementale américaine (US EPA, Figure 2, (U.S Environmental Protection Agency, 1998).

La méthodologie est divisée en trois étapes :

i - La formulation du problème – correspondant à l'élaboration d'hypothèses sur les causes réelles ou potentielles d'effets écologiques par la mise au point de modèles conceptuels itératifs. Ces représentations mettent en relation les sources de stress avec des écosystèmes potentiellement à risques et les impacts environnementaux possibles ou observés.

ii – L'analyse – basée sur les hypothèses définies par les modèles, vise à donner les informations nécessaires pour prédire ou caractériser les réponses écologiques d'un écosystème soumis aux pressions. Cette phase est séparée en deux parties, la caractérisation de l'exposition et celle des effets écologiques. Les données obtenues permettent de caractériser le risque mais également de compléter les modèles conceptuels de l'étape précédente.

iii - La caractérisation du risque – cette ultime étape a pour but de recenser toutes les informations obtenues durant les phases précédentes afin de déterminer les liens existants entre les facteurs de stress, les milieux récepteurs et les effets pour estimer les risques pouvant exister sur l'écosystème et les communiquer aux gestionnaires.

La phase d'analyse est l'étape clé de l'évaluation du risque. Elle alimente à la fois la formulation du problème et la phase finale. Elle est constituée de deux éléments principaux, la caractérisation de l'exposition et celle des effets écologiques.

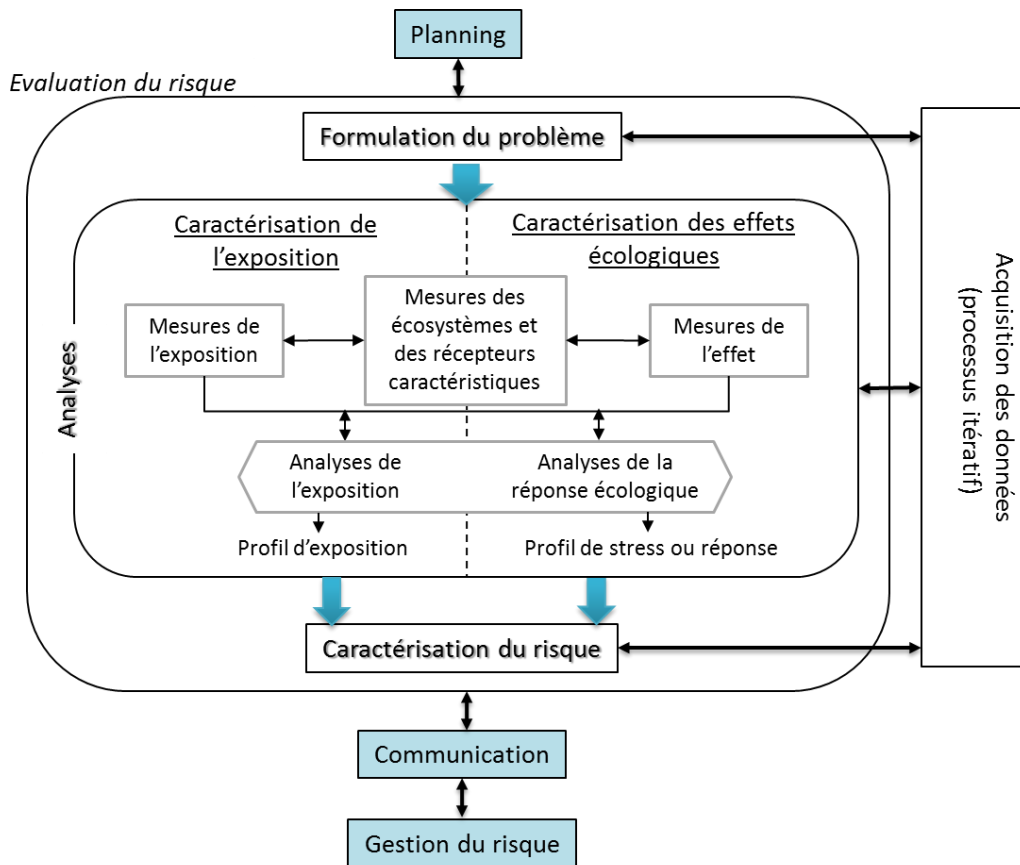


Figure 2: Diagramme général de l'évaluation des risques écologiques (U.S Environmental Protection Agency, 1998).

L'évaluation de l'exposition requiert de déterminer la présence de contaminants dans les écosystèmes en estimant leur concentration et leur biodisponibilité. Cette partie fait appel à la chimie analytique environnementale. De par les différentes techniques de séparation et les détecteurs aujourd'hui disponibles, les instruments analytiques permettent d'analyser une large gamme de polluants organiques dans l'environnement. Les analyses ciblées sur une pré-sélection de molécules sont privilégiées pour la surveillance du milieu (Picó et Barceló, 2008). Ces analyses étant optimisées sur des composés prédéfinis, elles permettent d'atteindre des niveaux de concentrations pouvant être qualifiés de traces. Cependant, elles ne prennent pas en compte toutes les molécules présentes dans les échantillons et sont susceptibles de sous-estimer un danger potentiel. Pour pallier ces limites, de nouvelles techniques analytiques de recherches de molécules ont été développées comme la spectrométrie de masse haute résolution (HRSM) (Krauss et al., 2010; Dévier et al., 2011).

Néanmoins afin d'appréhender un risque réel, il est nécessaire de caractériser des effets écologiques et par conséquent de faire appel au domaine de la biologie. Dans l'évaluation du risque, cette étape est la caractérisation des effets. L'approche se base sur des essais multi-espèces pouvant être effectués en microcosmes et mésocosmes afin de essayer de déterminer les effets de mélange de contaminants et la possible bioaccumulation le long des

réseaux trophiques (Perrodin, 2012). L'évaluation des effets combinés est l'une des principales difficultés à résoudre et doit absolument être prise en compte pour une évaluation correcte et pertinente du risque.

La phase d'analyse (*i.e.* caractérisation de l'exposition et caractérisation de l'effet) amène à l'étape de la caractérisation du risque qui combine toutes les données obtenues (U.S Environmental Protection Agency, 1998). Cette dernière étape permet entre autre d'établir des valeurs guides renseignant sur le risque écologique. Les normes couramment employées à l'échelle mondiale sont la PEC (*Predicted Environmental Concentration*), c'est-à-dire la concentration attendue d'un composé dans l'environnement, et la PNEC (*Predicted Non Effect Concentration*), c'est-à-dire la concentration d'un contaminant en-dessous desquelles il n'y a pas d'effets biologiques. Le rapport PEC/PNEC permet d'estimer le potentiel risque d'un composé sur l'environnement. Au niveau européen, dans le cadre de la DCE et pour répondre à la politique communautaire, des Normes de Qualités Environnementales (NQE) ont été établies. Une fois enregistrées, ces valeurs sont utilisées afin de définir le « bon état écologique et chimique » des écosystèmes aquatiques et servent donc de données guides pour la surveillance de la qualité du milieu (Chochois and Migné-Fouillen, 2011).

1.2 Les limitations

La surveillance de l'environnement se réfère classiquement aux réglementations qui sont établies lors de l'évaluation du risque. Les conventions se focalisent sur un nombre défini de molécules. La DCE, par exemple, préconise la surveillance de 53 molécules (*Directive 2013/39/UE*, 2013). Or en mai 2014, la société américaine de chimie référençait plus de 88 millions de molécules (*Chemical Abstract Service, CAS*, www.cas.org). La présélection de composés ne représente donc qu'une infime partie des contaminants pouvant se retrouver dans l'environnement et peut même être qualifiée de dérisoire face aux nombre de molécules synthétisées. De plus, une fois introduits dans le milieu, ces composés subissent de nombreux processus biotiques et abiotiques (*e.g.* phototransformation, biotransformation) qui peuvent générer des sous-produits pouvant être plus dangereux que les molécules parents. Ce constat est décrit, entre autre, par Sinclair et Boxall, (2009) qui ont regroupé des données de toxicité d'un lot de pesticides et de leurs produits de transformation sur *Daphnia pulex*. Sur 157 comparaisons, 16,7 % des produits de transformation se sont révélés plus toxiques que les composés initiaux. Fenner *et al.*, (2009) ont montré que la prise en considération des produits de transformation liés à la dégradation microbienne d'un herbicide, le diuron, augmentait de 70 % le danger encouru. Si l'on considère ce composé, actuellement dans le cadre de la DCE, seule la forme mère soit le diuron est suivie mais rien n'est stipulé quant à ses produits de dégradation comme le dichlorophénylméthyl-urée et le dichlorophényl-urée (*Directive 2013/39/UE*, 2013). Dans les réglementations européennes, une recommandation de surveillance des produits de transformation existe dans le suivi de certains pesticides mais rien ne transparait clairement pour les autres classes de contaminants tels que les composés pharmaceutiques (Fenner *et al.*, 2009). En plus de ces produits de transformation, il peut

exister des effets complexes de mélanges entre les molécules (Celander, 2011). Ces effets mélange sont difficiles à mettre en évidence et représentent un point laissé de côté dans l'évaluation du risque.

La sous-estimation du danger est d'autant plus importante que la détection de composés présents n'est pas toujours réalisable. En effet, la préparation des échantillons en elle-même peut entraîner une perte non négligeable de composés. Il est difficile voir quasiment impossible d'être exhaustif lors du traitement d'un échantillon. Du prélèvement à l'analyse, des molécules sont exclues à cause leurs diverses propriétés physico-chimiques. À ce constat s'ajoute le fait que certains composés peuvent entraîner une réponse biologique à des concentrations extrêmement basses. A titre d'exemple, dans la DCE, plusieurs composés possèdent des NQE moyennes annuelles de l'ordre de la dizaine de pg/L. Un insecticide, la cyperméthrine, en est une illustration avec une NQE moyenne annuelle dans les eaux de surface intérieures (*e.g.* rivières, lacs...) de 80 pg/L. L'insecticide organochloré, l'heptachlore et son produit de dégradation l'époxyde d'heptachlore possèdent les NQE les plus basses (0,2 pg/L, NQE moyenne annuelle dans les eaux de surfaces) (*Directive 2013/39/UE*, 2013). Bien que performante, les techniques analytiques actuellement disponibles ne permettent pas la détection de ces molécules à ces niveaux de concentrations. Les tests biologiques utilisés pour rechercher les possibles effets sont souvent plus sensibles que les analyses chimiques. Cependant dans un échantillon environnemental, ils ne peuvent que constater l'effet biologique du mélange non caractérisé sans pouvoir remonter à la cause de la réponse.

Toutes ces limites amènent à la difficulté d'établir un lien correct entre molécules présentes et effets biologiques observés.

2 Une meilleure appréhension de la contamination grâce aux approches bio-analytiques

Afin d'essayer de palier les limites actuelles pouvant être rencontrées dans l'évaluation du risque, de récentes approches couplant les disciplines de la chimie et de la biologie ont été développées. Ces méthodes intégratives sont qualifiées d'approches bio-analytiques et permettent d'établir un lien direct entre un effet biologique observé et les composés chimiques rencontrés. Ces démarches sont basées sur l'utilisation de bio-essais et allient la sensibilité des tests biologiques aux techniques analytiques performantes de détection et d'identification moléculaires.

Une des approches communément utilisée consiste à corrélérer les réponses biologiques mesurées durant une exposition aux concentrations en composés retrouvés dans l'échantillon donné. Cette méthode est appelée l'équilibre des masses (*Mass Balance Analysis*, MBA) et est décrite par (Khim et al., 2001; Giesy et al., 2002;). Elle permet de calculer la contribution de chaque molécule détectée à l'effet biologique total observé. Il apparait dans de nombreuses études que les concentrations mesurées pour les molécules détectées chimiquement n'expliquent que partiellement la réponse biologique obtenue. L'étude de Schriks *et al.*,

(2010) sur des effluents hospitaliers a montré qu'à 40 % l'activité glucocorticoïde mesurée ne pouvait pas être expliquée par les composés dosés. Plus récemment, Hong *et al.*, (2012) ont observé que sur trois classes de molécules recherchées (hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ; PCB et dioxines) dans des sédiments moins de 20 % de l'effet biologique mesuré était attribué aux composés détectés.

Giesy *et al.*, (2002) proposent plusieurs éléments pour expliquer ces résultats. Le premier provient des données disponibles pour le calcul des contributions qui ne sont pas forcément adaptables aux tests utilisés lors des études. Des variations de réponses interspécifiques sont observables et une transposition des valeurs obtenues lors d'essais indépendants n'est pas systématique. Un autre élément est l'absence de prise en compte des réactions complexes pouvant exister entre les molécules. En effet, le MBA se base sur les effets d'additivité entre les composés ignorant les phénomènes de synergie et d'antagonisme pouvant exister dans des mélanges complexes. Néanmoins, le principal élément permettant d'expliquer l'absence de concordance totale entre les mesures chimiques et biologiques est la présence de molécules ayant des effets mais qui ne sont pas identifiées.

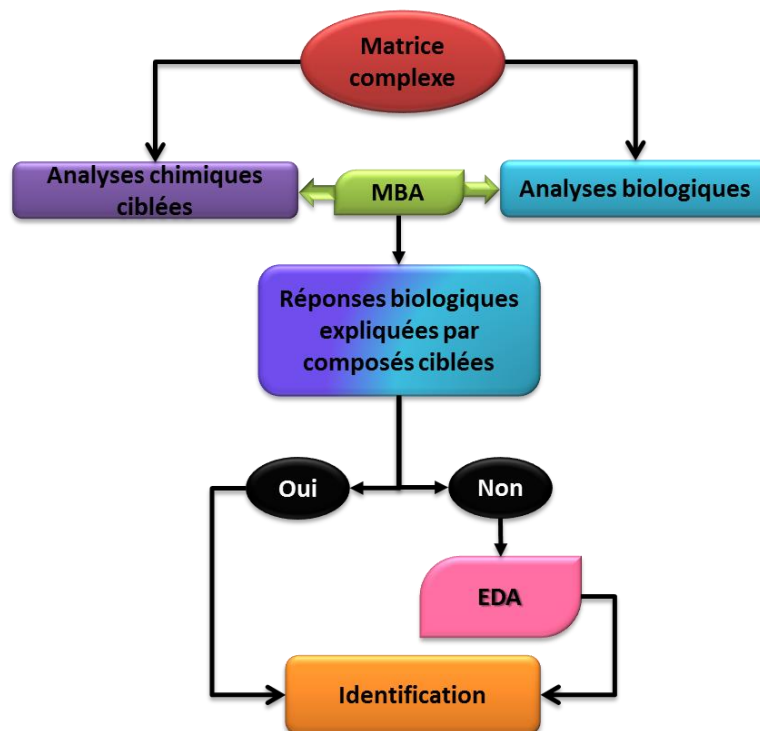


Figure 3 : Démarche expérimentale applicable à un échantillon environnemental pour identifier des composés ayant un effet biologique.

Les techniques actuelles développées en chimie analytique telle que la spectrométrie de masse haute résolution permettent d'identifier des composés non ciblés. Cependant, la multitude de molécules présentes dans un échantillon rend ce travail long, difficile et fastidieux. Il est donc nécessaire de se focaliser uniquement sur les composés entraînant une

réponse biologique et par conséquent de simplifier la matrice étudiée. L'approche bio-analytique de type EDA est une des méthodes récemment développée qui permet de simplifier des échantillons complexes afin d'identifier les molécules biologiquement actives. Cette démarche peut être effectuée dans un second temps lorsque l'approche MBA ne permet pas d'expliquer la totalité des effets biologiques observés (Figure 3). Une revue de la littérature sur l'approche EDA est présentée en Chapitre 2.

Chapitre 2

*L'analyse dirigée par l'effet,
« Effect Directed Analysis »
(EDA)*

Chapitre 2 – L’analyse dirigée par l’effet, « Effect Directed Analysis » (EDA)

1	L’historique de la méthode	19
2	Principe général de l’approche EDA	21
3	L’état de l’art sur le plan Européen et en France	25
4	Les quatre étapes principales de l’approche EDA	27
4.1	L’évaluation du profil biologique de l’échantillon.....	27
4.1.1	Les outils biologiques de type <i>in vitro</i>	27
a.	Les tests <i>in vitro</i>	27
b.	Les récepteurs nucléaires.....	28
4.1.2	Les outils plus représentatifs de l’impact environnemental : les modèles <i>in vivo</i>	32
a.	De la molécule à l’organisme	33
b.	De l’organisme entier à la population.....	35
4.1.3	Le choix du test biologique	35
4.2	Les techniques de préparation de l’échantillon	36
4.2.1	La notion de biodisponibilité.....	37
4.2.2	L’extraction	39
a.	Les techniques conventionnelles	39
b.	Les techniques accès sur la biodisponibilité.....	40
4.2.3	Le fractionnement	45
4.3	Les outils d’identification moléculaire	47
4.3.1	Généralités.....	47
4.3.2	Les analyses ciblées	47
4.3.3	Les analyses non ciblées	48
4.4	L’étape de confirmation.....	51
4.4.1	La confirmation de l’identification chimique	51
4.4.2	La confirmation biologique	51
5	Les limites actuelles de l’approche	52

Chapitre 2 – L’analyse dirigée par l’effet, « Effect Directed Analysis » (EDA)

1 L’historique de la méthode

Dans les années 1970, suite à une prise de conscience de l’état écologique catastrophique de plusieurs lacs et rivières des États-Unis (*e.g.* mort de poissons, rivière recouverte par des nappes d’hydrocarbures), l’Agence de protection environnementale américaine est chargée de développer des approches pour contrôler les rejets industriels et urbains dans le milieu aquatique (Ankley et al., 2011). Durant les années 1980, l’agence met alors en place un test pour évaluer la toxicité de l’ensemble des effluents industriels et municipaux (“*Whole Effluent Toxicity*”, WET) (Brack et Burgess, 2011). Cette démarche quantifiant seulement la toxicité globale de l’effluent devient rapidement insuffisante pour expliquer les causes de cette toxicité (Ankley et al., 2011; Burgess et al., 2013). Afin de caractériser les composés responsables et dans le but de les éliminer à la source, l’Agence de protection environnementale américaine développe alors une approche pluridisciplinaire permettant d’établir un lien entre cause et effets, « Toxicity Identification Evaluation » (TIE).

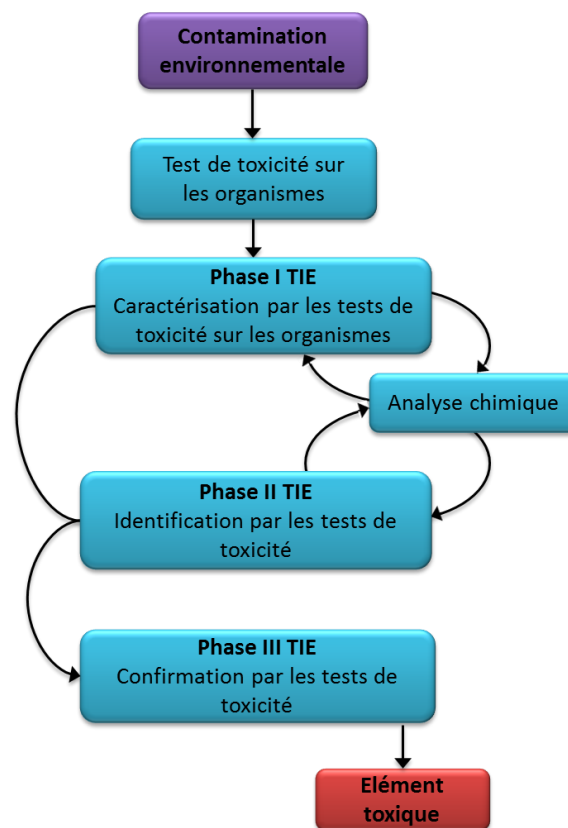


Figure 4 : Présentation de la démarche TIE « Toxicity Identification Evaluation » (Burgess et al., 2013).

Initialement, la démarche TIE se base exclusivement sur des tests *in vivo* (e.g. daphnies...) et s'applique principalement à des échantillons d'eaux (Bakker *et al.*, 2007). La démarche se base sur trois phases (Figure 4). La phase I consiste à caractériser la catégorie de contaminant provoquant la toxicité (e.g. composés organiques non-polaire, métaux...) (Mount, 1988). La phase II détermine plus finement les éléments responsables de la toxicité observée sur l'organisme entier (Mount, 1989a). Enfin la phase III est une étape de confirmation. Elle permet de tester la robustesse de l'hypothèse émise par les phases précédentes. Elle consiste à comparer l'activité individuelle des composés identifiés avec une solution étalon en utilisant le même test biologique (Mount, 1989b).

L'analyse dirigée par l'effet (*Effect Directed analysis*, EDA) est une adaptation européen de cette démarche mais à la différence de l'approche TIE, l'EDA utilise, en plus des tests biologiques *in vivo*, des modèles *in vitro* et possède des étapes de simplification des échantillons (Brack, 2003; Bakker *et al.*, 2007; Ankley *et al.*, 2011; Burgess *et al.*, 2013). L'EDA s'est développée en Europe dans les années 1980. En 1986, l'approche, nommée alors « *bioassay-directed chemical fractionation* », est décrite et appliquée avec succès par Schuetzle and Lewtas (1986) pour identifier des composés mutagènes dans des particules de diesel. Depuis, les articles utilisant l'approche EDA sont en nombre croissant chaque année (Figure 5).

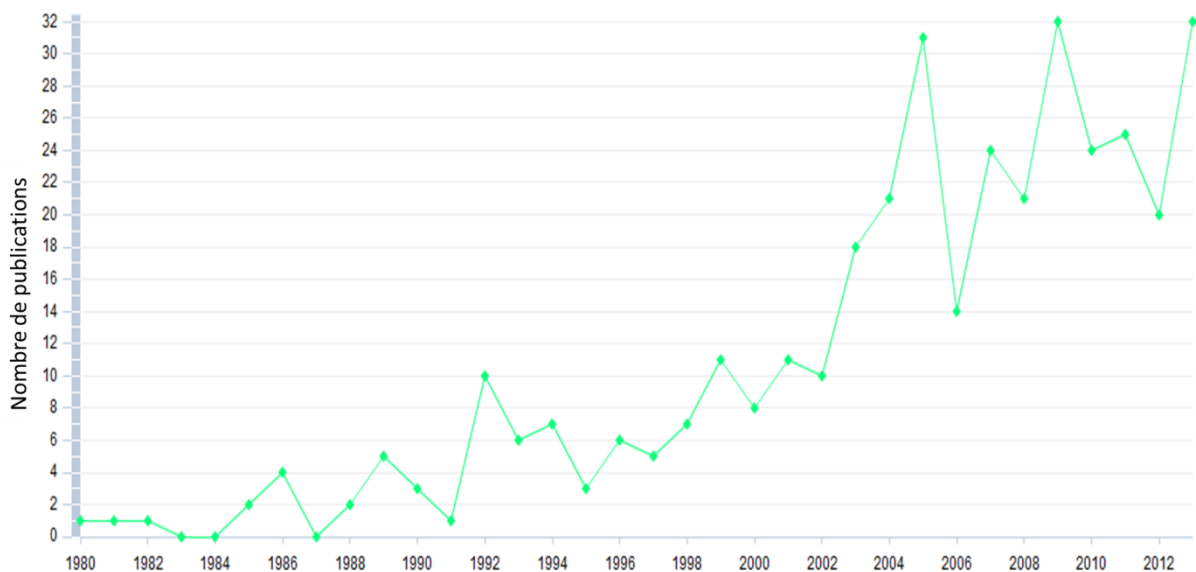


Figure 5 : Nombre annuel de publications concernant l'approche EDA (recherche effectuée dans SCOPUS, mots clés « *Effect-Directed Analysis* » et « *Bioassay directed analysis* »)

2 Principe général de l'approche EDA

Le concept global de l'analyse dirigée par l'effet repose comme pour la TIE sur trois étapes fondamentales : caractérisation, identification et confirmation (Bakker et al., 2007; Burgess et al., 2013). L'approche est décrite en détail dans la revue de Brack (2003).

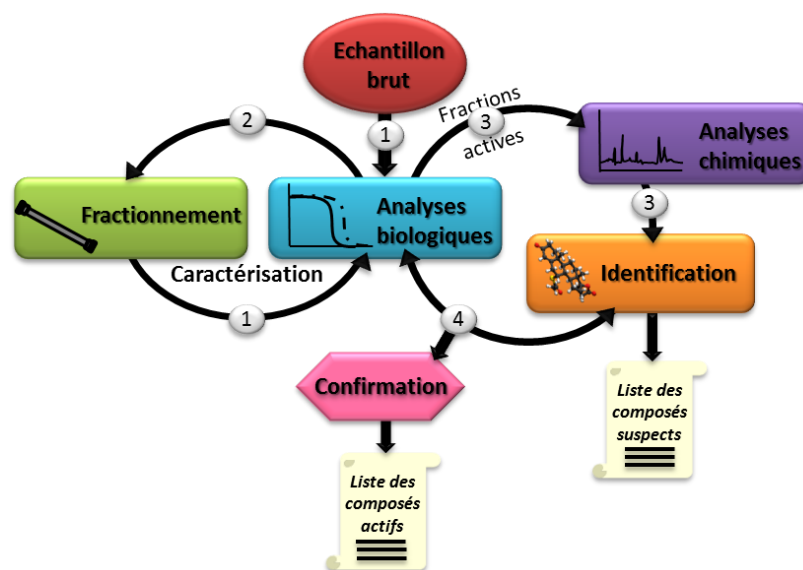


Figure 6 : Principe de l'analyse dirigée par l'effet (*Effect Directed Analysis*, EDA) inspiré de (Brack, 2003; Creusot, 2011; Simon, 2013). 1 - Évaluation du profil biologique, 2 - Simplification de l'échantillon, 3 - Identification des composés suspects comme actifs, 4 - Confirmation de l'activité des composés identifiés.

Plus spécifiquement, l'EDA est basée sur la simplification séquentielle d'un échantillon biologiquement actif afin de séparer puis identifier les composés responsables de l'activité mesurée (Brack, 2003). La démarche est schématisée Figure 6. Après avoir caractérisé l'activité biologique d'un échantillon environnemental, le mélange complexe est soumis à un ou plusieurs processus physico-chimiques de fractionnement afin de réduire la complexité de la matrice. Après chaque étape de fractionnement, les fractions générées sont testées biologiquement à l'aide de bio-essais *in vivo* et/ou *in vitro* afin de séparer les fractions les plus actives. La caractérisation moléculaire est ensuite réalisée sur ces fractions. Cette étape utilise généralement diverses techniques chromatographiques couplées à la spectrométrie de masse et à la spectrométrie de masse haute résolution. L'étape ultime est la confirmation. Les composés identifiés sont testés sur les bio-essais de manière à confirmer leurs effets biologiques.

Tableau 1 : Exemples d'études environnementales utilisant l'approche EDA.

Étude	Tests biologiques	Extraction	Type de fractionnement (Phase stationnaire)	Analyseurs	Composés identifiés	Références
Effluent industriel (usine pétrole/gaz)	ER, AR	SPE (C18)	NP-HPLC (Si greffée cyano-amino-)	GC -IT	AKP	(Thomas et al., 2004)
Effluent de STEP	AhR, ELISA (induction vitellogénine), cytotoxicité	SPE	RP-HPLC (C18)	GC-MS LC-MS/MS	Pesticides, composés pharmaceutiques, HAP, stéroïdes, AKP, benzophénone	(Grung et al., 2007)
Eau souterraine	<i>umuC</i> test (génotoxicité)	SPE	RP-HPLC (C18) + GC (colonne capillaire Si-phénylméthyl polysiloxane)	GC-MS	Chlorophénols, acides ester phosphoriques, phosphate méthylé	(Meinert et al., 2010)
Eau dopée et irradiée artificiellement	Inhibition de la photosynthèse	SPE	RP-HPLC (C18)	GC-MS	2-[(2-chlorophényl)-amino]benzaldéhyde (Produit transformation diclofénac)	(Schulze et al., 2010)
Eau de rivière	YES	SPMD + chromatographie exclusion stérique	RP-HPLC (C18)	GC-MS	Nonylphénols, phtalates, benzophénone, chloro-OH-benzophénone	(Rastall et al., 2006)
Eau de rivière	YAS	POCIS + LDPE + Bande de silicone	RP-HPLC (C18)	GC-MS LC-QTOF	Composés pharmaceutiques, pesticides	(Liscio et al., 2014)
Eau d'estuaire et eau de mer	Inhibition de la photosynthèse, <i>Dunaliella tertiolecta</i>	POCIS + Bande de silicone (extraction Soxhlet)	RP-HPLC (C18)	LC-TOF	Pesticides, N,N-diéthyl-3-méthyl-benzamide , tris(2-chloroéthyl)phosphate	(Booij et al., 2014)

Eau

Tableau 1 (suite)

	Étude	Tests biologiques	Extraction	Type de fractionnement (Phase stationnaire)	Analyseurs	Composés identifiés	Références
Eau	Eau de rivière	ER, AR/GR, PR, MR, PXR, AhR	POCIS	RP-HPLC (C18)	LC-MS/MS	Composés pharmaceutiques, Stéroïdes	(Creusot et al., 2014)
	Effluent d'eau usée Eau estuaire Sédiment	YAS, YES	SPE (C18) Centrifugation + SPE ou Ultrason	RP-HPLC (C18)	GC -IT	Stéroïdes, Phtalates, Nonylphénol	(Thomas et al., 2009, 2002a, 2002b)
Sédiment	Sédiment	Ames	ASE + AMAC	NP-HPLC (Si –nitrophényl-propyl, Si-cyanopropyl, carbone graphité poreux) + RP-HPLC (C18) + NP-HPLC (pyrényl-greffée Si)	GC-MS LC-LTQ-FTICR	nitro-HAP, OH-HAP, Céto-HAP, acides carboxyliques, quinones polycycliques	(Lübcke-von Varel et al., 2012)
	Sédiment	ER, anti-AR, PXR, AhR	ASE	SPE (Si) + RP-HPLC (C18)	GC-MS LC-MS/MS	OCP, HAP, PCB, PCDD/F, BPA, stéroïdes, nonylphénol, phtalates	(Creusot et al., 2013)
	Sédiment	ER-, DR-CALUX	ASE + GPC	RP-HPLC (C18) + NP-HPLC (µPorasil®)	GC-IT, GC-MS GCxGC-TOF	Œstrogènes, HAP	(Houtman et al., 2006)
	Sédiment	AhR, MTT	ASE + AMAC	NP-HPLC (Si-nitrophényl-propyl, Si-cyanopropyl, carbone graphité poreux)	GC-MS	HAP, méthyl-HAP, S-HAP, nitro-HAP, plastifiants	(Kaisarevic et al., 2009)
	Sédiment	AR-CALUX	ASE + GPC	RP-HPLC (C18) + NP-HPLC (µPorasil®)	GC-MS	HAP, nonylphénols, phtalates, organophosphates	(Weiss et al., 2009)
	Sédiment	Croissance algale	TENAX ou ASE	NP-HPLC (Si-nitrophényl-propyl, Si-cyanopropyl, carbone graphité poreux)	GC-MS	HAP, composés hétérocycles oxygénés et soufrés, N-phényl-2-naphthylamine	(Schwab et al., 2009)

Tableau 1 (suite)

	Étude	Tests biologiques	Extraction	Type de fractionnement (Phase stationnaire)	Analyseurs	Composés identifiés	Références
Sédiment	Sédiment	Toxicité (<i>Vibrio Fischeri</i> , <i>Daphnia magna</i> , <i>Scenedesmus vacuolatus</i>)	Soxhlet	Colonne ouverte (alumine) + NP-HPLC (Si)	GC-MS	HAP, phtalates, pesticides, pesticides organochlorés, PCB, alcanes	(Brack et al., 1999)
	Sédiment	AhR, test mutagène (<i>Salmonella sp.</i>)	Soxhlet	Colonne ouverte (alumine) + NP-HPLC (Si- nitrophényl-propyl) + chromatographie accepteur et donneur d'électron (Si- 2-(1-pyrényl)-éthyltriméthylsilylate) + chromatographie d'exclusion stérique (copolymère poreux de polystyrène divinylbenzène)	GC-MS	Dioxines, furanes, HAP, PCB,	(Brack et al., 2005b, 2002)
	Sédiment	Embryon de poisson transgénique (activité œstrogénique, tg(<i>cyp19a1b</i> -GFP))	ASE + GPC	NP-HPLC (Si-cyanopropyl)	GC-MS	Stéroïdes, filtres UV, Muscs, BPA, AKP	(Fetter et al., 2014)
Biota	Bile de poissons	ER-CALUX	LLE	RP-HPLC (C18)	GC-MS GC-MS/MS	Œstrogènes, AKP, BPA, Triclosan, Chlorophène, Cholestérol, chloroxylénol	(Houtman et al., 2004)
	Plasma d'ours polaires	TR	Centrifugation + SPE-LLE	-	GC-MS LC-TOF	Nonylphénol, PCB, OH-PCB	(Simon et al., 2013)

- **Tests biologiques** : AhR : récepteur arhy hydrocarbure, AR : récepteur aux androgènes, CALUX : « *Chemical Activated Luciferase gene eXpression* », DR : récepteur à la dioxine, ER : récepteurs aux œstrogènes, ELISA : « *enzyme-linked immunosorbent assay* », GR : récepteur aux glucocorticoïdes, MR : récepteur aux minéralocorticoïdes, MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium, PR : récepteur aux progestérones, PXR : récepteur X des prégnanes, YAS : « *yeast androgen screen* », YES : « *yeast estrogen screen* ».

- **Extraction** : AMAC : « *Accelerated membrane-assisted clean-up* », ASE : « *accelerated solvent extraction* », GPC: chromatographie de perméation de gel, LLE: extraction liquide/liquide, LDPE: membrane polyéthylène faible densité, POCIS : « *Polar Organic Chemical Integrative Sampler* », SPE : extraction sur phase solide, SPMD : membrane semi-perméable.

- **Fractionnement** : NP-HPLC : fractionnement en phase normale par chromatographie en phase liquide, RP-HPLC : fractionnement en phase inverse par chromatographie en phase liquide.

- **Analyseurs** : FTICR : résonance cyclotronique d'ion à transformée de Fourier, IT : piège ionique quadripolaire, GC: chromatographie en phase gazeuse, LC : chromatographie en phase liquide, LTQ : piège linéaire quadripolaire, MS : spectrométrie de masse, MS/MS : spectrométrie de masse en tandem, Q : quadripôle, TOF : temps de vol.

- **Composés** : AKP : alkylphénol, BPA : bisphénol A, HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique, OCP : pesticide organochloré, OH : hydroxyde, PCB : polychloro bisphényl, PCCD/F : polychlorodibenzo-p-dioxines/furane.

3 L'état de l'art sur le plan Européen et en France

De nombreuses applications de l'approche EDA ont permis de démontrer l'efficacité d'une telle méthode pour l'identification de composés biologiquement actifs dans des matrices environnementales diverses (Tableau 1). Le succès de cette méthodologie de recherche a suscité l'intérêt d'utiliser cette approche pour la surveillance de la qualité chimique du milieu aquatique notamment dans le cadre de la DCE (Brack et al., 2005a; Chapman and Hollert, 2006).

En Février 2010, un groupe de travail sur l'approche EDA a été créé au sein du réseau Norman (Norman Association, 2010). Ce consortium réunit plusieurs laboratoires européens (Tableau 2). Ce groupe de travail vise à démontrer l'efficacité et la pertinence de l'emploi d'une telle approche comme support supplémentaire dans le suivi environnemental pour l'identification de nouveaux composés à risque pouvant devenir à terme prioritaires (Norman Association, 2010). Les activités du groupe s'organisent autour de deux axes principaux. Le premier s'oriente sur l'échange entre laboratoires et vers la communauté scientifique sur les résultats mais également la méthode d'application de l'approche EDA. Ces échanges ont permis de mettre en place plusieurs études inter-comparatives entre les laboratoires notamment sur le plan chimique et biologique (*e.g.* validation des instruments et stratégies analytiques, comparaison des modèles biologiques...) afin de permettre à terme une normalisation de la méthode. Le second axe porte sur l'application de l'approche EDA dans le but de fournir des informations supplémentaires sur l'identification de nouveaux composés dangereux et l'utilité de leur suivi dans le milieu aquatique (groupes de travail n°1 et 2).

En 2011, un ouvrage consacré entièrement à l'approche EDA a été édité par les éditions Springer® (Brack, 2011). Durant la même année, une partie des auteurs ont été réunis dans un programme européen de démonstration, nommé « EDA Emerge ». Il rassemble autour de bourses « Marie Curie », 14 laboratoires répartis dans 8 pays européens, 14 chercheurs et 13 étudiants en doctorat. Le projet vise à développer et mettre en pratique l'approche EDA tout en formant de futurs chercheurs spécialisés. Le développement porte sur chaque partie de la méthode à savoir le fractionnement, les bio-essais, la procédure d'identification moléculaire. Une fois la méthodologie validée, l'approche EDA est appliquée sur des échantillons d'eaux provenant de 20 bassins fluviaux européens subissant différentes pressions anthropiques (*e.g.* effluents urbains, hospitaliers...). L'objectif principal est d'effectuer une comparaison entre les approches de surveillance classique avec les nouveaux outils développés (Brack et al., 2013).

Tableau 2 : Laboratoires européens participant au groupe de travail n°3 du réseau Norman.

Pays	Laboratoire
Croatie	IRB- <i>Ruder Boskovic Institute</i>
France	INERIS EPOC-LPTC
Allemagne	<i>Helmholtz Centre for Environmental Research UFZ,</i> RWTH Aachen <i>BAM, Federal Institute for Materials Research and Testing</i>
Italie	<i>JRC, Joint Research Centre</i>
Norvège	<i>NIVA, Norwegian Institute for Water Research</i>
Pays-Bas	Waterdienst <i>Free University of Amsterdam , IVM</i> <i>KWR Watercycle Research Institute</i>
Royaume Unis	<i>CEFAS, Centre for Environment, Fisheries & Aquaculture Science</i>
Slovaki	<i>Environmental Institute</i>
Suisse	EAWAG, Dübendorf

En France, l'approche EDA commence à être utilisée dans certains projets de recherche comme support à des questionnements scientifiques lorsque les approches classiques ne suffisent pas à expliquer les effets biologiques observés et cette thèse en expose certains. Actuellement, un grand nombre des projets portant sur ce sujet s'articule autour de trois laboratoires nationaux, l'Inéris unité ECOT (Verneuil-en-Halatte), l'Inserm unité IRCM (Montpellier) et EPOC-LPTC. En 2011, une thèse, en partenariat entre ces laboratoires, sur l'identification de perturbateurs endocriniens par l'utilisation de l'approche EDA a été soutenue (Creusot, 2011). À l'issue de la soutenance, plusieurs articles ont été publiés dans différents journaux (Creusot et al 2013; Creusot et al., 2014; Dévier et al., 2011). Les études menées ont permis d'identifier sur des échantillons de sédiment plusieurs composés de type perturbateur endocrinien : phtalate de diisooctyle, 2,4-di-tert-butylphénol et 2,6-di-ter-butyl- α -méthoxy-para-crésol (Creusot et al., 2013). Le même auteur a également appliqué l'approche EDA sur des échantillonneurs passifs de type POCIS et a mis en évidence la présence de divers composés stéroïdiens comme perturbateurs endocriniens dans une rivière impactée par des rejets urbains et industriels (Creusot et al., 2014). Une plateforme scientifique, liant ces trois laboratoires nationaux, est en cours de création et permettra de disposer, sur le plan national et international, de moyens efficaces et novateurs pour l'évaluation du risque. D'autres laboratoires sont également impliqués dans des projets de recherche portant sur l'analyse dirigée par l'effet comme par exemple le Groupe Santé Publique-Environnement de l'UMR Ecologie Systématique Evolution (GSPE-UMR 8079) de l'Université Paris Sud ou le Laboratoire des sciences de l'Environnement MARin au Havre.

4 Les quatre étapes principales de l'approche EDA

La démarche EDA s'organise en quatre étapes principales (Figure 6). Une revue de la littérature pour chaque étape est exposée dans cette section.

4.1 L'évaluation du profil biologique de l'échantillon

La première étape de la démarche EDA est de choisir un échantillon biologiquement actif associé à un ou des tests biologiques pertinents. Ce dernier sera la clé de voûte de l'approche. Le choix des bio-essais est donc une étape importante puisque le type de test employé conditionnera *in fine* les résultats de l'identification des composés (Brack et al., 1999; Brack, 2003). Les deux catégories de tests biologiques existant *in vitro* et *in vivo* sont exposés ce paragraphe.

4.1.1 Les outils biologiques de type *in vitro*

a. Les tests *in vitro*

Le terme *in vitro* définit toutes les expériences ou recherches pratiquées en laboratoire, isolées de l'organisme vivant entier. Blasco et Picó (2009) qualifient les tests *in vitro* de bio-capteurs ; ils peuvent être assimilés à des dispositifs d'analyse biologique qui permettent de mesurer un signal grâce à leurs capacités de reconnaissance moléculaire ou de mise en évidence d'un type de toxicité. La diversité des tests existants est relativement importante. Elle fait appel à différents mécanismes de réponses biologiques. La mesure d'une toxicité, de génotoxicité, d'effets mutagènes, et la recherche de perturbateurs endocriniens sont autant de paramètres pouvant être détectés par ce type de bio-essais. Ces outils *in vitro* permettant la détection d'un effet à court terme sont les outils biologiques qui sont le plus souvent utilisés comme tests pour diriger la démarche EDA. De nombreux tests recherchant la présence de composés génotoxique voire mutagène sont référencés dans l'approche EDA. Le test d'*Ames*, par exemple, faisant appel à la bactérie *Salmonella typhimurium*, est souvent rencontré dans la bibliographie. Le principe de ce bio-essais est basé sur la capacité des souches bactériennes à pousser en présence d'un acide aminé, l'histidine. Cette propriété résulte d'une mutation d'un des gènes. En présence de composés mutagènes, les souches poussent en l'absence d'histidine, avec un milieu minimum (Mortelmans et Zeiger, 2000). L'efficacité de l'utilisation de l'approche EDA dirigée par le test d'*Ames* a été montré dans plusieurs études (Fernández et al., 1992; Marvin et al., 2000, 1999). Récemment, Lübcke-von-Varel *et al.* ont confirmé la présence de 10 composés mutagènes dans un échantillon de sédiment dont les plus forts effets pouvaient être attribués à des nitro-HAP (*e.g.* dinitropyènes, 3-nitrobenzanthrone, nitrobenzo[a]pyrènes) grâce à l'utilisation de ce test (Lübcke-von Varel et al., 2012). Umbuzeiro et al. (2011) précisent dans une revue bibliographique que ce test peut se révéler très sensible pour certains composés (*e.g.* 3-nitrobenzanthrone) en détectant une réponse positive avec seulement quelques pico-grammes. D'autres bio-essais basés sur

l'inhibition de la bioluminescence des bactéries sont aussi cités dans différents articles associés à l'approche EDA pour la recherche de contaminants mutagènes (*e.g.* test Mutatox) (Thomas *et al.*, 2002b; Lei et Aoyama, 2010). Ces tests standardisés utilisent le plus communément l'espèce *Vibrio/Alivibrio fischeri*. Son faible coût, sa sensibilité et sa rapidité d'exécution font que ce test est souvent choisi comme bio-essais. Cependant, il a été observé que ce test était sensible à des éléments présents (*e.g.* soufre, limon, argile) dans les matrices étudiées, autres que les composés organiques recherchés (Salizzato *et al.*, 1998; Brack *et al.*, 1999; Parvez *et al.*, 2006). Cette faible spécificité peut entraîner la détection de « faux positifs ». L'utilisation de *Vibrio/Alivibrio fischeri*, bactérie marine, demande de travailler dans des conditions salines. Cette caractéristique peut entraîner la modification de la composition chimique de l'échantillon étudié (Farré et Barceló, 2003). Les inconvénients de ce test d'inhibition de luminescence poussent certains auteurs à combiner ce bio-essais avec d'autres tests biologiques (Grote *et al.*, 2005a; Kammann *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2013).

L'utilisation de ces tests basés sur des organismes procaryotes sont des outils adaptés et efficaces pour identifier des composés entraînant une réponse biologique. Néanmoins, ils ne permettent pas de représenter des effets biologiques pouvant exister sur des cellules ou organismes eucaryotes. Des bio-essais basés sur des cellules eucaryotes sont d'ailleurs également, couramment employés dans l'approche EDA (*e.g.* test Comet, prolifération cellulaire, vittélogénine...) (Grote *et al.*, 2005b; Kammann *et al.*, 2005). Cependant, les tests les plus rencontrés dans la littérature, sont basés sur l'expression de gènes naturels ou rapporteurs contrôlés par des récepteurs nucléaires, pour la recherche de perturbateurs endocriniens dans l'environnement. En effet, les perturbateurs endocriniens sont connus pour leur capacité à se lier aux récepteurs nucléaires. La fixation de ligand sur ces récepteurs induit des réactions au niveau cellulaire, tissulaire et *in fine* sur l'ensemble un système endocrinien. L'engouement pour ces bio-essais basés sur l'expression de gènes naturels ou rapporteurs contrôlés par des récepteurs nucléaires, est lié à leur coût, leur sensibilité, leur rapidité d'exécution et leur capacité à exprime quantitativement la réponse observée et ce pour un moindre coût en comparaison aux tests *in vivo*. Durant ce travail de thèse, ces tests *in vitro* ont principalement été employés, le paragraphe suivant leur est donc consacré.

b. Les récepteurs nucléaires

L'identification de perturbateurs endocriniens dans les écosystèmes aquatiques est un des sujets récurrents des articles utilisant l'approche EDA. Les principaux modèles utilisés sont ceux basés sur les récepteurs nucléaires. Cette superfamille, constituée de 48 récepteurs, participe au contrôle de nombreuses fonctions physiologiques tels que le maintien de l'homéostasie, le développement cellulaire, la différenciation sexuée chez les organismes eucaryotes (Janošek *et al.*, 2006). Ces récepteurs nucléaires peuvent être classés en trois catégories (Tableau 3) (Jacobs *et al.*, 2003; Janošek *et al.*, 2006).

Tableau 3 : Classification des récepteurs nucléaires couramment utilisés dans des études environnementales selon (Janošek et al., 2006).

Type	Récepteurs	
I	Stéroïdiens	Récepteur des œstrogènes (ER)
		Récepteur des androgènes (AR)
		Récepteur des glucocorticoïdes (GR)
		Récepteur des minéralocorticoïdes (MR)
		Récepteur des progestagènes (PR)
II		Récepteur thyroïdiens (TR)
		Récepteur de la vitamine D (VDR)
		Récepteur de l'acide rétinoïque (RAR)
		Récepteurs des rétinoïdes (RXR)
		Récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR)
	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes (PPAR)	
III	Orphelins	Récepteur des prégnanes (PXR)
		Récepteur des androstanes (CAR)
		COUP-TFs
		HNF4
		Rev Erb

Leurs mécanismes d'action en fonction de leur localisation sont présentés Figure 7. De façon générale, en absence de ligand, le récepteur associé à des protéines chaperonnes est inactif et se situe dans le cytoplasme ou dans le noyau. L'activation du récepteur se fait par l'association avec son ligand spécifique ce qui entraîne un changement de sa conformation structurale. Cette action lui permet de se lier l'ADN dans le noyau cellulaire et d'entraîner l'expression du gène cible (Figure 7). Sur la base de ce mode d'action, l'induction du gène cible reflétant l'interaction ligand-récepteur est mesurée soit par le dosage de protéines, soit de l'ARN messenger ou de l'activité enzymatique. Les modèles cellulaires exprimant de manière endogène le gène cible ou non (*i.e.* implantation d'un gène rapporteur) sont largement utilisés comme outils biologiques dans la démarche EDA (Tableau 3).

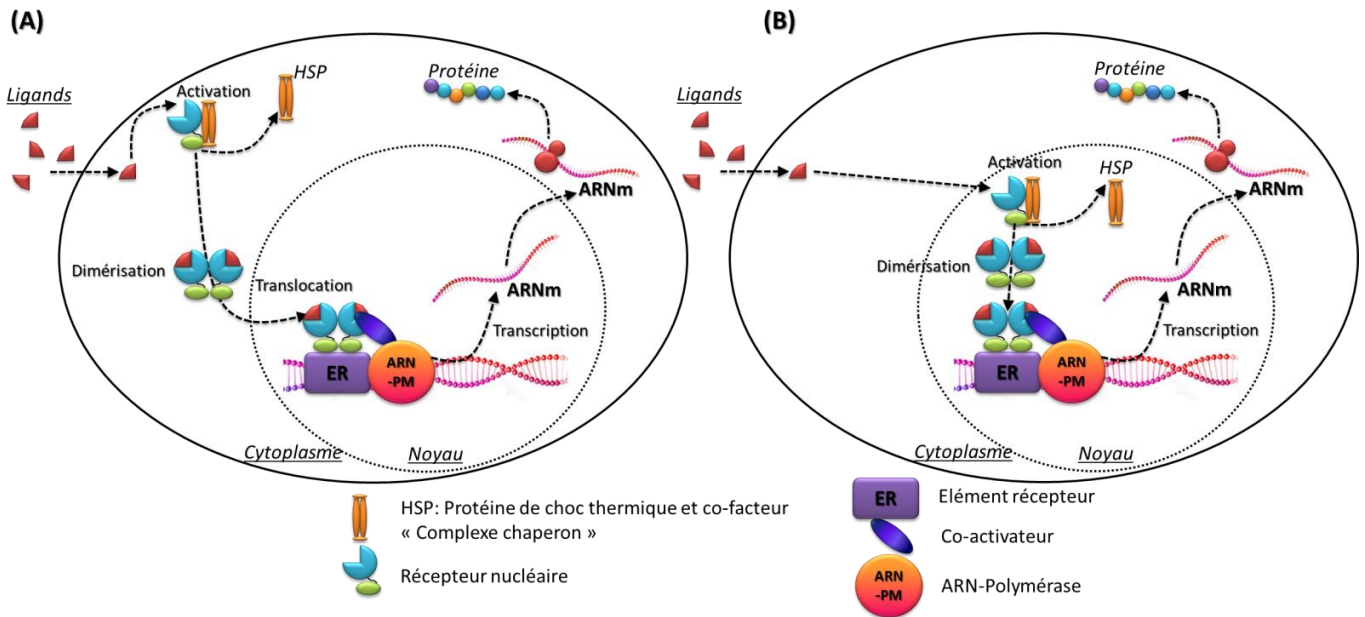


Figure 7 : Principe général simplifié du mécanisme d'action des récepteurs nucléaires - exemple des récepteurs nucléaires localisés dans le cytoplasme (A) (e.g. AR, AhR, GR) et dans le noyau (B) (e.g. ER, PXR).

L'association ligand-récepteur peut être visualisée par colorimétrie, bioluminescence et fluorescence. La quantité de ligands présents va moduler l'expression du gène cible et par conséquent la réponse cellulaire mesurée. La liaison ligand-récepteur est conditionnée par l'affinité que possède la molécule pour la zone de fixation (*relative binding affinity*, RBA). La réponse obéit à la loi de dose-réponse (Figure 8). Néanmoins, l'association ligand-récepteur est un processus complexe qui n'entraîne pas systématiquement un signal. Ainsi, les ligands peuvent être classés en quatre catégories (Marty et al., 2011) :

- i. Les *agonistes complets* : ces composés entraînent une réponse maximale de la cellule en activant le récepteur et permettant ainsi l'induction de tous les mécanismes physiologiques associés
- ii. Les *agonistes partiels* : ces ligands produisent une faible réponse cellulaire même lorsqu'ils sont présents en quantités importantes
- iii. Les *antagonistes complets* : ces molécules inhibent le récepteur ou se lient au récepteur sans engendrer de réponse.
- iv. Les *agonistes inverses* : ces ligands se fixent au récepteur et entraînent une répression de la transcription

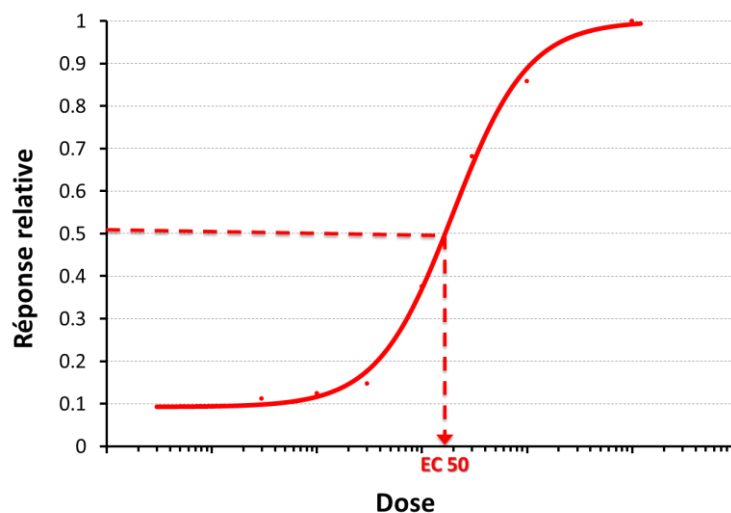


Figure 8 : Courbe dose-réponse d'une substance active et détermination de l'EC 50.

Dans un échantillon complexe l'identification de telle ou telle classe n'est pas aussi linéaire. Des interactions entre les composés existent et rendent parfois l'identification des mécanismes d'action difficile. Weiss *et al* ont, par exemple, mis en avant dans un échantillon de sédiment de rivière, une activité androgénique masquée par la présence de composés antagonistes (Weiss et al., 2009). L'extrait de sédiment ne permettait pas en l'état de mettre en évidence les effets de mélange entre les composés présents. L'approche EDA a permis, en séparant les molécules lors du fractionnement, la détection de l'activité androgénique. Les effets de mélange entre les composés peuvent être complexes (*e.g.* synergie, additivité, antagonisme). Dans le cas des récepteurs nucléaires, il a été démontré que dans certain cas un même récepteur avait la capacité de fixer une ou plusieurs molécules. Cette spécificité peut être liée à la taille de la poche de liaison du récepteur (Tableau 4). Ainsi au vu de leur petite taille (>200 Da), deux molécules de parabènes seraient potentiellement capables, selon des études *in silico*, de rentrer dans la poche du récepteur des œstrogènes (ER α), de se lier à ce dernier et d'entraîner une réponse synergique (Byford et al., 2002). Ces phénomènes de synergie peuvent également être observés à des fréquences plus importantes sur le récepteur des prégnanes (PXR) (Le Maire et al., 2010). En effet, ce dernier possède une poche deux fois et demi plus large que celle du ER α (Tableau 4). Cette caractéristique lui confère alors la possibilité de fixer une plus large gamme de molécules aux tailles plus variées. Il a été également observé que certains récepteurs pouvaient posséder deux poches de liaison.

Tableau 4 : Comparaison de la taille des poches de liaison de différents récepteurs (Jacobs et al., 2003).

Récepteur	Volume de la poche de liaison du ligand (Å ³)
ER α	476
PXR	1150
PPAR γ	1619
PR	557

Le récepteur des œstrogènes β (ER β) possède cette particularité. Elle a été mise en évidence par Wang *et al* (2006) par la cristallisation du récepteur en présence d'un antagoniste des œstrogènes, le 4-hydroxytamoxifène (Figure 9).

Même si les tests *in vitro* sont des modèles biologiques pouvant être qualifié d'éléments relativement simples par rapport aux modèles utilisés pour les tests *in vivo*, il apparaît que la réponse biologique observée n'est pas forcément simple en termes d'interprétation.

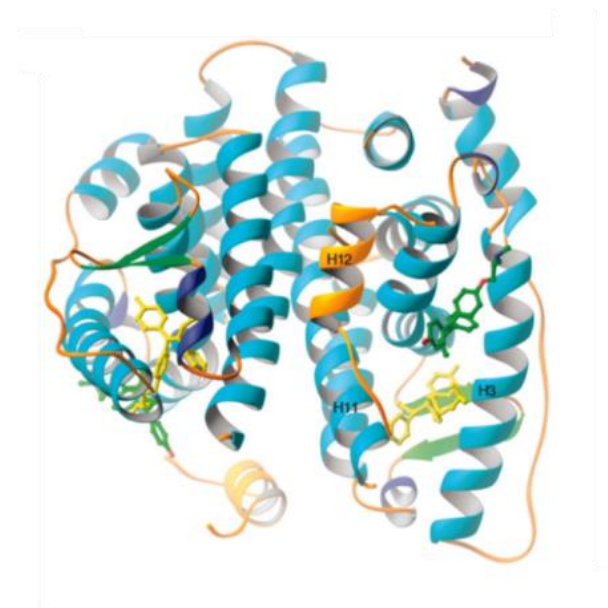


Figure 9 : Structure cristalline du récepteur des œstrogène β contenant la fixation de 4-hydroxy-tamoxifène (HT). Le HT lié au site de liaison complémentaire est en jaune (Wang et al., 2006).

4.1.2 Les outils plus représentatifs de l'impact environnemental : les modèles *in vivo*

Bien que plus rarement utilisés en raison entre autre du criblage des échantillons à faible débit, de leur sensibilité, des contraintes logistiques et des questions d'éthique, les bio-essais *in vivo* peuvent être employés comme outils biologiques dans l'approche EDA afin d'appréhender le réel impact écologique d'un échantillon environnemental. La diversité des tests utilisés permet d'aborder les différentes échelles des réponses déclanchées à l'issue d'un stress chimique (Figure 10).

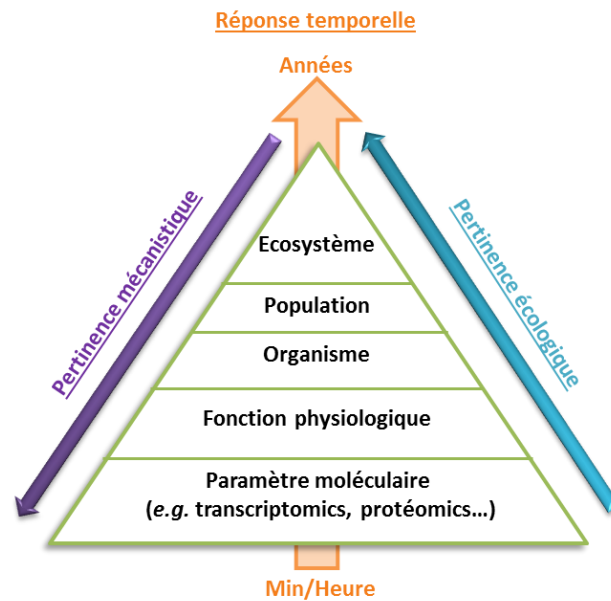


Figure 10 : Représentation schématique des réponses à un stress dans un système biologique adapté de Snape et al. (2004).

a. De la molécule à l'organisme

L'un des premiers niveaux de réponse des organismes à un stress chimique se situe à l'échelle moléculaire et biochimique. Un impact sur ce niveau peut entraîner *in fine* une réponse en cascade affectant les échelles supérieures telles que les fonctions physiologiques et l'individu. Des tests impliquant ce niveau organisationnel, s'appuyant sur le génome ou les protéines, sont couramment utilisés pour la recherche d'agents mutagènes ou cancérigènes. Concernant leur usage en tant que tests directeurs pour l'approche EDA, ces outils sont actuellement peu utilisés (Kammann et al., 2005). Néanmoins, des groupes de recherche tels que EDA-EMERGE travaillent sur le développement et l'application de ces tests *in vivo* transposables à la démarche EDA. L'un des objectifs est de développer un test protéomique sur des embryons de poissons zèbres (*Danio rerio*) (Brack et al., 2013). Groh et al. (2013) ont récemment mis en place une telle approche permettant d'étudier le niveau d'expression de certaines protéines durant la différenciation sexuelle du poisson zèbre. Cette étape de développement est dépendante de plusieurs gènes et les conditions environnementales peuvent influencer leur expression. De plus, le développement d'une méthode de détection ciblée des protéines, sensible et rapide permet d'envisager l'utilisation d'un tel test pour des études environnementales (Groh et al., 2013). Un autre objectif du consortium EDA-EMERGE est le développement de puce à ADN sur des algues en se basant sur les travaux déjà effectués sur d'autres organismes tels que les poissons (Meland et al., 2011; Kosmehl et al., 2012; Brack et al., 2013) et en les extrapolant. Un autre outil *in vivo* intéressant, est la mesure d'une réponse moléculaire et biochimique à l'échelle d'organismes vivants entiers. Cette méthode fait appel à des organismes transgéniques qui ont intégré un gène codant pour la luciférase ou pour une protéine fluorescente, la *green fluorescent protein* (GFP), qui peut

être placé sous le contrôle de récepteurs ou promoteurs. En présence de ligands, l'activation des éléments de réponse entraîne la production de luciférase ou de GFP. L'organisme à des stades précoces de développement devient alors luminescent ou fluorescent et une lecture de ces paramètres permet d'estimer la présence de composés (Figure 11). Les premiers développements pour obtenir ces mutants ont été réalisés sur le poisson zèbre (*Danio rerio*) dans les années 2000 pour l'étude de perturbateurs endocriniens activant le récepteur à la dioxine (AhR) ou des œstrogènes (Carvan III et al., 2000; Legler et al., 2000). D'autres études, plus récentes, ont permis de réaliser un travail similaire pour la détection de composés activant la voie thyroïdienne par l'utilisation d'un gène promoteur chez des organismes modèles comme le poisson zèbre ou l'amphibien *Xenopus laevis* (Fini et al., 2012; Ji et al., 2012). En 2014, Fetter et al., (2014) ont publié l'une des premières études combinant l'approche EDA à ces outils *in vivo* pour la détection de perturbateurs endocriniens (*i.e.* AKP, stéroïdes) dans des échantillons de sédiments provenant de la rivière *Bilina* en République Tchèque. Le modèle utilisé est un poisson zèbre à l'état embryonnaire possédant un gène codant pour le GFP, dont l'expression est régulée par un promoteur codant pour l'aromatase B cérébrale (*cyp19a1b*) lui-même sous contrôle du récepteur des œstrogènes (Figure 11) (Brion et al., 2012; Petersen et al., 2013). Fetter et al. (2014) soulignent l'efficacité de diriger les analyses par ces tests *in vivo* basés sur des organismes transgéniques pour l'identification de composés œstrogéno-mimétiques mais également pour la détection de molécules androgènes aromatisables, transformées par les aromatasés cérébrales. Néanmoins, ils précisent également la nécessité, pour utiliser ces modèles comme outil de surveillance de la qualité du milieu, de disposer de méthodes de lecture automatisées pour traiter plus rapidement un nombre d'échantillons plus important.

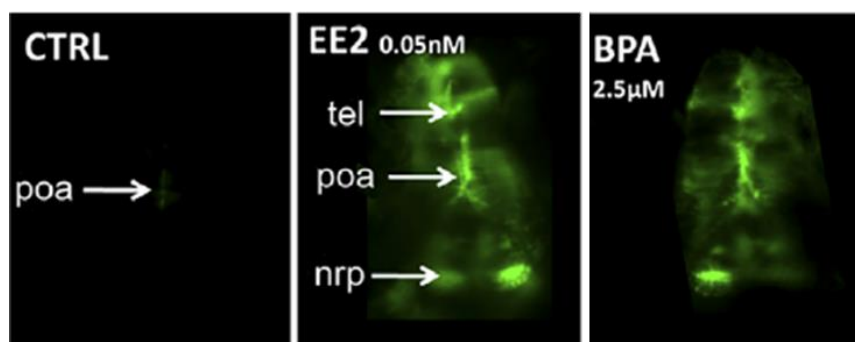


Figure 11 : Images d'embryons transgéniques de poisson zèbre (*cyp19a1b*-GFP) exposés à différents composés (EE2 : 17 α -éthinyloestradiol, BPA :bisphénol A). La vue dorsale de l'embryon permet de distinguer le noyau pré-optique (poa), le télencéphalon (tel), le noyau du récessus postérieur de l'hypothalamus caudal (nrp). CTRL correspond à l'embryon contrôle non exposé aux molécules (Brion et al., 2012).

b. De l'organisme entier à la population

Les tests normalisés basés sur des organismes vivants modèles tels que les daphnies (*Daphnie magna*) sont historiquement les premiers bio-essais utilisés dans l'approche EDA (Schuetzle and Lewtas, 1986; Brack et al., 1999). Ces tests de toxicité aiguë étaient les bio-essais *in vivo* les plus fréquemment rencontrés dans les études appliquant la démarche EDA avant les années 2000 (Brack, 2003). Ces tests de mortalité représentent l'impact, à court terme et sur des organismes modèles sensibles, des composés présents dans les échantillons testés. Néanmoins, ces bio-essais ne permettent pas d'indiquer les effets possibles à long et moyen terme de l'échantillon sur des organismes plus résistants. Outre la mortalité des organismes, d'autres paramètres traduisant un impact biologique peuvent être suivis à l'échelle de l'organisme en surveillant son comportement, ou des paramètres phénotypiques. Schmitt *et al.* ont récemment montré l'utilisation de l'escargot *Potamopyrgus antipodarum* comme outils d'évaluation biologique des effets d'un échantillon de sédiment environnemental sur la croissance, la reproduction et mortalité de l'organisme utilisé (Schmitt et al., 2011). Leur expérience a consisté à exposer les gastéropodes à un sédiment artificiel dopé avec les fractions de l'extrait de sédiment échantillonné durant une période de quatre semaines. Une augmentation de la reproduction des organismes a pu être observée pour certaines fractions. La présence de nonylphénol et de bisphénol-A a pu être mise en évidence dans les fractions ayant un effet biologique. Dans d'autres études des embryons de poissons comme test *in vivo* ont également été combinés à l'approche EDA. Les articles publiés se basent sur l'observation du comportement (*e.g.* rythme cardiaque), de malformations (*e.g.* malformations cardio-faciales, détachement de la queue, formation retardée de la somite) et de létalité dans le but d'identifier des composés mutagènes et tératogènes (Legler et al., 2011; Higley et al., 2012). Ces tests *in vivo* étudiant les fonctions physiologiques (*e.g.* reproduction, toxicité) ou le caractère phénotypique (*e.g.* malformations) sur des organismes modèles permettent de donner des informations sur un éventuel impact à l'échelle populationnelle voire même d'envisager des effets sur l'écosystème (Geiszinger et al., 2009). Toutefois, ces travaux nécessitent une période d'exposition très longue et des quantités de matrice relativement importantes compromettant ainsi parfois la faisabilité de la démarche.

4.1.3 Le choix du test biologique

L'outil biologique doit être choisi pour sa pertinence à répondre aux questions scientifiques posées, mais également pour son coût et sa rapidité d'exécution. En cela, les bio-essais *in vitro* représentent un potentiel intéressant. Ces modèles biologiques sont basés sur des mécanismes de réponse relativement simples, qui leur confèrent la particularité d'être spécifiques à une ou des familles de contaminants. Généralement, l'analyse des données est relativement courte et peut même être effectuée en temps réel (Blasco et Picó, 2009). Ces

éléments en font des outils particulièrement adaptés pour évaluer la réponse biologique d'un nombre important d'échantillon ou de composés. Pour une plus grande facilité d'exécution, des kits de tests *in vitro* sont aujourd'hui commercialisés contenant tout le nécessaire pour effectuer le test (*e.g.* SOS-ChromoTEST kit : le kit contient les réactifs, les matériaux jetables, le nécessaire pour tester de 4 à 80 échantillons, y compris les dilutions et les contrôles (www.ebpi-kits.com). De nombreux kits permettent d'évaluer la toxicité, la génotoxicité et les effets mutagènes sur les échantillons et rendent les tests *in vitro* d'autant plus accessibles. Cependant, ce type de bio-essais étant des modèles biologiques simples, ils ne peuvent être utilisés pour expliquer le réel impact à l'échelle de l'organisme. En effet, les contaminants qui peuvent entraîner une réponse sur ces tests, n'entraîneront pas systématiquement un effet sur l'individu entier, et inversement. Par exemple, certains composés ayant une activité androgénique sur des tests *in vitro* peuvent avoir une activité oestrogénique *in vivo*. Cet effet est lié à la présence d'enzymes (*e.g.* aromatase) qui catalysent la conversion des androgènes en œstrogènes (Lephart, 1996). Ainsi, les bio-essais basés sur l'organisme entier sont des outils biologiques plus représentatifs puisqu'ils intègrent les différentes voies de signalisation et de métabolisation existantes. Cette caractéristique les rend, par conséquent, peu spécifique d'un mécanisme donné puisque la complexité mécanistique cache les réponses sous-jacentes. De plus, ces mécanismes étant extrêmement complexes, les réponses observées sur l'individu peuvent être provoquées par des éléments environnementaux et non être en lien direct avec la présence de polluants. Cette caractéristique peut entraîner la présence de « faux positif » qui peut-être un verrou pour leur utilisation en tant qu'outil pour la recherche de molécules actives. À cela s'ajoute, outre la question d'éthique, le temps d'expérimentation qui peut être relativement long et le coût élevé de mettre en place de tels tests.

Comme il vient d'être énoncé, que ce soit pour les bio-essais *in vitro* ou *in vivo*, chaque type de tests possède des atouts et des inconvénients. Cependant, il semble que leur utilisation combinée permet de pallier leurs lacunes respectives et permet une caractérisation plus fine du risque environnementale en lien avec les polluants chimique. La multiplication de différents tests permet d'obtenir l'« empreinte digitale » d'un échantillon et fournit de nombreuses informations (Hamers et al., 2010). Dans le cadre de l'approche EDA, idéalement, il apparait intéressant de coupler les deux types de bio-essais ; le test *in vitro* pour sa rapidité à d'exécution pour la recherche de fractions et composés actives, et le test *in vivo* comme confirmation finale de l'effet des molécules détectées. La combinaison des deux types d'outil biologique permettrait une meilleure représentation et une meilleure compréhension du danger écologique.

4.2 Les techniques de préparation de l'échantillon

Les matrices environnementales sont des échantillons très complexes à cause du nombre de composés mais également des éléments structuraux présents (*e.g.* minéraux, sels, lipides...) (Brack et al., 2011a). Pour permettre l'identification de molécules, il est

indispensable de préparer l'échantillon pour le simplifier. Cette étape peut être effectuée en plusieurs phases. La première est l'extraction des composés présents dans la matrice. Ensuite, l'extrait est fractionné afin de séparer les molécules ayant un effet biologique des autres composants de l'échantillon. La préparation de l'échantillon est l'étape cruciale de l'approche EDA. Elle doit permettre de conserver le maximum de composés tout en éliminant les éléments pouvant interférer lors des analyses.

4.2.1 La notion de biodisponibilité

Avant de procéder à la préparation de l'échantillon à proprement parlé, il est intéressant de s'interroger sur la biodisponibilité des molécules. Le terme de biodisponibilité est défini comme la fraction accessible d'un produit chimique qui est assimilable et potentiellement toxique (Alexander, 2000). Cette notion est le plus souvent évoquée lors du traitement d'échantillon sédimentaire (Harmsen, 2007; Brack et al. 2009; Bandow, 2011; Brack et al., 2011a). Ce dernier, de par, sa composition (*i.e.* eau interstitielle, phase minérale, phase organique), peut renfermer des composés organiques qui peuvent ou non être bio-accessibles pour les organismes. La notion de biodisponibilité peut être également appliquée à un échantillon prélevé dans la colonne d'eau. Dans ce compartiment, la biodisponibilité est liée à la présence de différents composants, matières organiques dissoutes (MOD) et particulaires (MOP). Le concept de biodisponibilité peut être résumé en trois phases (Figure 12).

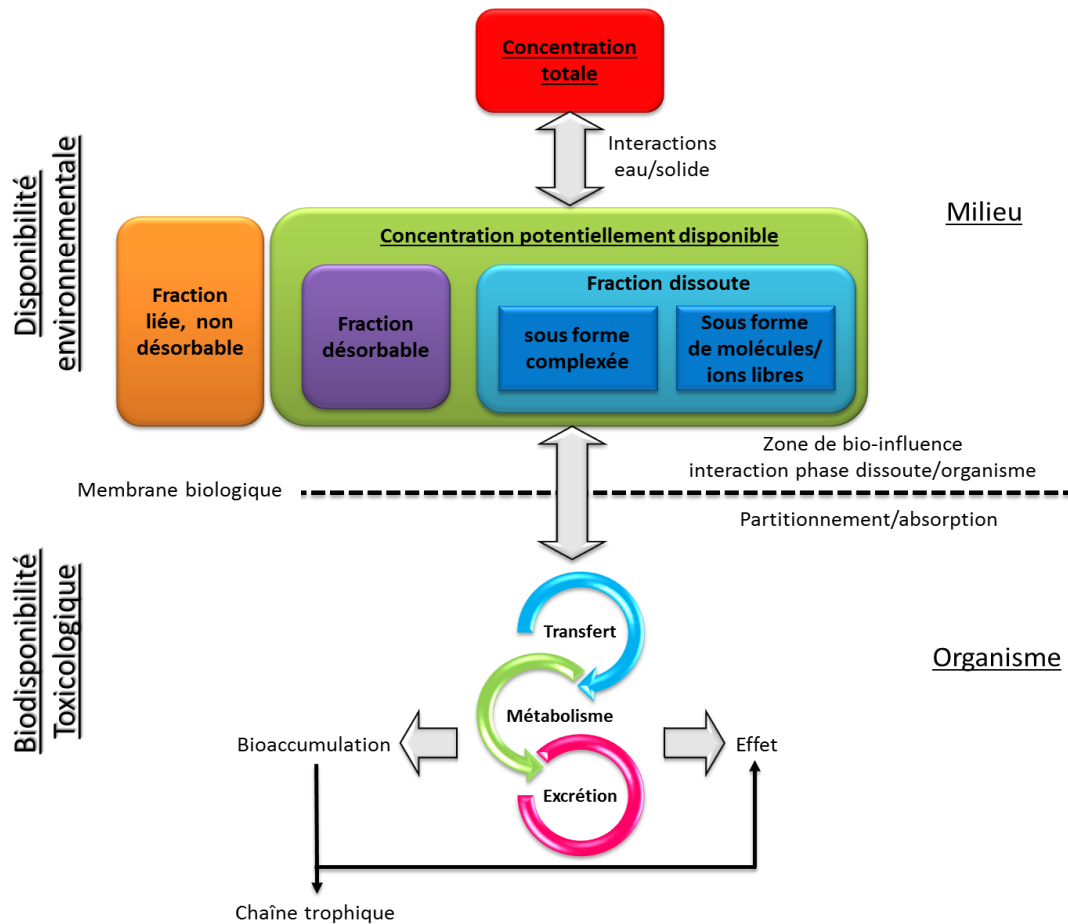


Figure 12 : Principe de la biodisponibilité (Harmsen, 2007).

La première étape correspond à la disponibilité du contaminant dans l'environnement. Ensuite vient la seconde phase qui est l'absorption du polluant par l'organisme. Finalement, la troisième étape correspond aux mécanismes que provoque le contaminant à l'intérieur de l'individu. (Harmsen, 2007). Lors de suivis environnementaux sur le milieu, la fraction bio-disponible est caractérisée comme la fraction désorbable et dissoute qui est accessible aux organismes (Seiler et al., 2008). Dans le cadre de l'approche EDA, il est primordial d'avoir à l'esprit ce concept et d'essayer de mimer au maximum lors de la préparation d'échantillon, les conditions présentes dans l'environnement afin de connaître les composés bio-disponibles. Sinon, il peut y avoir une surestimation du risque environnemental. Plusieurs études ont rapporté cette possibilité lors d'études sur des sédiments et ont montré que la présence de composés hydrophobes menait à l'observation d'une toxicité élevée, mais ces molécules n'étant pas bio-disponibles *in situ*, le danger environnemental était faible (Bandow et al., 2009b; Brack et al., 2009). Une alternative récemment proposée, pour prendre en considération cette notion est non plus de rechercher les composés dans la matrice environnementale à étudier mais de détecter directement dans les organismes exposés les molécules assimilées (Brack et Burgess, 2011; Eichbaum et al., 2013).

4.2.2 L'extraction

Dans un échantillon, la présence de différents éléments (*e.g.* minéraux, sels, pigments...) autres que les contaminants organiques à rechercher peuvent entraîner des problèmes analytiques aussi bien pour l'analyse chimique que biologique. Par conséquent, les composés organiques présents dans l'échantillon doivent être extraits de la matrice contenant les interférants. Le processus d'extraction des contaminants organiques doit être le plus exhaustif possible afin de représenter au mieux la contamination réelle de la matrice. L'extraction repose sur les propriétés physico-chimiques des composés et de la matrice étudiée. Elle se base généralement sur le principe de l'affinité molécules/substrat.

a. Les techniques conventionnelles

Les méthodes d'extraction appliquée sur les matrices solides (*e.g.* sédiments, boues de station d'épuration (STEP)...) ou bien liquides (*e.g.* eau de rivière, effluent de STEP, lixiviat...) sont nombreuses. Tout comme pour le choix des bio-essais lors de l'approche EDA, elles doivent être efficaces, rapides et peu coûteuses. Les extractions les plus appliquées dans la démarche EDA sont celles employées en routine dans les analyses chimiques.

Dans le cas de matrices solides, l'extraction de Soxhlet fait partie des techniques souvent utilisées (Otte et al., 2013). Cette méthode non automatisée possède quelques inconvénients. L'un des inconvénients non négligeable de cette méthode est la nécessité de porter l'extrait à haute température ce qui peut entraîner la dégradation des composés thermolabiles. L'utilisation d'une forte quantité de solvant peut poser un problème éthique sur le plan environnemental et rend cette technique coûteuse. Des méthodes pouvant être qualifiées de plus douce en terme de température et moins consommatrices en solvant sont utilisées dans l'approche EDA. L'extraction en phase liquide haute pression (*Pressurized Liquid Extraction*, PLE ; *Accelerated Solvent Extraction*, ASE[®]) est l'une des plus appliquées. Cette technique est reconnue pour être rapide et efficace. Généralement, elle est optimisée pour des familles de composés afin d'obtenir des bons rendements d'extraction. Creusot a montré qu'il était également possible de mettre en place une méthode d'extraction multi-classes (*i.e.* stéroïdes, composés pharmaceutiques, AKP, HAP, PCB, dioxine) permettant d'extraire de manière quasi-exhaustive des molécules aux propriétés physico-chimiques variées grâce à l'emploi de solvants de différentes polarités, du moins polaire comme l'hexane ou le cyclohexane, aux plus polaires comme le méthanol et l'éthanol. Les rendements obtenus lors des développements sont compris entre 68 % et 144 % (Creusot, 2011). De plus, cette technique est automatisée ce qui lui confère un avantage supplémentaire non négligeable et permet le traitement de plusieurs échantillons dans une même série. L'extraction par micro-ondes (*Microwave-Assisted Extraction*) possède également ces caractéristiques et est par conséquent retrouvée dans la bibliographie (Bartolomé et al., 2005; Schulze et al., 2012). Cette dernière peut également être appliquée sur la matière organique particulière lors de prélèvement de matrices liquides. Une autre méthode simple et peu coûteuse qui est employée dans la préparation d'échantillon pour l'approche EDA, est

l'extraction par sonication (Giltrap et al., 2009). Cependant, ces deux dernières techniques nécessitent une étape supplémentaire de filtration ou de centrifugation afin d'éliminer les résidus de matrices présents dans l'extrait.

Pour les matrices liquides et plus précisément la phase dissoute, l'extraction liquide/liquide est rarement rencontrée dans les approches EDA (Lukasewycz et Durhan, 1992). La méthode principalement utilisée dans la littérature est l'extraction sur phase solide (Lukasewycz et Durhan, 1992; Thomas et al., 2002b; Farré et Barceló, 2003). Ces méthodes font appel à une multitude de solvants d'extraction et l'utilisation en mélange permet de balayer toute la gamme de polarité. L'utilisation de différents solvants permet d'extraire une large gamme de composés aux propriétés physico-chimiques variées (*e.g.* composés pharmaceutiques, pesticides, stéroïdes, HAP...).

b. Les techniques accès sur la biodisponibilité

- L'extraction dirigée par la bio-accessibilité

Outre ces extractions conventionnelles, de plus en plus d'auteurs font appel à des méthodes liant l'extraction à la notion de biodisponibilité. Dans le cas de la préparation de sédiment, il est possible d'identifier deux types d'approches : les techniques se basant sur l'extraction de la fraction bio-accessible de l'échantillon (*Bioaccessibility-directed extraction*, BDE) comme l'extraction par cyclodextrines, TENAX[®] ou l'extraction par fluide supercritique ; et celles qui essayent de mimer les procédés de désorption pouvant se créer dans le système digestif des organismes (*e.g.* l'extraction avec des fluides biologiques ou biomimétiques) (Brack et Burgess, 2011). La majorité de ces méthodes ne sont pas actuellement employées comme techniques d'extraction dans la démarche EDA. Elles sont généralement trop coûteuses et ne permettent pas d'extraire une quantité suffisante d'échantillon pour effectuer toutes les étapes de l'approche. Seule la méthode d'extraction TENAX[®] est retrouvée associée à la démarche EDA (Schwab et al., 2009). Le TENAX[®] est un polymère poreux synthétisé à partir de l'oxyde de 2,6-diphényl-p-phénylène qui est utilisé pour piéger les composés hydrophobes facilement désorbables. La méthode est simple. Elle consiste à placer la résine en présence du sédiment à extraire et de l'eau ; le tout est mis à agiter pendant plusieurs heures (6 h à 30 h) (Cornelissen et al., 2001). La membrane est ensuite extraite par l'utilisation de solvant puis l'extrait est analysé. Schwab et Brack (2007) ont optimisé cette technique d'extraction afin de pouvoir extraire une plus grande quantité d'échantillon et ainsi l'appliquer à l'approche EDA. Mais cette méthode d'extraction reste relativement longue même après leur développement ; le temps d'exposition du polymère reste de 24 h. Schwab et al. (2009) ont montré l'utilité d'employer une telle technique pour mettre en évidence la présence de plusieurs HAP désorbables de leur matrice sédimentaire et par conséquent bio-disponibles pour les organismes benthiques. D'autres auteurs ont démontré que la fraction bio-accessible obtenue par cette technique d'extraction correspondait

à la fraction bio-accumulée par les organismes benthiques (*e.g.* Oligochaete) (Ten Hulscher et al., 2003).

- L'extraction basée sur le partitionnement

Une autre approche prend en compte ces phénomènes, l'extraction basée sur le partitionnement (*Partition-Based Extraction*, PBE). La PBE se base sur le piégeage passif des molécules dissoutes libres qui circulent entre les différents compartiments. Pour permettre la mise en place d'une telle extraction, des dispositifs d'échantillonnage passif ont été développés par la communauté scientifique pour des études autres que celles utilisant l'approche EDA. Le principe repose sur le transfert de composés du milieu vers la phase réceptrice (*i.e.* le transfert de masse). La phase réceptrice peut être sous forme de solvant, réactif chimique ou phase adsorbante poreuse (Namieśnik et al., 2005). La méthode par microextraction en phase solide (*Solid Phase MicroExtraction*, SPME) peut être considérée comme une technique d'échantillonnage passif puisqu'elle repose sur l'équilibre de diffusion entre la matrice environnementale et la fibre d'extraction (Lord et Pawliszyn, 2000). Cette méthode, rapide et ne demandant pas de solvant, permet de renseigner sur la présence de composés potentiellement bio-accumulables (Bakker et al., 2007). La diversité des fibres disponibles dans le commerce permet d'extraire une large gamme de composés. Un de ces atouts réside dans le fait que l'échantillonnage peut être pratiqué en simultané avec une exposition des organismes (You et al., 2011). Actuellement aucune étude n'a référencé le couplage SPME et approche EDA. Néanmoins, Bakker et al., (2007) précisent son utilité en tant que méthode complémentaire à l'approche EDA pour fournir des informations sur la réponse biologique de la matrice mais aussi pour quantifier les molécules potentiellement bioaccumulables.


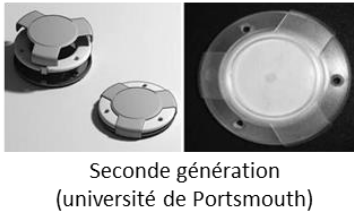
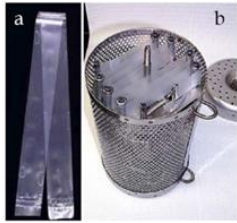

Aujourd'hui, la diversité des techniques d'échantillonnage est telle qu'elle permet de balayer une large gamme de polarité et donc de cibler différentes familles de composés (Tableau 5). La multitude d'échantillonneurs passifs permettent appliquer ces techniques pour extraire les composés dans des matrices aqueuses ou au contact du sédiment au niveau de l'eau interstitielle contenue dans la matrice solide (*e.g.* SPMD). Ces dispositifs peuvent être directement déployés sur le terrain et échantillonnent par conséquent le milieu. Suivant le type d'échantillonneur utilisé, le temps de séjour sur le terrain peut varier de quelques minutes à plusieurs mois (Vrana et al., 2005). Les avantages de ce type de méthodes quel que soit le type d'échantillonneur sont nombreux.

L'échantillonnage passif simplifie les étapes de préparation. Lors des déploiements sur le terrain, il reste exposé durant une période de temps relativement longue intégrant par conséquent de manière continue la concentration dans le milieu qui peut être affectée par les conditions environnementales (Belles, 2012; Wund, 2013). En moyennant la concentration (*Time Weigh Average*, TWA), certains de ces dispositifs sont qualifiés d'intégratif (*e.g.* POCIS). Le temps d'exposition permet également d'accumuler des composés et donc de

pouvoir par la suite détecter des molécules à l'état de traces qui seraient non détectables par l'échantillonnage ponctuel. L'intérêt est que certaines molécules peuvent entraîner une réponse biologique à des concentrations extrêmement basses qui sont en-deçà des limites de détection obtenues par les méthodes classiques ; l'échantillonnage passif permet de pouvoir détecter ces composés actifs.

L'autre intérêt de ces dispositifs est qu'ils miment la biodisponibilité des contaminants. Ils ont été conçu pour imiter le transfert à travers la membrane biologique et donc la bioaccumulation de composés dans les tissus. Les SPMD sont constitués de lipides, la trioléine, piégés entre deux membranes en polyéthylène de faible densité (*Low Density PolyEthylene*, LDPE ; Figure 13). Des pores transitoires d'une taille inférieure à 10 Å sont créés par les mouvements thermiques existant au sein des membranes en polymère. Ces cavités permettent la circulation de molécules de poids moléculaire inférieur ou égal à 600 Da (Huckins and Alvarez, 2004). Ces caractéristiques ont été développées afin de mimer les membranes de phospholipides de l'épithéliale branchial chez le poisson ce qui confère à cet échantillonneur passif la capacité de capter seulement les molécules hydrophobes bio-disponibles, rendant ce dispositif intéressant pour le couplage avec l'approche EDA (Sabaliūnas et al., 1999; Lu and Wang, 2003; Rastall et al., 2006). D'autres échantillonneurs passifs tels que les POCIS possèdent également des membranes qui servent de barrières physiques pour limiter le transfert de macromolécules mais ne permettent pas une sélection de taille aussi drastique afin d'imiter les barrières biologiques.

Tableau 5 : Liste non exhaustive d'échantillonneurs passifs (Vrana et al., 2005; Hilscherová, 2014).

<i>Type</i>	POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Samplers)	Chemcatcher®	SPMD (Semi-permeable Membrane Device)	MESCO (Membrane-Enclosed Sorptive Coating)
<i>Apparence</i>				
<i>Description</i>	Phase absorbante piégée entre deux membranes en polyéthersulfone (PES) tenues par des disques en acier inoxydable	Support en polytétrafluoroéthylène (PTFE) inerte contenant une phase réceptrice solide (disque Empore®) associée ou non à une membrane de diffusion	Membrane semi-perméable en polyéthylène faible densité (LDPE) contenant de la trioléine (lipide)	Sac en cellulose régénéré contenant un barreau en polydiméthylsiloxane (PDMS) ou en polyéthylène faible densité (LDPE)
<i>Molécules échantillonnées</i>	Composés organiques hydrophiles (log Kow < 3)	Composés organiques polaires et apolaires (dépendant du type de disque Empore® choisi)	Composés organiques hydrophobes, semi-volatils (log Kow > 3)	Composés organiques polaires et non polaires (log Kow > 3)

Cependant, ces échantillonneurs restent des outils intégratifs et pertinents pour l'échantillonnage de la phase dissoute et de récentes études montrent que son couplage avec l'approche EDA est un outil prometteur pour la détection de polluant émergent dans les milieux aquatiques (Creusot et al., 2014; Liscio et al., 2014).

Une autre approche semblable à la PBE est le dosage basé sur le partitionnement (*Partition Based-Dosing*, PBD). Comme pour la PBE, cette méthode tient compte de l'équilibre existant entre les différents compartiments. L'extraction consiste, dans ce cas à travailler, directement sur les organismes vivants en les exposant à une membrane ayant absorbée les composés de la matrice à étudier (*e.g.* SPMD, LDPE...) (Bandow et al., 2009a). Cette méthode est employée pour identifier des composés toxiques. Son couplage avec l'approche EDA pour étudier des échantillons de sédiments, a permis de mettre en évidence la toxicité, sur des algues vertes *Scenedesmus vacuolatus*, de différents composés comme les HAP qui était déjà connue mais aussi, de molécules de synthèse présentes dans les produits de soins corporels comme le triclosan et l'hexadécanol (Bandow et al., 2009b).

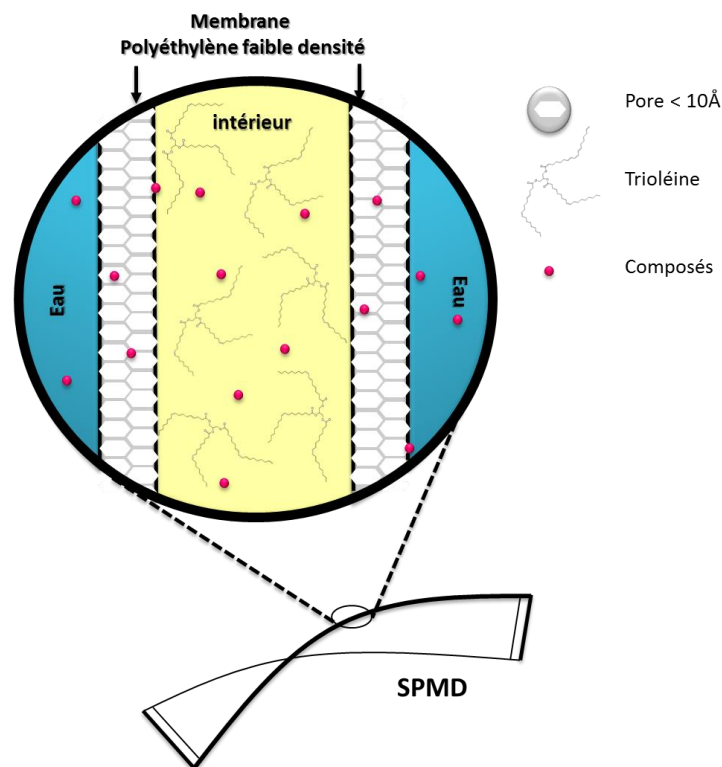


Figure 13 : Conception d'un échantillonneur passif de type SPMD (*Semi-permeable Membrane Device*) (Huckins et Alvarez, 2004).

4.2.3 Le fractionnement

Le fractionnement de l'échantillon est l'essence même de l'approche EDA. C'est l'étape sur laquelle est fondée la démarche. L'idée est de séparer les composés présents dans la matrice environnementale généralement très complexe afin de sélectionner seulement les molécules entraînant une réponse biologique. L'extraction de l'échantillon peut être déjà considérée comme la première étape de fractionnement (Brack et al., 2011a) En effet, elle permet comme énoncé précédemment de séparer les composés présents des autres éléments pouvant interférer durant les tests biologiques et les analyses chimiques (*e.g.* acide humique, pigments, lipides...). Tout comme lors de l'étape d'extraction, le fractionnement se doit d'être le plus exhaustif possible, c'est-à-dire que le processus de fractionnement doit être optimisé afin qu'il y est le minimum de pertes en composés. Il ne doit pas non plus apporter de composés supplémentaires susceptibles d'entraîner une réponse biologique. Généralement afin de vérifier l'absence de contamination, des blancs de procédure sont effectués en parallèle de la préparation de l'échantillon (Bakker et al., 2007; Weller, 2012). Le fractionnement consiste à séparer des composés, en se basant sur les interactions non-spécifiques liées à la force de Van der Waals (*i.e.* force électromagnétique de faible intensité s'exerçant entre les atomes ou les molécules) et les interactions spécifiques résultant de structures moléculaires particulières (Brack et al., 2011b). Le fractionnement fait appel à la chromatographie et la plus rencontrée est celle en phase liquide. Il existe une grande diversité de procédures de fractionnement (Tableau 1, p22). Cette multitude de techniques permet d'appréhender des natures de matrices environnementales variées qui renferment des composés aux propriétés physico-chimiques diverses. En plus du fractionnement par chromatographie d'exclusion stérique, il est possible de distinguer grossièrement de type de fractionnement. Le fractionnement en phase normale (NP, *e.g.* cyanopropyle, silice...) est adapté aux molécules apolaires, plutôt hydrophobes, se retrouvant préférentiellement dans les matrices solides (*e.g.* sédiment, boue...). Alors que le fractionnement en phase inverse (RP) est plus approprié aux composés plus polaires, hydrophiles, se localisant, dans la phase dissoute.

Le Tableau 1 (p22) illustre le fait qu'il n'existe pas une méthodologie universelle et montre que le fractionnement suivant les études peut être plus ou moins poussé. Dans la littérature, de nombreux auteurs ont choisi de réaliser plusieurs processus de fractionnement. Après chaque étape de séparation, le profil biologique de l'ensemble des fractions est établi. Il est ainsi fréquent de combiner plusieurs méthodologies de fractionnement. Par exemple, Brack *et al* couplent dans différentes études, le fractionnement en phase solide sur colonne d'alumine, la chromatographie en phase liquide en phase normale puis la chromatographie en phase inverse et peuvent ajouter la chromatographie d'exclusion stérique (Brack et al., 2003; Brack et Schirmer, 2003). Ce type de démarche permettant de séparer très finement l'extrait est fastidieux et entraîne inévitablement la perte de molécules et potentiellement

d'informations sur d'éventuels effets de mélange. Afin de rendre le fractionnement multiple plus rapide, une méthode automatisée en phase normale a été développée (Lübcke-von Varel et al., 2008). Cette méthode a été appliquée avec succès dans différentes études pour l'identification de composés apolaires dans des matrices sédimentaires (Kaisarevic et al., 2009; Lübcke-von Varel et al., 2012). Le fractionnement par chromatographie en phase gazeuse a également été développé mais son application est moins courante. Son principe est simple : les composés séparés et sortant de la colonne chromatographique sont piégés dans un solvant à basse température (*e.g.* dichlorométhane, -10°C) (Meinert et al., 2007; Meinert et al., 2010). Cette technique nécessite de disposer de système de refroidissement sophistiqué. Meinert *et al.* ont utilisé ce type de fractionnement en complément d'un fractionnement en phase liquide qui n'était pas assez séparatif pour identifier des composés mutagènes dans des eaux souterraines (Meinert et al., 2010). Récemment, Pieke et al., (2013) ont développé un autre type de fractionnement par chromatographie en phase gazeuse quasiment automatisé. Le système consiste à injecter en sortie de colonne chromatographique, après avoir préalablement refroidi le capillaire, un solvant afin de solubiliser les composés volatils puis de collecter l'éluat. Les fractions sont directement déposées dans des plaques 96 puits pour réaliser les tests biologiques (test DR-LUC), juste après la fin du fractionnement. Lorsque les fractions ont été collectées, elles sont évaporées et les cellules sont ajoutées en suivant dans les puits. Le temps de rétention permet de remonter directement aux composés présents dans les fractions actives. Cette technique a été appliquée avec succès sur des molécules étalons tels que les HAP et sur un échantillon de référence certifié contaminé en HAP. L'un des inconvénients non négligeable de ce fractionnement en phase gazeuse est la faible quantité d'échantillon introduite dans le système, nécessitant donc la répétition des injections. L'autre difficulté réside dans le solvant utilisé en sortie de colonne (Pieke et al., 2013). Ce dernier ne doit pas s'évaporer trop rapidement et doit être compatible les tests biologiques effectués en aval. Cette méthode ouvre des nouvelles perspectives en termes de fractionnement mais son efficacité reste à démontrer sur d'autres échantillons environnementaux.

Quelle que soit la méthode de fractionnement employée, la collecte de fractions peut s'effectuer de manière manuelle ou automatique. Bien évidemment, les techniques automatiques rendent cette étape moins fastidieuse et contraignante. Les développements actuels sont donc tournés vers l'automatisation totale de cette étape de fractionnement qui englobe la séparation des composés, l'évaluation de la réponse biologique des fractions et l'identification. Les efforts de recherche sont ciblés sur le développement de méthodes rapides et efficaces, adaptées à l'échantillon afin d'éviter la perte de molécules par les procédés de préparation.

4.3 Les outils d'identification moléculaire

4.3.1 Généralités

Après avoir déterminé les fractions ayant un impact biologique, il convient d'identifier les molécules responsables des effets observés. Cette étape est l'un des défis de l'approche EDA et nécessite de disposer de techniques analytiques performantes. Depuis sa création à la fin des années 1800, la spectrométrie de masse a changé considérablement la façon d'appréhender la chimie analytique. Cette méthode permet à la fois de connaître la masse moléculaire d'un composé et d'avoir des informations sur sa structure par le biais de sa fragmentation. Grâce à sa sélectivité, sensibilité et sa capacité d'identification moléculaire, la spectrométrie de masse permet de détecter des composés en concentration faible dans des matrices environnementales complexes (Dévier et al., 2011). D'autres moyens de détection peuvent être rencontrés comme la détection à capture d'électrons spécifique des composés halogénés (*e.g.* pesticides organochlorés, polychlorobisphényles...) ou encore la détection optique, fluorescente, mais ces instruments sont spécifiques et certains moins sensibles que la spectrométrie de masse. Le couplage de cette dernière avec des outils de séparation moléculaire telles que la chromatographie en phase gazeuse (GC) ou en phase liquide (LC) a permis le criblage d'une large variété de molécules aux propriétés physico-chimiques diverses. La chromatographie en phase liquide est utilisée pour la séparation de composés plutôt polaires alors que la chromatographie en phase gazeuse est adaptée pour la séparation de molécules volatiles apolaires (Meyer, 2010). Il est même possible de mettre en série plusieurs procédés de séparation (*e.g.* GCxGC, LCxLC) afin d'augmenter le pouvoir résolutif et par conséquent l'identification (Leonards et al., 2011). De plus, les développements effectués sur les sources d'ionisation des composés permettent aujourd'hui de disposer d'un nombre important de méthodes (*e.g.* impact électronique, IE ; désorption-ionisation laser assistée par matrice, MALDI ; ionisation par nébuliseur, ESI ; ionisation chimique à pression atmosphérique, APCI...). Tous ces outils offrent un large choix d'association et permettent ainsi d'appréhender au mieux la diversité des molécules présentes dans les échantillons.

La démarche d'identification moléculaire est selon Krauss et al., (2010) divisible en trois catégories (i) l'analyse de composés connus par une recherche ciblée (ii) la recherche de molécules non connues mais dont la présence est suspectée (iii) la recherche de composés inconnus. Néanmoins les deux dernières classes peuvent être regroupées au sein d'un même thème, l'analyse chimique non-ciblée (Figure 14).

4.3.2 Les analyses ciblées

L'analyse ciblée est une méthode de référence utilisée dans la surveillance du milieu. Elle a pour but d'aller rechercher des composés connus, pré-sélectionnés dans les échantillons et permet de les quantifier (Figure 14). Elle se base sur des développements analytiques effectués par l'utilisation de composés étalons achetés dans le commerce. Ainsi, ce type d'analyse est optimisé et est spécifique à une famille de composés (*e.g.* composés

pharmaceutique, (Togola et Budzinski, 2008). Cette analyse fait généralement appel à la spectrométrie de masse simple ou en tandem qui font partie des méthodes de détection les plus sensibles. La spectrométrie de masse simple consiste à rechercher les molécules en se basant sur leur masse et leur temps de rétention obtenus par chromatographie. De par sa faible résolution, la sélection de molécule ne peut pas seulement s'effectuer par la masse et l'ajout du temps de rétention ne suffit pas systématiquement pour confirmer l'identification. Par conséquent, cette technique peut générer des identifications fausses (Krauss et al., 2010). Les techniques de spectrométrie de masse en tandem permettent de rajouter un point de contrôle au processus d'identification. La configuration la plus rencontrée est l'utilisation d'un spectromètre de masse triple quadripôle (QqQ) (Leonards et al., 2011). Le principe est simple, le premier quadripôle sélectionne l'ion précurseur, le quadripôle intermédiaire fragmente l'ion sélectionné et le dernier quadripôle filtre par la masse de l'ion fragment. Cette technique appelée « *Multiple Reaction Monitoring* » (MRM) ou « *Selected Reaction Monitoring* » (SRM) permet ainsi d'ajouter l'étape de fragmentation qui augmente l'exactitude de l'identification. Dans le cadre de l'approche EDA, l'analyse ciblée est surtout utilisée pour sa sensibilité et permet d'obtenir l'identification et la quantification rapide de composés connus.

4.3.3 Les analyses non ciblées

L'analyse non ciblée représente un challenge dans l'identification moléculaire. Elle permet de rechercher des composés connus mais leur atout réside dans la possibilité d'identifier des molécules non recherchées ou inconnues (Figure 14). La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) est la technique la plus rencontrée pour l'identification de composés organiques non polaires dans la démarche EDA (Legler et al., 2011; Creusot et al., 2013; Regueiro et al., 2013). Elle est souvent combinée avec une source de type IE qui permet par l'énergie cinétique des électrons émis d'arracher un électron à la molécule présente formant ainsi un ion radicalaire ($M^{\cdot+}$) pouvant être instable et ayant la possibilité de se fragmenter (Mc Lafferty, 1980). Cette méthode permet d'obtenir des informations structurales sur le composé injecté. L'attrait existant pour la GC/MS est lié à sa facilité d'utilisation grâce à la disponibilité de bases de données spectrales (e.g. Wiley, NIST, QPID, EMPOMASS) contenant plus d'une centaine de milliers de composés simplifiant ainsi le processus d'identification (www.nist.gov). De plus, l'existence de programmes complémentaires automatisés en libre-service (*Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*, AMDIS, MOLGEN) permettant d'aider à l'identification en générant la structure des molécules par des algorithmes ou en réalisant la déconvolution des spectres et permettant d'interroger les bases de données ont rajouté un intérêt à l'utilisation de la GC/MS pour l'identification de molécules (Stein, 1999; Kerber et al., 2004). Comme cette méthode est également reproductible, il est possible de disposer de banques de fragmentation aidant à l'interprétation manuelle des spectres obtenus (Mc Lafferty, 1980; Hites, 1990). Cependant, l'analyse par GC/MS simple quadripôle reste une technique de faible résolution et adaptée à un certain type de composés. Des outils plus résolutifs sont également utilisés dans

l'identification moléculaire. Ces techniques basées sur la haute résolution tel que l'analyseur à temps de vol (TOF) permettent de déterminer avec une grande précision la masse des composés détectés et d'établir ainsi leur formule moléculaire. Ce type d'instrument qui possède uniquement qu'un seul analyseur et ne permettent pas la fragmentation, n'offrent pas vraiment la possibilité d'accéder à la structure moléculaire.

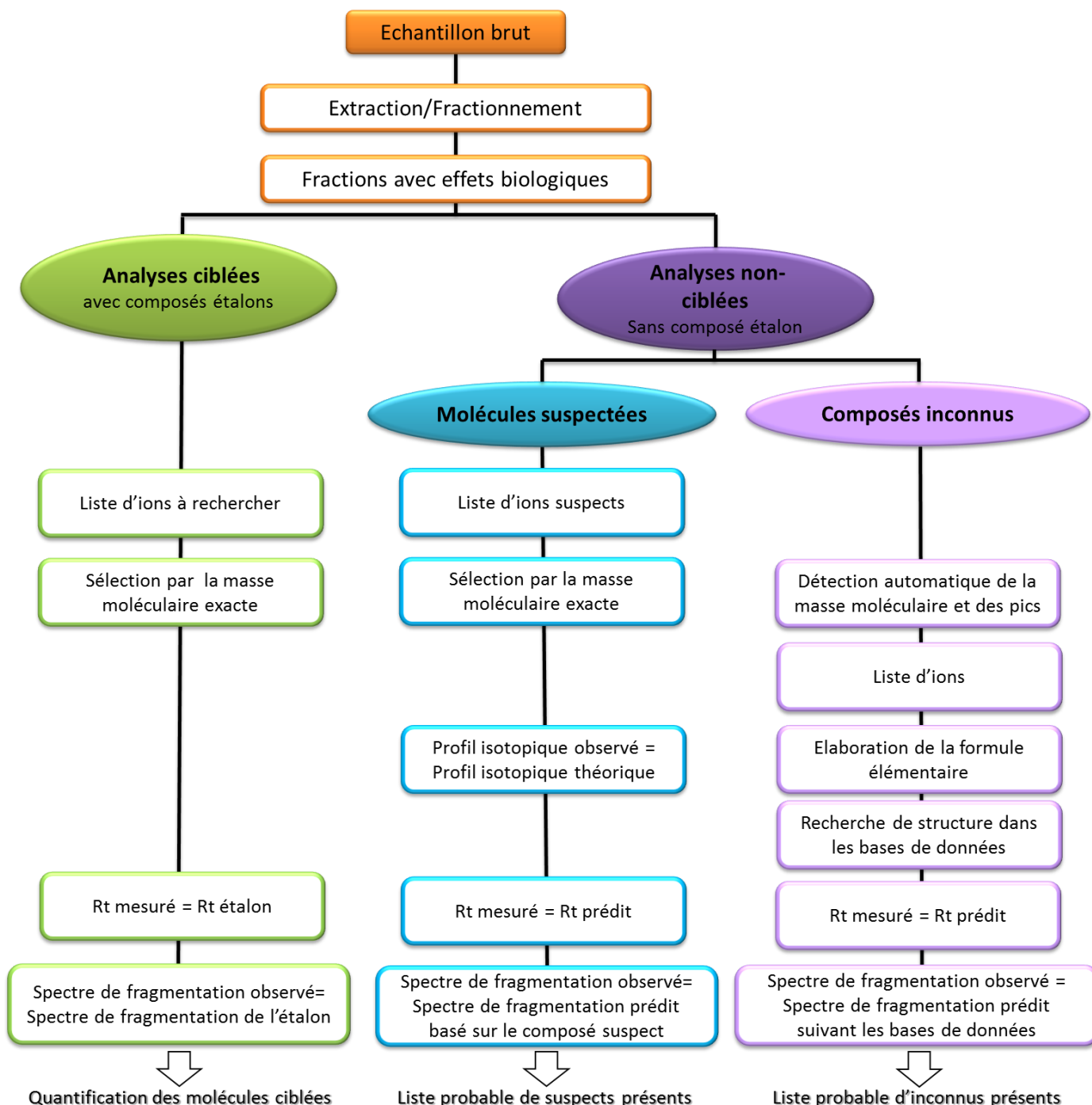


Figure 14 : Diagramme des procédures d'identification moléculaire disponibles pour analyser les échantillons environnementaux (Krauss et al., 2010).

Quelques informations de fragmentation peuvent être obtenues seulement au niveau de la source. Sur les systèmes de spectromètre de masse en tandem (*e.g.* le triple quadripôle, QqQ ; le piège ionique quadripolaire, IT) une fragmentation est réalisable dans la cellule de collision (CID) offrant ainsi une identification plus précise (Petrovic et al., 2010). Néanmoins, ces techniques ne permettent pas d'accéder à la masse exacte de la molécule empêchant par conséquent une identification certaine. Le développement d'analyseurs hybrides (*e.g.* QqTOF...) couplant les techniques de haute précision en masse à la fragmentation (*e.g.* CID) a permis de donner un nouvel essor à l'identification de composés. Différents instruments hybrides sont actuellement disponibles et leurs caractéristiques sont résumées Tableau 6. Tous ces outils sont à la base du processus d'identification. Néanmoins l'acquisition de données à elle seule ne suffit pas pour réaliser une élucidation complète des molécules présentes. Il est essentiel de disposer d'une démarche d'identification robuste s'appuyant sur des bases de données et/ou des algorithmes mathématiques capables de déconvoluer les spectres obtenus (Kind et Fiehn, 2010; Schymanski et al., 2011). Avec l'arrivée de ces nouvelles techniques analytiques hybrides, des bases de données partagées sont aujourd'hui disponibles et alimentées continuellement. En parallèle, avec les bases de données payantes ou demandant un enregistrement (*e.g.* Forensics...), des banques de données sont consultables librement en ligne (*e.g.* Metlin, Massbank...) (Horai et al., 2010).

Tableau 6 : Comparaison de différents spectromètres de masse (Krauss et al., 2010; Holčapek et al., 2012).

Spectromètre de masse^a	Résolution (FWHM) [$\times 10^3$]	Précision en masse (ppm)	Gamme dynamique	Sensibilité^b (masse absolue)
Q	3-5	Faible	10^5 - 10^6	Femto- au picogramme
IT	4-20	Faible	10^4 - 10^5	Femto- au picogramme
TOF	10-60	1-5	10^4 - 10^5	Femto- au picogramme
Orbitrap	100-240	1-3	5×10^3	Femto- au picogramme
ICR	750-2500	0,3-1	10^4	Picogramme

Quadripôle (Q), Piège ionique quadripolaire (IT), Temps de vol (TOF), Résonance cyclotronique d'ion (ICR)

^a TOF, Orbitrap et ICR, les terminaisons inclues les systèmes hybrides

^b la sensibilité dépend fortement de la source d'ionisation

La base de données *Mass Bank* fait partie de ces banques de données interactives. Initialement créée par la communauté scientifique japonaise (Horai et al., 2010; www.massbank.jp), elle s'est aujourd'hui élargie à l'Europe et est complétée activement par le consortium Norman (www.massbank.eu). Outre les bases de données, des logiciels prédictifs de fragmentation se basant sur la structure moléculaire des composés et des algorithmes sont également disponibles gratuitement (*e.g.* MetFrag). Enfin, différentes stratégies en lien avec les propriétés physico-chimiques des molécules sont apparues dans la

littérature pour permettre d'affiner la liste des composés et faciliter l'identification (*e.g.* Log KOW, temps de rétention...) (Shymanski et al., 2008; Schymanski et al. 2009; Schymanski et al., 2011).

Malgré le développement de nombreux instruments et d'outils informatiques aidant à l'interprétation, l'identification de molécules reste encore une étape difficile. Le défi actuel est donc de continuer à rechercher des stratégies et des moyens pour faciliter cette phase de caractérisation moléculaire.

4.4 L'étape de confirmation

4.4.1 La confirmation de l'identification chimique

Lorsque la liste des composés suspectés présents a été établie lors de l'étape précédente, il est primordial de confirmer l'identification des molécules détectées. Pour cela, il est indispensable de se procurer le composé étalon afin de l'analyser dans les mêmes conditions que le composé détecté dans les fractions. Différents fournisseurs existent ; néanmoins, la disponibilité des molécules à l'achat n'est pas systématique. Il peut alors être envisagé de les faire synthétiser. Des techniques puissantes sont utilisables pour caractériser la structure des composés dont la résonance magnétique nucléaire (RMN). Son emploi dans l'approche EDA a été référencé par Shiozawa et al. (2000) qui ont pu, grâce à l'identification structurale du 2-phénylbenzotriazole présent dans des extraits échantillonneurs passifs déployés dans une rivière, synthétiser ce composé et montrer son effet mutagène. Cependant, cette technique n'est que très rarement employée. Sa faible sensibilité empêche la détection de molécules faiblement concentrées. De plus, la complexité des échantillons environnementaux même après l'étape fractionnement rend la détection difficile et les données acquises sont généralement inexploitable par manque de purification (Brack et al., 2008).

4.4.2 La confirmation biologique

Dès que l'identification des composés est confirmée, l'impact biologique de ces derniers reste à évaluer. Cette étape est à effectuer sur les tests biologiques employés lors de l'étape de caractérisation de l'effet. Une première élimination des molécules non actives peut être effectuée par l'utilisation de modèles prédictifs renseignant sur le possible impact biologique. Ces outils se basent sur la structure du composés afin de prédire l'effet potentiel (*e.g.* *Quantitative Structure-Activity Relationships*, QSAR ; ToxPredict) (Hardy et al., 2010). Des modèles orientés vers les perturbateurs endocriniens ont récemment été créés. Disponibles sur le net, en libre-service, ils proposent de modéliser l'interaction protéine-ligands donnant ainsi des informations sur l'affinité possible de la molécule avec le récepteur (Pons et Labesse, 2009; www.atome2.cbc.cnrs.fr). La confirmation de la réponse biologique *in silico* représente un moyen peu coûteux pour éliminer les composés sans effet. La confirmation sur les bio-essais consiste simplement à exposer les modèles biologiques à la

molécule candidate. Il est important de garder à l'esprit la représentativité à l'échelle environnementale de l'effet potentiellement mesuré. En effet, comme il a été illustré précédemment (Figure 10, §4.1, p 33), la réponse biologique observée à un niveau organisationnel n'a pas forcément d'impact sur l'échelle supérieure et *vice versa*. La confirmation biologique (*i.e.* la validation de l'effet d'un composé sur le bio-essais utilisé) doit être extrapolée au niveau populationnel et de l'écosystème, afin de conclure à un réel impact biologique dans le milieu. Par conséquent, une molécule entraînant une réponse biologique *in vitro* doit d'être testée *in vivo*, nécessitant ainsi une étape de confirmation supplémentaire. Brack et al., (2008) citent l'existence d'un concept rarement utilisé mais néanmoins intéressant basé sur la confirmation d'un impact biologique à l'échelle populationnelle : la tolérance des communautés à la contamination (*Pollution-Induced Community Tolerance*, PICT). L'idée est la comparaison à l'échelle communautaire du métabolisme général de l'ensemble des individus (*e.g.* l'inhibition de la photosynthèse) exposés ou non à un composé. La molécule est considérée comme ayant un impact lorsque la mesure est différente entre les populations. Cependant, ce test ne peut être appliqué que sur des populations d'individus ayant des cycles longs et trouve rapidement des limites si les organismes développent une tolérance aux composés (Brack et al., 2008).

5 Les limites actuelles de l'approche

Bien que de nombreuses études aient montré l'efficacité de l'approche EDA pour l'identification de contaminants, comme pour toute méthode, il existe certaines limites. Cette démarche pluridisciplinaire nécessite plusieurs étapes afin de simplifier et séparer les molécules ayant un effet biologique. Cette multitude de phases rend l'approche EDA relativement longue, fastidieuse et très coûteuse (Blasco et Picó, 2009). Cette méthode n'est donc pas, à l'heure actuelle, adaptée à un criblage à haut débit de plusieurs échantillons mais plutôt pour comprendre les mécanismes sous-jacents de contamination sur des sites environnementaux sélectionnés. Les outils biologiques actuellement utilisés ne permettent pas à l'approche EDA d'être totalement pertinente sur le plan environnemental. Néanmoins, le développement d'outils biologiques basés sur l'étude des communautés permet à la démarche d'élargir son domaine de pertinence tout en conservant une facilité d'interprétation des résultats importante (Figure 15, Brack et al., 2007)

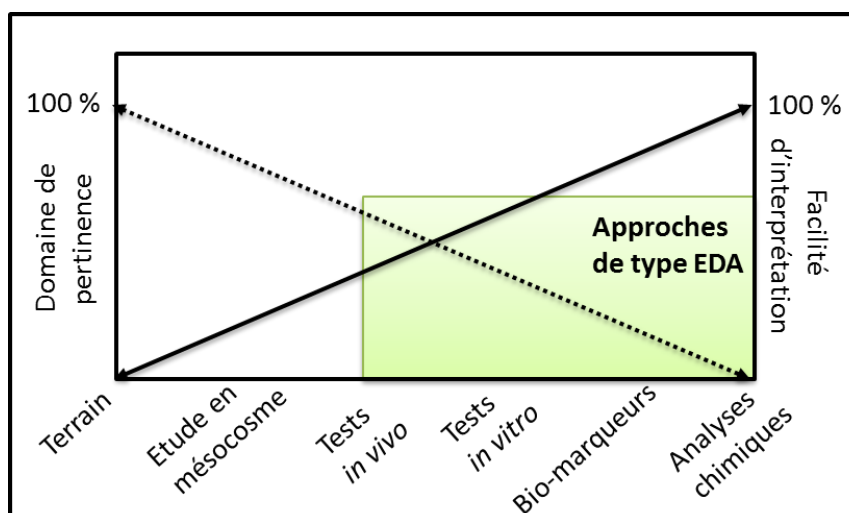


Figure 15 : Schéma de la Croix montrant une corrélation inversée entre la facilité d'interprétation des données et la pertinence environnementale avec le positionnement de l'approche EDA (Brack et al., 2007).

La présence de plusieurs étapes successives pour effectuer la démarche dans sa globalité, ne permet pas *in fine* de représenter de façon exhaustive tous les composés présents dans le milieu (*e.g.* spécificité des cibles biologiques, sélection par l'étape d'extraction). Outre ces éléments, le verrou actuel le plus important est l'identification et la confirmation des molécules biologiquement actives inconnues (Hecker et Hollert, 2009). Les techniques d'analyse de type haute résolution représentent l'avenir de l'identification de composés présent, seulement leur récent développement ne permet pas encore de disposer d'un nombre élevé d'informations pour identifier efficacement tous les composés détectés. De plus, même si la présence d'une molécule a été établie, sa confirmation n'est pas toujours réalisable par manque de composé étalon.

L'approche EDA demande de posséder des moyens biologiques et chimiques puissants. Les techniques en chimie analytique sont des dispositifs au coût élevé qui demandent donc de disposer de financement de travaux de recherche relativement important. Les exigences méthodologiques nécessitent le plus souvent la création de partenariats entre écotoxicologues et chimistes (Brack, 2003). Actuellement, contrairement à l'approche TIE, la démarche EDA ne possède pas de stratégie normalisée. Cette absence de standardisation peut décrédibiliser l'approche et par conséquent limiter son utilisation. Malgré ces limites, à notre connaissance, l'approche EDA représente la seule méthode aujourd'hui disponible pour permettre d'identifier des composés à priori inconnus ayant une réponse biologique et d'établir un lien direct de cause à effet (Brack, 2003; Chapman et Hollert, 2006).

*Les objectifs des travaux
de thèse*

Les objectifs des travaux de thèse

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans la problématique environnementale actuelle qui vise à restaurer et à préserver les écosystèmes aquatiques. La DCE a imposé pour l'année 2015 l'objectif général, à l'échelle européenne, « d'atteindre un bon état écologique des différents milieux aquatiques » (www.eaufrance.fr). L'échéance pour la réalisation de cet objectif demandant un travail colossal, a été reportée à 2027. Cependant, pour les sites où le niveau écologique souhaité n'est pas atteint, le développement de méthodes permettant de comprendre les causes sous-jacentes sont indispensables. C'est dans cette optique que les objectifs de ces travaux de thèse ont été définis.

Le but général de ce travail est la mise en place d'une approche bio-analytique de type EDA. La revue bibliographique exposée dans les chapitres précédents, souligne différents éléments :

- Les techniques utilisées en routine pour la surveillance des écosystèmes aquatiques ne permettent pas d'appréhender le lien direct entre molécules présentes et effets biologiques observés. Ces méthodes sont basées sur une sélection de composés définis par les réglementations, ignorant ainsi la présence de molécules non recherchées ou inconnues pouvant avoir un impact biologique.

- Afin de compléter les moyens actuellement disponibles, des approches plus adaptées pour évaluer le danger existant ont récemment été développées, les approches bio-analytiques. L'une des plus prometteuses est la démarche EDA inspirée de l'approche TIE. Cette méthode couplant la chimie à la biologie consiste en une succession d'étapes permettant la simplification de l'échantillon pour séparer puis identifier les composés entraînant une réponse biologique. Cette approche a été développée en Europe ; son utilisation en France est très récente.

- L'approche EDA s'appuie sur de nombreux procédés allant des modèles biologiques *in vitro* et *in vivo* aux techniques chimiques de préparation d'échantillons et d'identification moléculaire. Cette méthode a permis d'identifier plusieurs molécules actives dans différentes matrices. Néanmoins, le succès d'une telle approche est freiné par différents éléments en lien avec les techniques employées, notamment les bio-essais, la préparation des échantillons, la caractérisation et la confirmation des composés présents.

Dans ce contexte, plusieurs objectifs de travaux ont pu être établis :

1. Le premier objectif a consisté à développer et valider une méthodologie, la plus exhaustive possible basée sur la réponse biologique, pour limiter au maximum les pertes de composés actifs, durant la réalisation de l'approche. L'optimisation a été effectuée sur les étapes de préparation de l'échantillon de l'approche EDA, c'est-à-dire sur l'extraction et le fractionnement. L'étape d'extraction sur matrices solides ayant été développée lors de précédents travaux (Creusot, 2011), l'extraction s'est ici focalisée sur les matrices liquides. L'étape de fractionnement a quant à elle été développée par chromatographie en phase liquide à la fois en mode inverse et en mode normal pour être adaptée à différents types d'échantillons.

2. Le second objectif a été de mettre en place une stratégie d'identification moléculaire efficace. Comme il est observé dans la littérature, ce point est l'un des principaux challenges dans l'approche EDA. L'acquisition d'instruments de haute résolution par le laboratoire au début de ces travaux de thèse a permis le développement d'une méthodologie d'identification pour caractériser les molécules détectées.

3. Suite à la validation des différentes étapes de l'approche EDA, mises en place durant ces travaux de thèse, la démarche a été appliquée à diverses matrices environnementales reflétant les différents compartiments de l'écosystème aquatique. Le but de telles applications est la détection de molécules non recherchées en routine ou inconnues pouvant expliquer les effets biologiques observés sur les échantillons sélectionnés. La démarche EDA a été utilisée sur différentes sources d'introduction de polluants dans l'environnement (*e.g.* sources urbaines, agricoles et industrielles). L'intérêt est qu'une meilleure compréhension des sources peut aider à terme à l'implantation éventuelle de mesures correctives. La démarche a également été effectuée sur des sites naturels possédant des activités biologiques non expliquées par les analyses chimiques en routine. Finalement, l'approche EDA a été utilisée pour essayer de répondre à un questionnement scientifique, ne trouvant aucune réponse par les techniques conventionnelles, sur les causes d'une toxicité inexplicable chez des organismes aquatiques.

Chapitre 3

Matériels & Méthodes

Chapitre 3 : Matériels & Méthodes

Avant-propos

Ces travaux de thèse ont été réalisés dans le cadre de différents projets de recherche qui ont soulevé des questionnements scientifiques demandant la mise en place de l'approche EDA. Ces travaux multi-partenariaux, présentés dans ce chapitre, impliquent que l'extraction de certains échantillons et certains des tests biologiques utilisés ont été réalisés dans des laboratoires associés, ce qui sera spécifié le cas échéant.

La majorité de ces travaux de thèse a été effectuée dans deux laboratoires. Tout le fractionnement des échantillons, la majeure partie des extractions et les analyses chimiques ont été conduites au Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'environnement (LPTC) à Talence (33) et les tests biologiques basés sur la détection de perturbateurs endocriniens ont été réalisés au sein de l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS) à Verneuil-en-Halatte (60) dans l'unité d'Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo* (ECOT) sous la supervision de M. Sélim Aït-Aïssa.

1 Les programmes de recherche et les sites d'étude associés

1.1 Études portant sur les STEP

1.1.1 Le programme ÉTIAGE

a. Le descriptif du projet

Le programme **ÉTIAGE** a pour objectif d'effectuer une **Étude Intégrée** de l'effet des Apports amonts et locaux sur le fonctionnement de la **Garonne Estuarienne**. Un consortium pluridisciplinaire liant plusieurs laboratoires de recherche (Unité Mixte de Recherche « Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux » (UMR EPOC) (33) ; Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA), unité de recherche « Environnement, Territoires et Infrastructures » (ETBX) (33) ; le laboratoire de recherche et développement de la lyonnaise des Eaux (LyRE) (33)) et des gestionnaires (Communauté Urbaine de Bordeaux, la Lyonnaise des Eaux et l'Agence de l'eau Adour Garonne) a été créé pour répondre aux objectifs de ce projet de 4 ans (2010-2014). Le programme s'articule autour de 5 axes :

1. Caractérisation et rôle des apports organiques amont et locaux sur l'oxygénation des eaux de la Garonne estuarienne
2. Caractérisation et flux des contaminants organiques dans les eaux de la Garonne estuarienne
3. Qualification et quantification des apports métalliques

4. Approche de l'impact des conditions physico-chimiques affectant la masse d'eau de la Garonne estuarienne sur les cortèges biologiques
5. Synthèse des pressions et des impacts caractérisant les eaux de la Garonne estuarienne et recommandations de gestion

Le but de ce programme est de comprendre l'impact des rejets d'effluent de l'agglomération bordelaise sur le fonctionnement de la Garonne estuarienne, de réaliser un bilan de l'état écologique actuel des eaux et d'établir les actions correctrices à mettre en œuvre pour répondre aux exigences de la Directive Cadre sur l'Eau (*ETIAGE - Étude Intégrée de l'effet des Apport amont et locaux sur le fonctionnement de la Garonne Estuarienne*, 2014).

Dans le cadre de ces travaux de thèse, l'évaluation de la présence de perturbateurs endocriniens et leur identification moléculaire ont été effectuées sur les stations d'épuration bordelaises pour donner des informations complémentaires sur les pressions et les impacts anthropiques (Chapitre 6).

b. Les stations d'épuration étudiées

Deux STEP (*i.e.* la station de Louis Fargue et la station de Clos de Hilde) couvrant les trois quarts du réseau d'assainissement de la Communauté Urbaine de Bordeaux (CUB, 33) ont été choisies comme sites d'études. Les informations concernant ces deux STEP sont exposées en détails dans les travaux de thèse de (Aminot, 2013). Les caractéristiques des deux STEP sont ici synthétisées dans le Tableau 7. En Décembre 2011, des travaux de réhabilitation de la station de Louis Fargue ont été entrepris. Les données fournies dans le Tableau 7 correspondent aux caractéristiques avant travaux, période durant laquelle les prélèvements ont été effectués.

Tableau 7 : Caractéristiques des deux stations d'épuration étudiées (Aminot, 2013).

Nom	Implantation	Capacité ^a (EH)	Pourcentage de couverture de la CUB ^b	Procédés de traitement secondaire	Débits moyen du rejet par temps sec	Paramètres d'exploitation			
						MES ^c	DCO ^d	N-NH ₄ ^e	
Clos de Hilde	Bègles (33)	408 000	42 %	Biofiltres	0,6 m ³ .s ⁻¹	Eau brute	250 ±50	510 ±110	43 ±7
						Eau traitée	6 ±3	52±9	30 ±5
Louis Fargue (avant la réhabilitation de 2011)	Bordeaux (33)	300 000	31 %	66 % Boues activées	0,8 m ³ .s ⁻¹	Eau brute	220 ±50	430 ±70	34 ±6
				34 % uniquement décanté		Eau rejetée	31 ±14	120 ±20	34±6
						Eau traitée par boues activées	24 ±20	80 ±30	33 ±6

^a Charge de pollution théorique maximale que la STEP peut épurer. Elle est exprimée en équivalents-habitants (*i.e.* quantité de pollution émise par jour et par personne)

^b La CUB comprend 27 communes pour un total de 722 000 habitants, le réseau de collecte mesure 3952 km (20 % réseaux unitaires, 45 % réseaux séparatifs, 35 % réseaux d'eau pluviales)(Communauté urbaine de Bordeaux, 2011)

^c Matières en suspension exprimées en mg.L⁻¹

^d Demande chimique en oxygène exprimée en mg.L⁻¹

^e Azote ammoniacal exprimé en mg.L⁻¹

1.1.2 Le projet MED-SEINE

a. *Le descriptif du projet*

Les programmes de recherche Seine-Aval ont débuté en 1995 et visent à mieux connaître et comprendre l'estuaire de Seine afin de gérer de manière appropriée cet écosystème. Un groupe d'intérêt public (GIP) englobant partenaires privés et collectivités publiques, a été créé dans le but de mettre en place et de financer des projets en lien avec les objectifs globaux. Certains résultats de ces travaux de thèse ont été réalisés dans le cadre du projet MED-SEINE (2009-2012). Ce projet qui rentre dans le programme Seine-Aval 4 pour l'étude des risques chimiques et environnementaux, a pour but d'étudier la contamination de l'estuaire de Seine (*i.e.* milieu naturel et rejets de STEP) par les composés pharmaceutiques. L'étude vise à répondre à 4 objectifs principaux.

1. Développer et/ou adapter des méthodes d'analyse pour quantifier les composés pharmaceutiques sur plusieurs sites d'études.
2. Mettre en place des échantillonneurs passifs de type POCIS pour le suivi de la contamination
3. Évaluer la réponse biologique des différents échantillons (*i.e.* milieux naturels, effluents et échantillonneurs passifs de type POCIS).
4. Effectuer une étude sur la photo-dégradation des effluents STEP et de certains composés sélectionnés selon les premiers résultats obtenus.

Un consortium regroupant trois laboratoires scientifiques a été créé pour réaliser ces 4 axes de recherche, EPOC-LPTC (33), INERIS unité ECOT (60) et le Laboratoire d'Ecotoxicologie – Milieux Aquatiques (LEMA) (76). Dans le cadre de cette thèse, les résultats portent sur l'évaluation des activités biologiques des stations d'épuration.

b. Les stations d'épuration étudiées

Quatre STEP implantées tout le long de l'estuaire de Seine ont été échantillonnées. Les caractéristiques des différents sites sont résumées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Caractéristiques des STEP étudiées le long de la Seine (www.assainissement.developpement-durable.gouv.fr).

Nom	Implantation	Capacité^a (EH)	Nature	Procédés de traitement secondaire	Débit moyen^a
Edelweiss	Le Havre (76)	322 000	Urbaine	Déphosphatation Dénitrification Boues activées	57 948
Tancarville	Tancarville (76)	1800	Rurale	Boues activées	197
St-Aubin-Les-Elbeufs	St-Aubin-Les-Elbeufs (76)	118 000	Urbaine	Déphosphatation Dénitrification Boues activées	10 885
Le Petit Quevilly	Petit-Quevilly (Rouen, 76)	500 000	Urbaine	Déphosphatation Dénitrification Boues activées	88 456

^a Débit moyen entrant en m³.j⁻¹ pour l'année 2011

1.1.3 Le projet TOXSTEP

a. Le descriptif du projet

Le projet TOXSTEP (2010-2013), financé par le Programme National de Recherche Environnement-Santé Travail (PNR EST), a pour objectif d'étudier la contribution des polluants émergents et de leurs produits de dégradation sur la toxicité des effluents des stations d'épuration. Ce projet mené par deux laboratoires, l'EPOC-LPTC (33) et l'INERIS unité ECOT (60) a consisté à quantifier les composés pharmaceutiques dans les effluents de différentes STEP et à évaluer leurs activités biologiques. Les travaux de thèse se sont focalisés sur ce dernier point. Le second objectif était d'étudier la photo-réactivité des échantillons afin de connaître la stabilité des résidus médicamenteux et étudier l'évolution de la réponse biologique.

b. Les stations d'épurations étudiées

Quatre STEP ont été étudiées dans ce projet, deux stations (*i.e.* Clos de Hilde, STEP de Biganos) implantées en Gironde et deux stations (*i.e.* STEP de Saltgourde, STEP de

Trélassac) localisées en Dordogne. Les caractéristiques des STEP sont détaillées dans le Tableau 9. Les paramètres de la station de Clos de Hilde sont présentés dans la section 1.1.1 du Chapitre 3, p 62 (Tableau 7).

Tableau 9 : Caractéristiques des STEP étudiées dans le projet TOXSTEP, sauf Clos de Hilde (www.assainissement.developpement-durable.gouv.fr).

Nom	Implantation	Capacité ^a (EH)	Nature	Procédés de traitement secondaire	Débit moyen ^a
Biganos 2	Biganos (33)	135 000	Urbaine - saisonnaire	Biofiltre	15 810
Trélassac	Trélassac (24)	10 000	Rurale	Boues activées	920
Saltgourde	Marsac-sur-l'Isle (24)	48 000	Urbaine	Desphosphatation Boues activées	8550

^a Débit moyen entrant en m³.j⁻¹ pour l'année 2011

1.1.4 Le projet ECOPI

Le projet ECOPI, “*Endocrine disruptors COmpounds Purification and Identification*”, est un programme Post Grenelle de l'environnement qui a débuté en 2009 pour une durée de 3 ans. Il vise à améliorer et développer des techniques biologiques et chimiques afin d'identifier des perturbateurs endocriniens dans des matrices environnementales complexes. Pour répondre à cet objectif, un partenariat de 4 laboratoires a été créé (Institut National de la Santé Et de la Recherche Médical (INSERM), unité 896 « Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier »(IRCM) (34) ; INERIS, unité ECOT (60) ; INRA, UMR 1089 Xénobiotiques (31) et EPOC-LPTC (33)) afin de travailler sur 5 axes de recherche.

1. Développer et utiliser des lignées cellulaires sensibles bioluminescentes pour détecter la présence de perturbateurs endocriniens dans des échantillons environnementaux.
2. Améliorer et/ou établir la production de certaines lignées cellulaires basées sur les récepteurs nucléaires afin de cibler des composés retrouvés dans l'environnement.
3. Développer et optimiser des techniques de fractionnement d'échantillons environnementaux et de spectrométrie de masse.
4. Développer et optimiser les colonnes d'affinité à récepteurs nucléaires permettant de piéger des perturbateurs endocriniens et réaliser l'identification des composés bioactifs piégés par les récepteurs nucléaires par l'utilisation de LC-HRMS.
5. Développer et appliquer des stratégies bio-analytiques de type EDA pour l'identification de perturbateurs endocriniens dans des échantillons environnementaux.

Ces travaux de thèse se sont focalisés sur le troisième et cinquième axe du projet. Pour répondre aux objectifs du projet les échantillons prélevés dans les projets Etiage, MED-

SEINE et TOXSTEP ont été mutualisés pour servir de matrices environnementales. Des échantillons d'urine humaine ont également été utilisés, le prélèvement est exposé en section 4.3.1 du Chapitre 3, p 81.

1.1.5 Le projet Echibioteb

a. *Le descriptif du projet*

Le projet Echibioteb, a pour objectif de développer des « outils innovants d'Echantillonnages, d'analyses **CHI**miques et **BIO**logiques pour le suivi de **Traitements** avancés des **Eaux** usées et des **Boues** ». Le programme a débuté en 2011 et s'est terminé en 2014. Il associe 6 laboratoires privés et publics (*i.e.* IRSTEA, unité de recherche « Milieux Aquatiques, Ecologie et Pollutions » (MAEP) (69) ; Centre International de Recherche sur l'Eau et l'Environnement (CIRSEE) (78) ; EPOC-LPTC (33) ; Groupe Santé Publique-Environnement de l'UMR Ecologie Systématique Evolution (GSPE-UMR 8079) de l'Université Paris Sud ; INERIS unité ECOT et « Expertise et Essais en Ecotoxicologie » (EXES) (60) ; ENVOLURE (34)) autour de plusieurs axes d'étude. Le projet, financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), vise à étudier les procédés de traitements tertiaires (*e.g.* oxydation à l'ozone, aux rayons UV, adsorption sur charbon actif, osmose inverse) sur les rejets de station d'épuration mais également des déchets issus des processus de traitement (*i.e.* boues destinées à l'épandage agricole). Cette étude passe par l'évaluation des techniques tertiaires employées et le contrôle des molécules potentiellement dangereuses issues des processus de traitement. Dans le but de répondre à ce second point, l'approche EDA a été employée et les résultats sont exposés dans ce manuscrit (Chapitre 6).

b. *Les sites d'études*

Dans le cadre du projet, plusieurs sites ont été échantillonnés. Ces travaux de thèse se sont uniquement focalisés sur les échantillons ayant une activité biologique intéressante. Seuls les sites faisant l'objet de résultats dans ce manuscrit sont décrits dans ce paragraphe. Les travaux exposés dans cette thèse relatifs à ce projet portent sur les boues de STEP et sur l'étude de deux procédés tertiaires de traitement d'effluent de STEP, une sortie équipée de charbon actif et une sortie possédant une zone de lagunage, échantillonnés par échantillonneurs passifs de type POCIS.

Les sites étudiés sont des sites pilotes, c'est-à-dire des stations dans lesquelles différents dispositifs à tester ont été mis en place afin d'évaluer leur fonctionnement. Les détails des sites sont exposés dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Caractéristiques des sites pilotes étudiés (www.assainissement.developpement-durable.gouv.fr; www.sibso.fr).

Sites Pilotes	Capacité (EH)	Nature	Procédés de traitement	Procédés étudié	Echantillonnage
Site du Moulin (91)	60 000	Urbaine	Boues activées Filtration membranaire	Compostage des boues	Boues brutes et boues compostées
Site de la Feyssine (69)	300 000	Urbaine	Boue activée	Charbon actif	POCIS déployés en amont et en aval du traitement

1.1.6 Étude sur les boues de STEP non associée à un projet

Une étude sur les boues de STEP sans projet associé a été menée durant cette thèse. Cette étude associe trois laboratoires, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA), unité de recherche «Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et Procédés» (LISBP) (31), INSERM, unité IRCM (34) et EPOC - LPTC (33). Son objectif est d'évaluer l'activité biologique en lien avec la présence de perturbateurs endocriniens, de plusieurs échantillons de boues provenant de différents procédés et d'identifier les composés responsables de ces activités. Six échantillons ont été étudiés. Le détail de la provenance des matrices traitées est synthétisé dans le Tableau 11. Ces échantillons ont été fournis par l'INSA, unité LISBP (31).

Tableau 11 : Détails des STEP fournissant les échantillons de boues étudiés.

STEP	Capacité (EH)	Nature	Procédés de traitement de l'eau	Traitement de la filière boue	Échantillonnage
Lille	750 000	Urbaine	Dénitrification Desphosphatation Boue activée	Digestion anaérobie mésophile	Boues primaires Boues avant digesteur Boues digérées
Achères	6 000 000	Urbaine	Dénitrification Desphosphatation Boues activées Biofiltres	Epaississement statique gravitaire Stabilisation aérobie Digestion anaérobie mésophile	Boues primaires Boues deshydratées Boues digérées

1.2 Les lisiers porcins

Le projet DIPERPHA (ANR, début 2007, durée 42 mois), **D**ynamique et **I**mpact des **P**erturbateurs endocriniens et des composés **P**harmaceutiques issus des élevages agricoles, a montré la présence de fortes activités œstrogéniques et *dioxin-like* dans des lisiers porcins provenant de la région de Bretagne (Combalbert et al., 2012). Durant le projet, ces effets

biologiques n'ont pu être imputés aux molécules détectées avec les analyses chimiques ciblées sur une liste de composés. Le rendu des résultats du programme effectué, une étude complémentaire a été menée durant ces travaux de thèse afin de rechercher les composés responsables des activités biologiques mesurées. Pour ce faire, l'approche EDA a été appliquée sur l'échantillon ayant les effets biologiques les plus intenses, non expliqués par les molécules détectées.

L'échantillon étudié a été prélevé en Juillet 2009 dans un site d'élevage porcin de la région de Bretagne. Cet échantillon est du lisier brut, c'est-à-dire un mélange d'urine, de fèces, de restes d'aliments et des eaux de lavage, qui provient directement des bâtiments abritant les animaux. Ce lisier n'a subi aucun traitement, il peut seulement rester entre 3 et 4 semaines dans des canaux de pré-stockage avant d'être transféré dans des fosses de stockage (Combalbert, 2011). Cet échantillon a été fourni par l'INSA (31).

1.3 Études basées sur le milieu naturel

La rivière *La Dore* est un affluent de l'*Allier*. Elle est située dans le Puy de Dôme en France, et est impactée par des rejets industriels (*n.b.* STEP d'usine pharmaceutique) et urbains (Figure 16). Une étude préliminaire a mis en évidence des problèmes de reproduction chez le goujon provenant du site étudié (*e.g.* hypertrophie des gonades, induction de vitellogénine, insuffisance de fraie associée une intersexualité marquée) (Sanchez et al., 2011). Ces anomalies observées sont imputables à la présence dans le milieu de perturbateurs endocriniens. Suite à ce constat, des recherches ont été menées afin de trouver la cause de ces effets. Des échantillonneurs passifs de type POCIS ont été déployés dans la rivière et l'approche EDA a été appliquée sur leurs extraits pour rechercher les composés responsables des anomalies morphologiques observées. Creusot et al. (2014) ont détecté la présence de composés pharmaceutiques et de stéroïdes pouvant expliquer partiellement les activités biologiques mesurées. Néanmoins, une partie des activités n'a pu être attribuée aux composés trouvés, suggérant ainsi la présence de molécules inconnues ou non ciblées. Des investigations supplémentaires ont été réalisées durant cette thèse afin d'identifier ces composés (Chapitre 6).

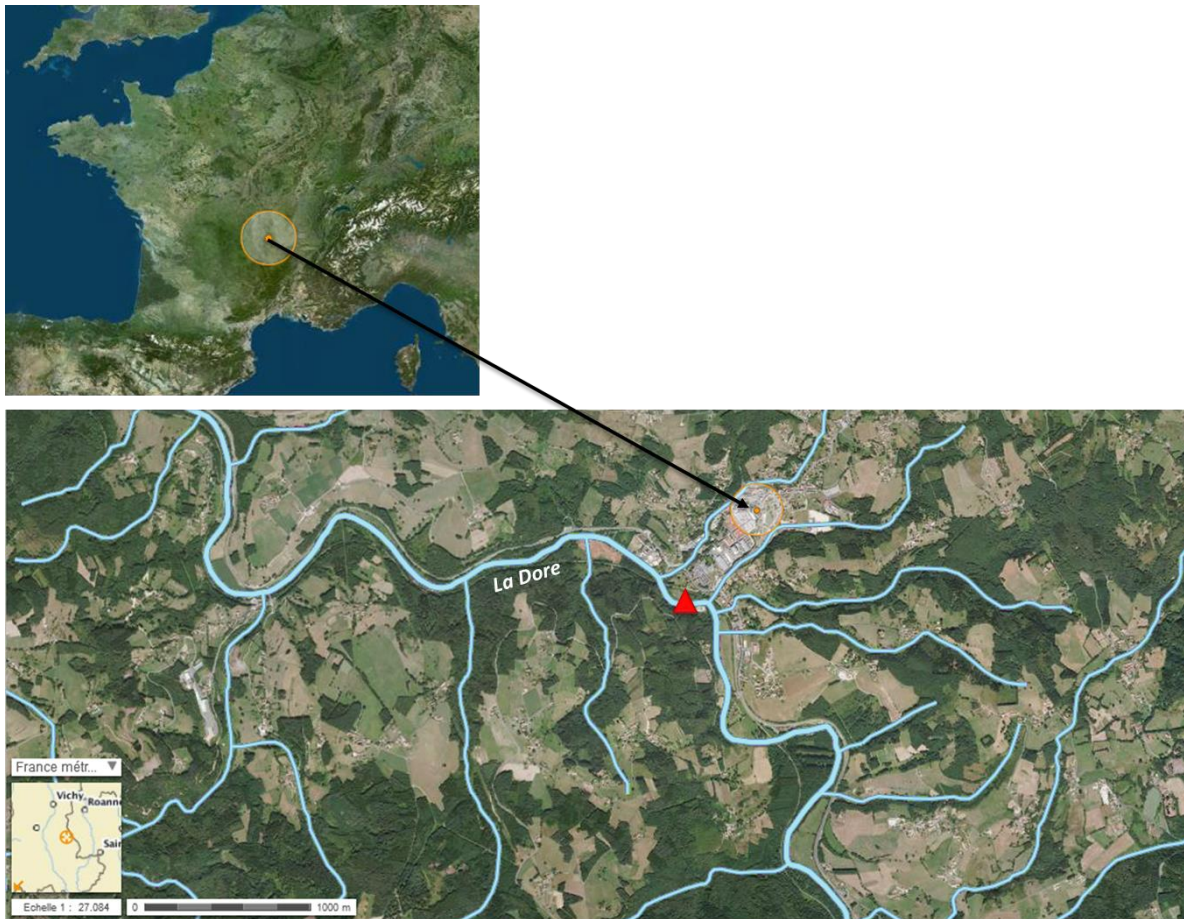


Figure 16 : La rivière *La Dore*. Le site de prélèvement est marqué d'un triangle rouge (www.geoportail.gouv.fr, 2014).

1.4 Étude appliquée au *biota* : le Programme National Arcachon (PNA)

Suite aux épisodes répétés de toxicité non expliquée, qualifiée d'atypique, observés sur les coquillages provenant du Bassin d'Arcachon (33), l'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) a monté un projet multi-partenarial dans le but d'identifier les causes possibles de ces phénomènes. À cette occasion un consortium scientifique a été mis en place regroupant 11 équipes de recherche, ANSES, unité de recherche « Toxicologie des Contaminants » (35) et « Caractérisation des Toxines » (94) ; IFREMER, « Laboratoire Phycotoxines » (44) et « Laboratoire Environnement-Ressources d'Arcachon » (33) ; le Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN) unité de recherche « Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes » (MCAM) (75) ; l'École nationale vétérinaire d'Alfort (94) ; EPOC-LPTC (33) ; l'Institut National des Sciences de l'Univers, unité de recherche "Ecologie des Systèmes Marins Côtiers" (34) et l'Université Bordeaux Segalen-INRA, unité de recherche « Laboratoire de Toxicologie » (33). Ce projet a été financé par la Direction Générale de l'alimentation et la Direction des pêches maritimes et de l'aquaculture (Ministère de

l'agriculture), ainsi que par la Direction Générale de la santé (Ministère du travail, de l'emploi et de la santé) et s'articule en 3 tâches principales :

1. Prélever dans le milieu et qualifier les stocks de coquillages
2. Étudier la toxicité et développer des outils pour le suivi des fractions toxiques
3. Identifier la nature du danger en se basant sur différentes hypothèses (*e.g.* toxicité due à de nouvelles toxines biologiques, à des formes dérivées de toxines connues)

Ces travaux de thèse s'inscrivent dans l'axe 2 du projet. La démarche EDA a ici été mise en place pour rechercher les agents potentiellement toxiques dans les coquillages (*Mytilus sp.*) du bassin d'Arcachon.

2 Les outils biologiques employés

Plusieurs tests biologiques ont été utilisés durant ces travaux de thèse. La majorité des bio-essais employés sont des tests *in vitro*. Tous ces outils sont décrits dans ce chapitre.

2.1 Bio-essais basés sur la détection de perturbateurs endocriniens

Ces tests *in vitro* sont des modèles cellulaires basés sur l'expression de gènes rapporteurs ou de gènes naturels qui sont contrôlés par différents récepteurs (Chapitre 2, § 4.1.1, p 27). Les résultats exposés ont été établis par l'emploi de plusieurs lignées cellulaires permettant de cibler différentes activités et par conséquent une large gamme de perturbateurs endocriniens. La caractérisation des activités biologiques a été réalisée à l'INERIS, unité ECOT (60), sous la direction de M. Sélim Aït-Aïssa et par l'INSERM, unité IRCM (34), sous la direction de M. Patrick Balaguer.

2.1.1 Les lignées cellulaires

Les différentes lignées employées sont exposées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Liste des différents modèles cellulaires utilisés au cours de ces travaux de thèse. ^a Bio-essais réalisés par l'INSERM, ^b Bioessais effectués à l'INERIS.

Effet biologique	Lignée cellulaire	Source	Récepteur	Gène rapporteur	Méthodes	Ligand de Référence	Référence
Activité oestrogénique	MELN ^{a,b}	Cellules humaines du cancer du sein, MCF-7	ER α endogène	ERE- β Glob-LUC	Dosage de la luciférase	Agoniste : 17 β -œstradiol Antagoniste : ICI	(Balaguer et al., 1999)
	HELN-ER α ou ER β ^a	Cellules humaines du cancer de l'utérus, HeLa	ER α ou ER β	ERE- β Glob-LUC	Dosage de la luciférase	Agoniste : 17 β -œstradiol Antagoniste : ICI	(Balaguer et al., 1999)
Activité androgénique	HELN-AR ^a	Cellules humaines du cancer de l'utérus, HeLa	AR	ERE- β Glob-LUC	Dosage de la luciférase	Agoniste : R1881 (méthyltrienolone)	(Molina-Molina et al., 2008)
Activité androgénique et glucocorticoïde	MDA-kb2 ^{a,b}	Cellules humaines du cancer du sein, MDA-MB-453	AR < GR endogènes	pMMTV-Luc	Dosage de la luciférase	Agoniste : Dihydrotestostérone /Dexaméthasone Antagoniste : Flutamide /Mifépristone (RU 486)	(Wilson et al., 2002a)
Activité glucocorticoïde	HG ₅ LN-GR ^a	Cellules humaines du cancer de l'utérus, HeLa	GR	GAL4RE ₅ - β Glob-LUC	Dosage de la luciférase	Agoniste : Dexaméthasone Antagoniste : Flutamide	(Molina-Molina et al., 2006)
Activité Minéralocorticoïde	HELN-MR ^a	Cellules humaines du cancer de l'utérus, HeLa	MR	ERE- β Glob-LUC	Dosage de la luciférase	Agoniste : Aldosterone	(Molina-Molina et al., 2008)
	HG ₅ LN-MR ^a	Cellules humaines du cancer de l'utérus, HeLa	MR	GAL4RE ₅ - β Glob-LUC	Dosage de la luciférase	Agoniste : Aldosterone	(Molina-Molina et al., 2006)

Tableau 12 (suite)

Effet biologique	Lignée cellulaire	Source	Récepteur	Gène rapporteur	Méthodes	Ligand de Référence	Référence
Activité progestative	HELN-PR ^a	Cellules humaines du cancer de l'utérus, HeLa	PR	ERE-βGlob-LUC	Dosage de la luciférase	Agoniste : promegestone (R 5020)	(Molina-Molina et al., 2008)
Activité <i>dioxin-like</i>	HAhLP ^a	Cellules humaines du cancer de l'utérus, HeLa	AhR endogène	CY1A1-LUC	Dosage de la luciférase	Agoniste : TCDD	(Pillon et al., 2005a)
	PLHC-1 ^b	Cellules hépatiques cancéreuses de poisson (<i>Poeciliopsis lucida</i>)	AhR endogène		Dosage de l'activité EROD (7-éthoxyrésorufine O-dééthylase)	Agoniste : TCDD	(Hahn et al., 1993; Kinani et al., 2010)
Activité induite par les xénobiotiques	HG ₅ LN-PXR ^a	Cellules humaines du cancer de l'utérus, HeLa	PXR	GAL4RE ₅ -βGlob-LUC	Dosage de la luciférase	Agoniste : SR 12813	(Lemaire et al., 2006; Creusot et al., 2010)

AhR : récepteur des hydrocarbures aromatiques, AR : récepteur des androgènes, ER : récepteur des œstrogènes, GR : récepteur des glucocorticoïdes, ICI : 7α,17β-[9-[(4,4,5,5,5-Pentafluoropentyl)sulfinyl]nonyl]estra-1,3,5(10)-triène-3,17-diol, MR : récepteur des minéralocorticoïdes, PR : récepteur des progestagènes, PXR : récepteur X des prégnanes, SR 12813 : Tetraéthyl 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphényl)éthényl-1,1-bisphosphonate, TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine.

2.1.2 Les conditions de culture cellulaire

Les conditions de culture des lignées cellulaires utilisées sont décrites en détails par (Bellet et al., 2012; Combalbert, 2011; Kinani et al., 2010; Louiz et al., 2008). Les réactifs employés pour la culture cellulaire proviennent, pour l'INERIS, de chez Fisher Scientific (Illkrich, France), excepté le de sérum de veau fœtal (SVF) provenant de chez Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France) et pour l'INSERM, de chez Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Les lignées employées sont cultivées en routine dans du milieu de culture (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM) contenant du rouge de phénol, 5 % de SVF, et 1 % d'acides aminées non essentiels et d'antibiotiques (*n.b.* pénicilline et streptomycine). Les cellules sont maintenues à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % CO₂. Pour la lignée PLHC-1, la culture s'effectue dans du milieu de culture minimum (*Eagle's minimal essential medium*, E-MEM) supplémenté avec 10 % SVF, 1 % d'antibiotiques. Leur croissance se réalise à 27,9°C sous atmosphère humide possédant 4 % CO₂. Le rouge de phénol et le SVF ayant une activité hormonale mais étant nécessaires pour la prolifération des cellules, deux à trois jours avant la réalisation des tests, les lignées sont cultivées dans du DMEM sans rouge de phénol contenant 3 % de SVF déstéroïdé et 1 % antibiotiques.

Après incubation, les cellules sontensemencées dans des plaques blanches de 96 puits (CellStar[®], Greiner Bio-one, D. Dutcher, Brumath, France) à une densité de 2.10⁴ à 1.10⁵ cellules par puit. Pour la lignée PLHC-1, les cellules sont déposées dans des plaques transparentes de 96 puits (plaque TPP[®], D. Dutcher, Brumath, France).

2.1.3 Exposition des cellules et analyse des échantillons

Lorsque les cellules sont confluentes, les tests peuvent être réalisés. Dans chaque puit la quantité de solvant ne doit pas excéder 0,5 % ; pour cela chaque élément déposé (*i.e.* composés, échantillons) est dilué dans du milieu de culture. Afin de vérifier le fonctionnement correct des lignées, une gamme de dilution du composé de référence de chaque lignée est testée. En parallèle à ce dépôt, d'autres contrôles sont à effectuer sur chaque plaque (Figure 17). La réponse basale de la lignée, la réponse induite par le solvant et la réponse maximale induite par les cellules en présence du composé de référence sont vérifiées. Lorsque les échantillons sont déposés dans les puits, les cellules sont incubées pendant 16 à 20 h. Pour la lignée HAHL, le temps d'incubation est de 8h. La lignée PLHC-1 est incubée 4h ou 24h pour mettre en évidence les composés persistants (*e.g.* dioxines) et ceux qui sont métabolisables (*e.g.* HAP) (Louiz et al., 2008; Kinani et al., 2010; Creusot et al., 2013).

Pendant la durée d'incubation, pour les lignées exprimant la luciférase, en présence de ligands, les cellules produisent de la luciférase. À la fin de l'incubation, les plaques sont vidées et du milieu de culture contenant de la luciférine (0,3 mM) est ajouté. Un complexe luciférase/luciférine se forme alors et catalyse la réaction d'oxydation de la luciférine par le dioxygène (O₂). Cette dernière devient instable et émet un photon. Le signal luminescent est

mesuré par un luminomètre (MicroBeta, Wallac[®], Perkin-Elmer SAS, Courtabœuf, France ou Synergy 2, BioTek[®], Colmar, France).

Pour la mesure de l'activité EROD (*i.e.* lignée PLHC-1), après 24h ou 4h, les plaques sont vidées et rincées au PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Le milieu de culture, contenant de la 7-éthoxyrésorufine (5 μ M), est ensuite ajouté. L'activité EROD est alors mesurée par un spectrofluorimètre (Safire 2, Tecan[®], Lyon, France) fixé à la longueur d'onde de 400/460 nm (Creusot et al., 2013).

Pour chaque mesure, luciférase ou EROD, une courbe dose-réponse est établie. L'activité est exprimée en relatif par rapport à celle du composé de référence spécifique à chaque lignée cellulaire (Tableau 12).

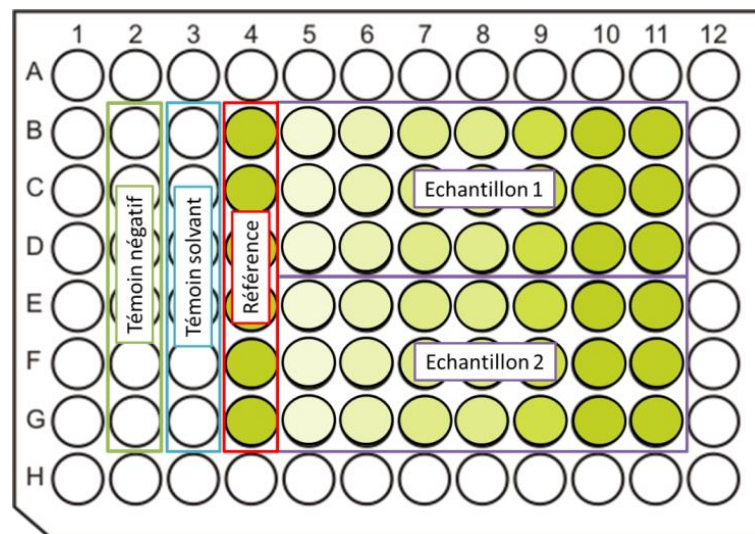


Figure 17 : Représentation schématique d'une plaque 96 puits contenant un exemple type de dépôt constitué de différents témoins et des échantillons : le témoin négatif est encadré en vert, le témoin solvant est encadré en bleu, le composé de référence à la concentration induisant le maximum de réponse cellulaire est encadré en rouge et les gammes en 7 points de dilution de deux échantillons sont encadrées en violet.

Selon les laboratoires, deux méthodes de modélisation des données ont été effectuées pour établir les courbes dose-réponse. Pour les lignées exposées à l'INSERM, unité IRCM (Tableau 12), les courbes sont réalisées à l'aide du logiciel Microsoft Excel[®]. Pour les bio-essais effectués à l'INERIS unité ECOT, les courbes sont modélisées en suivant l'équation de Hill à l'aide du logiciel Microsoft Excel[®] en utilisant la macro REGTOX_EV7.0.5 version 2 disponible librement sur le site http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html (Vindimian et al., 1983). Ces représentations permettent de déterminer la concentration entraînant 50 % ou 20 % de l'activité (EC 50, EC 20). L'activité de l'échantillon est comparée à la EC 50 ou EC 20 du ligand de référence ainsi les résultats peuvent être exprimés en quantité équivalente toxique biologique (Bio-TEQ, *Équation 1*).

$$\text{Équation 1,} \quad \text{Bio} - \text{TEQ} = \frac{\text{ECx composé de référence}}{\text{ECx extrait environnemental}}$$

Avec ECx = concentration entraînant x % de la réponse maximale pour l'activité considérée

Lorsque l'induction cellulaire maximale est inférieure à 50 % ou 20 %, l'activité est insuffisante pour établir la EC50 ou EC20 et le calcul de concentration ne peut être effectué.

2.2 Bio-essais utilisés pour évaluer la cytotoxicité, test MTT

Un test de viabilité cellulaire, le test MTT, a été utilisé durant ces travaux de thèse pour diriger l'approche EDA dans plusieurs projets. Les bio-essais ont été effectués par différents laboratoires français partenaires, INERIS unité ECOT (60), EPOC-LPTC (33), ANSES unité de recherche « Toxicologie des Contaminants » (35) et le MNHN unité MCAM (75).

2.2.1 Le principe du test MTT

Ce test a été effectué dans différents projets et sur différentes lignées cellulaires. Il renseigne, par une mesure de colorimétrie, sur l'activité métabolique des cellules. Dans le principe, du bromure tétrazolium de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétranasodium (MTT) est mis en contact avec les cellules. Chez les cellules vivantes, la succinate déshydrogénase présente chez les mitochondries va réduire le MTT en formazan. La réaction forme alors des cristaux violets. La coloration est plus ou moins intense suivant la quantité de cellules actives.

2.2.2 Test MTT sur lignées cellulaires basées sur l'expression de gènes rapporteurs

Ce test a été effectué à l'INERIS (unité ECOT) en complément des bio-essais basés sur l'expression de gènes rapporteurs. Le test MTT est décrit en détail par Laville et al. (2004). Afin d'effectuer ce test, les cellules doivent être préalablement déposées sur des plaques 96 puits transparentes (TPP[®], D. Dutcher, Brumath, France) ou sur des plaques blanches à fond transparent (Greiner Bio-one, D. Dutcher, Brumath, France) permettant à la fois la lecture de la luciférase et la réalisation du test MTT. Après l'exposition des cellules à l'extrait environnemental (Chapitre 3, §2.1.3, p 74), les plaques sont vidées et du MTT dilué dans du milieu de culture est ajouté à une concentration de 0,5 mg.mL⁻¹ dans chaque puit. Les cellules sont laissées à incuber pendant 3h. Après l'incubation, les plaques sont délicatement vidées et de l'isopropanol est ajouté dans chaque puit. Après une agitation de 30 min, les

plaques sont lues par spectrométrie (spectromètre Safire 2, Tecan[®], Lyon, France) aux longueurs d'onde de 570 nm et 660 nm. La viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage par rapport à la valeur du contrôle.

2.2.3 Test MTT réalisé dans le cadre du projet PNA

Les tests de viabilité cellulaire ont été effectués par les différents laboratoires partenaires du projet PNA. Trois bio-essais ont été utilisés dans cette étude :

- Le test HepG2 issu de cellules humaines cancéreuses du foie. Le test a été réalisé par le laboratoire EPOC-LPTC (Talence, 33).
- Le test Caco2 utilisant des cellules humaines cancéreuses du colon et du rectum. Le test a été réalisé par l'Anses, unité de recherche « Toxicologie des Contaminants » (Fougères, 35).
- Le test Neuro2a utilisant des cellules de neuroblastome chez la souris. Ce bio-essai a été effectué par le MNHN, unité MCAM (Paris, 75).

Les conditions de culture cellulaire ainsi que les paramètres de réalisation du test MTT sur les lignées utilisées, sont décrits en détails par Sérandour et al. (2012). Les cellules sont cultivées dans du milieu cellulaire adapté à la lignée (MEM-Glutamax pour HepG2 et Caco2, RPMI 1640-Glutamax pour Neuro2a) contenant 10 % de SVF, du glucose (1 à 2 g.L⁻¹), un mélange d'antibiotique (pénicilline à 50 U.mL⁻¹ et streptomycine à 50 µg.mL⁻¹) et des acides aminés non essentiels. Les lignées sont maintenues dans des flasques de 75 cm² dans une atmosphère à 37°C contenant 5 % de CO₂.

Pour la réalisation du test MTT, les cellules sontensemencées 1 jour avant l'exposition dans des plaques 96 puits, à une densité de 20 000 cellules pour Neuro2a et HepG2 et 30 000 cellules pour Caco2. Les échantillons sont dilués dans du milieu de culture afin d'avoir au maximum 5 % de solvant (MeOH) dans chaque puit. Ils sont ensuite déposés dans les plaques préalablement vidées. Après 24 h d'exposition, les cellules sont dans un premier temps observées au microscope afin de mettre en évidence d'éventuelles altérations morphologiques. Le test MTT est ensuite effectué. Les plaques sont vidées et du milieu de culture contenant 0,5 mg.mL⁻¹ de MTT est ajouté. Après 2 h d'incubation à 37°C, les plaques sont à nouveau vidées et de l'isopropanol acidifié à l'acide chloridrique est ajouté. Les plaques sont lues par spectrométrie à une longueur d'onde de 570 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité. La mesure de la concentration entraînant 50 % de viabilité cellulaire (IC 50) est déterminée à l'aide de logiciel GraphPad Prism[®].

3 Produits chimiques et solvants pour la préparation et l'analyse chimique des échantillons

Tous les solvants utilisés sont de qualité HPLC et proviennent de VWR International (Strasbourg, France), Acros Organics (Noisy le Grand, France), Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France) et Atlantic labo-ICS (Bruges, France). L'eau ultra-pure de qualité Milli-Q est préparée sur un système Milli-Q équipé d'un filtre EDS-PAK (Millipore SA, Guyancourt, France). L'acide formique en bouteille à 98% de la marque JT Baker, utilisé pour les analyses chimiques ciblées est fourni par Atlantic Labo (Bruges, France). Pour les analyses en spectrométrie de masse haute résolution, l'acide formique à 99% est contenu dans des ampoules individuelles de 1 mL, fournies par Atlantic Labo (Bruges, France).

L'argon (99,9990% de pureté Linde Gas, Bassens, France) est utilisé pour l'évaporation des échantillons.

Les composés et leurs homologues marqués par des isotopes stables (pureté >90%) sont obtenus auprès de Sigma Aldrich, Toronto Chemical Research (North York, Toronto, Canada), CDN Isotopes (Montréal, Canada), Cambridge Isotopes Laboratories (Tewksbury, MA, USA), LGC Standard (Molsheim, France), Cluzeau Info Labo (Ste Foy La Grande, France) et Santa Cruz (Heidelberg, Allemagne).

4 La préparation des échantillons

Plusieurs types d'échantillons ont été étudiés dans le cadre de cette thèse suivant les différents projets de recherche. Ainsi les échantillons ont pu être classés en différentes catégories suivant leurs caractéristiques physiques :

- i. Les matrices qualifiées de solides (*i.e.* boues de STEP, lisiers)
- ii. Les matrices de type liquide (*i.e.* eaux de STEP, urines humaines)
- iii. Les échantillonneurs passifs de type POCIS
- iv. Le *biota* – les bivalves

Par conséquent, la préparation des échantillons a été adaptée aux différents types de matrices et est exposée dans ce paragraphe.

4.1 Assurance qualité pour la préparation des échantillons

Pour éviter la contamination des échantillons au cours des procédures de préparation, des précautions de manipulation ont été réalisées. Avant chaque utilisation, toute la verrerie est préalablement lavée au détergent (TDF 7, Franklab, Montigny le Bretonneux, France), rincée à l'acide (Neutrax, Franklab, Montigny le Bretonneux, France) et calcinée à 450°C pendant 6 h pour éliminer toutes les traces de composés organiques. Une verrerie spécifique

est utilisée suivant le niveau de contamination de l'échantillon. De plus, toutes les bouteilles de solvant sont ouvertes avant les manipulations et dédiées à l'approche EDA en cours. L'eau ultra-pure employée est fraîchement préparée avant chaque expérience par un système de purification équipée d'un filtre éliminant la présence de perturbateurs endocriniens (filtre EDS-PAK, Millipore SA, Guyancourt, France).

Les pics à évaporations utilisés sont nettoyés aux ultrasons pendant 20 min dans du dichlorométhane, avant chaque utilisation. Afin de vérifier l'absence de contamination durant les procédés d'extraction, des blancs de procédure suivant chaque étape de la préparation de l'échantillon sont effectués. Tous les extraits préparés sont suivis par gravimétrie.

4.2 Préparation des matrices solides

Toutes les matrices de type solide étudiées ont été prélevées et extraites par les laboratoires partenaires des projets associés. Les modalités de préparation sont résumées dans le Tableau 13.

Tableau 13 : Paramètres de préparation des matrices solides.

Échantillons	Projet	Laboratoire	Type d'extraction	Quantité extraite	Paramètres d'extraction	Conservation des extraits
Boue de STEP	-	INSA, unité LISBP (31)	ASE	2 x 1 g	MeOH/acétone (50/50, v:v), 2 cycles, 75°C, 105 bars puis hexane/acétone (50/50, v:v), 1 cycle, 120°C, 100 bars Volume final d'extraction 20 mL	Evaporation 8 mL MeOH Centrifugation pour éliminer les particules Conservation à -20°C
	Echibioteb	IRSTEA, unité MAEP (69)	ASE	4 x 0,5 g	Acétone, 2 cycles puis dichlorométhane, 2 cycle, puis cyclohexane 2cycles, 75°C, 100 bars	Evaporation 2 mL cyclohexane Centrifugation pour éliminer les particules Conservation à -20°C
Lisier	-	INSA, unité LISBP (31)	ASE	10 x 0,5 g	MeOH/acétone (50/50, v:v), 2 cycles puis hexane/acétone (50/50, v:v), 1 cycle, 120°C, 100 bars Volume final d'extraction 40 mL	Evaporation ≈ 30 mL MeOH Conservation à -20°C

ASE : « *Accelerated solvent extraction* », MeOH : méthanol

4.3 Préparation des matrices liquides

Tous les prélèvements et la préparation des matrices liquides ont été effectués au laboratoire EPOC-LPTC (33).

4.3.1 Échantillonnage

a. Les eaux de station d'épuration

Les eaux d'entrée et de sortie de STEP, sauf cas particulier, sont collectés automatiquement dans des bidons de 10 L en polyéthylène haute densité, stockés dans des enceintes réfrigérées à 4°C. Le prélèvement représente généralement la moyenne des eaux arrivées ou traitées sur un jour de 8 h à 8 h le lendemain. Avant chaque prélèvement, le bidon est homogénéisé. Pour certaines STEP, les prélèvements n'ont pu être moyennés sur 24 h en raison de problème d'intrinsèque aux stations. Par conséquent, ces stations ont été prélevées ponctuellement, l'heure du prélèvement étant systématiquement précisé. Les eaux de chaque site sont prélevées dans des flacons en polyéthylène haute densité (Nalgène[®], Fisher Scientific, Illkrich, France) de 500 mL, exception faite pour la STEP de Biganos et l'exutoire *la Laouga* prélevés dans des bouteilles en verre. Le détail des prélèvements est précisé en Annexe I. Les prélèvements sont transportés au frais dans une glacière contenant des pains de glace.

Dès leur arrivée au laboratoire, les eaux prélevées sont filtrées avec des unités de filtration en polyéthylène haute densité dédiées spécifiquement aux eaux d'entrées ou de sorties de STEP. Pour les sorties, les eaux sont filtrées uniquement sur des filtres GFF (0,7 µm) (VWR, Fontenay-sous-bois, France). Pour les entrées, les eaux sont, d'abord, passées sur des filtres GFA (1,4 µm) (VWR, Fontenay-sous-bois, France) puis sur filtres GFF. Afin de ne pas apporter de contaminants lors de l'étape de filtration, tous les filtres sont calcinés la veille à 450°C pendant 6 heures. Les eaux filtrées sont récoltées dans des flacons en polyéthylène haute densité (Nalgène[®]) de 500 ml. Toutes les eaux sont conservées au congélateur à -20°C.

L'échantillonnage, la filtration et la conservation des eaux ont été optimisés afin de développer une méthode de préparation la plus exhaustive possible pour appréhender l'échantillon en termes d'activité biologique (Chapitre 4). Ce développement a été réalisé sur les eaux provenant de la station de Clos de Hilde (Bègles, 33) et de la station de Biganos (33). Les éléments annoncés précédemment peuvent donc légèrement différer suivant les paramètres testés. Ainsi pour les eaux provenant de ces deux STEP, les prélèvements ont, en parallèle, été également conservés dans des bouteilles en verre neuves, lavées et calcinées, afin d'évaluer l'influence du matériel sur les composés actifs lors du stockage des échantillons. Une partie des eaux a été filtrée avant stockage et une seconde a été conservée telle quelle. Pour ces dernières, la filtration a lieu juste avant l'extraction des composés. Toutes les eaux sont conservées au congélateur à -20°C.

b. L'urine humaine

L'échantillonnage d'urine humaine a été effectué dans le cadre du projet ECOPI. Les prélèvements ont été réalisés chez un homme et une femme adulte en Novembre 2013, la femme étant sous contraceptif oral. La première urine du matin a été prélevée dans des bouteilles en verre neuves, lavées et calcinées la veille. Après prélèvement, les échantillons ont été transportés au frais dans une glacière contenant des pains de glace. Les urines prélevées ont été extraites dès leur arrivée au laboratoire. Aucune étape de filtration n'a été effectuée.

4.3.2 Extraction des composés

a. Extraction sur phase solide

L'extraction sur phase solide (*Solide Phase Extraction*, SPE) permet d'extraire les composés contenus dans les matrices liquides par rétention des composés sur une phase. Une fois retenues, les molécules sont ensuite éluées de la phase par un solvant ou mélange de solvants ayant une forte affinité avec les composés. Ainsi les molécules sont concentrées dans quelques millilitres de solvant. Dans le cadre de l'approche EDA, l'extraction des composés doit être la plus exhaustive possible afin d'extraire toutes les molécules actives de l'échantillon. Par conséquent, il est apparu évident d'utiliser une phase stationnaire capable de balayer une large gamme de coefficients de partage octanol/eau ($\log K_{ow}$) afin de retenir le maximum de composés. Les cartouches SPE de type Oasis[®] HLB (*Hydrophilic-Lipophilic-Balanced*) (6 cc, 200 mg, Waters, Guyancourt, France) constituées de copolymère de divinylbenzène et de N-vinyl-pyrrolidone ont été choisies.

Les cartouches sont préalablement nettoyées avec du dichlorométhane (5 mL), du méthanol (5 mL) est ensuite ajouté servant de solvant de liaison entre le dichlorométhane et l'eau qui sont non miscibles. Les cartouches sont conditionnées avec de l'eau ultra-pure (5 mL). Puis, les échantillons sont percolés au goutte à goutte sur la cartouche. Les composés sont retenus sur la phase et la matrice est éliminée. La phase stationnaire est ensuite séchée durant 45 min sous vide. Enfin, les extraits sont élués avec 10 mL de méthanol, 10 mL d'un mélange méthanol/dichlorométhane (50/50, v:v) et 10 mL de dichlorométhane. L'éluât est ensuite évaporé, sans arriver à sec, dans un système d'évaporation automatique sous vide (RapidVap[®], Bioblock, Fontenay-sous-Bois, France). L'évaporation est terminée manuellement sous flux d'argon. Afin d'éviter la dégradation et la perte de composés durant chaque étape d'évaporation, les extraits sont chauffés à une température maximale de 45°C. Les extraits sont finalement repris dans du méthanol. Un aliquote est effectué pour la réalisation des tests biologiques. Ce dernier est évaporé sous flux d'argon et repris dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Tous les extraits sont stockés à -20°C.

b. Extraction liquide/liquide

En parallèle avec l'extraction sur phase solide, l'extraction liquide-liquide a été réalisée sur les échantillons d'eaux de station d'épuration dans le but de définir la méthode d'extraction la plus adaptée pour appréhender l'activité biologique des échantillons. Les résultats sont exposés Chapitre 4. Le principe s'appuie sur l'affinité que possèdent les composés pour deux phases liquides non miscibles. Les molécules contenues dans l'échantillon (*n.b.* phase aqueuse) vont migrer au contact du solvant organique vers ce dernier. La différence de densité entre les deux phases permet de collecter le solvant organique et ainsi de séparer les composés de la matrice environnementale. Dans une ampoule à décanter, 250 mL d'eau de STEP est introduite et 50 mL de dichlorométhane est ajouté. L'ampoule est agitée et dégazée plusieurs fois. Les deux phases sont ensuite laissées à décanter quelques minutes jusqu'à séparation distincte des deux liquides. Le dichlorométhane plus dense est alors collecté et la phase aqueuse est laissée dans l'ampoule. La même procédure est répétée trois fois. Afin d'éliminer toute la phase aqueuse, l'extrait organique contenant les composés est séché dans un entonnoir rempli de sulfate de sodium (Na_2SO_4). L'extrait est ensuite évaporé, sans arriver à sec, dans un système d'évaporation automatique sous vide (RapidVap[®], Bioblock, Fontenay-sous-Bois, France). L'évaporation est terminée manuellement sous flux d'argon à une température maximale de 45°C. Finalement, l'extrait est repris dans du méthanol et un aliquote est réservé pour les tests *in vitro*. Ce dernier est évaporé sous flux d'argon et repris dans du DMSO. Tous les extraits sont stockés à -20°C.

4.4 Les échantillonneurs passifs de type POCIS

Les échantillonneurs passifs de type POCIS ont été utilisés dans plusieurs projets, l'étude de la rivière *La Dore* et le projet Echibioteb, afin d'échantillonner la colonne d'eau. Les POCIS ont été montés et extraits au laboratoire EPOC-LPTC.

4.4.1 Préparation des POCIS

Afin d'éviter toute contamination éventuelle, chaque élément constituant l'échantillonneur est préalablement nettoyé avant chaque montage de POCIS. La phase Oasis[®] HLB ainsi que les membranes en polyéther sulfone (PES) de 0,1 μm de porosité (VWR, Fontenay-sous-bois, France) sont rincées successivement trois fois au méthanol. Les membranes sont ensuite séchées à 50°C dans une étuve dédiée et la phase est séchée sous vide. Le montage du POCIS consiste à déposer 200 mg de phase Oasis[®] HLB entre deux membranes en PES (Figure 18). Le tout est maintenu entre deux disques en acier inoxydable grâce à des vis et des écrous en inox. La quantité de phase ajoutée est contrôlée par gravimétrie.

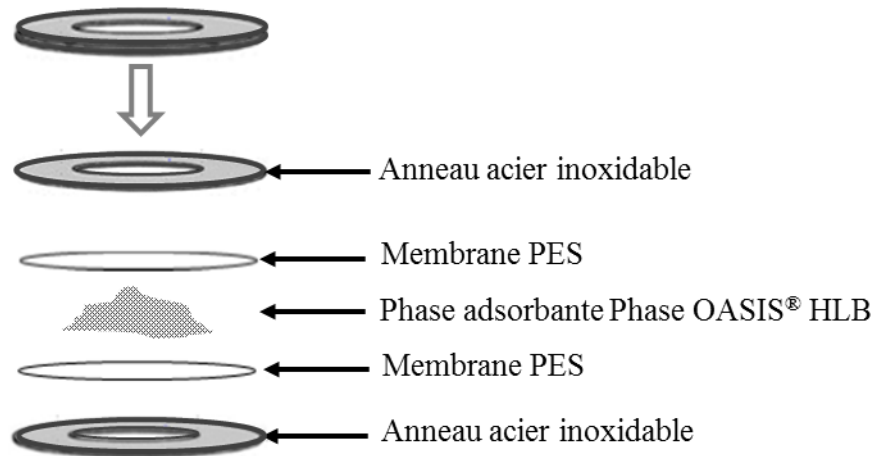


Figure 18 : configuration d'un POCIS ouvert.

4.4.2 Extraction des composés

La procédure de préparation de l'extrait de POCIS est décrite par Tapie *et al.* (2011) et Creusot *et al.* (2014). Après le déploiement sur le terrain, les POCIS sont démontés et la phase est déposée dans des cartouches en verre munies de frittés en Téflon préalablement nettoyés successivement trois fois au méthanol. Avant le transfert de la phase réceptrice, les cartouches et les frittés sont pesés afin de connaître la masse exacte de phase ajoutée. L'ensemble est séché sous vide jusqu'à ce que la phase ait un aspect de poudre libre. Les composés sont ensuite élués avec 10 mL de méthanol, 10 mL d'un mélange méthanol/dichlorométhane (50/50, v :v) et 10 mL de dichlorométhane. L'éluât est ensuite évaporé, sans arriver à sec, dans un système d'évaporation automatique sous vide (RapidVap[®], Bioblock, Fontenay-sous-Bois, France). L'évaporation est terminée manuellement sous flux d'argon à une température maximale de 45°C. Les extraits sont finalement repris dans du méthanol et stockés à -20°C. Avant d'être vidées et nettoyées, les cartouches contenant les frittés et la phase sont pesées. La différence de masse avec la cartouche contenant seulement les deux frittés permet d'obtenir la quantité de phase extraite.

4.5 Préparation du *biota*, cas appliqué aux bivalves

Les extraits de moule (*Mytilus sp.*) ont été préparés par l'ANSES, unité de recherche « Toxicologie des Contaminants » (35). Le protocole de préparation est décrit par Ledreux *et al.* (2012). Les coquillages sont disséqués et la glande digestive est gardée. Les glandes digestives provenant de plusieurs organismes sont homogénéisées et extraites trois fois avec 50 mL d'acétone. Le surnageant est récupéré et volatilisé par évaporation rotative. Une extraction par ajout de 50 mL de dichlorométhane est ensuite réalisée de façon à éliminer la phase aqueuse. Les composés lipophiles vont migrer vers le dichlorométhane. Ce dernier est ensuite récupéré et le même processus est réalisé deux fois. Pour éliminer totalement les

composés hydrophiles, les extraits sont rincés deux fois avec 15 mL de l'eau. Finalement, les extraits sont évaporés à sec et repris dans du méthanol et filtrés à travers des filtres en nylon de 0,22 μm . La concentration finale de l'extrait de bivalves est de 5 g d'hépatopancréas. mL^{-1} . L'extrait est ensuite conservé à -80°C .

5 Les procédures de fractionnement

Le fractionnement de tous les échantillons a été mené au laboratoire EPOC-LPTC. Plusieurs procédures ont été développées et appliquées suivant la complexité des échantillons et leurs propriétés physico-chimiques.

5.1 Le fractionnement par SPE : fractionnement primaire pour matrice solide

Le fractionnement par SPE a été développé durant les travaux de thèse de Creusot (2011) et a été publié par Creusot et al. (2013). Les cartouches de silice 500 mg, 6 cc (SupelcleanTM LC-Si SPE, Supelco[®], St Quentin Fallavier, France) ont été choisies pour leurs propriétés séparatives. Le développement a été effectué sur une solution constituée de 11 composés ayant des log Kow compris entre 2 et 7 et sur un sédiment supplémenté avec cette même solution. Les rendements d'extraction des composés obtenus lors du développement sont compris entre 118% et 88% pour les composés en solution (Figure 19). Pour les molécules contenues dans le sédiment, un léger effet matriciel est observé puisque les rendements sont légèrement inférieurs à ceux observés pour les composés en solution (Creusot et al., 2013). Les valeurs obtenues sont comprises entre 99% et 63%. Globalement, les rendements sont satisfaisants puisque les composés sont extraits à plus de 70 %, à l'exception du clotrimazole pour lequel le rendement est de 63 % (Figure 19).

Le protocole de fractionnement SPE a été appliqué durant ces travaux de thèse aux extraits de matrices solides pour permettre d'effectuer une première séparation des composés. Dans un premier temps, la cartouche est conditionnée avec 5 mL d'heptane. L'échantillon préalablement repris dans l'heptane est déposé sur la phase. L'élution des composés débute par l'ajout de 10 mL d'heptane, constituant ainsi la première fraction. 10 mL d'un mélange heptane/dichlorométhane (50/50, v:v) sont ensuite ajoutés. Les composés élués par ce mélange de solvants forment la seconde fraction. L'élution continue avec 10 mL d'acétate d'éthyle et se termine par 10 mL d'un mélange méthanol/eau ultra-pure (50/50, v:v) permettant ainsi de former la troisième et quatrième fraction. Ce protocole sépare l'extrait environnemental en quatre fractions de polarités croissantes. Chaque fraction est ensuite évaporée sous flux d'argon jusqu'au volume final souhaité. Comme pour chaque préparation d'extrait, les fractions sont séparées en deux. Un aliquote est destiné aux tests biologiques, le second est réservé pour un fractionnement supplémentaire ou pour l'analyse chimique. Les fractions sont suivies par gravimétrie et conservées à -20°C .

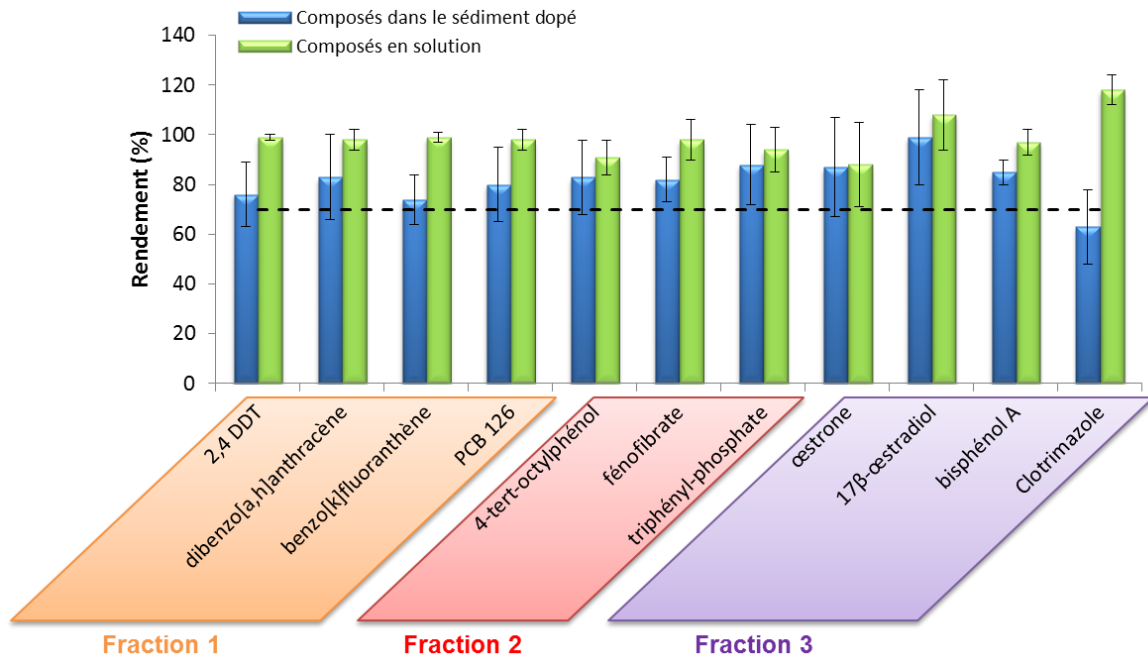


Figure 19 : Rendements d'extraction obtenus sur cartouches Supelclean™ LC-Si (n = 3) (Creusot et al., 2013). Aucun composé n'a été détecté dans la fraction 4.

5.2 Le fractionnement par chromatographie liquide

Dans le but de réaliser une séparation fine des composés biologiquement actifs, un fractionnement par chromatographie en phase liquide a été développé. Pour que ce fractionnement puisse être adapté à tous extraits d'échantillon, deux modes de séparation ont été mis en place, un fractionnement en phase inverse et un fractionnement en phase normale. Pour le Programme National Arcachonnais, un fractionnement optimisé pour l'extrait de bivalves a été spécialement développé pour le projet et est présenté Chapitre 6.

Une chaîne HPLC (Agilent HPLC system, série 1200) équipée d'un détecteur UV/Visible à barrettes de diodes (Agilent série 1200) et d'un collecteur automatique de fractions (Agilent série 1260 infinity) (Agilent Technologies, Les Ulis, France) a été utilisée pour développer et appliquer les différents fractionnements (Figure 20). Les développements pour le fractionnement en phase inverse et normale sont exposés Chapitre 4.

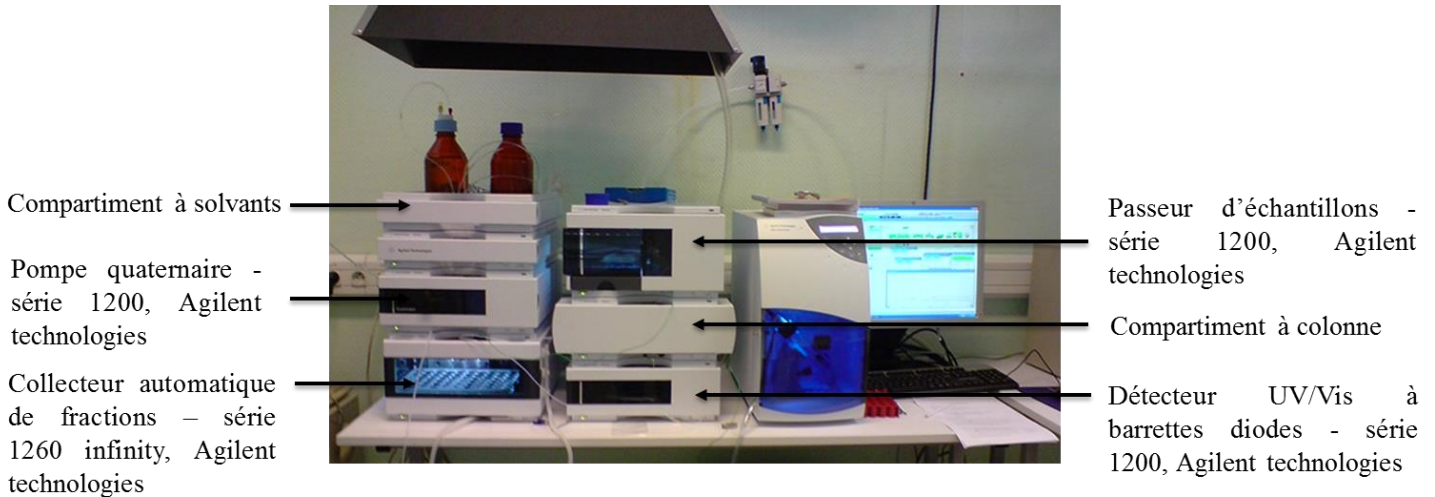


Figure 20 : Chaîne HPLC équipée d'un détecteur UV/Visible à barrettes de diodes et d'un collecteur automatique de fractions (Agilent Technologies, Les Ulis, France).

5.2.1 Assurance qualité pour la préparation des fractions par HPLC

Les mêmes consignes que celles citées pour la préparation des échantillons sont appliquées lors du fractionnement de façon à éviter la contamination des échantillons (Chapitre 3 §4.1, p 78). Pour s'assurer de la répétabilité de la procédure de séparation (*i.e.* temps de rétention), une solution de contrôle qualité contenant 9 et 16 composés en phase inverse et phase normale, respectivement, est injectée avant chaque fractionnement. De façon à vérifier l'absence de contamination, un blanc de procédure est réalisé en amont du fractionnement du blanc d'extraction et de l'extrait de l'échantillon.

5.2.2 Fractionnement en RP-HPLC

Le fractionnement en phase inverse est basé sur les travaux de Creusot (2011) et Creusot et al. (2013). Avant injection, l'échantillon est évaporé et repris dans 100 μL d'un mélange d'eau ultra-pure /acétonitrile (80/20, v:v). Les composés présents dans l'extrait injecté sont séparés sur une colonne de silice greffée C18 (C18 Spherisorb ODS2, 5 μm , 4,6 x 250 mm) (Waters, Milford, USA). Le gradient d'une durée de 120 min débute par un mélange eau ultra-pure/acétonitrile (80/20, v:v) et se termine à 100 % d'acétonitrile avec un débit fixé à 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (Figure 21). Toutes les 3 min, une fraction est collectée. Au total, 40 fractions sont obtenues par RP-HPLC (f1 à f40) et sont évaporées à sec sous évaporateur automatique EZ-2 Plus (Genevac[®], Fischer scientifique, Illkirch, France) et sous flux d'argon à 45°C. Après reprise dans du méthanol, chaque fraction est divisée en deux, l'une destinée aux tests biologiques, l'autre à l'analyse chimique. Les fractions à tester biologiquement sont ensuite à nouveau séparées en deux. Un des aliquotes est destiné à reformer l'extrait global sans fractionnement. Ainsi, les aliquotes sont regroupés dans un même flacon. L'extrait reconstitué est évaporé juste à sec sous flux d'argon et repris dans le solvant souhaité pour le bio-essai employé (*e.g.* méthanol, DMSO, acétonitrile). L'activité biologique des fractions combinées

est comparée à celle de l'extrait brut de façon à vérifier l'absence de perte d'effets biologiques liés au processus de fractionnement et éventuellement observer la présence d'effets de mélange entre les molécules. Le second aliquote des fractions réservées aux tests biologiques est évaporé sous flux d'argon et repris dans le solvant désiré pour effectuer les bio-essais. Toutes les fractions sont suivies par gravimétrie et conservées à -20°C.

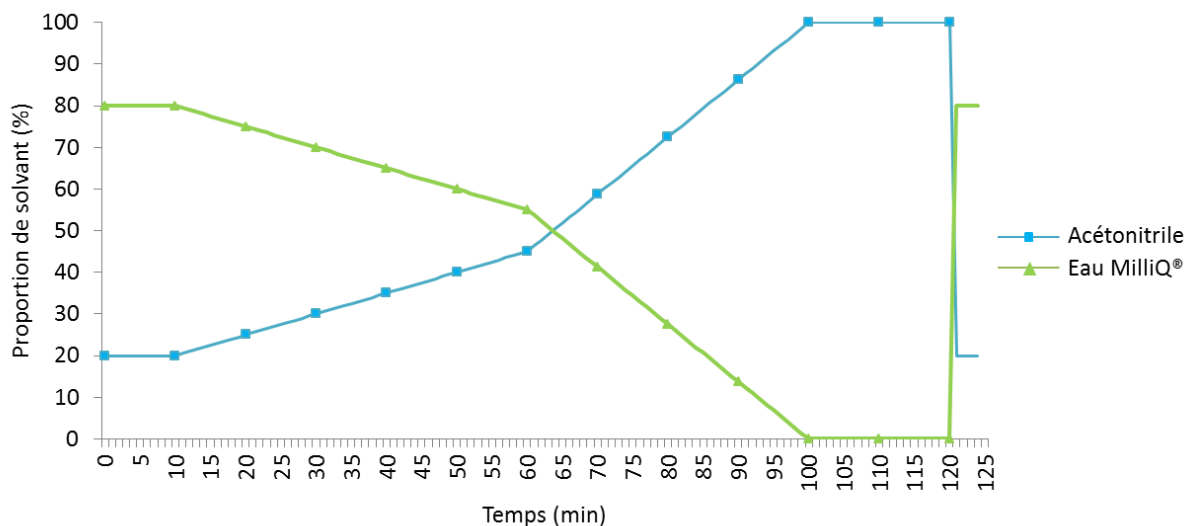


Figure 21 : Gradient d'élution de la phase mobile en RP-HPLC.

5.2.3 Fractionnement en NP-HPLC

Le fractionnement en phase normale est réalisé sur un extrait d'échantillon préalablement évaporé et repris dans 100 µL d'isooctane. La séparation des molécules s'effectue sur une colonne de silice greffée avec NH₂ (Microsorb NH₂ 100- 5, 4,6 x 250 mm, Varian®) (Agilent technologies, Les Ulis, France). Le gradient d'élution est composé de trois solvants (*n.b.* pentane, dichlorométhane, acétonitrile). Les conditions du gradient sont résumées dans le Tableau 14. Une fraction est collectée toutes les 2 min. Au total, 20 fractions sont obtenues par NP-HPLC (f1 à f20) et sont évaporées à sec sous flux d'argon à 45°C. Tout comme pour le fractionnement en RP-HPLC, chaque fraction est reprise dans du méthanol, est divisée en deux pour effectuer les tests biologiques et en parallèle les analyses chimiques. L'extrait global sans fractionnement est également reconstitué dans les mêmes conditions qu'exposées précédemment (Chapitre 3, §5.2.2, p 87). Toutes les fractions sont suivies par gravimétrie et conservées à -20°C.

Tableau 14 : Gradient d'élution utilisé en NP-HPLC

Temps (min)	Pentane (%)	Dichlorométhane (%)	Acétonitrile (%)	Débit (mL.min ⁻¹)
0	100	0	0	1
7	100	0	0	1
17	0	100	0	1
22	0	100	0	1
26	0	0	100	1
30	0	0	100	1
35	0	100	0	1
40	100	0	0	1
45	100	0	0	1

6 L'identification des composés

Après la caractérisation des fractions ayant un effet biologique, l'identification des composés présents dans les fractions actives est effectuée. L'identification peut être réalisée par la recherche de molécules connues en ciblant les analyses sur ces composés ou par la recherche de molécules inconnues ou non ciblées. De manière générale, ces deux types d'analyse sont effectués en parallèle pour l'identification de composés.

6.1 Assurance qualité lors des analyses chimiques

De façon à fournir des résultats analytiques fiables et robustes, chaque instrument analytique est vérifié avant chaque utilisation et plusieurs éléments sont contrôlés avant et pendant l'acquisition des données. La résolution et la calibration des spectromètres de masses sont vérifiées par l'infusion d'une solution de calibration spécifique à chaque appareil fournie par le fabricant. Les limites de détection et de quantification des composés recherchés et la répétabilité des analyses font l'objet d'un suivi régulier. Pour éviter la présence d'interférents lors des analyses, les bouteilles de solvant employées pour la phase mobile sont neuves et de qualité HPLC. L'eau ultra-pure est fraîchement préparée par un système de purification équipé d'un filtre EDS-PAK et l'acide formique à 99% est contenu dans des ampoules individuelles de 1 mL (Chapitre 3, §3, p 78). Pour éviter toute contamination croisée, du solvant (*i.e.* "blancs d'injection") est injecté entre chaque injection d'échantillons tout au long de la séquence d'acquisition. Pour contrôler l'absence d'une dérive instrumentale, une solution standard, contenant les composés à doser et leur étalon interne pour les analyses chimiques ciblées ou des molécules connues pour les analyses chimiques non ciblées, est injectée régulièrement durant la séquence

6.1.1 Généralités

Les analyses de molécules ciblées ont été menées sur des fractions ou des extraits d'échantillon globaux. Elles permettent d'obtenir une détection rapide des composés présents à des concentrations relativement faibles. Elles sont généralement réalisées lorsque la présence d'un composé ou d'une famille de composés, pouvant expliquer les effets biologiques observés, est supposée. Pour les fractions obtenues par HPLC, l'hypothèse de la présence de telle ou telles molécules est annoncée en se basant sur le chromatogramme de la solution de référence (en phase inverse ou phase normale) constituée de plusieurs molécules (Chapitre 4, section 2.1, p 114). Ce chromatogramme est permet de connaître l'élution et la collecte de certains composés suivant les fractions.

Les techniques de séparation sont sélectionnées suivant les propriétés physico-chimiques des composés recherchés. Ainsi, les analyses des composés volatils ou volatilissables sont réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse simple ou en tandem (GC-MS, GC-MS/MS) ou à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD). L'analyse des molécules plutôt polaires est effectuée par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS) avec une source d'ionisation par nébulisation (ESI). Les analyses par GC-MS et GC-ECD permettent d'identifier les molécules par rapport à leurs temps de rétention. Les instruments utilisant la spectrométrie de masse en tandem possèdent trois quadrupôles (QqQ) et sont utilisés en mode MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), excepté l'analyse en GC-MS/MS pour les HAP. Par cette technique, quatre critères sont contrôlés pour permettre une identification fiable des composés :

- i. Le temps de rétention de l'analyte
- ii. La transition de quantification
- iii. La transition de confirmation
- iv. Le rapport de l'intensité entre ces deux transitions

La quantification des composés étudiés est faite soit par étalonnage interne, soit pour quelques molécules par étalonnage externe. Pour la méthode d'étalonnage interne, les fractions ou extraits à injecter sont supplémentés avant l'analyse par une quantité connue en composés isotopiquement marqués (*i.e.* les étalons internes). Ces étalons doivent être initialement absents de l'échantillon et doivent posséder des propriétés physico-chimiques très proches de l'analyte afin d'avoir un comportement similaire au cours de l'analyse.

Des analyses sur différentes familles de composés ont été effectuées pour la détection de molécules connues. Toutes les méthodes d'analyse et les composés recherchés sont listés dans les paragraphes suivants.

6.1.2 Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les HAP sont analysés par GC-MS (GC série 6890 et détecteur, série 5973, Agilent technologies, Waghauseel, Germany) et GC-MS/MS (GC série 7890, QqQ série 7000 B, Agilent technologies, Waghauseel, Germany) en mode SIM (*Single Ion Monitoring*). L'analyse par GC-MS/MS est réservée aux fractions non analysables par spectrométrie de masse simple (*e.g.* effets matriciels trop importants masquant les composés) ou aux fractions ayant des HAP en concentration faible. Les conditions analytiques et les limites de quantification des composés obtenues par ces méthodes d'analyse sont présentées Annexe II.

6.1.3 Polluants organiques persistants

Les polluants organiques persistants (POP) (*i.e.* polychlorobiphényles, PCB, polybromodiphényléthers, PBDE et pesticides organochlorés, OCP) sont analysés par GC-ECD pour l'analyse des lisiers porcins et pour les boues de STEP. Plusieurs GC-ECD sont disponibles au laboratoire EPOC-LPTC, deux instruments analytiques ont été utilisés sur ces études :

- Un système de chromatographie en phase gazeuse (série G 1530 A, Agilent technologies) couplé avec un détecteur à capture d'électrons (série G 2397 A, Agilent technologies).
- Un système de chromatographie en phase gazeuse plus récent (série G 1530 N, Agilent technologies) couplé avec un détecteur à capture d'électrons (série G 2397 A, Agilent technologies)

Le choix de l'appareil dépend de sa disponibilité. Les conditions analytiques et les limites instrumentales des composés obtenues par ces méthodes d'analyse sont présentées Annexe III.

6.1.4 Médicaments

Les médicaments sont analysés par LC-MS/MS (chaîne HPLC série 1200, QqQ serie 6410, Agilent technologies, Santa Clara, USA). Les conditions analytiques et les limites instrumentales de quantification des composés obtenues par la méthode d'analyse sont présentées Annexe IV. Les paramètres de détection (*e.g.* ions fragments, tension de fragmentor, énergie de collision...) sont détaillés dans la thèse de Marion-Justine Capdeville (2011).

6.1.5 Stéroïdes

Les stéroïdes sont analysés par LC-MS/MS sur une chaîne UPLC Acquity Waters (Ultra Performance Liquid Chromatography) couplé à un spectromètre de masse à triple quadrupôle Quattro Premier XE triple quadrupôle (Waters, Guyancourt, France). Pour une meilleure sensibilité, les œstrogènes sont analysés sur une chaîne HPLC 1290 Infinity Agilent Technologies couplée à un spectromètre de masse en tandem Agilent Technologies série 6490.

Les conditions analytiques et les paramètres de détection des appareils optimisés pour chaque composé sont présentés en Annexe V. Les limites instrumentales de quantification des composés obtenues par les méthodes d'analyse sont données Annexe V.

6.1.6 Pesticides

Les pesticides sont analysés par LC-MS/MS (chaîne HPLC série 1290, QqQ série 6460, Agilent technologies, Santa Clara, USA). Les conditions analytiques et les limites instrumentales de quantification des composés obtenues par la méthode d'analyse sont présentées Annexe VI. Les paramètres de détection (*e.g.* ions fragments, tension de fragmentor, énergie de collision...) sont détaillés dans la thèse de Angel Belles (2012).

6.2 Les analyses non ciblées par spectrométrie de masse haute résolution

Les composés présents dans les extraits ou fractions d'échantillons ayant un effet biologique sont identifiés par spectrométrie de masse haute résolution. L'analyseur utilisé est un spectromètre de masse hybride quadrupôle/temps de vol (*i.e.* *Quadrupole/ Time Of Flight*, QTOF). Cette configuration allie la sélectivité du quadrupôle à la résolution de l'analyseur à temps de vol. Ce spectromètre est couplé à la chromatographie en phase liquide (LC-QTOF) ou à la chromatographie en phase gazeuse (GC-QTOF). Ces deux instruments ont été employés et optimisés dans ces travaux de thèse pour identifier les molécules présentes dans des extraits et des fractions environnementaux ayant des polarités différentes. L'analyse par LC-QTOF est privilégiée pour les fractions plutôt hydrophiles alors que l'analyse par GC-QTOF sera réservée aux fractions plus hydrophobes. Les performances des appareils ainsi que les stratégies d'identification sont présentées Chapitre 5.

6.2.1 Méthode analytique en LC-QTOF

Les analyses sont réalisées avec une chaîne HPLC (série 1209 Infinity, Agilent technologies, Santa Clara, USA) couplée à un spectromètre de masse hybride QTOF (série 6540, Agilent technologies, Santa Clara, USA) (Figure 22).



Figure 22 : LC-QTOF (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

Les composés sont séparés sur une colonne de silice greffée avec une chaîne alkyle de 18 atomes de carbone (Kinetex[®] C18, 100 x 2,1 mm, 1,7 μm) (Phenomenex, Agilent technologies, Les Ulis, France). Les solvants d'élution employés sont l'eau ultra-pure MilliQ filtré sur EDS-PAK et de l'acétonitrile. En mode d'ionisation positif, afin d'améliorer la séparation chromatographique, la reproductibilité des analyses et surtout l'ionisation des molécules, de l'acide formique est ajouté dans chaque solvant à 0,1%. Différents gradients ont été mis en place afin de répondre aux différents types d'échantillons (Tableau 15). Ces gradients sont identiques quel que soit le mode d'ionisation appliqué mais peuvent légèrement varier suivant les échantillons analysés afin d'optimiser la séparation des composés.

Tableau 15 : Conditions analytiques génériques pour la séparation des molécules en LC-QTOF.

Type d'échantillon	Extrait global inconnu		Fraction polaire		Fraction apolaire	
Volume d'injection	2 μL		2 μL		2 μL	
Phase éluante	A : Eau ultra-pure (\pm 0,1% acide formique)		A : Eau ultra-pure (\pm 0,1% acide formique)		A : Eau ultra-pure (\pm 0,1% acide formique)	
	B : Acétonitrile (\pm 0,1% acide formique)		B : Acétonitrile (\pm 0,1% acide formique)		B : Acétonitrile (\pm 0,1% acide formique)	
Débit	0,3 mL.min ⁻¹		0,3 mL.min ⁻¹		0,3 mL.min ⁻¹	
Gradient	Temps (min)	% B	Temps (min)	% B	Temps (min)	% B
	0	10	0	10	0	10
	45	100	22	40	8	40
	47	100	30	100	30	100
	49	10	32	100	34	100
	53	10	34	10	36	10
			38	10	40	10
Temps d'acquisition	53 min		38 min		40 min	

Les molécules sont ionisées par électro-nébulisation couplée à un système de gaz gainant (Agilent Jet Stream ESI) permettant une focalisation du flux d'ions et augmentant ainsi la sensibilité analytique. Les paramètres de source ont été déterminés à partir d'une méthode analytique optimisée pour l'analyse multi-résidus (*n.b.* pesticides, hormones et composés pharmaceutiques) (Wund, 2013). Les paramètres sont présentés dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Paramètres de la source d'ionisation des molécules en LC-QTOF.

Éléments	Paramètres en mode d'ionisation positif	Paramètres en mode d'ionisation négatif
Température du gaz de désolvatation	300°C	300°C
Débit du gaz de désolvatation	8 L.min ⁻¹	8 L.min ⁻¹
Pression de nébulisation	40 psi	40 psi
Température du gaz fourreau	400°C	400°C
Débit du gaz fourreau	11 L.min ⁻¹	11 L.min ⁻¹
Tension du capillaire	3000 V	3000 V
Tension du « Nozzle »	0	1500V

L'acquisition des données est effectuée en deux modes suivant la complexité des échantillons.

Pour les échantillons peu complexes (*e.g.* fractions obtenues en HPLC), la détection des molécules est réalisée en mode données-dépendant. Durant une même acquisition, les composés sont détectés par le TOF (mode MS simple) permettant de connaître avec exactitude (*n.b.* 10⁻⁴ Da) le rapport masse sur charge des ions générés, les plus intenses sont sélectionnés puis fragmentés et analysés en mode MS/MS (Q/TOF) permettant d'obtenir ainsi le spectre de fragmentation des ions sélectionnés. Cette méthode d'acquisition permet en une injection d'obtenir un maximum d'informations sur les composés présents dans l'échantillon.

Pour les échantillons complexes (*e.g.* extraits globaux), l'acquisition s'effectue en deux temps. Dans un premier temps, le spectromètre fonctionne en mode MS simple (*i.e.* le quadrupôle ne sélectionne aucun ion) afin de connaître précisément la masse moléculaire des composés détectés. Cette première acquisition permet d'établir une liste d'ions précurseurs à fragmenter. Une seconde analyse est ensuite effectuée en mode MS/MS pour obtenir les spectres de fragmentation des ions sélectionnés.

Les spectres sont acquis sur une gamme de masse comprise entre 70 *m/z* et 1700 *m/z* à une fréquence d'acquisition de 2 GHz. Les ions précurseurs sont soumis à trois énergies de collision (*e.g.* 10, 20 et 40 V ou 20, 40 et 60 V) lors de la fragmentation. Pour le Programme National Arcachonnais, les paramètres de détection sont différents et sont exposés dans le Chapitre 6.

Durant l'acquisition, un composé de référence est continuellement injecté (HP-921 = hexakis(1H, 1H, 3H-tétrafluoropropoxy)phosphazine ; 922.009798 *m/z* [M+H]⁺, 966.000725

m/z [M+HCO₂]) afin de s'assurer qu'aucune dérive en masse n'est apparue au cours de l'enregistrement des données.

Les données chromatographiques sont traitées avec le logiciel *MassHunter Qualitative* (Agilent technologies). La stratégie d'identification est détaillée dans le Chapitre 5.

6.2.2 Méthode analytique en GC-QTOF

Les analyses sont réalisées par chromatographie en phase gazeuse (GC, série 7890 B, Agilent technologies, Santa Clara, USA) couplée à un spectromètre de masse hybride QTOF (série 7200, Agilent technologies, Santa Clara, USA) (Figure 23).



Figure 23 : GC-QTOF (Agilent Technologies, Santa Clara, USA).

L'acquisition des données est effectuée seulement en employant le TOF (*i.e.* mode MS). Une source à impact électronique est utilisée pour former les ions radicalaires. Ces derniers pouvant être instables, peuvent se fragmenter dans la source. Grâce à cette interface, l'utilisation du mode MS permet d'obtenir la masse exacte des ions mais également des informations sur la fragmentation de la molécule. Les conditions analytiques sont présentées dans le Tableau 17 .

Tableau 17 : Conditions analytiques en GC-QTOF.

Éléments	Paramètres en GC-QTOF
Colonne	HP-5MS (Agilent technologies, Massy, France) 5 % Phényle- 95 % Méthyle-siloxane (30 m x 250 µm x 0,25 µm)
Source / énergie	Impact électronique / 70 ev
Mode d'injection /Température/ débit de purge	Sans division pulsée / 280°C/ 60 mL.min ⁻¹ pendant 1.5 min
Volume d'injection	1 µL
Gaz vecteur	Hélium (99,99990%)
Débit	1,3 mL.min ⁻¹
Gradient de température	50 C pendant 2 min , 10°C.min ⁻¹ jusqu'à 320 C, maintenue durant 8 min
Temps d'acquisition	37 min
Gamme de masse	50 à 500 <i>m/z</i>
Fréquence d'acquisition	2 GHz

Les données chromatographiques sont traitées avec le logiciel *MassHunter Qualitative* (Agilent Technologies). La stratégie d'identification est détaillée dans le Chapitre 5.

6.3 La quantification des composés

6.3.1 Quantification par dilution isotopique

La quantification par dilution isotopique a été privilégiée pour le dosage des composés dans les échantillons. En chromatographie, l'aire du pic chromatographique obtenu pour chaque molécule lors de l'analyse est proportionnelle à la quantité massique des composés présents. Cette relation amène ainsi aux équations suivantes :

$$\text{Équation 2,} \quad A_i = k_i \cdot m_i$$

$$\text{Équation 3,} \quad A_e = k_e \cdot m_e$$

Avec, A_i = l'aire du composé *i*,

A_e = l'aire de l'étalon interne *e*,

m_i = la masse du composé *i*,

m_e = la masse de l'étalon interne *e*,

k_i = le facteur de réponse du composé i ,

k_e = le facteur de réponse de l'étalon interne e .

Ce qui conduit au rapport,

$$\frac{A_e}{A_i} = \frac{k_e \cdot m_e}{k_i \cdot m_i}$$

Soit,

$$\text{Équation 4,} \quad K_i = \frac{k_e}{k_i} = \frac{A_e \cdot m_i}{A_i \cdot m_e}$$

Où K_i représente le coefficient de réponse du composé i par rapport à son étalon interne.

Le coefficient de réponse est déterminé par l'injection d'une solution étalon constituée de l'ensemble des composés et des étalons internes en concentration connue. Il sera égal à 1 lorsque l'analyte possède son analogue marqué en étalon interne.

La masse du composé i dans l'échantillon est déterminée d'après la formule suivante :

$$\text{Équation 5,} \quad m_i = K_i \cdot m_e \frac{A_i}{A_e}$$

De façon à contrôler la justesse de la quantification, une seconde solution étalon contenant l'ensemble des composés et des étalons internes est injectée en concentration connue. Les solutés sont quantifiés d'une manière similaire aux analytes contenus dans un échantillon et les valeurs mesurées sont comparées aux quantités théoriques. Les rendements de quantification doivent être le plus proches possible de 100 %.

6.3.2 Quantification par étalonnage externe

Lorsque aucun étalon interne adéquat n'est disponible, la quantification des composés s'effectue par étalonnage externe. La technique consiste à comparer le signal chromatographique de la molécule détectée dans l'échantillon à celui obtenu pour le même composé présent dans une solution étalon, injecté en quantité connue. La comparaison s'effectue sur la base d'une droite représentant la réponse chromatographique de l'analyte en fonction de la concentration injectée (Figure 24). La molécule de référence est injectée à différentes concentrations et la réponse chromatographique en chaque point de dilution est relevée. Sur la gamme de réponse linéaire, la concentration en composé présent dans l'échantillon est déterminée grâce à l'équation de la droite et au signal chromatographique obtenu.

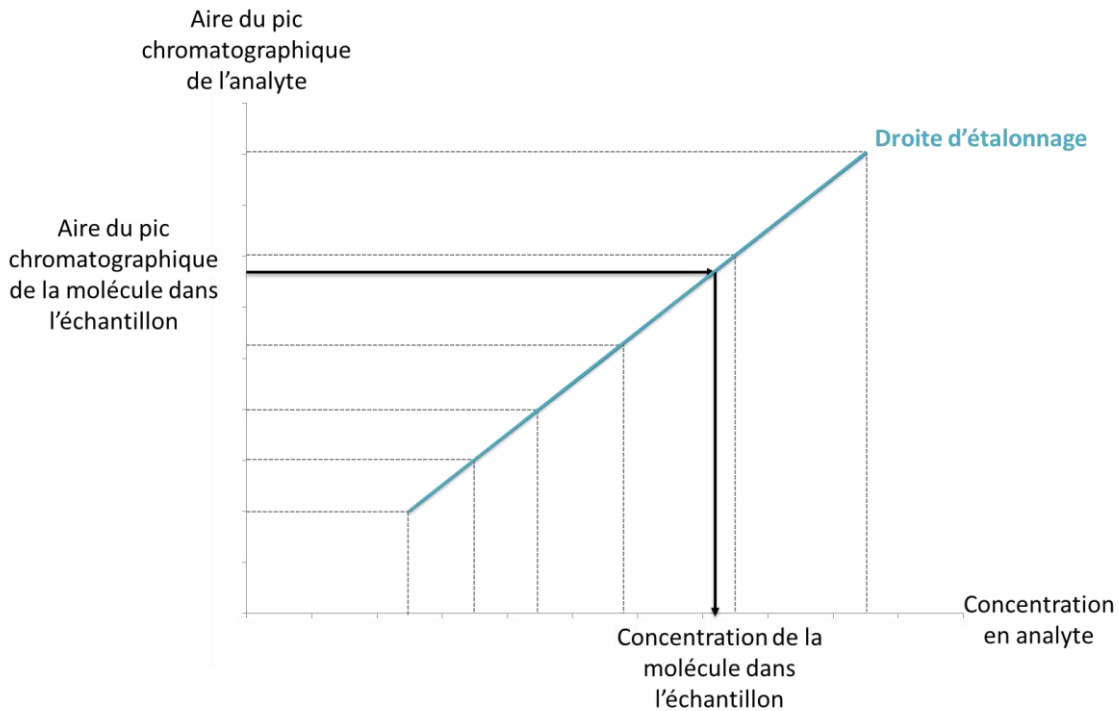


Figure 24 : Droite d'étalonnage externe

6.3.3 Quantification par ajouts dosés

La méthode des ajouts dosés est une technique de quantification qui peut s'appliquer comme pour l'étalonnage externe lorsqu'aucun étalon interne n'est disponible. La méthode consiste à ajouter dans l'échantillon, une quantité connue du composé à analyser. Lors d'une première analyse, l'échantillon brut est injecté pour connaître la réponse chromatographique de la molécule à doser. L'analyse de l'échantillon supplémenté en analyte à différentes concentrations est ensuite effectuée. Dans ces travaux de thèse, trois concentrations sont utilisées afin d'encadrer le signal chromatographique de l'analyte à doser. Après analyse, une droite renseignant l'aire obtenue en fonction de la concentration est tracée. Comme pour l'étalonnage externe, la concentration en composé présent dans l'échantillon est déterminée grâce à l'équation de la droite et au signal chromatographique obtenu. Cette méthode permet de prendre en compte les effets matriciels qui pourraient influencer le signal analytique.

Chapitre 4

*Développements et validations
méthodologiques*

Chapitre 4-Développements et validations méthodologiques

1	Influence des processus de préparation des échantillons sur l'activité biologique mesurée : cas des matrices liquides.....	103
1.1	Le prélèvement	104
1.2	La conservation de l'échantillon.....	105
1.2.1	La filtration.....	105
1.2.2	Le matériel de conservation de l'échantillon	106
1.3	L'extraction	108
1.3.1	Choix de l'extraction.....	108
1.3.2	Validation des solvants d'élution	109
1.3.3	Influence de la déconjugaison	111
1.4	Conclusion	112
2	Développement et validation du fractionnement par HPLC	112
2.1	Profils chromatographiques de référence	114
2.2	Validation au regard des activités biologiques	116
2.3	Conclusion	119

Chapitre 4-Développements et validations méthodologiques

Avant-propos

Dans l'objectif de mettre en place une démarche EDA robuste et adaptée à différentes matrices environnementales, des développements méthodologiques ont été réalisés. A l'issue des travaux de thèse de Creusot, (2011), un fractionnement par SPE dédié aux matrices solides et un fractionnement par RP-HPLC pour les composés plutôt hydrophiles ont été effectués. Au cours de cette thèse, les développements ont porté sur l'extraction des matrices de liquide et le fractionnement par NP-HPLC adapté aux composés hydrophobes afin de compléter les travaux précédents.

Ce chapitre expose les développements et les validations réalisés au cours de cette thèse.

1 Influence des processus de préparation des échantillons sur l'activité biologique mesurée : cas des matrices liquides

L'analyse dirigée par l'effet est employée pour rechercher les composés biologiquement actifs dans les échantillons. L'étape de préparation de l'échantillon demande une attention particulière afin de pouvoir conserver, du prélèvement à l'analyse, toutes les molécules induisant l'effet biologique ciblé. Un développement axé sur les matrices liquides de type aqueuses a été effectué. Il porte sur l'influence des différentes étapes de préparation sur les perturbateurs endocriniens. Quatre niveaux ont été évalués :

- i. Le prélèvement
- ii. La filtration
- iii. La conservation
- iv. L'extraction

Le développement a été réalisé sur des eaux usées brutes et traitées de deux STEP girondines, la station de Clos de Hilde et la station de Biganos (Chapitre 3, section 1.1.1, p61 et 1.1.3, p65). Pour des raisons pragmatiques, les activités biologiques suivies sont l'activité œstrogénique évaluée par les lignées cellulaires HELN-ER α (INSERM, unité IRCM, Montpellier) et MELN (INERIS, unité ECOT, Verneuil-en-Halatte) et l'activité androgénique mesurée à l'aide de la lignée cellulaires MDA-kb2 (INERIS, ECOT, Verneuil-en-Halatte).

1.1 Le prélèvement

Selon Teerlink et al., (2012), les concentrations de certains composés dans les eaux usées brutes peuvent varier aux cours de la journée. Il a été observé que certaines molécules étaient présentes en quantité importante tôt le matin et que leur concentration était plus faible en journée dans le réseau. Ainsi, le prélèvement moyenné est recommandé en termes de représentativité mais au cours du prélèvement les composés peuvent évoluer. Par conséquent, il est apparu important d'évaluer, en termes d'activité œstrogénique, l'influence du prélèvement sur l'effet biologique médié par les échantillons. Pour cela, les eaux d'entrée des deux STEP ont été prélevées ponctuellement en milieu de matinée et moyennées sur un jour en Avril 2012. En parallèle à l'échantillonnage ponctuel, le même prélèvement a été laissé durant 24h dans les mêmes conditions que la collecte de l'échantillon sur un jour. L'objectif était d'évaluer l'évolution de l'activité biologique et d'observer d'éventuelles dégradations ou transformations de molécules actives. Tous les échantillons collectés ont été filtrés puis extraits par SPE selon le protocole exposé en section 4.3.2 du Chapitre 3 (p82). Les extraits ont été testés biologiquement sur la lignée cellulaire HELN-ER α par l'équipe IRCM de l'INSERM.

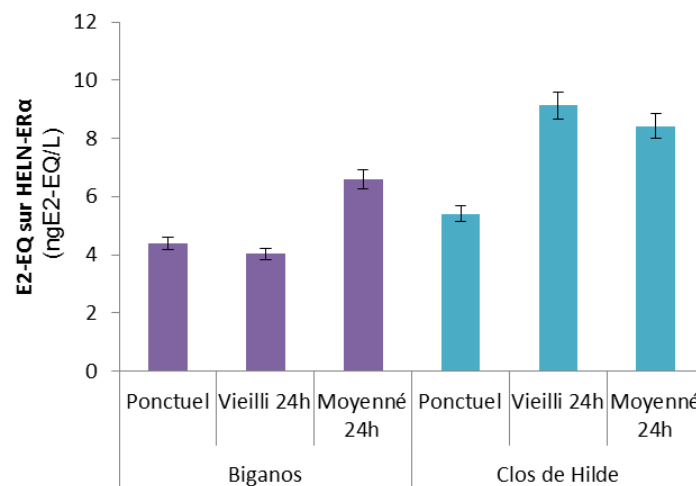


Figure 25 : Activité œstrogénique mesurée à partir de la lignée cellulaire HELN-ER α dans les eaux usées brutes de deux stations d'épuration, Biganos et Clos de Hilde, prélevées en ponctuel et moyennées sur un jour (moyenné 24h). Le terme « vieilli 24h » correspond à l'échantillon ponctuel laissé 24h dans le collecteur en STEP. L'activité est exprimée en ngE2-EQ/L. Les extraits ont été déposés sur les cellules en triplicat (n=3 puits). Les barres d'erreurs représentent une marge d'erreur théorique de 5%.

L'activité œstrogénique de l'échantillon prélevé ponctuellement est inférieure à celle de l'échantillon prélevé sur 24h pour les deux STEP (Figure 25). Le résultat du prélèvement ponctuel représente une valeur à un instant donné. Afin de conclure sur une réelle influence du prélèvement, un échantillonnage sur une journée doit être réalisé (*e.g.* heure par heure), l'activité de chaque prélèvement devant être évaluée indépendamment. Cependant, il peut être considéré que l'heure du prélèvement ne possède que peu l'influence sur l'activité biologique mesurée dans ces deux STEP. En effet, la dimension des canalisations peut pondérer les

concentrations en composés. Ainsi plus un réseau aura une superficie faible, plus le flux de composés varie en fonction du temps et inversement (Teerlink et al., 2012). Les stations de Biganos et de Clos de Hilde ont un réseau d'assainissement relativement étendu de plusieurs milliers de kilomètres (*e.g.* 3 952km pour Clos de Hilde). Il est donc envisageable que l'heure du prélèvement ne possède pas ou très peu d'impact sur l'activité biologique observée en entrée de STEP.

Concernant l'évolution du prélèvement ponctuel sur 24h (« vieilli 24h) dans les mêmes conditions que le prélèvement moyenné sur un jour, une différence entre cet échantillon est celui prélevé ponctuellement non vieilli est observable pour la station de Clos de Hilde (Figure 25). Une augmentation d'activité œstrogénique a été mesurée passant de 5,4 ng E2-EQ/L à 9,1 ng E2-EQ/L. Cette augmentation peut être liée à la dégradation et/ou la transformation de composés entraînant l'apparition de produits pouvant avoir une activité biologique plus importante que celle des composés parents. La maturation de l'extrait a pu également dégrader des ligands antagonistes induisant alors une augmentation du rapport ligands agonistes/antagonistes dans l'échantillon.

Dans une optique d'évaluation environnementale, le prélèvement moyenné sur un jour est plus représentatif des entrées en composés dans les STEP qu'un prélèvement ponctuel. Il englobe les variations de flux de composés. Il n'est malgré tout pas exclu qu'il y ait des transformations au cours des 24h et que l'activité biologique en soit modifiée.

1.2 La conservation de l'échantillon

Dès leur arrivée au laboratoire, les échantillons doivent être conservés dans l'attente de leur extraction. La conservation s'effectue à -20°C. Cependant, des questionnements sur le matériel de stockage et sur la filtration de l'échantillon se sont posés pour la conservation des activités biologiques.

1.2.1 La filtration

L'influence de la filtration sur l'activité œstrogénique des échantillons d'eaux provenant des deux STEP a été évaluée. Les échantillons d'eaux usées brutes et traitées prélevées sur un jour pour les STEP de Biganos et de Clos de Hilde ont été filtrés avant leur stockage à -20°C ou après le stockage, c'est-à-dire juste avant leur extraction. Les échantillons ont été filtrés sur filtres GFF (0,7 µm) préalablement calcinés à 450°C pendant 6h. Les échantillons sont conservés dans du polyéthylène haute densité. Les filtrats ont ensuite été extraits par SPE selon le protocole exposé en section 4.3.2 du Chapitre 3 (p 82). Les extraits ont été testés biologiquement sur la lignée cellulaire HELN-ER α à l'INSERM.

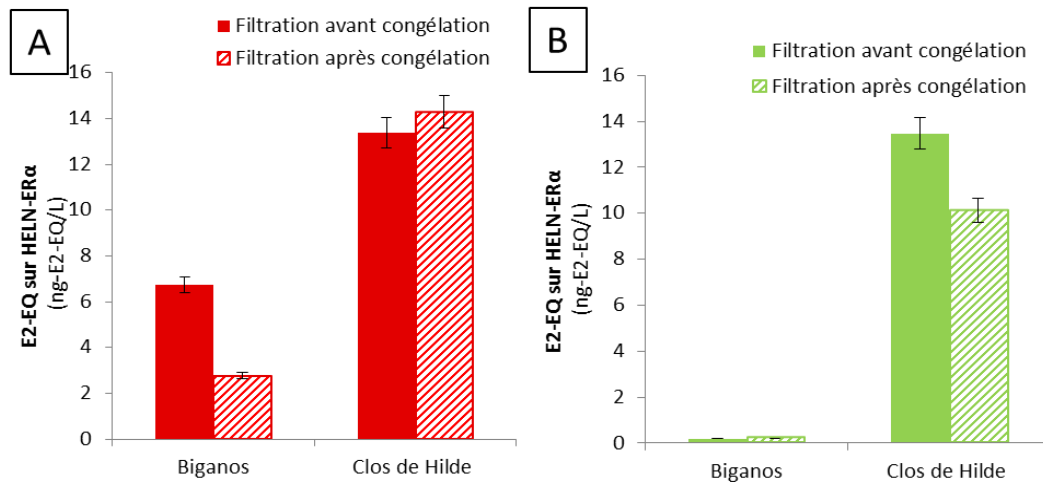


Figure 26 : Activité œstrogénique mesurée dans les extraits d'eaux usées brutes (A) et traitées (B) issues des STEP de Clos de Hilde et de Biganos en suivant deux procédures de filtration : filtrée avant ou après le stockage par congélation à -20°C . Les échantillons ont été conservés dans du polyéthylène haute densité. L'activité est exprimée en ngE2-EQ/L. Les extraits ont été déposés sur les cellules HELN-ER α en triplicat ($n=3$ puits). Les barres d'erreurs représentent une marge d'erreur théorique de 5%.

Suivant les stations et le type d'échantillon, c'est-à-dire eaux usées brutes ou traitées, le moment de la filtration a une influence sur l'activité œstrogénique mesurée (Figure 26). Pour l'eau usée brute de la STEP de Biganos et l'eau traitée de la station de Clos de Hilde, les réponses biologiques sont moins intenses quand l'échantillon est filtré après congélation, juste avant l'extraction. Par contre pour l'eau traitée de Biganos ou l'eau brute de Clos de Hilde, la filtration avant ou après congélation ne semble pas impacter l'activité œstrogénique. Aucune tendance générale ne peut être dégagée des résultats obtenus.

Le moment de la filtration peut ou non avoir une influence sur les activités biologiques des échantillons mais cet impact est dépendant de la composition de l'échantillon. Ce test ne peut être effectué systématiquement lors de criblages de plusieurs échantillons. Par conséquent, pour des raisons pratiques, il a été choisi de filtrer l'échantillon d'eaux dès l'arrivée au laboratoire, c'est-à-dire avant le stockage à -20°C .

1.2.2 Le matériel de conservation de l'échantillon

Suivant les propriétés physico-chimiques des molécules, des phénomènes adsorptions peuvent être observés dans les échantillons prélevés et stockés dans du verre ou du polyéthylène haute densité. Il est apparu intéressant d'évaluer l'influence du matériel dans lequel est conservé l'échantillon sur les composés actifs et par conséquent sur l'activité biologique. La station d'épuration de Clos de Hilde a été prélevée durant trois jours successifs en entrée et sortie de traitement (Janvier 2013). Les prélèvements ont été moyennés sur un jour. Les échantillons ont été filtrés sur filtre GFF ($0,7\ \mu\text{m}$) puis transférés dans des bouteilles

en verre ou en polyéthylène haute densité avant stockage à -20°C. Les filtrats ont ensuite été extraits par SPE selon le protocole exposé en section 4.3.2 du Chapitre 3 (p 82). Les activités œstrogéniques et androgéniques des extraits ont été évaluées sur les lignées cellulaires MELN et MDA-kb2, respectivement.

Les résultats de l'influence du matériel de stockage des échantillons sur les réponses œstrogéniques et androgéniques sont présentés en Figure 27. Pour tous les échantillons à l'exception de l'activité androgénique de l'eau traitée prélevée le jour 1, les filtrats conservés dans du verre possèdent des activités biologiques sensiblement supérieures aux échantillons stockés dans du polyéthylène. Néanmoins en tenant compte des barres d'erreurs, la tendance ne peut être confirmée statistiquement. Il peut donc être conclu que globalement, la conservation dans du verre ou dans du polyéthylène haute densité n'a pas une influence clairement marquée sur l'activité œstrogénique et androgénique pour les eaux de STEP.

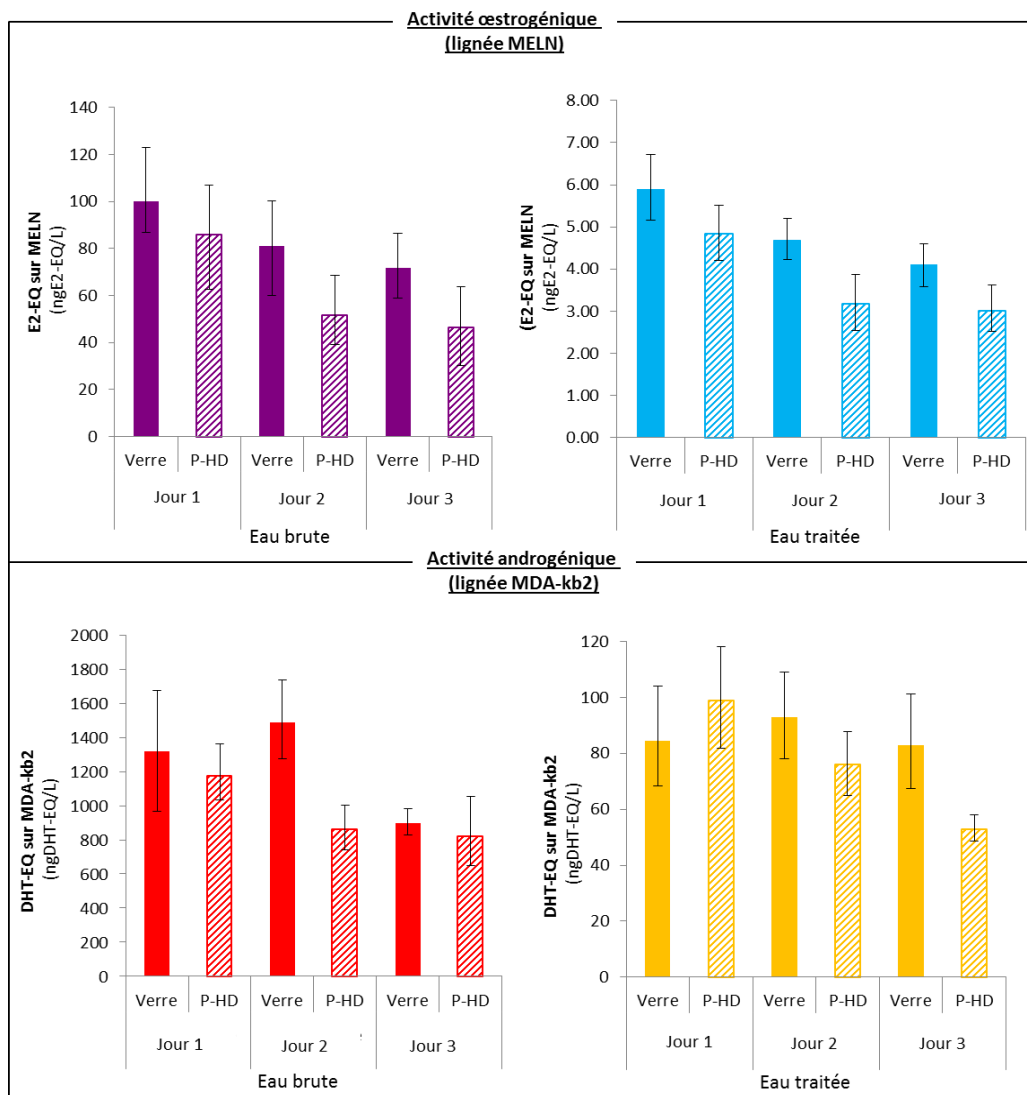


Figure 27 : Activités œstrogéniques et androgéniques mesurées, dans les extraits d'eaux usées brutes et traitées issues de la station de Clos de Hilde prélevées sur 3 jours consécutifs, stockées dans des bouteilles en verre ou dans du polyéthylène haute densité (P-HD). Les activités sont exprimées en ng standard-EQ/L. Les extraits ont été déposés trois fois sur les cellules MELN pour le test ER et MDA-kb2 pour le test AR. Les barres d'erreurs correspondent aux écarts types (n=3).

1.3 L'extraction

1.3.1 Choix de l'extraction

De manière à extraire le plus exhaustivement possible les molécules actives des échantillons d'eaux usées brutes et traitées de STEP, deux méthodes d'extraction ont été testées au cours de ces travaux, l'extraction SPE et l'extraction liquide/liquide (LLE). Les protocoles appliqués sont présentés dans la section 4.3.2 *a* et *b* du Chapitre 3 (p 82). Pour déterminer l'extraction la plus adaptée aux eaux de STEP, la station d'épuration de Clos de Hilde a été prélevée durant trois jours successifs en entrée et sortie de traitement (Janvier 2013). Les prélèvements ont été moyennés sur un jour. Une fois arrivés, les échantillons ont été filtrés sur filtre GFF (0,7 μ m) puis stockés à -20°C. Les activités œstrogéniques et androgéniques des extraits ont été évaluées sur les lignées cellulaires MELN et MDA-kb2, respectivement.

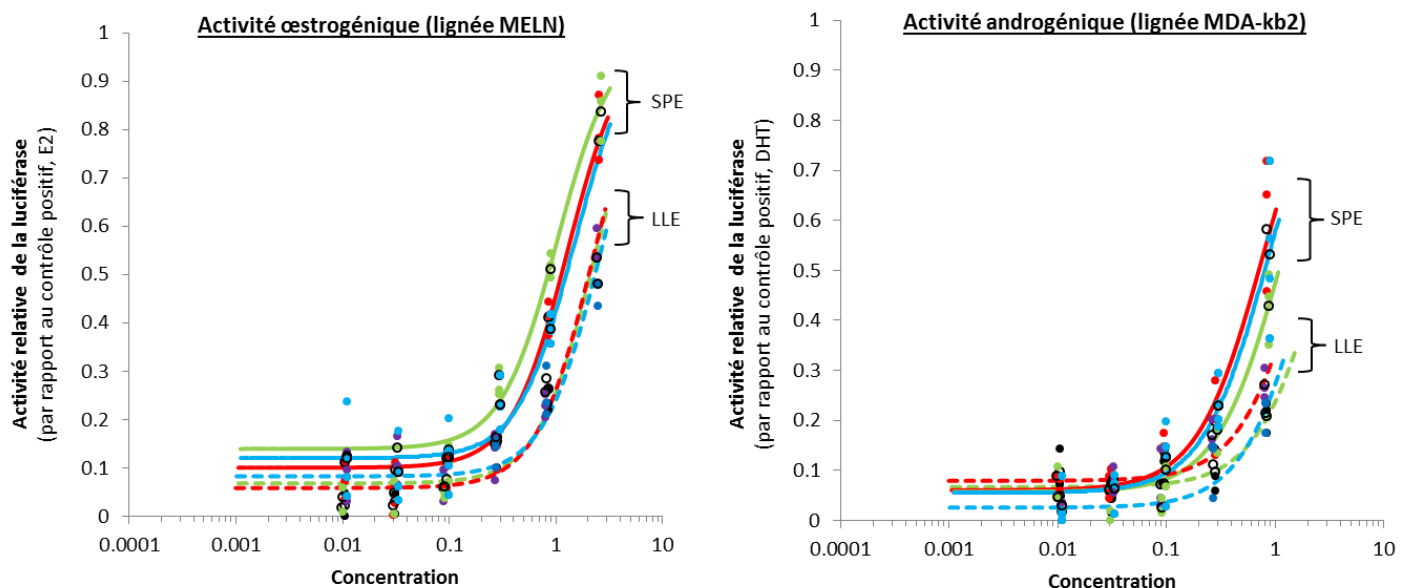


Figure 28 : Courbes dose-réponses des extraits SPE et LLE d'eaux usées traitées issues de la station de Clos de Hilde prélevées sur 3 jours consécutifs, obtenues pour les activités œstrogéniques et androgéniques. Les extraits ont été exposés sur cellules MELN pour le test ER et MDA-kb2 pour le test AR.

La comparaison des réponses biologiques obtenues pour les échantillons d'eaux usées traitées extraites par SPE et par LLE montre que le protocole d'extraction sélectionné influe sur les activités œstrogéniques et androgéniques des eaux prélevées (Figure 28). Les réponses biologiques mesurées sont plus importantes lors de l'extraction par SPE que par LLE. Ce constat a également été observé sur les extraits d'eaux usées brutes. Ainsi l'extraction par SPE permet d'extraire plus de ligands œstrogéniques et androgéniques dans les échantillons prélevés. Par conséquent, la SPE a été privilégiée comme méthode d'extraction pour mesurer les activités biologiques dans les eaux de STEP.

1.3.2 Validation des solvants d'élution

Après avoir validé la méthode d'extraction, l'élution des composés actifs a été optimisée. Trois protocoles d'extraction sur phase solide ont été testés utilisant les cartouches Oasis[®] HLB. Le détail méthodologique est donné dans le Tableau 18. Le premier protocole (n°1) est basé sur l'étude réalisée par Bellet et al., (2012) pour évaluer les activités œstrogéniques et androgéniques d'eaux usées brutes de STEP. Le second (protocole n°2) est inspiré des développements méthodologiques effectuées par Wund (2013). L'élution choisie a permis d'extraire de façon quasi exhaustive plusieurs molécules aux propriétés physico-chimiques variées appartenant à différentes familles comme les pesticides, hormones, médicaments. Finalement, l'influence de l'acidification des eaux a été évaluée et constitue le protocole n°3.

Tableau 18 : Détails méthodologiques de chaque protocole testé.

Protocole	n°1	n°2	n°3
Volume extrait	1L	250mL	250mL
pH	Acidifié 3-5	-	Acidifié 3-5
Cartouche	Oasis [®] HLB	Oasis [®] HLB	Oasis [®] HLB
Elution	100% MeOH	100% MeOH 50/50 MeOH/CH ₂ Cl ₂ 100% CH ₂ Cl ₂	100% MeOH 50/50 MeOH/CH ₂ Cl ₂ 100% CH ₂ Cl ₂
Reconcentration	200µL	500µL	500µL

Ces différents tests méthodologiques ont été réalisés sur les STEP de Biganos, Clos de Hilde et une STEP urbaine située dans l'Hérault, Brignac (capacité : 1 300 équivalent-habitants). Les extraits des eaux d'entrée et de sortie des deux STEP girondines ont été testés sur la lignée HELN-ER α afin d'évaluer l'influence du protocole sur l'activité œstrogénique. La réponse ER de la STEP de Brignac a été évaluée sur la lignée MELN.

Concernant les activités œstrogéniques des eaux usées brutes et traitées mesurées à l'aide de la lignée HELN-ER α , aucune différence marquée n'est observée entre les trois protocoles (Figure 29). Pour les STEP de Biganos et de Clos de Hilde, la procédure d'extraction sur phase solide n'influe pas sur la quantité de ligands ER élués. Quel que soit le protocole, l'activité œstrogénique est sensiblement la même.

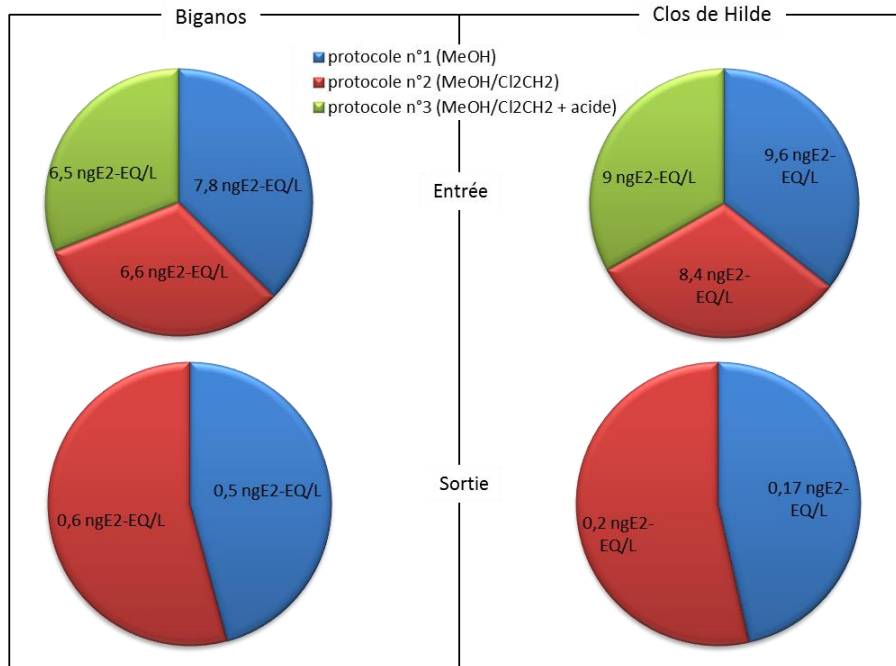


Figure 29 : Activités œstrogéniques mesurées dans les eaux d'entrée et de sortie des stations de Biganos et Clos de Hilde soumises à différents protocoles d'extraction sur phase solide. L'élution est précisée entre parenthèses. Les activités sont obtenues sur la lignée cellulaire HELN-ER α .

Pour l'activité ER évaluée par la lignée cellulaire MELN, sur les eaux brutes et traitées de la STEP de Brignac, une différence significative est observée sur les protocoles testés (Figure 30). Le protocole n°2 utilisant l'élution constituée de méthanol et de dichlorométhane est plus adaptée pour extraire les ligands agonistes ER. Ce mode protocole d'extraction a donc été sélectionné pour l'extraction des molécules actives.

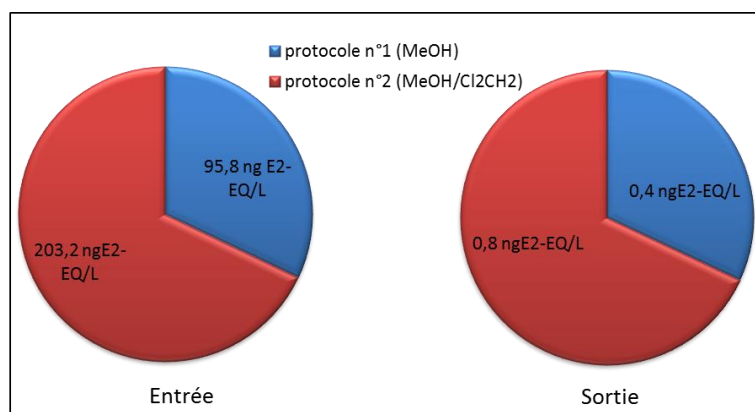


Figure 30 : Activités œstrogéniques mesurées dans les eaux d'entrée et de sortie de la station de Brignac soumises à différents protocoles d'extraction sur phase solide. L'élution est précisée entre parenthèses. Les activités sont obtenues sur la lignée cellulaire MELN.

1.3.3 Influence de la déconjugaison

Dans certaines études notamment celles portant sur les stéroïdes, une étape de déconjugaison est effectuée en aval de l'extraction afin de déconjuguer les molécules possédant des groupements glucuronides ou sulfatés (Labadie et Budzinski, 2005; Gabet-Giraud et al., 2010; Bellet et al., 2012;). L'impact de la déconjugaison sur la mesure des activités biologiques a donc été évalué dans des eaux brutes et traitées de STEP au cours de cette thèse. Des échantillons d'eaux de la STEP de Clos de Hilde ont été prélevés sur un jour, filtrés sur filtres GFF (0,7 μ m) puis extraits selon le protocole exposé en section 4.3.2 du chapitre 3 (p 82). Après élution, les solvants sont évaporés à sec sous flux d'argon et repris dans 5ml de tampon acétate (TA) à pH=5 conformément au protocole de Labadie et Budzinski, (2005). Une enzyme, la β -glucuronidase provenant *Helix pomatia* ($\geq 100\ 000$ units/mL, présence de sulfatase ≤ 7500 units/mL en tant qu'activité secondaire), est alors ajoutée. L'extrait contenant l'enzyme est ensuite placé dans un incubateur à 55°C pendant 3h. Après l'incubation, l'extrait subit de nouveau le processus d'extraction SPE. Les activités œstrogéniques et androgéniques des extraits ont été évaluées sur les lignées cellulaires MELN et MDA-kb2, respectivement.

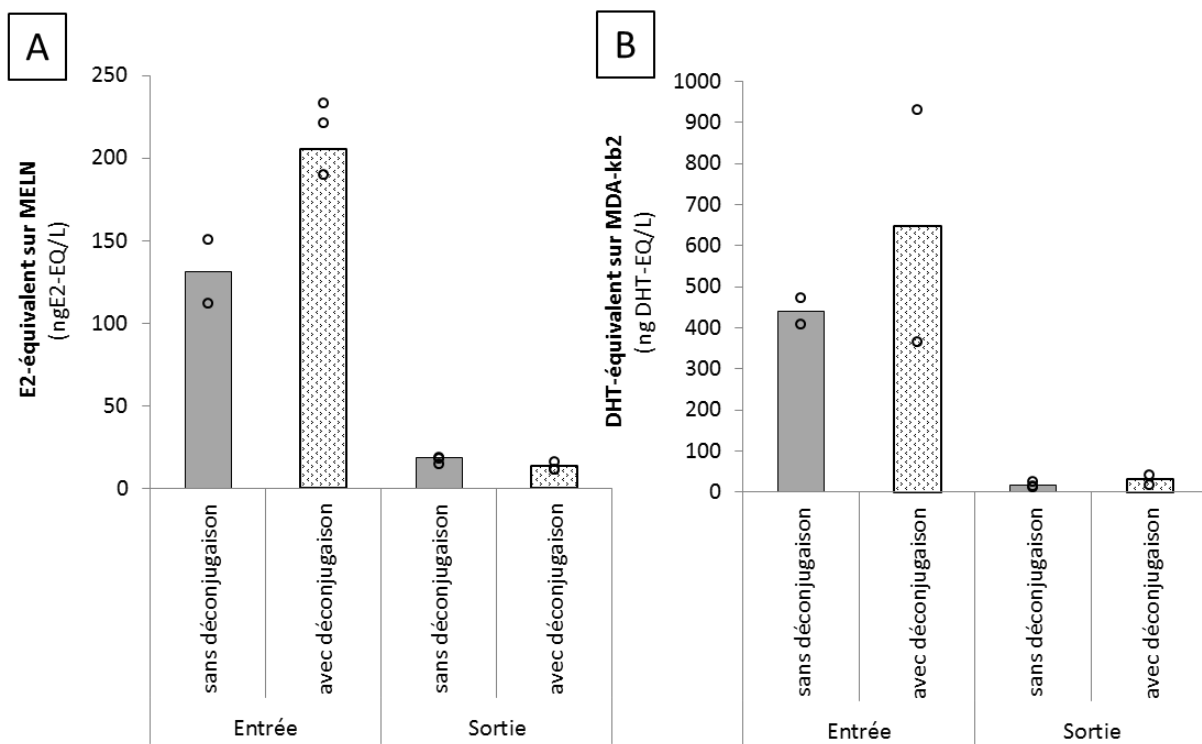


Figure 31 : Activités œstrogéniques (A) et androgéniques (B) obtenues dans les eaux d'entrée et de sortie de la station de Clos de Hilde avec et sans déconjugaison. Les extraits ont été exposés sur cellules MELN pour le test ER et MDA-kb2 pour le test AR. Les points représentent les valeurs obtenues pour chaque dépôt cellulaire (n=2 ou n=3).

L'évaluation des activités biologiques pour les extraits d'eaux de STEP montre qu'il existe une différence de réponses entre les échantillons déconjugués et ceux n'ayant pas eu d'étape de déconjugaison. Cependant, ce constat n'est valable uniquement pour l'eau prélevée en entrée de STEP (Figure 31). En effet, les composés véhiculés dans les eaux usées brutes sont excrétés en majorité par les urines et faeces sous forme conjugués. L'absence d'impact de la déconjugaison dans l'extrait d'eau traitée peut s'expliquer par le processus de traitement d'épuration des eaux en STEP qui fait appel à des microorganismes. Ces derniers peuvent donc décomplexer les molécules présentes (Ternes et al., 1999; Muller et al., 2008).

L'étape de déconjugaison n'a pas été incorporée dans le protocole final d'extraction des eaux de STEP. Son introduction est très complexe. L'étape augmente de façon non négligeable la préparation des échantillons. De plus, la déconjugaison n'a pas d'influence sur les effluents de STEP. Hors, ces derniers sont les plus intéressants pour l'évaluation du risque dans le milieu aquatique.

1.4 Conclusion

Les tests méthodologiques réalisés au cours de ces travaux de thèse se sont focalisés sur la préparation des échantillons de type liquide. Les développements ont été effectués sur le prélèvement, la filtration, la conservation et l'extraction des échantillons.

Une méthode de préparation a ainsi pu être mise en place. De nombreux éléments testés (filtration et matériel de stockage) n'ont pas montré d'influence significative sur les réponses biologiques testées (ER et AR) et des compromis pragmatiques ont donc été effectués. A contrario, l'extraction des échantillons impacte les activités biologiques mesurées. Ainsi il a été acté que les matrices liquides de type eaux de STEP devaient être extraites par extraction en phase solide.

2 Développement et validation du fractionnement par HPLC

Deux fractionnements par chromatographie en phase liquide ont été développés pour s'adapter au mieux aux propriétés physico-chimiques des extraits environnementaux à préparer. Le fractionnement en phase inverse (RP-HPLC) adapté pour les extraits et fractions SPE polaires (*i.e.* F3, F4), développé par Creusot (2011), a été transféré sur la chaîne HPLC (Agilent Technologies, série 1200) équipée d'une colonne de silice greffée avec une chaîne alkyle de 18 atomes de carbone (C18) (Chapitre 3, section 5.2.2, p 87). Le fractionnement en phase normale (NP-HPLC) adapté aux extraits et fractions SPE apolaires (*i.e.* F1 et F2) a été développé durant cette thèse sur la chaîne HPLC équipée d'une colonne de silice greffée avec un groupement NH₂ (Chapitre 3, section 5.2.3 p 88).

Le développement et la validation des fractionnements ont été réalisés à partir de solutions mélanges de composés, spécifiques aux deux modes d'élution. Les molécules sélectionnées appartiennent à différentes classes et possèdent des propriétés physico-chimiques variées (Tableau 19).

Tableau 19 : Liste des composés constituant les solutions de calibration pour fractionnement par chromatographie en phase liquide en mode inverse et normal.

	Nom	Famille	log Kow*
Composés utilisés en phase inverse	17 α -Ethinylestradiol	Hormone synthétique	4,12
	Acide fénofibrique	Métabolite d'hypolipidémiant	4
	Benzo(b)fluoranthène	HAP	6,11
	Bisphénol A	Plastifiant	3,64
	Caféine	Stimulant	0,16
	Carbamazépine	Antiépileptique	2,25
	Chlorsulfuron	Herbicide	2,26
	Clotrimazole	Antifongique	6,26
	Cyperméthrine	Insecticide	5,24
	Dexaméthasone	Glucocorticoïde	1,72
	Dibenzo(ah)anthracène	HAP	6,7
	Diclofénac	Analgésique	4,02
	Fénofibrate	Hypolipidémiant	5,19
	Ibuprofène	Analgésique	3,79
	Isoproturon	Herbicide	2,84
	œstriol	Hormone	2,81
	œstrone	Hormone	3,43
	op Dichlorodiphényltrichloroéthane	Insecticide (organochloré)	6,79
	Phosphate de triphényle	Plastifiant/retardateur de flamme	4,7
	Prednisolone	Corticostéroïde	1,4
Spirolactone	Stéroïde	2,88	
Stavudine	Antirétroviral	-0,79	
Testostérone	Hormone	3,27	
Composés utilisés en phase normale	1,1,2,3,4-Pentachlorobutane (PCB 1)	Polychlorobisphényl	3,36
	1,3-Dibromo-2-(3,4-dibromophenoxy)benzène (PBDE 17)	PBDE	6,77
	2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine	Dioxine	6,92
	2-Chlorodibenzo-para-dioxine	Dioxine	3,51
	Bis(pentabromophenyl) ether (PBDE 209)	PBDE	11,24
	Coronène	HAP	6,49
	Fénofibrate	Hypolipidémiant	5,19
	Hexachlorobenzène	Fongicide (organochloré)	5,86
	Mevastatine	Hypolipidémiant	4,32
	Naphtalène	HAP	3,17
	Octachloronaphtalène	HAP chloré	8,33
	œstradiol	Hormone	3,94
	œstrone	Hormone	3,43
	op Dichlorodiphényltrichloroéthane	Insecticide (organochloré)	6,79
	Oxadiazon	Herbicide	4,81
	Prétilachlore	Herbicide (organochloré)	4,29

* Valeurs estimées par KOWWIN v1.67 (base de données Chemspider)

2.1 Profils chromatographiques de référence

Les gradients d'élution ont été calibrés par l'utilisation de solutions contenant plusieurs molécules, couvrant une large gamme de polarité. Un profil chromatographique répertoriant les composés injectés a été obtenu pour les deux modes d'élution (Figure 32). Ces chromatogrammes servent de référence pour connaître l'élution de certaines molécules actives permettant ainsi de les localiser dans les fractions collectées.

Pour le fractionnement en phase inverse (Figure 32 A), les composés sélectionnés ont un log Kow compris entre -0,79 et 6,79. Une corrélation entre le temps de rétention et la polarité des molécules est observée (Figure 33). Le même constat avait été remarqué par Creusot et al. (2013). Cette correspondance apporte une information supplémentaire sur les molécules lors de la caractérisation moléculaire. Suivant le numéro de la fraction, un tri basé sur le log Kow des composés à identifier peut être réalisé lors des analyses non ciblées.

Concernant le fractionnement en phase normale, les molécules couvrent une polarité comprise entre $3,17 < \log Kow < 11,24$. L'élution des composés analysés est donnée en Figure 32 B. Plusieurs solutions mélanges de molécules appartenant à la même famille ont été injectées afin de connaître les fractions pouvant contenir ces composés. Sur la base des 16 HAP issus de la liste de l'US-EPA, leurs éluions s'étalent de la fraction 4 à 8. Les pesticides organo-chlorés sont collectés de la fraction 3 à 10. Contrairement au fractionnement en RP-HPLC, aucune corrélation n'a pu être établie entre le log Kow et le temps de rétention en phase normale.

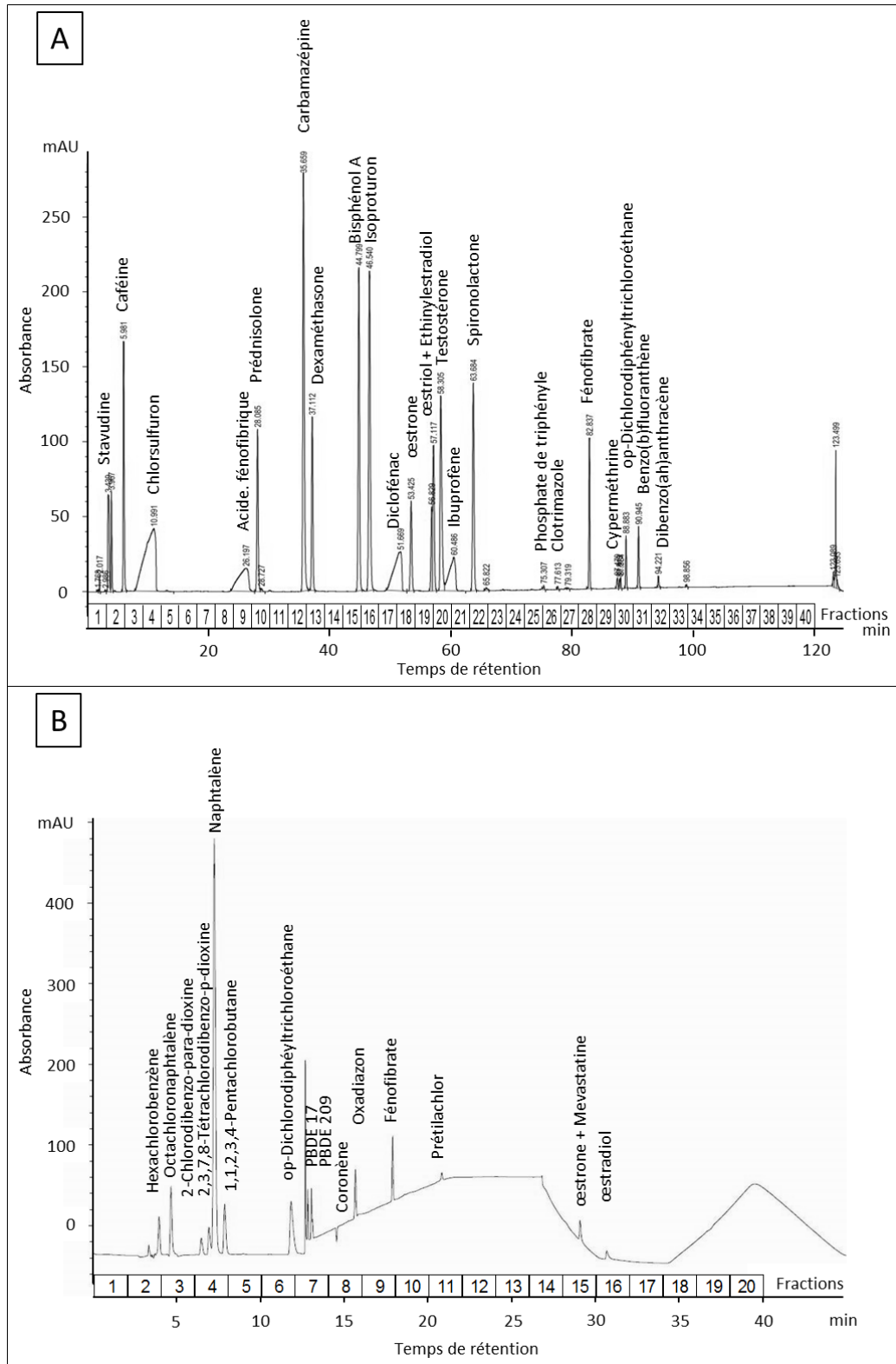


Figure 32 : Chromatogrammes de référence pour le fractionnement en phase inverse (A) et en phase normale (B) obtenus en HPLC.

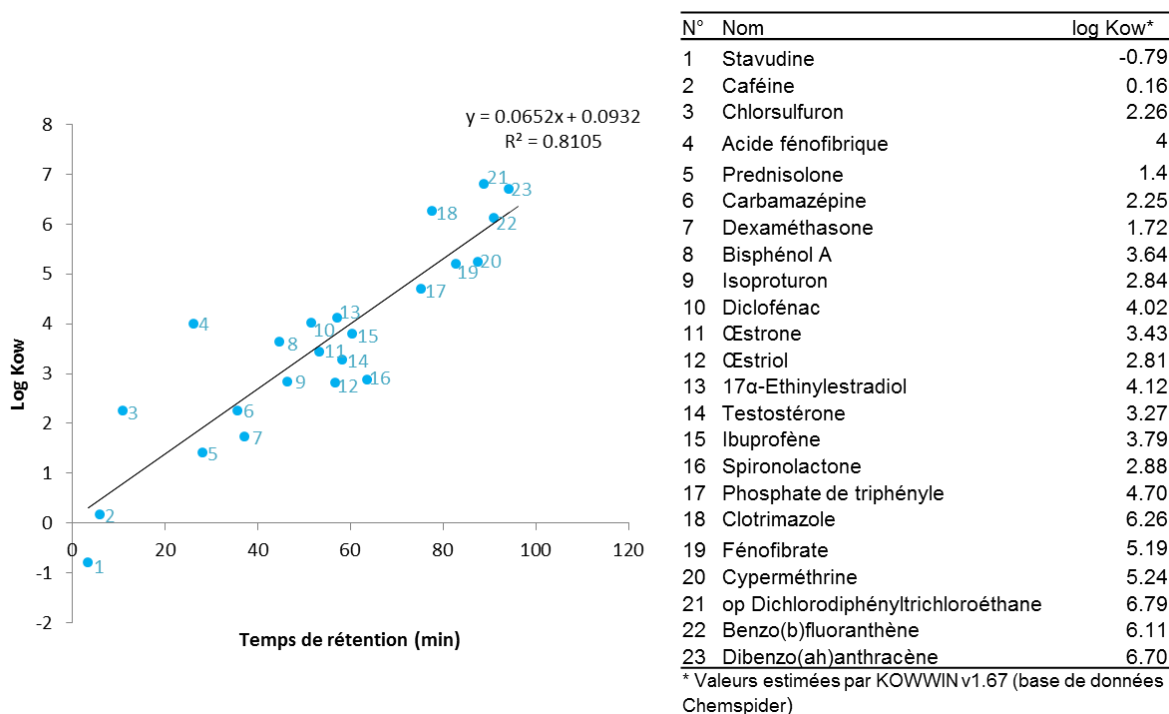


Figure 33 : Corrélation du log Kow des composés avec leur temps de rétention en RP-HPLC.

2.2 Validation au regard des activités biologiques

Les deux protocoles de séparation ont ensuite été testés avec une solution de 12 molécules biologiquement actives afin de vérifier que les fractionnements par HPLC n'entraînent pas une perte d'activité biologique. Les composés utilisés ainsi que leurs activités et leurs concentrations sont présentés dans le Tableau 20. Les fractionnements ont été évalués en fonction de trois activités ER, AhR et PXR. La méthodologie a été d'évaluer les activités biologiques de 50 μ L de solution (témoin positif) et celles de 50 μ L de solution après injection en HPLC. La totalité du mélange injecté est collecté. Un test de dopage a également été réalisé en RP-HPLC. Il consiste en l'ajout de 50 μ L de solution dans un volume de solvant équivalent à celui collecté à l'issue du fractionnement en HPLC. En parallèle, des blancs de protocole ont été préparés dans les mêmes conditions afin de tester les contaminations potentielles. L'ensemble est évaporé sous flux d'argon repris dans 50 μ L de DMSO et testé en ER, AhR et PXR sur lignées cellulaires MELN, PLHC-1 et HG₅LN-PXR, respectivement.

Tableau 20 : Solution mélange employée pour tester l'impact du fractionnement sur l'activité biologique.

Activité	Nom	Concentration en µg/mL acétone	Log Kow*
ER	Estrone	0,0027	3,43
	Estradiol	0,0008	3,94
	Bisphénol A	18,27	3,64
	4t-Octylphénol	8,26	5,28
	o,p-Dichlorodiphényltrichloroéthane	35,47	6,79
PXR	Phosphate de triphényle	489,71	4,70
	Clotrimazole	103,51	6,26
	Fénofibrate	541,57	5,19
AhR	3,3',4,4',5-Pentachlorobiphényle	0,163	6,98
	2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine	0,019	6,92
	Dibenzo[ah]anthracène	0,084	6,70
	Benzo[k]fluoranthène	0,076	6,11

*valeurs estimées par KOWWIN v1.67 (base de données Chemspider)

Les résultats obtenus en termes de EC20 sont présentés Figure 34. Pour faciliter la lisibilité des résultats, seules les solutions non injectées et collectées après passage en HPLC sont montrées. Il est important de préciser que les blancs de protocole n'ont pas montré d'activités ER et PXR mais ont présenté une légère activité AhR à 4h d'exposition cellulaire. La réponse AhR des blancs est cependant peu intense en comparaison de celle induite par la solution mélange. La distinction possible entre l'activité des blancs et celle de la solution permet de confirmer que la réponse cellulaire observée pour la solution est liée en majorité aux composés et non à une contamination lors du protocole.

Pour le fractionnement en RP-HPLC, les EC20 déterminés pour le témoin positif sont inférieures à celles obtenues pour la solution collectée après passage en HPLC (Figure 34 A). Ceci signifie que toutes les activités mesurées après HPLC sont moins intenses que les activités initiales induites par la solution mélange, suggérant une perte de l'activité durant la procédure. Pour l'activité AhR après 24h d'incubation cellulaire, aucune réponse biologique n'a été observée sur la solution injecté montrant une perte totale de l'activité AhR. Concernant le test de dopage, il présente les mêmes résultats que la solution injectée en HPLC. Ce résultat traduit que la perte d'activité n'est pas liée à l'injection et à la collecte de la solution après passage en HPLC mais se produit durant les procédures amont (*i.e.* reprise dans un solvant polaire) et/ou aval (*i.e.* évaporation). En observant les polarités des composés présents dans la solution, plusieurs molécules possèdent un logKow supérieur à 6,5, traduisant un comportement plutôt hydrophobe (Tableau 20). Lors de l'injection en phase inverse, la solution est reprise dans un mélange de solvants polaires constitués de 80% d'eau et 20% d'acétonitrile. Il est envisageable que les composés hydrophobes ne se solubilisent pas et restent adsorbés sur les parois des flacons. La succession de reprise, transfert et évaporation de la solution injectée en HPLC ou du test de dopage accentue les pertes de molécules. Le même phénomène peut également se produire lors des tests biologiques par la reprise de la solution dans du DMSO puis dans le milieu de culture de type aqueux. L'emploi de tubes

Eppendorf® en polypropylène pour les dilutions dans le milieu avant dépôt cellulaire peut aussi favoriser l'adsorption de ces composés sur les parois du tubes. L'étape des tests cellulaires étant la même pour tous les échantillons, la perte des molécules actives durant les bio-essais n'est pas discriminante entre la solution brute et injectée en HPLC. Par conséquent, ce test du fractionnement en phase inverse en se focalisant sur l'évaluation des activités biologiques a montré que cette procédure n'était pas adaptée aux échantillons contenant des composés hydrophobes tels que les sédiments, boues de STEP par exemple, ou les fractions apolaires obtenues en SPE sur cartouche de silice, c'est-à-dire les fractions F1 et F2.

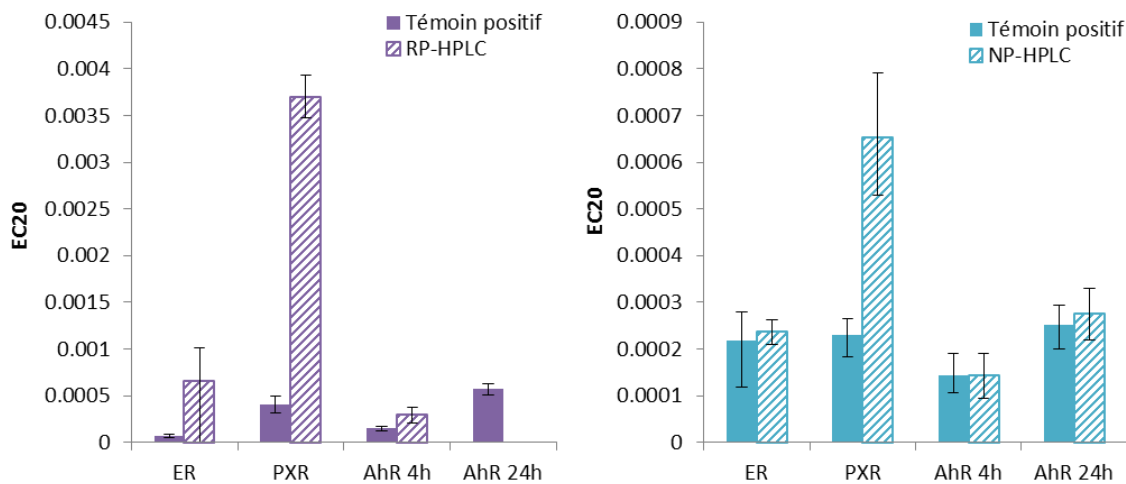


Figure 34 : Activités œstrogéniques, AhR et PXR de la solution mélange de 12 composés actifs collectée à l'issue du fractionnement en phase normale (NP-HPLC) et phase inverse (RP-HPLC) obtenues sur lignées cellulaires MELN, PLHC-1 et HG₅LN-PXR, respectivement. Le témoin positif correspond à la solution non injectée. Les réponses cellulaires sont présentées par la concentration entraînant 20% des activités (EC20) établie à partir de courbes dose-réponse. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance (n=3).

Concernant le fractionnement en phase normale, aucune différence entre les EC20 du témoin positif ou de la solution injectée et collectée en HPLC n'est observée pour les activités ER et AhR. Cependant, une perte d'activité PXR est remarquée pour la solution injectée en HPLC par rapport à la solution brute (Figure 34 B). Ces résultats confirment que le fractionnement en phase normale est plus adapté aux composés hydrophobes que le fractionnement en phase inverse. Contrairement à la phase inverse, la phase normale demande une reprise des solutions dans un solvant apolaire (*e.g.* iso-octane), ne présentant ainsi aucune contrainte pour les molécules hydrophobes. De plus, les fractions collectées sont constituées de solvants rapidement évaporés (*i.e.* pentane, dichlorométhane, acétonitrile) qui réduisent le temps d'évaporation et limitent les dégradations de molécules durant cette étape. Des pertes de composés actifs ont, néanmoins, pu être observées en phase normale pour l'activité PXR. Un facteur d'environ 2,5 est mesuré entre la EC20 du témoin positif et celle de la solution injectée en HPLC.

2.3 Conclusion

L'étude des fractionnements en termes d'activités biologiques a confirmé que le mode inverse était plus adapté pour les échantillons de type aqueux tels que les eaux de STEP, de rivière par exemple, ou les fractions polaires obtenues par le fractionnement SPE sur cartouches de silice (F3 et F4) contenant une majorité de composés hydrophiles. En complément, le fractionnement en phase normale convient aux échantillons de type solides, huileux, lipidiques ou fractions apolaires issues du fractionnement SPE sur cartouches de silice (F1 et F2) renfermant des molécules hydrophobes. La stratégie de fractionnement est schématisée Figure 35.

Cependant, il est important de garder à l'esprit, que les pertes de composés biologiquement actifs aux cours des procédures de fractionnement peuvent varier suivant les matrices environnementales. L'évaluation des pertes d'activités après fractionnement pour chaque échantillon doit être systématique. Cette vérification s'effectue par le regroupement d'un aliquote de chaque fraction collectée afin de recréer un échantillon global post-fractionnement. Ce dernier est alors comparé à l'échantillon sans fractionnement. En plus d'évaluer les pertes d'effets biologiques éventuelles, cette étape peut permettre, dans certain cas, de mettre en évidence la présence d'effets mélange entre les molécules.

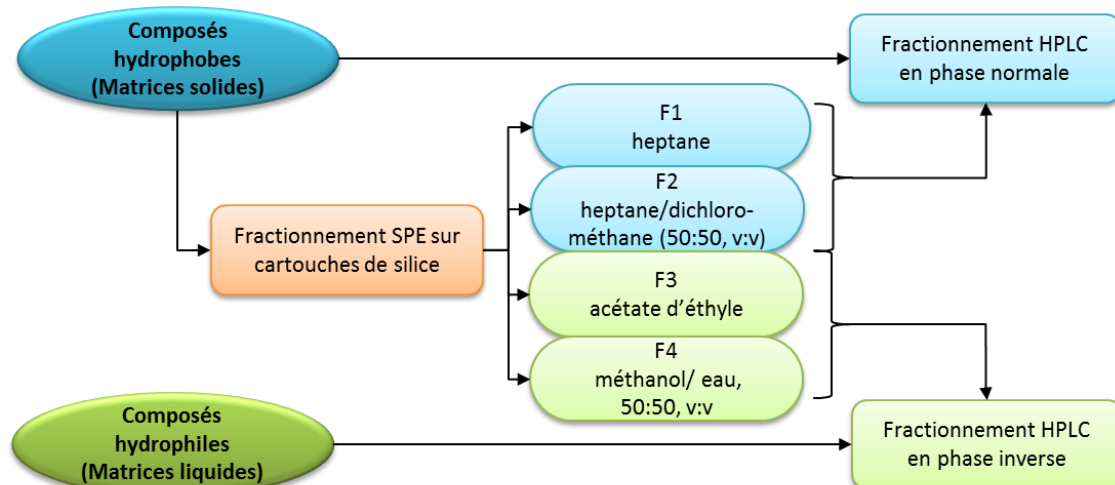


Figure 35 : Stratégie de fractionnement des matrices environnementales.

Chapitre 5

*Identification moléculaire par
spectrométrie de masse haute
résolution :*

LC-QTOF/GC-QTOF

Chapitre 5 : Identification moléculaire par spectrométrie de masse haute résolution : LC-QTOF/GC-QTOF

1	Assurance qualité pour les analyses chimiques non ciblées	125
1.1	Précaution à apporter aux matériels.....	125
1.2	Vérification et calibration instrumentales.....	126
1.3	Traitements des données analytiques : contrôle des « faux positifs ».....	127
2	Évaluation des performances instrumentales.....	128
2.1	La résolution	128
2.2	L'erreur en masse	130
2.3	Les limites de détection	131
3	La stratégies d'identification.....	132
3.1	Caractérisation moléculaire par LC-QTOF	132
3.1.1	L'acquisition des données	132
3.1.2	Le traitement des données	135
3.2	Identification par GC-QTOF	140
4	Freins à la caractérisation moléculaire.....	143
4.1	La recherche des ions et l'attribution des formules brutes	143
4.1.1	Difficultés mis en évidence en LC-QTOF	143
4.1.2	Obstacle rencontré en GC-QTOF.....	146
4.2	Le manque d'informations structurales	146
4.3	Les limites des bibliothèques spectrales et des logiciels <i>in silico</i>	149
4.3.1	Les banques de données	149
4.3.2	Les aides <i>in silico</i> à l'identification.....	150
4.4	La disponibilité des étalons analytiques	150
5	Les différents niveaux d'identification	151
6	Positionnement de la démarche au sein des connaissances actuelles en HRMS	151
7	Conclusion	153

Chapitre 5 : Identification moléculaire par spectrométrie de masse haute résolution : LC-QTOF/GC-QTOF

Avant-propos

L'approche dirigée par l'effet nécessite de disposer de moyens analytiques performants pour permettre la détection et l'identification des composés à risque. L'analyse chimique non ciblée, méthode complémentaire à l'analyse chimique ciblée, est un outil indispensable pour caractériser des molécules inconnues ou non ciblées pouvant présenter un danger pour l'environnement. L'acquisition de deux spectromètres de masse haute résolution (HRMS) de type hybride quadropôle/temps de vol (QTOF) couplés à la chromatographie en phase liquide (LC-QTOF, série 6540, Agilent technologies) ou gazeuse (GC-QTOF, série 7200, Agilent technologies) a nécessité le développement et la validation de ces instruments. Une évaluation des performances analytiques de chaque appareil ainsi que la mise au point d'une stratégie d'identification moléculaire ont été effectuées au cours de ces travaux de thèse.

Ce chapitre présente les informations techniques obtenues et la méthodologie mises en œuvre pour identifier les molécules détectées durant les analyses chimiques non ciblées.

1 Assurance qualité pour les analyses chimiques non ciblées

Les analyses chimiques non ciblées étant non spécifiques pour la détection de composés, elles demandent une attention particulière pour la préparation et le traitement des analyses.

1.1 Précaution à apporter aux matériels

Les solvants, les réactifs, la verrerie, etc., contiennent des composés pouvant interférer avec les analyses. Ces contaminants n'ont généralement pas d'impact sur les analyses chimiques ciblées, bien qu'ils peuvent être problématiques dans certains cas comme pour l'analyse des phtalates ou des alkylphénols ou le bisphénol A par exemple. Cependant lors de l'analyse par HRMS, l'ensemble des molécules présentes peut être détecté et créer des faux positifs. Les analyses par HRMS demandent par conséquent une vigilance importante du manipulateur quant à la préparation du matériel analytique.

Bien évidemment, le port des gants est obligatoire, d'une part pour des questions de sécurité mais également pour prévenir toutes contaminations du matériel manipulé par les produits de la vie quotidienne comme par exemple les produits de soins corporels ou les détergents. Concernant le matériel, il est indispensable d'utiliser des solvants et réactifs de qualité supérieure adaptés pour les analyses chimiques. De plus, il est important d'éviter la contamination de ces consommables après leur ouverture. En effet, après ouverture, les solvants peuvent par exemple absorber des composés présents dans l'air ambiant comme les HAP. L'idéal est d'employer des réactifs ou solvants neufs et à usage unique qui possèdent le volume adéquat pour les analyses envisagées. Cette précaution est systématiquement prise pour les analyses réalisées par LC-QTOF. Seule l'eau utilisée est produite par un système de filtration par osmose inverse et sur cartouches (système fourni par Millipore SA, Molsheim France) permettant d'obtenir une eau ultra pure. Une filtration supplémentaire sur charbon actif (cartouche EDS-PAK, Millipore SA, Guyancourt, France) est réalisée pour l'approche EDA et les analyses par LC-QTOF pour éliminer la présence de contaminants pouvant persister comme certains perturbateurs endocriniens tels que le nonylphénol, le bisphénol A, le diéthylphtalate et le di-n-butylphtalate (Merck Millipore, 2014). Les solvants sont changés à chaque séquence d'analyses pour éviter toutes modifications de leurs propriétés et la présence de contaminants. Pour les analyses par LC-QTOF, les bouteilles contenant les solvants de la phase mobile sont initialement neuves, dédiées aux solvants qu'elles contiennent et spécifiques aux analyses par HRMS. Pour la chaîne chromatographique, un préfiltre et une pré-colonne sont montés en début de colonne et changés régulièrement. La colonne est rincée seule systématiquement après chaque série d'analyse. Concernant les spectromètres, la source est nettoyée régulièrement. Pour le LC-QTOF, la source est nettoyée systématiquement avant chaque série d'injections. Les aiguilles servant à l'injection sont également nettoyées et ceci après chaque injection dans le but d'éviter toutes contaminations croisées entre les échantillons.

1.2 Vérification et calibration instrumentales

Comme pour toutes les analyses chimiques employant des spectromètres de masse, il est important de vérifier l'état de l'appareil avant son utilisation. Les paramètres concernent la calibration du QTOF mais également ses performances analytiques qui sont en association avec la chaîne chromatographique.

L'un des paramètres important à vérifier est l'exactitude de la mesure en masse. Cet élément dépend de la calibration du TOF. En effet, la masse moléculaire permet de déterminer la composition élémentaire des composés. Ainsi, plus la masse mesurée sera au plus juste de la masse théorique, plus la formule brute et par conséquent l'identification de la molécule détectée sera correcte. Cette vérification est donc un élément indispensable dans la recherche de composés inconnus ou non ciblés. L'exactitude en masse est contrôlée par l'infusion de molécules de référence pour lesquelles les masses exactes sont connues. La masse mesurée est alors comparée à la masse théorique.

Pour nos analyses, les spectromètres sont calibrés dès que la différence en masse est supérieure à 0,5 ppm pour le LC-QTOF et 2 ppm pour le GC-QTOF. L'exactitude est mesurée sur 8 molécules, balayant des gammes de masses comprises entre 120 Da et 1550 Da, et 70 Da et 610 Da pour le LC-QTOF et le GC-QTOF, respectivement. Cette calibration n'est effectuée que si elle est nécessaire avant le début des injections. Au cours d'une série d'injections, les dérives en masse sont contrôlées par l'infusion de composés de référence (lock-mass) pendant l'acquisition ou entre deux échantillons suivant l'appareil analytique utilisé.

Le second élément à vérifier avant le lancement d'une série d'analyses par HRMS est la résolution du spectromètre. La résolution est la capacité de l'appareil à distinguer deux signaux proches. Plus la résolution est importante, plus l'instrument est capable de différencier des pics chromatographiques proches l'un de l'autre. Ce paramètre permet d'obtenir des mesures précises en masse. Les résolutions des appareils utilisés sont données en section 2.1 de ce chapitre, p 128.

Pour le LC-QTOF, la fenêtre d'isolation des ions précurseurs par l'emploi du quadripôle doit être vérifiée. Le but est de s'assurer que les spectres de fragmentation obtenus sont bien ceux de l'ion sélectionné. Pour le GC-QTOF, le quadripôle n'a pas été utilisé dans nos analyses car aucune base de données actuelle ne recense, à notre connaissance, des spectres acquis par GC-QTOF. Par conséquent, seul le TOF a été employé pour l'identification des composés dans le but de pouvoir comparer les spectres de fragmentation obtenus par l'impact électronique à ceux disponibles dans les bibliothèques de spectres.

Enfin, la sensibilité analytique est contrôlée par l'injection d'une solution mélange de composés. Cette étape permet de s'assurer que l'appareil est dans des conditions optimales pour détecter les analytes présents.

1.3 Traitements des données analytiques : contrôle des « faux positifs »

Malgré les précautions prises pour le traitement des échantillons et la préparation du matériels analytiques, des composés peuvent être détectés dans les échantillons sans y être initialement. Ces molécules sont qualifiées de « faux positifs ». Pour éviter les contaminations croisées entre les échantillons, en plus du nettoyage de l'aiguille d'injection, du solvant (*i.e.* « blancs d'injection ») est injecté entre les échantillons tout au long de la série d'injections. Lors du traitement des données, il est indispensable de vérifier systématiquement que les molécules détectées dans l'échantillon sont bien absentes des blancs d'injection et du blanc protocole. Cette vérification apporte une étape supplémentaire au traitement des données mais reste obligatoire afin de générer des résultats fiables et corrects.

2 Évaluation des performances instrumentales

Trois critères ont été étudiés afin de connaître les capacités des appareils analytiques utilisés. Ces paramètres sont :

- i. La résolution
- ii. L'erreur en masse
- iii. La sensibilité

L'erreur en masse et la sensibilité ont été déterminées à partir des méthodes analytiques décrites dans le chapitre 3, dans la section 6.3.2 (p 97). Pour les analyses en LC-QTOF, les paramètres ont été étudiés sur 19 molécules appartenant à la famille des composés pharmaceutiques. Pour les analyses en GC-QTOF, les critères ont été établis par l'utilisation d'un mélange de 9 HAP marqués.

2.1 La résolution

Comme défini ci-dessus, la résolution traduit l'aptitude de l'instrument à discerner deux masses voisines. Cette valeur est calculée selon l'Équation 6.

Équation 6,
$$R\acute{e}solution = \frac{Masse\ exacte}{\Delta m/z}$$

Avec, la masse exacte mesurée au sommet du pic gaussien
 $\Delta m/z$ correspondant à la différence de m/z obtenue à la largeur à mi-hauteur du pic (FWHM)

Elle est déterminée automatiquement par l'appareil par l'infusion d'une solution contenant plusieurs composés de masses différentes.

La résolution du LC-QTOF, obtenue sur une gamme de masses comprises entre 100 et 1700 m/z , est présentée en Figure 36. Les deux modes d'ionisation de la source sont présentées car l'acquisition s'effectue selon deux cartes électroniques distinctes. Une est dédiée au mode positif et la seconde, au mode négatif. Quel que soit le mode d'ionisation, la résolution est proportionnelle à la masse. Les valeurs sont comprises entre 11 000 et 27 000 pour la plus petite et la plus forte masse, respectivement (Figure 36). Ce résultat signifie que l'instrument est capable de différencier par exemple une masse de 120,0000 Da et 120,0109 Da ou 1500,0000 Da et 1500,0555 Da.

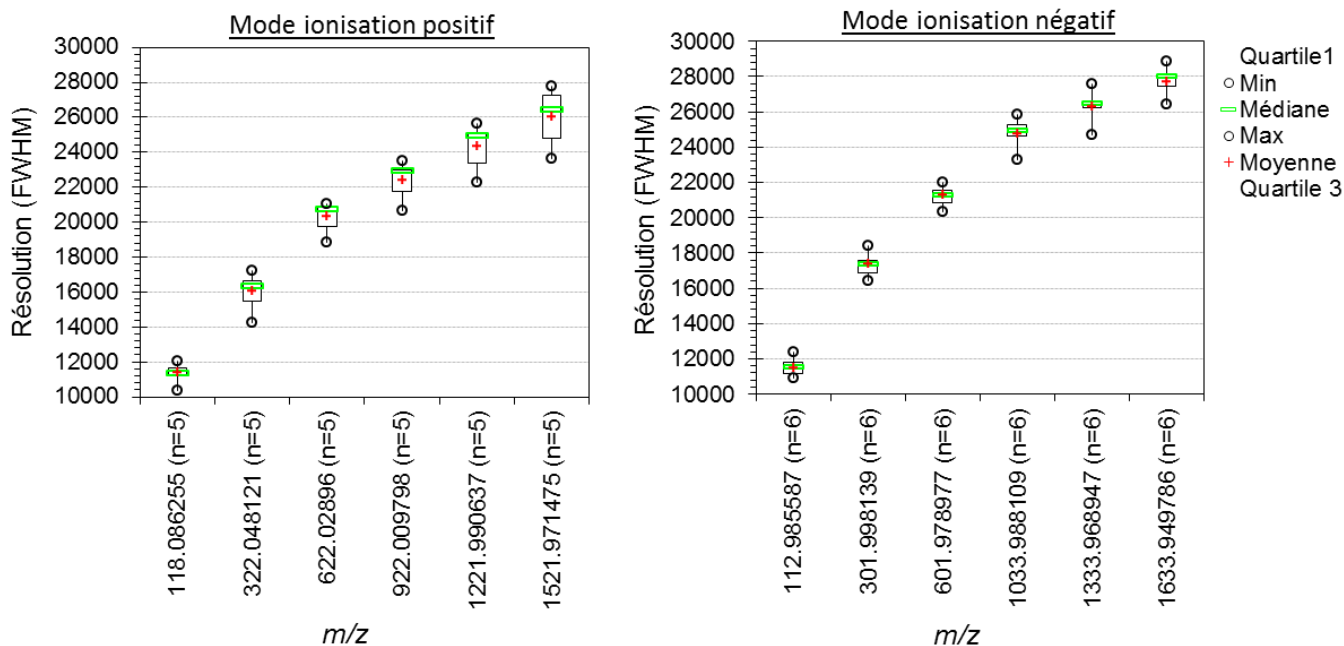


Figure 36 : Résolution mesurée en LC-QTOF, série 6540 (Agilent technologies) pour différentes masses. Les valeurs ont été obtenues sur un mois. L'instrument est configuré à une fréquence d'acquisition de 2 GHz en gamme dynamique externe pour des masses allant jusqu'à 1700 m/z .

Concernant le GC-QTOF, la résolution mesurée est comprise entre 4 500 et 9 500, pour les plus faibles et fortes masses, respectivement (Figure 37). Les valeurs sont inférieures à celles mesurées en LC-QTOF, en raison de la taille du tube à temps de vol qui est plus court.

Pour les deux appareils, la résolution est relativement stable dans le temps.

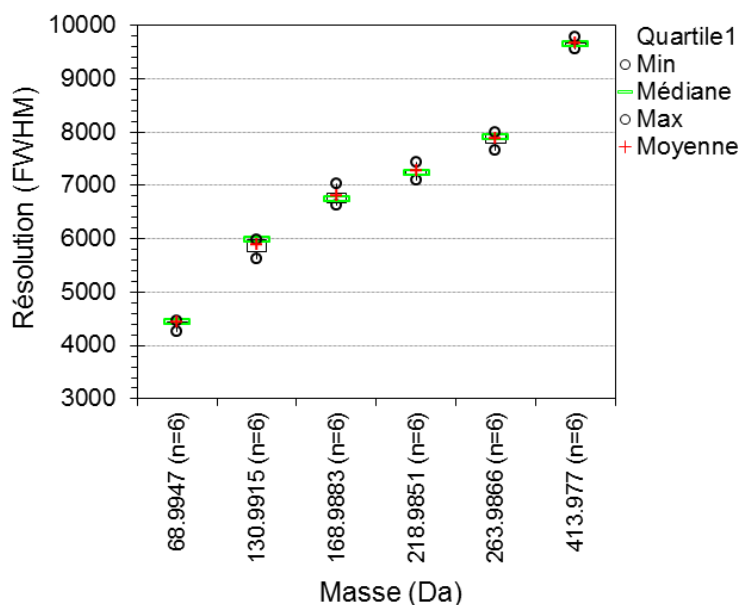


Figure 37 : Résolution mesurée en GC-QTOF, série 7200 (Agilent technologies) pour différentes masses. Les valeurs ont été obtenues sur un mois. L'instrument est configuré à une fréquence d'acquisition de 2 GHz.

2.2 L'erreur en masse

L'erreur en masse donne une information sur l'incertitude de la masse mesurée. La précision de la mesure est déterminée par calcul selon l'Équation 7 :

$$\text{Équation 7,} \quad \text{Erreur en masse} = \frac{m/z \text{ théorique} - m/z \text{ observée}}{m/z \text{ théorique}} \times 1000000$$

Avec, Erreur en masse exprimée en partie par million (ppm)
 m/z correspond à la masse sur la charge de la molécule

Les valeurs ont été obtenues par l'injection de solutions contenant des composés connus (19 médicaments et 9 HAP). Les molécules ont été analysées selon les méthodes analytiques utilisées en LC-QTOF et GC-QTOF pour les fractions d'échantillon issues de l'approche EDA.

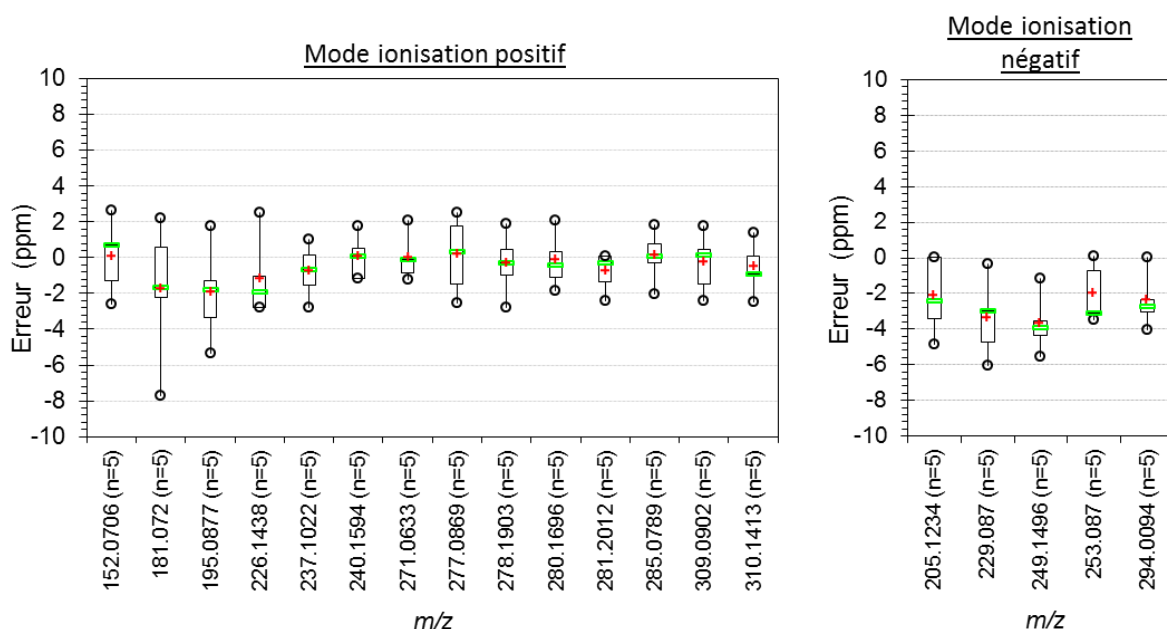


Figure 38 : Erreurs en masse mesurées sur 5 acquisitions réalisées sur 5 mois d'analyses en LC-QTOF. 19 composés pharmaceutiques ont été injectés à une concentration d'environ 5 ng/g en mode d'ionisation positif et 13 ng/g en mode d'ionisation négatif.

Les erreurs obtenues en LC-QTOF sont en moyenne inférieures à ± 3 ppm en mode d'ionisation positif (Figure 38). Pour le mode d'ionisation négatif, les valeurs sont systématiquement négatives montrant que la masse mesurée est supérieure à la masse théorique. Les erreurs sont inférieures à -6 ppm (Figure 38). L'écart absolu moyen a été calculé pour chaque mode d'ionisation. Il est de 1,34 ppm en mode positif et 1,36 ppm en mode négatif. Les différences de masse observées peuvent être réduites par l'infusion d'un composé de référence (lock-mass) de masse proche des analytes. Cette « lock-mass » permettrait de calibrer l'instrument sur les masses recherchées c'est-à-dire autour de 250 m/z. Actuellement, lors des injections, le composé infusé, le HP-921 possède une masse sur charge

de 922.009798 m/z $[M+H]^+$ ou 966.000725 m/z $[M+HCO_2]$ c'est-à-dire trois fois supérieure à celle des analytes.

Pour le GC-QTOF, les erreurs sont comprises entre 10 ppm et 5 ppm. L'écart absolu moyen est de 0,94 ppm (Figure 39).

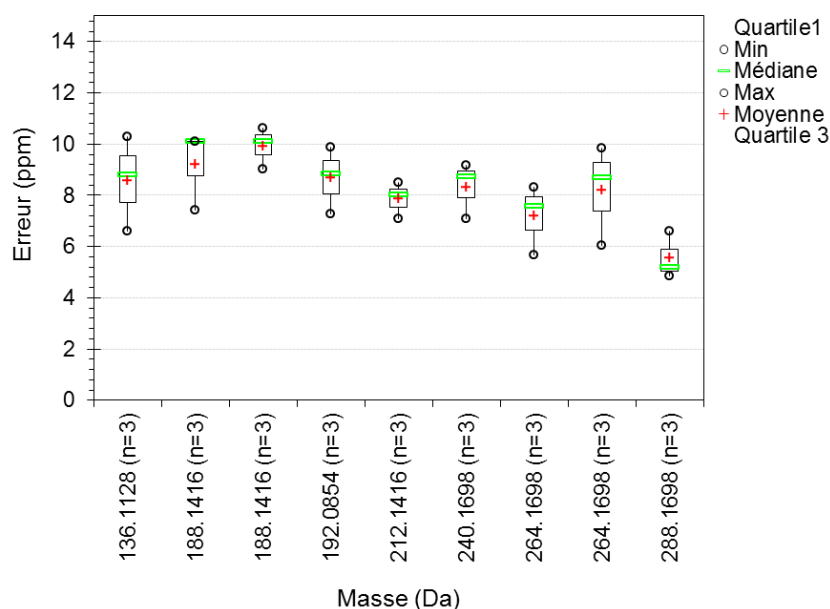


Figure 39 : Erreurs en masse mesurées sur 3 acquisitions en GC-QTOF. 9 HAP ont été injectés à une concentration d'environ 1 ng/g.

2.3 Les limites de détection

Des solutions de composés en mélange ont été injectées en LC-QTOF et GC-QTOF selon les méthodes appliquées pour les fractions obtenues par l'analyse EDA. Les limites de détection ont été extrapolées à partir des concentrations les plus faibles injectées et déterminées à partir du rapport signal/bruit égal à 3. Chaque composé a été recherché dans le chromatogramme selon sa masse. Le rapport signal/bruit a été obtenu selon la méthode du « peak to peak », c'est-à-dire en considérant la hauteur maximale du bruit sur la zone définie, soit la zone avant le pic.

Pour le LC-QTOF, les valeurs obtenues avec l'injection du mélange de 19 composés pharmaceutiques sont comprises entre 0,3 pg injecté pour le diazépam et 6 pg injecté pour le bromazépam pour le mode d'ionisation positif et entre 0,9 pg injecté pour le gemfibrozil et 14 pg injecté pour le naproxène.

Pour le GC-QTOF, les limites de détection obtenues sont pour les 9 HAP inférieures au picogramme injecté.

Ces limites de détection sont présentées ici pour illustrer la sensibilité des spectromètres utilisés. Cette sensibilité est molécule dépendante et ne peut être généralisée. De plus, il est important de distinguer limites de détection et limites d'identification. La

détection d'un ion à une concentration donnée ne garantit pas forcément son identification à la même concentration.

3 La stratégies d'identification

Plusieurs stratégies ont été mises en place pour l'identification moléculaire. Les démarches menées dépendent des spectromètres employés (*i.e.* LC-QTOF, GC-QTOF). Les procédures d'identification élaborées pour les deux spectromètres de masses utilisés sont décrites dans cette partie.

3.1 Caractérisation moléculaire par LC-QTOF

Deux stratégies ont été mises en place pour l'identification des composés par LC-QTOF (Figure 40). La démarche sélectionnée dépend principalement de la complexité des échantillons.

3.1.1 L'acquisition des données

La première méthode consiste à réaliser deux analyses. Elle est réservée aux matrices environnementales complexes comme les extraits bruts. En effet, plus la quantité de composés sera importante, plus le nombre d'ions générés sera élevé et par conséquent plus le temps alloué à l'acquisition des données pour chaque ion sera réduit. Dans le but d'obtenir des informations précises sur la masse exacte et aussi sur la fragmentation pour un maximum d'ions, il est nécessaire de réaliser deux analyses. La première est effectuée en mode MS simple, c'est-à-dire en utilisant uniquement l'analyseur à temps de vol (TOF) puis une seconde analyse est réalisées en mode MS/MS, c'est-à-dire en utilisant à la fois le quadropôle et le TOF (Figure 40). La première acquisition permet d'obtenir des informations sur la masse exacte des composés, permettant ainsi de déterminer les formules brutes des molécules détectées. La seconde analyse est effectuée pour acquérir des informations sur la structure des composés. Les ions précurseurs sont sélectionnés par le quadropôle, puis fragmentés par la cellule de collision et finalement, la masse et l'abondance de chaque fragment sont mesurées par le TOF. Cette méthode demande de disposer d'une quantité d'échantillon assez importante puisque plusieurs injections seront nécessaires pour posséder toutes les données essentielles à l'identification des molécules.

La seconde méthode est destinée aux échantillons peu complexes tels que les sous-fractions obtenues lors de l'approche EDA ou certains échantillons bruts susceptibles de contenir peu de composés comme les eaux de source ou minérales par exemple. Elle consiste à analyser les échantillons en mode données-dépendant (Figure 40). En une seule acquisition, les ions présents sont détectés par le TOF afin de connaître leur masse exacte et leur intensité, et les ions les plus intenses sont ensuite sélectionnés par le quadropôle et fragmentés pour obtenir les informations structurales. Cette méthode d'acquisition permet donc d'obtenir un maximum

d'informations sur les molécules détectées en une seule analyse. Effectuant à la fois le mode MS et MS/MS, l'analyse des ions demande un temps certain. Le temps de cycle doit être optimisé pour obtenir des données fiables pour l'identification mais également des informations sur le maximum d'ions détectés. Plus les informations demandées seront précises ou nombreuses, plus le temps d'analyse des ions sera long. Un cycle d'acquisition par ion trop important amène à perdre des informations sur les autres ions présents. Cette méthode nécessite donc d'effectuer un compromis entre la précision de la masse exacte de l'ion précurseur et celles des fragments. Dans ces travaux, le choix s'est porté sur l'acquisition de 1 à 3 spectres/seconde correspondant suivant la largeur des pics chromatographiques à 10 à 20 balayages. Pour chaque cycle, 2 ions précurseurs sont sélectionnés pour la fragmentation.

Pour les deux méthodologies, la gamme de masse enregistrée est comprise entre 70 m/z et 1700 m/z . Cette fenêtre d'acquisition a été définie en tant que telle pour se focaliser sur les composés organiques et éviter d'augmenter le temps de cycle par la recherche de molécules de taille plus importante comme des protéines.

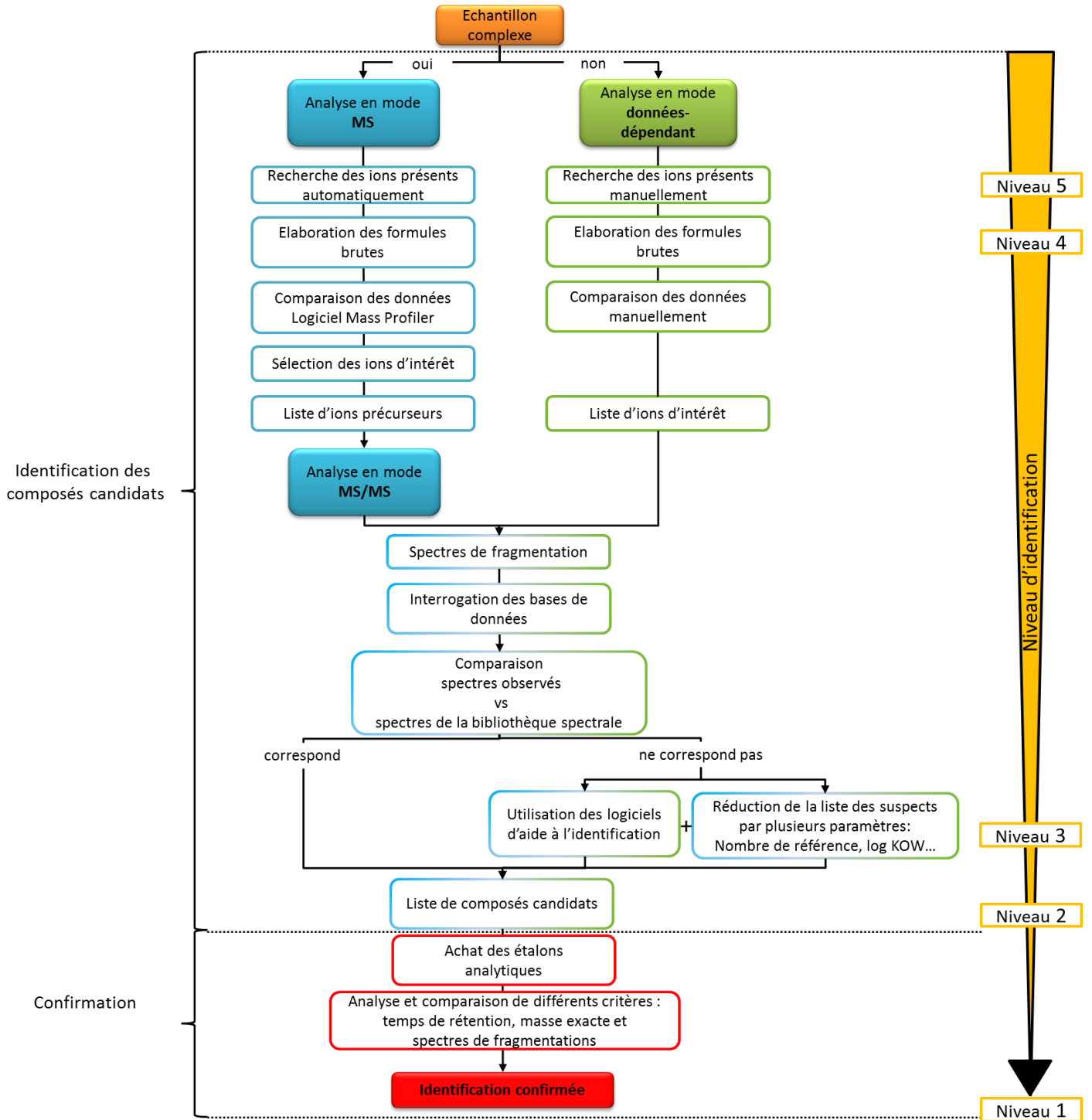


Figure 40 : Stratégies d'identification moléculaire mises en place pour les analyses effectuées par LC-QTOF. Le terme « MS » signifie que seul le TOF est utilisé ; le terme « MS/MS » signifie que le quadrupôle et le TOF sont tous les deux utilisés lors de l'acquisition.

3.1.2 Le traitement des données

Les données acquises sont retraitées avec le logiciel *MassHunter Qualitative* (Agilent Technologies, France). Suivant les méthodes d'acquisition, deux stratégies d'identification sont mises en place (Figure 40). Ces deux démarches diffèrent sur la manière de rechercher les ions d'intérêt.

a. Sélection des molécules d'intérêt dans les échantillons complexes

La méthode pour mettre en évidence les composés d'intérêt est généralement longue en terme de retraitement de données puisque elle est effectuée préférentiellement dans le cas d'échantillons complexes contenant beaucoup de signaux.

À l'issue de l'analyse en mode MS, les ions présents dans l'échantillon sont recherchés automatiquement par une fonction du logiciel (*Feature by Molecular Extraction*, MFE) permettant d'extraire les ions par leurs caractéristiques moléculaires (*i.e.* temps de rétention, intensité...) via un algorithme. Les paramètres d'extraction sont définis par l'observation du chromatogramme. Généralement, tous les ions qui possèdent une intensité supérieure à 10 fois le bruit de fond sont recherchés. L'état de charge maximum, la formation de molécules protonées ou déprotonées et la présence possible d'adduit sont renseignés préalablement avant le lancement de l'algorithme. Les ions $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$ et $[M+K]^+$ sont rentrés dans les paramètres d'attribution lors des analyses en mode d'ionisation positif et $[M-H]^-$, $[M+Cl]^-$ et $[M+HCOO]^-$ pour le mode négatif. D'après le fournisseur, la fonction MFE est capable de repérer les adduits présents et de générer une masse mono-isotopique pour la molécule neutre la plus juste possible. Les masses mono-isotopiques des ions détectés sont établis automatiquement. La formule brute des composés détectés est ensuite établie automatiquement en se basant sur la masse mono-isotopique mesurée et l'amas isotopique obtenu au cours de l'acquisition. La formule est déterminée en utilisant les atomes C, H, N, O, S, F, P, Cl et Br. Seule les formules possédant un score supérieur à 50 % sont générées. Ce score comprend l'adéquation entre masse mesurée et masse théorique obtenue par les atomes constitutifs, l'abondance et l'espacement de chaque pic du profil isotopique. La même démarche est effectuée sur les échantillons et les blancs protocoles associés. Les listes générées de molécules détectées dans les échantillons et dans les blancs sont ensuite comparées via le logiciel *MassProfiler* (Agilent technologies, France). Un exemple de comparaison, entre les signaux détectés dans une eau brute et une eau traitée de STEP, est montré en Figure 41. L'utilisation du logiciel *MassProfiler* permet de visualiser rapidement les molécules présents dans tel ou tel échantillon et/ou présent dans le blanc de protocole. Ainsi, cette étape permet de distinguer les composés présents uniquement dans un échantillon de manière à réduire la liste des molécules détectées en se focalisant seulement sur les composés d'intérêt (*i.e.* non détectés dans le blanc, seulement présents dans l'échantillon

sélectionné). Les ions précurseurs de ces molécules sont alors sélectionnés pour être fragmentés. L'échantillon est de nouveau injecté mais l'acquisition s'effectue en mode MS/MS afin d'obtenir les spectres de fragmentation de chaque molécule d'intérêt.

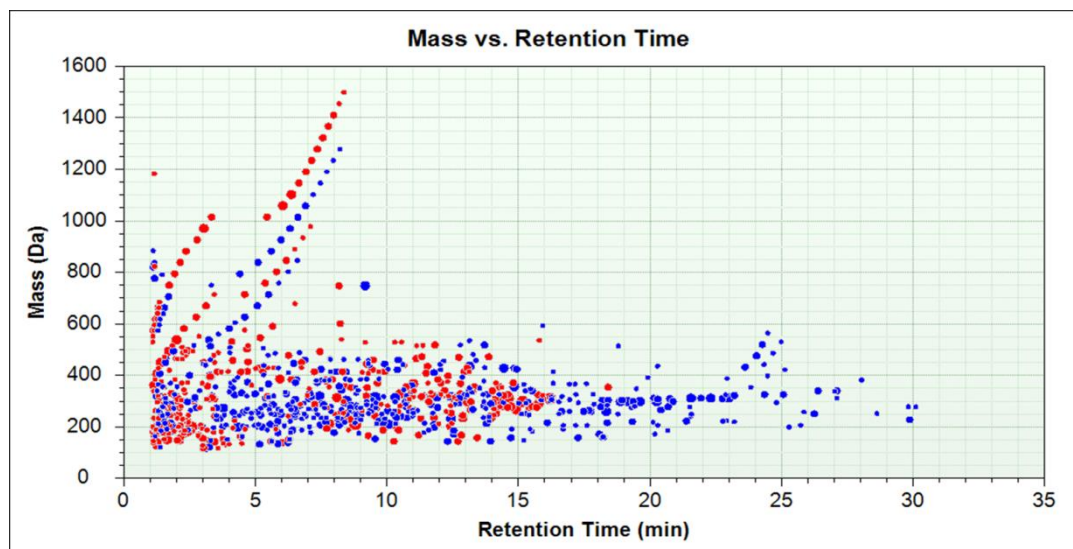


Figure 41 : Comparaison de données par *MassProfiler*. Les échantillons présentés sont des eaux d'entrée et de sortie de STEP. Un code couleur est donné pour chaque échantillon. Un point représente une molécule obtenue par la fonction MFE du logiciel *MassHunter Qualitative*.

b. Choix des composés d'intérêt dans les échantillons peu complexes

Outre l'acquisition des données, la démarche pour sélectionner les molécules d'intérêt est légèrement différente pour les échantillons peu complexes. Bien qu'il soit possible d'effectuer la même stratégie que pour les échantillons complexes, une recherche manuelle des ions est ici privilégiée (Figure 40). La méthode automatique pouvant posséder certaines limites (Chapitre 5, section 4, p143), la démarche manuelle est préférée quand elle est possible à mettre en place. Par l'observation du chromatogramme, les ions les plus intenses sont sélectionnés, c'est-à-dire ceux se détachant visuellement du bruit de fond. Au temps de rétention donné, l'ion pseudo-moléculaire est repéré et la formule brute est ensuite générée automatiquement par la sélection de l'amas isotopique en utilisant les atomes : C, H, N, O, S, F et P. Les atomes de chlore et de brome ayant une signature isotopique caractéristique sont ajoutés dans les paramètres lorsque leur présence est identifiée. Tout comme pour la stratégie d'identification réalisée pour les échantillons complexes, seules les formules les plus probables (score > 50%) sont conservées. Les ions détectés dans l'échantillon sont ensuite recherchés manuellement dans le blanc protocole associé et/ou dans un autre échantillon suivant la problématique. Le but est de vérifier l'absence de l'ion dans l'autre échantillon et/ou le blanc afin d'établir une liste d'ions d'intérêt.

c. Finalisation de l'identification

Les spectres de fragmentation des ions d'intérêt permettent de donner des informations sur la structure de la molécule et donc d'obtenir son identité. Une fois les spectres obtenus, la démarche d'identification est la même pour les échantillons complexes ou non.

Tout d'abord, les spectres de fragmentation pour les composés à identifier sont comparés aux spectres de fragmentation disponibles dans les banques de données spectrales (Figure 40). Plusieurs librairies pouvant être privées ou en libre-service peuvent être interrogées. Trois bases de données disposant de spectres de fragmentation ont été employées durant ces travaux :

- **Metlin** : banque de données en libre-service pour LC-QTOF possédant 62 020 références (Smith et al., 2005, <http://metlin.scripps.edu/index.php>).
- **Forensic** : banque de données privée pour LC-QTOF possédant 7 360 composés.
- **Massbank** : banque de données en libre-service et pouvant être continuellement alimentée par les laboratoires d'analyse disposant de 30 521 références (tout type d'instrument analytique confondu) (Horai et al., 2010, <http://www.massbank.jp/>, <http://massbank.ufz.de/MassBank/>).

Lorsque les spectres correspondent, le nom du composé est retenu comme candidat et devra être confirmé par l'injection de l'étalon analytique.

Quand il ne peut y avoir de correspondance entre les spectres, des recherches complémentaires sont effectuées afin de réduire au maximum la liste des composés suspects. Des logiciels peuvent aider à l'identification des molécules grâce à des algorithmes mathématiques prédisant la fragmentation des composés associés à la formule brute générée (Chiaia-Hernandez et al., 2014; Gerlich and Neumann, 2013; Schymanski et al., 2014; Wolf et al., 2010). Deux outils ont été utilisés pour l'identification lorsque les librairies de spectres ne permettaient pas de donner des informations :

- **Molecular Structure Correlator (MSC)** : logiciel fourni par Agilent Technologies. L'algorithme est expliqué dans l'article de Hill et Mortishire-Smith (2005).
- **Metfrag** : utilitaire en libre-service sur internet (<http://msbi.ipb-halle.de/MetFrag/>). L'algorithme est basé sur la prédiction de la fragmentation grâce aux énergies de liaison. Le détail de l'algorithme est rapporté par Wolf et al. (2010).

Ces aides donnent un score de probabilité entre les fragments obtenus et les structures de molécules correspondant à la formule brute établie.

Outre l'utilisation de ces logiciels, l'interprétation manuelle du spectre de fragmentation peut révéler des informations sur la structure de la molécule, permettant ainsi de réduire le nombre de composés suspects.

Une diminution de la liste des composés peut également être réalisée par l'utilisation de bases de données moléculaires référençant les propriétés physico-chimiques des composés (Hug et al., 2014). La base de données la plus employée pendant cette thèse est Chemspider qui possède 32 millions de molécules provenant de 490 sources (Chemspider, 2015). La base de données Scifinder[®] a également été utilisée pour certains résultats lorsque les données disponibles dans Chemspider n'étaient pas suffisantes. Ces bases de données permettent d'accéder aux propriétés des composés.

Un des paramètres aidant à l'identification est le coefficient de partage octanol/eau (log Kow) (Schymanski et al., 2009, 2008). Le log Kow renseigne sur le caractère hydrophile ou hydrophobe des composés et par conséquent sur la probabilité de rencontrer la molécule dans tel ou tel échantillon ou fraction et également au temps de rétention mesuré.

Le nombre de citation d'un composé dans la littérature apporte également une information sur son occurrence dans le milieu environnemental. Plus une molécule est référencée dans une matrice, plus la probabilité de la rencontrer dans l'échantillon étudié est importante (Milman, 2005).

Une fois la liste des composés candidats établis, les étalons analytiques sont achetés, lorsqu'ils sont disponibles commercialement afin de confirmer l'identification. L'étalon est analysé dans les mêmes conditions que le composé présent dans l'échantillon. Le temps de rétention, la masse exacte et le spectre de fragmentation de la molécule de référence sont comparés avec ceux du composé à identifier (Figure 42). L'identification est finalisée lorsque les caractéristiques moléculaires sont identiques.

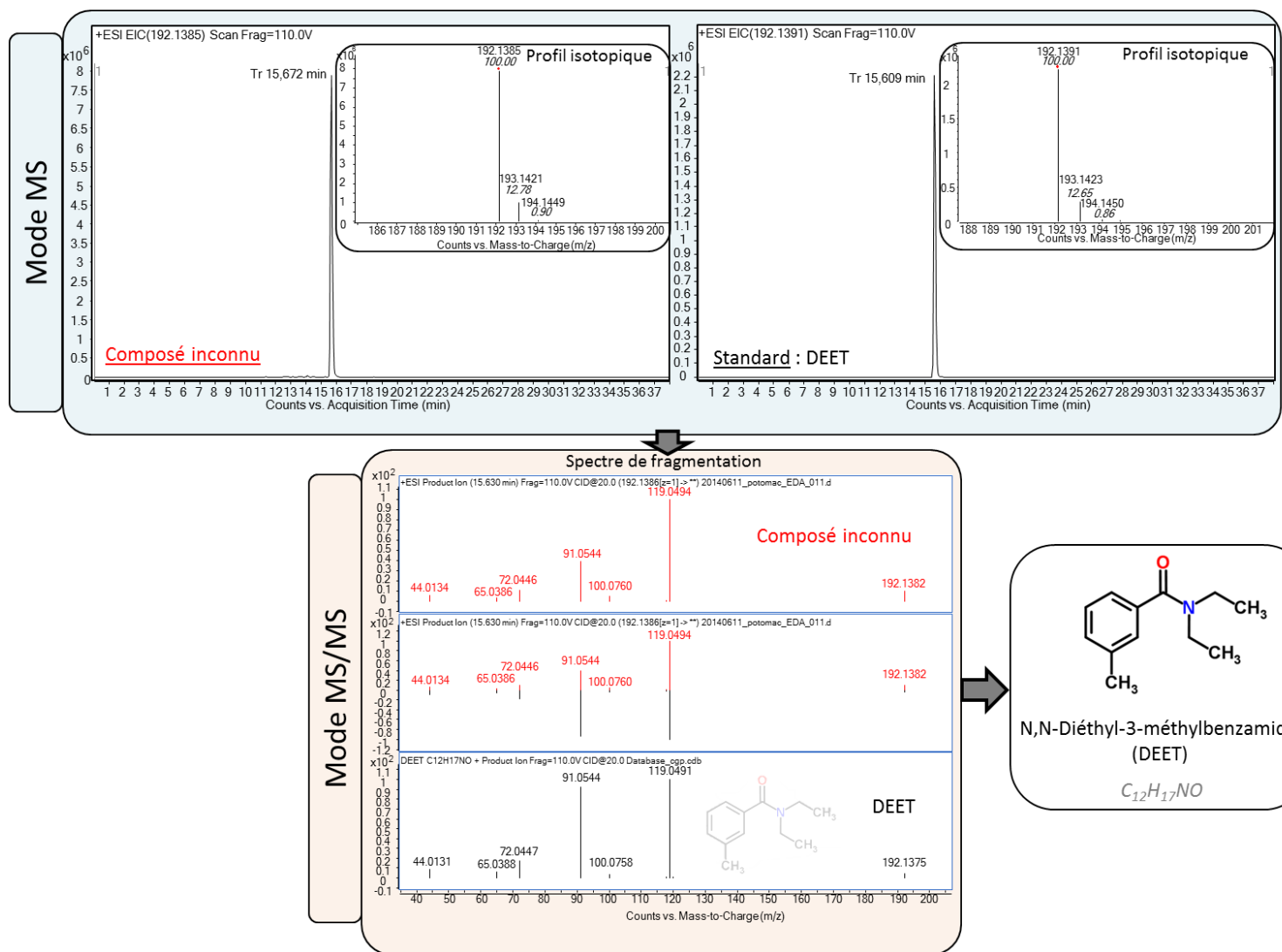


Figure 42 : Exemple d'identification moléculaire par l'analyse de l'étalon analytique réalisée au cours de ces travaux de thèse. La molécule est du DEET (insecticide) détectée dans une rivière grâce à l'EDA (ANR Potomac).

3.2 Identification par GC-QTOF

Pour les analyses par GC-QTOF, l'appareil a été utilisé en mode TOF. Les molécules ont été fragmentées au niveau de la source par impact électronique. Cette configuration a été sélectionnée pour que les spectres de molécules à identifier soient comparables à ceux disponibles dans les bases de données existantes (NIST11, W9N11). Par conséquent, une seule stratégie d'identification a été développée (Figure 43). Seules des fractions issues de l'analyse dirigée par l'effet ont été amenées à être analysées par cet appareil.

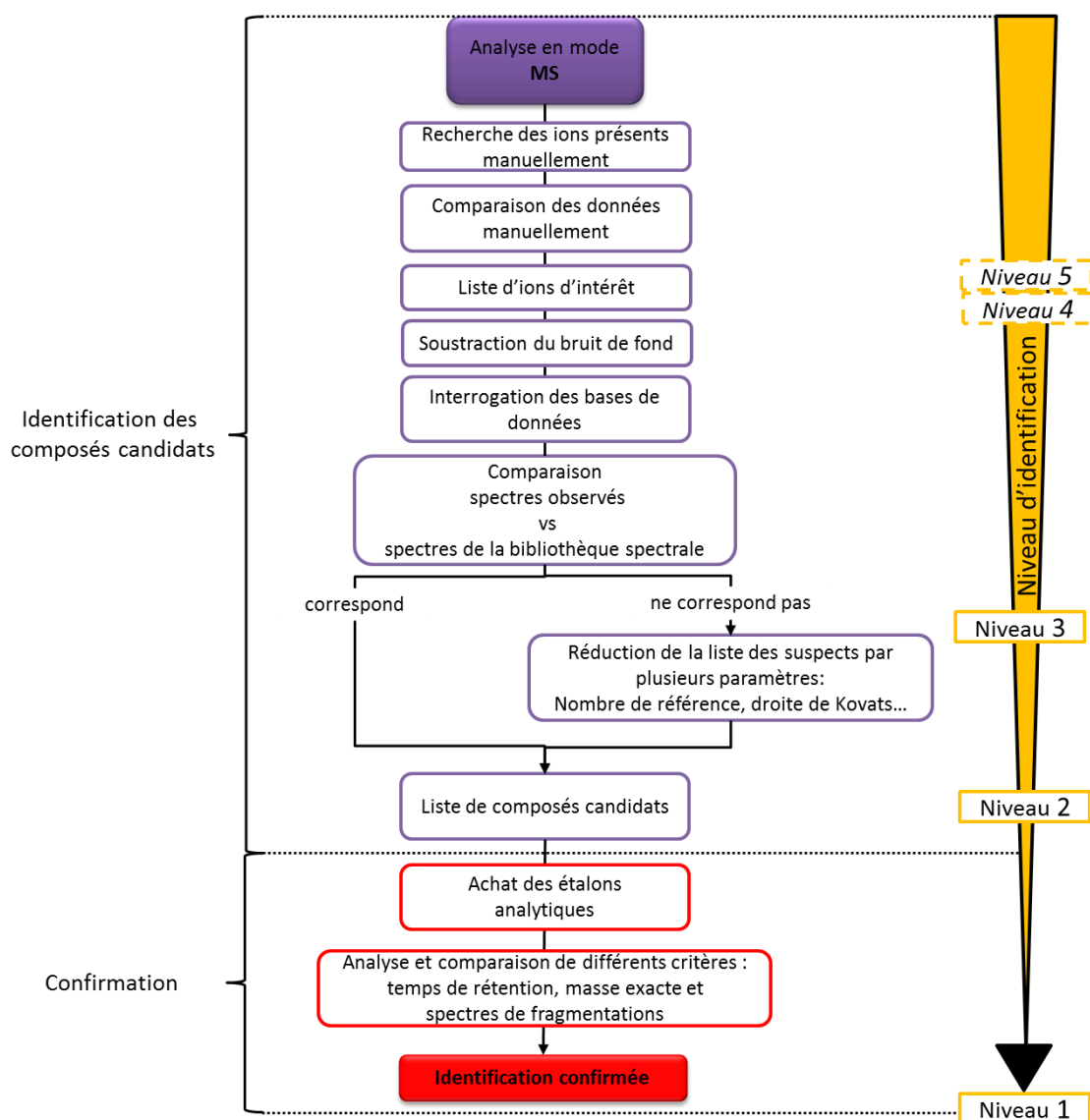


Figure 43 : Stratégie d'identification moléculaire mis en place pour les analyses effectuées par GC-QTOF. Le terme « MS » signifie que seul le TOF est utilisé.

La démarche est quasiment identique à celle réalisée lors du traitement des échantillons peu complexes en LC-QTOF. Chaque pic chromatographique est traité manuellement. Tout d'abord, les ions obtenus pour chaque temps de rétention dans les échantillons sont recherchés dans les blancs protocoles associés afin de repérer les molécules uniquement présentes dans les échantillons. Lorsque les pics chromatographiques sont peu intenses, le bruit de fond peut fortement impacter le spectre de fragmentation de la molécule détectée. Il est alors soustrait au spectre du composé afin de différencier les fragments appartenant à la molécule de ceux du bruit. Dans le cas de pics abondants, le bruit de fond est négligeable. Un exemple est exposé Figure 44. En absence de soustraction du signal basal, la molécule suspectée est le hexadécaméthyl-octasiloxane correspondant aux composants de la colonne chromatographique. Après soustraction du bruit de fond le composé suspecté est le stigmasta-3,5-dien-7-one.

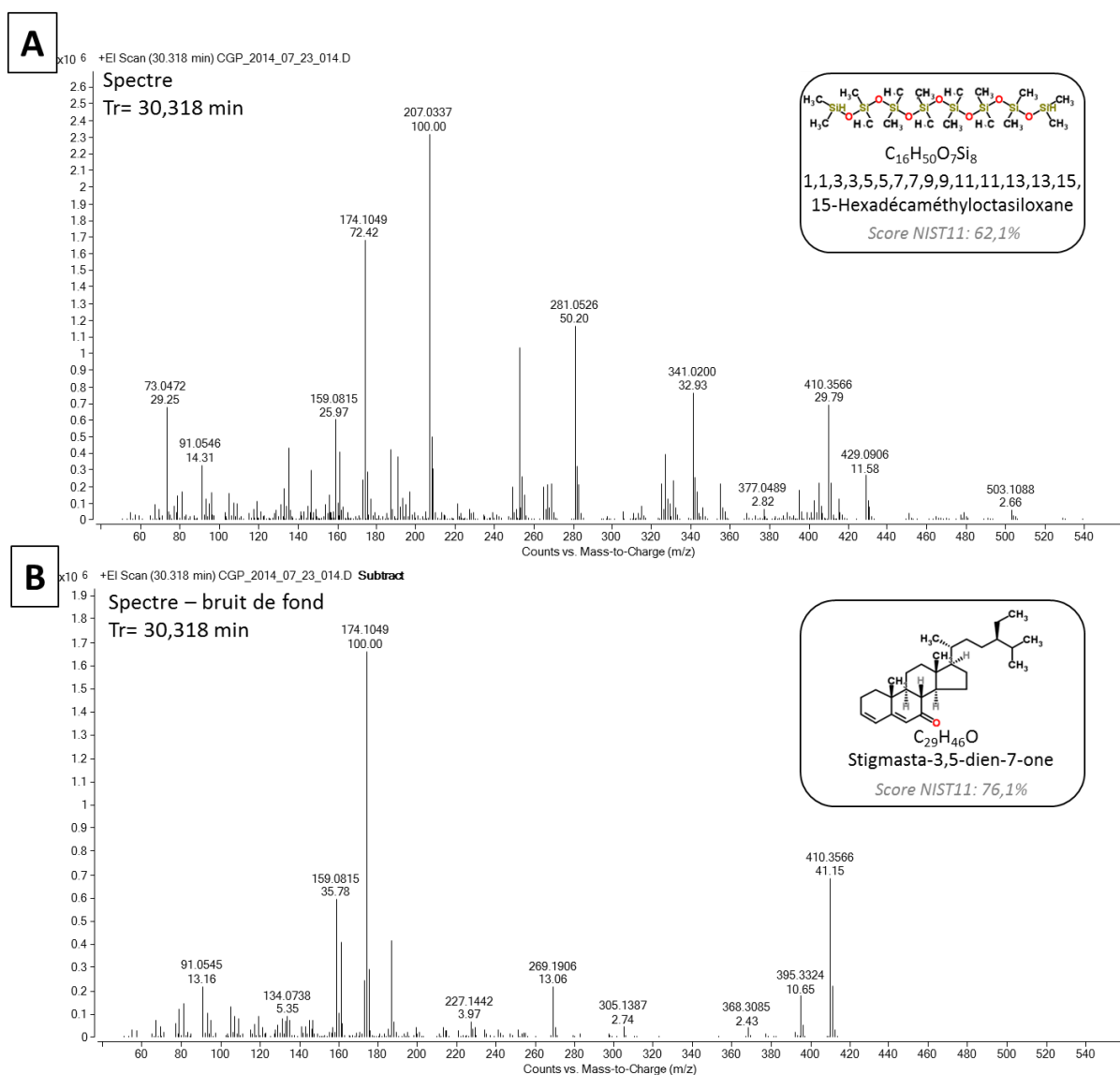


Figure 44 : Spectres de fragmentation obtenus au même temps de rétention par GC-QTOF. (A) représente le spectre original, (B) représente le spectre obtenu par soustraction du bruit de fond. Les spectres sont issus d'une fraction d'une boue compostée de station d'épuration.

Pour l'identification, les spectres de fragmentation générés par impact électronique aux temps de rétention définis sont comparés à ceux disponibles dans trois bibliothèques de spectres :

- **NIST11** : banque de données référencant 243 893 composés fournis par Agilent technologies. Des spectres de fragmentation sont également disponibles en libre-service sur le WebBook de chimie NIST (<http://webbook.nist.gov/chemistry/>)
- **W9N11** : bibliothèque de spectres possédant 819 882 molécules
- **Massbank** (Chapitre 5, section 3.1.2, p135)

Si les spectres ne sont pas concordants, la liste des molécules suspectes peut être réduite par l'utilisation d'outils d'aide à l'identification tel que Metfrag (Chapitre 5, section 3.1.2, p135) et/ou par les propriétés moléculaires comme le log Kow. Pour les acquisitions en GC-QTOF, l'indice de rétention de Kovats qui relie le temps de rétention d'une molécule à son nombre de carbone peut également aider à diminuer le nombre de composés suspects (Schymanski et al., 2009; Ulrich et al., 2013). La droite de Kovats obtenue avec la méthode d'acquisition utilisée pour l'identification des molécules en GC-QTOF est présentée Figure 45. Les temps de rétention des composés à identifier peuvent être estimés par report sur la droite. Des molécules peuvent ainsi être écartées de la liste des suspects.

Afin de finaliser l'identification, comme pour les analyses en LC-QTOF, les étalons analytiques sont achetés et analysés dans les mêmes conditions que l'échantillon.

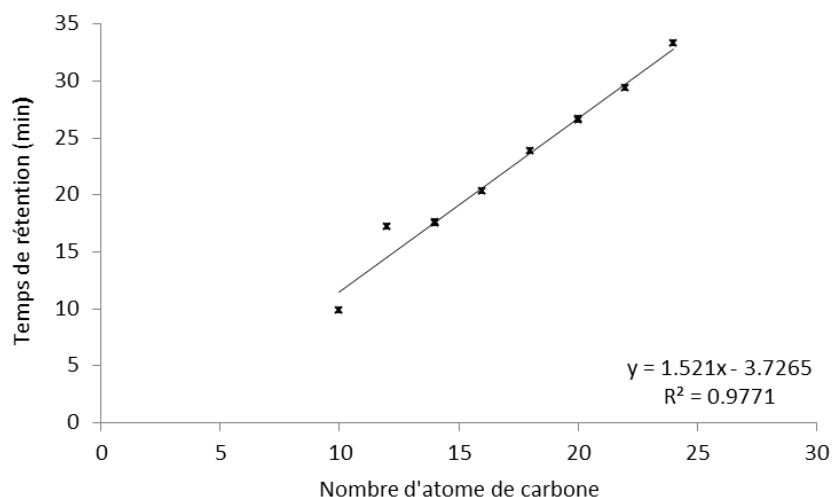


Figure 45 : Exemple de droite de Kovats obtenue par GC-QTOF configuré en mode TOF, en début de séquence par l'injection d'étalons (HAP).

4 Freins à la caractérisation moléculaire

Les analyses non ciblées effectuées par LC-QTOF et GC-QTOF ont montré que l'identification moléculaire pouvait se révéler délicate tout au long de la démarche de traitement des données. Plusieurs limites ont été rencontrées au cours de ces travaux de thèse.

4.1 La recherche des ions et l'attribution des formules brutes

4.1.1 Difficultés mis en évidence en LC-QTOF

a. Les anomalies d'attribution

Pour les échantillons complexes analysés en LC-QTOF, la recherche des ions présents est effectuée automatiquement par l'emploi de la fonction MFE du logiciel MassHunter. Cette fonction se base sur les caractéristiques moléculaires et est capable d'identifier les molécules multichargées et/ou possédant des adduits. En vérifiant manuellement quelques résultats, il est apparu que pour certains composés, la détection mais également l'attribution de la formule brute était incorrecte. En effet dans le cas de molécules polymériques, telles que les polyéthylène-glycols (PEG), détectés dans les échantillons d'eaux de STEP, des pertes répétées de 44,026 m/z correspondant au groupement $-\text{[C}_2\text{H}_4\text{O]}$ sont observées sur le chromatogramme sur une majeure partie de l'acquisition (Figure 46).

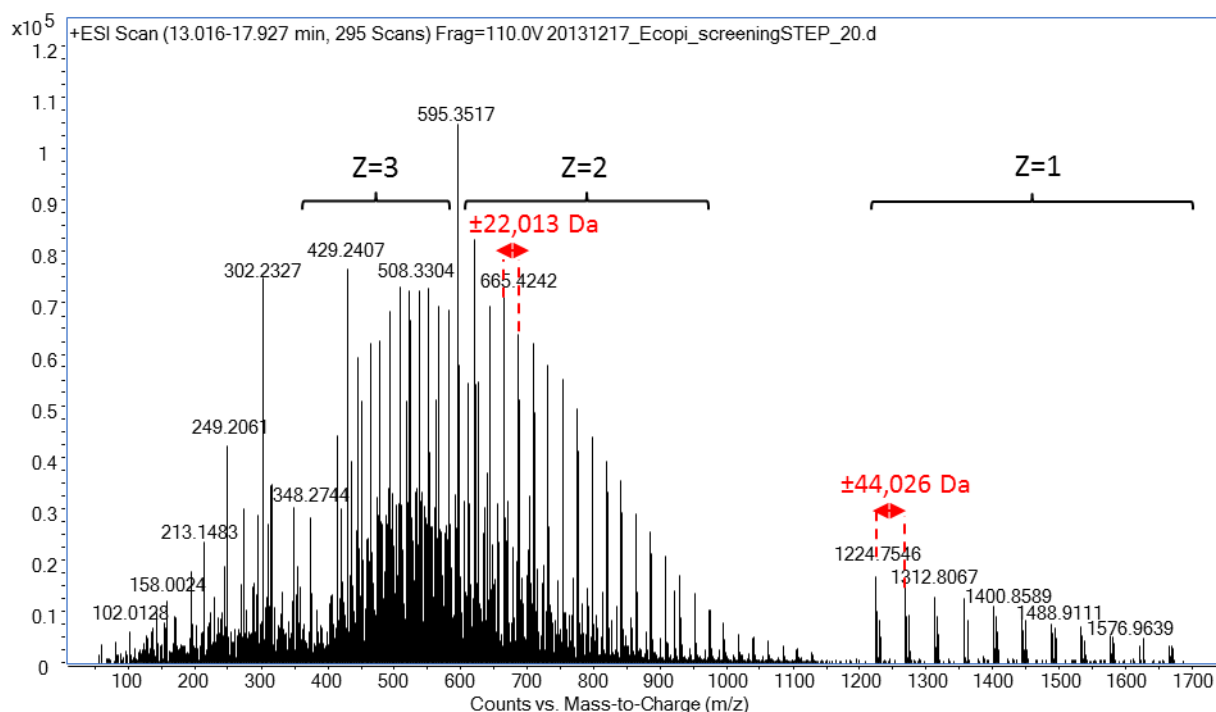


Figure 46 : Spectre MS de polyéthylène-glycol dans une eau brute de STEP. Le spectre montre la présence d'ions mono-chargés (Z=1), di-chargés (Z=2) et tri-chargés (Z=3). Les ions mono-chargés sont séparés de 44,026 Da correspondant au groupement $-\text{[C}_2\text{H}_4\text{O]}$.

Ces ions sont considérés par le logiciel comme des molécules indépendantes même en ajoutant dans les paramètres de recherche de composés (MFE), l'adduit $[M+C_2H_4O]^+$. Le problème réside dans l'attribution des formules entre deux ions qui peut donner des résultats incohérents. Un exemple de génération de formules brutes est donné Tableau 21. Les deux ions détectés appartiennent aux mêmes polymères et sont séparés de 44,026 Da soit $-[C_2H_4O]$. Cependant, le logiciel attribue les formules $C_{57}H_{116}F_4N_7O_{18}PS$ et $C_{58}H_{110}F_8N_8O_{17}S$ aux ions 1326,7779 et 1375,7655, respectivement. De plus, l'algorithme les identifie comme des molécules protonées or il s'agit de molécules possédant un adduit NH_4^+ et Na^+ , respectivement (Figure 47).

Tableau 21 : Exemple d'attribution automatique pour deux signaux appartenant à un motif polymérique de type PEG différent de 44,026 Da détectés dans les eaux de STEP.

ion	m/z (Da)	Masse du neutre (Da)	Diff (ppm)	Formule brute	Score MS (%)
$[M+H]^+$	1375.7655	1374.7592	-0.72	C58 H110 F8 N8 O17 S	94,14
$[M+H]^+$	1326.7844	1325.7779	-0.55	C57 H116 F4 N7 O18 P S	96,93

Les mêmes observations ont été rapportées par Aminot (2013) dans des échantillons d'eau de STEP concernant les PEG. L'examen des attributions concernant les motifs constitutifs des PEG a également révélé que les adduits étaient parfois mal évalués par la recherche automatique. Le logiciel peut être amené à identifier à un temps de rétention donné plusieurs ions protonés $[M+H]^+$ alors qu'il semble s'agir de la même molécule comportant différents adduits (Figure 47). Ces erreurs peuvent être réduites par le traitement automatique du chromatogramme sur des plages de temps courtes permettant ainsi de diminuer le nombre d'ions présents et par conséquent de faciliter le calcul effectué par les algorithmes. Cependant, malgré cette précaution, des anomalies persistent et la vérification des molécules détectées une à une demande un travail long et fastidieux qui peut même se révéler quasiment impossible lors d'échantillons très complexes possédant plusieurs milliers de signaux. Ces erreurs d'interprétation soulignent que les algorithmes régissant les recherches et attributions automatiques possèdent actuellement quelques lacunes pour le traitement d'analyses environnementales. Ces anomalies, si elles ne sont pas corrigées, peuvent créer un biais lors des interprétations globales des données en mode MS (*e.g.* diagramme de Van Krevelen, indice d'aromaticité...). Par conséquent, le traitement des données manuellement est privilégié lorsque ce dernier est possible, c'est-à-dire pour l'analyse d'échantillons peu complexes. Cependant, l'extraction des données automatiquement est actuellement le seul outil pour caractériser de la manière la plus exhaustive possible des matrices complexes. Les algorithmes utilisés doivent donc évoluer et être optimisés pour répondre aux problématiques environnementales.

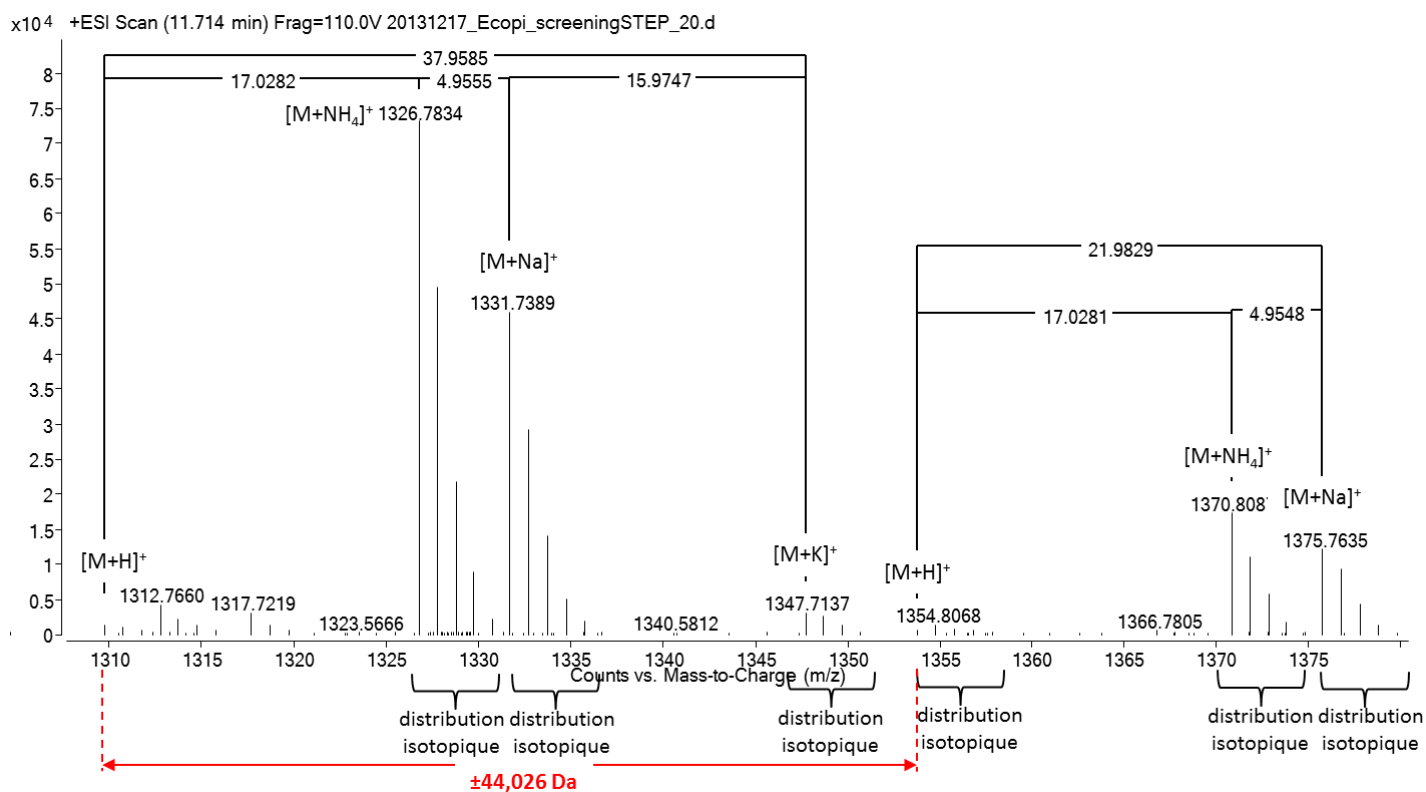


Figure 47 : Attribution manuelle des adduits présents sur un spectre MS de PEG détecté dans une eau brute de STEP.

b. Dilution du signal et interférence

En parallèle aux quelques anomalies d'attribution des compositions élémentaires des molécules détectées, l'analyse des échantillons complexes est affectée par la présence d'un nombre important de signaux pouvant s'élever à plusieurs milliers de composés suivant les paramètres de traitement de données renseignés. La présence d'autant de molécules lors d'une analyse en HRMS peut perturber le processus d'ionisation des composés. En effet, le nuage de molécules présentes dans la source peut être tellement dense qu'il est envisageable qu'une partie des composés ne puisse pas être ionisée. En absence d'ionisation, les molécules ne peuvent pas être détectées. La simplification de l'échantillon telle qu'elle est réalisée lors du fractionnement permet de diminuer la quantité de molécules et donc d'éviter ce problème.

Des molécules pouvant agir comme des interférents peuvent également représenter un frein aux analyses non ciblées. Certains composés, comme les PEG, possèdent une forte affinité protonique qui les rend facilement ionisables (Lin et al., 1993). Ces polymères génèrent des ions multichargés qui amènent à la détection de massifs isotopiques denses et complexes (Figure 46, p 143). En plus de contribuer à la monopolisation de l'énergie d'ionisation de la source, les PEG de par leurs distributions isotopiques peuvent empêcher la visualisation des autres ions pseudo-moléculaires présents.

4.1.2 Obstacle rencontré en GC-QTOF

L'attribution des formules brutes en GC-QTOF n'est pas toujours réalisable puisque, comme pour les analyses en GC-MS, l'ion moléculaire n'est pas forcément visible. En effet, l'impact électronique peut totalement fragmenter l'ion moléculaire l'amenant à disparaître du spectre obtenu. Cette caractéristique est problématique dans le cas de la recherche de composés inconnus pour lesquels aucun spectre de fragmentation n'est disponible, pour comparaison, dans les bases de données.

4.2 Le manque d'informations structurales

Les informations structurales sont indispensables pour l'identification de molécules non ciblées ou inconnues. Les spectres de fragmentation permettent d'accéder à ces informations mais ils ne sont pas toujours disponibles ou exploitables. Trois situations ont été observées lors d'acquisitions de données effectuées par LC-QTOF.

La première est une absence de spectre de fragmentation du composé. Ce cas est apparu lors de l'analyse de molécules peu abondantes. Même si des informations sur la formule brute sont disponibles car le composé a été détecté, aucun spectre de fragmentation n'a pu être obtenu. L'absence de spectre MS/MS rend l'identification moléculaire irréalisable. Il existe donc une différence notable entre limite de détection et limite d'identification suivant les molécules.

Le second point observé est le mauvais isolement de l'ion précurseur en mode MS/MS ou Auto-MS/MS. Si des ions de poids moléculaires proches sont présents à des temps de rétention voisins, il est possible que l'ion précurseur soit mal isolé et que le spectre de fragmentation contienne les fragments de plusieurs ions. Ce cas n'a été observé que rarement. Il a été résolu par une amélioration de la séparation chromatographique. La sélection d'une fenêtre d'ouverture du quadropôle faible peut également permettre de contourner ce problème. Sauf exception, lors des analyses effectuées en LC-QTOF les ions précurseurs sont choisis par le quadropôle avec une fenêtre de 1,3 m/z afin d'éviter la sélection involontaire d'ions appartenant à un autre massif isotopique.

Un autre cas observé est la présence d'un spectre de fragmentation qui ne permet pas d'obtenir d'informations structurales. Un exemple souvent remarqué est l'absence de fragmentation à différentes énergies de collision pour un mode d'ionisation donné. Les énergies choisies sont préférentiellement 10 V, 20 V et 40 V afin de pouvoir comparer les spectres de fragmentation à ceux des bases de données. Mais il peut s'avérer que les ions ne fragmentent pas à ces valeurs. La Figure 48 montre un exemple d'ions ne fragmentant pas à l'énergie 10V, 20V et n'étant pas assez intense pour obtenir durant la même acquisition le spectre à 40V. Aucune information structurale n'est donc disponible. Cependant, l'interrogation des bases de données identifie avec un score MS/MS de 100% l'acide 2-hexyldécanoïque. D'autres molécules sont également proposées comme l'acide palmitique. En regardant les structures de composés correspondant à la formule $C_{16}H_{32}O_2$, plusieurs molécules de structures proches et des isomères sont possibles. Par conséquent, compte tenu

de ces pauvres informations, l'identification ne peut pas complètement aboutir en l'état. Les analyses supplémentaires comme par exemple l'injection dans un autre mode d'ionisation doivent être réalisées pour espérer conclure sur le nom de la molécule détectée.

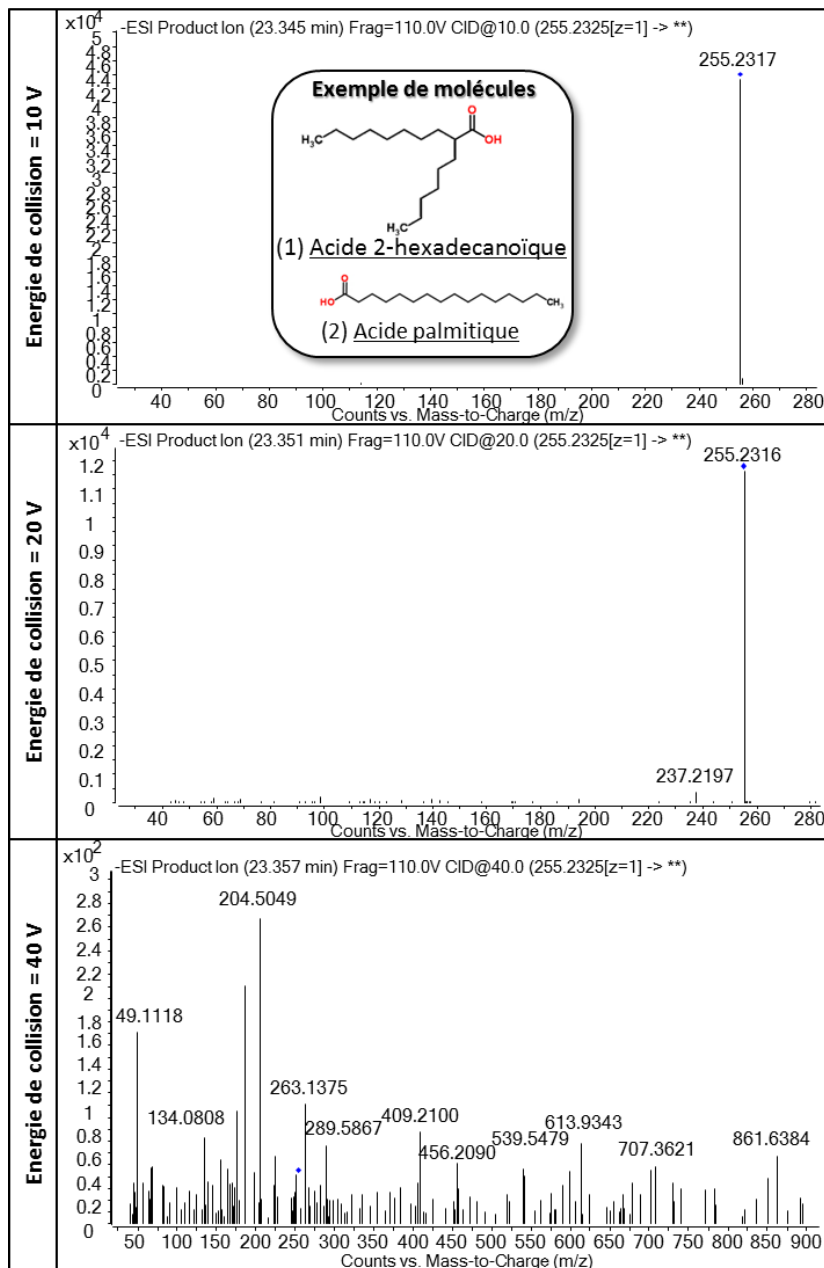


Figure 48 : Spectres de fragmentation de l'ion déprotoné m/z 255,2316 obtenus à trois énergies de collision différentes, 10 V, 20 V et 40 V. Un exemple de molécules possédant le même spectre de fragmentation est donné dans l'encadré.

Le dernier cas est la présence de quelques fragments dans le spectre qui n'apportent que peu d'informations. Un exemple de spectre de fragmentation permet d'illustrer ces propos (Figure 49). Trois fragments sont observables sur le spectre obtenu à 10 V et 20 V. Ils mettent en évidence une perte de $-\text{[H}_2\text{O]}$ et de $-\text{[FH]}$. En observant les structures pouvant présenter ce type de fragmentations, plusieurs noms de molécules peuvent être proposés et on ne peut conclure. Des exemples de noms sont cités Figure 49. Néanmoins, l'identification peut être finalisée à cette étape. Dans cet exemple, un des étalons analytiques a pu être acheté. Le choix s'est porté sur le composé possédant le plus de référence bibliographique, l'acide floctafénique. L'analyse de cet étalon à trois énergies de collision 10, 20 et 40 V a permis de confirmer l'identité de la molécule détectée dans l'échantillon. Dans ce cas, il est apparu que le spectre de fragmentation à 40 V possédait un nombre plus important de fragments (*i.e.* 5) permettant de confirmer de façon certaine l'identification. À cette énergie de collision, l'ion pseudo-moléculaire n'est plus visible. Une seule analyse à une seule énergie aurait amené soit à une absence d'identification par manque d'informations structurales (*e.g.* 10 V et 20 V), soit à des interrogations sur la justesse du spectre de fragmentation obtenu par l'absence de l'ion pseudo-moléculaire (*e.g.* 40 V). Cet exemple montre donc l'intérêt de fragmenter les molécules à plusieurs énergies de collision.

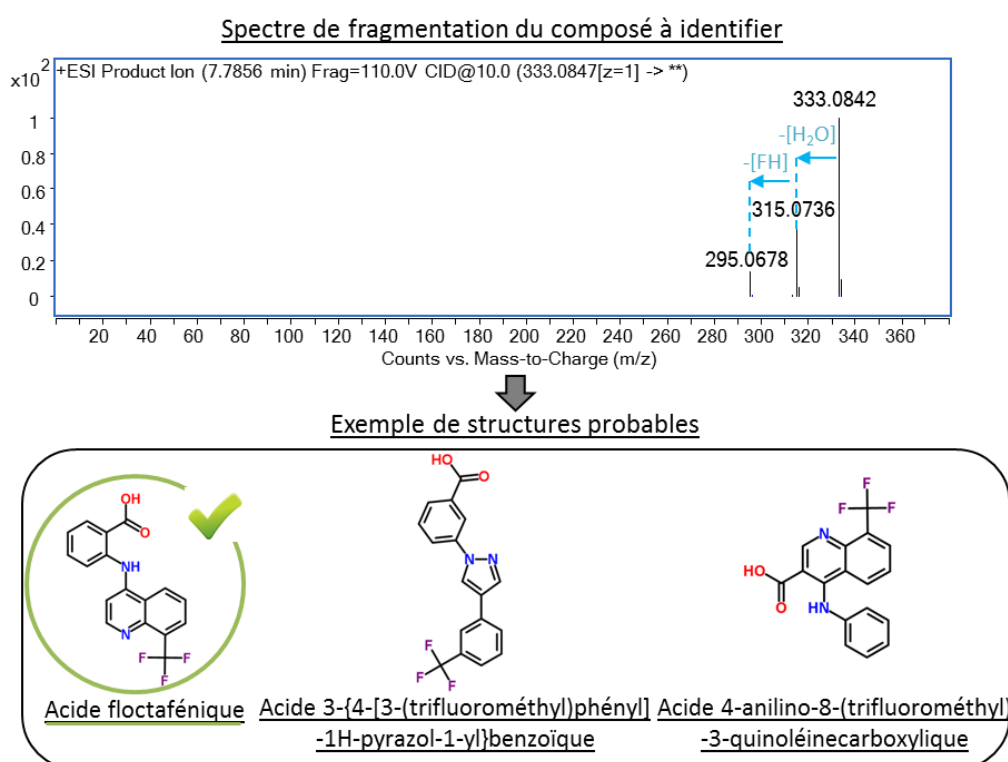


Figure 49 : Spectre de fragmentation donnant peu d'informations structurales d'une molécule détectée dans un POCIS déployé en rivière et structures probables apparentées. Le spectre s'est révélé être celui de l'acide floctafénique.

4.3 Les limites des bibliothèques spectrales et des logiciels *in silico*

4.3.1 Les banques de données

Après avoir obtenu les spectres de fragmentation, la première étape est d'interroger les bibliothèques spectrales afin de pouvoir proposer une structure probable pour les molécules détectées. Les bases de données sont généralement l'outil essentiel pour permettre une identification moléculaire correcte et rapide. Cependant, à l'heure actuelle, les bibliothèques de spectres ne contiennent que quelques milliers de molécules. Ce nombre est minime en comparaison aux plusieurs dizaines de millions de molécules référencées (Chemical Abstracts Services, 2015). Le développement des bibliothèques est nécessaire pour permettre d'identifier le maximum de composés susceptibles de se rencontrer dans l'environnement et donc dans les échantillons analysés.

De plus, il a été observé que pour les analyses par LC-QTOF, les banques de spectres sont, sauf exception (*e.g.* MassBank), axées majoritairement sur une catégorie de composés (*e.g.* pesticides, composés pharmaceutiques, métabolites...). Cette caractéristique conditionne les résultats de l'identification. Par exemple, l'utilisation exclusive de bases de données possédant principalement des composés pharmaceutiques amènera à identifier en majorité cette famille de molécules, si elle est présente, dans l'échantillon analysé. Or il se peut parfaitement que cet échantillon contienne également un nombre conséquent de pesticides. Cependant, ces derniers ne pourront pas être identifiés par manque de référence de ce type de composés dans les bibliothèques spectrales non adaptées. Par manque de moyen et de raisonnement, des conclusions hâtives peuvent être émises si le manipulateur ne connaît pas la composition des banques de données employées. Le développement de bibliothèques plus diversifiées ou l'emploi de plusieurs bibliothèques de spectres peut pallier ce problème.

Pour certains spectromètres de masses récents comme le GC-QTOF, aucune banque spectrale n'est aujourd'hui disponible avec la résolution proposée. Les bibliothèques employées sont celles utilisées en GC-MS et GC-TOF qui possèdent seulement une précision en masse à l'unité. Le GC-QTOF peut proposer des masses exactes à 3 décimales. Les comparaisons des spectres de fragmentations obtenus avec ceux des bases de données apportent des informations structurales sur les molécules à identifier mais ne permettent pas de les caractériser de façon quasi-certaines puisque les scores de compatibilité entre les deux spectres peuvent être sous- ou sur- estimés. Par conséquent, la confirmation par l'injection d'étalons analytique est dans ce cas inévitable afin de pouvoir proposer une identification juste.

4.3.2 Les aides *in silico* à l'identification

Lorsque les bibliothèques de spectre ne permettent pas de proposer une structure de molécules, des algorithmes peuvent être employés afin de prédire la structure de la molécule. Les deux aides utilisées sont MSC et Metfrag. Des tests ont été effectués pour connaître la confiance à accorder à de tels outils en se focalisant sur le logiciel MSC. Pour cela, une solution contenant 19 composés pharmaceutiques a été analysée en mode MS/MS, à une concentration d'environ 100 ng/g, afin d'obtenir les spectres de fragmentation des molécules. Les résultats de l'identification des composés par l'algorithme MSC sont présentés Tableau 22. Les scores MS/MS sont inférieurs à 78 %. Pour la majorité des molécules, l'identification est rarement correcte. Au vu de ces résultats, cet algorithme est encore à optimiser pour pouvoir l'employer comme aide pour la caractérisation des spectres de fragmentation.

Tableau 22 : Identification des spectres de fragmentation de 4 composés pharmaceutiques injectés à une concentration d'environ 100 ng/g par le logiciel *Molecular Structure Correlator*.

Nom	Formule brute	Librairies	Score MS/MS (%)	Position*	Energie de collision (V)
Théophylline	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂	Chemspider	77,16	45/148	20
		Meltin	77,16	3/3	20
		Forensics	77,16	3/3	20
Carbamazépine	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	Chemspider	-	-	20
		Meltin	66,76	1/1	20
		Forensics	66,76	1/3	20
Clenbutérol	C ₁₂ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O	Chemspider	61,48	3/87	40
		Meltin	-	-	40
		Forensics	61,48	1/1	40
Fluoxétine	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	Chemspider	68,08	20/98	20
		Meltin	68,08	1/1	20
		Forensics	68,08	1/2	20

* position du composé dans la liste des suspects proposés

4.4 La disponibilité des étalons analytiques

Afin de confirmer l'identité des composés détectés, les étalons analytiques doivent être analysés dans les mêmes conditions que les molécules à identifier. L'achat des composés de référence n'est pas toujours possible par manque de commercialisation ou à cause des prix trop excessifs. L'absence de confirmation ne permet pas de finaliser l'identification des composés et représente donc un verrou majeur.

5 Les différents niveaux d'identification

Comme exposé précédemment, la procédure d'identification est une démarche longue qui peut être interrompue à différents stades. En effet, la confirmation de l'identité des molécules n'est pas systématique et l'identification est généralement amenée à s'arrêter avant la finalisation de la caractérisation. Ainsi cinq degrés d'identification moléculaire sont observables (Schymanski et al., 2014). Ces niveaux vont du plus vague (*i.e.* niveau 5) au plus précis (*i.e.* niveau 1) qui correspond à l'identification complète du composé (Figure 50). Les échelons d'identification augmentent lorsque les spectres de fragmentation sont exploitables et donnent des informations structurales. Les niveaux 5 et 4 sont les degrés les plus flous n'apportant aucun renseignement sur la structure de la molécule. Ces deux niveaux ne sont pas toujours disponibles lors d'injection par GC-QTOF. C'est à partir du niveau 3 que la structure peut être affinée. Cependant à cet échelon, seule une structure approximative du composé à identifier peut être proposée. Les niveaux 2 et 1 sont les degrés qui permettent d'énoncer la structure la plus proche possible voir exacte de la molécule.

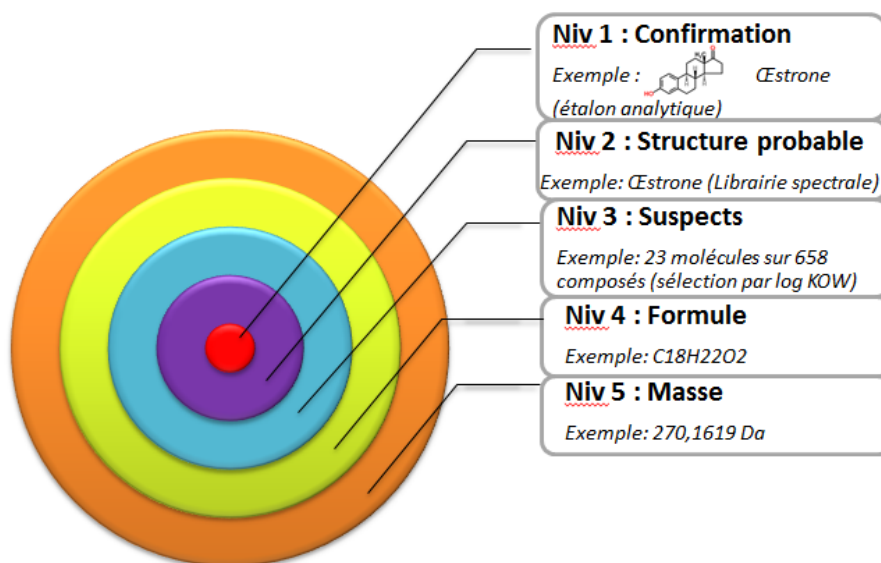


Figure 50 : Niveaux d'identification moléculaire par HRMS. Plus le niveau diminue plus l'identification du composé est complète (inspiré de Schymanski et al, 2014).

6 Positionnement de la démarche au sein des connaissances actuelles en HRMS

Dans ces travaux, la stratégie d'identification moléculaire mise en place à l'issue de l'analyse dirigée par l'effet est essentiellement basée sur la comparaison des spectres proposés dans les bibliothèques spectrales. Elle est apparue la plus adaptée pour une caractérisation des

composés somme toute rapide et efficace. Cependant, d'autres approches sont rapportées dans la littérature scientifique.

Un exemple proche de la démarche employée est présentée par Chiaia-Hernandez et al. (2014) et Schymanski et al., (2014). Les auteurs se basent dans un premier temps sur la recherche d'une liste définie de molécules susceptibles de se rencontrer dans l'échantillon étudié. La liste est établie sur plusieurs famille de composés, sur les propriétés chimiques telles que le log Kow et le temps de rétention prédit. Cette première étape permet de constituer une liste de suspects. Pour les composés non présents dans la liste, une sélection par l'intensité et les erreurs en masse est effectuée. L'échantillon est ensuite réinjecté en mode MS/MS pour obtenir des informations supplémentaires sur les structures des composés suspects mais également sur ceux non présents sur la liste. Les spectres de fragmentation sont interprétés avec différentes bases de données associées à des aides *in silico* comme MOLGEN MS/MS, Mass Frontier, RMassBank, Metfrag, et Met Fusion. D'autres auteurs établissent une liste de molécules suspectes en se basant sur le nombre de citations des composés dans la littérature puis réduisent la liste en prédisant le temps de rétention des molécules par le model LSER (*Linear Solvation Energy Relationships*) (Ulrich et al., 2013). Finalement, les spectres sont interprétés à l'aide d'algorithmes comme Metfrag (Hug et al., 2014).

L'identification moléculaire par HRMS est également abordée de manière plus globale par plusieurs auteurs. Cette démarche est généralement appliquée pour la comparaison d'échantillons. Les données acquises sont traitées graphiquement à l'aide de différents diagrammes comme par exemple le diagramme de Venn, de Van Krevelen et par l'indice d'aromaticité des molécules (Koch et Dittmar, 2006; Müller et al., 2011; Schramm et al., 2011; Mesfioui et al., 2012; Schramm et al., 2014). Le traitement des données par des méthodes statistiques telles que les analyses en composante principale est également employé dans plusieurs études (Vaclavik et al., 2011; Merel et Snyder, 2014).

Toutes ces stratégies illustrent qu'actuellement il n'existe pas de démarche type pour le traitement des données. Au-delà de développer des nouveaux outils techniques performants et fiables pour faciliter l'identification des molécules, les analyses chimiques non ciblées par HRMS demandent un effort particulier pour le manipulateur en termes de réflexion. Des connaissances approfondies en chimie analytique (*e.g.* procédés de fragmentation, formation d'adduit...) sont indispensables afin de pouvoir interpréter de façon correcte les données acquises. Cependant, en plus de ces bases, un effort de raisonnement est nécessaire pour pouvoir simplifier les données, les hiérarchiser et les interpréter. L'utilisation entre autre de méthodes statistiques apportent de nombreuses informations sur la caractérisation des échantillons mais demandent au manipulateur de posséder les connaissances nécessaires.

7 Conclusion

Initialement utilisée en protéomique, la spectrométrie de masse haute résolution est aujourd'hui appliquée à la recherche environnementale.

La caractérisation de composés inconnus demande une rigueur particulière pour l'acquisition des données et un traitement minutieux des informations obtenues. Dans le cadre de l'analyse dirigée par l'effet, une stratégie d'identification a été élaborée en LC-QTOF et GC-QTOF. Après avoir extrait les masses exactes et élaboré les formules brutes, la structure de la molécule est recherchée via le spectre de fragmentation par l'interrogation de banques de spectres. Lorsqu'aucune correspondance avec les bases de données n'est possible, une réduction de la liste des structures potentielles est effectuée par les propriétés physico-chimiques des molécules proposées et l'emploi d'algorithmes de fragmentation. Finalement, la structure probable est confirmée par l'injection d'étalons analytiques.

L'identification moléculaire n'aboutit pas systématiquement à la confirmation de la structure du composé ainsi 5 niveaux d'identification sont référencés : masses, formules, suspects, structure probable et confirmation.

Contrairement aux analyses chimiques ciblées qui fournissent des données pouvant être traitées rapidement et de façon quasi-intuitive, la caractérisation moléculaire par HRMS est longue et fastidieuse. Actuellement, les outils techniques d'identification possèdent quelques faiblesses. Ainsi le traitement automatique des données peut fausser certaines attributions de formules brutes et les algorithmes pour interpréter les spectres *in silico* restent à optimiser. Les bibliothèques de spectres sont un outil important, voire la clé de voute de la stratégie d'identification moléculaire. Elles conditionnent majoritairement la caractérisation et leur développement en HRMS est primordial afin de simplifier considérablement la démarche de caractérisation des composés.

En dehors du développement et de l'optimisation des instruments et des logiciels d'interprétation, une nouvelle façon de raisonner et d'appréhender l'identification moléculaire en chimie analytique est aujourd'hui en pleine expansion.

Chapitre 6

*Application de l'approche
EDA dans les écosystèmes
aquatiques*

Chapitre 6 – Application de l’approche EDA dans les écosystèmes aquatiques

Avant-propos

Après avoir développé la méthodologie associée à l’approche dirigée par l’effet, l’un des objectifs de ces travaux de thèse a consisté à appliquer la démarche sur des problématiques environnementales. Les composés organiques possèdent plusieurs voies d’introduction qui les amènent *in fine* dans le milieu aquatique (Figure 51). Afin de mieux connaître et comprendre le devenir des molécules introduites, l’analyse dirigée par l’effet a été appliquée à différents niveaux de distributions des polluants : les sources, le milieu récepteur et les organismes aquatiques.

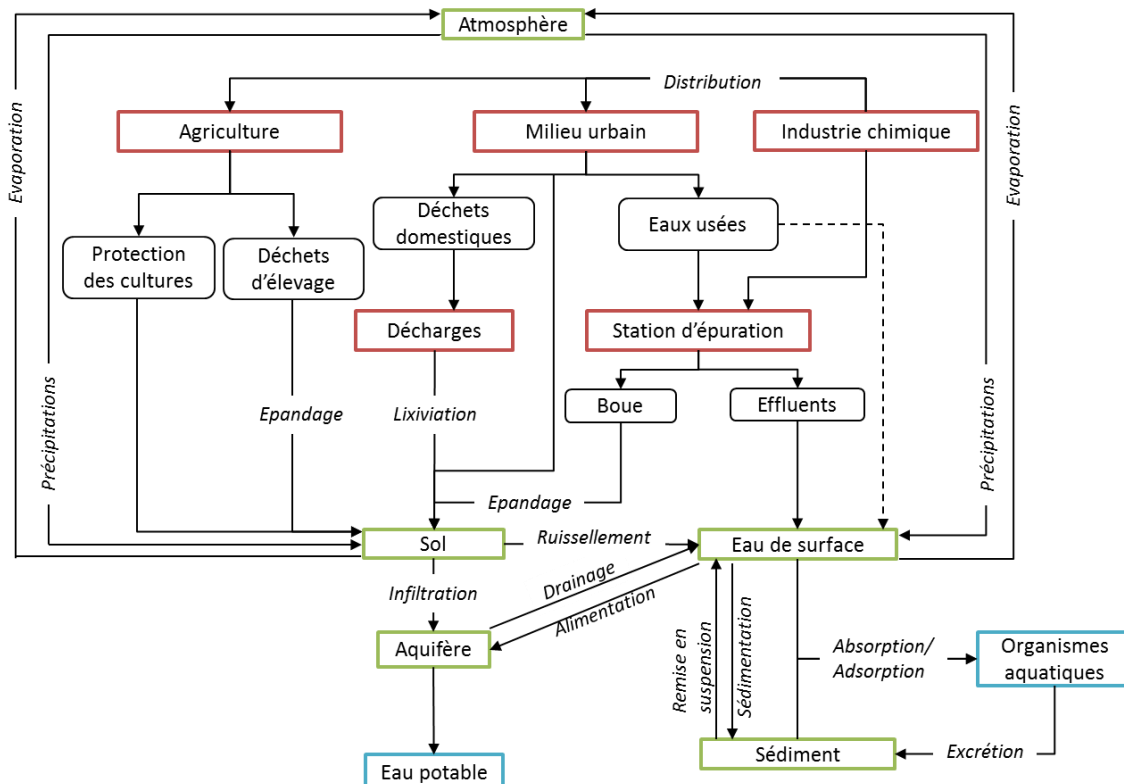


Figure 51 : Voies de contamination des écosystèmes aquatiques par les composés organiques d’origine anthropique. Les encadrés rouges représentent les sources ; les encadrés verts, le milieu récepteur et les encadrés bleus, les éléments impactés.

Ce chapitre expose les principaux résultats obtenus et se présente sous forme d'une synthèse suivie des articles scientifiques utilisés pour la constituer. Il vise à illustrer l'intérêt de l'analyse dirigée par l'effet pour répondre à certaines préoccupations environnementales et montrer son applicabilité vis-à-vis de différents types d'échantillon. Trois parties résumant au total cinq articles scientifiques, structurent ce chapitre.

La première partie vise à connaître et comprendre les sources de perturbateurs endocriniens dans le milieu aquatique par l'utilisation de l'analyse dirigée par l'effet en se focalisant sur les rejets de stations d'épuration urbaines et industrielles (Figure 51).

La seconde s'appuie sur l'emploi de l'approche bio-analytique pour caractériser et rechercher la présence de perturbateurs endocriniens dans des déchets organiques (*i.e.* boues de STEP, lisiers) utilisés comme amendements pour les sols agricoles (Figure 51).

Le chapitre se clôture par une étude sur le *biota* (Figure 51). Certains bivalves provenant du Bassin d'Arcachon (Sud-Ouest de la France) ont montré une toxicité qui n'a pu être expliquée par les techniques appliquées en routine (*i.e.* recherche d'espèces phytoplanctoniques toxiques ou méconnues, recherche de toxines connues par LC-MS/MS). Une méthode alternative, l'analyse dirigée par l'effet, a été appliquée sur ces bivalves afin d'identifier les composés potentiellement responsables de la toxicité.

Pour des raisons de lisibilité, les références bibliographiques des articles sont présentées à la fin du manuscrit.

Partie I

*Étude des rejets urbains et industriels dans la
contamination chimique du milieu aquatique*

Partie I - Etude des rejets urbains et industriels dans la contamination chimique du milieu aquatique

1	Etude exploratoire sur les urines humaines comme source de contamination.....	165
1.1	Caractérisation des activités biologiques générées par l'urine humaine	165
1.1.1	Impact de la déconjugaison sur les activités biologiques.....	165
1.1.2	Présence de ligands agonistes et antagonistes de différents récepteurs nucléaires.....	168
1.2	Identification de composés endogènes dans les urines humaines	171
1.3	Conclusion	173
2	Les stations d'épurations urbaines, vecteurs de perturbateurs endocriniens	173
2.1	Évaluation des activités biologiques présentes dans les stations d'épuration urbaines	174
2.2	Détection de perturbateurs endocriniens et autres composés dans les eaux usées brutes et traitées urbaines	176
2.3	Conclusion	181
3	Devenir des composés organiques actifs dans les eaux usées suite aux procédés de traitement.....	182
3.1	Abattement des perturbateurs endocriniens dans les eaux usées traitées par deux procédés secondaires, les boues activées et les biofiltres.....	182
3.2	Assainissement des effluents par un traitement tertiaire avancé, le charbon actif ..	184
3.3	Conclusion	186
4	Contamination du milieu récepteur, étude de cas lié aux rejets industriels : la rivière « La Dore »	187
4.1	Occurrence et activités biologiques des molécules identifiées.....	187
4.2	Présence de composés inconnus	190
4.3	Conclusion	191
	Bilan de l'étude des rejets urbains et industriels par l'analyse dirigée par l'effet	191
	Article n°1 : Assessing in vitro activities and identification of endocrine-disrupting compounds in wastewater treatment plant using effect-directed analysis	195
	Article n°2 : High-resolution mass spectrometric identification of emerging pharmaceutical pollutants in a river impacted by an industrial effluent combining passive sampling and Effect-Directed Analysis	231

Partie I - Etude des rejets urbains et industriels dans la contamination chimique du milieu aquatique

L'environnement aquatique est soumis à de nombreuses pressions anthropiques (*e.g.* urbanisation, nautisme, industrie). Des composés organiques et inorganiques issus des activités domestiques modernes (*e.g.* composés pharmaceutiques, hormones, produits de soin corporel, détergents...) sont rejetés en continu dans le milieu aquatique (Bester, 2007). L'une des principales sources d'émission de ces contaminants sont les effluents des stations d'épuration (Schwarzenbach et al., 2006). Ces composés peuvent engendrer, de façon parfois irréversible, des effets biologiques ou même toxiques sur les organismes aquatiques, et ce de l'échelle moléculaire à celle de la population. De nombreuses molécules organiques sont aujourd'hui recherchées dans les rejets de station d'épuration mais les composés détectés ne permettent pas systématiquement d'expliquer les effets biologiques observés dans le milieu récepteur. Plusieurs composés présentant un risque environnemental existent mais ne sont pas connus ou ne sont pas recherchés. Par conséquent, ces travaux de thèse se sont portés en partie sur la recherche et l'identification de ces composés.

L'étude a été focalisée sur la caractérisation de perturbateurs endocriniens. Elle a été menée sur différents niveaux de dispersion allant de leur origine en ciblant une source particulière, l'urine humaine à leur destination ultime, le milieu récepteur.

Cette partie est donc structurée en 4 paragraphes correspondant à plusieurs études :

- i. **Les urines humaines** : une étude exploratoire a été réalisée afin de rechercher la présence de perturbateurs endocriniens et mieux comprendre la composition des eaux usées brutes arrivant en station d'épuration.
- ii. **Les stations d'épuration urbaines** : l'activité *in vitro* de plusieurs STEP françaises a été étudiée ; L'analyse dirigée par l'effet a été employée pour identifier les molécules biologiquement actives.
- iii. **Les effluents de stations d'épuration traités par un procédé tertiaire** : le devenir des composés après le traitement des effluents par filtration sur charbon actif a été étudié.
- iv. **Le milieu récepteur** : une étude de contamination du milieu récepteur par des rejets industriels initiée par Creusot et al. (2014) a été poursuivie dans le but d'identifier les composés biologiquement actifs mis en évidence par l'analyse dirigée par l'effet.

1 Etude exploratoire sur les urines humaines comme source de contamination

Une étude sur les urines humaines d'une femme et d'un homme adultes (Chapitre 3, § 4.3.1, p 81) a été réalisée au cours de ces travaux de thèse dans le but d'évaluer les activités biologiques en lien avec la présence de perturbateurs endocriniens, afin de mieux comprendre les effets biologiques observés en entrée de station d'épuration.

1.1 Caractérisation des activités biologiques générées par l'urine humaine

Les hormones étant excrétées sous forme conjuguée, une étape de déconjugaison est effectuée en amont de l'extraction sur une partie des urines prélevées. La déconjugaison est réalisée à l'aide d'un mélange enzymatique constitué de deux enzymes, la β -glucuronidase et la sulfatase ayant deux provenances différentes : l'escargot *Hélix pomatia* (β -glucuronidase $\geq 100\,000$ units/mL, sulfatase ≤ 7500 units/mL) ou la bactérie *Escherichia coli* (β -glucuronidase $\geq 5\,000\,000$ - $20\,000\,000$ units/gm protéine). Les enzymes sont ajoutées dans les échantillons à déconjuguer puis les urines sont incubées pendant 3 h à 55°C. Après incubation, les échantillons d'urine sont extraits par phase solide suivant le protocole énoncé en section 4.3.2 du Chapitre 3, p 82. Afin de mettre en évidence d'éventuels effets de mélange entre les molécules présentes dans les échantillons, les urines de femme et d'homme sont mélangées. Le mélange est traité comme un échantillon.

Les extraits obtenus ont été testés par l'INSERM (IRCM, Montpellier, France) sur différentes lignées cellulaires HELN-ER α , HELN-AR, HELN-GR, HELN-MR et HELN-PR. Ces bio-essais permettent de mettre en évidence la présence d'agonistes de l'activité œstrogénique (ER) et androgénique (AR) ainsi que d'antagonistes de l'activité glucocorticoïde (GR), minéralocorticoïde (MR) et progestative (PR), respectivement. Les détails sur les modèles biologiques, la culture des cellules et le protocole des tests sont exposés en section 2.1.1 du Chapitre 3, p 71.

1.1.1 Impact de la déconjugaison sur les activités biologiques

L'influence de la déconjugaison enzymatique sur les activités œstrogéniques et androgéniques des extraits d'urine est présentée Figure 52. Les urines ayant subi l'étape de déconjugaison quelle que soit les enzymes utilisées induisent une réponse biologique à la différence des urines non déconjuguées (Figure 52). La déconjugaison influence clairement les activités œstrogéniques et androgéniques. Les principaux ligands de ces deux activités sont les hormones. Ces dernières sont excrétées par l'organisme sous forme glucuro- et/ou sulfo-conjugué, les rendant biologiquement inactives (Desbrow et al., 1998).

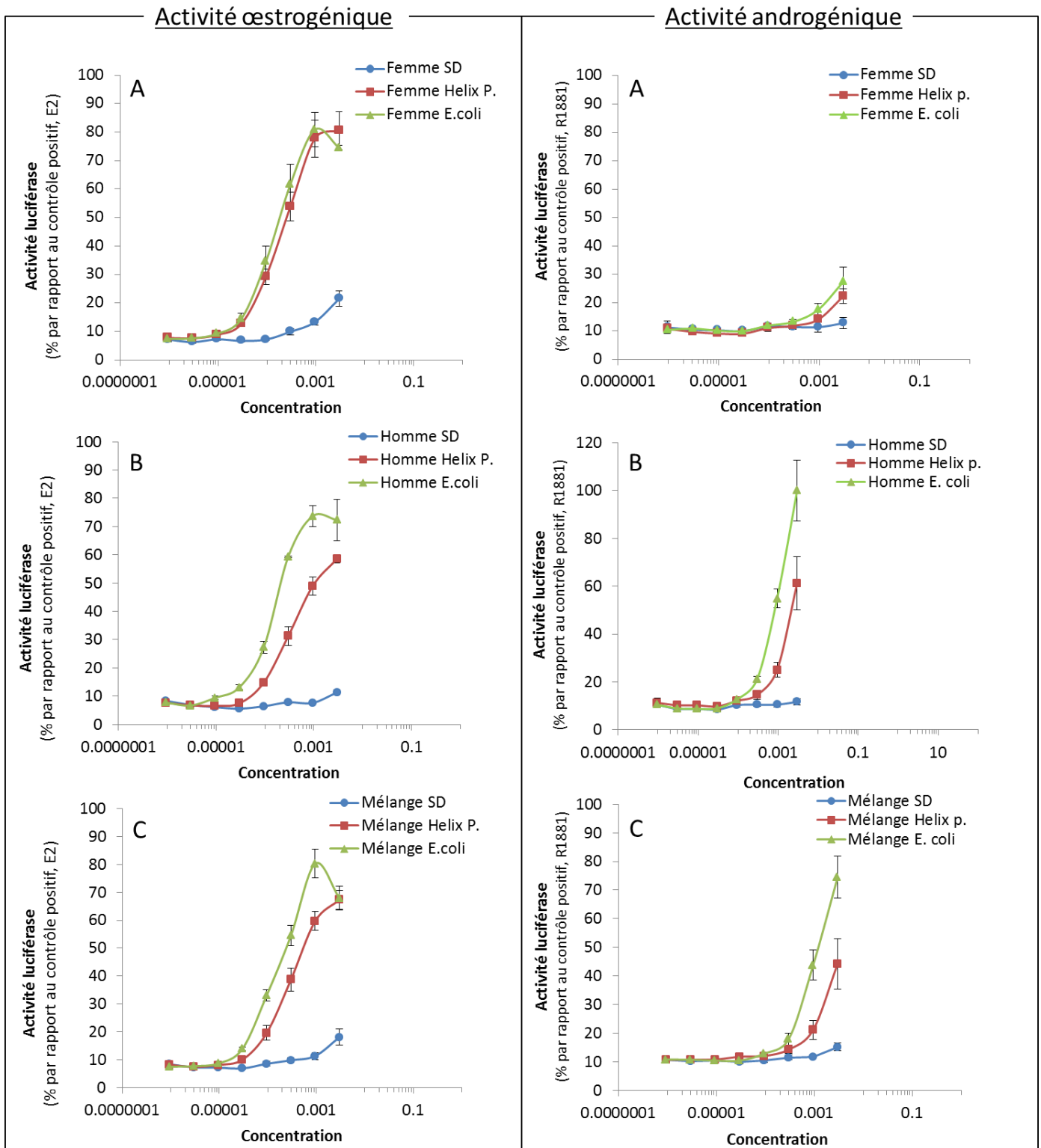


Figure 52 : Activités œstrogéniques et androgéniques des urines humaines de femme (A), homme (B) et en mélange (C). Trois courbes dose-réponse sont modélisées pour chaque échantillon, l'activité obtenue pour l'extrait non déconjugué (●), l'extrait déconjugué par les enzymes provenant du gastéropode *Helix Pomatia* (■) et l'extrait déconjugué par les enzymes provenant d'*Escherichia Coli* (▲). Les barres d'erreurs représentent les écartypes (n=3). Les blancs de manipulation sont inactifs.

Cependant ce constat n'est pas observé pour les activités anti-minéralocorticoïdes, anti-progestatives et anti-glucocorticoïdes montrant que les ligands de ces récepteurs ne sont pas sous forme conjugués ou arrivent à se lier malgré leur conjugaison. Dans les stations d'épuration, les mêmes types d'activités biologiques ont été mesurés sans une étape de déconjugaison préalable (article n°1).

Des tests de protocole utilisant les enzymes glucuronidase et sulfatase de l'escargot *Helix pomatia* ont été effectués sur des eaux brutes et traitées de STEP. Une différence d'activités œstrogéniques et androgéniques, entre les échantillons ayant eu une étape de déconjugaison et ceux sans déconjugaison, a été observée pour une eau brute mais aucune différence n'a été constatée pour l'eau traitée (Chapitre 4, §1.3.3, p 111). Après l'étape de déconjugaison, les activités de l'extrait d'eau brute ont augmenté d'environ 1,5 fois en comparaison à celles mesurées sans étape de déconjugaison (Figure 31, p 111). Des composés conjugués, induisant une réponse cellulaire lorsqu'ils sont sous forme libre, sont donc présents dans les eaux d'entrée de STEP. Cependant, les activités androgéniques et œstrogéniques mesurées sans l'étape de déconjugaison restent importantes, 131 ng E2-EQ/L et 440 ng DHT-EQ/L pour l'activité œstrogénique (lignée cellulaire MELN) et androgénique (lignée cellulaire MDA-kb2), respectivement. La détection d'œstrogènes sous forme libre tels que l'œstriol, le 17 β -œstradiol et l'œstrone à une concentration totale de 234 ng/L, dans une eau brute de la même STEP prélevée à une période différente, a permis d'expliquer la totalité de l'activité œstrogénique de l'échantillon non déconjugué (60 ng E2-EQ/L) (article n°1). Les hormones sont excrétées en majorité via les urines. Seulement 5 à 10% des œstrogènes sont rejetés par l'organisme via les fèces (Adlercreutz et Järvenpää, 1982). Par conséquent, les stéroïdes présents dans les eaux d'entrée de STEP proviennent en majorité des urines. Les hormones contenues dans les urines ne sont jamais excrétées sous forme libre, à l'exception de l'œstriol chez les femmes enceintes (D'Ascenzo et al., 2003). Leur détection sous forme libre dans les eaux brutes de STEP montrent qu'une partie des hormones perdent leur complexe glucuronide ou sulfate au cours de leur transport dans le réseau d'assainissement les rendant biologiquement actives (Desbrow et al., 1998; D'Ascenzo et al., 2003;). En effet, les enzymes glucuronidase et sulfatase sont produites naturellement par diverses bactéries dont les coliformes fécaux et les *Escherichia coli* et peuvent se trouver dans le réseau et dans les eaux brutes en entrée de STEP (Adlercreutz et Järvenpää, 1982; Tryland et Fiksdal, 1998). La déconjugaison des hormones après l'excrétion via l'organisme peut apparaître en quelques heures. Il a été observé qu'en moins de 2h, les œstrogènes sous forme glucuroconjuguée étaient décomplexés dans les eaux usées (Ternes et al., 1999; D'Ascenzo et al., 2003; Gomes et al., 2009; Kumar et al., 2012). Les formes sulfoconjugués sont plus résistantes à la déconjugaison et peuvent mettre une dizaine d'heures voir quelques jours à se décomplexer (Ternes et al., 1999; D'Ascenzo et al., 2003; Gomes et al., 2009; Kumar et al., 2012). Ainsi, les œstrogènes sulfoconjugués peuvent représenter 60% des œstrogènes conjugués dans les eaux brutes de STEP alors qu'ils sont mesurés à une proportion de 20% dans les urines (D'Ascenzo et al., 2003).

Classiquement, de nombreux auteurs utilisent pour la préparation des échantillons d'eaux de station d'épuration des enzymes provenant de l'escargot *Helix Pomatia* (Labadie et Budzinski, 2005; Gabet-Giraud, 2009; Bellet et al., 2012;). Cependant, quelques articles scientifiques montrent en plus de la déconjugaison, une transformation de certaines hormones (Crabbe et al., 2002; Hauser et al., 2008). Hauser et al., (2008) ont ainsi montré que 43% de le 5-androstènediol ((3 β ,17 β)-androst-5-ène-3,17-diol) étaient convertis en testostérone suivant la préparation enzymatique issue de *Helix Pomatia* dans les urines de singes (*Pan paniscus*). Le changement de conformation des molécules serait dû à la présence de isomérases et oxydases dans la préparation enzymatique de *Helix Pomatia* (Crabbe et al., 2002). Ces modifications structurales des composés liées à la déconjugaison peuvent impacter les activités biologiques mesurées en générant des produits de transformation non actifs ou plus actifs que le composé parent. Pour l'urine masculine une différence d'activités œstrogénique et androgénique est observable entre les échantillons traités avec *Escherichia coli* ou *Helix Pomatia* (Figure 52). L'emploi des enzymes provenant *Helix Pomatia* peut créer un biais analytique. L'utilisation d'enzymes d'*Escherichia coli* lors de la déconjugaison des échantillons apparait plus adapté pour représenter de façon plus exacte les activités œstrogéniques et androgéniques induites par les urines une fois déconjuguées dans le réseau d'eaux usées.

1.1.2 Présence de ligands agonistes et antagonistes de différents récepteurs nucléaires

La figure 53 (A, B) représente les activités œstrogéniques et androgéniques des échantillons d'urine d'homme et de femme adultes déconjuguées par les enzymes issues d'*Escherichia coli*. La présence de ligands des récepteurs aux œstrogènes est observée dans tous les échantillons. S'il est évident que l'urine féminine possède une activité œstrogénique importante en lien avec la présence de composés actifs tels que les œstrogènes, il est remarquable que l'activité de l'urine masculine soit aussi intense que celle de l'urine prélevée chez la femme.

Les lignées cellulaires utilisées pour mesurer les activités, HELN, contiennent des enzymes, les aromatasases qui peuvent transformer les androgènes en œstrogènes. A titre d'exemple, Morishima et al. (1995) ont mis en évidence que la testostérone était transformé en œstradiol en présence des aromatasases. Ainsi la réponse œstrogénique observée pour l'urine de l'homme peut être liée à la présence de composés androgènes métabolisés en œstrogènes par les enzymes présentes. Afin d'évaluer l'activité œstrogénique des échantillons en lien avec la présence de composés actifs non aromatisables, les bio-essais doivent être effectués en présence d'un inhibiteur des aromatasases. Ce test n'a pu être réalisé, au cours de ces travaux, en raison d'une importante activité cellulaire basale induite par l'inhibiteur utilisé et sera effectué prochainement. Cependant, le dosage des stéroïdes (présenté dans le paragraphe suivant) dans les extraits d'urine d'homme et de femme montre que les concentrations en œstrogènes (ligand ER) sont supérieures dans l'extrait d'urine masculine (e.g. pour 17 β -

œstradiol : 1,63 µg/L pour l'urine d'homme contre 0,37 µg/L pour l'urine de femme). De plus comme il était envisageable, la concentration en testostérone est également plus importante dans l'urine d'homme (49,24 µg/L) que celle de femme (2,43 µg/L). La métabolisation de cette hormone dans les cellules HELN, si elle est réalisée, ne contribue pas ou très peu à l'activité œstrogénique observée. En effet, en raison de sa concentration et de la présence d'œstrogènes dans l'extrait d'urine d'homme, la réponse des récepteurs ER seraient plus importante dans cette échantillon que dans celui de femme. Pour des échantillons environnementaux, contenant des composés transformables par les aromatasés (*e.g.* testostérone), comme les eaux et boues de STEP, l'emploi de lignées cellulaires possédant ces enzymes pour l'évaluation de l'activité œstrogénique peut amener à la détection d'une réponse ER médiée par des molécules métabolisables. L'utilisation d'un inhibiteur des aromatasés, lors des tests biologiques, serait par conséquent judicieux afin de vérifier la présence de composés actifs non aromatisables dans les échantillons.

Concernant l'activité androgénique, la réponse cellulaire observée pour l'urine d'homme est supérieure à celle mesurée pour l'extrait d'urine de femme (Figure 53 B). S'il est considéré que les urines testées ne contiennent uniquement des hormones endogènes en tant que ligands, ce résultat est cohérent puisque une femme excrète par jours environ deux fois moins d'androgènes qu'un homme et produit 25 fois moins de testostérone (Shore et Shemesh, 2003).

La présence de composés antagonistes des activités MR, GR et PR a également été recherchée. Quel que soit l'échantillon d'urine testé (*i.e.* femme, homme, mélange), une activité antagoniste est observée sur chaque récepteur (Figure 53- C, D, E). Des ligands antagonistes des récepteurs MR, GR et PR sont donc mis en évidence dans les extraits d'urine étudiés. Ces mêmes activités ont été observées dans les eaux non traitées de stations d'épuration (Bellet et al., 2012; article n°1). Cette similitude entre les activités observées dans les urines et celles des eaux de STEP permet de confirmer que les activités anti-MR, anti-GR et anti-PR constatées en entrée de STEP sont liées en partie avec la présence de ligands endogènes excrétés par les urines. La recherche d'hormones dans les urines, permettant d'expliquer ces activités, est présentée dans le paragraphe suivant.

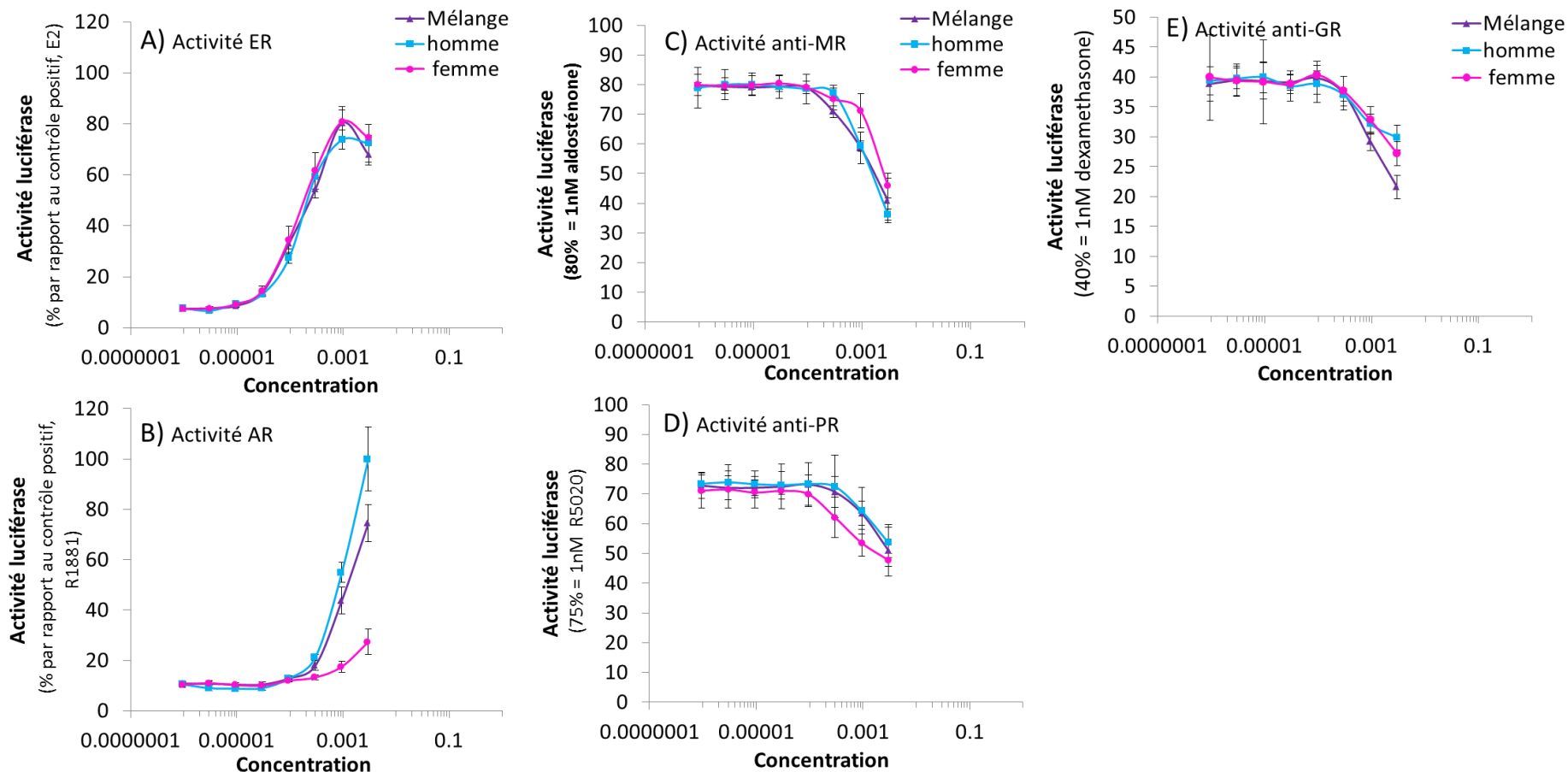


Figure 53 : Courbes dose-réponse des activités œstrogéniques (A) et androgéniques (B) agonistes et minérolocorticoïdes (C), progestatives (D) et glucocorticoïdes (E) antagonistes mesurées dans des extraits d'urine d'homme (■), de femme (●), en mélange (▲) déconjugés par les enzymes β -glucuronidase et sulfatase provenant *Escherichia coli*. Les activités sont exprimées en pourcentage par rapport aux ligands de référence, 10 nM œstradiol (E2), 100 nM R1881, 1 nM aldostérone, 1 nM R5020, 1 nM dexaméthasone, respectivement. Les barres d'erreurs représentent les écarts types (n=3).

1.2 Identification de composés endogènes dans les urines humaines

La recherche de stéroïdes dans les urines d’homme et de femme adultes a été menée par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem. Les instruments employés ainsi que les méthodes analytiques sont détaillés dans la section 6.2.6 du Chapitre 3, p 92. Au total, 29 hormones naturelles et de synthèse ont été analysées. Trois et cinq hormones sont détectées respectivement dans les urines de femme et d’homme ; dans les urines ayant subi l’étape de déconjugaison, 9 stéroïdes sont retrouvés (Figure 54).

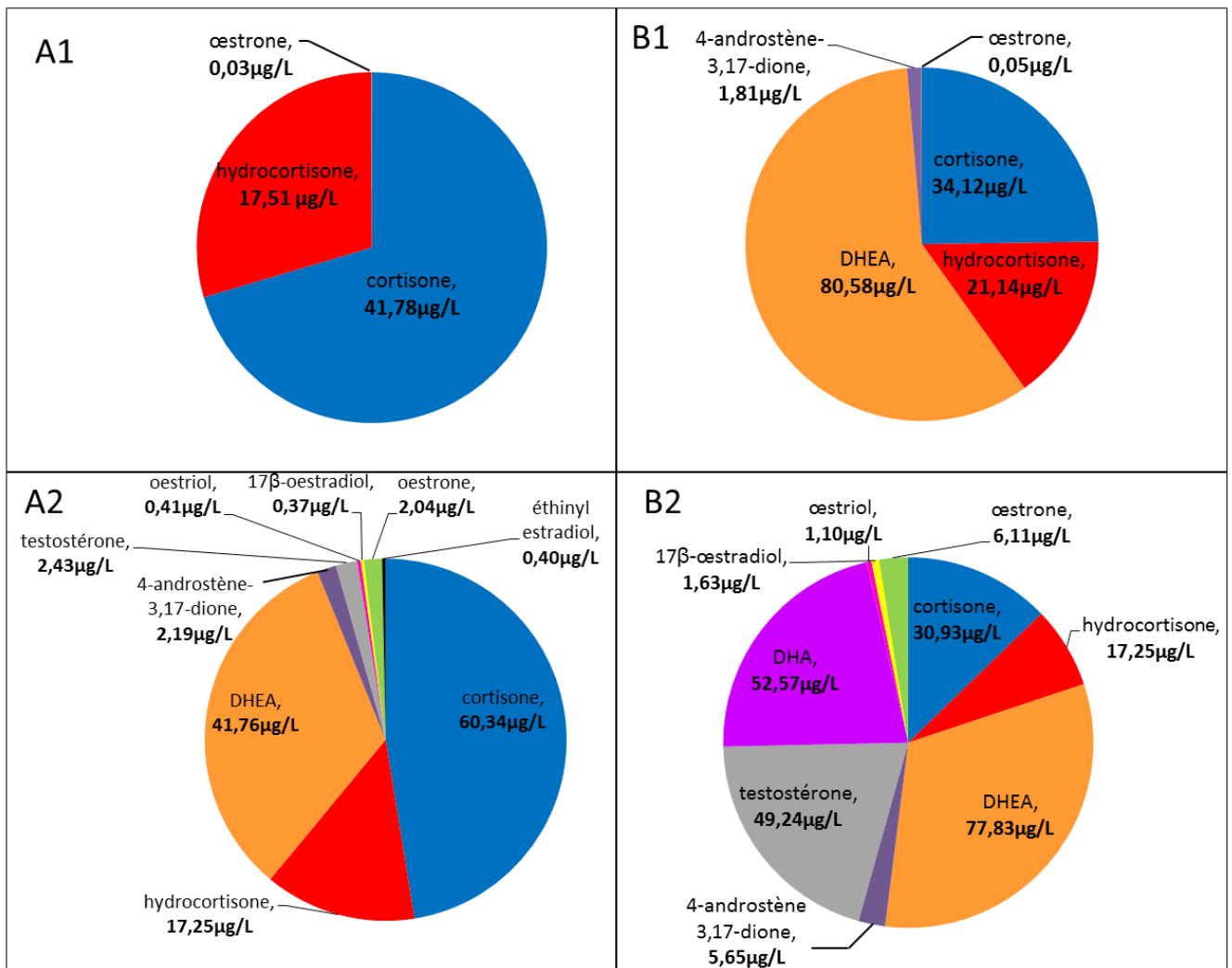


Figure 54 : Répartition et concentration des hormones naturelles et de synthèses détectées par LC-MS/MS dans les urines humaines de femme (A) et d’homme (B) sans (1) ou avec déconjugaison (2) réalisée par les enzymes β-glucuronidase et sulfatase provenant *Escherichia coli*.

Hormis la cortisone, l'hydrocortisone et le DHEA ((3 β)-3-hydroxyandrost-5- \acute{e} n-17-one) qui sont retrouvés quasiment à la même concentration dans tous les échantillons, les autres composés sont détectés à des niveaux variables suivant le protocole de préparation des urines. Cette observation illustre l'excrétion de certaines hormones (*n.b.* DHEA compris) sous formes conjuguées. Parmi ces molécules, les œstrogènes sont détectés à des concentrations de l'ordre de la centaine de ng/L à quelques μ g/L dans les urines aussi bien de femme que d'homme. Seul l'éthinylœstradiol, hormone de synthèse utilisée comme contraceptif, est retrouvé uniquement dans l'urine féminine (Figure 54, A2). L'œstrone, le 17 β -œstradiol, l'œstriol et l'éthinylestradiol sont des ligands ER et par conséquent contribuent à l'activité œstrogénique observée dans les extraits d'urine d'homme et de femme. Selon Johnson et al. (2000), les œstrogènes naturels détectés dans les urines représenteraient pour moitié ceux observés dans les eaux en entrée de station d'épuration, l'autre partie provenant des fèces et des produits pharmaceutiques. Le DHEA est un androgène intermédiaire impliqué dans la biosynthèse de différentes hormones (Marwah et al., 2001). Il a été rapporté que ce stéroïde activait les récepteurs des œstrogènes des lignées cellulaires MELN mais n'a pas montré d'affinité pour les récepteurs des androgènes, des glucocorticoïdes des lignées cellulaires MDA-kb2, les récepteurs aux progestatifs des lignées cellulaires HELN, et les récepteurs des minéralocorticoïdes (*n.b.* activité agoniste et antagoniste) des lignées cellulaire HG₅LN (Creusot et al., 2014). En parallèle aux œstrogènes, plusieurs hormones telles que le 4-androstène-3,17-dione, la testostérone, la cortisone et l'hydrocortisone sont identifiés dans les échantillons d'urine. Ces stéroïdes sont des ligands antagonistes des récepteurs des minéralocorticoïdes et contribuent à l'activité observée (Bellet et al., 2012; Creusot et al., 2014). Le 4-androstène-3,17-dione et la testostérone possèdent également une affinité avec le récepteur des androgènes. En plus de ces effets, Bellet et al. (2012) rapportent que la testostérone est un antagoniste des activités progestatives et glucocorticoïdes.

L'analyse des hormones par LC-MS/MS a permis de détecter différentes hormones naturelles et de synthèse. Ces stéroïdes étant des ligands connus, ils contribuent aux activités biologiques mesurées dans les urines humaines. Cependant, la liste établie ne permet pas de comprendre en totalité les réponses cellulaires observées. En effet, la testostérone détectée dans les échantillons est, à notre connaissance, la seule molécule recherchée qui contribue à l'activité progestative antagoniste. La concentration de cet androgène est naturellement plus forte chez l'homme (49 μ g/L) que chez la femme (2 μ g/L). Néanmoins, la réponse cellulaire observée pour les récepteurs des progestatifs est plus importante dans l'urine femelle que mâle suggérant la présence de ligand(s) antagoniste(s) non connus. L'analyse dirigée par l'effet pourrait dans cette étude permettre la mise en évidence et l'identification de composés actifs dans les échantillons d'urine.

1.3 Conclusion

Les activités biologiques d'urines d'homme et de femme ont été évaluées sur 5 bio-essais. L'étude a permis de mettre en évidence la présence de ligands agonistes des récepteurs ER et AR et antagonistes des récepteurs MR, GR et PR. Les hormones endogènes comme par exemple le 17β -œstradiol, la testostérone, la cortisone, l'hydrocortisone contribuent aux activités biologiques mesurées dans les urines. Mais la présence de composés actifs autres que ceux recherchés par l'analyse chimique ciblée a été mise en évidence notamment pour l'activité anti-PR. L'analyse dirigée par l'effet permettrait d'identifier ces ligands endogènes. De plus, cette étude exploratoire a permis de montrer que les urines excrétées n'induisaient pas d'activités œstrogéniques et androgéniques sans étape de déconjugaison. La forme glucuro- ou sulfato-conjuguée des hormones excrétées les rend inactifs sur les récepteurs ER et AR. Une déconjugaison le long du réseau d'assainissement expliquerait les activités biologiques mesurées en entrée de station d'épuration ainsi que la détection des hormones sous-forme libre. L'étude des composés (*i.e.* stéroïdes, molécules pharmaceutiques, produits de soins corporels) dans les canalisations d'eaux usées permettrait d'apporter des informations supplémentaires sur les phénomènes de biotransformation existants.

2 Les stations d'épurations urbaines, vecteurs de perturbateurs endocriniens

Les stations d'épuration sont l'une des principales sources en perturbateurs endocriniens des eaux de surface du milieu naturel (Ternes et Joss, 2006). L'action dominante de ces composés est leur capacité à se lier aux récepteurs nucléaires en se substituant aux substances naturelles telles que les hormones. Cette liaison perturbe l'équilibre hormonal de l'organisme et altère certaines fonctions comme la reproduction ou la croissance. Jusqu'à récemment, seule la présence de composés œstrogène-mimétiques comme les hormones ou surfactants était recherchée dans les stations d'épuration. Aujourd'hui, le développement de nouveaux modèles cellulaires permettent d'appréhender d'autres effets biologiques. La présence de composés androgènes, glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes, progestatifs ayant une action agonistes ou antagonistes peut être recherchée dans l'environnement. Dans notre étude, des bio-essais basés sur l'activation de gènes rapporteurs, sous contrôle de différents récepteurs (*i.e.* œstrogènes (ER), androgènes (AR), glucocorticoïdes (GR), minéralocorticoïdes (MR), progestatifs (PR), X des prégnanes (PXR) et hydrocarbures aromatiques (AhR)) sont utilisés pour évaluer l'activité biologique de neuf stations d'épuration française. Le détail des sites est exposé dans le chapitre 3 section 1.1.1, 1.1.2 et 1.1.3. Les échantillons ayant été filtrés à $0,7\ \mu\text{m}$, il est considéré que les résultats énoncés correspondent à la phase dissoute. Après avoir caractérisé les effets biologiques, la recherche de perturbateurs endocriniens dans les échantillons d'eaux usées brutes et traitées est effectuée par une analyse chimique ciblée sur

les stéroïdes. La présence de composés actifs autres que ceux recherchés en mode d'analyse ciblée par spectrométrie de masse en tandem est également réalisée par l'analyse dirigée par l'effet et spectrométrie de masse haute résolution (LC-QTOF). Les résultats obtenus font l'objet d'un article scientifique qui sera soumis prochainement (p 209).

Article n°1: *Assessing in vitro activities and identification of endocrine-disrupting compounds in wastewater treatment plant using Effect-Directed Analysis*

2.1 Évaluation des activités biologiques présentes dans les stations d'épuration urbaines

Les extraits d'eaux usées brutes et traitées des neuf stations d'épuration étudiées induisent sans exception une réponse œstrogéniques, androgéniques/glucocorticoïdes et *dioxine-like*.

L'activité androgénique a été évaluée en utilisant la lignée cellulaire MDA-kb2. Ce test n'est pas spécifique des ligands androgéniques et exprime en parallèle l'activité glucocorticoïde. La présence de ligands agonistes GR se traduit par une sur-induction de la réponse cellulaire par rapport au témoin positif (1 nM DHT) (Wilson et al., 2002; Aït-Aïssa et al., 2010). Cette sur-activation n'a pas été observée sur les extraits testés, suggérant l'absence de ligands agonistes du récepteur GR. Cependant, une activité anti-GR a pu être constatée dans les extraits d'eau brute et traitée de STEP testés sur ce bio-essais (Clos de Hilde, Louis Fargue, Trélissac, Saltourde) (Figure 3, article n°1, p 209). Par conséquent, un effet de mélange entre les ligands agonistes et antagonistes, créant une compétition pour le site de liaison du récepteur GR, existe potentiellement au sein des échantillons empêchant de visualiser et donc de confirmer la présence de ligands agonistes (Kemppainen et Wilson, 1996; Wilson et al., 2002). Ne pouvant exclure la présence de composés agonistes du récepteur GR, l'activité mesurée pour ces travaux est qualifiée d'activité androgénique/glucocorticoïde.

Les activités œstrogéniques et androgéniques/glucocorticoïdes agonistiques moyennes mesurées, sur les neuf sites prélevés, sont respectivement de 180 ngE2-EQ/L et 556 ngDHT-EQ/L pour les eaux usées brutes et de 8 ngE2-EQ/L, 15 ngDHT-EQ/L pour les eaux traitées (Figure 55). Quel que soit le traitement réalisé par les stations d'épuration, c'est-à-dire biofiltre ou boue activée, les procédés sont efficaces pour éliminer de la phase dissoute une partie des composés actifs. Seule la station de Louis Fargue n'a pas montré un abattement de l'activité œstrogénique en sortie de traitement (Figure 2, article n°1, p 207). Ce résultat montre une inefficacité du site à traiter les molécules œstrogène-mimétiques. Une réhabilitation complète de cette STEP a été menée en décembre 2011 afin d'éviter les rejets d'eaux non traitées en Garonne. Un bassin tampon permettant de stocker les eaux brutes en cas de forts débits a été mis en place et le procédés de traitement a été remplacé par des biofiltres (Aminot, 2013). Les résultats observés correspondent, par conséquent, à l'ancienne configuration. Concernant les autres sites étudiés, la majorité des résultats obtenus sont en

accord avec ceux publiés par différents auteurs. La littérature rapporte que l'activité ER en STEP est comprise entre 15 et 169 ngE2-EQ/L pour les eaux brutes et entre 2 et 24 ngE2-EQ/L pour les effluents traités (Cargouët et al., 2004; Muller et al., 2008; Jugan et al., 2009; Bellet et al., 2012). Bellet et al (2012) ont mesuré une activité androgénique dans les eaux usées d'entrée de STEP comprise entre 40 et 254 ngR1881-EQ/L. Toutefois pour certains sites comme par exemple la station de Elbeuf où l'activité AR est de 1511 ngDHT-EQ/L, les concentrations mesurées dans les eaux usées brutes sont supérieures à celles observées dans la littérature. Les variabilités existantes entre les stations d'épurations peuvent être imputées à plusieurs paramètres tels que la taille du réseaux d'assainissement, la capacité du site, les variations journalières des apports et la saison d'échantillonnage (Muller et al., 2008; Teerlink et al., 2012; Jálová et al., 2013).

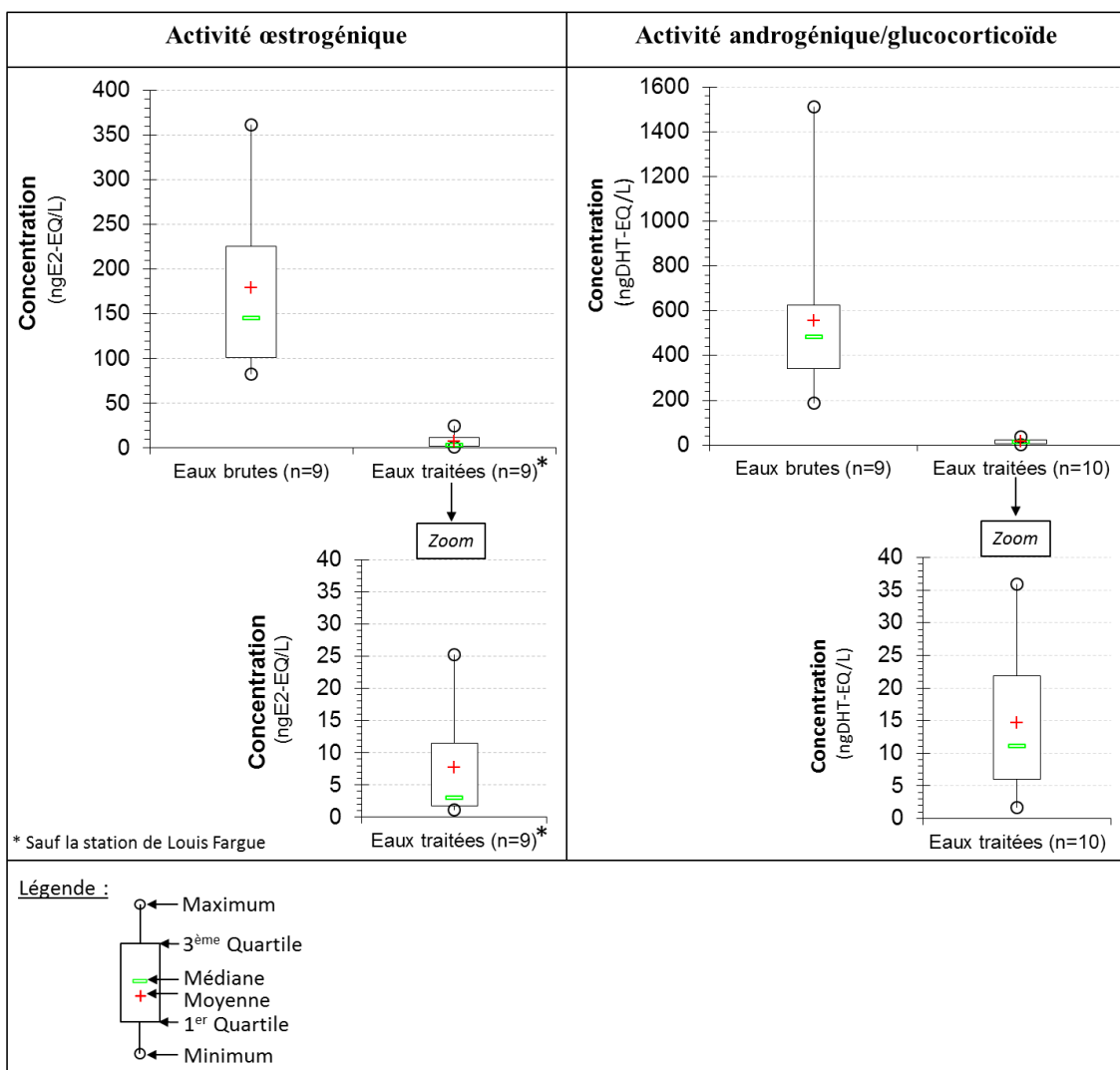


Figure 55 : Activités œstrogéniques et androgéniques/glucocorticoïdes moyennées sur neuf eaux usées brutes et dix eaux traitées provenant de différentes stations d'épuration françaises.

En plus de l'évaluation des activités œstrogéniques et androgéniques/glucocorticoïdes, la présence de ligands aux récepteurs des hydrocarbures aromatiques a été recherchée. Toutes les STEP étudiées montrent une activité *dioxine-like* lorsque les cellules sont exposées durant 4h aux extraits d'eaux. La réponse cellulaire disparaît à 24h d'exposition. La perte d'activité est liée à la présence de composés actifs qui sont métabolisés par les cellules tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Louiz et al., 2008; Kinani et al., 2010). La détection des HAP dans les eaux usées est rapportée par plusieurs auteurs (Blanchard et al., 2001; Blanchard et al., 2004; Buseti et al., 2006). Leur présence serait due au lessivage des sols urbains lors des fortes pluies (Blanchard et al., 2001). Cependant, d'autres composés couramment rencontrés en station d'épuration (*e.g.* fénofibrate, ibuprofène, naproxène...) peuvent induire une réponse similaire sur les lignées cellulaires PLHC-1 et par conséquent (Thibaut et Porte, 2008). Ces molécules n'ont pas été recherchées dans les extraits testés mais d'autres études ont montré leur présence dans les stations étudiées (Aminot, 2013; Bui, 2013). Par conséquent, ces composés peuvent être responsables en partie des activités *dioxine-like* observées.

En parallèle à la présence de ligands agonistes, la présence de molécules antagonistes aux récepteurs des minéralocorticoïdes, glucocorticoïdes et progestatifs, est détectée dans toutes les stations d'épuration ayant été analysées (*i.e.* Clos de Hilde, Louis Fargue, Biganos, Trélassac et Saltgourde) (Figure 3, article n°1, p 209). Comme pour les autres activités biologiques, les procédés d'épuration permettent d'éliminer une partie des ligands dans les effluents. Les mêmes activités ont été observés par Bellet et al dans des eaux usées brutes de six stations d'épuration du sud de la France (Bellet et al., 2012). Si la présence de ligands agonistes aux récepteurs des androgènes a été mise en évidence, l'existence de molécules antagonistes n'a pu être pas démontrée dans notre étude.

2.2 Détection de perturbateurs endocriniens et autres composés dans les eaux usées brutes et traitées urbaines

L'identification de perturbateurs endocriniens a été réalisée pour des raisons pragmatiques sur la station d'épuration de Clos de Hilde (Chapitre 3, § 1.1.1, p 61). La procédure nécessitant un volume d'échantillon conséquent, un nouveau prélèvement en Janvier 2013 d'eaux usées brutes et traitées, a été effectué pour ce volet. Les activités ER, AR et PXR sont détectées à des concentrations respectives de 60 ngE2-EQ/L, 310,6 ngDHT-EQ/L et 65,4 µgSR12813/L pour les eaux usées brutes et 5,4 ngE2-EQ/L et 21,3 ngDHT-EQ/L pour les eaux traitées. L'activité biologique liée aux récepteurs X des prégnanes dans l'effluent traité n'a pas pu être quantifiée à cause d'une induction trop faible.

Pour expliquer les activités biologiques observées, des analyses chimiques ciblées sur la recherche de stéroïdes ont été menées (Chapitre 3, §6.2.6, p 92). La liste des composés identifiés et leur concentration sont exposées dans la Figure 56. Les stéroïdes détectés sont classiquement retrouvés dans les stations d'épuration urbaines (Chang et al., 2007; Muller et al., 2010a; Schriks et al., 2010; Bellet et al., 2012). Dans notre étude, les composés sont

seulement détectés dans les eaux usées brutes et permettent d'expliquer la totalité de l'activité œstrogénique, 12 % de l'activité androgénique et seulement 0,01 % de l'activité induite par les récepteurs X des prégnanes. La présence de testostérone, 4-androstène-3,17-dione, progestérone, prégnenolone et cortisone montre l'existence de ligands antagonistes aux récepteurs des minéralocorticoïdes et progestatifs ainsi que des ligands agonistes aux récepteurs des glucocorticoïdes dans les eaux usées brutes de la station de Clos de Hilde (Schriks et al., 2010; Bellet et al., 2012; Creusot et al., 2014).

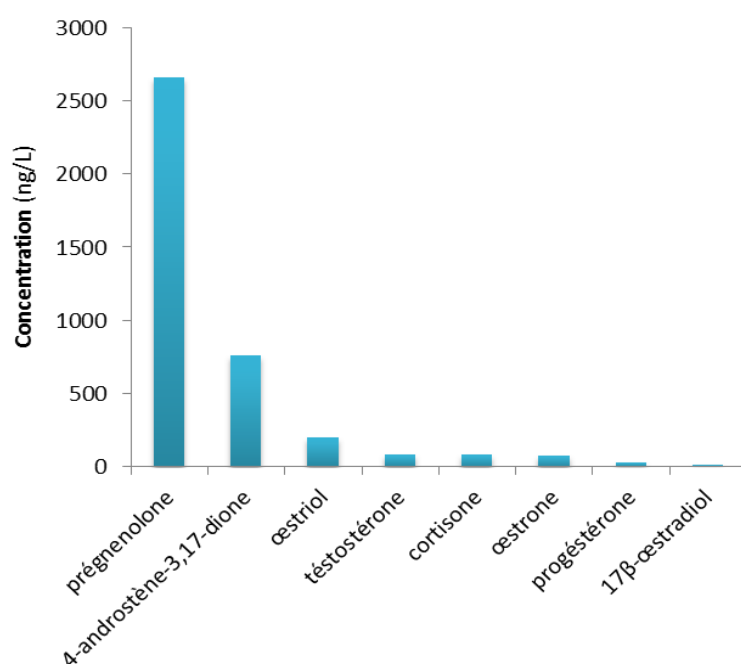


Figure 56 : Concentrations mesurées en hormones dans les eaux usées brutes de la station d'épuration de Clos de Hilde.

En parallèle, une analyse non ciblée par LC-QTOF a été réalisée sur les extraits d'eaux usées brutes et d'eaux traitées. Parmi les ions obtenus en mode d'ionisation positive, des distributions isotopiques ayant une perte répétée de fragment 44,0262 m/z sont observées. Ces fragments correspondent au groupement $-[C_2H_4O]$ de chaîne éthoxylate, qui sont attribuables à la présence de surfactants tels que les nonylphénol polyéthoxylates, l'alcool éthoxylate et/ou les polyéthylènes glycol (Lara-Martín et al., 2011). Des études ont montré que les composés polyéthoxylés étaient détectés dans l'environnement aquatique et que ces molécules présentaient un risque pour les organismes qui y sont exposés (Castillo and Barceló, 1999; Jobling et al., 1996; Lara-Martín et al., 2014).

En plus des polymères, des milliers de molécules sont détectées dans les échantillons analysés. Dans l'extrait d'eau brute, 4886 ions sont détectés en mode d'ionisation positif contre 1639 pour l'extrait d'eau traitée pour la STEP de Clos de Hilde (MFE correspondant à 10 fois le bruit de fond). Ce résultat justifie le choix de mettre en place l'analyse dirigée par l'effet afin d'identifier les composés biologiquement actifs. Les extraits ont été séparés par HPLC en 40 fractions suivant le protocole développé par Creusot et al. (2013). La Figure 57 illustre la réduction de la complexité de l'extrait d'eau d'entrée de STEP après fractionnement.

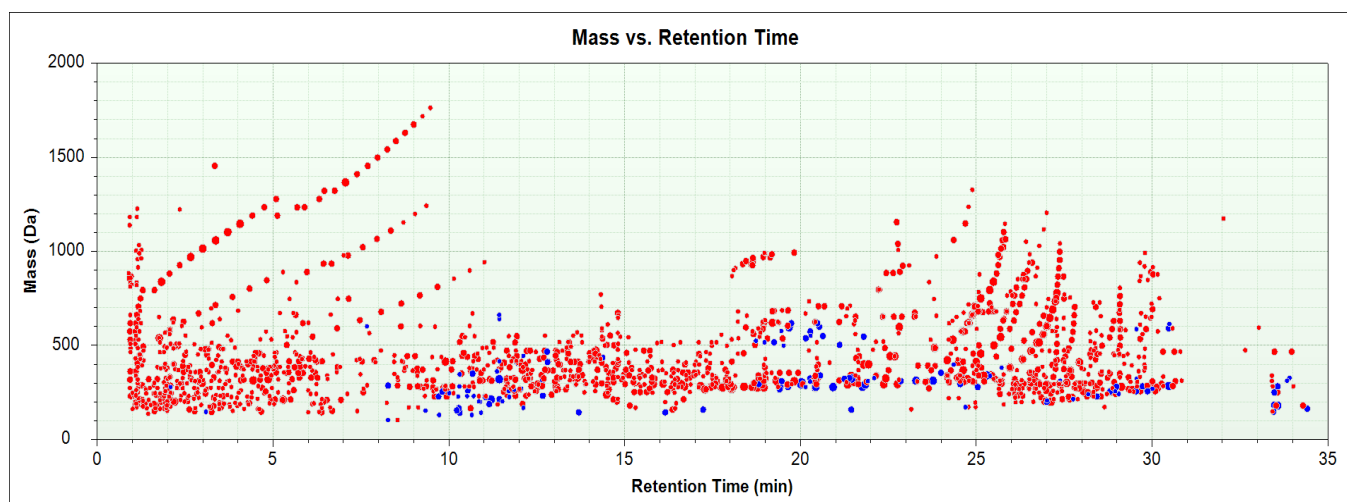
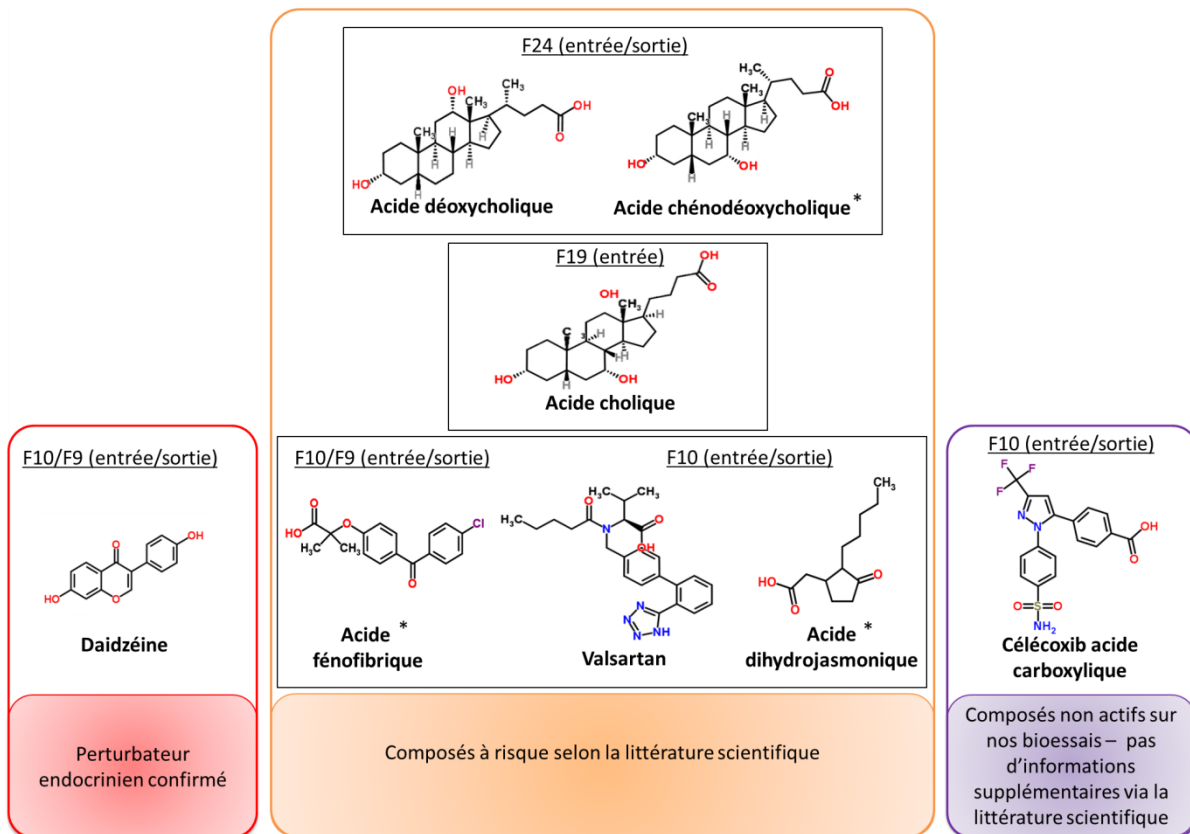


Figure 57 : Comparaison des données obtenues par LC-QTOF pour l'extrait d'eau brut de STEP (●) et la fraction F10 du même extrait (●). Un point correspond à une molécule obtenue par la fonction MFE du logiciel *MassHunter Qualitative*.

Quatre fractions (f18, f23, f24 et f31) induisent une activité androgénique pour l'eau usée brute et aucune fraction n'est active en ce qui concerne l'eau traitée. Les ligands androgéniques ont donc été dégradés par le procédé de traitement. L'analyse par LC-QTOF de la fraction la plus active, f24, a permis d'identifier la présence de sels biliaries, l'acide chénodéoxycholique et l'acide déoxycholique (Figure 58). Ces composés sont également détectés dans l'effluent. Un autre sel biliaire, l'acide cholique, est aussi détecté dans la F19. Ces composés jouent un rôle essentiel dans l'absorption des lipides par l'intestin. Leur présence dans l'environnement est d'origine fécale. Des études se sont intéressées à la recherche de ces molécules dans le milieu aquatique. Les concentrations retrouvées dans les eaux de surface sont supérieures au $\mu\text{g/L}$ (Elhmmali et al., 2000; Sebök et al., 2008). Ces sels biliaries ont également été détectés dans les sédiments (Elhmmali et al., 1997). Leur origine fécale et leur présence dans différents compartiments des écosystèmes aquatiques peuvent faire des sels biliaries des traceurs moléculaires pour le diagnostic de contamination fécale (Elhmmali et al., 1997; Elhmmali et al., 2000; Bull et al., 2002). Ces indicateurs chimiques pourraient compléter les indicateurs biologiques déjà utilisés (*e.g.* recherche de *Escherichia coli*). Ils permettraient d'identifier les sources de pollution fécale notamment dans le cadre des directives européennes relative aux eaux de baignade ou de la DCE. Si l'acide déoxycholique n'a pas induit d'activité androgénique sur la lignée cellulaire MDA-kb2, des études ont démontré que les sels biliaries, excrétés par les urines, étaient cytotoxiques et pouvaient se lier aux récepteurs X des prégnanes (Goodwin et al., 2003; Morgan et al., 2008). Par conséquent, leur recherche dans l'environnement aquatique n'est pas dénuée d'intérêt.



* Molécule non testée sur nos bioessais

Figure 58 : Composés identifiés dans les fractions biologiquement actives (F9, F10, F19 et F24) par LC-QTOF. Les molécules comportant un astérisque sont à tester sur les lignées cellulaires utilisées.

Concernant l'activité œstrogénique, les fractions (f10, f19 et f20) de l'extrait d'eau brute et les fractions (f9, f19 et f20) de l'extrait d'eau traitée montrent un effet biologique sur la lignée cellulaire MELN. Un médicament, des métabolites de composés pharmaceutiques, un phytoestrogène, et un acide gras sont identifiés dans les fractions f9 de l'effluent et f10 de l'eau usée brute (Figure 58). Parmi les molécules détectées et testées biologiquement, seule la daidzéine qui est un isoflavone issu de certains végétaux comme le soja, possède une activité œstrogénique ($TEF = 5,53 \cdot 10^{-5}$). Son spectre de fragmentation est présenté Figure 59. En tant que perturbateur endocrinien, la daidzéine est rapportée pour modifier les fonctions de la reproduction. Ainsi, l'exposition de poissons femelles (*Pimephales promelas*) à ce phytoestrogène, à une concentration de 1 µg/L, entraîne une augmentation de la quantité d'œufs (Rearick et al., 2014). Cette molécule possède une faible activité ER par rapport aux œstrogènes naturels tels que le 17β-œstradiol. Cependant, la daidzéine est excrétée en beaucoup plus grande quantité que l'œstrone (86 fois plus) (Liu et al., 2010). Les concentrations dans les écosystèmes aquatiques sont très variables suivant les sites d'étude en raison par exemple du régime alimentaire de la population, de la présence d'industries (e.g. usine à papier), des procédés d'épuration, etc (Kawanishi et al., 2004; Liu et al., 2010). Les valeurs référencées sont de 71 à 12000 ng/L pour les eaux brutes de STEP, de 5 ng/L à 81 ng/L dans les effluents traités et de 2 ng/L à 49200 ng/L (Kawanishi et al., 2004; Liu et

al., 2010). Les phytoestrogènes sont facilement dégradables par les micro-organismes mais leurs émissions constantes en font des composés pseudo-persistants dans le milieu aquatique (Kelly et al., 2014).

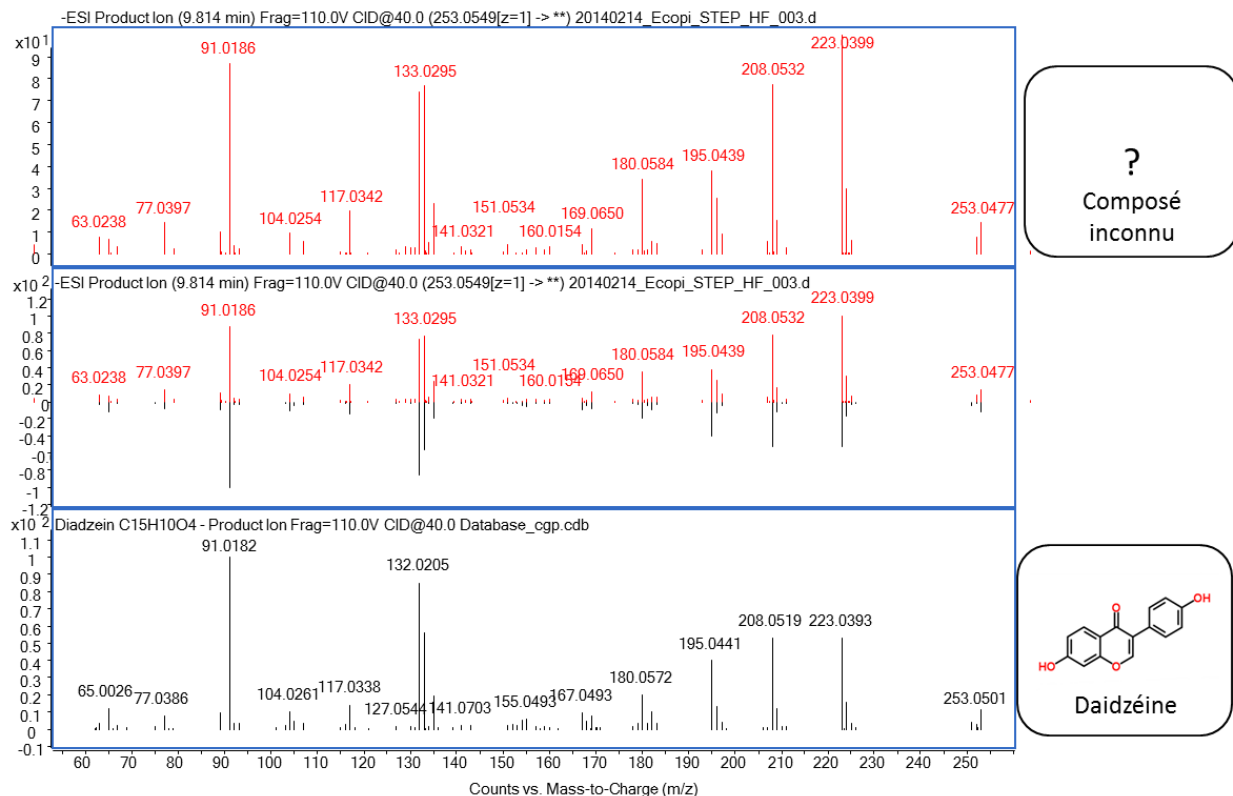


Figure 59 : Comparaison du spectre de fragmentation de la daidzéine avec celui d'un composé inconnu dans la fraction F10 d'eau usée brute de STEP.

D'autres composés identifiés dans les fractions d'eau brute et traitée de STEP représentent un danger biologique pour les organismes aquatiques. L'acide fénofibrique sera testé prochainement sur les bio-essais. Une étude rapporte ses effets biologiques chez le poisson (*Danio rerio*). Une induction de vitellogénine a été observée chez le poisson exposé à une concentration de 32 µg/L (Madureira et al., 2012). Aminot (2013) a montré que les concentrations rencontrés dans les effluents traités de STEP étaient en moyenne inférieures à 4 µg/L (écartype ±3) et dans l'environnement (*i.e.* estuaire), à 25 ng/L (écartype ±37). Cependant, l'acide fénofibrique peut induire les mêmes effets à des concentrations inférieures à 4 ng/L, lorsqu'il est en solution mélange avec d'autres composés pharmaceutiques (carbamazépine, sulfaméthoxazole, triméthoprime et propanolol hydrochloride) rencontrés dans le milieu aquatique (Madureira et al., 2011; Madureira et al., 2012). Le valsartan n'a pas montré d'activité ER, AR et anti-AR sur les lignées cellulaires MELN et MDA-kb2, respectivement mais possède une PNEC de 27 µg/L sur les algues vertes (*Pseudokirchneriella subcapitata*) et a la capacité d'être bioaccumulé chez l'espèce benthique (*Erpobdella octoculata*)

(Escher et al., 2011; Grabicova et al., 2014). Pour le célécoxib acide carboxylique, à notre connaissance, seule des données sur son parent, le célécoxib, issues d'études pharmacologiques (i.e propriété anti-inflammatoire, métabolites produits) sont disponibles dans la littérature scientifique (Davies et al., 2000; Paulson et al., 2000). Des recherches sur son occurrence dans le milieu aquatique et ses possibles effets biologiques à des concentrations environnementales doivent être menées afin de mieux connaître ce composé et son impact potentiel.

Finalement, la présence d'effet mélange entre plusieurs molécules est observée par l'activité PXR dans l'extrait d'eau prélevée en entrée de STEP. En effet, individuellement les 40 fractions collectées n'ont pas montré d'activité sur les récepteurs X des prégnanes. Mais lorsque les fractions sont regroupées dans un unique flacon, une réponse cellulaire est mesurée. L'une des hypothèse pouvant expliquer l'effet de mélange entre les composés est la taille du récepteur X des prégnanes qui assez importante pour lier plusieurs molécules simultanément (Le Maire et al., 2010). Des recherches complémentaires sont à réaliser pour mettre en évidence les composés induisant un effet synergique.

2.3 Conclusion

Les activités biologiques d'un échantillonnage comptant neuf STEP françaises ont été évaluées sur 6 bio-essais. La présence de ligands agonistes et antagoniste des récepteurs ER, AR, GR, MR, PR, PXR et AhR a été détectée dans toutes les eaux usées brutes et traitées testées. Les activités biologiques mesurées dans les effluents, comprises entre 1 et 25 ngE2-EQ/L pour la réponse ER et 2 à 36 ngDHT-EQ/L pour la réponse AR, montrent, sans surprise, que les traitements actuellement mis en œuvre (pour ceux qui ont été testés dans cette étude) ne sont pas totalement efficaces et que les effluents représentent un risque pour l'environnement aquatique. Une analyse ciblée par LC-MS/MS menée sur une STEP sélectionnée a permis d'identifier dans l'eau brute, plusieurs stéroïdes naturels comme ligands ER (*e.g.* œstriol, œstradiol, œstrone), AR (*e.g.* testostérone) et ligands antagonistes des activités MR et PR (*e.g.* prégénolone). En plus des hormones détectées par l'analyse chimique ciblée, l'analyse dirigée par l'effet, réalisée sur les extraits d'eau brute et traitée, a permis d'établir une liste de molécules pouvant présenter un danger pour le milieu aquatique parmi lesquelles des médicaments, le valsartan, des métabolites de composés pharmaceutiques comme l'acide fénofibrique, et des composés peu référencés dans la littérature, comme le célécoxib acide carboxylique. Des molécules purement endogènes comme les sels biliaires excrétés via les fèces ont également pu être identifiées. L'étude de ces composés endogènes dans l'environnement est peu documentée par rapport aux études réalisées sur les molécules émergentes comme les composés pharmaceutiques. Les sels biliaires peuvent représenter un intérêt en tant que traceurs chimiques de contamination pour diagnostiquer les sources de pollution fécale, notamment dans le cadre de la DCE. Un isoflavone, la daidzéine, a également été identifié comme perturbateur endocrinien (ligand ER) dans l'eau brute et traitée de STEP par l'approche EDA. Son activité est faible en

comparaison aux œstrogènes naturels ou aux plastifiants (bisphénol A). Cependant, la constante émission des phytoestrogènes et leur concentration dans le milieu aquatiques en font des composés à risque non négligeables (Liu et al., 2010). Des traitements complémentaires pour le traitement des eaux usées doivent donc être mis en place pour améliorer l'élimination des perturbateurs endocriniens mais également des composés présentant un danger pour l'environnement.

3 Devenir des composés organiques actifs dans les eaux usées suite aux procédés de traitement

Les processus de traitement secondaires les plus couramment utilisés pour le traitement des eaux sont les traitements biologiques utilisant des cultures bactériennes en suspension comme les boues activées ou fixées tels que les biofiltres ou les lits bactériens (Dagnino, 2009). L'article n°1 a montré que les traitements actuels (boues activées et biofiltres) mis en place dans les stations d'épuration urbaines ne permettent pas d'éliminer tous les perturbateurs endocriniens de la phase dissoute. Des technologies avancées de traitements tertiaires comme l'ozonation et la filtration sur charbon actif sont aujourd'hui disponibles pour dégrader et éliminer les micropolluants présents dans les effluents issus de traitements secondaires. Le devenir des perturbateurs endocriniens au cours des processus de traitement est exposé dans cette partie. Les résultats sont issus du projet ECHIBIOTEB qui a pour but d'évaluer ces dispositifs avancés. Afin d'améliorer les connaissances sur ces systèmes d'épuration, des échantillonneurs passifs de type POCIS ont été déployés en amont et aval des traitements tertiaires à étudier (Chapitre 3, § 1.1.5, p 67). Les activités *dioxine-like*, œstrogéniques et androgéniques/glucocorticoïdes des extraits d'eaux traitées ont été caractérisées sur les lignées cellulaire PLHC-1, MELN et MDA-kb2, respectivement. Les réponses biologiques ont été évaluées par l'INERIS (ECOT, Verneuil-en-halatte, France).

3.1 Abatement des perturbateurs endocriniens dans les eaux usées traitées par deux procédés secondaires, les boues activées et les biofiltres

Les abattements d'activités œstrogéniques et androgéniques ont pu être calculés sur deux stations d'épuration possédant deux traitements biologiques distincts : le site de Clos de Hilde utilisant les biofiltres et la station d'épuration du Havre utilisant le procédé de boues activées (Chapitre 3, §1.1.1 p61, §1.1.2 p64). Les eaux usées brutes et traitées ont été prélevées toutes les heures pendant 24h, le volume prélevé chaque heures dépendant du débits. Les rendements d'élimination sont calculées suivant l'Équation 8 employée par Gabet-Giraud, (2009).

$$\text{Équation 8 : } Ri = \frac{C_{ei} - C_{si}}{C_{ei}} \times 100$$

Avec, R_i , le rendement d'élimination le jour i

C_{ei} , la concentration mesurée dans les eaux usées en entrée de STEP le jour i

C_{si} , la concentration mesurée dans les effluents en sortie de STEP le jour i

Pour la station de Clos de Hilde, deux campagnes de prélèvement ont été réalisées, une en Mai 2011 et la seconde en Janvier 2013. Pour cette dernière, les prélèvements ont été effectués sur trois jours consécutifs, permettant ainsi de calculer un rendement moyen.

Le traitement par boue activée est l'un des procédés actuellement le plus employé pour traiter les eaux usées en France (Dagnino, 2009). Dans notre étude, la station du Havre a été utilisée pour calculer des abattements d'activités biologiques liés à ce type de traitement secondaire. Pour l'activité œstrogénique, le rendement d'élimination des composés œstrogéno-mimétiques avoisine 99%. Certains auteurs rapportent que selon les sites étudiés, les rendements peuvent varier surtout lorsque le procédé est utilisé seul. Svenson et al., (2003) montrent ainsi que les boues activées utilisées sans traitement complémentaire éliminent 58% à 94% des composés œstrogéno-mimétiques suivant les stations. Les abattements obtenus pour des stations d'épuration où le traitement des boues activées est complété avec un autre processus, sont de 81% à >99% (Svenson et al., 2003). Ces résultats sont en accord avec ceux de Dagnino et al., (2009) qui expliquent que les boues activées utilisées seules dégradent 58% de l'activité œstrogénique et que l'ajout du traitement supplémentaire par chlorure ferrique permet d'augmenter le rendement jusqu'à 90%. Lors du traitement par boues activées, des auteurs ont montré que l'activité androgénique se comportait de la même manière que l'activité œstrogénique avec des rendements d'élimination entre 82% et >99% (Leusch et al., 2006). Ce résultat est cohérent avec nos observations. En effet, l'activité AR mesurée dans l'eau brute de la station du Havre est de 189,6 ngDHT-EQ/L contre 6,1 ngDHT-EQ/L dans l'effluent traité. L'abattement calculé pour cette activité est d'environ 97%.

Concernant les stations d'épuration utilisant le traitement par biofiltre, notre étude montre que pour le site de Clos de Hilde, le traitement par biofiltres, compilé en amont par un procédé décanteur, et épaisseur utilisant des réacteurs à boues recyclées, a permis d'éliminer en moyenne 93% de l'activité œstrogénique et 91% de l'activité androgénique. De nombreuses études rapportent que ce procédé employé seul est moins efficace que les boues activées (Svenson et al., 2003; Fernandez et al., 2007; Dagnino et al., 2009). D'autres auteurs ont observé des bons abattements d'activités œstrogéniques et androgéniques par ce procédé mais précisent que ces rendements élevés sont certainement dûs aux faibles concentrations présentes dans les eaux usées (Bain et al., 2014). Cependant, couplé avec d'autres traitements comme par exemple le lagunage, les rendements d'élimination de certains perturbateurs endocriniens peuvent être supérieur à 90% (Dagnino et al., 2009). Le couplage biofiltres/boues activées a montré des rendements d'élimination de composés œstrogéno-mimétiques supérieurs à 99% (Svenson et al., 2003). Le couplage de plusieurs traitements (*e.g.* biofiltre/ boue activées, biofiltre/lagunage) nécessite des temps de séjours des eaux relativement longs et peut selon le procédé générer une grande quantité de déchets organiques.

3.2 Assainissement des effluents par un traitement tertiaire avancé, le charbon actif

Les extraits de POCIS déployés en amont et aval d'un procédé de traitement par filtration sur charbon actif induisent une activité œstrogénique, androgénique, glucocorticoïde et *dioxine-like*. Cette dernière est observable à 4h d'exposition mais disparaît après 24h montrant ainsi que les ligands sont métabolisés par les cellules. Comme exposé dans l'article n°1 et en section 2.1 de ce chapitre p174, différentes familles de molécules peuvent être responsables de ces activités biologiques telles que les stéroïdes et les composés pharmaceutiques. Les rendements d'élimination du site, entre le traitement secondaire (*n.b.* boues activées) et le procédé tertiaire, sont de 91%, 92% et 83% pour les activités ER, AR/GR et AhR, respectivement (Tableau 23). Par conséquent, la filtration sur charbon actif est un procédé performant pour éliminer la majorité des perturbateurs endocriniens dans les effluents ayant effectué un traitement secondaire en amont.

Tableau 23 : Activités ER, AR/GR et AhR mesurées dans les extraits d'eau traitée par procédé secondaire et tertiaire et calcul d'abattement des activités.

	EQ-Standard ($\mu\text{g standard/g phase HLB}$)			
	ER	GR/AR	AhR 4h	AhR 24h
Extrait traitement secondaire	0.0058	1.3	4	< LOD
Extrait traitement tertiaire	0.0005	0.1	0.7	< LOD
Abattement d'activité	91%	92%	83%	-

Les extraits de POCIS amont et aval du traitement tertiaire ont été analysés par LC-QTOF. Les paramètres analytiques sont décrits en section 6.3.2 du chapitre 3 (p 97). Les extraits ont été analysés en mode d'ionisation positif et négatif. Ne disposant que d'un volume restreint d'extraits, les échantillons ont été analysés en mode données-dépendant suivant la démarche présentée en section 3.1.2 du chapitre 5 (p 135). Les masses enregistrées sont comprises entre 100 m/z et 1700 m/z. Une fois enregistrées les données sont retraitées automatiquement par la fonction MFE (*Molecular Feature Extraction*) du logiciel MassHunter Qualitative. Seuls les ions ayant une intensité supérieure à 10 000 coups sont extraits.

Les analyses par LC-QTOF sur les extraits de POCIS amont et aval du traitement par filtration sur charbon actif montrent une diminution de 50% du nombre de molécules dans le POCIS déployé après le traitement tertiaire (Figure 60). Parmi les composés retrouvés dans l'échantillon en aval de la filtration par charbon actif, plus de la moitié sont communs avec l'échantillon en amont du traitement. Certaines molécules sont uniquement détectées en aval suggérant la présence de composés générés par le processus de traitement avancé et/ou de composés masqués par un effet matriciel important en amont. Le nombre de molécules détectées est cependant à pondérer puisque les composés présents dans le blanc de protocole n'ont pas été retranchés à l'extrait.

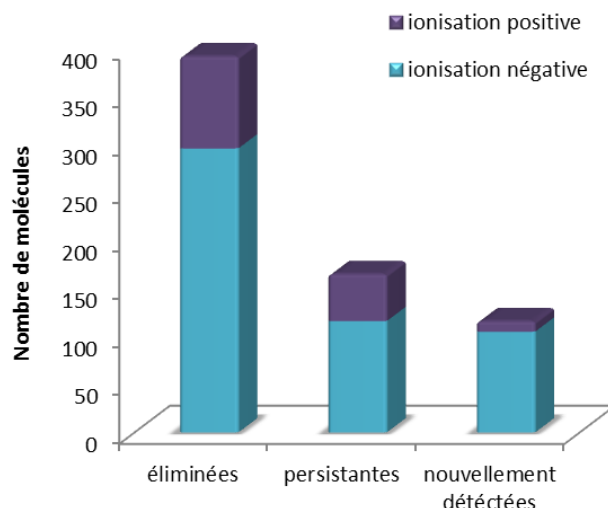


Figure 60 : Comparaison du nombre de molécules, en amont et aval du traitement tertiaire de filtration sur charbon actif, détectées par LC-QTOF dans les deux modes d'ionisation (positif et négatif).

Cette représentation ne considère pas les composés capables d'être ionisés dans les deux modes. Les molécules qualifiées « éliminées » sont détectées uniquement dans l'extrait de POCIS en amont et « nouvellement détectées » uniquement en aval du traitement tertiaire. Le terme « persistantes » désignent les molécules communes aux deux échantillons. Une cinquantaine/soixantaine de molécules sont détectées dans les blancs de protocole selon le mode d'ionisation. Ces molécules n'ont pas été retranchées aux échantillons.

Certains composés ont pu être identifiés en se basant sur les spectres de fragmentation disponibles dans les bases de données (*e.g.* Metlin, Forensics). La liste des molécules est présentée dans le Tableau 24. Il est intéressant de remarquer que certains composés difficilement éliminés par les stations d'épuration (*i.e.* rendements inférieurs à 30%) possédant un traitement secondaire, comme par exemple le sotalol et la carbamazépine (Aminot, 2013), ne sont pas éliminés par le traitement tertiaire et sont retrouvés en aval. D'autres molécules qualifiées de composés à risque pour l'environnement, comme le fipronil (pesticide souvent employé à usages domestiques) sont également détectées dans l'effluent traité par filtration sur charbon actif. La quantification de ces molécules dans les échantillons permettrait de conclure sur les concentrations observées en sortie de traitement tertiaire et par conséquent, d'évaluer plus précisément les éventuels bénéfices de l'emploi d'un tel procédé. Choubert et al., (2011) ont évalué les abattements de 89 composés organiques et métaux par ce procédé. Sur 28 rendements d'élimination calculés, 12 sont supérieurs à 70%. Ils précisent également que la filtration par charbon actif d'influence pas l'élimination des métaux. Dans notre étude, parmi les composés non totalement éliminés, le valsartan et quelques dérivés ainsi que le célécoxib acide carboxylique sont retrouvés dans l'extrait de POCIS en aval du traitement tertiaire. Ces molécules ont été détectées dans une autre station d'épuration par l'analyse dirigée par l'effet et sont présentées dans l'article n°1. Au même titre, des polymères possédant une chaîne de groupements $-\text{[C}_2\text{H}_4\text{O]}$ pouvant être identifiés comme des polyéthylènes-glycol, sont détectés en amont et aval du procédé de filtration sur charbon actif.

La détection de composés polymérisés comme les acides alkylphénol-polyéthoxyphénoxyacétiques a été rapporté dans des eaux usées traitées par des procédés tertiaires avancés (Choubert et al., 2011). La présence de ces composés rarement répertoriés et leur épuration difficile soulignent l'intérêt d'approfondir les recherches quant à leur occurrence et à leurs impacts biologiques éventuels.

Tableau 24 : Liste des composés identifiés (score MS/MS >80%) par LC-QTOF dans les extraits POCIS déployés en amont et en aval de la filtration sur charbon actif.

Nom	Formule brute	Temps de rétention (min)	Ion	m/z	Score MS/MS (%)	Famille
Acide célécoxib carboxylique	C17H12F3N3O4S	5.4	[M-H]-	410.046	90.17	Métabolite de composé pharmaceutique
Amisulpride	C17H27N3O4S	3.4	[M+H]+	370.178	94.55	Composé pharmaceutique
Carbamazepine	C15H12N2O	10.5	[M+H]+	237.101	86.79	Composé pharmaceutique
Celiprolol	C20H33N3O4	6.6	[M+H]+	380.253	89.92	Composé pharmaceutique
Clarithromycin	C38H69NO13	13.7	[M+H]+	748.482	95.02	Composé pharmaceutique
Diacetolol	C16H24N2O4	2.1	[M+H]+	309.18	89.03	Composé pharmaceutique
Dibenzoylmethane	C15H12O2	18.9	[M+H]+	225.09	89.27	
Diclofenac	C14H11Cl2NO2	18.9	[M+H]+	296.022	92.93	Composé pharmaceutique
Diltiazem	C22H26N2O4S	10.8	[M+H]+	415.166	89.57	Composé pharmaceutique
EDDP (métabolite de la méthadone)	C20H23N	10.9	[M+H]+	278.189	93.2	Métabolite de composé pharmaceutique
Fipronil	C12H4Cl2F6N4OS	22.1	[M-H]-	434.935	98.98	Pesticide
Flecainide	C17H20F6N2O3	10.4	[M+H]+	415.143	89.65	Composé pharmaceutique
Gemfibrozil	C15H22O3	21.5	[M-H]-	249.152	99.6	Composé pharmaceutique
Irbesartan	C25H28N6O	14.3	[M-H]-	427.229	99.62	Composé pharmaceutique
Niflumic acid	C13H9F3N2O2	17.4	[M+H]+	283.067	85.14	
Noscapine	C22H23NO7	7.4	[M+H]+	414.153	94.04	Composé pharmaceutique
Phendimetrazine	C12H17NO	11.4	[M+H]+	192.137	94.91	Composé pharmaceutique
Sotalol	C12H20N2O3S	1.3	[M+H]+	273.125	85.45	Composé pharmaceutique
Tiapride	C15H24N2O4S	1.9	[M+H]+	329.151	83.54	Composé pharmaceutique
Valsartan	C24H29N5O3	17.0	[M+H]+	436.232	86.99	Composé pharmaceutique
Venlafaxine	C17H27NO2	7.3	[M+H]+	278.21	86.59	Composé pharmaceutique

3.3 Conclusion

Les traitements secondaires employés dans les stations d'épuration ne permettent pas d'éliminer la totalité des composés organiques et des perturbateurs endocriniens dans les effluents urbains. La combinaison de plusieurs traitements secondaires produit de meilleurs rendements d'élimination (>90%) mais possède quelques contraintes comme la maintenance, la durée de l'épuration et la quantité de déchets organiques générés. Un nouveau traitement tertiaire, la filtration sur charbon actif, a été évalué. Ce procédé est performant pour diminuer la quantité de molécules présentes dans les effluents en sortie de traitement secondaire. La détermination des concentrations des composés entre l'amont et l'aval du procédé permettrait d'affiner les conclusions sur l'épuration et sur l'efficacité. Cependant, ce traitement ne semble pas adapté pour éliminer totalement certains composés à risque comme le fipronil, et génère de nouvelles molécules pouvant peut-être présenter un danger pour l'environnement. L'analyse dirigée par l'effet permettrait dans ce cas, d'identifier dans les effluents traités par procédé tertiaire ces molécules connues ou inconnues pouvant impacter le milieu aquatique.

4 Contamination du milieu récepteur, étude de cas lié aux rejets industriels : la rivière « La Dore »

Afin de rejeter les effluents dans l'environnement aquatique, les stations d'épuration sont tenues de vérifier certains paramètres pouvant entraîner une eutrophisation du milieu (*e.g.* pH, matière en suspension, taux d'azote...) mais aucune réglementation n'existe pour limiter les quantités en xénobiotiques émises (Gilbert, 2011). Si cette absence de réglementation est préoccupante quant à l'impact biologique des effluents des stations d'épuration urbaines, le cas des effluents industriels peut dans certains cas se révéler encore plus problématique quant aux rejets de micropolluants dans le milieu récepteur. À ce titre, Sanchez et al., (2011) ont observé une forte perturbation de la reproduction (*i.e.* hypertrophie des gonades, induction de vitellogénine...) chez les goujons *Gobio gobio* pêchés dans une rivière (*La Dore*) en aval de rejets urbains et industriels. Une première étude a été menée, au sein de l'INERIS en partenariat avec le LPTC, pour déterminer les causes des effets biologiques observés. Des échantillonneurs passifs de type POCIS ont été déployés sur la rivière *La Dore* en aval des rejets de STEP. L'extrait de POCIS a ensuite été fractionné par RP-HPLC suivant le protocole détaillé section 5.2.2 du chapitre 3 (p 87). L'emploi d'échantillonneur passif de type POCIS et la mise en place de l'analyse dirigée par l'effet a permis d'identifier plusieurs perturbateurs endocriniens tels que la dexaméthasone, la spironolactone, le 6 α -méthylprédnisolone, le lévonorgestrel dans la rivière impactée (Creusot et al., 2014). Cependant pour certaines fractions (F15, F20, F21) ayant des fortes activités glucocorticoïdes et anti-minéralocorticoïdes mesurées à l'aide de la lignée cellulaire MDA-kb2 et HG₅LN-MR, respectivement, les composés responsables des effets observés n'ont pas pu être identifiés par les analyses chimiques ciblées. Au cours de ces travaux de thèse, une stratégie d'identification basée sur l'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution (LC-QTOF) a été mise en place pour identifier les molécules actives. Ce travail fait l'objet d'un article qui sera prochainement soumis pour publication. La méthodologie employée est décrite dans l'article.

Article n°2 : *High-resolution mass spectrometric identification of emerging pharmaceutical pollutants in a river impacted by an industrial effluent combining passive sampling and Effect-Directed Analysis*

4.1 Occurrence et activités biologiques des molécules identifiées

Les fractions F15, F20 et F21 de l'extrait de POCIS déployé dans la rivière *La Dore* ont montré une activité GR et anti-MR (Figure 61). L'analyse chimique non ciblée de ces fractions par LC-QTOF a permis de confirmer cinq composés dans les fractions F15, F20 et F21, le riluzole, la désosimétasone, la canrénone, l'acide floctafénique et la roxithromycine (Tableau 25). Parmi ces molécules, la canrénone et la désosimétasone se sont relevées être biologiquement actives sur les bio-essais utilisés.

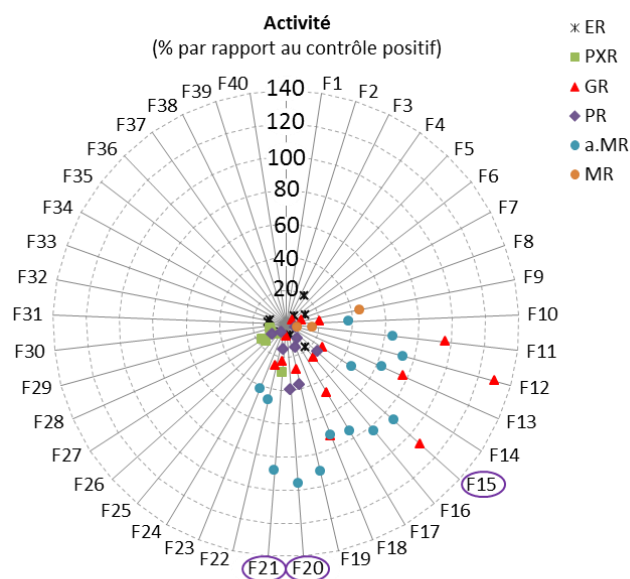


Figure 61 : Activités biologiques des fractions obtenues par RP-HPLC de l'extrait de POCIS déployé en aval des rejets urbains et industriels (Creusot et al., 2014).

La canrénone détectée dans la fraction F20 (*n.b.* concentration de 9,5 µg/g de phase HLB) est rapportée pour être un ligand antagoniste des récepteurs aux androgènes, glucocorticoïdes et minéralocorticoïdes et un agoniste des récepteurs aux progestatifs (Creusot et al., 2014). Concernant la désoximétasone, sa présence est confirmée dans la fraction F15 (Figure 62). Son activité glucocorticoïde a été évaluée sur la lignée MDA-kb2 et ce composé possède une forte affinité avec les récepteurs aux glucocorticoïdes (TEF = 3). Sa concentration dans la fraction permet d'expliquer 45 % de la réponse cellulaire mesurée. Les effets sur la reproduction de ces deux composés ne sont pas renseignés dans la littérature. Cependant des informations existent sur le parent de la canrénone, la spironolactone, et sur la dexaméthasone, un corticostéroïde très proche structurellement de la désoximétasone. La spironolactone et la dexaméthasone sont connues pour affecter les fonctions de la reproduction chez certaines espèces de poissons (Lalone et al., 2012; Lalone et al., 2013). Au vu des activités *in vitro* des composés détectés, il est envisageable que la canrénone et la désoximétasone puissent perturber, au même titre que la spironolactone et la dexaméthasone, la reproduction de certains organismes aquatiques.

D'autres molécules (*i.e.* l'acide floctafénique, la roxithromycine et le riluzole) sont identifiées par LC-QTOF dans les fractions analysées. Cependant, ces composés, excepté l'acide floctafénique qui n'a pas été testé, ne sont pas actifs sur la lignée cellulaire MDA-kb2. Des tests pour évaluer leur effet sur la lignée cellulaire HG₅LN-MR seront prochainement réalisés. Outre la roxithromycine qui est rapportée pour inhiber le cytochrome P450 et qui pourrait impacter le processus de détoxification des individus exposés (Besse et Garric, 2008),

aucune information n'a été trouvée sur d'éventuels effets biologiques du riluzole et de l'acide floctafénique sur les organismes aquatiques.

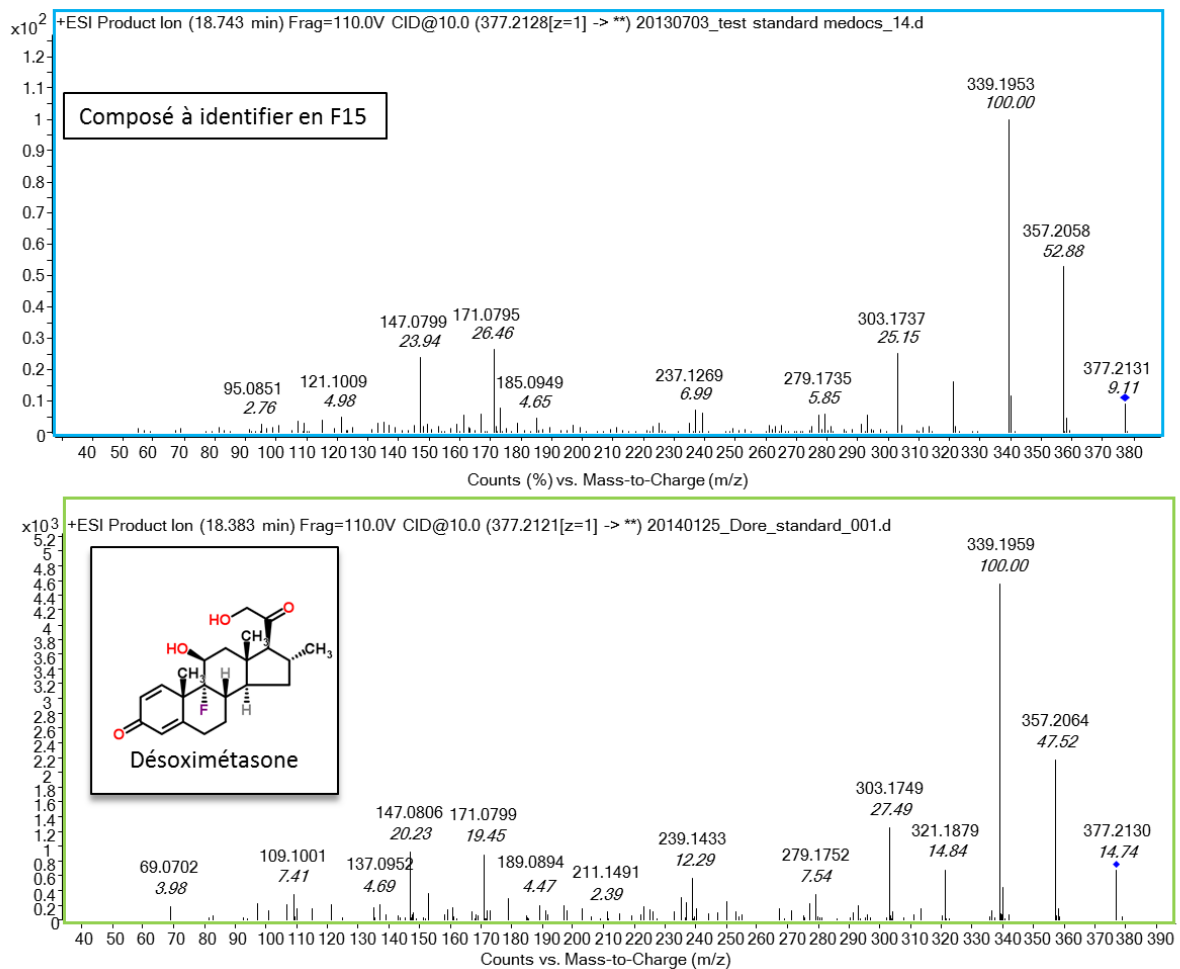
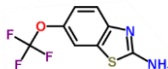
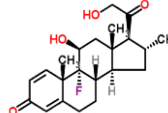
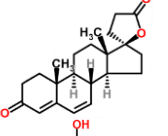
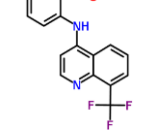
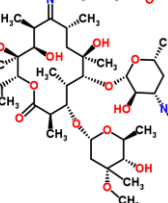


Figure 62 : Comparaison du spectre de fragmentation du composé à identifier dans la fraction F15 de POCIS et celui de l'étalon analytique, la désoximétasone.

A notre connaissance, cette étude est la première à détecter la canrénone (Creusot et al., 2014), la désoximétasone, le riluzole et l'acide floctafénique dans le milieu aquatique en France. En effet, la désoximétasone n'est plus prescrite en France, depuis 2002 mais ce corticostéroïde est toujours autorisé dans d'autres pays européens ("ANSM - Répertoire des spécialités pharmaceutiques," 2014). Par conséquent, son rejet dans le milieu d'étude via les effluents urbains est peu probable en raison de sa prescription non autorisée. Sa détection dans le site d'étude est en lien directe avec le rejet industriel. La détection du riluzole semble être également le résultat du rejet de l'effluent industriel. En effet, ce médicament est prescrit pour réduire l'évolution de la sclérose amyotrophique latéral qui touche 2 personnes sur 100 000 en Europe (McDermott and Shaw, 2008; Logroscino et al., 2010;). Sa faible utilisation par la population amène à penser qu'il est peu rejeté par les effluents urbains.

Tableau 25 : Liste des composés confirmés par LC-QTOF dans les fractions F15, F20 et F21 de l'extrait de POCIS déployés dans la rivière *La Dore*.

Fraction	Nom	Formule brute	Structure	Numéro CAS	Activité biologique ¹	Description
F15	Riluzole	C ₈ H ₅ F ₃ N ₂ OS		1744-22-5	na	Médicament pour le traitement de la sclérose latérale amyotrophique
	Désoximétasone	C ₂₂ H ₂₉ FO ₄		382-67-2	Glucocorticoïde (TEF = 3)	Corticostéroïde
F20	Canrénone	C ₂₂ H ₂₈ O ₃		976-71-6	anti-minéralocorticoïde (TEF = 0,3) ² anti-glucocorticoïde (TEF = 4.10 ⁻⁴) ²	Métabolite de la Spironolactone, stéroïde antagoniste de l'aldostérone
F20/F21	Acide floctafénique	C ₁₇ H ₁₁ F ₃ N ₂ O ₂		36783-34-3	nd	Métabolite de la Floctafénine, anti-inflammatoire
F21	Roxithromycine	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅		80214-83-1	na	Antibiotique

¹ activité biologique déterminée sur nos bio-essais (MDA-kb2, HG5LN-hMR)

² Creusot et al. 2014

nd: non déterminée, na: non active, TEF = facteur de toxicité équivalent

4.2 Présence de composés inconnus

Sur la centaine de molécules détectées dans chaque fraction analysée, 105, 182 et 138 pour la fraction F15, F20 et F21, respectivement, au total seulement cinq composés ont pu être confirmés. Par conséquent, d'autres molécules à risque sont suspectées dans les échantillons. Leur identification a été amorcée mais par manque de composés étalons disponibles dans le commerce, leur confirmation n'a pu aboutir et leur présence n'est actuellement qu'une supposition. Ce cas de figure s'applique à un produit de transformation de la cortisone, le tétrahydrocortisone-3,21-diacétate. En absence de composés étalons pour comparer les spectres de fragmentation, sa présence ne peut être confirmée dans la fraction F15. Pour d'autres molécules, l'identification est un peu plus avancée. Des isomères de l'érythromycine-9-oxime ou érythromycine A enol ether, peuvent ainsi être suspectés grâce aux similarités existantes entre les spectres de fragmentation des molécules à identifier et les composés standards achetés (érythromycine-9-oxime, érythromycine A enol ether) (SI Fig 1-2, article n°2, p253) mais aucun nom de molécule ne peut être prononcé.

Des composés de formules C₁₃H₉ClN₂ et C₁₄H₁₁ClN₂ ont été mis en évidence mais n'ont pas pu être totalement identifiés dans les fractions F20 et F21, respectivement.

Cependant, selon un logiciel aidant à l'interprétation des spectres de fragmentation, MetFrag, ces molécules pourraient posséder un groupement chimique, le benzimidazole (SI Fig3-4, article n°2, p 255). Des auteurs ont récemment montré qu'un composé le fabrozole, constitué également de cycle aromatique et d'un groupement benzimidazole, modifiait le sexe des poissons (*Danio rerio*) qui y sont exposés (Takatsu et al., 2013). Par manque de composés étalons commercialisés, l'identification n'a pu aboutir. Mais ces composés inconnus potentiellement portant un groupement benzimidazole sont de bons candidats et pourraient apporter des informations supplémentaires, sur les causes du dysfonctionnement de la reproduction qui impactent les poissons de la rivière.

4.3 Conclusion

La combinaison de l'échantillonnage passif, de l'analyse dirigée par l'effet et de la spectrométrie de masse haute résolution a permis d'apporter des éléments pour comprendre les causes impactant les organismes aquatiques d'un site naturel.

Les deux études menées sur le site, ont permis la détection de plusieurs perturbateurs endocriniens. La présence de désosimétasone possédant une forte activité glucocorticoïde a pu être mise en évidence par l'emploi de la spectrométrie de masse haute résolution. D'autres molécules ont également été détectées comme l'acide floctafénique et le riluzole. Cependant à ce jour, de nombreuses molécules restent encore inconnues notamment par le manque de composés étalons disponibles commercialement. Ce constat montre les limites actuelles de l'identification par spectrométrie de masse haute résolution et illustre la nécessité de développer des bases de données pour permettre de combler ces lacunes.

Même si le site étudié est un cas exceptionnel, cette étude souligne l'intérêt d'augmenter la surveillance des rejets de stations d'épuration associées à des sites industriels en se focalisant sur la présence de xénobiotiques et de mettre en place des processus de traitement plus adaptés pour limiter les rejets de composés dans l'environnement.

Bilan de l'étude des rejets urbains et industriels par l'analyse dirigée par l'effet

1 Activités *in vitro* dans les urines et en STEP

Dans ces travaux de thèse, les activités ER, AR, GR, MR, PR, PXR et AHR ont été évaluées sur des sources d'émission de perturbateurs endocriniens c'est-à-dire les urines de femme et d'homme et les stations d'épuration urbaines. L'étude a montré que :

Pour les urines :

- Des activités agonistes des récepteurs aux œstrogènes, androgènes, et antagoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes, minéralocorticoïdes, de la progestérone ont été détectées dans les urines aussi bien d'homme que de femme.
- Les composés excrétés sous formes conjuguées ne sont pas actifs sur ER et AR. Mais la conjugaison n'impacte pas les activités anti-GR, anti-MR et anti-PR.

Pour les STEP :

- Les mêmes activités que celles détectées dans les urines ont pu être mises en évidence dans les eaux brutes et traitées de neuf stations d'épuration françaises, avec en plus des activités liées aux récepteurs PXR et AhR. L'activité ER et AR moyenne est respectivement de 180 ngE2-EQ/L et de 556 ngDHT-EQ/L pour les eaux usées brutes et de 8 ngE2-EQ/L et de 15 ngDHT-EQ/L pour les eaux traitées.
- Une déconjugaison des hormones excrétées via les urines sous forme conjuguée est suspectée durant leur transport dans le réseau d'assainissement.
- Les traitements secondaires actuels (boues activées et biofiltres) ne sont pas efficaces pour éliminer les perturbateurs endocriniens.
- L'ajout de traitement tertiaire de type filtration sur charbon actif est une méthode alternative performante pour réduire l'activité ER et AR (> 90%) et limiter la quantité de molécules présentes dans les effluents de STEP issus de procédé secondaire.

Les composés responsables des activités *in vitro* observées ont été recherchés par des analyses chimiques (LC-MS/MS) ciblées sur les stéroïdes dans les urines et STEP.

- Des œstrogènes (œstriol, œstradiol, œstrone, éthynylestradiol) ont été détectés dans les urines ; parmi eux l'œstriol, l'œstradiol et l'œstrone ont été retrouvés dans les eaux

brutes de STEP. Dans les STEP, ils contribuent à l'intégralité de l'activité œstrogénique mesurée.

- Des composés androgéniques comme la testostérone, le 4-androstène-3,17-dione ont été identifiés dans les deux types d'échantillon. Ils contribuent à 12% de l'activité androgénique mesurée dans les eaux d'entrée de STEP.
- L'activité anti-MR peut s'expliquer par la détection de testostérone, 4-androstène-3,17-dione, cortisone et hydrocortisone dans les urines et par ces mêmes hormones (hormis l'hydrocortisone), la prégnénolone et la progestérone en STEP.
- La prégnénolone et la testostérone contribuent à l'activité anti-PR mesurée.
- La prégnénolone est le stéroïde le plus concentré dans les eaux brutes de STEP après le 4-androstène-3,17-dione (produit de dégradation de la testostérone).
- Les stéroïdes détectés ne permettent pas d'expliquer à eux seuls les activités biologiques mesurées en STEP et dans les urines.

Diverses activités *in vitro* sont mesurées en STEP en lien avec la présence de PE. L'étude a montré que les traitements des eaux usées ne sont pas totalement efficaces pour éliminer tous les composés actifs.

Hormis les activités PXR et AhR, les activités ER, AR, anti-GR, anti-PR et anti-MR ont été reliées dans une certaine mesure aux urines humaines.

Ces effets biologiques sont expliqués en partie par la présence de nombreux stéroïdes : prégnénolone, 4-androstène-3,17-dione, cortisone, testostérone, œstriol, œstradiol, œstrone, progestérone en STEP ; ces hormones à l'exception de la prégnénolone et de la progestérone se retrouvent également dans les urines échantillonnées.

2 Apport de l'approche EDA à la caractérisation de composés biologiquement actifs en STEP

L'analyse dirigée par l'effet a été mise en place dans les eaux brutes et usées d'une STEP bordelaise (Clos de Hilde) afin d'identifier des perturbateurs endocriniens non identifiés par les analyses chimiques ciblées. Les extraits d'eaux d'entrée et de sortie de STEP ont été fractionnés en RP-HPLC en 40 fractions. Les activités ER, AR, anti-AR et PXR ont été employées. Les résultats obtenus sont les suivants :

- Hormis pour l'activité ER, aucune fraction active n'a été détectée dans les effluents de STEP

- Un effet mélange de composés est observé pour l'activité PXR. Les composés responsables restent à identifier.
- 4 fractions sont actives en AR : F18, F23, F24 et F31.
- 3 fractions sont actives en ER : F10, F19, F20 en entrée et F9, F19, F20 en sortie. Une différence est observée entre les deux profils de fractionnement (F10 et F9). Deux hypothèses sont émises : (1) possibilité de présence de produit(s) de transformation(s) actif(s) en F9 de sortie de STEP, (2) même composés actifs dans F10 et F9, la différence de fraction est liée à un léger décalage de temps de rétention.

Des analyses non ciblées par LC-QTOF ont été réalisées sur les extraits de STEP et les fractions les plus actives (F9/F10, F19 et F24). L'identification a révélé la présence de :

- Surfactant tels que les poly(éthylène)glycols.
- Médicaments : le valsartan et des métabolites : le célécoxib acide carboxylique, l'acide fénofibrique.
- Sels biliaires : l'acide cholique, l'acide déoxycholique, l'acide chénodeoxycholique.
- Acide gras : l'acide dihydrojasmonique
- Phytoestrogène : la daidzéine, composé actif sur ER ($TEF = 5,53 \cdot 10^{-5}$).

L'analyse dirigée par l'effet réalisée sur les extraits de STEP a permis de mettre en évidence la présence d'effet mélange entre les composés pour l'activité PXR. Cet effet a pu être observé grâce au fractionnement de l'échantillon et n'aurait pas pu être mis en évidence les techniques conventionnelles de criblage d'activités sur l'extrait global.

Pour les activités ER et AR, 8 molécules ont pu être identifiées parmi lesquelles 6 sont rapportées dans la littérature pour être des composés potentiellement à risque. Ces molécules sont des composés pharmaceutiques ou métabolites excrétés par l'homme, et des composés purement endogènes : PEG, valsartan, le célécoxib acide carboxylique, l'acide fénofibrique, l'acide cholique, l'acide déoxycholique, l'acide chénodeoxycholique, l'acide dihydrojasmonique, la daidzéine.

L'EDA a permis d'identifier parmi les molécules détectées un perturbateur endocrinien, la daidzéine comme ligand agoniste des récepteurs ER.

L'approche EDA montre qu'en parallèle aux composés classiquement rencontrés dans les effluents de STEP, des molécules naturelles tels que les phytoestrogènes, ou certains composés endogènes peuvent présenter un danger pour l'environnement. Cependant, les composés endogènes comme les sels biliaires peuvent également présenter un intérêt dans le cadre d'un diagnostic environnemental de contamination fécale.

3 Couplage POCIS/EDA/HRMS pour l'identification de perturbateurs endocriniens dans les eaux de surface

Des échantillonneurs passifs de type POCIS ont été couplés à l'analyse dirigée par l'effet dans le but d'identifier des perturbateurs endocriniens dans une rivière impactée par des rejets urbains et industriels. Des analyses chimiques non ciblées par LC-QTOF ont été réalisées afin de caractériser les composés responsables des fortes activités glucocorticoïdes et anti-minéralocorticoïdes non expliquées de différentes fractions (F15, F20, F21). Les résultats obtenus sont :

- Une détection de plus d'une centaine de molécules dans chaque fraction analysée en mode d'ionisation positif.
- La stratégie d'identification mise en place a permis d'identifier la présence de médicaments spécifiques au rejet industriel : le riluzole, la desoximétasone et roxithromycine ; et de métabolites de composés pharmaceutiques : l'acide floctafénique et la canrenone.
- L'identification est restée inachevée pour plusieurs molécules par manque d'informations dans les bibliothèques de spectre ou d'étalon analytiques.
- Une liste de suspects a été établie parmi lesquels sont inclus des produits de dégradation d'antibiotiques, un produit de transformation de la cortisone, le tétrahydrocortisone-3,21-diacétate ; des composés de type benzimidazole.
- Les benzimidazoles sont une piste à creuser pour expliquer une partie des effets biologiques observés sur le site d'étude
- La desoximétasone a été identifiée comme un fort ligand agoniste GR (TEF =3), détecté dans l'eau de rivière à une concentration estimée de 0,23 µg/L.

Le couplage de l'analyse dirigée par l'effet avec les échantillonneurs passifs et les analyses par HRMS est une combinaison intéressante pour répondre à des problématiques environnementales. Le POCIS permet de concentrer pour une part les composés présents afin de faciliter leur détection ; l'EDA simplifie l'échantillon pour sélectionner les fractions d'intérêt ; et l'analyse par HRMS permet d'identifier les molécules connues et/ou inconnues responsable des activités biologiques mises en évidence.

L'emploi de cette technique alternative sur une rivière impactée par des rejets urbains et industriels a permis d'identifier des perturbateurs endocriniens : la desoximétasone, comme ligand agoniste des récepteurs aux glucocorticoïdes et la canrenone comme ligand antagoniste des récepteurs aux minéralocorticoïdes. D'autres composés, dont les effets biologiques dans l'environnement sont peu connus, ont également pu être détectée : le riluzole et l'acide floctafénique.

L'étude montre aussi la nécessité de développer des bibliothèques de spectres pour faciliter l'identification car quelques molécules détectées n'ont actuellement pas pu être identifiées.

Article n°1

Assessing in vitro activities and identification of endocrine-disrupting compounds in wastewater treatment plant using Effect-Directed Analysis

Assessing *in vitro* activities and identification of endocrine-disrupting compounds in wastewater treatment plant using effect-directed analysis

Gardia-Parège C.^a, Dévier M-H.^a, Creusot N.^b, Maillot-Marechal E.^b, Balaguer P.^c, Grimaldi M.^c, Mazellier P.^a, Aït-Aïssa S.^b, Budzinski H.^a

^a Université de Bordeaux, EPOC / LPTC – UMR 5805 CNRS, 351 cours de la Libération, F-33405 Talence cedex, France

^b Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques INERIS, Unité Écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, Parc ALATA, BP2 F-60550 Verneuil-en-Halatte, France

^c Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, IRCM, INSERM U896, ICM, UM1 - Parc Euromédecine, F-34298 Montpellier cedex 5, France.

*Corresponding author: Hélène Budzinski

E-mail: h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr, phone +33 540 006 998, fax +33 540 002 267

ABSTRACT

Wastewater treatment plants (WWTP) are the main source of endocrine disrupting compounds (EDCs) released in aquatic environment. Considering the large diversity of compounds and their transformation products, many EDCs are currently unknown. In this study, *in vitro* biological activities of both influent and effluent water sample of nine French urban WWTP were assessed using a panel of bioassays based on the activation of the estrogen (ER α), androgen (AR), glucocorticoid (GR), mineralocorticoid (MR), progestagen (PR), xenobiotics (PXR) and dioxin-like (AhR) receptors. The presence of agonist and antagonist ligands was detected in these samples. The identification of several steroids was performed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). 9 natural hormones have been detected in the influent sample among them pregnenolone, 4-androstene-3,17-dione and estriol were the most abundant steroids. However, identified compounds were partially responsible for the observed biological activities. Only 12% of AR and 0.01% of PXR responses could be explained by the detected steroids. Considering the thousands of compounds present in crude extracts, Effect-Directed Analysis (EDA) was conducted in order to simplify samples focusing only on EDCs present in active fractions. This approach combined to high resolution mass spectrometry (LC-QTOF-MS) allowed establishing a list of non-target compounds among them drugs, metabolites, phytoestrogen, fatty acid and bile salts which the analysis of confirmed by commercial standards. *In vitro* ER and AR activities of all identified compounds were assessed. As expected, daidzein identified in both influent and effluent WWTP sample was confirmed as an agonist ligand of ER.

Keywords: endocrine disrupting compounds, wastewater treatment plants, target and non-target chemical analysis, effect-directed analysis, high resolution mass spectrometry

INTRODUCTION

The presence of organic pollutants in aquatic ecosystems is the result of multiple human activities, including domestic, agricultural or industrial. Everyday, different pollutants among them personal care products, pesticides, cleansers, drugs which can amount to 30 000 to 70 000 chemicals were daily used by man activities (Bester, 2007; Schwarzenbach et al., 2006). In addition to these products, endogenous compounds as such hormones are excreted via urine and faeces. All of these contaminants are conveyed by sewers, arrived at sewage treatment plant and finally a part is released in the aquatic environment. Indeed, wastewater treatment plants (WWTPs) are only required to check pH, the rate of suspended solid particules, chemical and biological oxygen demand, phosphate, nitrogen. But no framework limit the released concentration of xenobiotics in aquatic ecosystems (Gilbert, 2011). However, several compounds can induce biological damages at very low concentrations (*e.g.* LOEC of ivermectin at 0.001 ng/L, Garric et al., 2007). Effluents of WWTPs were reported to induce disruptions of endocrine system functions, resulting adverse effects on growth and reproduction of aquatic wildlife (Sanchez et al., 2011; Creusot et al., 2014;). In fact, WWTPs are the main source of endocrine disrupting compounds (EDCs) in aquatic ecosystems (Ternes and Joss, 2006).

The large diversity of compounds released in the environment is increased by transformation products (*e.g.* phototransformation, metabolisation, biodegradation...). These compounds may induce more damage than their parent molecules (Schmitt-Jansen et al., 2007; Schulze et al., 2010). Processes of water treatment are not totally efficient and may produce compounds degradation. Regarding to the several thousands of known and currently unknown chemicals present in WWTPs, it is important to apply methods that can both highlight the compounds causing biological damage and to identify them. Herein, Effect-Directed Analysis (EDA) is an promising approach which have previously shown satisfactory results on effluents of sewage treatment plants (Grung et al., 2007; Thomas et al., 2009; Smital et al., 2011; Creusot et al., 2014). This approach based on the sequential simplification of complex environmental samples using physico-chemical fractionation processes and bioassays allows identifying biological active compounds (Brack, 2003). To date, the development of analytical apparatus such as high resolution mass spectrometry systems (HRMS) opened new possibilities for the identification of compounds especially non target or unknown molecules (Petrovic et al., 2010; Dévier et al., 2011; Sosa-Ferrera et al., 2013; Hug et al., 2014; Schymanski et al., 2014).

In this study, EDA was conducted in an attempt to understand the potential impact of WWTPs in the aquatic environment and to identify EDCs focused on typical urban WWTPs. Firstly, the presence of EDCs in various WWTPs was been investigated on nine French urban WWTPs by assessment of *in vitro* activities of both influent and effluent water samples. Biological screening of estrogen (ER), androgen (AR), glucocorticoid (GR), mineralocorticoid (MR), progestagenic (AhR), dioxin-like (AhR) and pregnane X (PXR) activities, was performed using a panel of *in vitro* bioassays based on nuclear receptors which

are the first targets of EDCs. Then, compounds responsible of these activities were searched in selected urban WWTP samples. Firstly, a target chemical screening was performed on steroids. The assessment of the contribution of the detected compounds to the biological activities measured was calculated using mass balance analysis. In an attempt to identify other active compounds, WWTP water extracts were fractionated using high performance liquid chromatography (HPLC). Each fraction was then tested on bio-assays (ER, AR, PXR). Finally, a non target chemical analysis based on HRMS was performed on the most active fraction, in order to identify EDCs.

MATERIELS AND METHODS

Solvents, reagents and materials

Methanol and acetonitrile (HPLC grade quality) from J.T. Baker and dichloromethane were purchased from Atlantic Labo (Bruges, France) and Acros Organics (Noisy le Grand, France), respectively. Ultra-pure water was prepared with a Milli-Q water purification system using an EDS-PAK filter (Millipore SA, Guyancourt, France). Formic acid (98% purity) destined to target chemical analysis and formic acid (99 % purity) contained in 1 mL individual vial reserved to non target chemical analysis, both from J.T. Baker, were supplied from Atlantic Labo (Bruges, France).

High density polyethylene (HDPE) plastics bottles (Nalgene[®]) and glass microfiber filters (Whatman, GFF, 0.7 μ m) was supplied by Fisher Bioblock Scientific (Illkirch, France). Oasis Hydrophilic-Lipophilic Balanced cartridge (6 cc, 200 mg) was purchased from Waters (Guyancourt, France).

All the compound standards and the deuterated internal standards (>98% purity) were obtained from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), Santa Cruz (Heidelberg, Allemagne) and LGC standards (Molsheim, France).

For biological tests, dimethylsulfoxid (DMSO) (biological reagent grade quality) was provided from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Ligands were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France), LGC Standards (Molsheim, France) and NEN Life Science Products (Paris, France).

Samples collection and water extraction

Influent and final treated effluents of nine WWTPs in France were collected (Fig 1). In addition, an effluent namely Laouga included effluents of 3 public and 2 private sewage treatment plants was also sampled. Details of each site and the sampling are given in Table 1.

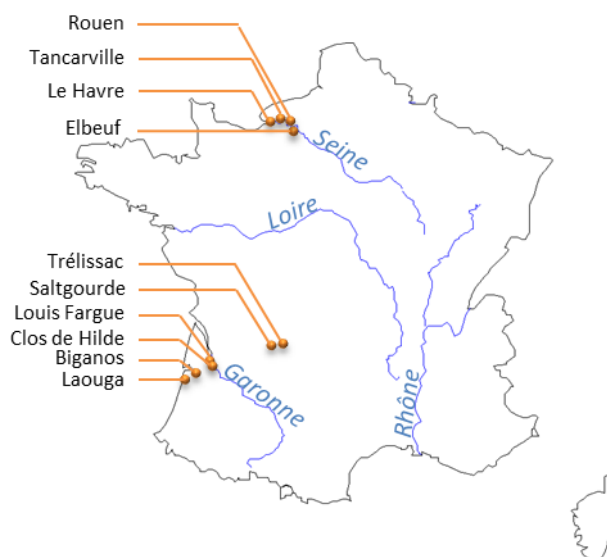


Fig 1 : Location of sampling site in France

For EDA experiment, a second sampling was needed (higher sample volume) and was performed on a selected WWT (Clos de Hilde).

Samples were collected in new HDPE bottles or glass bottles (Table 1) and were transported in a cold compartment. When arrived at the laboratory, waters were filtered using glass microfiber filters (GFF, 0.7 μm) previously calcinated at 450°C for 6 h and were then stored then in HPDE bottles at -20°C.

A 250 mL was extracted by solide-phase extraction (SPE) using 200 mg Oasis[®] HLB cartridge. Cartridges were previously cleaned using 5 mL dichloromethane and were conditioned by 5 mL methanol and then 5 mL ultra-pure water. Samples were percolated on cartridges. After drying under vacuum (45 min), compounds were eluted with 2x5 mL dichloromethane, 2x5 mL dichloromethane/methanol mixture (50/50, v:v) and 2x5 mL methanol. The extract was dried under argon flux (99,999 % purity, Linde gas, Bassens, France) and reconstituted in 500 μL methanol. An aliquot of extract was dried and dissolved in DMSO for *in vitro* bioassays. Finally, extracts were stored at -20°C until further processing.

***In vitro* bioassays**

Cell culture conditions and protocols were described in previous studies (Louiz et al., 2008; Creusot et al., 2010; Kinani et al., 2010; Bellet et al., 2012). In brief, MELN, MDA-kb2, HELN-hAR, HG₅LN-hGR, HG₅LN-hMR, HG₅LN-hPR, HG₅LN-hPXR, and PLHC-1 cell lines were used to assess estrogenic, (anti)-androgenic/glucocorticoid, specific anti-glucocorticoid, anti-mineralocorticoid, anti-progestagenic, PXR-like and dioxine-like activities, respectively. Cells were seeded in 96-well white opaque culture plates at a density

of 1×10^5 cells per well. After 24 h, reference ligands and samples were introduced in cell plates at different concentrations in triplicates. After 16 h of exposure, cell plates were emptied and medium containing 0.3 mM luciferin was added in each well. Luminescence signal was read by two microtiter plate luminometers, one for extract of WWTPs (Wallac MicroBeta[®], Perkin-Elmer SAS, Courtabœuf, France), the other for fractions of WWTPs (Synergy 2, BioTek, Colmar, France). Response was expressed compared with maximal luciferase activity induced by the reference ligand. For the EROD assay, PLHC-1 cells were seeded in transparent 96-well plates at 5×10^4 cells per well. After 24 h of incubation, the cells were exposed to extracts samples for 4 h and 24 h. Then, plates were emptied and 5 μ M 7-ethoxyresorufin was added in each well. EROD activity was measured on a spectrofluorimeter at 400/460 nm (Saphire 2, Tecan, Lyon, France).

Dose-response curves were drawn using the Hill equation model given by the Regtox 7.5 Microsoft Excel macro (freely available at <http://www.normalesup.org/~vindimian/>) and allowed determining EC20 corresponding to concentrations of extracts or chemical standards giving 20% of the maximum luciferase. A toxic-equivalent factor or quotient derived from bioassay activities (Bio-TEQ) was estimated following the ratio of the EC20 of the reference chemicals (g/L) to that of the sample expressed as equivalent liter per liter (L EQ/L).

In parallel to the assessment of activities, cell viability was checked for several samples, when cytotoxicity is suspected using the MTT assay according to the procedure previously described by Laville et al. (2004).

Table 1 : Main characteristics of the studied WWTPs and sampling conditions (www.assainissement.developpement-durable.gouv.fr).

WWTPs	Capacity (inhabitant equivalent)	Type of treatment	Sampling collect			Date
			Nature	Sampling type	Sampling materials	
Clos de Hilde	408 000	biofilter	influent/effluent	24 h composite samples (flow proportional)	HDPE	May 2011 and January 2013
Louis Fargue	300 000	activated sludge	influent/effluent	24 h composite samples (flow proportional)	HDPE	May 2011
Biganos	135 000	biofilter	influent/effluent	24 h composite samples (flow proportional)	HDPE (influent)/ Glass bottle (effluent)	May 2011
Laouga	-	activated sludge/ biofilter/desinfection process (UV, chlorination...)	Outlet of 5 WWTPs	24 h composite samples (flow proportional)	Glass bottle	May 2011
Trelissac	10 000	activated sludge	influent/effluent	Point-source (4:45 pm)	HDPE	May 2011
Saltgourde	48 000	activated sludge	influent/effluent	Point-source (4 pm)	HDPE	May 2011
Le Havre	322 000	activated sludge	influent/effluent	24 h composite samples (flow proportional)	HDPE	May 2011
Tancarville	1 800	activated sludge	influent/effluent	Point-source (10:15 am)	HDPE	May 2011
Elbeuf	118 000	activated sludge	influent/effluent	Point-source (10:15 am)	HDPE	May 2011
Rouen	500 000	activated sludge	influent/effluent	Point-source (8:45 am)	HDPE	May 2011

WWTPs, wastewater treatment plants, HDPE, high density polyethylene plastic bottle

Fractionation process

Influent and final treated effluent of a WWTP (Clos de Hilde) located in the South West of France collected in January 2013 were fractionated using reversed phase - high performance liquid chromatography (RP-HPLC) performed on an Agilent apparatus (1200 Series, Agilent Technologies, Santa Clara, USA), equipped with a diode array detector (1200 Series) and a fraction collector (1260 Infinity Series). Fractionation protocol was adapted from Creusot et al., (2013). Compounds were separated on a C18 column (Spherisorb ODS2, 5 μm , 4,6 x 250 mm) (Waters, Milford, USA) at a flow rate of 1 mL/min. The gradient started at an initial composition of ultra-pure water/acetonitrile (80/20, v:v) during 10 min, increased until 45 % acetonitrile at 60 min, and then at 100 % acetonitrile at 100 min and held for 20 min, before returning to the initial value to ultra-pure water/acetonitrile (80/20, v:v) and kept until 125 min. The fractions were collected each 3 min. 40 fractions (F1 to F40) were obtained, dried using EZ-2⁺® automatic evaporator system (Genevac, Fisher Scientific, Illkirch, France) and then reconstituted in methanol. Each fraction was divided in three aliquots : one for chemical analysis, one for bioassays, and the last part of each fraction was assembled in a single vial in order to reconstitute extracts as if it was not fractionated. For bioassays, fractions were finally dried under argon flux and reconstituted in DMSO. All fractions were stored at -20°C until further processing. In parallel to samples, a procedural blank (solvents only) was also fractionated in order to check the absence of contamination during the whole procedure.

Steroids analysis

Steroid analysis were performed on a Waters Acquity UPLC apparatus coupled to a Quattro Premier XE Waters mass spectrometer (Saint Quentin en Yvelines, France). Analytes were separated on a C18 column (Kinetex[®] C18, 1.7 μm , 100 x 2.1 mm), Phenomenex, Agilent Technologies, Les Ulis, France). The injection volume was set at 5 μL . The separation was performed at a flow rate of 0.6 mL/min under gradient elution conditions using ultra-pure water (A) and acetonitrile (B) both with 0.1 % formic acid. Gradient elution was from 20 % B to 40 % B at 11 min, increased to 100 % B in 4 min and kept isocratic for 30 second, then the initial conditions of 20 % B were again reached at the time of 16 min and kept isocratic for 2 min.

The apparatus was operated in positive electrospray ionisation mode (ESI+) using Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode. Capillary voltage was set at 3 500V and flow rate was 800 L/h. Other parameters of spectrometer (*i.e.* transition ions, cone voltage, collision energy) are given in SI Table 1.

Estrogen analyses were performed by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) with an Agilent Infinity 1290 LC system coupled to an Agilent 6490 mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Estrogens were

separated chromatographically on a C18 analytical column (Kinetex Phenomenex[®], 100 x 2.1 mm and 1,7 μm particle size, Agilent Technologies) maintained at 30°C. Mobile phases were ultra-pure water with 1 nM ammonium fluoride (A) and acetonitrile/methanol (35/65, v:v) (B) in the negative ionization mode. The chromatographic method used the following time program of the gradient: 0.5 min 10% B, linear to 100% B at 5.5 min, constant 100% B to 6 min, back to 10% B at 6.5 min and equilibration for 2.5 min. The flow rate was 0.6 mL/min and the injected sample volume was 5 μL . The apparatus was performed by negative ion mode using MRM mode. The MS/MS parameters (*i.e.* transition ions, fragmentor voltage, collision energy) are given in SI Table 1. Capillary voltage was fixed at 3 000 V. Gas flow rate was 11 L/min at temperature of 300°C.

The identification of compounds was accepted according to the check of four analytical points : the retention time, the detection of peak in transitions of quantification, and in transitions of confirmation, the ratio between these two transitions. All steroid was quantified relatively to deuterated steroid used as surrogate standards (SI Table 1).

LC-QTOF-MS analysis

Analyses were carried out on an Agilent Infinity 1290 HPLC system coupled to an Agilent 6540 accurate mass quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Analytes were separated on an analytical C18 column (100 x 2,1 mm, 100 \AA , 1,7 μm , Kinetex Phenomenex[®], Agilent Technologies, Les Ulis, France) kept at 40°C and 2 μL of fraction was injected. Highest active fractions were analyzed in both positive and negative mode electrospray ionization (ESI) coupled to a Jet Stream system (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Mobile phase were ultra-pure water (A) and acetonitrile (B) both with 0.1 % of formic acid for positive ionization mode and ultra-pure water and acetonitrile for negative ionization at a flow rate of 0.3 mL/min. The elution gradient program was as follows : 0 min 10% B, linear to 40% B at 22 min, linear to 100% B at 30 min, constant 100% B to 32 min, back to 10% B at 34 min and equilibration for 4 min. The operating conditions for the ESI source were as follows: source temperature 300°C, gas flow rate 8 L.min⁻¹, capillary voltage 3000 V, nebulizer gas pressure 40 psi, sheath gas temperature 400°C, nozzle voltage 1500 V and fragmentor 110 V. The instrument was operated in 2 GHz (Extended Dynamic Range). The data acquisitions were performed using (data-dependent) auto-MS/MS acquisition mode. In the same run, the most abundant precursor ions are selected from a TOF mode scan and then fragmented in MS/MS mode (Q-TOF). MS spectra were acquired with a scan range of 70 – 1700 m/z . The most abundant precursor ions were isolated for ~1.3 Da isolation width and fragmented at three fixed collision energies : 10, 20 and 40 V. A constant flow of an Agilent TOF reference solution through the reference nebulizer allowed the system to continuously correct for any mass drift by using the reference mass ion HP-921 [hexakis-(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)-phosphazine] at m/z 922.0098 $[\text{M}+\text{H}]^+$, or 966.000725 m/z $[\text{M}+\text{HCO}_2]^-$ (formate adduct) in the positive and negative ionization mode, respectively. Before all injection, stability of mass accuracy was checked with an Agilent

standard solution and the system was re-calibrated if values went above 0.2 ppm error. A standard solution containing 36 compounds was injected before the samples to check the retention time of compounds and the instrumental sensitivity (used as control card).

The data were processed using the MassHunter Qualitative software (version B.05.00, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Total ion chromatogram was examined manually in order to select ions only present, intense enough, in sample fraction by comparing compounds detected in sample fraction with those of the corresponding blank fraction. For each selected peak, the elemental formulae were generated using relative isotopic abundance of mass spectra profiles and precursor ion mass. The calculation of most probable molecular formula included the common elements C, H, N, O, S, Cl, F, P, score higher than 50 % and an error margin of 5 ppm. Different ionization products were considered : $[M+H]^+$ or $[M+NH_4]^+$ for positive mode and $[M-H]^-$ and $[M+Cl]^-$ for negative mode. Then, the fragmentation mass spectrum was compared to MS/MS spectra included in exhaustive spectral libraries namely Metlin, Forensics and MassBank. In order to confirm the identity of the compound, reference standard was purchased, when it was available. The purchased molecule was analysed using the same LC-QTOF-MS method. The identity of the molecule was confirmed when the standard have the same analytical characteristics as unknown compound (*i.e* retention time match, accurate mass, isotope pattern and the fragmentation spectra).

Assessment and contribution to biological activities

When available, purchased reference standards of identified compounds were also tested on bioassays in an attempt to check their activities. For an active molecule, the relative equivalent potency of tested chemical (REPi) was determined as ratio of EC20 of reference compound on EC20 of tested compound. The contribution of the identified active compounds was assessed to determine the concentrations of molecules in samples or fractions using the standard addition method or internal calibration method. A chemical toxic equivalent value (Chem-TEQ) was determined using the chemical concentrations (C_i) and REPi by the following equation : $\text{chem-TEQ} = \sum (C_i \times \text{REPi})$. Finally, Chem-TEQ was compared to Bio-TEQ in order to define the contribution of the identified molecule to the measured biological activities.

Quality control

All solvent bottles were freshly opened and dedicated to this study. All glassware was washed with detergent and carefully rinsed with ultra-pure water. The glassware was then calcinated at 450°C overnight.

In order to check the absence of contamination during the extraction and fractionation processes, a procedural blank sample (solvents) was performed for each experiments. For

chemical analysis, blanks of injection were used after each sample to avoid cross-contamination between samples.

RESULTS AND DISCUSSION

Assesment of *in vitro* activities in wastewater treatment plants

Different WWTPs with various treatment processes and capacities were studied in order to assess their biological regarding the occurrence of EDCs. At sites, estrogenic and androgenic activities were observed in both influent and effluent samples (Fig 2). No activity was observed in the procedural blank.

Focusing on estrogenic activity in effluents of WWTPs (Fig 2A), measured biological toxic-equivalents ranged between 1 and 25 ngE2-EQ/L, excepted at Louis Fargue station . The highest value was observed for Saltgourde station. Cargouët et al., (2004) reported same level of *in vitro* estrogenic activities in different urban effluents (*i.e.* 2-24 ngE2-EQ/L). Regarding influents, values were between 83 ngE2-EQ/L and 362 ngE2-EQ/L. Excepted to four WWTPs, the measured activities were in agreement with values reported in different influents of WWTPs which ranged between 15 to 169 ngE2-EQ/L (measured using MELN cell line) (Bellet et al., 2012; Jugan et al., 2009; Muller et al., 2008).

Concerning MDA-kb2 assay, cells express both glucocorticoid and androgenic activities. An increased of luciferase activity more than 100% in cell was the result of GR ligands (Wilson et al., 2002b). In our study, induction of luciferase did not exceed 100 % transactivation, suggesting that extracts samples of WWTP influent and effluent samples contained a majority of agonist ligands of androgen receptor or antagonist ligands of glucocorticoid receptor. However, the existence of glucocorticoid ligands in samples could not totally refuted because other ligands could mask the effect of the glucocorticoid ligands by competitive binding (Kemppainen and Wilson, 1996). Thus, MDA-kb2 cell response characterized as androgen/glucocorticoid activities. Measured androgen/glucocorticoid activities in influents ranged from 190 ngDHT-EQ/L (Le Havre station) to 653 ngDHT-EQ/L (Tancarville station), excepted for Elbeuf station at 1510 ngDHT-EQ/L. For effluent, biological toxic-equivalents between 2 ngDHT-EQ/L and 36 ngDHT-EQ/L (Fig 2 B). Androgen/glucocorticoid activity was less documented than estogenic activity in literature especially with the used of MDA-kb2 cells and DHT as reference standard. Bellet et al (2012) reported androgenic activities in influents of 6 French WWTPs ranging from 40 to 254 ngR1881-EQ/L. These values gives an indication on measured activities in other sites but cannot be directly compare to our results. In addition to cell lines used, it is difficult to compare biological activities of influent between different studies because concentration of EDCs depend on many parameters. The first could be the capacity of sewage treatment plants and the sampling. In our study, WWTPs which shows the higher activities count less than 120 000 inhabitant-equivalent and were studied by a grab sampling. Teerlink et al (2012)

observed a variability of the concentrations of different organic contaminants depending on hours of sampling for small sewershed. The higher sewershed allows buffering the concentration peaks. They concluded that concentrations of pollutants were inversely related to sewershed scale (Teerlink et al., 2012). In addition to daily variations and area, many authors reported the effect of season on the *in vitro* observed activity (Jálová et al., 2013; Muller et al., 2008). Jugan et al (2009) observed during a campaign of 7 weeks, variation values ranging from simple to triple in a same influent of WWTP without explanation.

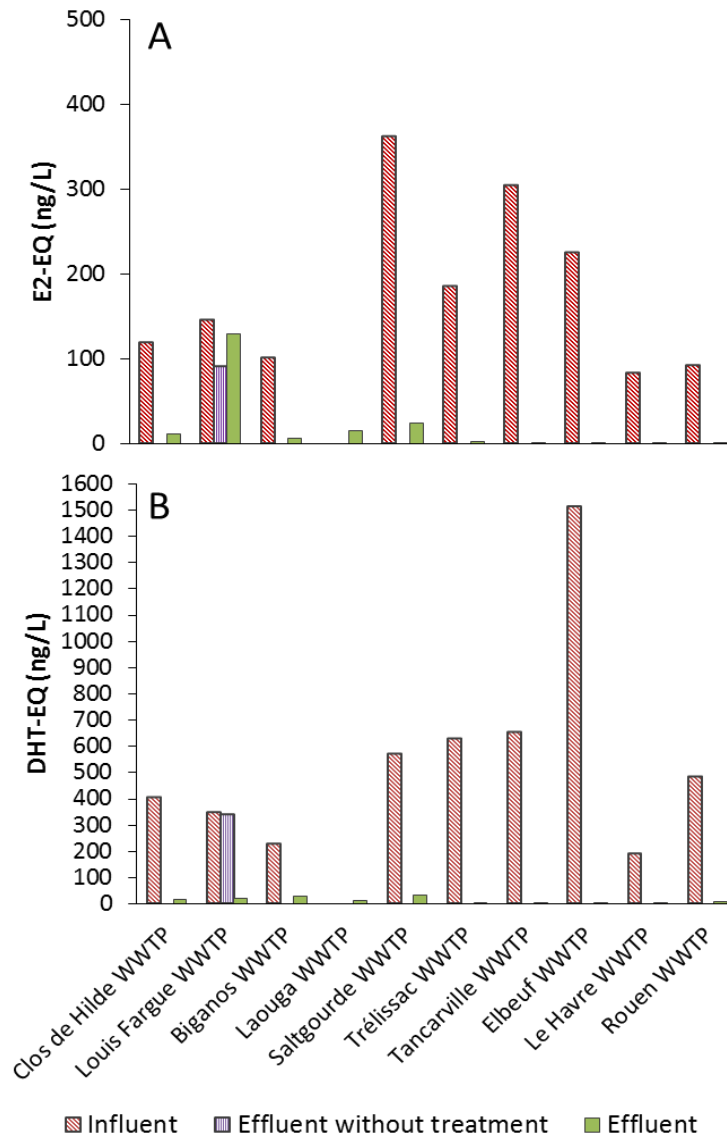


Fig 2 : Measured estrogenic (A) and androgen/glucocorticoid (B) activities in different WWTPs. Estrogenic activity was determined using MELN cells and androgen/glucocorticoid activities using MDA-kb2 cells.

Parallel to MDA-kb2 assays, the androgenic activities of several WWTPs were screened using a specific cell, HELN-hAR, which expressed only the receptor of androgens (Fig 3). These tests allowed confirming the androgenic activity of influents of WWTPs, excepted for Biganos site. The research of anti-androgenic activity was also performed on WWTP extracts using co-exposure of the MDA-kb2 cells to both WWTP extracts and 0.1 nM DHT (Aït-Aïssa et al., 2010). No anti-androgenic activity was detected in WWTP extracts. However, a suspected response was observed in the influent sample of Tancarville station, suggesting the presence of antagonist ligands. This information was refuted by MTT assay bringing out a cytotoxicity (data not shown). The no detection of androgenic activity in our samples suggested the presence of agonist ligands only or a mixture of agonist and antagonist compounds with a higher level of agonists. Indeed, Weiss et al., (2009) reported the existence of antagonist ligands in wastewaters sample. Antagonist compounds could be shown by a fractionation process of WWTP extracts.

In addition to estrogenic and androgenic/glucocorticoid activities, other biological activities were screened as a complementary issue. Anti-mineralocorticoid, anti-glucocorticoid and anti-progestagenic activities were assessed and observed in tested WWTP samples (Fig 3, except anti-PR activity; data not shown). Bellet et al., (2012) obtained similar results on 6 influents of WWTP. They detected anti-mineralocorticoid, anti-glucocorticoid and anti-progestagenic activities caused by different compounds among them testosterone, dihydrotestosterone, 5 β -androstane-17 β -ol-3-one and pregnenolone. Moreover in our study, ligands of aryl hydrocarbon receptor were searched in wastewater extracts. An induction of EROD activity was observed at 4 h of incubation but disappeared after 24 h of exposition (SI Fig 1). These results showed that activities of compounds were degradable by PLHC-1 cells suggesting the presence of metabolizable molecules like polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (Louiz et al., 2008). However, due to their physico-chemical properties, these non-polar contaminants are more likely to be encountered in sludge or particulate phase than in the dissolved phase. Thibaut and Porte (2008) reported the induction of EROD activity in PLHC-1 cells at 6 h of exposition by various pharmaceuticals often detected in wastewaters (*e.g.* fenofibrate, clofibrate, ibuprofen, naproxen, fluoxetine...). And this response disappears for tested concentration at 12 h of exposition suggesting a rapid metabolization of these chemicals (Thibaut and Porte, 2008). The presence of these compounds in our samples have not been searched yet. But many projects of research in France (*e.g.* Etiage, MedSeine, ToxSTEP), based on routine chemical analyses of drugs in influent and effluent of WWTPs, showed that these molecules are frequently detected in our sites of study (EPOC-LPTC, personal communication, Aminot et al, in preparation).

Regardless bioassays, the comparison of activities between influents and effluents of WWTPs indicated that activities were maintained, although reduced, after treatment process. The assessment of *in vitro* activities revealed that the studied sewage treatment plants could remove partially the active compounds. In addition to the elimination of molecules, it cannot also be ruled out that the sewage treatment processes could be generate transformation products contributing to observed activities (Farré et al., 2008).

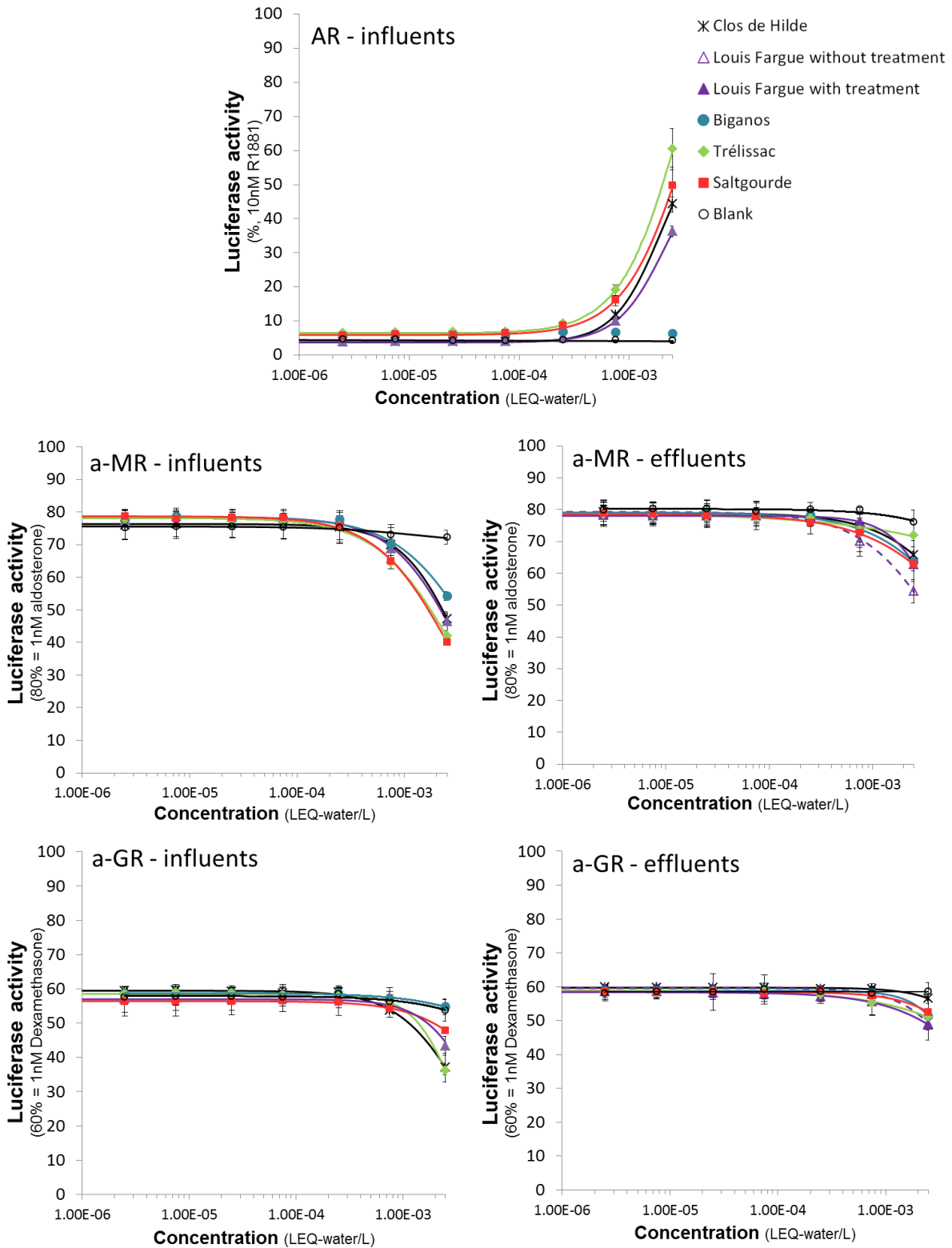


Fig 3 : Dose-response curves of specific androgenic, anti-mineralocorticoid and anti-glucocorticoid activities of five influents and effluents of WWTPs respectively expressed as percentage of luciferase activity induced by 10 nM R1881, 1 nM aldosterone and 1 nM dexamethasone. Activities were obtained on HELN hAR, HG5LN-hGR, HG5LN-hMR, respectively. Effluents of investigated WWTPs did not exhibit androgenic activity on HELN hAR cell lines. Error bars represent the standard deviation (n=3). No transactivations were observed for procedural blanks.

Steroids screening in sewage treatment plant extracts

Steroid-like natural or synthetic hormones were often reported as ligands of bioassays (*i.e.* ER, AR/GR, a-GR, a-MR, a-PR) in WWTPs (Chang et al., 2007; Van Der Linden et al., 2008; Bellet et al., 2012; Creusot et al., 2014). In order to identify compounds responsible for these activities, Clos de Hilde site was used for a further investigation. This sewage treatment plant was chosen because it represents a typical French urban WWTP and for pragmatic reasons (*e.g.* geographically close, ease of sampling...). A campaign was performed in January 2013 to obtain a sufficient quantity of extract for further experiments. Estrogenic, androgenic/glucocorticoid and pregnane activities determined on the sample were checked (Table 3). The androgenic/glucocorticoid activity was in the same range of magnitude than during the first campaign. On the other hand, estrogenic activity of the influent was slightly lower in the second campaign. In comparison to the estrogenic and androgen/glucocorticoid activities of influent, effluent had values around ten times lower. Concerning pregnane X activity, it was detected in influent. For effluent, a very lower response was observed that can not be quantified because transactivation was less than 20 %.

Table 2 : Concentrations of detected steroids and their relative equivalent potency. contribution to activities. The Bio-TEQ of estrogen and androgen activities are measured based on average value n=2.

Detected compounds	Chemical concentration (ng/L)		REP values		
	Influent	Effluent	ER (MELN)	AR (MDA-kb2) ¹	PXR (HG5LNhPXR) ²
			Estradiol (EC20=0.002nM)	DHT (EC50=0.15nM)	SR12813 (EC20=19nM)
Estriol	204	<LQ	0.17	-	-
17β-Estradiol	16	<LQ	1	-	4.3E-05
Estrone	77	<LQ	0.2	-	3.2E-05
17α-Ethinylestradiol	<LQ	<LQ	0.93	-	2.4E-05
Cortisone	84	<LQ	na	na	na
4-Androstene-3,17-dione	761	<LQ	9.70E-07	3.80E-03	na
Testosterone	89	<LQ	na	0.38	na
Pregnenolone	2662	<LQ	1.10E-05	na	2.40E-03
Progesterone	30	<LQ	7.50E-07	na	na

REP: Relative Equivalent Potency of standard compound, ER: Estrogen Receptor, AR : Androgen Receptor, PXR: Pregnane X Receptor, DHT: Dihydrotestosterone, SR 12813: Tetraethyl 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)ethenyl-1,1-bisphosphonate, *nd*: no detected, *na*: non active, “-“: no information ¹Ait-Aïssa et al., 2010, ²Creusot et al., 2014

A target chemical analysis based on steroid detection was performed on Clos de Hilde wastewater extracts in an attempt to find compounds responsible for observed activities. In total, 9 hormones were detected in the influent of WWTP at concentration ranging from 16 ng/L for 17 β -estradiol at 2662 ng/L for pregnenolone (Table 2). Unlike influent, no hormones were detected in effluent extract. Sewage treatment processes were reported to remove much of hormones like estrogens in WWTPs (Muller et al., 2008; Dagnino et al., 2009). Thus, the obtained result was no wonder. But considering the detected estrogen and androgen/glucocorticoid activities in effluent, the presence of steroids could be supposed especially because several authors detected steroid in effluent of WWTPs (Labadie and Budzinski, 2005; Muller et al., 2008; Fan et al., 2011; Bain et al., 2014). One explanation of not detected hormones in extract sample could be the limits of instrumental detection were higher than concentrations of molecules in effluent. A second one could be the presence of other EDCs contributing to biological observed activities. Regarding the influent sample, natural estrogens were detected and totally explained the observed estrogen activity (Table 3). This observation was in agreement with other studies (Desbrow et al., 1998; Snyder et al., 2001). But only 12 % of androgenic activity was due to detected hormones namely testosterone and 4-androstene-3,17-dione. Concerning pregnane X activity, agonist ligands of estrogen receptor induce an activation of pregnane X receptor. Mnif et al., (2007) reported that the PXR activity could be linked to estrogenic activity by same ligands. Detected hormones did not explain much the observed activity. However, It is important to keep in mind that the contribution of compounds to biological response based only on the additivity phenomena between molecules not taking into account synergism phenomena. Consequently, a poor estimation could be carry out on the explanation of activities (Kaisarevic et al., 2009).

Table 3 : Contribution of detected steroids to activities using Mass Balance Analysis. The Bio-TEQ of estrogen and androgen activities are measured based on average value (n=2).

	Influent	Effluent
<i>Estrogen activity</i>		
Σ Chem-TEQ (ng/L)	65.7	<LQ
Bio-TEQ (ng E2-EQ/L) (n=2)	60 (\pm 7)	5.4 (\pm 1)
% Chem-TEQ/Bio-TEQ	110 %	-
<i>Androgen activity</i>		
Σ Chem-TEQ (ng/L)	36.2	<LQ
Bio-TEQ (ng DHT-EQ/L) (n=2)	310.6 (\pm 43)	21.3 (\pm 10)
% Chem-TEQ/Bio-TEQ	12%	-
<i>Pregnane X activity</i>		
Σ Chem-TEQ (ng/L)	0.013	<LQ
Bio-TEQ (μ g SR12813-EQ/L)	65.4	<LQ
% Chem-TEQ/Bio-TEQ	0.01%	-

Unlike first investigation, anti-mineralocorticoid and anti-progestagenic activities were not assessed during this second campaign. However, detected steroids like testosterone, 4-androstene-3,17-dione, pregnenolone and progesterone have been already reported as antagonist ligands of mineralocorticoid receptor and pregnenolone and testosterone as antagonist ligands of progestagen receptor (Bellet et al., 2012; Creusot et al., 2014). In addition to these compounds, the presence of cortisone was evident in influent. This compound is known to induce glucocorticoid activity (Chang et al., 2007; Schriks et al., 2010). The detection of these hormones of human origin is classically observed in municipal sewage treatment plants. Nevertheless, it was also reported that compounds other than steroids could contribute to these activities. Indeed, alkylphenols, bisphenols or pesticides are known to interact with the endocrine system and are commonly detected in WWTPs (Bester, 2007; Hamid and Eskicioglu, 2012; Molina-Molina et al., 2013).

Biological fractionation profil of influent and effluent of wastewater treatment plant

In an attempt to highlight active compounds, crude extracts were separated in 40 fractions using RP-HPLC. To check that activities of extracts were the same before and after the fractionation process, an aliquote of each fraction was pooled in a single vial in order to recreate the extract without fractionation step. Each collected fraction and total extracts were tested using estrogen, androgen/glucocorticoid and pregnane X receptors. An induction of luciferase was observed in total extract samples with or without fractionation step for all tested activities, excepted of pregnane X activity of effluent and androgenic/glucocorticoid activity of recreated effluent extract (Fig 4). However, a loss of response was measured on restored total extract compared to crude extract, showing a loss of agonist ligands of estrogen and pregnane X receptor during fractionation process (Fig 4). In contrast, a same cell response was observed between extracts with or without fractionation step for androgenic/glucocorticoid activity (Fig 4). Losses of activities after fractionation process is commonly reported in literature (Brack and Schirmer, 2003; Brack et al., 2005b;). The sample preparation, the injection in HPLC system, evaporation, transfer to another vial are examples of steps which lead to losses of the compounds.

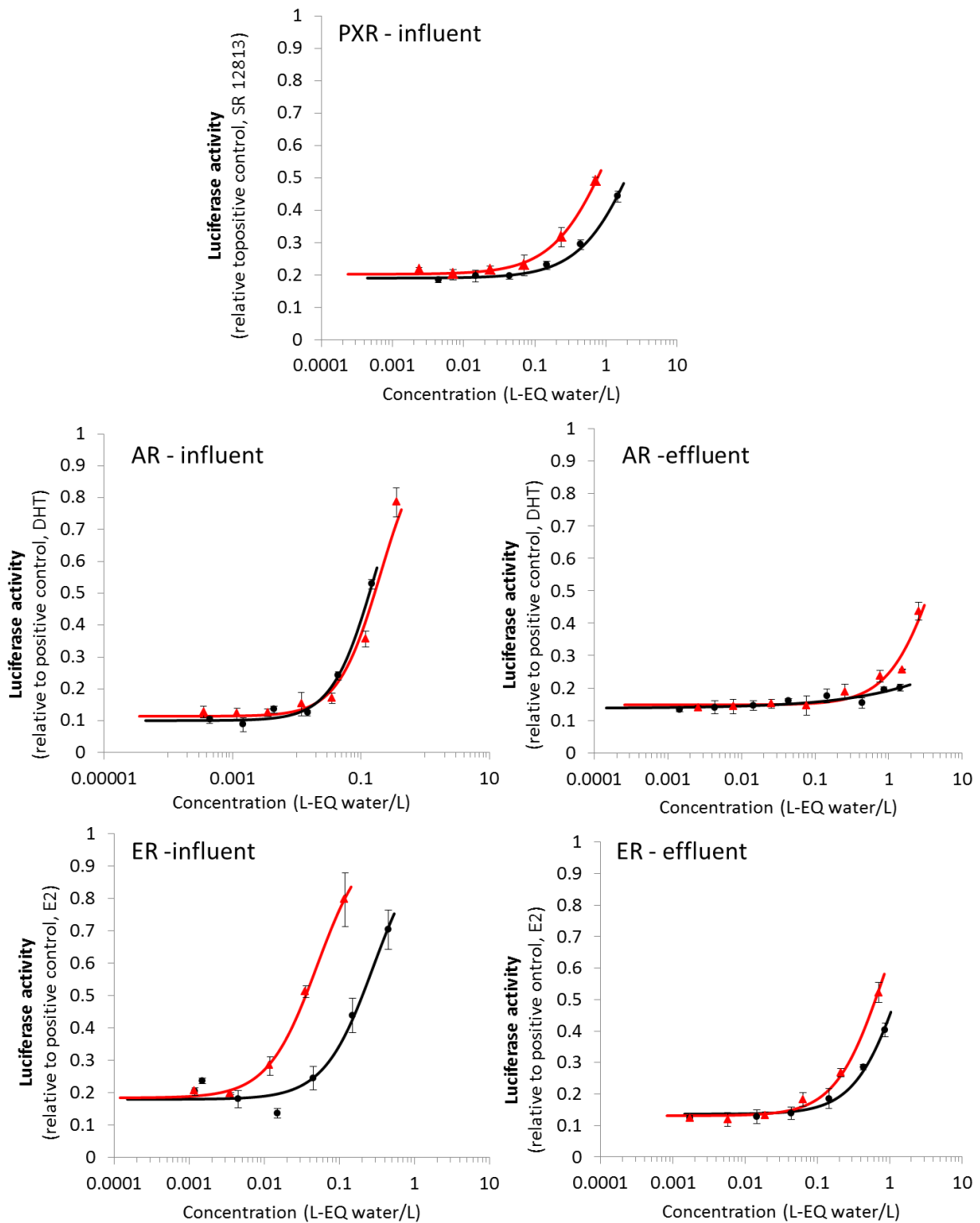


Fig 4 : Dose-response curves of pregnane X, androgenic/glucocorticoid and estrogenic activities of influent and effluent of Clos de Hilde WWTP respectively expressed by percentage of luciferase activity induced by 0.3 μ M SR 12813, 10 nM dihydrotestosterone (DHT) and 10 nM estradiol (E2). Activities were obtained on HG5LN-hPXR, MDA-kb2 and MELN respectively. No pregnane X activity was detected in effluent extract. Points represent reconstituted extract after fractionation and triangles the crude extract without fractionation process; error bars represent the standard deviation (n=3). No transactivations were obtained for procedural blanks.

As regard pregnane X activity, the recreated extract of influent after fractionation induced a response of exposed cells but no fraction induced a biological effect. This result suggested the presence effect of mixture compounds, namely cocktail effects (data not shown). The size of binding pocket of this receptor would be an explanation. Indeed, it has been reported that pregnane X receptor can catch various compounds in a same pocket (Le Maire et al., 2010). The presence of pregnane X activity induced by cocktail effect was also noticed in sludge of wastewater treatment plants (Gardia-Parège et al, in preparation, article n°3). Indeed, no pregnane X activity was measured in effluent showing the removal of ligands by treatment process. However, a total efficiency is unlikely. It may be led to think that the compounds responsible for this activity migrated of dissolved compartment to the solid phase and could be find in sludge for example. In order to identify synergist compounds, it might be possible to use PXR-affinity column to separate ligands of other no active compounds in WWTP extracts (Dagnino et al., 2014). This approach is a promising way requiring a new investigation.

Biological profiles of the fractionation for androgenic/glucocorticoid and estrogenic activities are given in Fig 5. No activities were observed in procedural blank. For androgenic/glucocorticoid activities, four fractions namely F18, F23, F24, F31 showed an intensive response compare to the other fractions. In effluent, no fractions were actives (data not shown). This result was consistent with the no observed effect in reconstituted effluent. Some studies have demonstrated the presence of antagonist ligand of androgen receptor using fractionation step previously no detected in crude sample (Weiss et al., 2009). Following this information, screening of anti-androgenic activity was performed on each fraction of influent and effluent extracts of WWTP. No effect have been detected in all fractions. For estrogen activity, three fractions induced a cell response in the fractionationed influent and effluent of WWTP. A similarity between the biological profile of samples was observed concerning two fractions, F18 and F19, which showed an estrogenic activity (Fig 5). However, fractions of effluent were fewer active than fractions of influent confirming the efficiency of treatment process. In contrast, two fractions differed between the influent (F10) and F9 in effluent (F9). One explanation could be a possible presence of active molecules produced by the treatment process as transformation product. The second one was a modification of retention time of active compound(s) due to matrix effect.

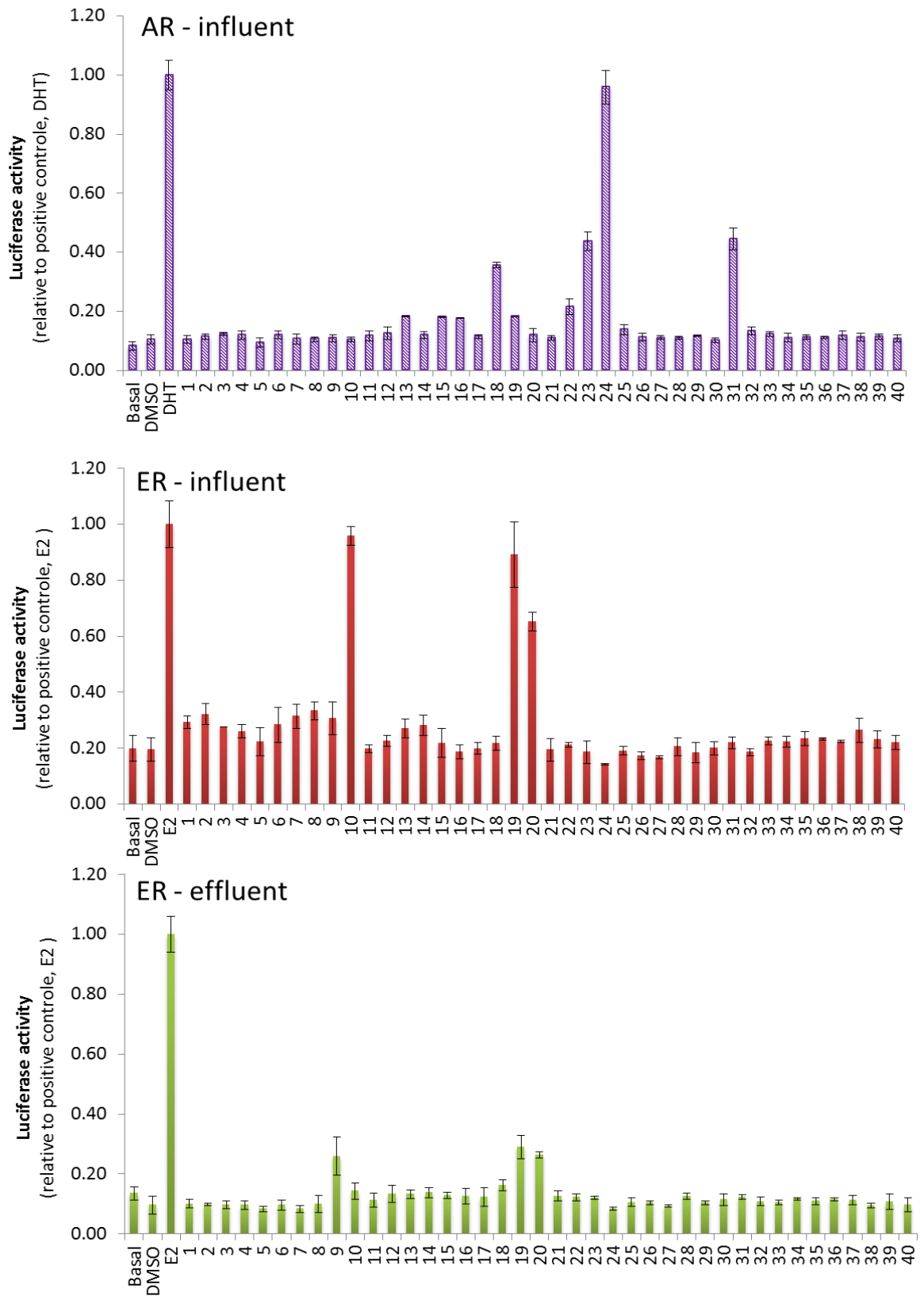


Fig 5 : Biological profil of androgenic/glucocorticoid and estrogenic activities of influent and effluent of Clos de Hilde’s WWTP; error bars represent the standard deviation (n=3). No androgenic/glucocorticoid activity was detected in effluent of WWTP.

Identification of compounds by non target chemical analysis

The identification of active molecules was performed by LC-QTOF-MS on the most active fractions namely F10, F19 and F24 of influent and F9 of effluent.

Suspected polymers

The analysis in positive ionization mode revealed the presence of fragments of polymers in the different fractions. These compounds were also identified in crude extracts of both influent and effluent with an intensity less marked in the effluent (Fig 6). Non target analysis of crude extracts showed a spreading of these polymers throughout the acquisition run by the chromatographic column (Fig 6). Consequently, the presence of fragments of molecules in each fraction was predictable given that the fractionation was carried out using RP-HPLC. The occurrence of these polymers were easily detectable due to the repeated loss of fragment 44,0262 m/z corresponding to $-[C_2H_4O]$ group from probably ethoxylate chain. Lara-Martín et al., (2011) reported the occurrence of same molecular patterns using LC-TOF-MS in influent and effluent of wastewaters (New York, USA) assigned to nonionic surfactant (nonylphenol ethoxylates, NPEO, and alcohol ethoxylates, AEO) and there degradation products (polyethylene glycols, PEG). It was also documented that homologue series like octylphenol ethoxylates (OPEO), or polypropyleneglycols (PPG) could be detected in environmental sample (Lara-Martín et al., 2011; Sabik et al., 2003; Terzic and Ahel, 2011). The structures of the mentioned compounds are given in Supporting Information Fig 2. In our study, an advanced identification was not possible in analysed fractions and also in crude extract. Indeed, analytical parameters were not optimized for these type of compounds because the aim was about making a non target analysis. And it was specified that a complete separation of these surfactants was impossible by conventional reverse-phase column (Lara-Martín et al., 2011). The suspected presence of polyethylene glycols could be mentioned in our investigation because of several adducts were generated that can be attributed to these polymers ($[M+NH_4]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$), in addition to $-[C_2H_4O]$ unit (SI Fig 3) (Thurman et al., 2014). The presence of these polyethoxylated products may mask other isotopic pattern of other compounds. The detection of these polymers in the raw and effluent extracts of WWTP was not surprising because these compounds are used in different fields such as cosmetics, pharmaceuticals, detergents, food, plastics which likely to end up in wastewaters. Different studies documented the presence of polyethoxylated molecules in various compartment of the aqueous ecosystem suggesting an ubiquiste behaviour of these compounds (Castillo and Barceló, 1999; Terzic and Ahel, 2011; Lara-Martín et al., 2014).

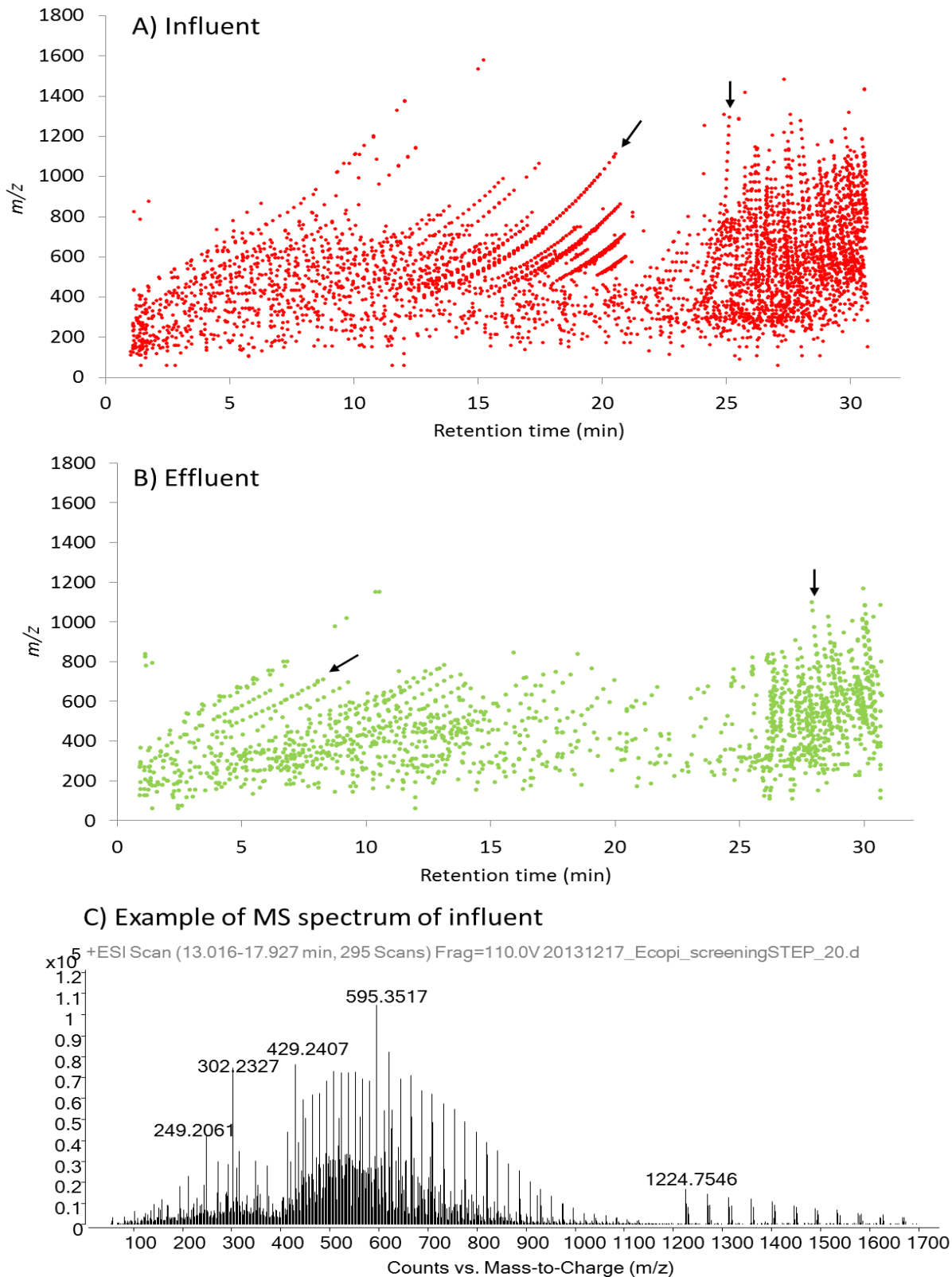


Fig 6 : Acquisition profiles of influent (A) and effluent (B) crude extract of Clos de Hilde's WWTP. Profil represents the mass-to-charge ratio of each extracted ion according its retention time. Arrows show an example of polymer and points of each arrows one ion. Spectrum (C) correspond to the isotopic pattern of multicharged polymers at retention times from 13 min to 18 min of the influent extract.

Recently, Lara-Martín et al. (2014) determined concentrations of various surfactants and their metabolites in influent and effluent of WWTP located in Long Island Sound (USA) to more than 20 µg/L and 0,1 µg/L, respectively, showing an efficiency of more than 95 % of treatment process but despite this, compounds were detected more than 70 km of New York city in sediment of the estuary. The same observation can be done for analyses performed in negative ionization mode. It could be also compounds with ethoxylated chains or alkylated chains. According to Lara-Martín et al. (2014, 2011), other surfactants and their degradate products may be detected in negative ionization mode (*e.g.* linear alkylbenzene sulfonates, LAS, nonylphenol ethoxycarboxylates, NPEC) and these polymers are frequently observed in aqueous ecosystem but in our study there identifications were not proven. Several mentioned polymers especially nonylphenol polyethoxylates are known to be EDCs (Jobling et al., 1996; Castillo and Barceló, 1999; Johnson and Sumpter, 2001). It will be interesting to continue the investigation on these compounds in order to confirm their identities using an other method an analytical column and to assess their contribution to the observed biological activities. Moreover, even if the polyethoxylate products possess a good removal rates from the dissolved phase, it does not mean that these polymers are completely degraded during the treatment process. They may be trapped in other compartments such as sludge (Johnson and Sumpter, 2001).

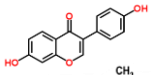
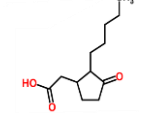
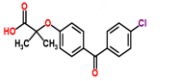
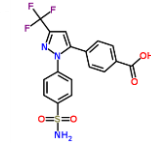
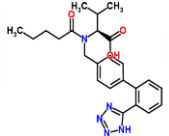
Drugs, metabolites, phytoestrogens, fatty acid and bile salts as detected compounds

In samples analyzed in negative ionization mode, these polymers were less present than in positive ionization mode, allowing the detection of other classes of molecules. The identification was focused on the most active fractions namely F10, F19 and F24 of influent and F9 of effluent. Our data processing strategy allowed generating a list of compounds in each analysed fraction (Table 4).

In total, 8 molecules including drugs, their metabolites, phytoestrogens, fatty acid and biliary metabolites were identified in the different fractions of the influent and confirmed using analytical standard. The majority of these compounds (*i.e.* daidzein, fenofibric acid, celecoxib carboxylic acid, valsartan, chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid) were also detected in the fraction of effluent but with a lower peak intensity than in the influent fractions suggesting a partial efficiency of treatment process, excepted for fenofibric acid (more intensive). Concerning the fraction F9 of effluent extract, estrogenic ligands produced by the treatment process were suspected in this fraction because the fraction F9 of influent extract was not active. To date, the data processing of obtained chromatogram for these fraction did not allowed identification of compound produced by treatment process.

In an attempt to assess the activity of confirmed molecules when available, pure standard of each compounds excepted fenofibric acid, dihydrojasmonic acid and chenodeoxycholic acid were tested on MELN and MDA-kb2 cells lines in order to check their estrogenic, androgenic/glucocorticoid and anti-androgenic activities. As expected, daidzein induced an estrogenic response (Fig 7). Its relative equivalent potency was determined at $5.53E^{-5}$.

Table 4 : List of compounds confirmed by match standard in different fractions of WWTP extracts using LC-QTOF-MS

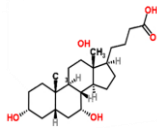
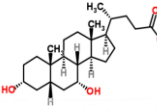
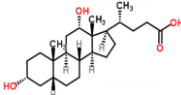
Fraction	Sample	Compound name	Chemical structure	Rt* (min)	Molecular formula	ion species	m/z*	Measured monoisotopic mass* (Da)	Theoretical monoisotopic mass* (Da)	Diff* (ppm)	Activity	Log Kow**	CAS number	Description
F10/F9	Influent/Effluent	Daidzein		9.8	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M-H] ⁻	253.0506	254.0581	254.0579	-0.94	Estrogenic (REP = 5.53E ⁻⁵)	2.55	486-66-8	Phytoestrogen
F10	Influent/Effluent	Dihydrojasmonic acid		11.2	C ₁₂ H ₂₀ O ₃	[M-H] ⁻	211.1340	212.1416	212.1412	-1.48	nd	2.69	3572-64-3	Fatty acid belongs to the family of plant hormone, the jasmonate
F10/F9	Influent/Effluent	Fenofibric acid		12.7	C ₁₇ H ₁₅ ClO ₄	[M-H] ⁻	317.0587	318.0659	318.0658	0.17	nd	4	42017-89-0	Lipid regulating agent, active form of drug, fenofibrate
F10	Influent/Effluent	Celecoxib carboxylic acid		12.8	C ₁₇ H ₁₂ F ₃ N ₃ O ₄ S	[M-H] ⁻	410.0428	411.0504	411.0501	-0.87	na	2.81	170571-01-4	Metabolite of anti-inflammatory drug, celecoxib
F10	Influent/Effluent	Valsartan		14.3	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃	[M-H] ⁻	434.2208	435.2281	435.2270	-2.53	na	3.65	137862-53-4	Anti-hypertensive drug belongs to the family of angiotensin II inhibitors

nd: no determined, na: no active on tested bioassays (MELN and MDA-kb2 cell lines)

*value obtained in fraction of influent

**Estimate value based on KOWWIN v1.67 estimate from database Chemspider : <http://www.chemspider.com>.

Table 4 (continued)

Fraction	Sample	Compound name	Chemical structure	Rt (min)	Molecular formula	ion species	m/z*	Measured monoisotopic mass* (Da)	Theoretical monoisotopic mass* (Da)	Diff* (ppm)	Activity	Log Kow*	CAS number	Description
F19	Influent	Cholic acid		20	C ₂₄ H ₄₀ O ₅	[M-H] ⁻	407.2812	408.2885	408.2876	-2.28	na	3.52	81-25-4	Bile salt derived to cholesterol
F24	Influent/Effluent	Chenodeoxycholic acid		24.6	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	[M-H] ⁻	391.2854	392.2917	392.2927	2.47	nd	5.06	474-25-9	Bile salt derived to cholesterol
F24	Influent/Effluent	Deoxycholic acid		24.8	C ₂₄ H ₄₀ O ₄	[M-H] ⁻	391.2854	392.2920	392.2927	1.57	na	5.06	83-44-3	Bile salt derived to cholesterol

nd: no determined, na: no active on tested bioassays (MELN and MDA-kb2 cell lines)

*value obtained in fraction of influent

**Estimate value based on KOWWIN v1.67 estimate from database Chemspider : <http://www.chemspider.com>.

The estrogenic potency of daidzein and other flavonoids was previously reported in various studies and reviews (Kuiper et al., 1998; Escande et al., 2006; Hamid and Eskicioglu, 2012; Liu et al., 2010). The ER activity of daidzein was less than other reference ligands like estradiol or bisphenol A. Rearick et al., (2014) showed that daidzein affects the reproduction (*i.e.* eggs production) of adult female minnows at concentration of 1 µg/L. The damages were generally more subtle for other measured parameters like body condition factor, liver and gonadal tissue indexes, vitellogenin induction. The detection of phytoestrogens was frequently observed in raw sewage at concentration ranging from some µg/L in influent to ng/L in effluent (Kang and Price, 2009; Liu et al., 2010; Rearick et al., 2014). A high concentration of daidzein, 49200 ng/L, was measured in Japan river linked to food and wood pulp factories (Kawanishi et al., 2004). In addition to industries, human urine is the principal source of flavonoids in water ecosystem. Liu et al., (2010) reported data about daily excretion of phytoestrogens by humans. The concentration of daidzein excreted by human per day can set up 5 mg/day following diet. In comparison to human hormones like estrogens, this phytoestrogen are excreted about 86 times higher than estrone (Liu et al., 2010). Phytoestrogen were degraded rapidly in ecosystem but these compounds may be pseudo-persistent by their constant release (Kelly et al., 2014).

In addition to daidzein, a natural plant fatty acid was also identified namely dihydrojasmonic acid. This molecule is involved by plants in growth regulating and could be also a microbial derivative of jasmonate compounds (Meyer et al., 1989; Miersch et al., 1999, 1989). To our knowledge, its potential of endocrine disrupting compound is not reported. However, several authors showed an *in vivo* effect (*e.g.* anti-inflammatory action) on murine macrophage cells of various derivatives of jasmonate, without studied the activity dihydrojasmonic acid (Dang et al., 2012, 2008). In our study, the assessment of its *in vitro* activities could not be performed during the period assigned to the project due to a lack of time. Therefore, the estimation of the biological effect of dihydrojasmonic acid on our bioassays needs a further investigation.

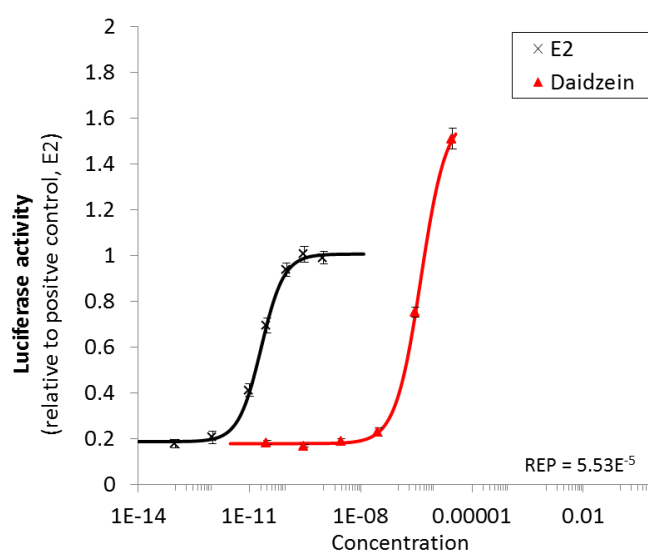


Fig 7 : Dose-response curves of daidzein and reference ligand estradiol in MELN cell lines.

Human endogen compounds as bile salts were also detected in active fractions, F19 and F24 (Table 4). Cholic acid, deoxycholic acid and chenodeoxycholic acid are biliary derivatives of cholesterol which plays an essential role in the absorption of lipid in the intestine. Studies reported the alteration of cell function or cytotoxicity caused by bile acids (Morgan et al., 2008). In addition to this proven toxicity, there was showed that various biliary derivatives could induce PXR (Goodwin et al., 2003). Sebök et al. (2008) quantified the presence of cholic acid and their derivatives at the concentration of 4 µg/L in Danube River and around 200 µg/L in influent of WWTP. Other bile salts were measured at 2µg/L in river associated to suspended particules (Elhmmali et al., 2000). These compounds could be used as a biomarker detection for faecal contamination for Water Framework Directive, in addition to biological biomarker like bacteria *Escherichia coli*, especially for the identification of source of pollution (Elhmmali et al., 1997; Elhmmali et al., 2000; Bull et al., 2002;).

In the present study, other compounds were identified like metabolites of drugs as celecoxib carboxylic acid and fenofibric acid and drug like valsartan in F10 of influent. Celecoxib carboxylic acid and valsartan showed no estrogenic or androgenic/glucocorticoid activities or antagonist androgenic effect. Although celecoxib carboxylic acid is widely known to be the major metabolite of celecoxib (Paulson et al., 2000; Baranczewski et al., 2006), its detection in the aquatic environment has not been reported, to our knowledge. On the contrary, the presence of valsartan and fenofibric acid in sewage treatment plant were frequently reported (Ternes, 1998; Rosal et al., 2010; Unceta et al., 2010; Escher et al., 2011; Kostich et al., 2014). The presence of valsartan in WWTP seemed relatively considerable because this anti-hypertensive molecule has been detected in 40 of 41 effluent samples in USA at an average concentration of 1.6 µg/L (Kostich et al., 2014). The Predicted No Effect Concentration (PNEC) of valsartan on green algae test is to 27 µg/L (Escher et al., 2011). To our knowledge, this concentration has not been encountered in the environment. However, biological damages on other aquatic organisms is not excluded at concentration lower than PNEC. Therefore, it is highly desirable to assess more accurately the environmental damage of valsartan mainly that a recent study proved that it has the capacity to bioaccumulate in a benthic species (*Erpobdella octoculata*) and thus enter the food chain (Grabicova et al., 2014). Concerning fenofibric acid, authors reported its biological impacts on adult and larvae fish, alone and in mixture with other pharmaceutical compounds, like carbamazepine, propranolol hydrochloride, sulfamethoxazole and trimethoprim, frequently detected in WWTPs (Madureira et al., 2012, 2011). In addition to an higher hepatocellular metabolic activity, increase of vitellogenin has been also observed in male adult fish exposed to fenofibric acid suggesting an action of this compound on endocrine system (Madureira et al., 2012). This metabolite is produced by hydrolyse of fenofibrate and fenofibric acid is excreted in its conjugated form via urine or faeces. Ternes, (1998) showed that deconjugation of the metabolite could occur during the treatment process of sewage treatment plant, resulting in an increase of concentration in effluent and thus higher levels released in aqueous environment than those detected in influent of WWTP. Measured concentration reported in Clos de Hilde station were higher than 6µg/L in influent, 2µg/l in effluent and 25 ng/L in receive

environnement (Garonne estuary) (Aminot et al., in preparation) Therefore, the presence of fenofibric acid represents a risk to the environment and it is highly desirable to document its concentration in the treatment plant discharges and in receiving environment like rivers, estuaries.

CONCLUSION

In this study, the release of endocrine disrupting compounds by WWTP were assessed in different French WWTP. In addition to classical estrogenic activity, androgenic/glucocorticoid, anti-glucocorticoid, anti-mineralocorticoid, anti-progestagenic, pregnane X and dioxin-like activities were observed in influent and several effluents of the studied sites showing that treatment process currently implemented are not totally efficient. To date, other complementary treatments must be created to improve the removal of EDCs like for example filtration of effluent on activated charcoal. A part of these observed activities could be explained by natural steroids detected by target chemical analysis. Estrone, estradiol and estriol contributed mainly to estrogenic activity and testosterone and 4-androstene-3,17-dione to androgenic activity. Considering the thousands of compounds present in crude extracts, EDA allowed to simplify samples focusing only on the active fractions and so to simplify the EDCs identification process. This approach combined to LC-QTOF-MS allowed establishing a list of 8 non-target compounds composed of drugs, their metabolites, phytoestrogen, fatty acid and biliary salts. Only daidzein was confirmed as an agonist ligand of estrogen receptor. Other identified molecules tested on bioassays did not induce effects. Moreover, all detected molecules by LC-QTOF-MS are released in aquatic environment but not searched by routine chemical analysis. In addition to pharmaceutical compounds which are a classical family research in WWTP, we have demonstrated the presence of metabolites drugs like fenofibric acid or celecoxib carboxylic acid and various human endogenous compounds like bile salts (cholic acid, chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid) or natural molecule like daidzein and dihydrojasmonic acid. Their presence in ecosystem are not devoid of interest and studies on human urine could allow a better understanding of their presence in sewage treatment plants and their possible effects on wildlife.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Hélène Budzinski

Phone: +33 540 006 998 ; fax +33 540 002 267; e-mail h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr

ACKNOWLEDGMENTS

The French Ministry of Ecology, Sustainable Development and Energy, the Aquitaine Region and the European Union (CPER A2E project, ECOPI project) are acknowledged for their financial support. Europe is moving in Aquitaine with the European Regional Development Fund. Moreover, this study has been carried out with financial support from the “Programme national de recherche Environnement-Santé Travail” (PNR EST, ToxSTEP project) and the public interest group Seine-Aval (Medseine project), in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45). The authors also thank Lyonnais des Eaux for access to WWTP.

SUPPORTING INFORMATIONS

Table 1 : List of steroids and surrogate standards.

	Compounds	Quantification transition	Collision energy (V)	Confirmation transition	Collision energy (V)	Cone or fragmentor voltage (V)
UPLC-MS/MS (Waters)	11-cetotestosterone	303.2>121	25	303.2>259.3	23	28
	17 α -ethynylestradiol-d4	283.3>134.9	20			25
	17 β -estradiol-d4	259.2>160.9	22			25
	11 α -hydroxyprogesterone	331.3>109	30	331.3>96.9	25	35
	17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogesterone	333.2>96.9	28	333.2>108.9	35	35
	17 α -hydroxypregnenolone	315.3>297.3	10	315.3>159.1	25	15
	17 α -hydroxyprogesterone	331.3>109	30	331.3>96.9	25	35
	4-androstene-3,17-dione	287.2>96.8	22	287.2>108.9	25	35
	5 α -dihydrotestosterone	291.2>159.1	20	291.2>255.2	22	15
	6 α -methyl-prednisolone	375.3>357.3	10	375.3>161.2	20	18
	canrenone	341.2>107.1	30	341.2>187.1	20	35
	cortisone	361.3>163.1	25	361.3>121	28	40
	dexamethasone	393.3>373.3	8	393.3>355.2	10	15
	DHA	289.3>271.4	15	289.3>253	17	28
	DHEA	271.1>253.2	15	271.1>159	22	20
	estrone-d4	275.2>257.3	15			25
	hydrocortisone	363.2>121.1	30	363.2>97.1	25	30
	levonorgestrel	313.3>108.8	30	313.3>90.8	40	30
	mestranol	293.2>173	20	293.2>146.9	20	30
	norethindrone	299.2>109	28	299.2>90.8	40	35
	norgestimate	370.2>124.1	35	370.2>91.1	50	50
	prednisolone	361.3>343.3	10	361.3>147.2	25	25
	prednisone	359.3>341.3	12	359.3>147.1	25	25
	pregnenolone	299.2>281.3	10	299.2>160.9	15	25
	progesterone	315.3>96.9	25	315.3>108.9	25	35
	progesterone d9	324.3>99.9	25			35
	spironolactone	341.2>107.1	30	341.2>187.1	20	35
	testosterone	289.2>96.2	22	289.2>108.8	25	32
testosterone-d3	292.2>96.9	23			35	
thiocolchicoside	564.2>402.2	22	564.2>360.3	35	35	
LC-MS/MS (Agilent technologies)	17 α -ethynylestradiol	295>145	52	295>143	60	380
	17 α -ethynylestradiol-d4	299>147	52			380
	17 β -estradiol	271>183.2	50	271>143	60	380
	17 β -estradiol-d4	275>147	50			380
	estriol	287.2>171	32	287.2>142.9	50	380
	estriol-d2	289.2>147	50			380
	estrone	269.1>145	45	269.1>142.9	60	380
	estrone-d4	273>147	45			380

DHEA : (3 β)-3-hydroxyandrost-5-en-17-one ;

DHA : 5 α -androstane-3,17-dione.

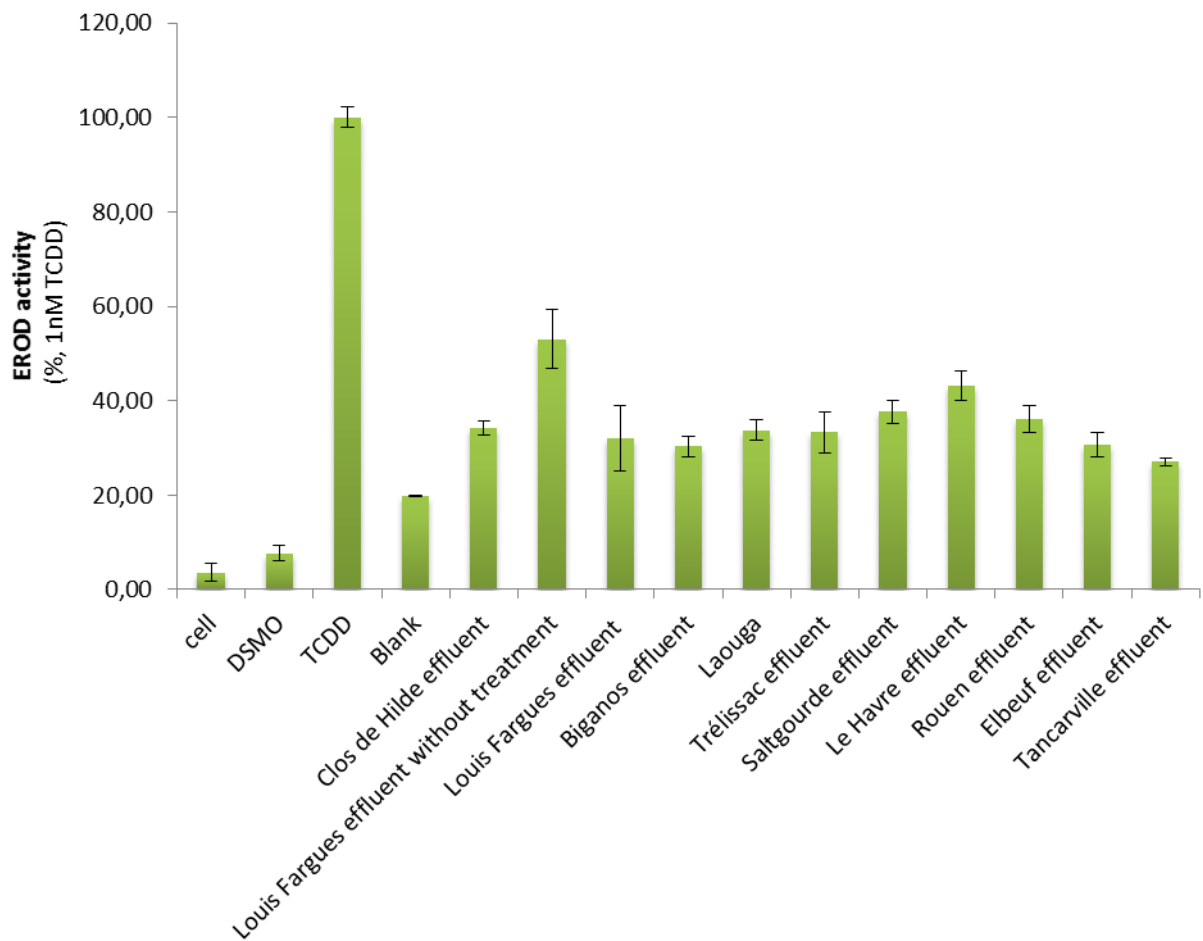


Fig 1 : Dioxin-like activity in effluent of studied WWTP expressed as percentage of EROD activity induced by 1 nM TCDD.

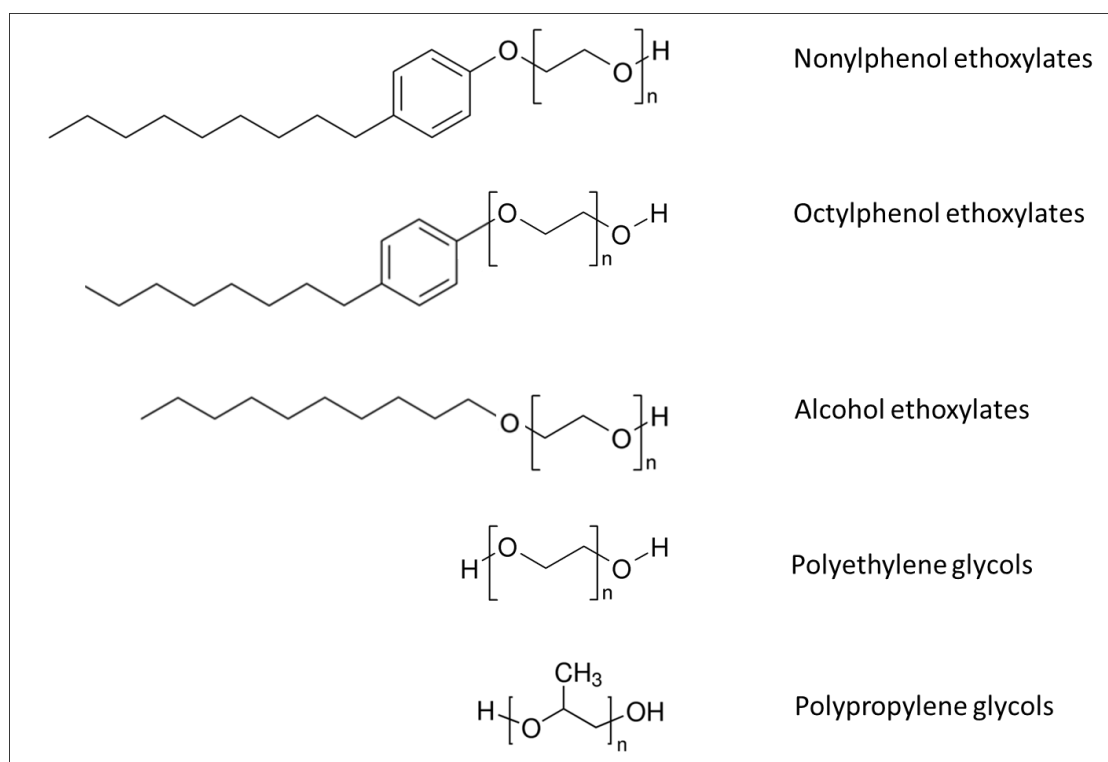


Fig 2 : Chemical structures of suspected polymers detected in crude extracts of influents and effluents of WWTPs using LC-QTOF-MS in positive ionization mode.

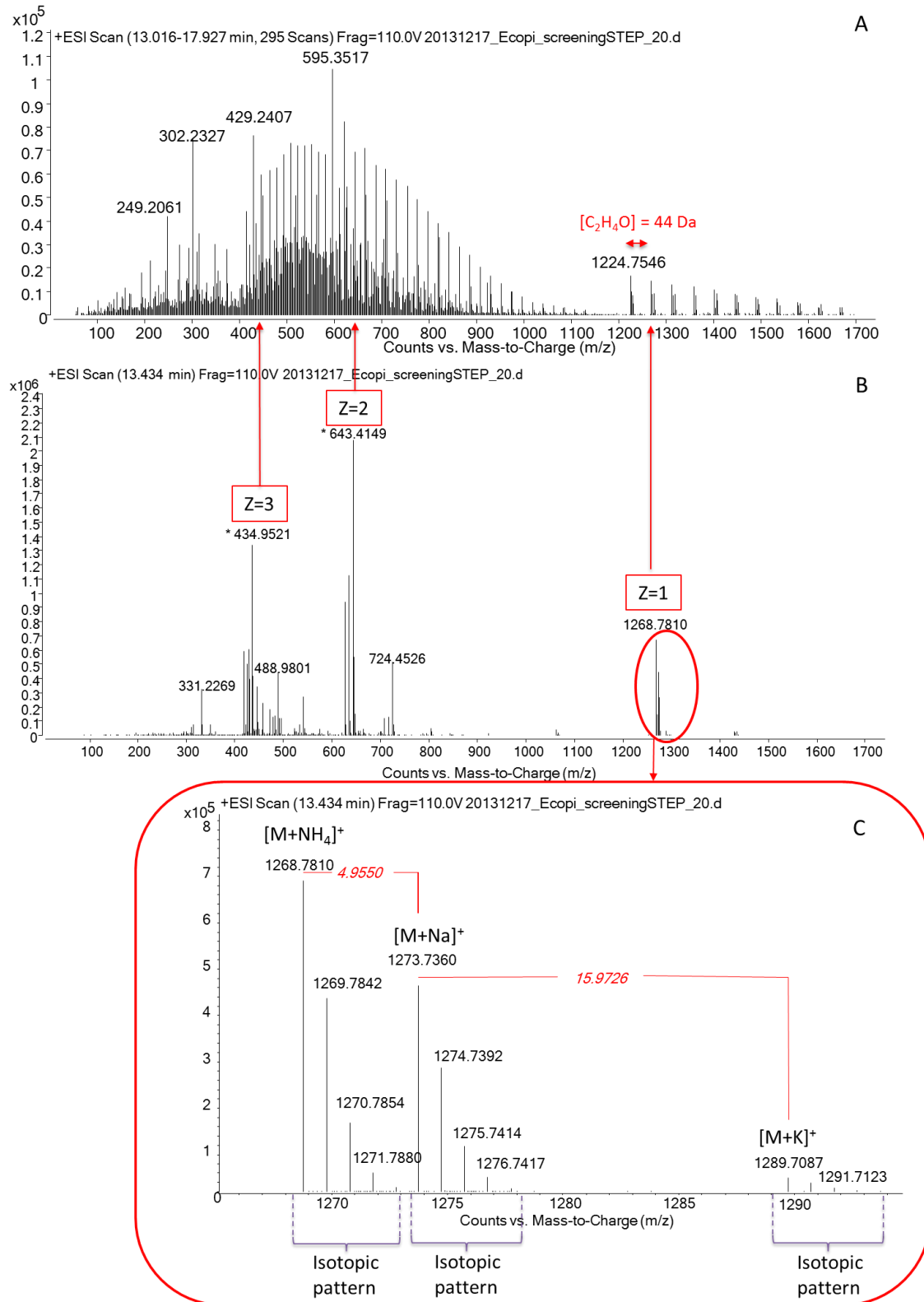


Fig 3 : Example of polymeric compound (polyethylene glycol) detected in crude influent extract. Illustration (A) correspond to MS spectrum ranging between 13 min to 18 min showing a 44 Da mass difference for each ethylene oxide unit loss. MS spectrum at one retention time (B) illustrates the occurrence of multicharged isotopic pattern with a zoom on monocharged isotopic patterns (C) showing the presence of different adducts (NH₄⁺, Na⁺ and K⁺).

Article n°2

High-resolution mass spectrometric identification of emerging pharmaceutical pollutants in a river impacted by an industrial effluent combining passive sampling and Effect-Directed Analysis

High-resolution mass spectrometric identification of emerging pharmaceutical pollutants in a river impacted by an industrial effluent combining passive sampling and effect-directed analysis

Caroline Gardia-Parège^a, Nicolas Creusot^b, Marie-Hélène Dévier^a, Patrick Mazellier^a, Sélim Aït-Aïssa^b, Hélène Budzinski^{a*}

^a Université de Bordeaux, EPOC / LPTC – UMR 5805 CNRS, F-33405 Talence cedex, France

^b *Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques* INERIS, Unité Écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, , Parc ALATA, BP2 F-60550 Verneuil-en-Halatte, France

* Corresponding author:

E-mail: h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr, phone +33 540 006 998, fax +33 540 002 267

ABSTRACT

The occurrence of endocrine disrupting compounds was previously detected in a French river impacted by an urban and a pharmaceutical wastewater treatment plants (WWTPs). Indeed, first investigations were conducted in surface water using polar organic compound integrative sampler (POCIS) at upstream and downstream of the WWTPs. The identification of 60 chemicals (pharmaceuticals, antibiotics and steroids) by targeted chemical analyses (LC-MS/MS) did not totally explain the activities. In order to isolate the active chemicals and to identify them, Effect-Directed Analysis approach was performed on POCIS crude extract. Several steroid compounds were detected by target analyses using LC-MS/MS and these chemicals explained the majority of observed activities in the selected fractions. For many highly active fractions, compounds responsible for these activities remained unknown. In this study, a LC-HRMS system (LC-QTOF-MS) was used to identify these active compounds. The procedure allowed the identification of several candidat molecules including drugs, steroids and some of their metabolites. The identification of some of them has been confirmed with purchased reference standards. Among them, desoximetasone was shown a strong glucocorticoid activity and allowed explaining the fraction activity.

Key words: Industrial wastewater effluents, polar organic compound integrative sampler (POCIS), effect-directed analysis (EDA), non-target and target chemical analysis (LC-MS/MS, LC-QTOF)

INTRODUCTION

The occurrence of endocrine disrupting compounds (EDCs) in environment is a proven fact. Their main source in aquatic ecosystem is wastewater effluent from anthropic activity (Ternes and Joss, 2006). Since 2009, several studies have been published on river impacted by effluents of industrial wastewater treatment plants (WWTPs). Authors have denounced very high levels of xenobiotics among them EDCs worrying to aquatic ecosystems (Gilbert, 2011). Due to their mechanisms of action, EDCs have effects on the wildlife and are a real environmental problem. Indeed, Sanchez et al., (2011) observed the occurrence of strong reproductive alterations among them gonad hypertrophy, spawning failure associated to intersex and vitellogenin induction in fish from French river located downstream from both pharmaceuticals and urban WWTP. Therefore, the research effort was focused on the detection and identification of xenobiotics compounds that can impact hormonal functions of organisms. To date, a battery of bioassays based on steroid receptors such as estrogen (ER) androgen (AR), glucocorticoid (GR), mineralocorticoid (MR) or progesterone receptors (PR) is available and allows screening various activities. Bioassays inform on biological activity but can not identify compounds responsible of the observed effect. Coupling biology to analytical chemistry allow overcoming this gap. However, environmental matrices are very complex samples. For example, waste water can contain more than ten thousand of compounds (Schwarzenbach et al., 2006). In an attempt to find among them biological active compounds, researchers need to possess a method to simplify the sample. Effect Directed Analysis (EDA) is a powerful tool to reduce the complexity of environmental mixtures to allow identifying chemicals linked to observed biological effect. The EDA method combines bioassays, fractionation procedures in order to select active compounds and chemical analytical methods to identify them (Brack, 2003; Weller, 2012).

In a previous study, we were applied this strategy to understand the cause of observed reproductive disrupters which impacted gudgeon in French river site. Investigations were conducted in surface water using polar organic compound integrative sampler (POCIS) upstream and two downstream sites of urban and pharmaceutical WWTPs (Creusot et al., 2014). Passive sampling methods provide representative information of the water quality over extended time periods in environment by the integration of concentration fluctuations (Vrana et al., 2005; Tapie et al., 2011; Belles et al., 2014). Toxicological profiling of samples was evaluated using a battery of biosensors based on luciferase gene reporter (6 bioassays used) allowing the specific and integrative detection of a wide range of active chemicals. Strong activities were found in POCIS extracts with stronger activities downstream from the pharmaceutical factory. A panel of 118 pharmaceuticals, antibiotics and steroids has been screened on POCIS extracts. However, the numerous detected compounds did not totally explain the biological activities. In order to identify them, POCIS crude extract was fractionated and each fraction was then tested individually on *in vitro* cells line. Target chemical analyses were performed on several fractions and this allowed confirming the strong contribution of several steroids compounds among them 6 α -methyl-prednisolone,

dexamethasone and spironolactone (Creusot et al., 2014). Unfortunately, for many strong active fractions, compounds responsible for these activities remained unknown.

The aim of the present study was to implement an identification strategy for detecting non targeted or unknown molecules. For that purpose, high resolution mass spectrometry more specifically liquid chromatography coupled to a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (LC-QTOF-MS) was used to identify the compounds causing the unexplained remaining activities.

MATERIELS AND METHODS

Chemicals and Reagents

POCIS samplers were prepared in the laboratory using Oasis Hydrophilic-Lipophilic Balanced bulk phase (60 μm) which was provided from Waters (Guyancourt, France) and polyethersulfone membranes (0.1 μm , 90 mm membrane diameter) which were purchased by VWR International (Fontenay-sous-Bois, France).

Methanol and acetonitrile from J.T. Baker with HPLC grade quality and dichloromethane were purchased by Atlantic Labo (Bruges, France) and Acros Organics (Noisy le Grand, France), respectively. Milli-Q grade water was prepared from a Milli-Q water purification system using an EDS-PAK filter (Millipore SA, Guyancourt, France). Formic acid (99 % purity) contained in 1 mL individual vial was supplied by Atlantic Labo (Bruges, France).

For biological test, dimethylsulfoxid (DMSO) was biological reagent grade quality and provided from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Flutamide and dexamethasone were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France), and R1881, aldosterone were a kind gift from Dr Patrick Balaguer (INSERM, France).

Analytical confirmation standards (>98% purity) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), Santa Cruz (Heidelberg, Allemagne and LGC standards (Molsheim, France).

Study Sites, POCIS preparation and its biological activities

The site of study and the sampling was previously reported in detail (Creusot et al., 2014; Sanchez et al., 2011). In the present study, only POCIS deployed from October 2009 over 28 days in French river at 1 km downstream of effluent discharges of a pharmaceutical industry and a urban WWTP, were investigated. All step of preparation process were previously described (Creusot et al., 2014).

Briefly, after exposure, compound caught in POCIS-sorbent were eluted with 10 mL dichloromethane, 10 mL dichloromethane /methanol mixture (50: 50, v/v) and 10 mL methanol. The extract was dried under N₂ flux (99,995 % purity, Linde gas, Bassens, France) and dissolved in 200 µL of methanol. A aliquot of this extract was fractionated in order to separated active compounds. The fractionation procedure was previously reported (Creusot et al., 2014, 2013). Quickly, POCIS extract was fractionated by Reverse Phase – High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) (Prostar series, Agilent, Les Ulis, France) using C18 column (Poursuit C18, 5 µm, 250 mm × 4,6 mm, Agilent, Les Ulis, France). The gradient used was from water/acetonitrile (80: 20, v/v) to 100% acetonitrile at a flow rate of 1 mL/min. 40 fractions (F1 to F40) were collected (each 3 min). The fractions were evaporated to dryness and reconstituted in acetonitrile for chemical analysis or in dimethylsulfoxid for biological tests.

In the previous study, all fraction were tested on 6 bioassays based on luciferase gene reporter for the detection of ligands of ER, AR/GR, PR, MR, PXR, and AhR with different cell lines, namely MELN, MDAkb2, HG5LN-hPR, HG5LN-hMR, HG5LN-hPXR, and PLHC-1 respectively (Creusot et al., 2014). In this present investigation, the study was focused on the unexplained activities observed in F15, F20 and F21 that is glucocorticoid and anti-mineralocorticoid activities with different cell lines, namely MDA-kb2 and HG5LN-hMR. MDA-kb2 was purchased from the American Type Culture Collection and HG5LN-hMR was kindly provided by Patrick Balaguer (INSERM, Montpellier, France). The description of cell culture conditions and protocols were previously described in detail (Bellet et al., 2012; Creusot et al., 2014; Kinani et al., 2010). Cells were seeded in 96-well white opaque culture plates (Greiner CellStar; Dutscher, Brumath, France) at a density of 1×10^5 cells per well. After 24 h, reference ligands and candidat compounds were introduced to cell plates in triplicates in different concentrations. After 16 h of exposition, cell plates were emptied and medium containing 0.3 mM luciferin was added in each well. Luminescence signal was read by a microtiter plate luminometer (MicroBeta Wallac Luminometer). Response was expressed as relative of maximal luciferase activity induced by the reference ligands, dexamethasone 6 nM and spironolactone 2.2 nM in MDA-kb2 and HG5LN-hMR cell lines, respectively. A dose-response curves were drawn using the Hill equation model given by the Regtox 7.5 Microsoft Excel macro (freely available at <http://www.normalesup.org/~vindimian/>). This representations allowed determining EC20 (*i.e.* concentration of extracts or chemical standards giving 20% of the maximum luciferase). A toxic-equivalent derived from bioassays activities (Bio-TEQ) were expressed as the ratio of the EC20 of the reference chemicals expressed as g/L to that of the sample expressed as equivalent gram of oasis HLB phase per liter for POCIS extracts.

Targeted chemical analysis

In order to complet results of the previous investigation, targeted chemical analysis to quantify one steroid (*n.b.* canrenone) was performed on one active unexplained fraction (F20) using Multiple Reaction Monitoring (MRM) mode with liquid chromatography coupled with

tandem mass UPLC-Quattro Premier Waters (Guyancourt, France). Steroids were separated with 1.7 μm , 100 x 2.1 mm C18 reversed phase column (Kinetex[®] C18, Phenomenex, Agilent Technologies, Les Ulis, France). The injection volume was set at 5 μL . The separation was performed at a flow rate of 0.6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ under gradient elution conditions using ultra-pure water (A) and acetonitrile (B) both with 0.1 % of formic acid. Gradient elution was from 20 % B to 40 % B at 11 min, increased to 100 % B in 4 min and kept isocratic for 30 second, then the initial conditions of 20 % B were again reached at the time of 16 min and kept isocratic for 2 min. The acquisition was performed in positive electrospray ionisation. The steroid was quantified relatively to deuterated steroid used as internal standards.

Data acquisition with LC-QTOF-MS

Analyses were carried out on an Agilent Infinity 1290 HPLC system coupled to an Agilent 6540 accurate mass quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Analytes were separated on an analytical C18 column 100 x 2,1 mm, 100 Å, 1,7 μm (Kinetex Phenomenex[®], Agilent Technologies, Les Ulis, France) kept at 40°C and 2 μL of fraction was injected. Highly active fractions were analyzed using positive mode electrospray ionization (ESI) coupled to an Agilent Jet Stream technology which was allowed directing ion spray by the presence of sheath gas. After an initial injection to observe the elution time of the compounds, optimized gradient was created in order to suit all analyzed fractions and to separate properly ions. Mobile phase were ultra-pure water (A) and acetonitrile (B) both with 0.1 % of formic acid at a flow rate of 0.3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The elution gradient program was as following : the gradient was started with mobile phase proportion of 90 % of A and 10% of B and attained rapidly to 20 % B in 5 min, then increased to 37 % B until 27 min, augmented to 60 % B at 32 min, reached to 100 % B at 36 min and held at 100 % B for 2 min, before returning to the initial value at 43 min and kept until 48 min. The operating conditions for the ESI source were as follows: source temperature 300°C, gas flow rate 8 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, capillary voltage 3000 V, nebulizer gas pressure 40 psi, sheath gas temperature 400°C, nozzle voltage 1500 V and fragmentor 110 V. The instrument was operated in 2 GHz. The data acquisitions were performed using (data-dependent) auto-MS/MS acquisition mode. In the same run, the most abundant precursor ions are selected from a TOF mode scan and then fragmented in MS/MS mode (Q-TOF). MS spectra were acquired with a scan range of 70 – 1700 m/z . The most abundant precursor ions were isolated in width of ~ 1.3 amu and fragmented with three fixed collision energies : 10, 20 and 40 eV. A constant flow of an Agilent TOF reference solution through the reference nebulizer allowed the system to continuously correct for any mass drift by using the reference mass ion HP-921 [hexakis-(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)-phosphazine] at m/z 922.009798 $[\text{M}+\text{H}]^+$. Before all injection, stability of mass accuracy was checked with an Agilent standard solution and the system was re-calibrated if values went above 0.2 ppm error. A standard solution containing 36 compounds was injected before the sample to check the retention time of compounds and the instrumental sensitivity.

Mass spectra analysis

The data were processed using the MassHunter Qualitative software (version B.05.00, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A compound screening was performed on the total ion chromatogram using the molecular feature extraction (MFE) which is an untargeted feature finding algorithm of the software. Only peaks with intensity > 1500 counts were searched. The elemental formulae were generated using relative isotopic abundance of mass spectra profiles and precursor ion mass. The composition were defined by Generate Formulas function of the software. The calculation of most probable molecular formula included the common elements C, H, N, O, S, Cl, F, P, score higher than 50 % and a error margin of 5 ppm. Different ionization products were considered : $[M+H]^+$ or $[M+NH_4]^+$. In order to isolate compounds of interest, the list of compounds detected in the POCIS fraction was compare to the corresponding blank fraction using MassProfiler Agilent software. This software is a visualization tool allowing the identification of statistically meaningful differences between sample groups. The characterization of compounds was performed on peak only present in POCIS fractions. Then, the most abundant candidat compounds were manually examined in order to confirm the elemental formula given by algorithm and to search the molecular structure using MS/MS spectra. The fragmentation mass spectrum was compared to MS/MS spectra include in exhaustive spectral libraries namely Metlin, Forensics and MassBank. When no MS/MS spectra were reported, molecular formulas were searched in compound database specifically Chempidder and only the more referenced molecule having log Kow compatible to absorption in POCIS was selected as candidate. Associated with this criteria, a research using Metfrag, an *in silico* fragmenter prediction, was used. Only proposal compounds with score higher to 0.7 and mass difference of 5 ppm were accepted (Wolf et al., 2010).

Chemical and biological confirmation

In order to confirm the identity of the compound, reference standard was purchased, when it was available. The purchased molecule was analysed in the same LC-QTOF-MS method that unknown compounds. The identity of the molecule was confirmed by retention time match, accurate mass, isotope pattern and the fragmentation spectra. After the chemical confirmation, reference standards were tested on bioassays in the same procedure as fractions. To calculate the contribution of the identified active compounds, concentration of molecule in fraction was evaluated using the standard addition or internal calibration method. The chemical concentrations were allowed assessing a toxic equivalent value (Chem-TEQ) determined by the following equation : $\text{chem-TEQ} = \sum (C_i \times \text{REPi})$, where, for a given chemical *i*, C_i is the measured concentration in a sample and REPi is the inducing equivalent factor relative to the reference ligand ($\text{REPi} = \text{EC}_{20}$ of reference compound/ EC_{20} of test compound, on mass basis). Finally, Chem-TEQ was compared to Bio-TEQ in order to define the contribution of identify molecule to biological measured activities.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical screening in active fractions

The chemical identification of unknown compounds was performed on three unexplained active fractions F15, F20 and F21. Fraction F 15 was chosen because of a strong glucocorticoid activity and the fractions F20 and F21 for anti-mineralocorticoid activities. These three fraction were also induced a progesterone activity (Creusot et al., 2014). Firstly, we were performed a compound screening using molecular feature extraction software function. More than hundred molecules were found in each fraction in positive ionization mode. After a subtraction compounds presenting in the corresponding blank, a list of 105, 182 and 138 candidat molecules has been created in positive ionization mode for fractions F15, F20 and F21 respectively. The chemical identification was carried out on the most intensive ions, approximately ten compounds per fraction. Result details are showed Table. Spectra of fragmentation of unknown compounds were compare to MS/MS spectra databases (e.g. Metlin, Forensics and MassBank). This comparaisn allowed suspecting the presence of various molecules (see below). When no corresponding spectra were available, our strategy was to search on molecular libraries (e.g. Chemspider, Scifinder) in order to select the most referenced molecule. A compound with many citations is a molecule that arouses the interest of researchers because it is encountered in the environment, either because has a biological effect and consequently could be available to purchase (Hug et al., 2014). This hypothesis allows suggesting a proposal name to buy. Unfortunately, the identification was stopped on elemental formula for a majority of ion. A research of the compound names corresponding to formulae based on molecular libraries revealed an important number of similar molecules which have many reference. This case was prevented from to chose only one compounds in order to purchase the standard. Nevertheless, a selection of candidate name was performed for some molecules, based on molecular properties (e.g. log Kow, structure), potential occurrence in this site of study and for some of them biological effect. In addition to these criteria, the utilisation of an *in silico* fragmentation assistance (e.g. Metfrag) was allows determining the possible identity of compounds corresponding to elemental formula. Must keep in mind, this algorithm for similar results can not discern exactly the good molecule and can give it the rang 10 in the propositional list for example (Wolf et al., 2010). Considering these selection parameters, a candidat compound list was proposed and the suspected molecule was given Table.

Table 1 : Compounds list of most abundant ions in different fractions; fats name corresponding to confirm molecules; italics name corresponding to compounds purchased but not confirm; blue italics name corresponding to suspected compounds which standard was no available.

Ion	Accurate experimental ion mass (<i>m/z</i>)	Accurate experimental Mass (<i>Da</i>)	Theoric Mass (<i>Da</i>)	Error		Ret. Time (min)	Elemental composition ^a	Score ^b (%)	Compound name
				mDa	ppm				
[M+H] ⁺	421.1378	420.1305	420.1297	-0.82	-1.96	6.31	C21 H19 F3 N2 O4	97.45	
[M+H] ⁺	396.1271	395.1198	395.1194	-0.41	-1.03	8	C20 H15 F2 N5 O2	96.4	
[M+H] ⁺	558.364	557.3565	557.3564	-0.08	-0.15	10.17	C29 H51 N O9	98.87	
[M+H] ⁺	235.0147	234.0073	234.0075	0.17	0.71	12.05	C8 H5 F3 N2 O S	98.55	Riluzole
[M+H] ⁺	305.1761	304.1691	304.1688	-0.33	-1.08	17.03	C19 H20 N4	99.14	
[M+H] ⁺	317.2112	316.2039	316.2038	-0.18	-0.06	17.51	C20 H28 O3	99.17	
[M+H] ⁺	315.1955	314.1887	314.1882	-0.54	-1.73	17.87	C20 H26 O3	91.86	
[M+H] ⁺	359.2221	358.2149	358.2144	-1.41	-0.3	18.36	C22 H30 O4	98.88	
[M+H] ⁺	377.2126	376.2052	376.205	-0.26	-0.68	18.72	C22 H29 F O4	98.73	Desoximetasone
F15 [M+H] ⁺	449.2534	448.2463	448.2461	-0.21	-0.47	19.52	C25 H36 O7	99.58	<i>Tetrahydrocortisone-3,21-diacetate</i>
[M+H] ⁺	333.0842	332.077	332.0773	0.29	0.88	7.88	C17 H11 F3 N2 O2	98.25	Floctafenic acid
[M+H] ⁺	364.1365	363.1297	363.1293	-0.39	-1.07	12.1	C22 H21 N O2 S	97.79	
[M+H] ⁺	749.4804	748.4721	748.4731	-0.94	-1.25	14.03	C37 H68 N2 O13	98.67	<i>Erythromycin, 9-oxime</i>
[M+H] ⁺	544.345	543.3405	543.3407	0.24	0.44	16.19	C28 H49 N O9	99.78	<i>Desoleandomycin</i>
[M+H] ⁺	229.0527	228.0451	228.0454	0.28	1.23	21.49	C13 H9 Cl N2	98.29	<i>Chlorfenazole</i>
[M+H] ⁺	377.2324	376.225	376.225	-0.05	-0.13	24.97	C22 H32 O5	99.09	
[M+H] ⁺	373.201	372.1938	372.1937	-0.1	-0.28	25.23	C22 H28 O5	99.49	<i>16β-methylprednisone</i>
[M+H] ⁺	415.2117	414.2044	414.2042	-0.13	-0.32	25.47	C24 H30 O6	99.42	
[M+H] ⁺	375.2166	374.2096	374.2093	-0.28	-0.76	26.07	C22 H30 O5	99.68	
[M+H] ⁺	334.1914	333.1843	333.1841	-0.19	-0.57	26.43	C21 H23 N3 O	99.84	
[M+H] ⁺	341.211	340.2039	340.2038	-0.04	-0.12	26.85	C22 H28 O3	99.22	Canrenone
[M+H] ⁺	415.2115	414.2041	414.2042	0.12	0.29	27.52	C24 H30 O6	99.76	
[M+H] ⁺	435.3217	434.3151	434.3145	-1.55	-0.67	29.08	C25 H42 N2 O4	98.68	
F20 [M+H] ⁺	657.479	656.4716	656.4724	1.17	0.77	30.41	C34 H64 N4 O8	96.15	

^a Elemental formula corresponding at neutral molecule^b Score based on how well the masses (and isotope abundances, when available) predicted from the formula match the MS data

Table 1 (Continued)

Ion	Accurate experimental ion mass (m/z)	Accurate experimental Mass (Da)	Theoric Mass (Da)	Error		Ret. Time (min)	Elemental composition ^a	Score ^b (%)	Compound name
				mDa	ppm				
[M+H] ⁺	333.0845	332.0776	332.0773	-0.3	-0.91	7.91	C17 H11 F3 N2 O2	99.2	Floctafenic acid
[M+H] ⁺	352.173	351.1658	351.1657	-0.08	-0.23	11.86	C22 H25 N O S	98.48	
[M+H] ⁺	364.1377	363.1303	363.1304	0.28	0.1	12.09	C19 H22 F N O3 S	98.27	
[M+H] ⁺	243.0684	242.0608	242.0611	0.24	1	12.34	C14 H11 Cl N2	99.01	<i>2-(4-Chlorobenzyl)-1H-benzimidazole</i>
[M+H] ⁺	458.3265	457.3196	457.3192	-0.34	-0.75	15.23	C28 H43 N O4	99.3	
F21 [M+H] ⁺	716.4589	715.4518	715.4507	-1.07	-1.5	17.04	C37 H65 N O12	96.19	<i>Erythromycin A Enol Ether</i>
[M+H] ⁺	733.4864	732.4792	732.4786	-0.59	-0.81	17.52	C38 H64 N6 O8	97.01	
[M+H] ⁺	837.5318	836.5262	836.5246	-1.66	-1.18	18.36	C41 H76 N2 O15	97.02	Roxithromycin
[M+H] ⁺	443.1083	442.1012	442.1013	0.11	0.26	26.13	C17 H14 F4 N6 O4	99.27	
[M+H] ⁺	332.1757	331.1685	331.1685	-0.04	-0.12	27.4	C21 H21 N3 O	99.71	
[M+NH4] ⁺	482.3687	464.3351	464.3349	-0.4	-0.19	29.81	C24 H48 O8	99.38	

^a Elemental formula corresponding at neutral molecule

^b Score based on how well the masses (and isotope abundances, when available) predicted from the formula match the MS data

Identification of compounds – occurrence and activities

In an attempt to confirm the identification of suspected compounds, reference standards were researched and purchased. The list of built molecules is detailed Table 1. After injection of the analytical standards and fractions on the LC-QTOF-MS, two compounds detected in POCIS extract and three “unknown” compounds were analytically confirmed.

Canrenone previously found in POCIS extract was detected as active compound in F20 due to untargeted analysis. Like we proved in previous article, this synthetic steroid leads various *in vitro* activities. Indeed, canrenone is an antagonist ligand of androgen, mineralocorticoid receptor and glucocorticoid receptor to a lesser extent. It involves a low progesterone activity (Creusot et al., 2014). The concentration of canrenone measured in F20 was determined using technical internal calibration with deuterated standard. To determine a representative concentration in river water, measured value was converted using sampling rate (Rs). For identified compound, the sampling rate is unknown. Consequently, we fixed Rs to a median value which is 0.1 L/day like the previous investigation (Creusot et al., 2014; Harman et al., 2012). The value was 0.68 µg/L (Rs fixed to 0.1) corresponding to 9.5 µg/g sorbent. This presence contributed to the anti-mineralocorticoid activity. Canrenone is a major metabolic product of the synthetic steroid, spironolactone (Kaukonen et al., 1998). Lalone et al., (2013) were described that spironolactone can affect the reproduction metabolism like fecundity, cessation of spawning or decrease of number of egg for female fish (*n.b.* Japanese medaka, Fathead minnow). These authors emphasized that *in vivo* impacting of its metabolites among them canrenone was not known but they specified the importance to assess its presence in the environment in addition to spironolactone due to its *in vitro* activities.

And other previously reported compound, roxithromycin was identified in F21. The detection of this antibiotic is commonly reported in aquatic ecosystems due to release to effluents of WWTP (Hirsch et al., 1999; Jones et al., 2005). During the previous investigation, roxithromycin has been detected in the POCIS extract by target analysis. This compound was not active on used bioassays and its detection can not be explained the measured activity of the fraction 21. However, roxithromycin is an inhibitor of cytochrome P450 (*n.b.* cyp3A4, cyp1A2) (Besse and Garric, 2008). This action could decrease the efficiency of detoxification process inducing a possible increase of impact of metabolisable xenobiotics like spironolactone for example.

In both F20 and F21, floctafenic acid was confirmed (Fig 1). This molecule is a major metabolite of floctafenine which is a non-steroidal anti-inflammatory. To our knowledge, the occurrence of floctafenic acid and its parent is not described in surface water or effluents. Few pharmaceutical studies are based on this compound or its parent and none environmental study is reported. To date, it was difficult to predict only with our information if floctafenic acid was released by urban or industrial WWTP. Concerning its biological effect, activities remained to be tested on bioassays. This metabolite requires more research in attempt to determine its biological effects and to assess its presence in other sites.

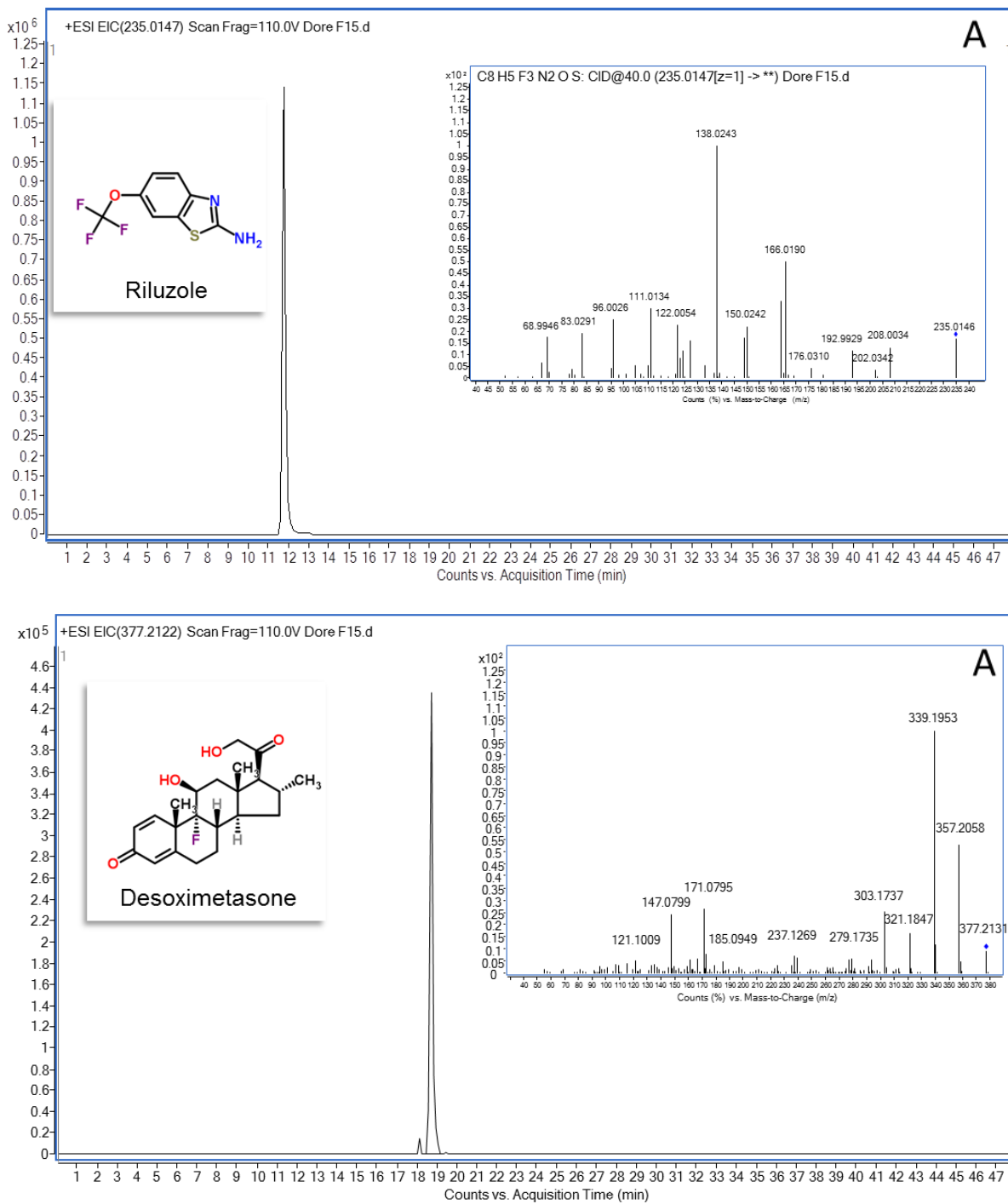


Fig 1 : Analytical peak and fragmentation spectrum of confirmed compounds in F15 (A), F20 (B) and F21 (C).

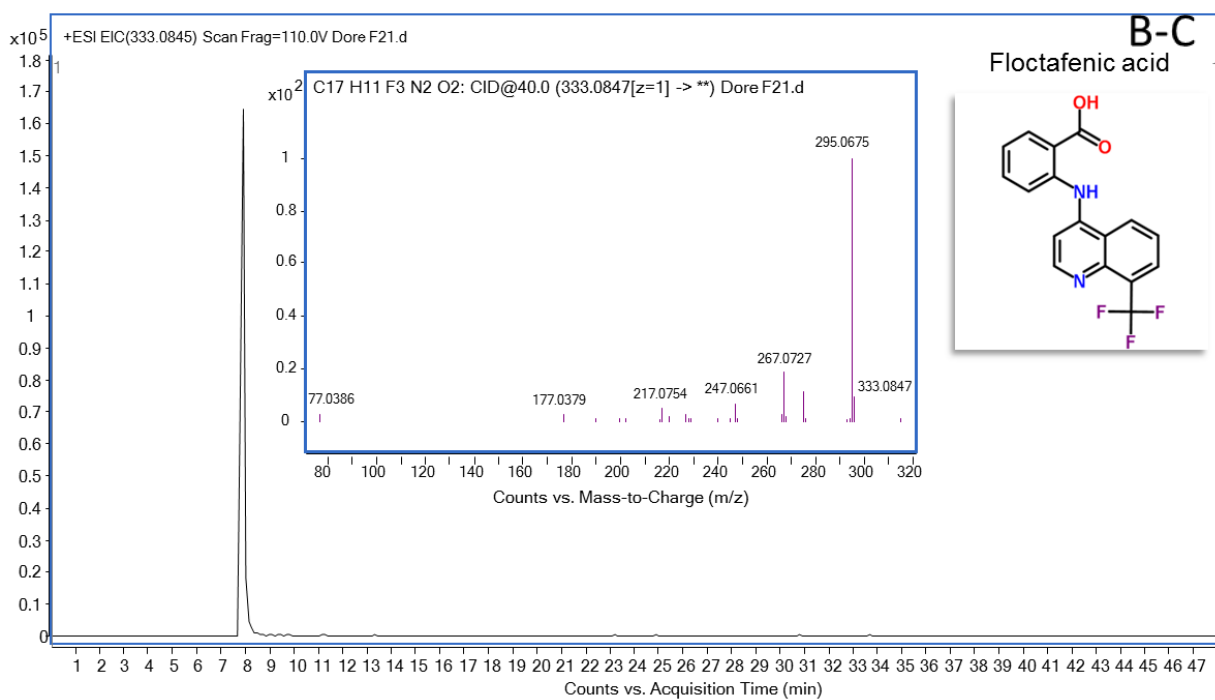
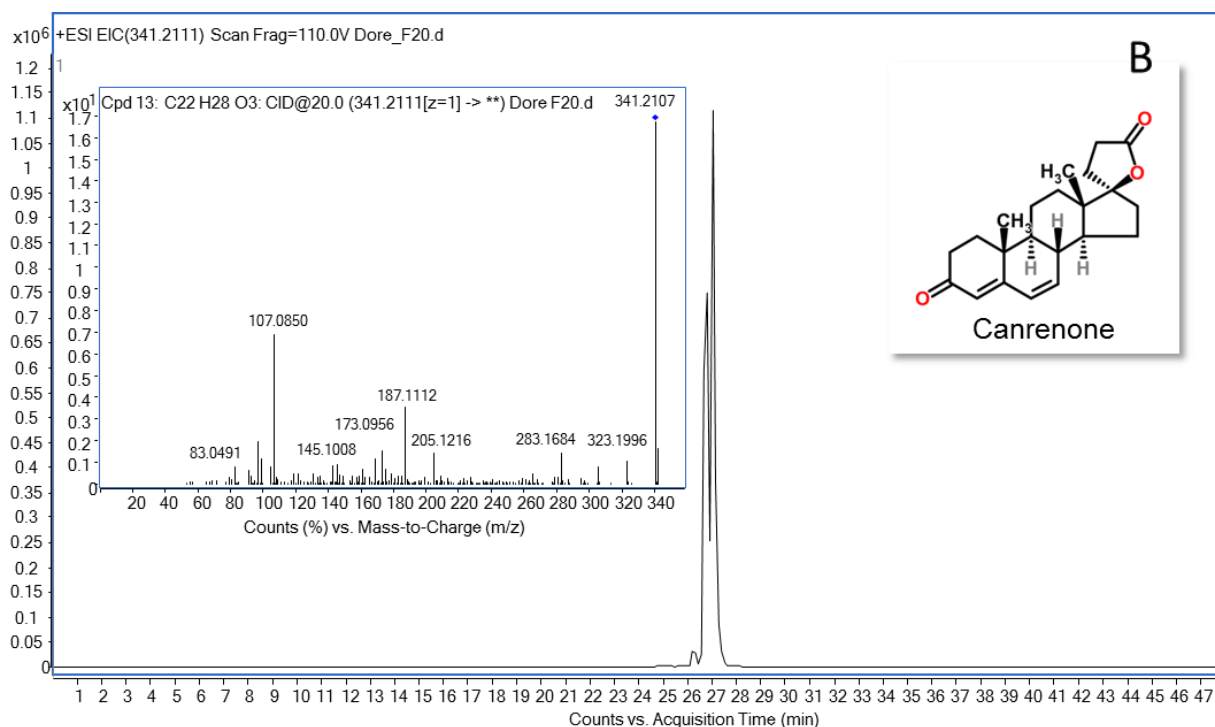


Fig 1 (Continued)

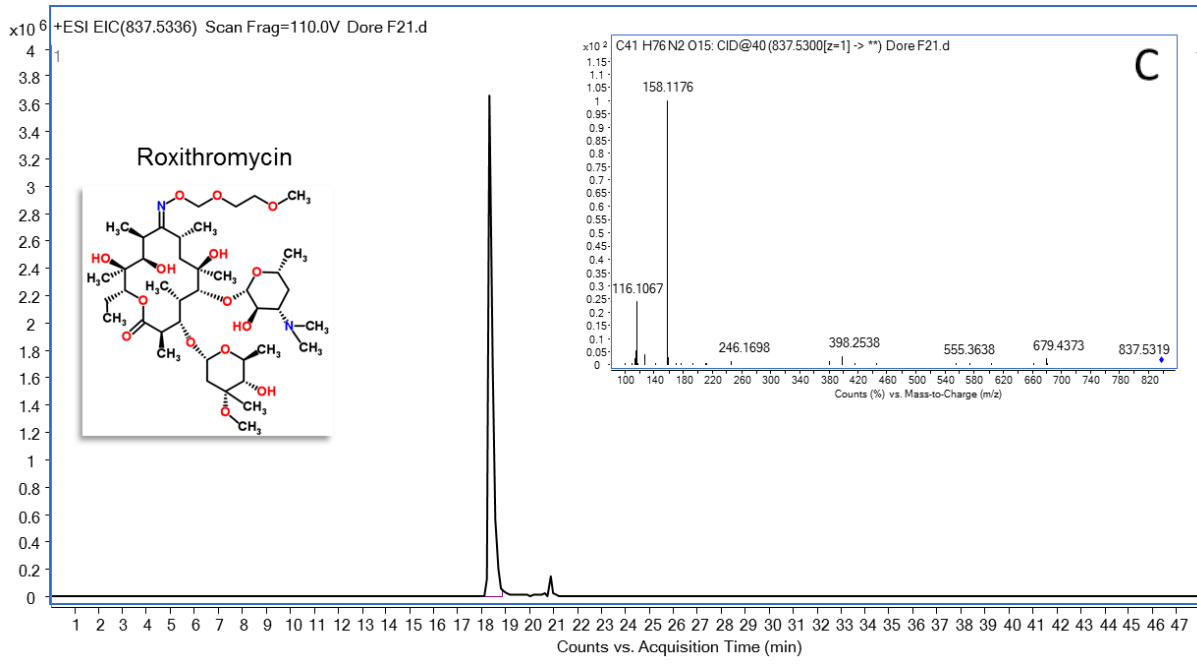


Fig 1 (Continued)

In fraction F15, a drug namely riluzole was identified and confirmed. Its fragmentation spectrum is given Fig1. This molecule is used to slow the progression of amyotrophic lateral sclerosis (McDermott and Shaw, 2008). The neurologic disease affects 2 persons on 100 000 in Europe (Logroscino et al., 2010). To our knowledge, the identification of this compound has not been reported in effluents of WWTP. These observations suggests that this drug could be produced by the pharmaceutical industry and not brought by urbain WWTP. Concerning the biological *in vitro* activity, riluzole was not active on used bioassays and its detection was not explained the fraction activity. In addition to this drug, a corticosteroid namely desoximetasone was confirmed by comparaison of fragmentation spectra of standard (Fig). This synthetic corticoid was tested on bioassay and showed a higher affinity to blind to GR that the reference ligand dexamethasone (REP = 3) (Fig 2).

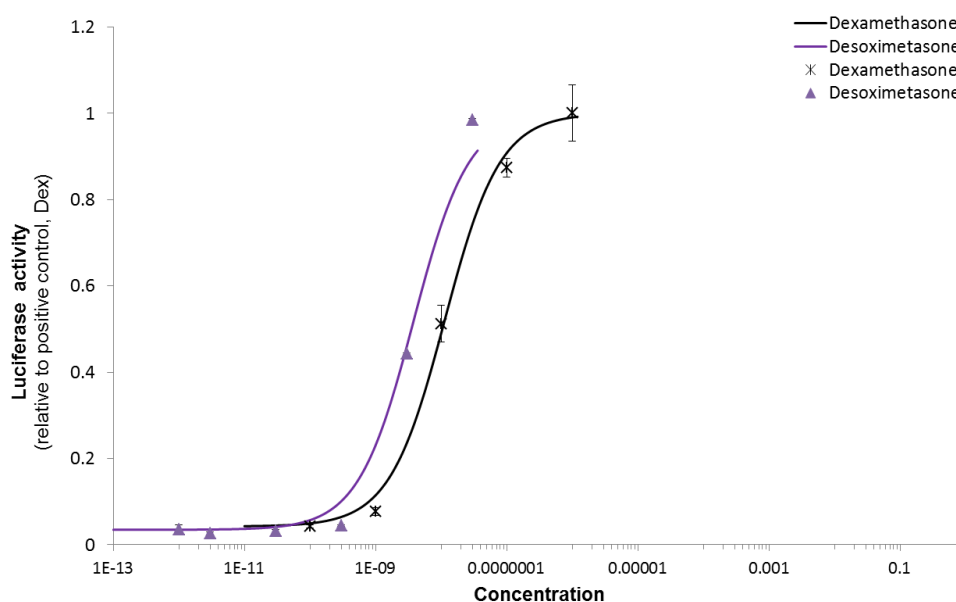


Fig 2 : Dose-response curves of desoximetasone and reference ligand dexamethasone in MDA-kb2 assays, GR-mediated agonist response.

This result was in agreement to activity proved by Schriks *et al* on GR CALUX bioassay (Schriks et al., 2010). In order to determine the contribution of desoximetasone at measured activity, the concentration was assessed in F15 and was 3.19 $\mu\text{g/g}$ sorbent. The concentration of desoximetasone in river water was estimated to 0.23 $\mu\text{g/L}$. The occurrence of glucocorticoids is often reported in effluent of urban and industrial WWTP (Chang et al., 2007; Schriks et al., 2010; Fan et al., 2011; Bellet et al., 2012). The most detected compounds were cortisol, cortisone and prednisolone (Schriks et al., 2010; Fan et al., 2011;). In France, the use of desoximetasone cream to treat skin problems have repealed since 2002 (“ANSM - Répertoire des spécialités pharmaceutiques,” 2014). Consequently, this detection in river water would be linked to effluent of pharmaceutical industry and not to urban WWTP. The contribution to the glucocorticoid activity was calculated and this compound explained 44.7 % of the activity in F15. Naturally, glucocorticoids are important actors in the regulation of the endocrine system. However, synthetic glucocorticoid like xenobiotic can be impact

reproduction process, growth and development in aquatic species (Lalone et al., 2013, 2012; Leatherland et al., 2010) A study on dexamethasone was showed that a increase of mass testes can be measured on male fathead minnow exposed to concentration of 0.1 µg/L while effects on female fish were appeared at very high concentration (500 µg/L) (Lalone et al., 2012). The structure of desoximetasone is similar to dexamethasone (SI Figure 1) and it has same targeted activity. But we demonstrated that desoximetasone has more affinity to GR than dexamethasone (REP = 3). In this contexte, it is quite possible that desoximetasone induced in vivo effects with lower levels than those observed with dexamethasone. Even if desoximetasone is apparently not prescribe as drug in France, this molecule is used to skins treatment in other european country or United States. The research of this compound could be the subject of supplementary monitoring in aquatic ecosystem especially on site with release of hospital and industrial effluents. The detection of this compound by non targeted analysis was lead an additional element to understand causes of observed effects in fish in our site of study. This presence associated with riluzole were confirmed the effluent of pharmaceutical industry as a source of contaminant of the river.

Non identified molecules

Obviously, other compounds were detected in active fractions but the confirmation of their identifications was not possible or not complete. Tetrahydrocortisone-3,21-diacetate (C₂₅H₃₆O₇) belonged to this category but was a interesting candidate compounds in F15. Indeed, this molecule is an derivative microbial degradation of cortisone which is a ligand of anti-mineralocorticoid receptor (Creusot et al., 2014; “Tetrahydrocortisone-3,21-diacetate,” 2014). In previous investigation, mesured concentration of cortisone was 536 ng/g sorbent in POCIS extract deployed in river downstream of effluent discharges of a pharmaceutical industry (October 2009)(Creusot et al., 2014). Its potential transformation by microorganisms like bacteria is strongly suspected especially in the presence of biological treatment of WWTP. We can exclude that this suspected molecule may be contributed to the anti-MR activity measured in F15. To date, the presence of tetrahydrocortisone-3,21-diacetate could not be confirm.

In F20, protonated molecule (373.201 m/z) was suspected to be 16β-methylprednisone Table. The compound was a interesting potential ligand of glucocorticoid receptor concerning its steroid structure. however, fragmentation spectra of 16β-methylprednisone was not matched spectra of the unknown compound and no other information no information other than the elemental formula could be obtained.

In parallel, the presence of erythromycin-9-oxime in F20 and erythromycin A enol ether in F21, which are intermediaire product of antibiotics clarythromycin and erythromycin A respectively, were rejected (Zhou et al., 2005). However, the fragmentation pathway of each compounds in comparison of unknown compounds revealed similar fragments suggesting the presence of isomers molecules (e.g. 9-deoxo-6,12-dideoxy-6,9:9,12-diepoxyerythromycin) in these fractions (SI Fig 1-Fig 2). Erythromycin and roxithromycin were not ligands of our cell lines. Therefore, it is quite possible that the molecules which have the same structures are not

as active. Focusing on potential biological effect, one compounds with elemental formula corresponding to $C_{13}H_9ClN_2$ was interesting in F20. According to *in silico* fragmentation using the open-source fragmenter MetFrag (*n.b.* database ChempSpider), this molecule would be constituted to benzimidazole group. A recent study published in Nature was showed that non-steroidal aromatase inhibitor, the fabrozole can be influed on sex-change in sexual mature zebrafish (*Danio rerio*) contaminated by food in ~20 days (Takatsu et al., 2013). This compound inhibits aromatase essential enzyme which convert androgens in estrogens (Steele et al., 1987). A modification of the cycle impacts sex balance. Fabrozole is constituted to aromatic cycle and benzimidazole groupe and has similarities to proposonal molecules by Metfrag. Scores were very close and benzimidazole group appeared at first positions (SI Fig 3). Recently, a review was reported the utilisation of this group as antiviral, antifungal, antibacterial, antiparasite and anticancer drugs (Kumar et al., 2014). Due to their various activities, the presence of benzimidazole in our site of study could be possible. However, the confirmation was not executed due to a lack of analytical standards corresponding to the proposal name using MetFrag. In F21, a similar compound was detected with $C_{14}H_{11}ClN_2$ as elemental formula (SI Fig 4). In an attempt to advance on identification step, molecules were pruchased namely 2-(2-chlorphenyl)-1h-benzimidazol (F20) and 2-(4-chlorobenzyl)-1H-benzimidazole (F21). They were chosen based to elemental formulae, structure with a benzimidazole group, the number of references in ChempSpider database and available to buy. These compounds were purchased to obtain additional informations about the fragmentation spectrum of unknown molecules. Even if some fragments are revealed similar, this strategy was failed to learn about their structures and the identity of the compounds remained unknown. One perspective would be to collect these compounds making a split between the end of analytical column and enter of mass spectrometer. We were performed this experiment on a standard solution with good result (data not shown). However, the establishment of such method requires a sufficient volume of sample extract to inject and time consuming to collect enough extract in order to perform biological tests behind.

This complementary study was focused on identification by high resolution mass spectrometry in attempt to find compounds explaining the measured biological activities in fraction of POCIS extract. This study stresses the need to develop mass spectra libraries in order to facilitate the identification process which is very time consuming, to date. Even if a majority of detected molecules remained unknown, this investigation was allowed identifying various molecules like metabolite of floctafenine, riluzole and desoximetasone. Among them, desoximetasone was shown a strong glucocorticoid activity highlighted the interest to research this compound site impacted to industrial or hospital effluents. The both investigations were allowed detecting a high diversity of molecules affected the wildlife in the river studied. These discoveries stresses to increase oversight of the industry and to call to develop efficient treatment process in WWTP, in an attempt to limit the release of pharmaceutical compounds in aquatic environment.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +33 540 006 998 ; fax +33 540 002 267; e-mail h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr

ACKNOWLEDGMENTS

The French Ministry of Ecology, Sustainable Development and Energy (P181-DRC 43 via INERIS), the Aquitaine Region and the European Union (CPER A2E project) are acknowledged for their financial support. Europe is moving in Aquitaine with the European Regional Development Fund. Moreover, this study has been carried out with financial support from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45)

SUPPORTING INFORMATIONS

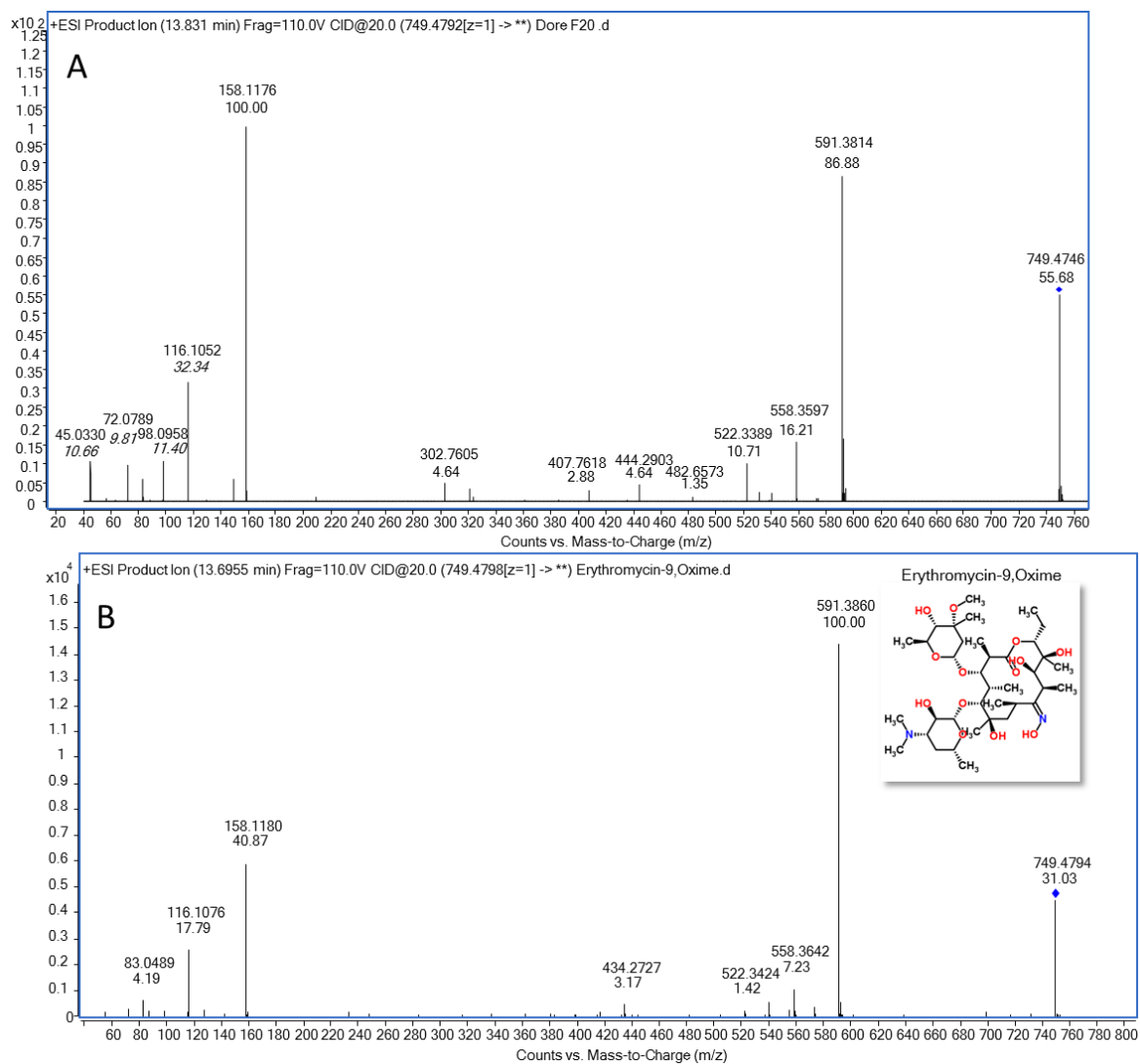


Fig 1 : Comparaison of ragmentation spectra of unknown compounds detected in F20 (A) and Erythromycin-9-oxime (B)

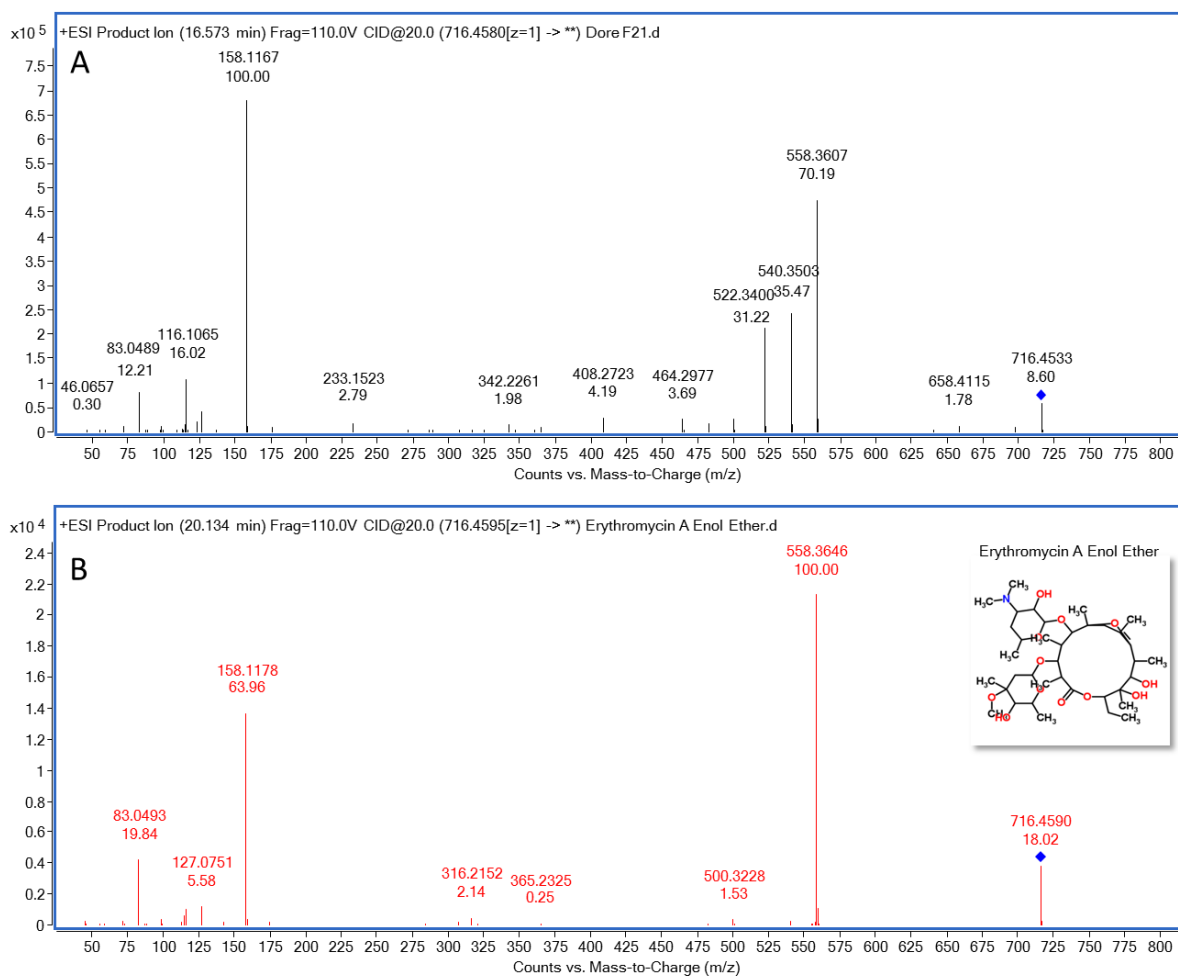


Fig 2: Comparaison of ragmentation spectra of unknown compounds detected in F21 (A) and Erythromycin-A-Enol-Ether (B)



MetFrag

In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra

MetFrag MzAnnotate Viewer About / News

Database Settings
 Database: KEGG PubChem ChemSpider Local SDF
 Neutral exact mass: Search PPM:
 Molecular formula:
 Only biological compounds:
 Limit # of structures:
 Database ID's:
 128 hits!

MetFrag Settings
 Mode: [M+H] [M-H] [M]
 Charge: pos neg
 Mzabs (e.g. 0.01):
 Mzppm (e.g. 10):

Parent ion: [M+H]

 Peaks:
 51.0231 9.77
 63.023 9.68
 64.0308 3.48
 65.0385 4.04
 66.0463 2.95
 72.364 6.61
 77.0386 30.27
 78.0451 1.93
 90.0341 26.41
 91.0414 21.24
 92.049 2.81
 98.9993 100
 104.0492 4.79
 126.0101 40.12
 139.0537 3.92
 140.05 3.46
 153.021 3.21
 166.0646 16.2
 167.0724 8.4
 168.0766 2.33
 192.0679 4.8
 193.0756 36.27
 194.0834 56.79
 195.0866 2.38

Log

Download complete table: [Generate output files](#)

Score	# Explained Peaks	Trivial Name	Exact Mass	Structure	Database ID
1.0	14	24238919	C ₁₃ H ₉ ClN ₂ 228.0454		24238919
1.0	14	24244469	C ₁₃ H ₉ ClN ₂ 228.0454		24244469
0.995	14	4485604	C ₁₃ H ₉ ClN ₂ 228.0454		4485604
0.995	14	4485615	C ₁₃ H ₉ ClN ₂ 228.0454		4485615

Fig 3 : Suggested structures for elemental formula C₉H₁₃ClN₂ in F20 using MetFrag



MetFrag

In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra

MetFrag MzAnnotate Viewer About / News

Database Settings
 Database: KEGG PubChem ChemSpider Local SDF

Neutral exact mass: Search PPM:

Molecular formula:

Only biological compounds:

Limit # of structures:

Database ID's:

183 hits!

MetFrag Settings
 Mode: [M+H] [M-H] [M]

Charge: pos. neg.

Mzabs (e.g. 0.01):

Mzppm (e.g. 10):

Parent ion: [M+H]⁺

Peaks:
 228.0448 54.68
 207.0915 55.80
 193.0759 8.16
 180.0805 4.25
 167.0727 100.00
 140.0260 11.85
 125.0024 2.88
 104.0492 8.76
 91.0541 4.20
 77.0387 41.07
 51.0233 8.07

[View spectrum](#)

Download complete table: [Generate output files](#)

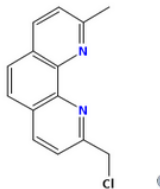
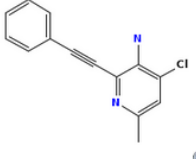
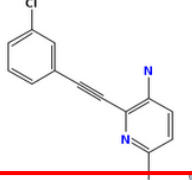

Score	# Explained Peaks	Trivial Name	Exact Mass	Structure	Database ID	Actions
1.0	7	304284	C ₁₄ H ₁₁ ClN ₂ 242.0611		304284	Fragments Download
0.983	7	8928041	C ₁₄ H ₁₁ ClN ₂ 242.0611		8928041	Fragments Download
0.896	7	8258654	C ₁₄ H ₁₁ ClN ₂ 242.0611		8258654	Fragments Download
0.725	4	14940495	C ₁₄ H ₁₁ ClN ₂ 242.0611		14940495	Fragments Download

Fig 4 : Suggested structures for elemental formula C₁₄H₁₁ClN₂ in F21 using MetFrag

Partie II

Évaluation des risques environnementaux en lien avec la valorisation des déchets organiques

Partie II – Contribution de l’EDA à évaluation des risques environnementaux en lien avec la valorisation des déchets organiques

1	Etude des activités biologiques et identification de composés à risque dans les boues de stations d’épuration urbaines.....	267
1.1	Activité <i>dioxine-like</i> et ligands associés.....	268
1.2	Activité œstrogénique et identification de composés œstrogéno-mimétiques	270
1.3	Activation des récepteurs X des prégnanes par les extraits de boues.....	271
1.4	Conclusion	272
2	Devenir des activités biologiques et des composés organiques dans les boues au cours du traitement des eaux usées et des déchets	272
2.1	Evolution de activités biologiques dans les boues au cours du procédé d’assainissement.....	273
2.2	Identification de molécules candidates aux activités biologiques observées dans une boue compostée	275
2.2.1	Composés connus et non ciblés pouvant expliquer l’activité <i>dioxine-like</i> et androgénique agoniste.....	276
2.2.2	Candidats à l’activité œstrogénique et <i>dioxine-like</i>	278
2.2.3	Phtalates et muscs, ligands antagonistes aux récepteurs androgéniques.....	279
2.3	Conclusion	282
3	Recherche et identification de perturbateurs endocriniens dans les lisiers porcins	282
3.1	Détection de composés connus dans les fractions de lisier	283
3.2	Recherche de molécules non ciblées par LC-QTOF	284
3.3	Conclusion	285
	Bilan de l’apport de EDA à l’étude des déchets organiques destinés à l’épandage agricole ..	287
	Article n°3: <i>Profils biologiques de boues de stations d’épuration urbaines associés à l’identification de perturbateurs endocriniens par l’analyse dirigée par l’effet</i>	289
	Article n°4: <i>Apport de l’analyse dirigée par l’effet (« effect-directed analysis », EDA) à la recherche et l’identification de perturbateurs endocriniens dans les lisiers porcins destinés à l’épandage agricole.....</i>	321

Partie II – Contribution de l’EDA à évaluation des risques environnementaux en lien avec la valorisation des déchets organiques

Il a été démontré dans la partie précédente (Chapitre 5, partie I p 173) que les stations d’épuration ont la capacité d’éliminer une partie des perturbateurs endocriniens en sortie de traitement. S’il est vrai qu’une quantité de composés est réellement dégradée, une partie des molécules présentes migrent de la phase dissoute pour être piégée dans les procédés de traitement (*i.e.* boues, biofiltre...). Après avoir été utilisées pour traiter les eaux usées, ces boues sont incinérées (*n.b.* filière minoritaire) ou dans la majorité des cas épandues comme fertilisant sur les sols agricoles. Cependant, les boues renferment des métaux et des composés organiques pouvant entraîner un risque pour l’environnement. Par le lessivage des sols, ces molécules peuvent se retrouver *in fine* dans le milieu aquatique. Ces déchets organiques représentent seulement 2 % des amendements, la majorité des épandages agricoles c’est-à-dire 94 %, est réalisée en utilisant les déjections animales tels que les lisiers porcins (Dudkowski, 2000). Ce mélange liquide d’excréments et d’urines de bétail contient en plus des éléments fertilisants (e.g. phosphore, potassium...), des hormones naturelles et des micropolluants. Ces composés font des lisiers une source avérée en perturbateurs endocriniens et son épandage n’est pas sans risque pour l’environnement (Hanselman et al., 2003; Combalbert et al., 2012). Par conséquent, il est apparu intéressant de rechercher dans les boues de stations d’épuration et les lisiers porcins, la présence de perturbateurs endocriniens en réalisant une étude de leurs activités biologiques et en appliquant l’approche EDA afin d’identifier les composés actifs.

Cette partie est structurée en 3 paragraphes correspondant à plusieurs études :

- i. **Les boues de stations d’épuration** : La présence de perturbateurs endocriniens a été étudiée par l’utilisation de l’analyse dirigée par l’effet.
- ii. **Le devenir des activités biologiques et des composés dans des boues de STEP** : Différents processus de traitement de boues de STEP ont été étudiés ; L’approche EDA a été employée pour évaluer les activités *in vitro* et identifier des molécules biologiquement actives présentes dans des boues issues du compostage.
- iii. **Les lisiers porcins** : L’analyse dirigée par l’effet a été utilisée pour identifier des perturbateurs endocriniens au sein des lisiers porcins.

1 Etude des activités biologiques et identification de composés à risque dans les boues de stations d'épuration urbaines

En France, l'épuration des eaux usées par les stations d'épuration génère des déchets parmi lesquels les boues issues du processus d'assainissement. Avec une production moyenne en France de 15 kg de matière sèche par habitant et par an (ADEME, 2014), la valorisation des boues par épandage agricole apparaît être une solution intéressante pour le recyclage de ces déchets organiques. Cependant, en plus d'être une source avérée en éléments fertilisants (*e.g.* azote, phosphore...), les boues contiennent de nombreux métaux et micropolluants. Ainsi, les exploitations d'installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE) (*e.g.* stations d'épuration industrielles, stations d'épuration mixtes...) déclaraient l'émission d'environ 3Mt de métaux, 17t de biphényles polychlorés et 39t alkylphénols comme polluants dans les sols, en 2011 (Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, 2014). Une multitude de micropolluants non réglementés pouvant constituer un danger, s'ajoutent aux contaminants précédemment cités. En effet, au cours des procédés d'assainissement des eaux, une étude a montré qu'environ 65 % des composés ayant des rendements d'élimination dans la phase dissoute supérieurs à 70 % étaient détectés dans les boues activées (Martin-Ruel, 2009). Une fois piégées dans la phase solide, ces molécules peuvent être transformées par la microfaune présente ou les processus abiotiques en composés présentant parfois un risque supérieur aux composés parents (Tobias Schulze et al., 2010).

Dans notre étude, deux stations d'épuration, Lille et Achères, possédant deux filières d'assainissement par des boues ont été étudiées (Chapitre 3, § 1.1.6, p 68). La présence de perturbateurs endocriniens a été caractérisée par l'emploi de trois bio-essais, les récepteurs ER, AhR et PXR dans plusieurs boues prélevées en trois points de la filière de traitement (*i.e.* primaire, avant digesteur, digérée, déshydratée). L'analyse dirigée par l'effet a été utilisée pour simplifier les échantillons et identifier la présence de perturbateurs endocriniens. Un fractionnement par SPE a été réalisé sur chaque extrait de boue. 4 fractions aux polarités croissantes ont été collectées suivant le protocole exposé Chapitre 3, section 5.1 (p 85). Un fractionnement plus fin a ensuite été effectué par HPLC sur les fractions sélectionnées (F3 de la boue primaire et F3 et F2 de la boue digérée de la STEP de Lille). Les composés présents dans les sous-fractions les plus actives ont été recherchés par spectrométrie de masse haute résolution. Les résultats obtenus ont donné lieu à un article.

Article n°3 : *Profils biologiques de boues de stations d'épuration urbaines associés à l'identification de perturbateurs endocriniens par l'analyse dirigée par l'effet*

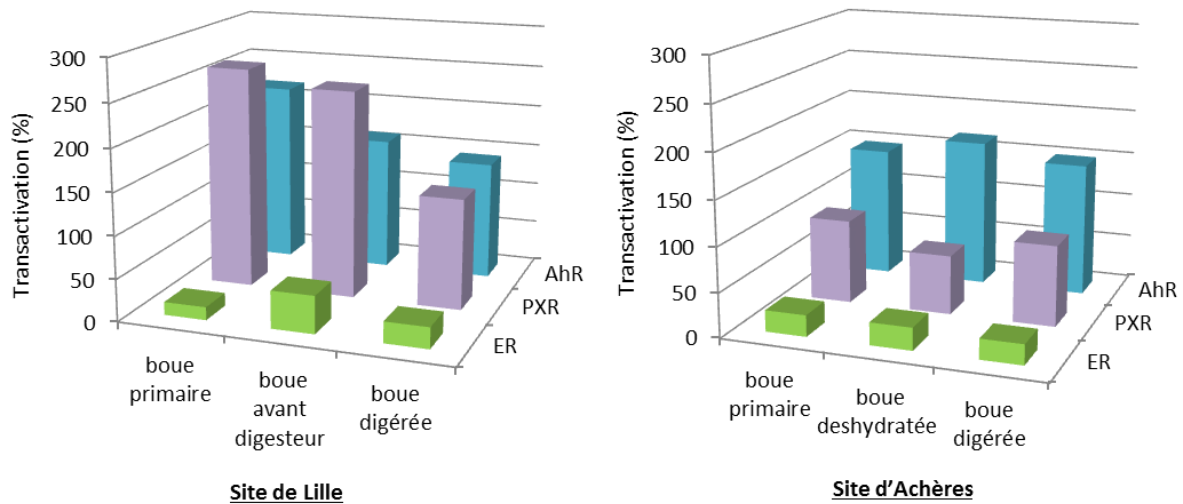


Figure 63 : Activités des xénobiotiques (PXR), *dioxine-like* (AhR) et œstrogéniques (ER) observées sur les lignées cellulaires HG5LN-PXR, HAhLP, HELN-αER, respectivement, exposées à différents extraits de boues issues de deux stations d'épuration, Lille et Achères. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à l'induction générée par les ligands de référence 1µM SR12813, 10nM E2, 10nM TCDD.

1.1 Activité *dioxine-like* et ligands associés

L'activité *dioxine-like* a été évaluée sur les différents extraits de boues provenant des stations d'épuration de Lille et d'Achères. Les boues primaires, avant digesteur, digérées et deshydratée induisent une réponse des cellules HAhLP montrant la présence de ligands AhR (Figure 63). Une sur-activation du récepteur AhR (activité de la luciférase > à 100%) liée à une induction non spécifique de la luciférase est constatée pour tous les extraits de boues provenant des deux STEP (Figure 63). Dans cette configuration, l'expression de l'activité en équivalent toxique (Bio-TEQ) ne peut être effectuée. L'utilisation d'une lignée cellulaire différente comme par exemple la lignée PLHC-1 induisant une activité EROD pourrait permettre de quantifier l'activité AhR (Hahn et al., 1993; Kinani et al., 2010). L'activité *dioxine-like* est observée dans les 4 fractions obtenues par SPE de chaque extrait de boues quelle que soit la station d'épuration (Figure 1, article n°3, p301). Les fractions ayant été collectées selon une gamme de polarité, les ligands présents possèdent par conséquent des propriétés physico-chimiques variés. Les HAP étant des ligands connus du récepteur AhR (Louiz et al., 2008), une analyse chimique ciblée par GC-MS/MS a été réalisée sur la boue primaire et digérée de la station de Lille dans le but d'évaluer l'influence des traitements sur les composés actifs. La présence de HAP a été détectée dans les fractions F1, F2 et F3 des boues primaires et digérées de la station de Lille. 19 HAP sont identifiés dans les fractions analysées, parmi lesquels 11 sont connus pour être des ligands AhR (Figure 64) (Louiz et al., 2008). La majorité de ces composés sont élués, de façon logique, dans la fraction la plus apolaire F1 et peuvent contribuer à l'activité *dioxine-like* observée.

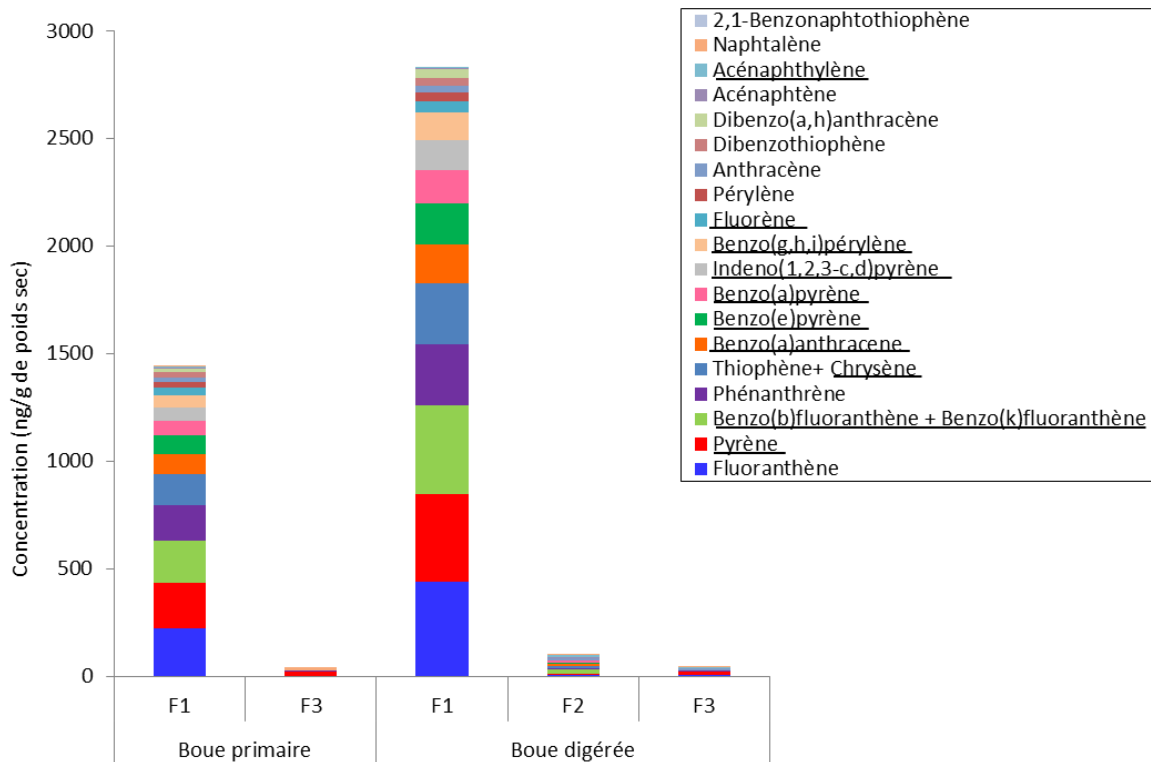


Figure 64 : Concentrations en HAP mesurées en ng/g de poids sec dans les fractions obtenues par SPE des boues primaires et digérées de la station d'épuration de Lille. Les composés actifs sont surlignés dans la légende selon Louiz et al., (2008).

Concernant les fractions plus polaires (F3 de la boue primaire et digérée et F2 de la boue digérée de la STEP de Lille), la recherche d'autres ligands potentiels a été menée après une simplification de ces fractions par RP-HPLC. Sur les 40 fractions générées, deux sous-fractions des fractions F3 des boues primaires et digérées ont montré une activité *dioxine-like* (f23 et f25) (Figure 3, article n°3, p304). Ces sous-fractions étant de type apolaire (collectée par HPLC à une proportion d'acétonitrile de plus de 60%), l'identification moléculaire a été effectuée par GC-QTOF. L'analyse chimique non ciblée de ces sous-fractions actives, a permis de suspecter la présence d'une hormone, l'androstérone dans la sous-fraction f23 et de deux acides gras, le méthylstéarate et le palmitate de méthyle dans la sous-fraction f25. La présence de ces familles de composés dans les eaux usées et les boues a également été rapportée par d'autres études (Appels et al., 2008; Bellet et al., 2012). Cependant à notre connaissance, l'affinité de ces composés avec le récepteur AhR n'est pas référencée dans la littérature scientifique. Des études complémentaires sont à réaliser afin, d'une part, de confirmer analytiquement l'identification de ces composés, et d'autre part, d'évaluer leur éventuelle activité *dioxine-like*.

1.2 Activité œstrogénique et identification de composés œstrogéno-mimétiques

Une activité œstrogénique, relativement faible en comparaison aux autres activités, est détectée dans tous les extraits de boues étudiées testés sur la lignée cellulaire HELN-ER α (Figure 63). Après simplification des extraits par SPE, la réponse biologique est majoritairement observée dans la fraction F3 et dans une moindre mesure dans la fraction F2 (Figure 6, article n°3, p 308). L'activité œstrogénique pouvant être médiée par des hormones, des analyses par LC-MS/MS ont été réalisées sur les boues primaires et dégradées de la station de Lille. Les analyses ont permis de détecter 7 stéroïdes dans les fractions F3 de ces deux échantillons (Figure 65).

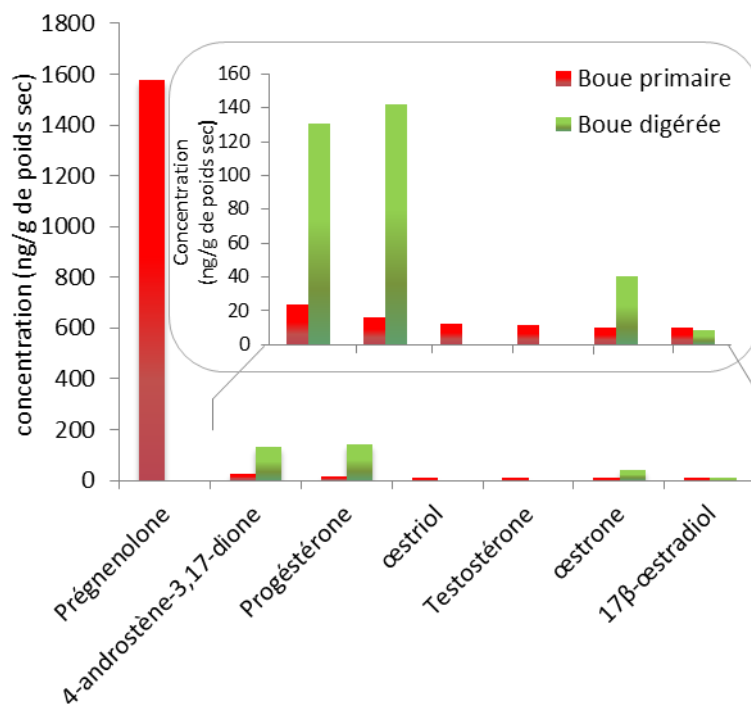


Figure 65 : Concentrations en stéroïdes mesurées en ng/g de poids sec dans les fractions F3 obtenues par SPE des boues primaires et digérées de la STEP de Lille.

Les œstrogènes détectés (*i.e.* 17 β -œstradiol, œstriol et œstrone) mais également les composés androgènes (*i.e.* testostérone et 4-androstène-3,17-dione) pouvant être transformés par les aromatasés dans les cellules utilisées (Morishima et al., 1995), contribuent à l'activité mesurée. En plus de ces hormones, d'autres stéroïdes sont également détectés tels que la prégnénolone et la progestérone. La présence de tous ces composés suggère que les boues échantillonnées peuvent induire, en plus des activités testées, d'autres activités biologiques

comme les activités androgéniques, anti-minéralocorticoïdes et anti-progestatives (Bellet et al., 2012; Creusot et al., 2014).

Concernant la fraction F2 obtenue par SPE de la boue digérée du site de Lille, le fractionnement par HPLC a mis en évidence deux sous-fractions, f32 et f40, ayant une activité œstrogénique. En plus d'induire une réponse œstrogénique, la fraction f32 est active sur AhR. Son temps de collecte correspond avec l'élution d'un HAP, le benzo[b]fluoranthène, ligand AhR connu (Chapitre 4, §2.1, p 114). Des analyses par GC-QTOF ont été menées sur les deux sous-fractions f32 et f40. Le benzo[b]fluoranthène n'a pas été identifié dans la sous-fraction f32 en raison de son absence ou de sa faible intensité chromatographique. Les analyses non ciblées ont permis de suspecter la présence d'acides gras, l'acide 6-octadécénoïque et l'acide palmitique, et un stéroïde le cholest-4-én-3-ol dans les sous fractions f32 et f40, respectivement. Les boues de stations d'épuration sont connues pour contenir des acides gras qui peuvent, en raison de leur toxicité, impacter les colonies bactériennes utilisées pour l'épuration (Alves et al., 2001; Appels et al., 2008). Le lien entre ces composés suspectés et l'activité œstrogénique observée n'est pour le moment pas totalement établi. La confirmation de l'identité des molécules détectées doit être réalisée en analysant les étalons analytiques par GC-QTOF. Une fois leur identité confirmée, les composés pourront être testés sur les bio-essais afin d'évaluer leur effet biologique.

En parallèle de la recherche de composés biologiquement actifs dans les sous-fractions, la fraction F2 obtenue par SPE a été analysée par LC-QTOF. Par cette analyse, des biocides ont été mis en évidence dans cette fraction. La présence de triclosan est suspectée dans l'extrait de boue digérée. Ce composé est rapporté pour être un ligand antagoniste des récepteur aux androgènes présent dans les boues et effluents de STEP (Rostkowski et al., 2011; Singer et al., 2002). A ce composé s'ajoute la présence confirmée du chlorophène. Ce dernier a montré une forte affinité, aussi intense que le 4-nonylphéno,l avec les récepteurs des œstrogènes (test YES) (Schmitt et al., 2012). Sa contribution à l'activité œstrogénique observée dans la fraction F2 reste à évaluer.

1.3 Activation des récepteurs X des prégnanes par les extraits de boues

Les extraits de boues des deux stations d'épuration ont induit une activité des récepteurs X des prégnanes (Figure 63). Selon plusieurs auteurs, cette activité peut être liée à la présence de ligands communs avec les récepteurs ER et AhR comme les œstrogènes, les pesticides, les composés pharmaceutiques, les PCB, etc (Creusot et al., 2010; Jacobs et al., 2005; Mnif et al., 2007; Dagnino et al., 2014). Par conséquent, certains composés détectés tels que l'œstradiol, l'œstrone ou le triclosan (s'il est confirmé) peuvent contribuer à l'activité PXR mesurée.

Les fractions F3 et F2 obtenues par SPE des boues primaires et digérées de la station de Lille ont été fractionnées par HPLC. Aucune des sous-fractions collectée n'a induit de réponse biologique. Cependant une fois les fractions regroupées, une activité PXR est observée montrant ainsi la présence d'une additivité moléculaire (Figure 3, article n°3, p 304).

Ce même constat a été observé pendant ces travaux de thèse sur les eaux usées brutes de stations d'épuration (article n°1). Actuellement, les composés agissant en association n'ont pas pu être identifiés. L'utilisation de colonne d'affinité intégrant le récepteur PXR pourrait permettre de sélectionner uniquement les ligands présents et faciliterait ainsi la procédure d'identification moléculaire (Dagnino et al., 2014).

1.4 Conclusion

L'analyse dirigée par l'effet a été mise en œuvre dans le but d'identifier la présence de perturbateurs endocriniens dans les boues d'assainissement issues de deux stations d'épuration. La présence d'une activité *dioxine-like*, œstrogénique et PXR a été observée dans les boues primaires, avant digesteur, digérées et déshydratées provenant des deux sites d'études. Des ligands aux récepteurs étudiés ont été détectés par des analyses chimiques ciblées réalisées par spectrométrie de masse en tandem et par des analyses non ciblées effectuées par spectrométrie de masse haute résolution. Ces analyses ont permis d'identifier la présence de HAP, d'œstrogènes et de biocide, le chlorophène, comme composés actifs. La contribution de ces ligands aux activités mesurées n'a pas pu être calculée en raison d'une sur-activation des récepteurs utilisés pour évaluer les activités biologiques empêchant la détermination de Bio-TEQ. L'analyse dirigée par l'effet a également mis en évidence la présence d'autres molécules comme des acides gras (méthylstéarate, palmitate de méthyle, acide palmitique, acide 6-octadécénoïque), des stéroïdes (androstérone, cholest-4-én-3-ol) et d'un biocide, le triclosan. Cependant, l'identité de ces composés n'a pas encore été confirmée. L'achat de composés de synthèse permettrait à la fois une confirmation chimique et l'évaluation de leur éventuelle activité biologique. En plus de la caractérisation de ligands, un effet mélange entre molécules a été observé pour l'activité PXR dans les échantillons de boues primaires et boues digérées du site de Lille. Les composés induisant la réponse biologique n'ont pas encore été identifiés. L'utilisation de colonne d'affinité en complément de l'analyse dirigée par l'effet pourrait apporter une aide méthodologique pour la caractérisation de ces molécules.

2 Devenir des activités biologiques et des composés organiques dans les boues au cours du traitement des eaux usées et des déchets

Les boues des STEP sont le résultat de la transformation de la matière présente dans les eaux usées par les micro-organismes. Par conséquent, les boues sont présentes tout au long du processus d'assainissement des eaux usées. Cependant suivant les procédés de traitement mis en place, la quantité générée sera plus ou moins importante. Dans le but d'étudier le devenir des activités biologiques et des composés organiques présents au cours du processus de traitement des eaux usées, deux stations d'épuration, Lille et Achères, possédant deux filières d'assainissement par des boues ont été étudiées (Chapitre 3, § 1.1.6, p 68). Les activités œstrogéniques, *dioxine-like* et PXR ont été évaluées dans des boues en trois points de la filière

de traitement (*i.e.* primaire, avant digesteur, digérée, déshydratée). Les résultats obtenus sont présentés dans l'article n°3 et synthétisés dans cette partie.

Ces travaux de thèse ont également étudié le traitement des boues par compostage. En effet, afin de réduire le volume des boues stockées et d'améliorer leurs propriétés fertilisantes, les boues de certains exploitants sont amenées à être compostées. L'impact de ce vieillissement sur les effets biologiques et les composés est très peu étudié. A cause à des procédés biotiques et abiotiques existant au sein des boues, des produits de transformation peuvent être générés par ce compostage. Les produits pouvant être parfois plus dangereux que les composés parents, les activités biologiques et la présence de molécules actives ont été recherchées dans une boue compostée prélevée dans le cadre du projet Echibioteb (Chapitre 3, § 1.1.5, p 67). L'analyse dirigée par l'effet a été appliquée à un extrait de boue présentant des activités *dioxine-like*, anti-androgéniques et œstrogéniques dans le but d'identifier les composés responsables des activités biologiques observées. Après extraction par ASE, l'extrait a été fractionné par HPLC à la fois en phase inverse, RP-HPLC (*n.b.* colonne analytique greffée C18) et phase normale NP-HPLC (*n.b.* colonne analytique greffée NH2) selon les protocoles exposés dans le chapitre 3, section 5.2, p 86. Chaque fraction collectée, 20 en NP-HPLC et 40 en RP-HPLC, a été testée biologiquement, par l'INERIS (Verneuil-en-Halatte), sur les lignées cellulaires, MELN, PLHC-1 et MDA-kb2 exprimant les récepteurs aux œstrogènes, de la dioxine et aux androgènes, respectivement. Les fractions les plus actives ont finalement été analysées par GC-QTOF configuré en mode TOF (Chapitre 5, §3.2,p 140) pour les fractions NP-HPLC et par LC-QTOF pour les fractions RP-HPLC. Les résultats obtenus sont exposés dans cette partie.

2.1 Evolution de activités biologiques dans les boues au cours du procédé d'assainissement

Les activités œstrogéniques, *dioxine-like* et PXR ont été évaluées dans les boues primaires, avant digesteur, digérées et déshydratées provenant des sites de Lille et d'Achères. Les courbes dose-réponse obtenues sont présentées Figure 8 de l'article n°3, p315. Trois profils semblent être observés suivant les activités biologiques :

- i. Augmentation marquée de l'activité œstrogéniques le long du traitement des eaux usées.
- ii. Légère augmentation de l'activité *dioxine-like* entre les différents points de prélèvement.
- iii. Dégradation de l'activité PXR au cours du processus d'assainissement.

Une augmentation de l'activité œstrogénique aux différents stades de traitement des eaux est observée. Ce résultat peut être corrélé à la quantité de certains ligands, œstrone et 4-androstène-3,17-dione, qui est supérieure dans la boue digérée par rapport à la boue primaire. Les concentrations passent entre la boue primaire et digérée de 10,2 ng/g de poids sec à 40,1 ng/g de poids sec pour l'œstrone et de 23,2 ng/g de poids sec à 130,4 ng/g de poids sec pour le 4-androstène-3,17-dione. Ces augmentations de concentration sont accompagnées

d'une diminution de la quantité de testostérone, d'œstriol. Les valeurs passent d'une dizaine de ng/g de poids sec pour la boue primaire au dessous des limites de quantification pour la boue digérée. La dégradation de l'œstradiol en œstrone et de la testostérone en 4-androstène-3,17-dione a été rapportée dans différentes études et peut constituer un éléments d'explication à l'augmentation des concentrations et de l'activité (Muller et al., 2010a; Muller et al., 2010b; Yang et al., 2010; Yang et al.; 2011). L'augmentation de l'activité ER peut également résulter d'une déconjugaison des composés comme les hormones dans les boues. Ainsi, il a été montré que les œstrogènes, l'œstriol, l'œstrone et l'éthinylestradiol pouvaient passer d'une forme conjuguée à libre en 8h lorsqu'ils sont contenus dans des boues activées (Gomes et al., 2009).

Concernant l'activité *dioxine-like*, cette dernière n'évolue pas de façon très marquée durant les différentes étapes de traitement. Si une légère augmentation peut être observée entre les boues avant digesteur/digérée/déshydratée en comparaison à la boue primaire des deux sites, la répétition du test cellulaire en triplicat de plaques pour chaque échantillon permettrait de confirmer la tendance. Cependant, la quantification des HAP dans la boue primaire et digérée de la STEP de Lille est cohérente avec les activités observées puisqu'elle montre une augmentation des concentrations des composés actifs dans la boue digérée. Les concentrations totales en HAP passent de 1439,2 ng/g de poids sec pour la boue primaire à 2833,3 ng/g de poids sec pour la boue digérée. L'augmentation de l'activité dioxine-like observée est en accord avec différentes études qui précisent que la réponse des récepteurs AhR augmenterait au cours de la filière de traitement (Gustavsson et al., 2004; Zhang et al., 2009).

Une dégradation de l'activité PXR est observée entre la boue digérée et la boue primaire/avant digesteur pour la station de Lille suggérant l'élimination des composés actifs au cours du traitement anaérobie (Figure 66). Concernant la station d'épuration d'Achères, une interprétation est plus difficile à réaliser au vu des courbes dose-réponse obtenues qui possèdent des niveaux différents de transactivation basale (Figure 66). Ces variations de courbes dose-réponse, indépendamment de l'effet médié par l'échantillon, illustrent la nécessité de modéliser de façon similaire les résultats en fixant à minima le niveau basal. La détermination de Bio-TEQ à partir des EC20 ou EC50 des échantillons est un outil indispensable pour l'évaluation des activités biologiques (Escher et al., 2008). Le calcul de Bio-TEQ permettrait de comparer de façon plus rigoureuse les activités biologiques observées dans notre étude.

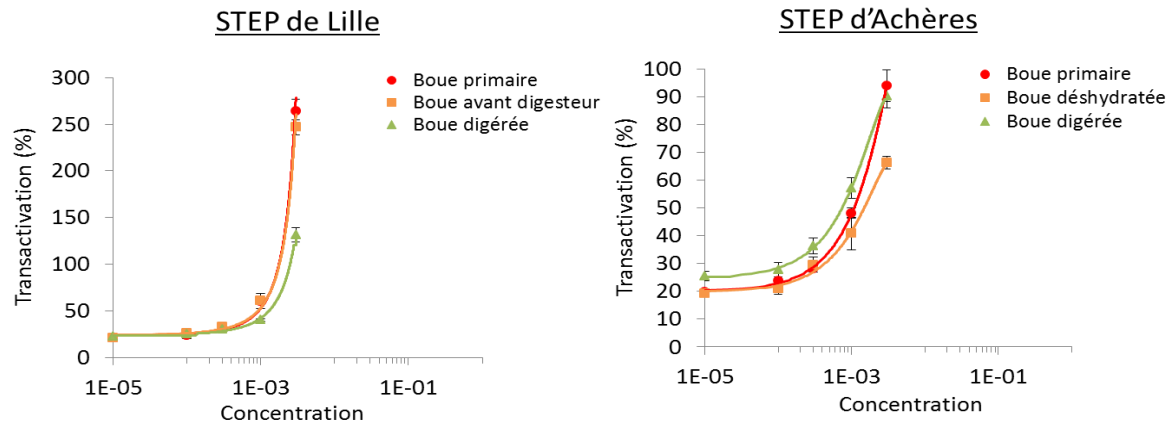


Figure 66 : Courbes dose-réponse de l'activité PXR obtenues pour les différents échantillons de boues des STEP de Lille et d'Achères. La lignée cellulaire utilisée est HG5LN-PXR. L'activité est exprimée en pourcentage par rapport au ligand de référence, SR 12813.

L'influence du compostage a également été étudiée dans le cadre du projet Echibioteb. Les activités biologiques ER, AhR et anti-AR des extraits de boue brute et compostée ont été mesurées par le GSPE-Paris Sud et l'INERIS. Concernant l'activité ER, une augmentation de l'activité ER d'un facteur 3 est constatée, la Bio-TEQ passant de 3 ng/g pour la boue brute à 9 ngE2-EQ/g pour la boue compostée. La tendance est en accord avec l'augmentation précédemment observée sur les boues primaires/digérées/déshydratées. Pour l'activité AhR à 4h d'exposition cellulaire, le compostage ne semble pas avoir d'influence que la dégradation des composés actifs. La Bio-TEQ est de 53 µgBaP-EQ/g pour la boue brute et de 50 µgBaP-EQ/g pour la boue compostée. Par contre, une diminution de l'activité anti-AR est observée. l'activité anti-AR est de 299 µgFlu-EQ/g et de 284 µgFlu-EQ/g pour la boue brute et compostée, respectivement. Cette diminution est cohérente avec Kapanen et al. (2013), qui rapportent que la maturation des boues issues des traitements des eaux usées permettrait de réduire leur toxicité aiguë, leur génotoxicité et leur potentiel de perturbateur endocrinien.

2.2 Identification de molécules candidates aux activités biologiques observées dans une boue compostée

Une boue issue de procédé de compostage a été sélectionnée pour ses activités anti-androgéniques, *dioxine-like*, et œstrogéniques. L'EDA a été mis en œuvre sur cette échantillon dans le but d'identifier les ligands. L'extrait de boue a été fractionné à la fois en phase inverse et en phase normale. Il a été observé que l'extrait de boue n'est pas miscible avec le solvant de l'injection lors du fractionnement en phase inverse. Certains composés peuvent donc ne pas être injectés. Ce problème de miscibilité n'est pas apparu en phase normale. Par conséquent, seuls les résultats obtenus pour les fractions collectées en phase normale sont présentés.

Le profil biologique des activités agonistes est présenté Figure 67.

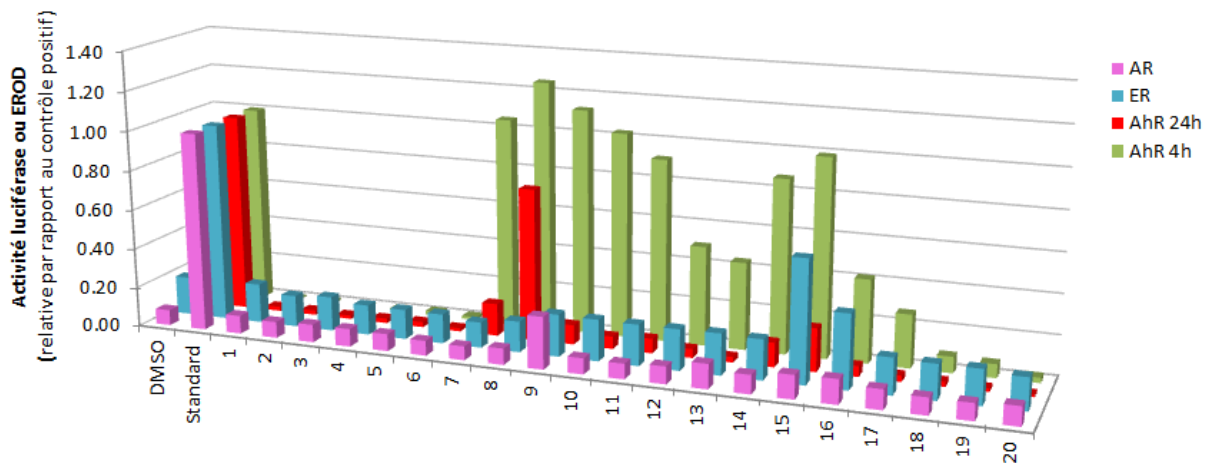


Figure 67 : Profil biologique de l'extrait de boue issue de compostage fractionné en phase inverse.

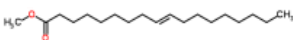
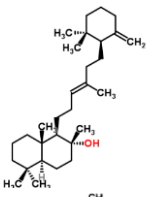
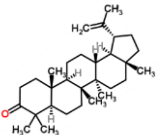
Il montre que suivant les activités mesurées, œstrogéniques, *dioxine-like* et androgéniques, plusieurs fractions sont actives. L'activité *dioxine-like* est étalée sur un grand nombre de fractions contiguës (F7 à F17). Par contre, l'activité œstrogénique est localisée sur quelques fractions F15 et F16. Finalement, certains fractions possèdent une double activité et induisent une réponse ER/AhR comme les fractions F15 et F16, ou AR/AhR comme la fraction F9. La présence de chevauchement d'activités peut être observée à l'issue de fractionnement basé sur un nombre restreint de fractions. En effet, plus le nombre de fraction est petit, plus la quantité de composés collectés dans une même fraction est importante, augmentant ainsi les probabilités de présence de ligands variés au sein de cette fraction (Creusot et al., 2013). Cependant, des chevauchements d'activités peuvent également être observés pour d'autres raisons, comme la présence de ligands communs pour plusieurs activités.

2.2.1 Composés connus et non ciblés pouvant expliquer l'activité *dioxine-like* et androgénique agoniste

Concernant l'activité *dioxine-like*, comme déjà énoncé, la réponse s'étale sur plusieurs fractions. Le fractionnement en phase normale balayant différentes polarités entre la collecte de la fraction F7 et F17 montre que les composés induisant cette réponse cellulaire possèdent des propriétés physico-chimiques variées. Pour la majorité des fractions actives sauf les fractions F7, F8 et F15, la réponse des cellules PLHC-1 ne persiste pas après 24h d'exposition suggérant la présence de composés métabolisables tels que les HAP (Louiz et al., 2008. Kinani et al., 2010). Ces composés ont déjà été détectés dans l'extrait de boue par GC-MS lors d'analyses chimiques ciblées et la présence de certains HAP (n=10) contribue à l'activité mesurée. Les mêmes HAP actifs ont été observés lors de l'étude sur les boues primaires et digérées dans la station d'épuration de Lille (article n°3). Parmi les fractions actives, la fraction F9 contient à la fois des ligands AhR et AR agonistes. L'activité androgénique n'avait pas été détectée lors de l'évaluation des effets biologiques sur l'extrait global. Seule une forte activité androgénique antagoniste avait été observée. Les ligands agonistes étaient

donc masqués par l'effet des ligands antagonistes. L'étape de fractionnement par HPLC a permis de déconvoluer les activités. Weiss et al. (2009) ont également mis en évidence par le fractionnement, la présence de ligands antagonistes qui était masquée par une activité agoniste pour des sédiments de rivière. Dans l'extrait de boue issue du procédé de compostage, la fraction montre une activité *dioxine-like* en plus d'induire une réponse androgénique. Cette fraction a été analysées par GC-QTOF afin d'identifier les molécules responsables des activités observées. La présence de triterpènes, du lupénone, de musc, de l'ambréine et d'acide gras, (9E)-9-octadécénoate de méthyle est suspectée (Tableau 26).

Tableau 26 : Liste des molécules suspectées, détectées par GC-QTOF dans la fraction F9 obtenue par fractionnement en phase normale de l'extrait de boue compostée.

Nom	Temps de rétention	Score NIST11	Formule brute	Structure	Masse monoisotopique ¹ (Da)	log KOW ²	CAS
(9E)-9-Octadécénoate de méthyle	20,4 min	87,66%	C19H36O2		296.2715	8,02	112-62-9
Ambréine	28,1min	85,58%	C30H52O		428.4018	11,68	473-03-0
Lup-20(29)-én-3-one	30,1 min	95,93%	C30H48O		424.3705	8,72	1617-70-5

¹base de donnée Chempidier

²valeur estimée par KOWWIN v1.67 (base de donnée Chempidier)

Comme exposé dans l'article n°3, la présence d'acides gras dans les boues des stations d'épuration est rapportée dans la littérature scientifique (Alves et al., 2001). Très peu d'informations sur les dangers biologiques que peut présenter le lupénone existent. Cependant, des données sur la toxicité de ces dérivés sont rapportées dans la littérature. Une étude a montré que le lupénone n'est pas cytotoxique sur la lignée cellulaire de poumons NSCLC-N6 à la différence de certains de ces produits oxydés (Mutai et al., 2004). Concernant l'ambréine, tout comme pour le lupénone, très peu de données sont disponibles. Seul un comportement de vasodilatateur semble lui être assignée (Taha et al., 1998). Aucune donnée n'a été trouvée concernant la mise en évidence ou non d'un éventuel potentiel de perturbateur endocrinien. La confirmation de l'identité des molécules dans l'échantillon de boue reste à effectuer avec l'analyse des étalons analytiques. Si leur présence se trouve effectivement validée, leur activité biologique devra être caractérisée.

2.2.2 Candidats à l'activité œstrogénique et *dioxine-like*

D'autres fractions possèdent également une double activité. Les fractions F15 et F16 induisent à la fois une réponse ER et AhR. Dans ses travaux de thèse, Dagnino, (2009) a estimé que 42% de l'activité AhR était induite par des ligands communs avec les récepteurs aux œstrogènes dans des boues de STEP. Parmi ces ligands, certains HAP comme par exemple le benzo(a)anthracène et le dibenzo(ah)anthracène sont cités pour se lier aux récepteurs AhR et ER (Villeneuve et al., 2002). La collecte de ces fractions correspond à l'élution de certains œstrogènes, ligands connus des récepteurs ER, comme l'œstrone et œstradiol. Cette correspondance a été mise en évidence par l'injection d'étalons analytiques lors de la calibration du fractionnement (Chapitre 4, §2.1, p114). L'œstrone dans l'extrait brut a été quantifiée à une concentration de 503,3 ng/g de matières sèches par IRSTEAs lors du programme ARMISTIQ. La présence d'17β-œstradiol, 17α-œstradiol, d'œstriol et de 17β-éthynylestradiol a été détectée mais n'a pas pu être quantifiée (IRSTEAs, communication personnelle). D'autres ligands œstrogéniques agonistes tels que les alkylphénols, notamment le 4-nonylphénol, et des plastifiants comme le bisphénol A ont également été détectés et quantifiés chacun à 2,2 µg/g de poids sec dans l'extrait brut de boue issu du traitement par compostage (LPTC, communication personnelle). Les fractions F15 et F16 ont été analysées par GC-QTOF. La présence de différents composés pouvant être classés en 3 familles, amine, acide gras et stéroïdes, a été mise en évidence dans les deux fractions (Figure 68). La majorité des molécules, absentes des blancs protocoles, est détectée dans les deux fractions mais possèdent des abondances variables. Des acides gras et des stérols structurellement proches du cholestan-3-one avaient déjà été suspectés dans des fractions de boue primaire et digérée présentant une activité œstrogéniques et *dioxine-like* (article n°3). Les identifications des composés doivent encore être confirmées par l'achat d'étalons analytiques. D'ores et déjà, des auteurs ont rapporté la présence de certains stérols tels que le cholestan-3-one et le sitostérol dans les stations d'épuration (Chaler et al., 2001; Fernandez et al., 2007; Smital et al., 2011. Furtula et al., 2012). Les boues sont également connues pour contenir différents acides gras (Appels et al., 2008). En plus de la confirmation de leur identité, les activités biologiques restent à être évaluées bien que certains comme le sitostérol par exemple sont déjà rapportés pour être des ligands agonistes des récepteurs aux œstrogènes (Tremblay et Van Der Kraak, 1998).

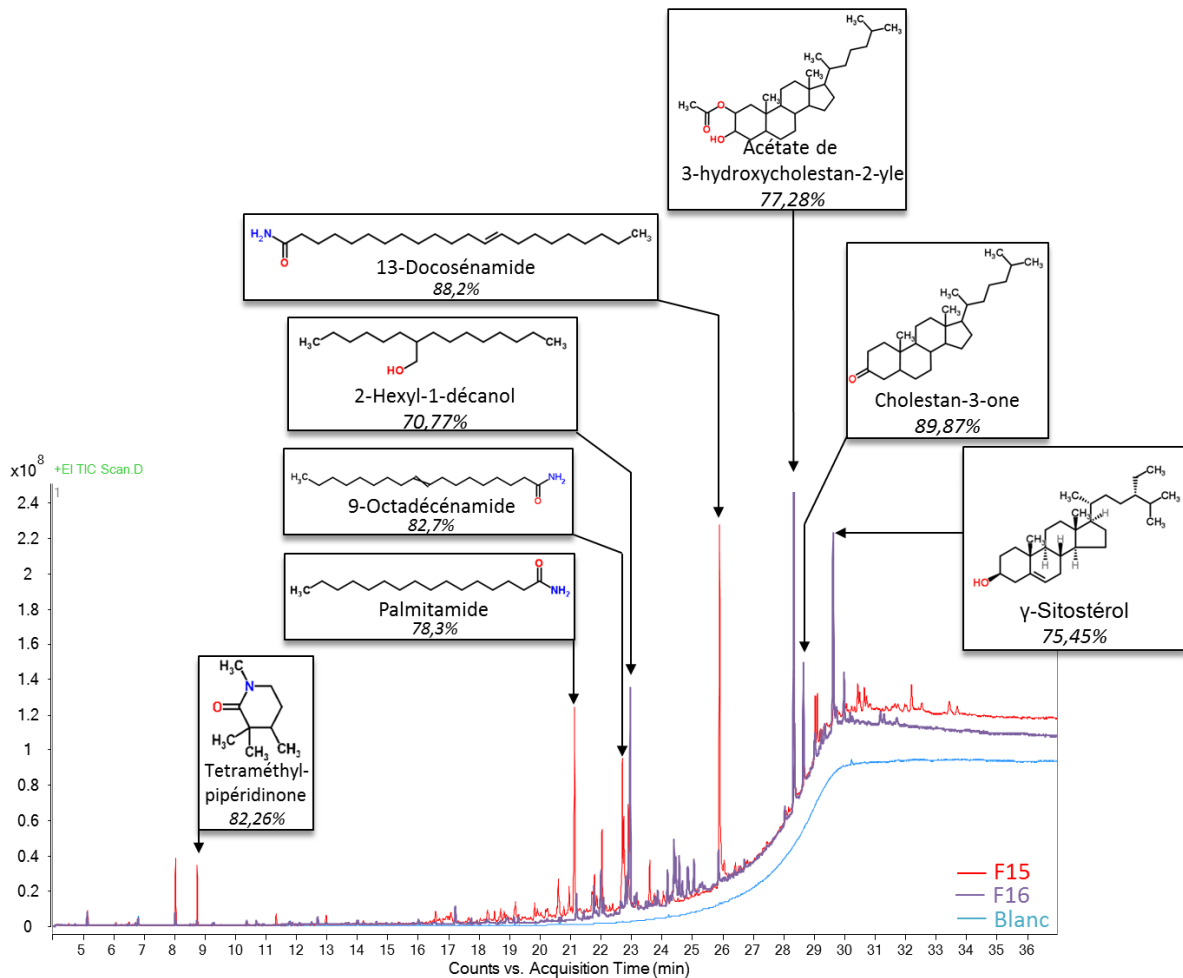


Figure 68 : Chromatogrammes et composés suspectés dans les fractions F15 et F16 de boue compostée ayant une activité œstrogénique et *dioxine-like*. Le score de comparaison des spectres de fragmentation avec les spectres présents dans les libraries NIST11 et W9N11 est écrit en italique.

2.2.3 Phtalates et muscs, ligands antagonistes aux récepteurs androgéniques

En plus de montrer des activités agonistes, l'extrait de boue issue du procédé de compostage possède une activité androgénique antagoniste. L'activité anti-androgénique a été évaluée sur lignée cellulaire MDA-kb2 par co-exposition à la DHT. Le test consiste à saturer à 80% les récepteurs androgéniques par l'ajout dans le milieu d'un ligand agoniste, la DHT (0,3nM). En présence de ligands antagonistes dans l'extrait, l'activité mesurée sera inférieure à cette valeur de saturation. Le profil de l'activité androgénique antagoniste à l'issue du fractionnement montre que les fractions F7, F8 et F10 induisent une réponse en lien avec la présence de ligands antagonistes (Figure 69). Au vu de ses activités, la fraction F8 a été analysée par GC-QTOF.

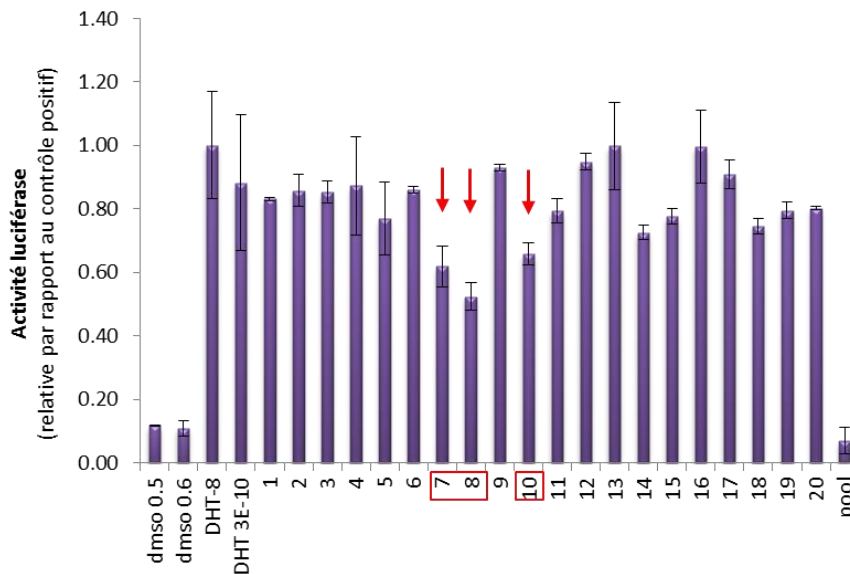


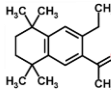
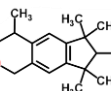
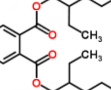
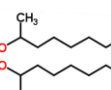
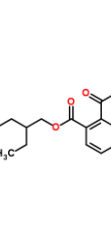
Figure 69 : Profil de l'activité androgénique antagoniste obtenu pour l'extrait de boue compostée fractionné en phase normale. Les barres d'erreur représentent les écartypes (n=3). Le « pool » qualifie le regroupement des fractions en un seul extrait afin de reconstituer l'extrait brut global après injection en HPLC. DMSO 0,5 et DMSO 0,6 correspondent aux deux blancs utilisés pour mesurer l'effet médié par le solvant lui-même. DHT⁻⁸ et DHT 3^{E-10} symbolisent l'activité induite par le composé de référence la DHT à deux concentrations différentes.

L'analyse a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs composés appartenant à la famille des muscs et des phtalates (Tableau 27). Une partie de ces molécules a déjà été référencée dans les boues de stations d'épuration (Clarke et Smith, 2011). La présence de galaxolide et de bis(2-éthylhexyle)phtalate peut être confirmée puisque ces composés avaient été détectés par des analyses chimiques ciblées par le CIRSEE aux concentrations élevées de 857mg/kg de boue et 29mg/kg de boue, respectivement. Parmi les molécules détectées par les analyses ciblées, ces deux composés sont avec le Fer les éléments les plus concentrés dans l'extrait de boue issu du traitement par compostage (projet ARMISTIQ). Ces composés peuvent présenter un risque puisqu'ils sont rapportés pour être des ligands antagonistes aux récepteurs androgéniques (Stroheker et al., 2005; Christen et al., 2010; Weiss et al., 2011). Par conséquent, ils contribuent à l'activité anti-androgénique observée dans la fraction F8 ainsi qu'à celle de l'échantillon. Une étude évaluant différentes activités *in vitro* de plusieurs isomères de tétralines et de la galaxolide a démontré que toutes ces molécules induisent une activité anti-androgéniques sur la lignée cellulaire HEK293 transfectée par le récepteur AR (Schreurs et al., 2005). Cette étude laisse penser que la tétraline suspectée dans la fraction F8 peut contribuer à l'activité anti-androgénique observée au même titre que les isomères de la galaxolide et le bis(2-éthylhexyle)phtalate.

En plus de présenter une activité anti-androgénique, la galaxolide et le bis(2-éthylhexyle)phtalate sont rapportés pour être des ligands PXR (Mnif et al., 2007) et agonistes de faible affinité avec les récepteurs aux œstrogènes (ER α) (Gomez et al., 2005; Takeuchi et al., 2005). Cependant l'activité œstrogénique n'a pas été observée dans la fraction analysée.

Ce résultat peut être expliquée par (1) le fait que les composés actifs n'induisent pas une réponse cellulaire assez importante pour être détectée, ou (2) que la fraction contient des ligands antagonistes et/ou des agonistes inverses qui rentrent en compétition avec les ligands agonistes présents (Kempainen et Wilson, 1996). Il est intéressant de noter que certains phtalates sont connus pour être à la fois des ligands agonistes et antagonistes des récepteurs œstrogéniques ER α et ER β , respectivement (Takeuchi et al., 2005). Un isomère du versalide, est aussi rapportée pour avoir une activité œstrogénique antagoniste (ER β) (Schreurs et al., 2005). Les activités biologiques peuvent également varier suivant les concentrations en composés qui influencent les interactions ligand/récepteur. Ainsi, une étude a rapporté que des mélanges de plastifiants (*i.e.* phtalates et bisphénol A) à faible concentration activaient le récepteur androgénique et à forte concentration possédaient un effet antagoniste fort (Christen et al., 2012). Des observations similaires ont également été observées pour des filtres UV activant les récepteurs des œstrogènes (Kunz et Fent, 2006).

Tableau 27 : Liste des molécules suspectées, détectées par GC-QTOF dans la fraction F8 obtenue par fractionnement en phase normale de l'extrait de boue compostée

Nom	Temps de rétention	Score ¹	Formule brute	Structure	Masse monoisotopique ² (Da)	log KOW ³	CAS	Description
Versalide	18,2 min	88,84%	C18H26O		258.1984	6.41	88-29-9	Musc
Isomères du galaxolide	18,6min, 18,8 min	93,43%, 93,35%	C18H26O		258.1984	6,23	1222-05-5	Musc
Bis(2-éthylhexyl) phtalate	24,2 min	90,99%	C24H28O4		390.2770	8.71	117-81-7	Plastifiant
Di-2-décanyle phtalate	26,3min	90,1%	C28H46O4		446.3396	10,83	28029-89-2	Plastifiant
Tricotyl trimellitate	30,3 min	90,28%	C33H54O6		546.3920	12,80	3319-31-1	Plastifiant

¹ Score selon les bases de données W9N11 et NIST11

² base de données Chemspider

³ valeur estimée par ACD/labs (base de données Chemspider)

Concernant l'activité *dioxine-like*, Schreurs et al. (2005) précisent que les dérivés de tétralines et la galaxolide n'ont pas montré d'activité *dioxine-like* sur DR-CALUX. A contrario, le bis(2-éthylhexyle)phtalate possède une faible affinité avec le récepteur AhR (Krüger et al., 2008). Cependant, la présence de HAP dans la fraction F8 n'est pas exclue. En

effet, sur la base de la calibration du fractionnement certains HAP sont élués au moment de la collecte de la fraction F8 (Chapitre 4, § 2.1, p 114). L'identification de composés par GC-QTOF ayant été effectuée uniquement sur les pics chromatographiques les plus intenses, il est possible que ces composés soient détectés mais pas traités.

Concernant les autres molécules suspectées, le di-2-décanyle phtalate et le tricoctyl trimellitate, aucune information n'a été trouvée quant à leurs activités biologiques respectives. Des études supplémentaires sont donc à entreprendre pour confirmer d'une part l'identité de ces composés par l'injection des composés étalons par GC-QTOF et d'autre part pour évaluer leurs éventuelles activités biologiques.

2.3 Conclusion

L'étude des différentes boues montre que quel que soit le prélèvement effectué, boues primaires, avant digesteur, digérées, déshydratées ou compostées, les échantillons contiennent des perturbateurs endocriniens. Les activités œstrogéniques et *dioxine-like* augmentent entre la boue primaire et la boue digérée mais l'activité PXR semble diminuer. Il a été observé que plusieurs activités biologiques existent au sein de la boue issue de compostage (activités œstrogéniques, dioxine-like et anti-androgéniques). Cette étape de maturation modifie la composition chimique de la boue et entraîne une augmentation de l'activité ER et une diminution, somme toute faible, de l'activité anti-AR. Cependant, le compostage ne semble pas influencer l'activité AhR. Par conséquent, la maturation des boues par compostage ne semble pas représenter une alternative intéressante pour réduire les perturbateurs endocriniens dans ce type de matrice. L'analyse dirigée par l'effet mêmée sur une boue compostée a permis de suspecter la présence de plusieurs contaminants tels que des stéroïdes, acides gras, muscs et phtalates comme perturbateurs endocriniens potentiels, en plus des micropolluants classiquement rencontrés dans les boues comme les HAP, stéroïdes, alkylphénols ou bisphénol A. L'identification de certains composés et leurs contributions aux activités observées restent à confirmer.

3 Recherche et identification de perturbateurs endocriniens dans les lisiers porcins

L'épandage de lisier représente la majorité des amendements agricoles (Dudkowski, 2000). Riche en éléments fertilisants, le lisier est également identifié comme une source importante d'hormones dans l'environnement (Combalbert et al., 2012). En plus des médicaments vétérinaires utilisés dans les aliments et l'eau pour améliorer les performances de croissance ou pour prévenir les infections dans les élevages intensifs (Sarmah et al., 2006; Combalbert et al., 2010), les animaux peuvent également être en contact avec de nombreux perturbateurs endocriniens comme les HAP, les dioxines, les phtalates, les détergents provenant des activités agricoles (Ciganek et Neca, 2008). Ces perturbateurs endocriniens sont finalement concentrés dans le lisier et font du lisier utilisé comme engrais pour les sols

agricoles, une source de contamination de l'environnement. En effet, une étude précédente a rapporté que le lisier porcins induisait une forte activité œstrogénique et *dioxine-like*. Ces effets n'ont pas pu être expliqués par les composés actifs détectés (œstrogènes, HAP) par les analyses chimiques conventionnelles.

Par conséquent, l'analyse dirigée par l'effet a été mise en œuvre sur un échantillon de lisier fortement actif dans le but d'identifier les molécules responsables des activités mesurées. Le lisier prélevé a été extrait par ASE (Chapitre 3, §4.2, p 79), puis fractionné par SPE suivant un gradient de polarité en quatre fractions (F1-F4), la fraction F1 étant la plus apolaire (Chapitre 3, §5.1, p85). Après évaluation de l'activité œstrogénique (cellule MELN) et *dioxine-like* (cellule HAhLP), la fraction la plus active a été fractionnée par RP-HPLC en 40 sous-fractions (f1 à f40) (Chapitre 3, §5.2.2, p 87). Les sous-fractions présentant un effet ont été analysés chimiquement par LC-MS/MS, GC-MS, GC-ECD et par LC-QTOF. Les résultats obtenus sont exposés dans l'article n°4 publié dans le journal ARET-Actualités (Mars 2015, p35-45).

Article n°4 : *Apport de l'analyse dirigée par l'effet (« Effect-Directed Analysis », EDA) à la recherche et l'identification de perturbateurs endocriniens dans les lisiers porcins destinés à l'épandage agricole*

3.1 Détection de composés connus dans les fractions de lisier

Dans un premier temps, l'extrait de lisier a été fractionné par SPE. Les activités œstrogéniques et *dioxine-like* sont contenues à environ 70% dans la fraction F2 suggérant la présence de ligands plutôt apolaires (Figure 70).

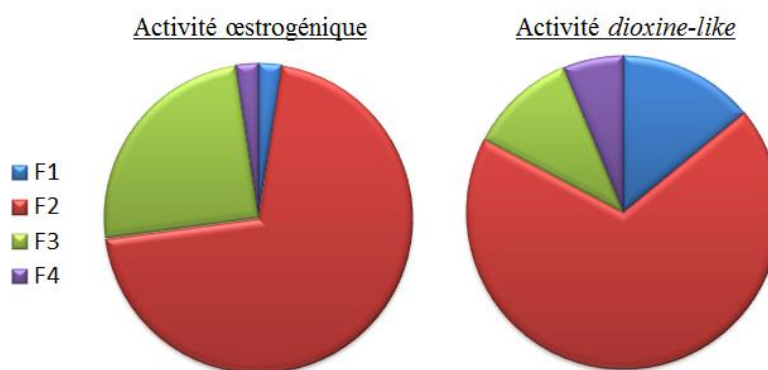


Figure 70 : Activités œstrogéniques et *dioxine-like* mesurées dans chaque fraction de l'extrait de lisier obtenues par SPE.

Au vu de son activité, cette fraction a été sélectionnée pour subir une étape de fractionnement par RP-HPLC. Parmi les 40 sous-fractions qui ont été collectées, 9 sont actives sur récepteurs AhR et 15 sur les récepteurs aux œstrogènes. Cependant, une majeure

partie des effets biologiques a été perdue au cours des processus successifs de fractionnement. Les nombreuses manipulations (*e.g.* évaporation, reprise, injections...) peuvent être responsables des pertes observées. Un autre point pouvant entraîner une perte est le fractionnement par RP-HPLC non adapté pour la fraction F2 apolaire (*e.g.* mauvaise solubilité des composés dans le solvant d'injection). Pour ce type de fraction et de matrice, un fractionnement par NP-HPLC aurait peut-être limité les pertes d'activités biologiques.

L'identification par analyses chimiques a été réalisée sur les sous-fractions f18 et f23 ayant la plus forte activité AhR ainsi que les sous-fractions f13, f19 à f22 présentant la plus forte activité œstrogénique. Des analyses chimiques ciblées sur 253 molécules appartenant à 5 familles différentes, ont permis d'identifier la présence de 5 stéroïdes (3 œstrogènes et 2 androgènes), 5 composés pharmaceutiques, un pesticide, un PCB et un HAP dans les sous-fractions sélectionnées (Tableau 2, article n°4, p333). Outre les œstrogènes, le 17 α -, le 17 β -l'œstradiol, l'œstrone, et l'antibiotique, la lincomycine, aucun des autres composés n'est référencé dans la littérature scientifique pour être détecté dans les lisiers porcins. Cependant, plusieurs auteurs précisent que ces familles de molécules (autres médicaments, pesticides, HAP et PCB) peuvent être présentes à cause des activités agricoles environnantes (Soleille et Brignon, 2006; ANSES, 2010; Capdeville, 2011). La détection de ces composés, qui sont pour la majorité non actifs, n'a pas permis d'expliquer les activités biologiques observées. Une analyse non ciblée a été effectuée pour tenter d'identifier les molécules à risque.

3.2 Recherche de molécules non ciblées par LC-QTOF

Les sous-fractions f13, f19, f20 et f23 ont été analysées par LC-QTOF. Les données obtenues par HRMS en mode d'ionisation positif ont mis en évidence la présence de plus d'une centaine de composés dans chaque sous-fraction avec les paramètres de traitement sélectionnés. Si l'attribution des formules brutes a été possible pour une grande partie des molécules détectées, aucune correspondance des spectres de fragmentation avec ceux disponibles dans les bibliothèques de spectres n'a pu être établie. Les ions fragmentés ont été analysés sur un logiciel (*Molecular structure correlator*, Agilent technologies) qui se base sur des algorithmes mathématiques pour prédire la structure moléculaire. Une trentaine de molécules ayant des scores de prédiction supérieurs à 80% ont pu ainsi être identifiées dans la fraction f13. Un exemple de composés suspectés dans cette fraction est exposé dans le tableau 3 de l'article n°4. Des acides gras, médicaments et métabolites de composés pharmaceutiques sont suspectés.

Seul le métabolite, le O-desméthylquinidine (score prédictif de 91,72%) a pu être acheté mais non confirmé dans la sous-fraction. Ce résultat montre que l'emploi de logiciel basé sur des algorithmes n'est à l'heure actuelle pas totalement efficace. Des tests sur la reconnaissance par ce logiciel après injection d'étalons analytiques (13 composés pharmaceutiques injectés à une concentration de 100 ng/g) confirment ce fait (Chapitre 5, §4.3.2, p150). Les scores MS/MS correspondant à la bonne proposition sont systématiquement inférieurs à 80%, les scores supérieurs correspondant à d'autres composés.

Pour des concentrations plus faibles, même si elles sont suffisantes pour donner un spectre de fragmentation convenable pour une interprétation manuelle, le logiciel ne permet pas d'identifier de façon exacte les molécules. Ce constat pose des problèmes quant à l'identification de composés dans des échantillons environnementaux et d'autant plus dans des sous-fractions qui peuvent posséder des concentrations en composés faibles.

Pour les autres molécules suspectées, ayant un score intéressant, les composés de synthèse n'ont pas pu être achetés dans le commerce. En l'absence de standards analytiques, la confirmation chimique (*i.e.* l'identification) mais également biologique (*i.e.* activité *in vitro* des composés) n'est pas possible. L'étape de confirmation représente un point bloquant dans la finalisation de l'analyse dirigée par l'effet (Brack et al., 2008). Par conséquent, le développement de bases de données spectrales constitue une des innovations majeures pour une utilisation aboutie de l'analyse dirigée par l'effet. Des bibliothèques communautaires de spectres (*e.g.* MassBank), pouvant être continuellement complétées par les laboratoires, sont aujourd'hui disponibles pour permettre d'avancer dans cette étape d'identification et de confirmation. Cependant, le manque d'harmonisation des méthodes analytiques entre les laboratoires fait que la comparaison des spectres reste limitée. Pour pallier à ce problème, des comparaisons inter-laboratoires concernant les acquisitions par spectrométrie de masse haute résolution commencent à être mis en œuvre notamment dans le cadre du consortium européen Norman.

3.3 Conclusion

L'analyse dirigée par l'effet mise en place sur les lisiers porcins a permis de détecter la présence de 13 molécules dans les sous-fractions présentant des activités œstrogéniques et *dioxine-like*. Parmi ces composés, les œstrogènes contribuent à l'activité œstrogénique mesurée. Cependant, cette étude a montré que l'EDA possédait certaines limites. Malgré un fractionnement séquentiel, les sous-fractions générées contiennent une quantité encore importante de molécules rendant l'identification par HRMS longue et complexe. Le nombre relativement faible de spectres de fragmentation disponibles dans les bases de données, et les logiciels de prédiction de structure à améliorer, font que l'identification de molécules reste délicate sur des échantillons extrêmement complexes comme les lisiers. A cela s'ajoute le manque d'étalons analytiques disponibles commercialement qui malheureusement empêche la finalisation de la caractérisation chimique. Cependant, l'approche dirigée par l'effet reste l'une des rares alternatives intéressantes pour l'identification de molécules non ciblées ou inconnues représentant un risque biologique.

Bilan de l'apport de l'EDA à l'étude des déchets organiques destinés à l'épandage agricole

1 Mise en évidence de composés potentiellement à risque dans les boues de STEP

L'analyse dirigée par l'effet a été réalisée sur des boues de STEP issues de plusieurs procédés de traitement dans le but d'identifier la présence de perturbateurs endocriniens. Deux étapes de fractionnement ont été entreprises un par SPE (4 fractions générées, F1-F4) et le second par HPLC. Les résultats acquis sont :

Pour les boues primaires et digérées des stations d'épuration :

- Les fractions les plus apolaires, F1, obtenues par SPE contiennent la majorité des HAP présents dans l'échantillon. Plusieurs HAP détectés peuvent contribuer à l'activité AhR mesurée : l'acénaphthylène, le fluorène, le benzo[g,h,i]pérylène, l'indeno[1,2,3-c,d]pyrène, le benzo[a]pyrène, le benzo[e]pyrène, le benzo[a]anthracène, le chrysène, le benzo[b]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène, le pyrène.
- Des stéroïdes ont été détectés dans les fractions F3. Les hormones identifiées par les analyses chimiques ciblées sont : la prégnenolone, le 4-androstène-3,17-dione, la progestérone, l'œstriol, la testostérone, l'œstrone et le 17β-œstradiol. Une partie de ces composés contribue à l'activité ER mesurée.
- Les boues évoluent durant les procédés de traitement : (1) la concentration totale en HAP augmente entre la boue primaire et la boue digérée, 1,44 µg/g et 2,83 µg/g, respectivement. Il est observé en parallèle une augmentation de l'activité AhR dans ces deux échantillons ; (2) les concentrations de 4-androstène-3,17-dione, de progestérone et d'œstrone augmentent entre les boues primaires et digérées alors que la prégnenolone diminue montrant la présence de phénomènes de transformation.
- Les composés identifiés montrent que les boues possèdent d'autres activités biologiques non recherchées comme les activités androgéniques, anti-minéralocorticoïdes et anti-progestatives.
- Le fractionnement par HPLC a révélé la présence d'effets cocktails entre les molécules activant les récepteurs X des prégnanes.
- Les analyses par GC-QTOF et LC-QTOF sur les fractions obtenues par HRMS ont permis de : (1) suspecter plusieurs composés : le méthylstéarate, le palmitate de méthyle, l'acide palmitique, l'acide 6-octadécanoïque, l'androstérone, le cholest-4-én-3-ol et le triclosan ; (2) confirmer la présence de chorofène, ligand agoniste aux récepteurs des œstrogènes.

Pour la boue de station d'épuration ayant été compostée présentant des activités ER, AhR et anti-AR :

- Le fractionnement a permis de mettre en évidence la présence d'une activité AR agoniste, non détectée dans l'échantillon global traduisant l'existence d'effets mélange entre les composés.
- Plusieurs familles de molécules sont suspectées dans les fractions obtenues par NP-HPLC analysées par GC-QTOF : acides gras, stéroïls, muscs et phtalates parmi lesquels des perturbateurs endocriniens reconnus, la galaxolide, le bis(2-éthylhexyle)phtalate, le sistérol.
- La galaxolide et le bis(-éthylhexyle)phtalate ayant été identifiés dans la boue compostée lors d'analyses chimiques ciblées, leur présence peut être confirmée. Ces molécules sont rapportées pour être des ligands antagonistes des récepteurs aux androgènes et ligands agonistes aux récepteurs des œstrogènes et PXR. Le bis(2-éthylhexyle)phtalate possède également une affinité avec les récepteurs AhR.

L'analyse dirigée par l'effet effectuée sur les boues de STEP a permis de mettre en évidence la présence d'effets mélange entre les composés pour l'activité PXR et AR.

Les boues primaires, digérées et compostées renferment une multitude de composés organiques parmi lesquels de nombreux perturbateurs endocriniens. En plus des molécules détectées couramment, HAP et stéroïdes, d'autres composés présentant un risque pour l'environnement ont été mis en évidence grâce à l'EDA : chlorofène, galaxolide et bis(2-éthylhexyle)phtalate.

Les composés identifiés montrent que les boues de STEP induisent des activités biologiques variées. En plus des activités ER, AhR et PXR mesurées dans les boues primaires et digérées, les molécules détectées peuvent induire des réponses anti-MR, anti-PR, AR.

L'EDA a permis de révéler la complexité de telles matrices.

2 Identification de molécules dans les lisiers porcins par l'approche EDA

L'analyse dirigée par l'effet a été appliquée à des lisiers provenant d'élevages porcins présentant des activités ER et AhR non expliquées par les composés détectés par les analyses chimiques ciblées. Deux étapes de fractionnement ont été entreprises la première par SPE (4 fractions générées, F1-F4) et la seconde par HPLC (40 sous-fractions collectées). Les résultats obtenus sont :

- Les activités ER et AhR sont contenues à 70% dans la fraction F2 obtenue par SPE de propriété apolaire. Les molécules actives sont plutôt hydrophobes, ce qui signifie qu'elles ne sont donc pas forcément lessivables.

- 25% de l'activité ER est observée dans la fraction F3 majoritairement expliquée par la présence d'œstriol (68,4 ng/g) et de 17β-œstradiol (0,7 ng/g).
- Les analyses chimiques ciblées effectuées sur les sous-fractions actives ont détecté la présence de stéroïdes comme ligands agonistes ER (œstrone, 17β-œstradiol, 17α-œstradiol 4-androstène-3,17-dione, 11-kétotestostérone), de composés pharmaceutiques (bromazépam, théophylline, doxépine, imipramine, lincomycine), de PCB 118, d'anthracène et de pesticides à l'état de traces (azoxystrobine).
- La détection de certains composés comme par exemple le 4-androstène-3,17-dione et la 11-kétotestostérone, montre la présence de phénomène de transformation par des microorganismes présents au sein des lisiers.
- La présence de PCB118, anthracène et azoxystrobine illustre l'influence du milieu environnant sur la contamination possible des lisiers.
- L'analyse par LC-QTOF a mis en évidence la présence de plus d'une centaine de molécules dans chaque sous-fraction allant jusqu'à 513 composés pour la sous-fraction ayant la plus forte activité ER (f13).
- Aucun nom de molécules n'a pu être confirmé par manque de banques de spectres et d'étalons analytiques.

L'analyse dirigée par l'effet a permis d'identifier plusieurs molécules pouvant présenter un danger pour l'environnement dans les lisiers porcins comme des perturbateurs endocriens (œstrone, 17β-œstradiol, 17α-œstradiol 4-androstène-3,17-dione, 11-kétotestostérone) mais également des composés reconnus toxiques comme l'azoxystrobine, l'anthracène, le PCB 118.

L'étude montre aussi que malgré plusieurs processus de fractionnement, les fractions restent relativement complexes et que l'analyse par HRMS ne permet pas systématiquement de conclure sur l'identification de molécules. Elle souligne que le développement de bibliothèques spectrales est, à l'heure actuelle, indispensable.

Article n°3

Profils biologiques de boues de stations d'épuration urbaines associés à l'identification de perturbateurs endocriniens par l'analyse dirigée par l'effet

Profils biologiques de boues de stations d'épuration urbaines associées à l'identification de perturbateurs endocriniens par l'analyse dirigée par l'effet

GARDIA-PARÈGE Caroline¹, **DÉVIER** Marie-Hélène¹, **HERNANDEZ-RAQUET** Guillermina⁴,
MAZELLIER Patrick¹, **BALAGUER** Patrick², **BUDZINSKI** Hélène^{1*}

1 EPOC-LPTC, UMR 5805 CNRS, Université Bordeaux 1, 351 cours de la libération, 33405 Talence cedex, France.

2 IRCM, INSERM U896, ICM, UM1 - Parc Euromédecine, F-34298 Montpellier cedex 5, France.

3 LISBP INSA - UMR INSA/CNRS 5504 - UMR INSA/INRA 792, 135 avenue de Ranguel, 31077 Toulouse Cedex 04, France.

*Correspondant : Hélène BUDZINSKI

h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr, tel +33 540 006 998, fax +33 540 002 267

RÉSUMÉ

La valorisation des boues de stations d'épuration par épandage sur les sols agricoles soulève plusieurs questionnements quant à l'émission de perturbateurs endocriniens dans l'environnement. Dans cette étude, les activités biologiques liées à la présence de ces contaminants ont été suivies dans des boues de deux stations d'épuration à différents stades du traitement (primaire, avant digesteur, digérée et déshydratée). L'évaluation a été effectuée par l'utilisation de trois lignées cellulaires luminescentes (HELN-ER, AhR et HG₅LN-PXR) exprimant les récepteurs aux œstrogènes (ER), le récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR) et le récepteur X des prégnanes (PXR). Ces tests biologiques ont permis de mettre en évidence la présence de ligands aux récepteurs employés dans les échantillons étudiés. L'analyse dirigée par l'effet (EDA) a été mise en place afin d'identifier les composés biologiquement actifs. Deux étapes successives de fractionnement par extraction sur phase solide (SPE) puis chromatographie en phase liquide (HPLC) ont été réalisées sur les extraits de boues afin de réduire la complexité de la matrice et séparer les molécules d'intérêt. Les composés présents dans les fractions biologiquement actives ont été identifiés par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS, GC-MS/MS) et haute résolution (GC-QTOF, LC-QTOF). Plusieurs molécules ayant un effet biologique ont pu être ainsi identifiées. Les composés appartiennent à différentes classes de composés telles que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les hormones (*e.g.* androsténone, cholest-4-én-3-ol), les acides gras (*e.g.* acide palmitique) et les biocides (*e.g.* chlorofène). L'étude a montré que les procédés de traitement des boues étudiés étaient inefficaces pour réduire les activités biologiques voir au contraire pouvaient même générer des effets au cours de la filière.

Mots clés : Boue de stations d'épuration, perturbateurs endocriniens, analyse dirigée par l'effet, spectrométrie de masse en tandem, spectrométrie de masse haute résolution

INTRODUCTION

Le traitement des eaux usées en France produit chaque année plusieurs millions de tonnes de boues. En 2010, 1,5 million de tonnes de matières sèches provenant des boues de stations d'épuration ont été produits (www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr). Pour les détruire, l'incinération est pratiquée dans une minorité de cas. Mais cette méthode vise à être réduite (Art-46 du Grenelle 1 paru le 23 Juillet 2009). Une seconde pratique vise à valoriser les boues. Riche en éléments nutritifs, ces déchets organiques sont le plus souvent utilisés comme amendements sur les sols agricoles (Dudkowski, 2000). Cependant, le phosphore, l'azote et le potassium ne sont pas les seuls éléments présents ; des métaux et micropolluants variés sont également détectés (Alloway et Jackson, 1991; Clarke and Smith, 2011). Après épandage, ces polluants peuvent migrer vers le milieu aquatique (*i.e.* rivières, eaux souterraines...) par lessivage des sols ou lixiviation. L'une des préoccupations environnementales majeures est l'étude des perturbateurs endocriniens présents dans les boues. Différentes études ont pu montrer que ces déchets organiques induisent des effets biologiques qui sont imputables aux perturbateurs endocriniens (Muller et al., 2008; Zhang et al., 2009). En plus des molécules connues, d'autres composés non recherchés ou issus de processus de transformation biotiques et abiotiques peuvent être présents et représenter un danger environnemental.

L'analyse dirigée par l'effet (*Effect Directed Analysis*, EDA) a permis de rechercher et d'identifier avec succès des molécules « inconnues » présentant un danger pour l'environnement dans différentes matrices (Tobias Schulze et al., 2010; Creusot et al., 2013; Simon et al., 2013). Cette approche bio-analytique est basée sur la simplification séquentielle de l'échantillon grâce à l'utilisation de tests biologiques et de techniques physico-chimiques de fractionnement, dans le but de séparer les molécules d'intérêts. Les fractions obtenues montrant un effet biologique sont caractérisées chimiquement afin d'identifier les composés contenus. Les molécules identifiées sont ensuite testées biologiquement afin de confirmer leur effet biologique (Brack, 2003).

Dans cette étude, l'activité biologique en lien avec la présence de perturbateurs endocriniens est étudiée dans les boues, provenant de différents stades de traitement de deux stations d'épuration. Les recherches se sont focalisées sur la détection de ligands œstrogéniques, *dioxine-like*, et xénobiotiques par l'utilisation respective des récepteurs des œstrogènes (ER), des hydrocarbures aromatiques (AhR) et des prégnanes (PXR). Dans le but de simplifier les échantillons et d'identifier les molécules, l'approche dirigée par l'effet a été réalisée sur des échantillons. Les extraits de boues ont été fractionnés par extraction sur phase solide (SPE). Après évaluation des activités biologiques, des fractions de boue primaire et boue digérée ont ensuite été fractionnées plus finement par chromatographie en phase liquide (HPLC). Les fractions actives obtenues par SPE et HPLC ont été analysées par spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS, GC-MS/MS) et spectrométrie de masse haute résolution (GC-QTOF, LC,QTOF) afin d'identifier des molécules responsables des activités mesurées.

MATÉRIELS & MÉTHODES

Matériels, réactifs et composés

Tous les solvants étaient de qualité HPLC provenant de VWR International (Strasbourg, France), Acros Organics (Noisy le Grand, France), Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France) et Atlantic labo-ICS (Bruges, France). L'acide formique et le fluorure d'ammonium a été fournis par Atlantic labo (Bruges, France). L'eau ultra-pure a été préparée sur un système Milli-Q équipé d'un filtre EDS-PAK (Millipore SA, Guyancourt, France).

Les cartouches SPE (LC-Si, 500 mg – 6 mL, 45 µm ; Sulpelco) ont été achetées chez Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

L'argon (99,999%) a été fourni par Linde Gas (Bassens, France).

Les composés et leurs homologues marqués par isotopes stables (pureté >90%) ont été obtenus auprès de Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), CDN Isotopes (Montréal, Canada), Cambridge Isotopes Laboratories (Tewksbury, MA, USA), LGC Standard (Molsheim, France), Cluzeau Info Labo (Ste Foy La Grande, France) et Santa Cruz (Heidelberg, Allemagne).

Sites d'études et préparations des échantillons

Deux stations d'épuration, de Lille et d'Achères, situées au Nord de la France ont été prélevées (Tableau 1). Les quatre boues ont été échantillonnées le long du processus de traitement des eaux usées :

- Les boues primaires représentant la matière organique obtenue après décantation des eaux usées (prélevées dans les deux stations).
- Les boues avant digesteur correspondant aux boues ayant subies un épaissement statique gravitaire (prélevées seulement dans la station de Lille).
- Les boues déshydratées (prélevées seulement dans la station d'Achères)
- Les boues digérées anaérobies (prélevées dans les deux stations).

Tableau 1 : Caractéristiques des stations d'épuration étudiées.

STEP	Capacité (EH)	Nature	Procédés de traitement de l'eau	Traitement de la filière boue	Échantillonnage (code échantillon)
Lille	750 000	Urbaine	Dénitrification Desphosphatation Boue activée	Digestion anaérobie mésophile	Boues primaires Boues avant digesteur Boues digérées
Achères	6 000 000	Urbaine	Dénitrification Desphosphatation Boues activées Biofiltres	Epaississement statique gravitaire Stabilisation aérobie Digestion anaérobie mésophile	Boues primaires Boues déshydratées Boues digérées (

STEP : station d'épuration

EH : Equivalent habitant, c'est-à-dire, la quantité de pollution apporter par personne et par jours.

2 x 1 g de boues lyophilisées, tamisées et mélangées avec du sulfate de sodium anhydre ont été extraits par extraction sous solvant pressurisés (*Accelerated Solvent Extraction, ASE[®]*). Deux procédures successives ont été effectuées. L'extraction a tout d'abord été réalisée avec un mélange méthanol/acétone (50/50, v:v) à 75°C et 105 bars puis par un mélange hexane/acétone (50/50, v :v) à 120°C et 100 bars. L'extrait (20 mL) a été évaporé sous flux d'azote puis repris dans 8 mL de méthanol et stocké à -20°C.

Bio-essais employés pour l'évaluation des activités biologiques

Les lignées cellulaires HAhLP, HELN-ER α et HG₅LN-PXR ont été employées dans cette étude pour mesurer respectivement l'activité *dioxine-like*, œstrogénique et des xénobiotiques. Ces bio-essais utilisant respectivement les récepteurs des hydrocarbures aromatiques (AhR), aux œstrogènes (ER), et des récepteurs X des prégnanes (PXR), sont des modèles cellulaires ayant intégré de manière stable un gène rapporteur codant pour la luciférase. La culture des cellules et le protocole d'exposition pour les différentes lignées sont décrits en détail par plusieurs auteurs (Balaguer et al., 2001; Pillon et al., 2005a; Escande et al., 2006; Lemaire et al., 2006; Molina-Molina et al., 2008; Creusot et al., 2010).

En résumé, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à une densité d'environ 5×10^4 cellules par puits. Après adhésion des cellules, l'échantillon dilué dans le milieu de culture a été déposé dans chaque puits. Après 16 h d'incubation, du milieu de culture contenant de la luciférine (0,3 mM) a été ajouté à la plaque préalablement vidée et la luminescence a été mesurée. Une courbe dose-réponse a alors été établie et l'activité exprimée en pourcentage par rapport à celle du composé de référence, la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzodioxine (TCDD) à 10 nM pour l'activité *dioxine-like*, le 17 β -œstradiol (E2) à 10 nM pour l'activité œstrogénique et le SR12813 à 1 μ M pour l'activité des xénobiotiques.

Procédure de fractionnement

Un fractionnement séquentiel a été réalisé sur les extraits de boues. Le protocole est décrit en détail dans Creusot et al. (2013).

Les extraits de boues obtenus par ASE ont été préalablement évaporés sous flux d'argon et repris dans de l'heptane afin d'être fractionnés par SPE en utilisant des cartouches de silice. Après conditionnement à l'heptane, l'échantillon est déposé sur la cartouche et les composés ont été élués séquentiellement par plusieurs solvants permettant de balayer une large gamme de polarité : heptane, un mélange heptane/dichlorométhane (50/50, v:v), d'acétate d'éthyle, puis un mélange méthanol/eau ultra-pure (50/50, v:v). Une fraction a été collectée à chaque étape d'éluion, la première fraction commençant au moment du dépôt. Les quatre fractions (F1 à F4) ont ensuite été évaporées à sec sous flux d'argon et reprises dans du méthanol. Chaque fraction a été divisée en deux aliquotes. Une aliquote a été destinée aux analyses biologiques, la seconde a été conservée pour une deuxième étape de fractionnement. Toutes les fractions ont été stockées à -20°C.

Sur la base des activités biologiques observées, les fractions F3 de la boue primaire et les fractions F2 et F3 de la boue digérée obtenues par SPE provenant de STEP de Lille, ont été choisies afin d'être fractionnées par HPLC (Tableau 1). La simplification a été réalisée par HPLC couplée à un détecteur UV (Agilent 1200 Series HPLC system, Agilent Technologies, France) et à un collecteur de fractions (Agilent 1260 Infinity Series, Agilent Technologies, France). Les composés présents ont été séparés en phase inverse (RP-HPLC) sur une colonne greffée C18 (Spherisorb ODS2, 5 µm, 4,6 x 250 mm ; Waters, Guyancourt, France). Le débit a été fixé à 1 mL/min. Le gradient d'une durée totale de 125 min est le suivant : le gradient débute avec un mélange eau ultra-pure/acétonitrile (80/20, v:v), à 60 min il est composé de 45 % d'acétonitrile, il augmente linéairement pour atteindre 100 % d'acétonitrile à 100 min puis reste isocratique pendant 20 min ; finalement il revient instantanément à sa composition initiale eau/acétonitrile, maintenue pendant 5min. La collecte des fractions a été effectuée toutes les 3 min sur 120 min. Les 40 sous-fractions obtenues par RP-HPLC (f1 à f40) ont été évaporées à sec sous flux d'argon et reprises dans du méthanol. Toutes les sous-fractions ont été suivies par gravimétrie et stockées à -20°C.

Analyses chimiques ciblées

Les analyses chimiques ont été ciblées sur deux familles de composés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les stéroïdes pouvant expliquer l'activité AhR et ER, respectivement. La recherche de ces composés a été effectuée sur les fractions obtenues par SPE montrant des activités *dioxine-like* et œstrogéniques (F1, F2 et F3). La quantification des composés, pour toutes les analyses, a été réalisée par étalonnage interne (analyses marquées par des isotopes stables).

Analyses des hydrocarbures aromatiques polycycliques par GC-MS/MS

La détection des HAP a été réalisée sur les fractions F1 et F3 de la boue primaire et sur les fractions F1, F2 et F3, de la boue digérée de la STEP de Lille. Les HAP ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse en tandem (GC-MS/MS (GC série 7890, QqQ série 7000 B, Agilent Technologies). Les analytes ont été séparés sur une colonne analytique 95 % phényl- 5 % méthyl-siloxane (HP5-MS, 30 m x 250 µm x 0,25 µm, Agilent technologies, France). Les échantillons ont été injectés dans la source en mode pulsé sans division de flux, 280°C. Le gradient de température, d'une durée de 33 min est le suivant : 50 C pendant 2 min puis 10°C.min⁻¹ jusqu'à 310 C maintenue durant 5 min. Les HAP ont été ionisés par impact électronique à 70 eV et ont été analysé en mode « Single Ion Monitoring » (SIM). La liste des analytes et leurs étalons internes est détaillée dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Liste des HAP et de leurs homologues marqués analysés par GC-MS/MS.

Composés	Étalons internes	Ion de quantification (m/z)
Naphtalène	naphtalène-d8	128
Acénaphthylène	phénanthrène-d10	152
Acénaphthène	phénanthrène-d10	154
Fluorène	phénanthrène-d10	166
Dibenzothiophène	dibenzothiophène-d8	184
Phénanthrène	phénanthrène-d10	178
Anthracène	anthracène-d10	178
Fluoranthène	fluoranthène-d10	202
Pyrène	fluoranthène-d10	202
Benzo[a]anthracène	chrysène-d12	228
Triphenylène + Chrysène	chrysène-d12	228
Benzo[b]naphato(1,2-d)thiophène	chrysène-d12	252
Benzo[b,j,k]fluoranthène	benzo[e]pyrène-d12	252
Benzo[e]pyrène	benzo[e]pyrène-d12	252
Benzo[a]pyrène	benzo[a]pyrène-d10	252
Pérylène	benzo[a]pyrène-d10	252
Indeno(1,2,3-c,d)pyrène	benzo[g,h,i]pérylène-d12	276
Dibenzo[a,h]anthracène	benzo[g,h,i]pérylène-d12	276
Benzo[g,h,i]pérylène	benzo[g,h,i]pérylène-d12	278

Analyses des stéroïdes par LC-MS/MS

La détection des stéroïdes a été réalisée sur les fractions F3 de la boue primaire et de la boue digérée de la STEP de Lille.

Les stéroïdes ont été analysés par chromatographie en phase liquide ultra performance (UPLC Acquity Waters) couplée à un spectromètre de masse en tandem Quattro Premier XE triple quadropôle (Waters, Guyancourt, France). Les composés ont été séparés en phase inverse sur une colonne analytique de type C18 (Kinetex[®] C18, 1,7 µm, 100 x 2,1 mm, Phenomenex, Agilent Technologies, France) maintenue à une température de 35 C. 5 µL des fractions à analyser ont été injectés. La phase mobile est constituée d'eau ultra-pure contenant 0,1 % d'acide formique (A) et d'acétonitrile contenant 0,1 % d'acide formique (B). Le gradient qui a été utilisé est le suivant : la séparation des composés débute à 20 % de B, augmente jusqu'à 40 % de B en 11 min, puis arrive à 100 % de B à 15 min. La composition est maintenue à 100 % de B pendant 30 s puis revient aux conditions initiales de 20 % de B à 16 min. La colonne est de nouveau stabilisée pendant 2 min. Le gradient s'effectue à un débit de 0,6 mL/min. Les analyses ont été effectuées en mode *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Les composés ont été ionisés par électronebuliation en mode positive. La tension du capillaire a été fixée à 3 500V et le débit à 800 L/h. Les transitions des analytes, l'énergie de collision et la tension du cône sont données dans le Tableau 3.

Les œstrogènes ont également été analysés par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (1290 Infinity-6490 MS, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Les analytes ont été séparés en phase inverse sur une colonne analytique de type C18 (Kinetex[®] C18, 1,7 µm, 100 x 2,1 mm, Phenomenex, Agilent Technologies, France) maintenue à une température de 30 C. Les conditions analytiques ont été les suivantes : le volume d'injection était de 5 µL, les phases mobiles qui ont été utilisées sont de l'eau ultra-pure avec 1 nM de fluorure d'ammonium (A) et un mélange acétonitrile/méthanol (35/65, v:v) (B), le débit a été fixé à 0,6 mL/min. Le gradient d'élution commence à 10 % de B et augmente linéairement jusqu'à atteindre 100 % de B à 5,5 min. Il reste constant pendant 30 s puis revient aux conditions initiales de 10 % de B à 6,5 min et reste à cette composition durant 2,5 min. L'acquisition a été réalisée en mode MRM. Les composés ont été ionisés par électronebulisation en mode négatif. La tension du capillaire a été fixée à 3 000V et le débit à 1 L/min. Les conditions d'acquisition sont données dans le Tableau 3. La liste des analytes et leurs étalons internes est également détaillée dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Liste des stéroïdes et de leurs homologues marqués analysés par LC-MS/MS et paramètres MS/MS.

Composés	Transition de quantification	Énergie de collision (V)	Transition de confirmation	Énergie de collision (V)	Tension du cône ou du fragmentor (V)
11-Cétotestostérone	303.2>121	25	303.2>259.3	23	28
17β-Œstradiol-d4	259.2>160.9	22			25
17α-Ethinylœstradiol-d4	283.3>134.9	20			25
11α-Hydroxyprogestérone	331.3>109	30	331.3>96.9	25	35
17α-Hydroxy-20β-dihydroprogestérone	333.2>96.9	28	333.2>108.9	35	35
17α-Hydroxyprégénolone	315.3>297.3	10	315.3>159.1	25	15
17α-Hydroxyprogestérone	331.3>109	30	331.3>96.9	25	35
4-Androstène-3,17-dione	287.2>96.8	22	287.2>108.9	25	35
5α-Dihydrotestostérone	291.2>159.1	20	291.2>255.2	22	15
6α-Methyl-prednisolone	375.3>357.3	10	375.3>161.2	20	18
Canrénone	341.2>107.1	30	341.2>187.1	20	35
Cortisone	361.3>163.1	25	361.3>121	28	40
Dexaméthasone	393.3>373.3	8	393.3>355.2	10	15
DHA	289.3>271.4	15	289.3>253	17	28
DHEA	271.1>253.2	15	271.1>159	22	20
Œstrone-d4	275.2>257.3	15			25
Hydrocortisone	363.2>121.1	30	363.2>97.1	25	30
Lévonorgestrel	313.3>108.8	30	313.3>90.8	40	30
Méstranol	293.2>173	20	293.2>146.9	20	30
Noréthindrone	299.2>109	28	299.2>90.8	40	35
Norgéstimate	370.2>124.1	35	370.2>91.1	50	50
Prédnisolone	361.3>343.3	10	361.3>147.2	25	25
Prédnisone	359.3>341.3	12	359.3>147.1	25	25
Prégénolone	299.2>281.3	10	299.2>160.9	15	25
Progestérone	315.3>96.9	25	315.3>108.9	25	35
Progestérone d9	324.3>99.9	25			35
Spironolactone	341.2>107.1	30	341.2>187.1	20	35
Testostérone	289.2>96.2	22	289.2>108.8	25	32
Testostérone-d3	292.2>96.9	23			35
Thiocolchicoside	564.2>402.2	22	564.2>360.3	35	35
17α-Ethinylœstradiol	295>145	52	295>143	60	380
17α-Éthinylœstradiol-d4	299>147	52			380
17β-Œstradiol	271>183.2	50	271>143	60	380
17β-Œstradiol-d4	275>147	50			380
Œstriol	287.2>171	32	287.2>142.9	50	380
Œstriol-d2	289.2>147	50			380
Œstrone	269.1>145	45	269.1>142.9	60	380
Œstrone-d4	273>147	45			380

DHEA : (3β)-3-hydroxyandrost-5-en-17-one ; DHA : 5α-androstane-3,17-dione.

Analyses des polluants organiques persistants par GC-ECD

La détection des polluants organiques persistants (POP) (*i.e.* polychlorobiphényles, PCB et pesticides organochlorés, OCP) a été réalisée sur les fractions F3 de la boue primaire et les fractions F2 et F3 de la boue digérée de la STEP de Lille.

Les POP ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à capture d'électron (GC-ECD) (GC série G 1530 N, détecteur série G 2397 A, Agilent technologies). Les analytes ont été séparés sur une colonne analytique 95 % phényl- 5 % méthyl-siloxane (HP5-MS, 60 m x 250 µm x 0,25 µm Agilent Technologies, France). Les échantillons ont été injectés dans la source en mode pulsé sans division à une température de 280°C. Le gradient de température, d'une durée de 102 min est le suivant : 80 C pendant 2 min puis 2°C.min⁻¹ jusqu'à 280 C. Les composés ont été détectés par ECD configuré à une température de 300°C.

Analyses chimiques non ciblées

Les analyses chimiques non ciblées ont été effectuées par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse hybride quadrupôle/temps de vol (LC-QTOF) à titre exploratoire sur la fraction F2 obtenue par SPE de l'extrait de boue digérée de la STEP de Lille. Les sous-fractions actives obtenues par HPLC étant plutôt apolaires, des analyses ont également été menées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse hybride quadrupôle/temps de vol (GC-QTOF) des extraits de la boue primaire et digérée de la STEP de Lille afin d'identifier les composés responsables des activités ER et AhR observées.

Analyses des sous-fractions actives par GC-QTOF

Les sous-fractions actives ont été analysées par GC-QTOF (GC série 7890 B, spectromètre série 7200, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). L'acquisition des données a été effectuée en mode MS. Les sous-fractions ont été injectées en mode pulsé sans division de flux à une température de 280°C. Les molécules ont été séparées par le gradient de température suivant : 50°C pendant 2 min, 10°C.min⁻¹ jusqu'à 320°C, température finale maintenue durant 8 min. L'acquisition s'effectue sur une durée de 37 min. Les composés ont été ionisés par impact électronique à 70 eV. La gamme de masse de 50 *m/z* à 500 *m/z* est balayées à une fréquence de 2 GHz. Avant chaque analyse, les performances analytiques de l'instrument (résolution, exactitude en masse, et sensibilité) ont été vérifiées à l'aide de composés standards (HAP ; carte de contrôle). Si un des paramètres n'est pas conforme l'appareil est recalibrer pour réajuster la résolution et les masses.

Les données ont été traitées à l'aide du logiciel *MassHunter Qualitative* version B.05.00 (Agilent Technologies). Après une comparaison du chromatogramme du blanc de procédure avec celui de la sous-fraction de boue analysée, les pics les plus intenses et seulement présents dans la sous-fraction de l'extrait ont été étudiés. Le spectre de fragmentation obtenu au temps de rétention donné est retranché au bruit de fond chromatographique. Le spectre est alors comparé aux spectres présents dans les bases de données NIST11 (243 893 molécules) et W9N11 (819 882 composés). Les spectres contenus dans ces bibliothèques ont été obtenus par spectrométrie de masse simple en basse résolution. Par conséquent, l'interrogation des bases de données pour l'identification des composés dans les sous-fractions ne permet pas d'obtenir des scores de comparaison optimaux.

Analyses des fractions SPE par LC-QTOF

En plus de l'analyse en GC-QTOF, une analyse exploratoire des fractions obtenues par SPE a été réalisée en chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse haut résolution hybride quadrupôle/temps de vol (LC-QTOF) (Infinity série 1290 couplée à un spectromètre série 6540, Agilent Technologies). Les composés ont été séparés sur une colonne C18 (Kinetex[®] C18, 100 x 2,1 mm, 1,7 μ m, Phenomenex, Agilent Technologies, Les Ulis, France) puis ionisés par électro-nébulisation en mode positif (ESI+) et négatif (ESI-) (source Agilent ESI Jet Stream). L'eau ultra-pure (A) et l'acétonitrile (B) pour le mode ESI- et pour le mode ESI+ les solvants sont acidifiés avec 0,1 % d'acide formique. Dans les deux modes, le gradient d'élution a été le suivant : 10 % de B, il augmente linéairement pour atteindre 100 % de B à 45 min puis reste constant durant 2 min pour revenir à la composition initiale de 10 % de B à 49 min qui est maintenue pendant 4 min. Le débit est de 0,3 mL.min⁻¹.

L'acquisition a été réalisée en mode données-dépendant, c'est-à-dire que durant une même acquisition, les composés sont détectés par le TOF (mode MS simple) permettant de connaître avec exactitude leurs masses (10^{-4} Da), les plus intenses sont sélectionnés puis fragmentés et analysés en mode MS/MS (Q/TOF) permettant d'obtenir ainsi le spectre de fragmentation des ions sélectionnés. Cette méthode d'acquisition permet en une injection d'obtenir un maximum d'informations sur les composés présents dans l'échantillon. Les spectres ont été acquis sur une gamme de masse comprise entre 70 m/z et 1700 m/z à une fréquence d'acquisition de 2 GHz. En mode MS, 1,4 spectres/s ont été enregistrés et en mode MS/MS, 4 spectres/s. Les ions précurseurs ont été fragmentés à trois énergies de collision (10, 20 et 40 V). Durant l'acquisition, un composé de référence a été continuellement injecté (HP-921 = hexakis(1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxy)phosphazine ; 922.009798 m/z [M+H]⁺, 966.000725 m/z [M+HCO₂]) afin de s'assurer qu'aucune dérive en masses n'est apparue au cours de l'enregistrement des données.

Les données ont été retraitées avec le logiciel *MassHunter Qualitative* version B.05.00 (Agilent Technologies). Les composés présents dans la fraction de boue ont été recherchés dans le chromatogramme à l'aide de l'algorithme, *Molecular Feature Extraction* du logiciel.

Les données obtenues ont directement été comparées aux bases de données *Metlin* (24 776 composés), *Forensics* (7 360 composés) afin de permettre une identification rapide des molécules présentes en se basant sur les masses moléculaires mesurées et les spectres de fragmentation.

Contrôle qualité

Avant chaque manipulation, toutes les bouteilles de solvant ont été fraîchement ouvertes et leur utilisation a été dédiée à ces analyses. Toute la verrerie a été lavée au détergent puis soigneusement rincée avec de l'eau ultra-pure. La verrerie a ensuite été calcinée à 450°C durant 8h.

Afin de vérifier l'absence de contamination pendant la préparation des fractions, un blanc de procédure (solvants) a été réalisé en parallèle. Durant les analyses chimiques, des injections de solvant ont été réalisées après chaque échantillon pour éviter les contaminations croisées au cours des analyses.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Caractérisation des activités biologiques de boues de station d'épuration et identification de perturbateurs endocriniens

Les activités AhR, ER et PXR ont été évaluées sur les extraits de boues provenant de différents stades de traitement (*i.e.* boue primaire, avant digesteur, digérée et déshydratée). Afin de simplifier les échantillons et identifier les fractions actives, les extraits ont été fractionnés par SPE et chaque fraction a été testée biologiquement. Cette caractérisation permet d'apporter des informations sur les propriétés physico-chimiques des ligands. En effet, les fractions SPE extraites sur cartouche de silice ont été obtenues par élution à l'aide de solvants de polarité croissante. Ainsi, la fraction F1 contient des composés apolaires et la fraction F4 des molécules polaires.

Une fois, les activités des fractions SPE évaluée, les ligands ont été recherchés par des analyses chimiques ciblées sur les fractions, les plus actives. Les fractions SPE sélectionnées proviennent de deux stades de traitements, les boues primaires et les boues digérées de la station de Lille, dans le but d'évaluer l'effluence des traitements sur les composés actifs.

Les fractions SPE actives sélectionnées (F3 et F2) ont ensuite été fractionnées par HPLC. Les activités AhR, ER et PXR des 40 sous-fractions obtenues par HPLC ont été évaluées afin de mettre en évidence les sous-fractions les plus actives. Les composés présents dans ces sous-fractions ont été recherchés par des analyses chimiques non ciblées par spectrométrie de masse haute résolution (GC-QTOF).

Activités *dioxine-like*

L'activité *dioxine-like* dans les boues de stations d'épuration a été évaluée à l'aide des lignées cellulaires HAhLP. Ce test a permis de mettre en évidence, dans tous les échantillons étudiés, la présence de composés actifs (Figure 1). Les blancs de procédure n'ont pas montré d'activité. Pour les deux stations étudiées, la suractivation du récepteur AhR observée dans les extraits bruts est probablement liée à une induction non spécifique de la luciférase. Ce résultat ne permet pas d'exprimer l'activité en termes d'équivalent toxique biologique (Bio-TEQ) et par conséquent de comparer quantitativement les extraits. L'utilisation d'une autre lignée cellulaire telle que PLHC-1 induisant un activité EROD pourrait permettre pour doser l'activité *dioxine-like* dans les extraits (Hahn et al., 1993; Kinani et al., 2010). Concernant les fractions obtenues par SPE, l'activité *dioxine-like* est détectée dans toutes les fractions. Ces fractions ayant été obtenues par SPE suivant un gradient de polarité, ce constat suggère que les ligands contenus dans les extraits possèdent des propriétés physico-chimiques diverses.

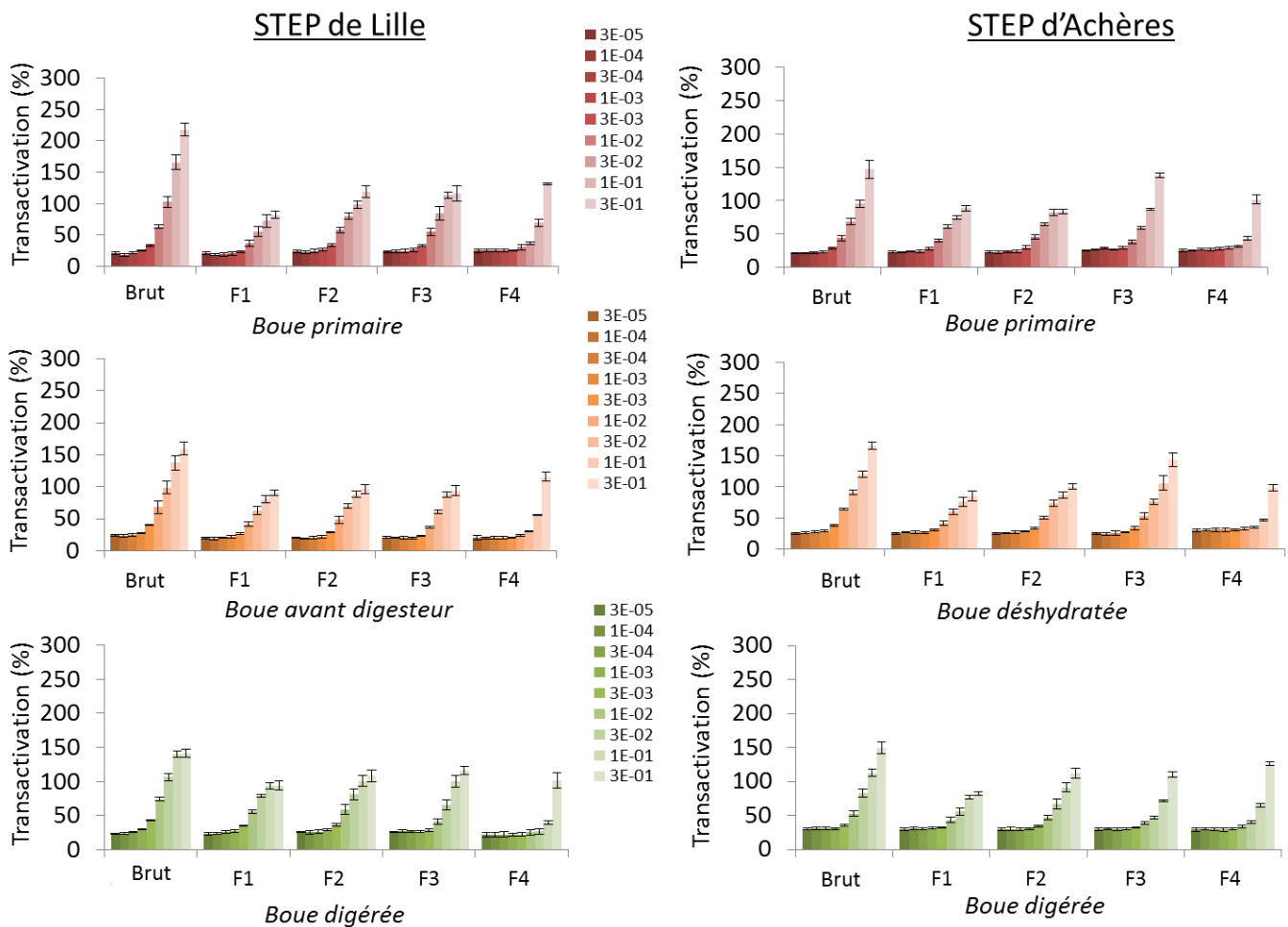


Figure 1 : Activité *dioxine-like* des extraits de boues provenant des stations d'épuration de Lille et d'Achères obtenue sur la lignée HAhLP. La réponse biologique est exprimée en pourcentage par rapport à l'induction générée par le ligand de référence (10nM TCDD). Les dilutions réalisées lors du dépôt cellulaire sont précisées dans la légende.

De nombreuses molécules hydrophobes sont reconnues pour être des ligands AhR, comme les dioxines, les polychlorobiphényles (PCB), les polybromodiphényléthers (PBDE) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Hahn et al., 1993; Janošek et al., 2006; Louiz et al., 2008; Kinani et al., 2010). La détection de cette activité dans les boues et plus précisément dans les fractions SPE F1 et F2, est cohérente avec les propriétés physico-chimiques des composés cités. Creusot et al., (2013) précisent que lors du fractionnement par SPE, les HAP, PCB et les pesticides organochlorés sont élués dans la fraction la plus apolaire, la fraction F1. Cependant, la validation de ce protocole a été effectuée sur une liste défini de composés et sur une matrice de référence, un sédiment de rivière. Suivant les propriétés intrinsèques de chaque matrice environnementale, l'éluion des molécules peut donc varier. Ainsi, il est envisagé que ces composés hydrophobes peuvent se retrouver également dans la fraction F2.

Une analyse ciblée sur les HAP a été réalisée par GC-MS/MS en mode SIM sur les fractions F1, F3 de la boue primaire et F1, F2 et F3 de la boue digérée de la STEP de Lille. Les résultats sont présentés Figure 2.

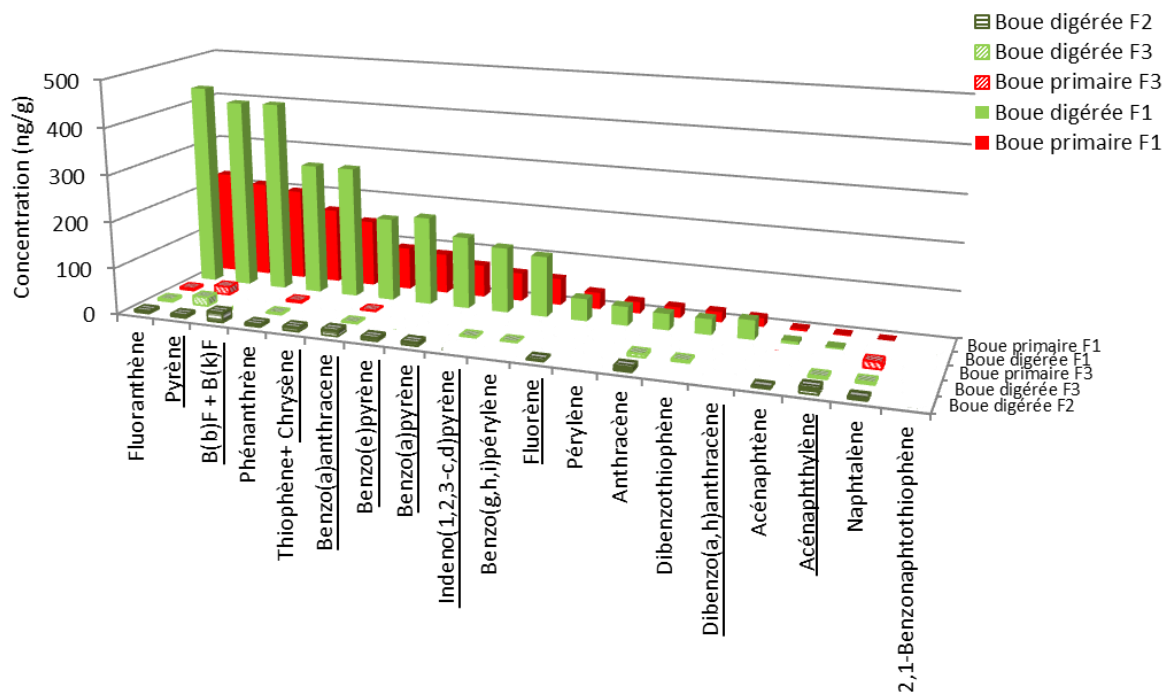


Figure 2 : Concentrations en HAP (ng/g de poids sec) mesurées dans les fractions de boues de STEP de Lille par GC-MS/MS. « B(b)F + B(k)F » somme du benzo(b)fluoranthène et du benzo(k)fluoranthène. Les composés soulignés sont des ligands AhR (Louiz et al., 2008).

Le dosage des HAP dans les deux échantillons montrent effectivement la présence de composés pouvant contribuer à l'activité AhR détectée tels que le benzo(e)pyrène, le benzo(a)pyrène, le pyrène, etc...(Louiz et al., 2008). Ces ligands sont essentiellement contenus dans la fraction F1. Cette fraction possède également les concentrations les plus élevées. Ce résultat est donc en accord avec les validations réalisées par Creusot *et al.* (2003) qui, comme précédemment indiqué, localisaient les HAP dans la première fraction lors du fractionnement des échantillons par SPE. Cependant, les composés ne sont pas seulement élués dans la fraction F1 et certains continuent à être détectés dans la fraction F2 voire F3 comme le pyrène mais à des concentrations moindres (Figure 2). Les concentrations rencontrées dans notre étude concordent avec celles observées dans les boues de différentes stations d'épuration européennes (Engwall et al., 1999; Ozcan et al., 2013). Cependant, les auteurs précisent que les niveaux en HAP mesurés ne permettent d'expliquer qu'au maximum 10 % des activités *dioxine-like* mesurée (Engwall et al., 1999).

Les fractions SPE les plus polaires F3 et F4 présentent également une activité AhR (Figure 1). Thibaut et Porte (2008) ont montré que sur la lignée PLHC-1 certains composés pharmaceutiques (plus polaires que certains HAP) sont des ligands AhR (*e.g.* naproxène, ibuprofène...). Afin de rechercher et d'identifier les ligands potentiels, les fractions F3 des échantillons de boue primaire et digérée et la fraction 2 de la boue digérée de la station de Lille ont été fractionnées plus finement par HPLC. Le profil d'activité AhR obtenu pour chaque fraction est représenté en Figure.

Concernant la fraction F2 de l'extrait de boue digérée, le profil révèle une activité étalée sur plusieurs sous-fractions (f25-f34) correspondant à une proportion en acétonitrile comprise entre 60% et 100%. Ce profil particulier contenant plusieurs fractions actives plutôt apolaires peut indiquer de la présence de HAP. Sur la base d'un chromatogramme de référence, contenant 23 composés, utilisé pour le développement du fractionnement par HPLC, il a été montré que le benzo(b)fluoranthène et le dibenzo(a,h)anthracène ont été collectés dans les sous-fractions f31 et f32. De plus, le log Kow des molécules est corrélé au temps de rétention lors du fractionnement en phase inverse par HPLC. Ainsi, il peut être estimé que les molécules présentes dans les sous-fractions actives possèdent un log Kow compris entre 5 et 7. Comme il a été montré lors de l'analyse ciblée, les HAP sont effectivement présents dans la fraction F2 et peuvent contribuer pour certains, comme le benzo(b)fluoranthène et le benzo(k)fluoranthène ou le benzo(a)anthracène, à l'effet biologique observé.

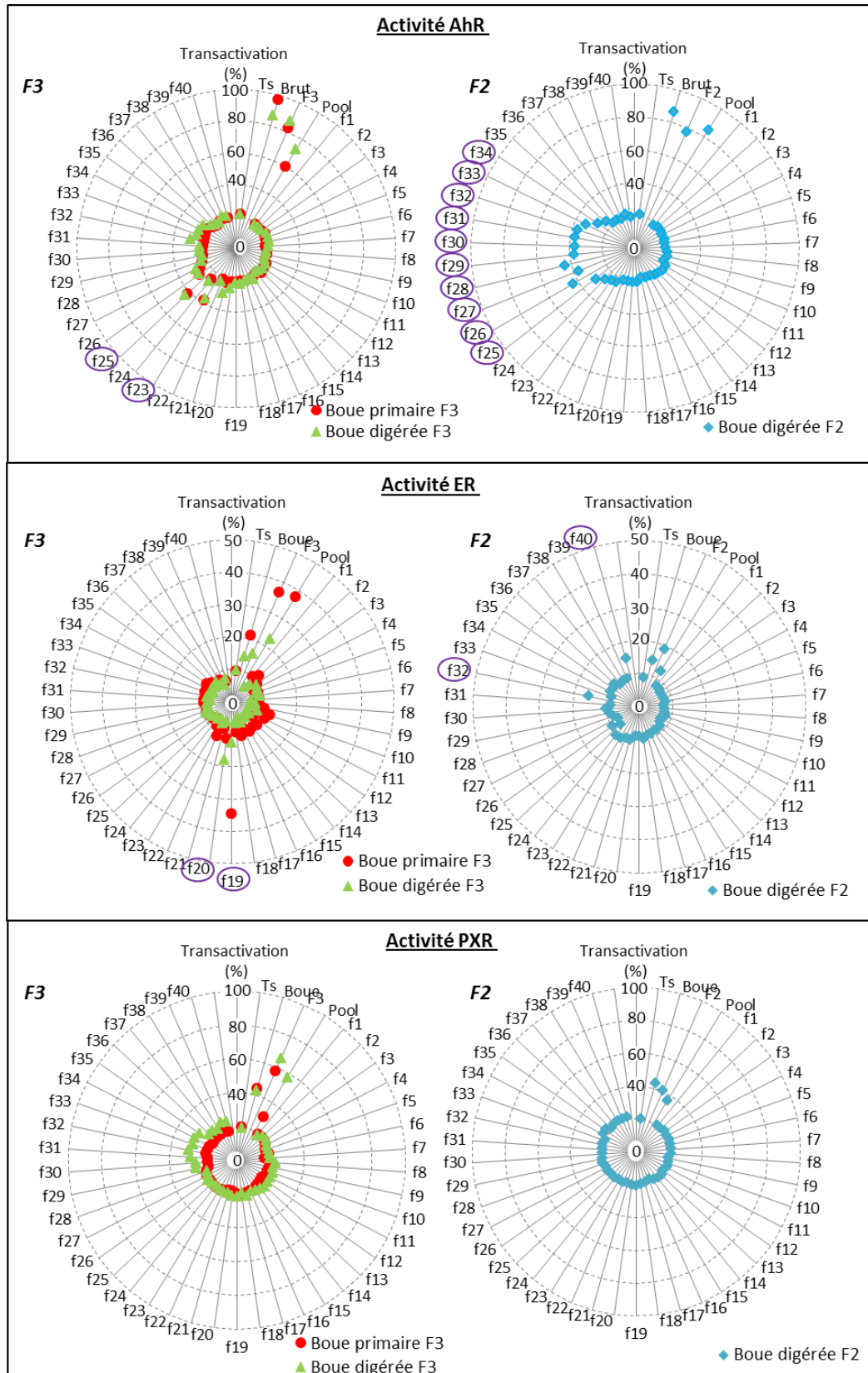


Figure 3 : Profil biologique des activités AhR, ER, PXR des sous-fractions HPLC de la fraction F3 de la boue primaire et digérée et de la fraction F2 de la boue digérée de la STEP de Lille. Les sous-fractions des blancs de procédures n'ont pas induit d'activité. « Ts » correspond au témoin solvant, « Boue » à l'extrait globale, « Pool » à l'extrait global après fractionnement.

Concernant les profils des fractions F3 de l'échantillon de boue primaire et de boue digérée de la station de Lille, les profils sont similaires et montrent la présence de deux sous-fractions actives, f23 et f25. L'analyse de ces fractions par GC-QTOF a permis de suspecter la présence d'androstérone (*5 α -Androstan-3 α -ol-17-one*, C₁₉H₃₀O₂, CAS 53-41-8) comme composé majoritaire dans la sous-fraction f23 des deux échantillons (Figure 4). La confirmation de son identification dans les boues devra passer par l'achat et l'injection du standard analytique sur GC-QTOF. Il est observé que la molécule est détectée avec une intensité plus importante dans la sous-fraction f23 de la boue primaire que dans la boue digérée. Malgré l'absence d'étalon, la différence bien marquée d'intensité de la molécule entre les deux fractions permet d'envisager que le composé est dégradé dans la boue digérée. L'androstérone, stéroïde naturel, a déjà été détecté dans les eaux usées de station d'épuration (Chang et al., 2011; Liu et al., 2011; Bellet et al., 2012). À notre connaissance, l'activité AhR de l'androsténone n'est pas documentée néanmoins c'est un ligand connu des récepteurs des androgènes (Bellet et al., 2012). L'activité AR n'a pas été évaluée durant ces travaux mais la mise en évidence de ce composé souligne l'intérêt de rechercher d'autres activités et notamment l'activité AR. La réponse de l'androsténone sur la lignée cellulaire HAhLP est à tester afin de conclure sur son activité AhR.

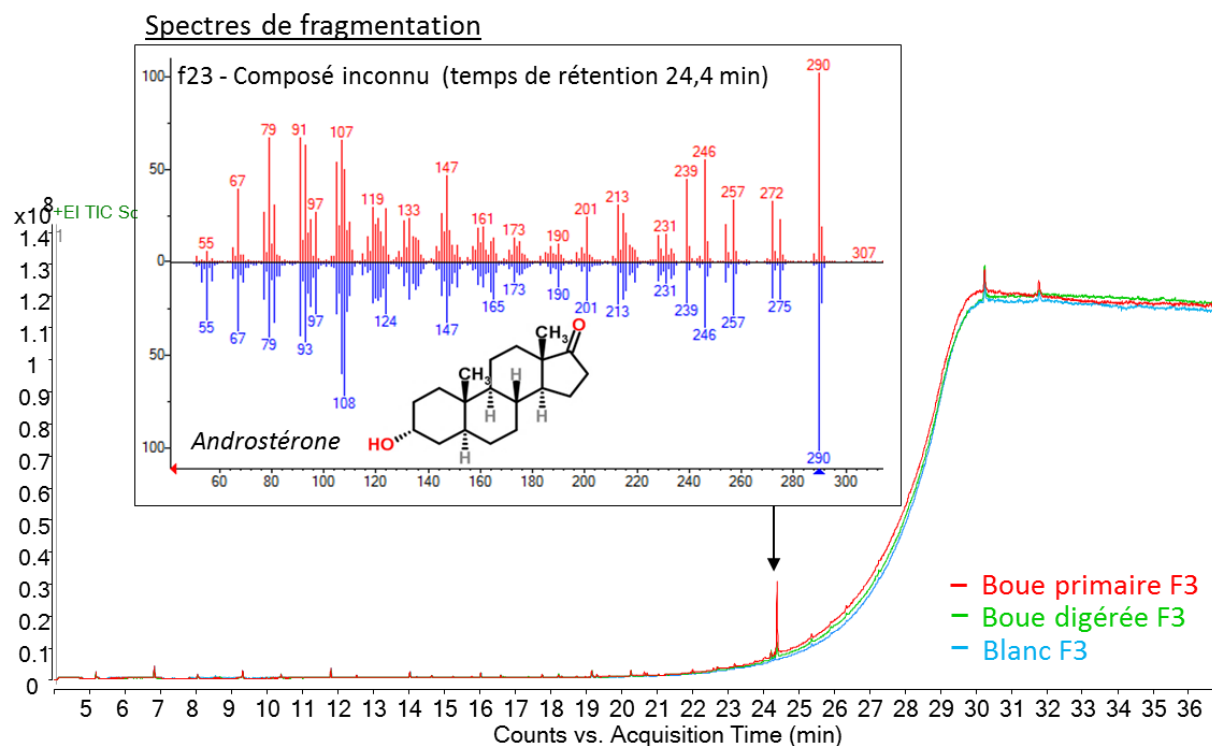


Figure 4 : Chromatogrammes et spectres de fragmentation montrant la possible présence d'androstérone, dans les sous-fractions f23 des fractions F3 des boues primaires, digérées. Les composés ne sont pas détectés dans le blanc de procédure associé aux échantillons.

Concernant la sous-fraction f25, des acides gras comme le méthylstéarate ($C_{19}H_{38}O_2$, CAS 112-61-8) et le palmitate de méthyle ($C_{17}H_{34}O_2$, CAS 112-39-0) sont suspectés dans les deux échantillons (Figure 5). Comme pour l'androsténone, l'intensité des pics chromatographiques est plus importante dans la boue primaire que dans la boue digérée. La présence d'acides gras dans les boues de station d'épuration est documentée (Appels et al., 2008). L'utilisation variée des lipides dans l'alimentation (*e.g.* produits laitiers, huiles...), l'industrie et les cosmétiques en fait des composés persistants dans les eaux usées. Leurs détections dans les boues montrent que malgré une étape de dégraissage au début du processus de traitement des eaux usées, leur élimination n'est pas totale.

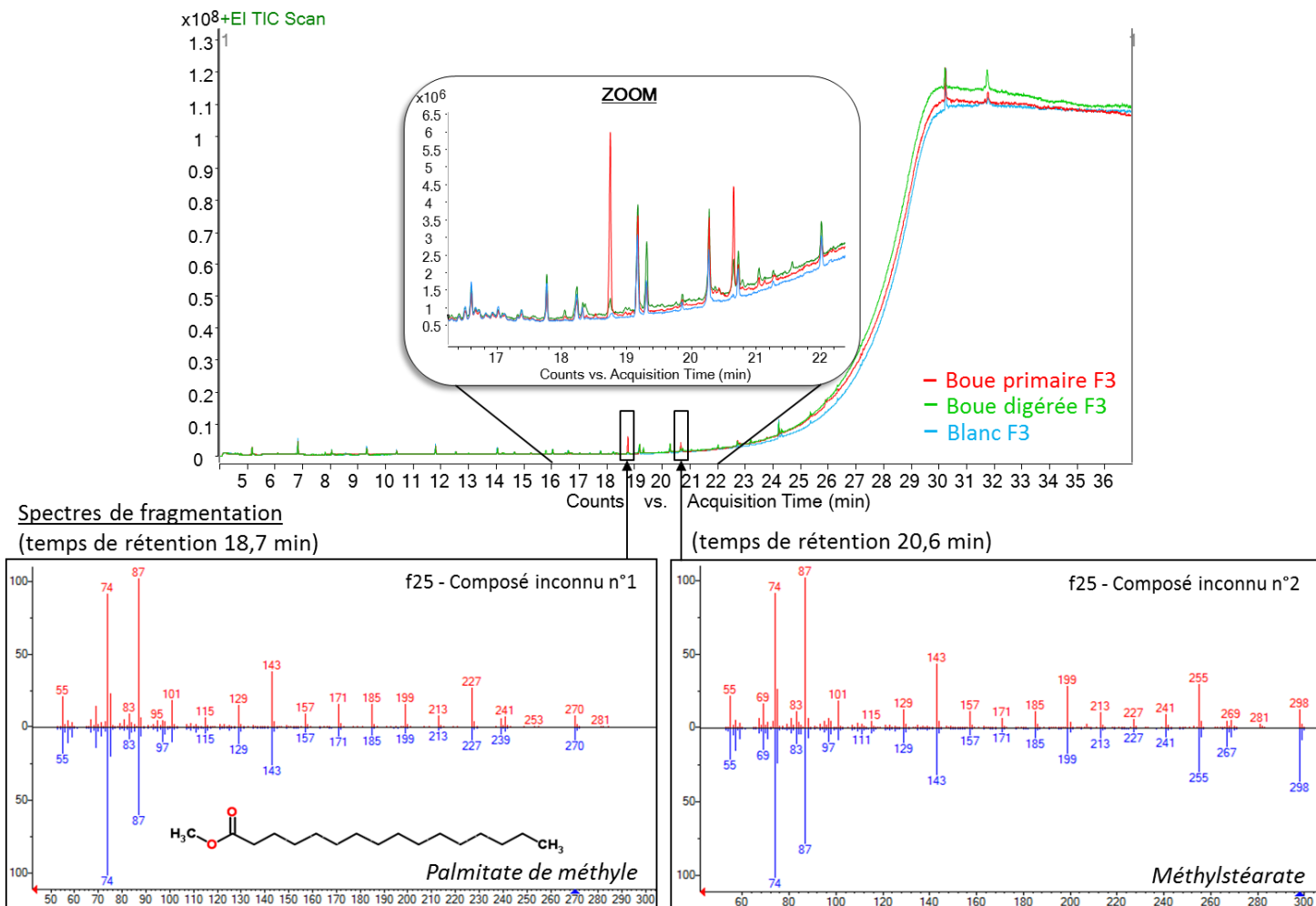


Figure 5 : Chromatogrammes et spectres de fragmentation montrant la possible présence de palmitate de méthyle et méthylstéarate dans la sous-fraction f25 des fractions F3 des boues primaires, digérées. Les composés ne sont pas détectés dans le blanc de procédure associé aux échantillons.

Leurs propriétés hydrophobes les rendent facilement adsorbables sur la phase solide et les acides gras se retrouvent dans les boues. Si la toxicité de certains acides gras et leurs affinités avec quelques récepteurs nucléaires est rapporté dans la littérature (Alves et al., 2001; Khan and Vanden Heuvel, 2003), les affinités du méthylstéarate et du palmitate de méthyle avec le récepteur AhR n'a pas été étudié, à notre connaissance. Par conséquent, il s'avère intéressant d'évaluer dans un futur proche, l'activité *dioxine-like* de ces composés.

Activités œstrogéniques et mise en évidence d'autres activités médiées par la présence de stéroïdes

L'activité œstrogénique a également été évaluée dans les différents échantillons de boues. Il ressort que tous les extraits de boues activent le récepteur des œstrogènes (Figure 6). De manière globale, l'activité œstrogénique mesurée est relativement faible. L'induction de la luciférase ne dépasse pas 50% de transactivation. Au vue des faibles activités, la quantification des réponses cellulaires par la détermination d'équivalents toxiques biologiques n'a pu être réalisée. Concernant les fractions SPE, la réponse cellulaire est localisée de la fraction F2 et F3 pour les deux STEP. La fraction F3 semble induire la plus forte activité (Figure 6). Mnif et al. (2010) ont montré que l'activité œstrogénique était mineure dans les boues de stations d'épuration en comparaison aux activités *dioxine-like* et des xénobiotiques. Le fractionnement par SPE montre que l'activité est contenue principalement dans les fractions F2 et surtout F3. Sur la base des développements méthodologiques réalisés pour le fractionnement par SPE, il ressort que les ligands agonistes aux récepteurs des œstrogènes testés lors de la validation (*i.e.* œstradiol, œstrone, bisphénol A, 4-ter-octylphénol) sont collectés dans les fractions F2 et F3 (Creusot et al., 2013). Des analyses ciblées ont été menées pour rechercher la présence de stéroïdes dans la fraction F3 la boue primaire de la station de Lille, la plus active. Dans le but de comparer les procédés de traitement, la fraction F3 de la boue digérée de la STEP de Lille a également été analysée. Sept stéroïdes ont été détectés dans les fractions sélectionnées (Tableau 4). Les concentrations mesurées sont comprises entre 8 ng/g de poids sec pour le 17 β -œstradiol détecté dans la la fraction F3 de la boue digérée et 1578 ng/g de poids sec pour la prégnénolone détectée uniquement dans boue primaire.

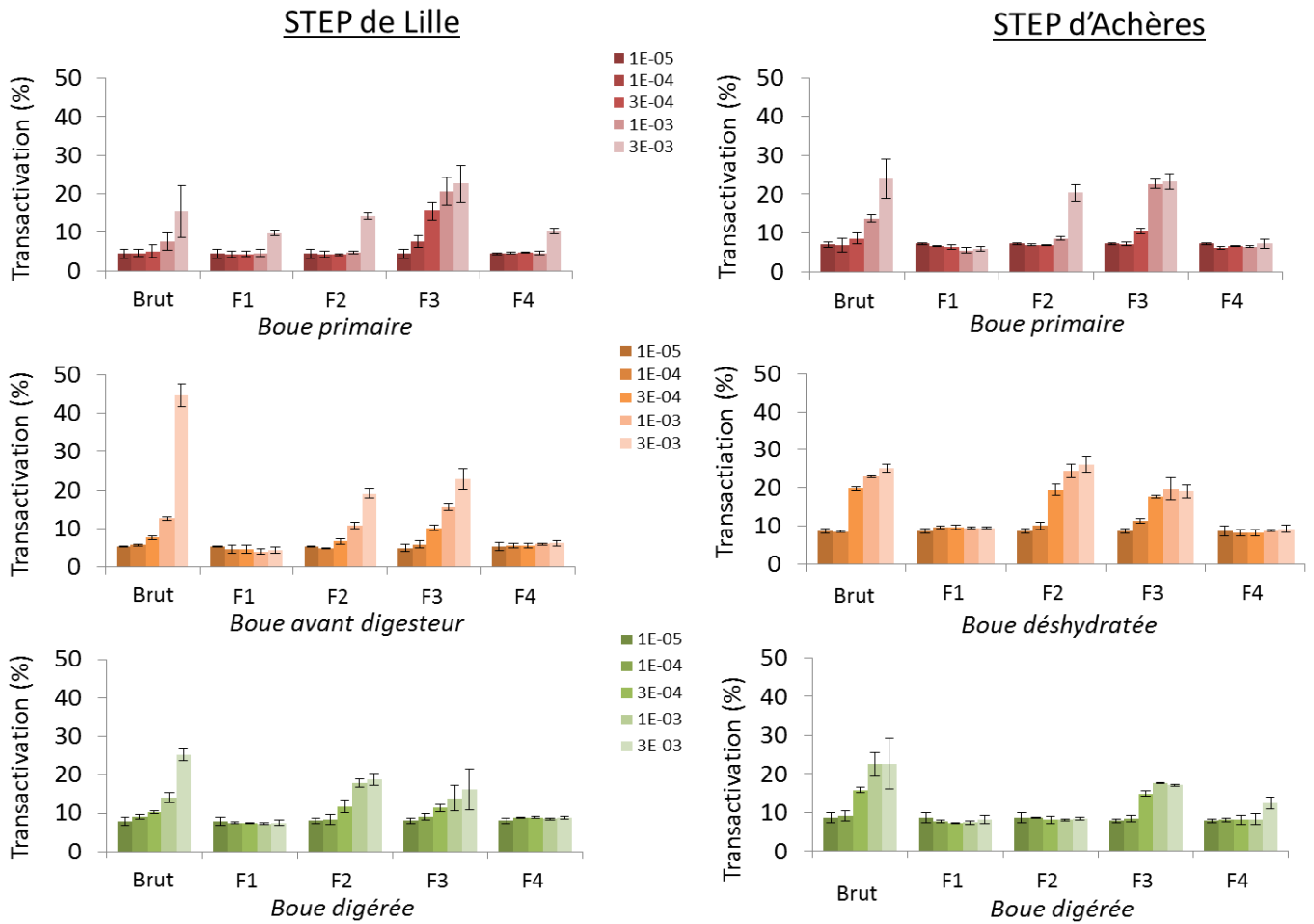


Figure 6 : Activité œstrogénique des extraits de boue provenant de deux stations d'épuration obtenus sur la lignée HELN-ERα. La réponse biologique est exprimée en pourcentage par rapport à l'induction générée par le ligand de référence 10 nM E2. Les dilutions réalisées lors du dépôt cellulaire sont précisées dans la légende.

Différents œstrogènes, le 17β-œstradiol, l'œstriol et l'œstrone ont été détectés dans les boues de station d'épuration à des concentrations de l'ordre de la dizaine de ng/g pour tous les composés sauf l'œstrone détecté dans la boue digérée à une concentration un peu plus élevée (40ng/g). Ces valeurs sont en accord avec celles observées dans plusieurs études comprises entre 4 ng/g et 49 ng/g (Ternes et al., 2002; Kuster et al., 2004; Muller et al., 2010a;). Le 4-androstène-3,17-dione et la progestérone ont également été détectés dans les deux échantillons à des concentrations de l'ordre de la dizaine de ng/g dans la boue primaire et supérieures à la centaine de ng/g dans la fraction F3 de la boue digérée. La prégnenolone (1578 ng/g) et la testostérone (11,4 ng/g) ont été uniquement détectés dans la boue primaire. Les différences de composition et de concentration entre la fraction F3 de la boue primaire et la fraction F3 de la boue digérée témoignent d'une évolution chimique des boues au cours des procédés de traitement pour la STEP de Lille. De nombreux auteurs ont rapporté que les hormones naturelles contenues dans les eaux de stations d'épuration étaient éliminées par les procédés de traitement (*i.e.* rendement d'élimination supérieur à 70 %) (Cargouët et al., 2007; Dagnino et al., 2010; Hamid et Eskicioglu, 2012). Cependant, la détection de ces composés

dans les échantillons de boues montrent que ces molécules ne sont pas forcément dégradées mais migrent de la phase dissoute vers la phase solide (Gabet-Giraud et al., 2010; Muller et al., 2010a).

Tableau 4 : Concentrations en stéroïdes (ng/g de poids sec) mesurées dans les fractions F3 de boues de stations d'épuration par LC-MS/MS.

	Composés	Boue	Boue
		primaire	digérée
		ng/g	ng/g
UPLC-MS/MS (Waters)	11-Cetotestostérone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	11 α -Hydroxyprogestérone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	17 α -Hydroxy-20 β -dihydroprogestérone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	17 α -Hydroxyprégnénone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	17 α -Hydroxyprogestérone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	4-Androstène-3,17-dione	23.2	130.4
	5 α -Dihydrotestostérone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	6 α -Méthyl-prednisolone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	Canrénone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	Cortisone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	Dexamethasone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	DHA	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	DHEA	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	Hydrocortisone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	Levonorgestrel	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	Mestranol	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	Norethindrone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	Norgéstimat	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	Prednisolone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	Prednisone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	Prégnénone	1578.1	<i>nd</i>
	Progestérone	16.1	141.8
	Spironolactone	<i>nd</i>	<i>nd</i>
Testostérone	11.4	<i>nd</i>	
Thiocolchicoside	<i>nd</i>	<i>nd</i>	
LC-MS/MS (Agilent [®] Technologies)	17 α -Ethinylœstradiol	<i>nd</i>	<i>nd</i>
	17 β -œstradiol	10.0	8.0
	œstriol	11.8	<i>nd</i>
	œstrone	10.2	40.1

DHEA : (3 β)-3-hydroxyandrost-5-en-17-one ; DHA : 5 α -androstane-3,17-dione.

Les hormones détectées dans les échantillons de boues de la station de Lille sont toutes des ligands de récepteurs nucléaires. Le 17β -œstradiol, l'œstriol et l'œstrone sont des inducteurs agonistes des récepteurs aux œstrogènes (Balaguer et al., 1999; Escande et al., 2006). Ces composés contribuent à l'activité œstrogénique mis en évidence dans les fractions F3 des échantillons. Afin d'estimer leur contribution, l'analyse de l'équilibre des masses pourrait être effectuée (Khim et al., 2001; Giesy et al., 2002). Cependant, cette méthode nécessite de disposer de la quantité équivalente toxique de chaque échantillon. Cette valeur n'a pas été déterminée pour les fractions actives, principalement à cause de la faible induction observée. En plus des œstrogènes, le 4-androstène-3,17-dione et la testostérone peuvent contribuer à la réponse ER. En effet, certaines enzymes, les aromatasés, présentes dans les lignées cellulaires HELN, transforment les composés androgènes en œstrogènes (Morishima et al., 1995). L'inhibition de ces enzymes pourrait permettre de vérifier l'impact de ces deux composés sur l'activité œstrogénique mesurée dans les fractions F3 des extraits de boue primaire et digérée de la STEP de Lille.

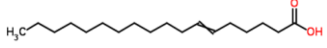
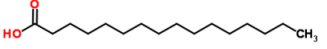
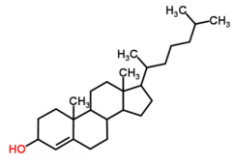
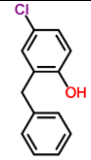
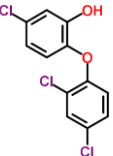
En plus des ligands œstrogéniques, l'analyse chimique ciblée a permis de mettre en évidence la présence d'autres ligands dans les fractions analysées. Le 4-androstène-3,17-dione et la testostérone sont rapportés pour être des ligands aux récepteurs des androgènes et également des antagonistes des récepteurs minéralocorticoïdes comme la prégénolone et la progestérone (Bellet et al., 2012; Creusot et al., 2014). Le 4-androstène-3,17-dione et la prégénolone sont aussi des antagonistes de l'activité progestative. La présence des stéroïdes dans les boues reflète la composition des eaux brutes de stations d'épuration avant traitement. Une de nos études précédentes portant sur les eaux de stations d'épuration a montré que ces stéroïdes étaient détectés dans les eaux d'entrée de station d'épuration urbaine (Gardia-Parège et al., en préparation, article n°1). La détection de ces différents ligands montre que les boues de STEP peuvent induire une multitude d'activités biologiques. Par conséquent, il est important d'utiliser plusieurs lignées cellulaires afin de caractériser au plus juste les risques environnementaux liés à l'émission de perturbateurs endocriniens par l'épandage des boues de STEP.

Dans le but d'identifier d'autres perturbateurs endocriniens potentiels, les fractions obtenues par SPE de la boue primaire (F3) et de la boue digérée (F2-F3) de la STEP de Lille ont été fractionnées par HPLC avant l'analyse chimique non ciblée. Les sous-fractions obtenues ont été testées sur la lignée cellulaire HELN-ER α exprimant le récepteur des œstrogènes. Les profils biologiques des fractions SPE F3 de la boue primaire et digérée de la STEP de Lille montrent que l'activité biologique est localisée seulement dans les sous-fractions f19 et f20 (Figure 3). Sur la base du chromatogramme de référence, la collecte de ces fractions coïncide avec le temps de rétention de différents œstrogènes parmi lesquels 17β -œstradiol, œstrone, œstriol détectées dans les extraits de boues. Concernant la fraction F2 de l'échantillon de boue digérée, l'activité œstrogénique est localisée dans les sous-fractions f32 et f40 (Figure 3). Ces sous-fractions sont apolaires et la collecte de la sous-fraction f32 correspond entre autre, à l'élution du benzo[b]fluoranthène. Villeneuve et al. (2002) ont montré que certains HAP tels que le benzo[a]anthracène et le dibenz[ah]anthracène induisent

une réponse œstrogénique sur les lignées MVLN, en plus d'une activité *dioxine-like*. Des analyses non ciblées par GC-QTOF ont donc été menées pour identifier les possibles ligands présents dans ces deux sous-fractions (f32 et f40). Aucun HAP n'a pu être mis en évidence dans les deux sous-fractions par la stratégie de traitement des données employée qui est basée sur l'étude des molécules les plus intenses. A contrario, la présence d'acides gras, l'acide 6-octadécénoïque et l'acide palmitique, et d'un isomère du cholestérol, le cholest-4-én-3-ol, est supposée dans les sous-fractions f32 et f40, respectivement (Tableau 5). Le cholest-4-én-3-ol possède un coefficient octanol/eau (*i.e.* log Kow) de 8,74, lui conférant un comportement apolaire. Son élution dans la fraction F2 puis dans la sous-fraction f40 peut être envisageable et apporte un élément supplémentaire sur sa présence possible dans l'échantillon. Concernant les acides gras suspectés, selon plusieurs auteurs, la dégradation des lipides comme l'acide oléique par les microorganismes en condition anaérobie produit d'autres acides gras tels que l'acide palmitique et l'acide myristique (Lalman et Bagley, 2001). Par conséquent, la présence d'acide palmitique pourrait être en partie issue du processus de traitement des boues de stations d'épuration (digestion anaérobie). À notre connaissance, très peu d'études existent sur les composés détectés et plus particulièrement sur leur possible impact biologique. Afin de chimiquement leur identification, les standards analytiques des molécules doivent être achetés et analysés par GC-QTOF. Une fois l'étape de confirmation réalisée, les standards devront être testés sur la lignée cellulaire employée pour évaluer l'activité œstrogénique dans le but de caractériser leur activité éventuelle et déterminer leur contribution à la réponse cellulaire observée dans les sous-fractions.

En parallèle, une analyse non-ciblée a été menée par LC-QTOF sur la fraction F2 de l'extrait de boue digérée dans le but d'obtenir des informations supplémentaires sur les composés présents dans cette fraction. Cette analyse a permis de confirmer la présence de chlorophène et de suspecter la présence de triclosan, deux biocides (Tableau 5). Martínez Bueno et al. (2007) ont détecté par spectrométrie de masse haute résolution, le chlorophène dans cinq effluents de stations d'épuration espagnoles à une concentration moyenne de 1279 ng/L. La présence de triclosan dans les boues et effluents a également été rapportée à des concentrations allant jusqu'à plusieurs centaines de ng/L (Singer et al., 2002). Les propriétés hormono-mimétiques de ces deux composés ont été documentées par quelques auteurs (Rostkowski et al., 2011; Schmitt et al., 2012). Les deux composés détectés dans la bile de poisson (truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*) et ont été caractérisés comme des antagonistes des récepteurs des androgènes sur les bio-essais YAS et AR-CALUX (Rostkowski et al., 2011). Le chlorophène possède une forte affinité avec les récepteurs des œstrogènes (test YES), l'activité œstrogénique mesurée étant du même ordre de grandeur que celle induite par un puissant ligand, le 4-nonylphénol (Schmitt et al., 2012).

Tableau 5 : Liste des composés, suspectés ou confirmés, détectés par GC-QTOF et LC-QTOF dans la fraction F2 et les sous-fractions f32 et f40 de l'extrait de boue digérée de la station d'épuration de Lille.

Fraction	Nom	Structure	Formule brute	Numéro CAS	Instrument	Masse monoisotopique (Da)	Score d'identification* (bibliothèque)	Description
F2 f32	Acide 6-octadécénoïque		C ₁₈ H ₃₄ O ₂	593-39-5	GC-QTOF	282.2559	91,05% (W9N11 et NIST11)	Acide gras
	Acide palmitique		C ₁₆ H ₃₂ O ₂	67701-02-4	GC-QTOF	256.2402	87,32% (W9N11)	Acide gras
F2 f40	Cholest-4-én-3-ol		C ₂₇ H ₄₆ O	14597-42-3	GC-QTOF	386.3549	87,38% (W9N11)	Stéroïde , isomère du cholestérol
F2	Chlorophène		C ₁₃ H ₁₁ ClO	120-32-1	LC-QTOF	218.0499	Confirmé (injection du composé standard)	Pesticide organochloré, biocide
	Triclosan		C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂	3380-34-5	LC-QTOF	287.9512	Suspecté (Forensics)	Pesticide organochloré, biocide

* Score basé sur les spectres de fragmentation

Activités des xénobiotiques

L'activité des xénobiotiques (PXR) a été évaluée sur les extraits de boues des deux stations d'épuration. Tous les échantillons ont induit une réponse cellulaire sur la lignée HG₅LN-hPXR (Figure 7). Aucune activité n'a été détectée dans les blancs de procédure. Comme observé pour l'évaluation de l'activité AhR, une suractivation du récepteur PXR est observée pour la STEP de Lille suggérant une induction non spécifique de la luciférase. Concernant la STEP d'Achères, la transactivation du récepteur ne dépasse pas les 100%. Le fractionnement par SPE montre que l'activité est localisée dans les fractions F2, F3 et F4 avec une transactivation légèrement plus marquée pour la fraction F3 (Figure 7). Plusieurs auteurs ont démontré que l'activité des récepteurs X des prégnanes pouvait être liée à la présence de ligands communs avec les récepteurs ER et AhR (Mnif et al., 2007; Dagnino et al., 2014;). Différentes classes de molécules, rencontrées dans les boues, possèdent une affinité pour le récepteur PXR, telles que les composés pharmaceutiques, les pesticides, les alkylphénols, les hormones et les PCB (Jacobs et al., 2005; Creusot et al., 2010).

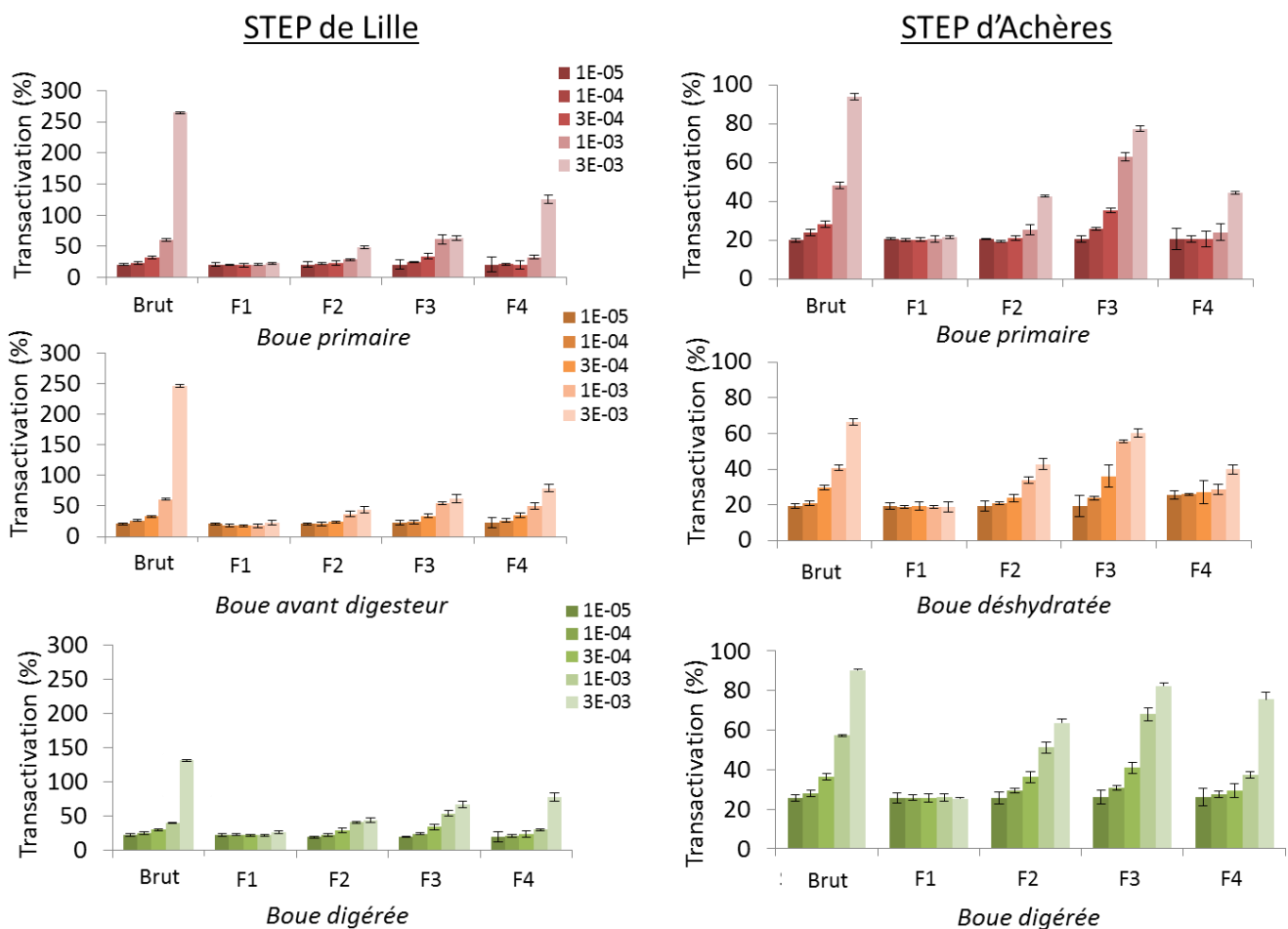


Figure 7 : Activité des xénobiotiques des extraits de boue provenant de deux stations d'épuration obtenus sur la lignée HG₅LN-PXR. La réponse biologique est exprimée en pourcentage par rapport à l'induction générée par le ligand de référence 1 μ M SR12813. Les dilutions réalisées lors du dépôt cellulaire sont précisées dans la légende.

Creusot et al., (2010) rapportent que certains œstrogènes comme l'œstradiol, l'œstrone et certains biocides tels que le triclosan sont actifs sur la lignée cellulaire HG₅LN-hPXR. Par conséquent, les œstrogènes détectés dans les fractions F3 de la boue primaire et digérée de la STEP de Lille contribuent à l'effet biologique observé dans les fractions F3 évalué sur PXR.

D'autres molécules actives sont couramment rencontrées dans les boues de stations d'épuration, comme les PCB, les pesticides organochlorés et les composés pharmaceutiques (Clarke et Smith, 2011). La recherche des composés pharmaceutiques n'a pas été effectuée au cours de l'étude. Concernant la présence de PCB et de pesticides organochlorés, l'analyse ciblée de ces molécules par GC-ECD dans les fractions obtenues par SPE de la boue primaire et digérée de la STEP de Lille, n'a pas pu aboutir à cause d'effets matriciels trop importants. Une étape de purification des fractions permettrait d'améliorer la détection de ces analytes dans les boues.

Les composés présents dans les fractions F3 de la boue primaire et digérée et la fraction F2 de l'extrait de boue digérée ont été séparés par HPLC. Les sous-fractions générées ont été testées sur la lignée cellulaire HG₅LN-hPXR. Aucune sous-fraction n'a entraîné de réponses cellulaires. A contrario, les mêmes sous-fractions regroupées induisent une activité PXR traduisant ainsi la présence d'effet de mélange entre les molécules contenues dans les extraits de boues (Figure 3). Des synergies entre molécules ont déjà été observées sur le récepteur PXR (Le Maire et al., 2010). Cette synergie est possible grâce à la taille relativement importante de la poche de liaison du récepteur qui permet de lier en même temps plusieurs molécules. Un effet de mélange entre composés a également été mis en évidence sur ce type de récepteur dans les eaux brutes d'une station d'épuration urbaine (Gardia-Parège et al., en préparation, article n°1, pX). Afin de pouvoir identifier les molécules responsables de cet effet, il serait intéressant d'utiliser des colonnes d'affinité intégrant le récepteur X des prégnanes. Ces colonnes récemment développées permettent de purifier les extraits environnementaux pour sélectionner seulement les composés d'intérêts et éliminer les molécules qui n'ont pas d'affinité avec le récepteur (Dagnino et al., 2014). Les molécules éluées sont ensuite identifiées par spectrométrie de masse haute résolution (Jondeau-Cabaton et al., 2013). Les ligands identifiés peuvent être testés deux à deux ou être injectés en HPLC pour obtenir leur temps de rétention afin de visualiser les fractions dans lesquelles ils ont été collectés. Le regroupement de ces sous-fractions et leurs tests sur bio-essais permettraient la mise en évidence des effets mélange entre les composés.

Evolution des activités biologiques au cours des procédés de traitement des boues

Les activités biologiques à différents stade de traitement des boues ont été caractérisées dans deux stations d'épuration (Figure8).

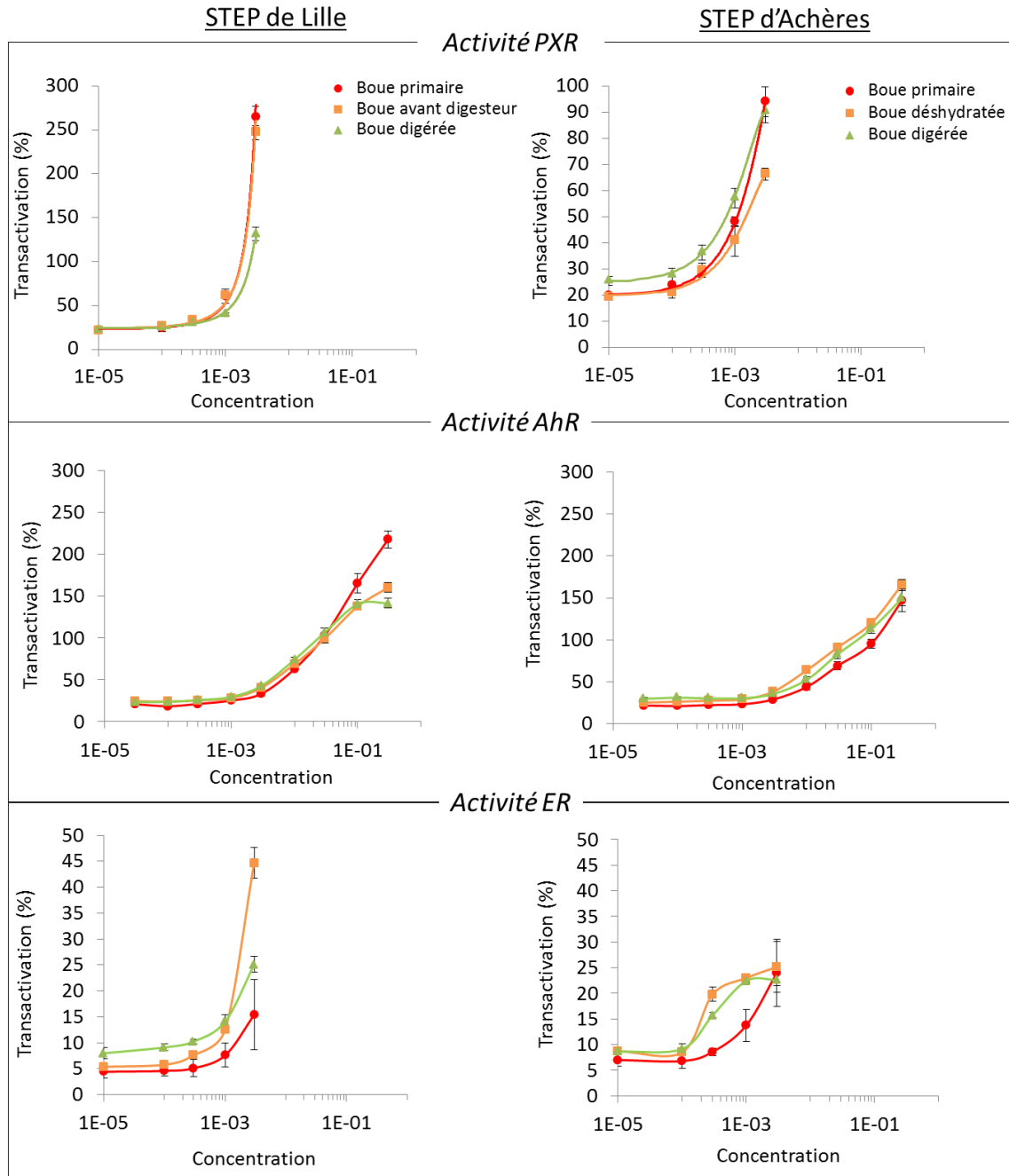


Figure 8 : Courbes dose-réponse des activités PXR, AhR et ER obtenues pour les différents échantillons de boues prélevés au cours du processus de traitement (primaire, avant digesteur, digérée et déshydratée) des deux stations d'épuration de Lille et Achères. Les activités PXR, AhR et ER sont observées respectivement sur les lignées cellulaires HG5LN-PXR, HAhLP et HELN-ERα. Les activités sont exprimées en pourcentage par rapport aux ligands de référence, SR12813, TCDD et E2 respectivement.

Concernant l'activité PXR de la station de Lille, la boue digérée induit une réponse cellulaire moins intense que la boue primaire et avant digesteur. Ce résultat suggère une dégradation d'une partie des composés actifs par des procédés de traitement. A contrario, pour la station d'Achères, les courbes dose-réponse obtenues sur la lignée HG₅LN-hPXR montrent que l'activité de la boue digérée semble plus importante que celle la boue primaire et avant digesteur. Cependant, la comparaison des activités est difficilement interprétable. En effet, le niveau basal de l'activité cellulaire observé pour cet extrait est légèrement supérieur à celui de la boue déshydratée et primaire. Si les courbes étaient ramenées à la transactivation basale, l'échantillon de boue digérée ne posséderait pas de différence avec les autres stades de traitement. Afin d'émettre une conclusion sur l'activité des xénobiotiques de cette station, il serait intéressant de modéliser les courbes en retranchant cette activité basale. La détermination de concentrations équivalentes biologiques calculées à partir des courbes dose-réponse permettraient de comparer plus aisément les activités (Escher et al., 2008).

Concernant l'activité *dioxine-like*, les activités des trois extraits de boues de la station de Lille ne possèdent pas de différences très marquées. Cependant, les analyses chimiques ciblées effectuée sur les fractions F1 de la boue primaire et digérée de la STEP de Lille montrent une augmentation de la concentration des HAP y compris ceux biologiquement actifs entre les deux stades (Figure 2). Ce résultat amène donc à penser que l'activité AhR, augmenterait au cours des procédés. Pour la station d'Achères, une activité légèrement supérieure est remarquée pour les boues déshydratées et digérées par rapport à la boue primaire. Au vu des activités relativement proches, une répétition du test cellulaire sur les échantillons serait à effectuer dans le but de confirmer cette tendance. Ces résultats sont en accord avec ceux observés dans différentes études (Gustavsson et al., 2004; Zhang et al., 2009). Ces auteurs ont également démontré que les procédés de traitement anaérobie, aérobie et anoxique ne permettaient pas de réduire l'activité *dioxin-like* mesurée dans les boues de station d'épuration et que la réponse biologique pouvaient même augmenter au cours de la filière de traitement. Cependant, Gustavsson et al. (2004) précisent que les résultats observés dépendent des bio-essais employés et donc, de la sensibilité et de l'affinité des composés actifs avec les récepteurs utilisés. Les communautés microbiennes présentes peuvent également modifier la composition chimique des boues par dégradation et/ou transformation des composés (Hernandez-Raquet et al., 2013). Par conséquent, une généralisation des résultats obtenus ne peut être effectuée.

Pour l'activité œstrogénique, des variations notables de réponses sont mesurées. Pour les deux stations d'épuration, la transactivation observée est plus importante dans les échantillons de boues avant digesteur, digérées et déshydratées en comparaison avec les boues primaires. Une augmentation de l'activité œstrogénique au cours du traitement anaérobie des boues a également été observée par Holbrook et al., (2002). Pour l'extrait de boue digérée de la station de Lille, la différence avec la boue primaire n'est pas si évidente si le niveau basal des cellules est pris en compte. Cependant, les analyses chimiques ciblées sur les stéroïdes effectuées sur les fractions F3 de la boue primaire et digérée de la STEP de Lille montrent une augmentation de la concentration en 4-androstène-3,17-dione et de l'œstrone dans la boue

digérée (Tableau 3). Pour l'œstrone, les valeurs passent de 10 ng/g de poids sec dans la boue primaire à 40 ng/g dans la boue digérée. Cette augmentation de la concentration en ligand agoniste ER peut confirmer la tendance observée sur l'activité biologique. L'activité ER mesurée dans les différentes boues peut être en lien avec l'activité microbienne. En effet durant les procédés de traitement des boues, une augmentation de la concentration en œstrogènes peut être le résultat de l'hydrolyse de la forme conjuguée (non active) en forme libre (active) (Gomes et al., 2009; Muller et al., 2010a; Muller et al., 2010b; Kumar et al., 2012).

CONCLUSION

Dans le but d'évaluer, les activités biologiques médiées par les boues de STEP et identifier les composés responsable de ces effets biologiques, des extraits de boues provenant de différents stades de traitement (primaire, avant digesteur, digérée et déshydratée) prélevées dans deux STEP, Lille et Achères ont été caractérisées en terme d'activités ER, AhR et PXR. Afin d'identifier les molécules responsables des reponses cellulaires, les extraits ont été simplifiés par deux fractionnements successifs (SPE puis HPLC). La recherche de composés a été réalisée sur les fractions actives par des analyses chimiques ciblées principalement sur les HAP et les stéroïdes et par des analyses non ciblées en LC-QTOF et GC-QTOF.

Toutes les activités recherchées (ER, AhR et PXR) ont été détectées dans les boues de stations d'épuration aux différents stades de traitement. L'étude de l'évolution des activités biologiques au cours des processus de traitement a montré que les activités biologiques (ER et AhR) ont tendance à augmenter au cours des procédés de traitement. Les analyses chimiques ciblées réalisées par GC-MS/MS et LC-MS/MS ont permis de suspecter que ces effets sont liés à la présence de perturbateurs endocriniens connus tels que les HAP et les hormones (*e.g.* œstrone, 17 β -œstradiol). Des analyses non ciblées sur une fraction SPE et les sous-fractions obtenues par HPLC ont permis de mettre en évidence la présence de composés référencés dans la littérature scientifique comme actifs tels que par exemple le chlorofène (confirmé par l'étalon analytique). L'identification des molécules détectées par GC-QTOF, reste à confirmer par l'achat et l'injection des étalons analytiques, à l'exception du chlorofène, et sera entrepris prochainement. En plus des composés identifiés, la présence d'effets de mélange entre les molécules sur PXR a également été observée grâce au fractionnement poussé réalisé sur les extraits de boues. Les composés entraînant un effet additif sont à identifier et cette caractérisation nécessite de continuer les travaux de recherche. En conclusion, notre étude a montré, comme attendu, que l'épandage des boues sur les sols agricoles véhicule dans l'environnement des perturbateurs endocriniens. Les effets biologiques induits par ces déchets organiques peuvent être complexes avec la présence d'effets de mélange de type additif entre les composés. Les interactions entre composés sont encore très peu documentées et cette étude souligne l'intérêt d'utiliser l'approche bio-analytique de type EDA pour les identifier.

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée avec le soutien financier de l'Agence Nationale de la Recherche française (ANR) dans le cadre du programme investissements d'avenir, au sein du Laboratoire d'excellence COTE (ANR-10-labx-45). Les auteurs remercient également le Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie, la Région Aquitaine, le CPER A2E - projet cofinancé par l'Union européenne et la Région Aquitaine - pour leur soutien financier. L'Europe s'engage en Aquitaine avec le fonds européen de développement régional.

Article n°4

Apport de l'analyse dirigée par l'effet (« effect-directed analysis », EDA) à la recherche et l'identification de perturbateurs endocriniens dans les lisiers porcins destinés à l'épandage agricole

Apport de l'analyse dirigée par l'effet (« Effect-Directed Analysis », EDA) à la recherche et l'identification de Perturbateurs endocriniens dans les lisiers porcins destinés à l'épandage agricole

GARDIA-PARÈGE Caroline¹, DÉVIER Marie-Hélène¹,
HERNANDEZ-RAQUET Guillermina⁴, MAZELLIER Patrick¹, BALAGUER Patrick³,
BUDZINSKI Hélène¹

¹ EPOC-LPTC, UMR 5805 CNRS, Université Bordeaux 1, 351 cours de la libération, 33405 Talence cedex, France.

² IRCM, INSERM U896, ICM, UMI - Parc Euromédecine, F-34298 Montpellier cedex 5, France.

³ LISBP INSA - UMR INSA/CNRS 5504 - UMR INSA/INRA 792, 135 avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 04, France.

Correspondant : h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr, 05 40 00 69 98

RÉSUMÉ

L'épandage de lisiers porcins est une pratique courante pour la fertilisation des sols agricoles. Cette pratique entraîne la dissémination dans l'environnement de nombreux composés dont des perturbateurs endocriniens. En effet, des études préliminaires ont montré la présence d'activités œstrogéniques et *dioxine-like* importantes dans divers échantillons de lisiers. Toutefois, les réponses biologiques mesurées n'ont pu être expliquées par les composés détectés (hormones, composés aromatiques polycycliques, nonylphénols et produits pharmaceutiques), suggérant ainsi la présence de perturbateurs endocriniens non identifiés. L'objectif de cette étude est de déterminer la nature chimique des molécules responsables des activités mesurées. L'analyse dirigée par l'effet (EDA, Effect-directed analysis) a été mise en œuvre afin de répondre à cette question. Un extrait de lisier type a subi un fractionnement séquentiel qui a permis d'isoler un certain nombre de fractions actives. Des analyses chimiques ciblées réalisées sur ces fractions ont permis d'identifier différentes familles de composés dont la présence de perturbateurs endocriniens (e.g. 17β -œstradiol, œstriol). Néanmoins, les molécules détectées n'expliquent pas les réponses endocrines observées. Les fractions les plus actives ont été analysées par le couplage chromatographie en phase liquide/spectrométrie de masse haute résolution (LC-QTOF). De nombreux composés ont été mis en évidence mais leur identification n'a pu être définitivement confirmée.

Mots clés : Perturbateurs endocriniens, lisier porcin, *Effect-directed analysis*, tests *in vitro*, spectrométrie de masse haute résolution.

INTRODUCTION

Riche en azote, en phosphore et en potassium, le lisier (mélange, sous forme liquide, des excréments et des urines de bétails, avec peu ou pas de litière) est épandu sous forme de fertilisant sur les sols agricoles. La France est le troisième producteur de viande porcine en Europe (Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2013) et génère chaque année environ 77 millions de m³ de lisier porcin. Ce chiffre est estimé sur la base de 3 469 m³ de lisier produit annuellement pour un élevage moyen (élevage de naisseur-engraisseur de 180 truies), la France comptant 22 286 exploitations (AGRESTE, 2013; Levasseur, 2013). En plus d'être une cause de l'eutrophisation de plusieurs plans d'eau, l'application de ces déchets d'élevage sur les sols agricoles est une source avérée de perturbateurs endocriniens dans les écosystèmes aquatiques (Hanselman et al., 2003). En addition aux hormones naturellement produites par les animaux, de nombreux composés pharmaceutiques sont utilisés pour soigner ou éviter les maladies mais aussi pour améliorer la croissance et se retrouvent dans les déjections animales (Sarmah et al., 2006; Capdeville, 2011; Combalbert et al., 2012). Les animaux sont également exposés à diverses familles de polluants (HAP, dioxines et furanes, phtalates, nonylphénols...) via les activités agricoles (Ciganek et Neca, 2008). Par infiltration et lessivage des sols fertilisés, ces molécules et leurs produits de dégradation sont susceptibles de se retrouver dans l'environnement aquatique et peuvent altérer le développement et/ou la reproduction de nombreux organismes aquatiques. De plus, une fois introduits dans l'environnement, ces composés peuvent subir de nombreux processus abiotiques et biotiques (e.g. photo-transformation, biotransformation) qui peuvent générer des sous-produits pouvant être plus dangereux que les composés parents (Sinclair et Boxall, 2009). Combalbert *et al.* ont mené une étude sur le transfert de perturbateurs endocriniens par l'épandage de lisier porcin (Combalbert et al., 2012). Les tests *in vitro* basés sur l'expression de gènes rapporteurs [les récepteurs des œstrogènes (ER), des androgènes (AR), de la dioxine (AhR), et des prégnanes (PxR) et le récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes γ (PPAR γ)] ont été utilisés comme modèles biologiques sur trois sites d'étude. Seul de fortes activités ER et AhR ont été mises en évidence sur les échantillons de lisier. Sur deux sites étudiés, l'activité œstrogénique du lisier n'était expliquée qu'à hauteur de 15 à 51% par les œstrogènes classiquement analysés (œstriol, 17 β -œstradiol, 17 α -œstradiol, œstrone). L'activité *dioxine-like* a pu être expliquée à seulement 0,1% par la présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ces résultats ont mis en évidence la présence de perturbateurs endocriniens non identifiés.

Des méthodes alternatives intégratives basées sur des bio-essais, dites « bio-analytiques », telles que l'analyse dirigée par l'effet (« *Effect-Directed Analysis* », EDA) sont actuellement disponibles pour caractériser des composés biologiquement actifs non identifiés par les techniques analytiques classiques. En 2003, Brack a décrit en détail cette approche pluridisciplinaire (Brack, 2003). La démarche EDA dérive des procédures TIE (« *Toxicity Identification Evaluation* ») élaborée par l'Agence américaine pour la protection de l'environnement (US EPA) afin de déterminer la toxicité et les causes de celle-ci dans des

effluents industriels et municipaux (Ankley et al., 2011). La méthode EDA repose sur des étapes de fractionnement successif dirigées par des tests biologiques qui permettent de réduire la complexité de l'échantillon. Ceci permet d'isoler les composés responsables des effets biologiques observés (Figure 1). Lorsque l'échantillon est suffisamment simplifié, des analyses chimiques basées généralement sur la spectrométrie de masse sont effectuées sur les fractions biologiquement actives. Le but est d'identifier les molécules présentes pour établir une liste de composés candidats pouvant expliquer les effets biologiques observés. Lorsque les agents présents sont identifiés, une étape de confirmation de leur activité est alors réalisée par les tests biologiques. Notre étude a pour objectif d'identifier les molécules « inconnues » responsables de l'activité endocrine observée dans des lisiers porcins. Un échantillon de lisier actif a subi deux fractionnements successifs afin de simplifier la complexité de la matrice et d'isoler les composés actifs. Les molécules présentes dans les fractions actives ont été recherchées par l'utilisation d'analyses chimiques ciblées et non ciblées.

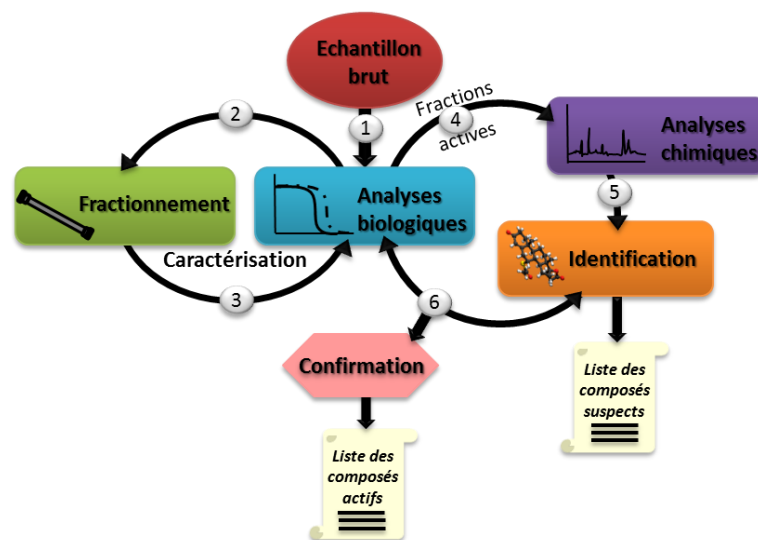


Figure 1 : Principe général de la démarche EDA (inspiré de Brack, 2003).

1- Évaluation du profil biologique de l'échantillon, 2- Simplification de l'échantillon, 3- Caractérisation des fractions actives, 4- Analyse chimique des fractions actives, 5- Identification des composés suspectés comme actifs, 6- Confirmation de l'activité des composés identifiés

APPROCHES METHODOLOGIQUES

Les réactifs et composés

Tous les solvants utilisés sont de qualité HPLC et proviennent de VWR International (Strasbourg, France), Acros Organics (Noisy le Grand, France), Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France) et Atlantic labo-ICS (Bruges, France). L'eau ultra-pure de qualité Milli-Q est préparée sur un système Milli-Q équipé d'un filtre EDS-PAK (Millipore SA, Guyancourt, France).

L'argon (99,999% de pureté Linde Gas, Bassens, France) est utilisé pour l'évaporation des échantillons.

Les composés et leurs homologues marqués par isotopes stables (pureté >90%) sont obtenus auprès de Sigma Aldrich, Toronto Chemical Research (North York, Toronto, Canada), CDN Isotopes (Montréal, Canada), Cambridge Isotopes Laboratories (Tewksbury, MA, USA), LGC Standard (Molsheim, France) et Cluzeau Info Labo (Ste Foy La Grande, France).

Site d'étude et préparation des échantillons

Des lisiers de la région de Bretagne provenant de différents systèmes de gestion ont été testés pour leurs activités ER et AhR (Combalbert et al., 2012). Un échantillon prélevé en juillet 2009 sur un site où des fortes activités œstrogéniques et dioxin-like ont été détectées, a été sélectionné pour cette étude. Un volume de 300 mL de lisier brut est lyophilisé. Puis, 0,5 g de lisier (poids sec) est extrait par solvant pressurisé (« *Accelerated Solvent Extraction* », ASE) par un mélange méthanol/acétone (50/50, v:v) puis par un mélange hexane/acétone (50/50, v:v) à 120°C et 100 bars. L'extrait est évaporé (40 mL) puis repris dans du méthanol et stocké à -20°C.

Les tests *in vitro*

Les deux lignées cellulaires ainsi que la préparation des tests *in vitro* utilisées dans cette étude sont décrites dans l'article de Combalbert *et al.* (2012). Brièvement, les bio-essais employés sont des modèles cellulaires ayant intégré de manière stable un gène rapporteur codant pour la luciférase.

L'activité œstrogénique de l'extrait de lisier est déterminée en utilisant la lignée cellulaire MELN obtenue par la transfection du plasmide rapporteur codant pour la luciférase sous le contrôle d'un élément de réponse aux œstrogènes (ERE) dans des cellules humaines de cancer du sein MCF-7. L'activité *dioxine-like* est mesurée par le dosage de la luciférase dans la lignée cellulaire HAhLP issue de la transfection du plasmide rapporteur CYP1A1-Luc

dans des cellules humaines cancéreuses du col de l'utérus HeLa possédant naturellement le récepteur AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*) (Pillon et al., 2005b).

Les cellules sontensemencées dans des plaques 96 puits à une densité de 5×10^4 cellules par puits. Lorsque les cellules ont adhéré, 50 μ L d'extrait dilué dans le milieu de culture est déposé dans chaque puits. Après 16 h d'incubation, du milieu de culture contenant de la luciférine (0,3 mM) est ajouté à la plaque préalablement vidée et la luminescence est mesurée. Une courbe dose-réponse est alors établie permettant de déterminer la concentration entraînant 50 % de l'activité endocrine (CE 50). L'activité est exprimée en pourcentage par rapport à celle du composé de référence, le 17 β -œstradiol (E2) pour l'activité ER et la 2,3,7,8-tétrachloro-dibenzodioxine (TCDD) pour l'activité AhR.

Stratégie de fractionnement

L'extrait de lisier a subi deux procédures de fractionnement séquentiel basées sur le protocole développé par Creusot *et al.* (2013).

Dans un premier temps, l'extrait repris dans de l'heptane est fractionné sur phase solide (SPE) en utilisant des cartouches de silice (500 mg – 6 mL, 45 μ m ; Sulpelco, St-Quentin Fallavier, France) conditionnées au préalable avec le même solvant. L'échantillon est déposé sur la cartouche et les composés sont élués séquentiellement par différents solvants balayant une large gamme de polarité : heptane, un mélange heptane/dichlorométhane (50/50, v:v), d'acétate d'éthyle, puis un mélange méthanol/eau (50/50, v:v). Une fraction est collectée à chaque étape de l'éluion. Les quatre fractions (F1 à F4) ainsi générées sont ensuite évaporées à sec sous flux d'argon et reprises dans du méthanol. Chaque fraction est divisée en deux aliquotes. Une aliquote est destinée aux analyses biologiques, la seconde est conservée pour une deuxième étape de fractionnement. Toutes les fractions sont suivies par gravimétrie et stockées à -20°C.

Après évaluation de l'activité biologique, la fraction ayant le plus fort effet est fractionnée plus finement par chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur UV (Agilent 1200 Series HPLC system, Agilent technologies, France) et à un collecteur de fractions (Agilent 1260 infinity Series, Agilent technologies, France). Les composés présents dans la fraction injectée sont séparés en phase inverse (RP-HPLC) sur une colonne greffée C18 (Spherisorb ODS2, 5 μ m, 4,6 x 250 mm) (Waters, Guyancourt, France). Le gradient d'une durée de 120 min débute par un mélange eau/acétonitrile (80/20, v:v) et termine à 100 % d'acétonitrile avec un débit fixé à 1 mL/min. Toutes les 3 min, une fraction est collectée. Les 40 sous-fractions obtenues par RP-HPLC (f1 à f40) sont évaporées à sec sous flux d'argon et reprises dans du méthanol. La procédure est effectuée une première fois pour récolter les sous-fractions destinées aux tests *in vitro* puis renouvelée pour collecter les fractions réservées pour les analyses chimiques. Toutes les sous-fractions sont suivies par gravimétrie et stockées à -20°C.

Contrôle qualité

Dans le but d'éviter une contamination par les procédés de préparation et de fractionnement de l'échantillon, toutes les bouteilles de solvant sont neuves et dédiées uniquement à l'expérience. De plus, la veille de l'expérience, la verrerie est lavée au détergent et à l'acide, rincée à l'eau ultra-pure et calcinée à 450°C pendant 6h. En parallèle à la préparation des fractions, des blancs expérimentaux sont effectués selon la même procédure puis testés sur les lignées cellulaires utilisées.

Avant chaque étape de fractionnement par RP-HPLC, la répétabilité de la procédure de fractionnement (temps de rétention) est évaluée par l'injection d'une solution de composés de référence.

Les analyses chimiques ciblées

Les composés recherchés ainsi que les méthodes d'analyse utilisées sont listés Tableau 1. Les acquisitions par chromatographie en phase liquide haute performance couplée à un spectromètre de masse en tandem (HPLC-MS/MS et RRLC-MS/MS, Agilent Technologies ; UPLC-MS/MS, Waters) s'effectuent en mode MRM dynamique (*Multiple reaction monitoring*). Les analyses des composés volatiles ou volatilissables sont réalisées par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) ou à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECD). Avant chaque analyse, la résolution et la calibration du spectromètre de masse sont vérifiées par l'injection d'une solution de calibration. Les limites de détection et de quantification des composés recherchés et la répétabilité des analyses font l'objet d'un suivi régulier et ces points de contrôle sont vérifiés avant chaque série d'acquisitions.

Pour toutes les analyses, la quantification est réalisée par étalonnage interne. Avant chaque analyse, les fractions à injecter sont supplémentées en composés marqués (dilution isotopique).

Tableau 1 : Liste des composés ciblés et méthodes analytiques utilisées.

Classes de composés	Techniques analytiques	Familles de molécules	Composés quantifiés
Stéroïdes	<p>UPLC-MS/MS (Waters Technologie)</p> <p>colonne: Waters BEH C18 (100 x 2,1 mm , 1,7 µm)</p> <p>Gradient: Eau ultra-pure/méthanol</p> <p>Source: Electro-nébulisation positive</p>		<p>Thiocolchicoside, Dexaméthasone, 6α-Methylprednisolone, Hydrocortisone, Prednisolone, Cortisone, Prednisone, 11-ketotestosterone, Oestrilol, 11α-hydroxyprogesterone, 17,20-Dihydroxypregn-4-en-3-one, Norethindrone, 17α-hydroxypregnenolone, Testosterone, Androsténédione, 17α-Ethynylœstradiol, Oestrone, 17α-Oœstradiol, 17β-Oœstradiol, Spironolactone, Canrenone, Levonorgestrel, 17α-hydroxyprogesterone, 17α-hydroxyprogesterone, DHT: 5α-Androstan-17β-ol-3-one, DHEA : Trans-déhydroandrosterone , Norgestimate, Progesterone, Pregnenolone, Mestranol, DHA : 5α-androstan-3,17-dione</p>
Composés pharmaceutiques	<p>RRLC-MS/MS (Agilent Technologie)</p> <p>Colonne: Zorbax® SB C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)</p> <p>Gradient: Eau ultra-pure/acétonitrile et Eau ultra-pure/acétonitrile acidifiés à 0,1% acide formique</p> <p>Source: Electro-nébulisation positive et négative</p>	Antibiotiques	<p>Amoxicilline, Ampicilline, Pénicilline G, Pénicilline V, Oxacilline, Cloxacilline, Dicloxacilline, Cefalexine, Cefotaxime, Cefpodoxime, Ceftiofur, Cefuraoxime, Azithromycine, Clarithromycine, Érythromycine, Josamycine, Roxithromycine, Spiramycine, Tylosine, Lincomycine, Clindamycine, Enrofloxacin, Ciprofloxacine, Ciprofloxacine, Marbofloxacine, Norfloxacine, Ofloxacine, Acide Pipémidique, Acide Oxolinique, Fluméquine, Tétracycline, Oxytétracycline, Chlortétracycline, Doxycycline, Sulfadiazine, Sulfadiméthoxine, Sulfamérazine, Sulfaméthazine, Sulfaméthizole, Sulfaméthoxazole, Sulfanilamide, Sulfapyridine, Sulfathiazole, Triméthoprime, Bacitracine, Monensine, Salinomycine, Virginiamycine, Chloramphénicol, Thiamphénicol, Acide Fusidique, Métronidazole, Atenolol, Rifampicine, Rifampicine, Bisoprolol, Metoprolol, Propranolol, Sotalol, Timolol, 5-Fluorouracil, Daunorubicine, Doxorubicine, Épirubicine, Ifosfamide, Cyclophosphamide, Docetaxel, Gemcitabine, Methotrèxate, Tamoxifène, Abacavir, Indinavir, Lamivudine, Nefinavir, Nevirapine, Ritonavir, Saquinavir, Stavudine, Zidovudine, Sildenafil</p>
		Médicaments	<p>Carbamazépine, Diazepam, Alprazolam, Bromazepam, Clénbutérol, Terbutaline, Théophylline, Nordiazepam, Fluoxétine, Amitryptiline, Imipramine, Doxépine, Salbutamol, Paracétamol, Caféine, Ibuprofène, Naproxène, Diclofénac, Ketoprofène, Gemfibrozil</p>
Pesticides	<p>HPLC-MS/MS (Agilent Technologie)</p> <p>Colonne: Kinetex® C18 (100x2,1 mm, 1,7µm)</p> <p>Gradient: Eau ultra-pure/Méthanol avec ajout de 5mM d'acétate d'ammonium et 0,1% d'acide acétique</p> <p>Source: Electro-nébulisation positive</p>		<p>Cyromazine, 1,2,4 DCPU: 1-(2,4 Dichlorophényl)urée , 1,3,4 DCPU: 1-(3,4 Dichlorophényl)urée , 1,3,4 DCPMU : 1-(3,4 Dichlorophényl)-3-méthylurée, 2-Hydroxy-atrazine, Acétochlore, Acétochlore-ESA, Acétochlore-OA, Alachlore, Améthryne, Atrazine, Azoxystrobine, Bentazone, Carbendazime, Carbétamide, Carbofuran, Carbosulfan, Chlorotoluron, Chlorsulfuron, Cyanazine, DEA: Déséthyl-atrazine , Diflufenican, DIA: Déisopropyl-atrazine , DIA: Déisopropyl-atrazine , Dimétachlore, Diuron , DMSA, DMST, Flazasulfuron, Fluzafop-P-Butyl, Flusilazole, Hexazinone, Hydroxysimazine, Imidaclopride, Irgarol, Isoproturon, Linuron, Métazachlore, Methiocarb, S-Métolachlore, Métolachlore-ESA, Métolachlore-OA, Métoxon, Métsulfuron-Méthyl, Nicosulfuron, Prométhrine, Propachlore, Propazine, Propiconazole, Prosulfuron, Pyméthrozine, Quizalofop-Ethyl, Simazine, Quizalofop-P-Tefuryl, Quizalofop-P-Tefuryl, Terbuthrine, Terbutylazine, Terbutylazine-Déséthyle, Thiaméthoxam</p>
Polluants organiques persistants	<p>GC-ECD (Agilent Technologie)</p> <p>Colonne: colonne capillaire HP-5MS, 5% Phenyl Methyl Siloxane (30 m x 0.25mm, 0,25 µm)</p> <p>Gradient de 80°C à 320°C à 10°C/min, gaz vecteur Hélium</p> <p>Injection : <i>Spiltless</i></p>	Polychlorobiphényles (PCB)	<p>PCB 1, PCB 8, PCB 18, PCB 28, PCB 29, PCB 44, PCB 50, PCB 52, PCB 66, PCB 77, PCB 87, PCB 101, PCB 104, PCB 105, PCB 118, PCB 126, PCB 128, PCB 138, PCB 153, PCB 154, PCB 170, PCB 187, PCB 180, PCB 180, PCB 188, PCB 195, PCB 201, PCB 206</p>
		Polybromodiphényléthers (PBDE)	<p>PBDE 47, PBDE 99, PBDE 119, PBDE 153</p>
		Organochlorés	<p>Hexachlorobenzène, γ-Hexachlorocyclohexane, Heptachlore, Heptachloro-époxyde, 2,4'DDE, Cis-α-Chlordane, Trans-γ-Chlordane, 4,4'DDE, Dieldrin, 2,4'DDD, 4,4'DDD, 2,4'DDT, 4,4'DDT, Mirex</p>
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	<p>GC-MS (Agilent Technologie)</p> <p>Colonne: colonne capillaire HP-5MS, 5% Phenyl Methyl Siloxane (30 m x 0.25mm, 0,25 µm)</p> <p>Gradient de 50°C à 310°C à 10°C/min, gaz vecteur Hélium</p> <p>Injection : <i>Pulsed Spiltless</i></p>		<p>Naphtalène, Acénaphthylène, Acénaphthalène, Fluorène, Phénanthrène, Anthracène, Fluoranthène, Pyrène, Benzo[a]Anthracène, Triphénylène, Chrysène, Benzo[b]naphato(1,2-d)thiophène, Benzo[b]Fluoranthène, Benzo[j]Fluoranthène, Benzo[k]Fluoranthène, Benzo[e]pyrène, Benzo[a]pyrène, Pérylène, Indeno(1,2,3-cd)Pyrène, Dibenzo[a,h]anthracène, Dibenzo[a,c]anthracène, Benzo[g,h,i]pérylène</p>

Les analyses chimiques non ciblées

Les sous-fractions sélectionnées sont analysées par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse hybride quadripôle - temps de vol (LC-QTOF). Les composés sont séparés sur une colonne C18 (Kinetex[®] Phenomenex, 100 x 2,1 mm, 1,7 µm) à un débit de 0,3 mL/min par un gradient linéaire eau ultra-pure/ acétonitrile, les phases étant acidifiées avec 0,1% d'acide formique. Le gradient débute à une composition eau /acétonitrile de 90/10 (v:v) pour atteindre 100 % d'acétonitrile en 38 min. Une fois séparés, les composés sont ionisés positivement par électro-nébulisation (ESI). La source *Jet stream* ESI (Agilent Technologies) utilisée possède un système de gaz fourreau (azote) permettant la focalisation du flux d'ions augmentant ainsi la sensibilité de détection.

Dans un premier temps, les sous-fractions sont analysées en mode MS simple (TOF : Time Of Flight). Durant cette analyse, seul l'analyseur TOF est utilisé ce qui permet d'obtenir des informations sur la masse exacte des composés, indispensable pour établir la formule élémentaire. Cette première acquisition permet également d'établir une liste d'ions précurseurs à fragmenter. Les sous-fractions sont ensuite analysées en mode MS/MS (Q-TOF). Cette analyse permet d'obtenir les spectres de fragmentation des ions sélectionnés. Les spectres sont acquis sur une gamme de masse comprise entre 100 m/z et 1700 m/z et à trois énergies de collision, 20, 40 et 60 eV. Durant l'acquisition, un composé de référence (HP-921 = hexakis(1H, 1H, 3H-tétrafluoropropoxy)phosphazine ; 922.009798 m/z [M+H]⁺) est continuellement injecté afin de corriger toute dérive potentielle en masse. Comme pour les analyses ciblées, la résolution et la calibration de l'instrument sont vérifiées avant chaque analyse, tout comme les performances analytiques (sensibilité et reproductibilité).

Les données acquises sont ensuite retraitées avec le logiciel *MassHunter Qualitative* (Agilent Technologies). Tout d'abord, une recherche de tous les ions présents dans la sous-fraction est effectuée via la fonction d'extraction des caractéristiques moléculaires (*Molecular Feature Extraction*) du logiciel. Les résultats obtenus pour les sous-fractions de l'extrait sont comparés à ceux acquis pour les sous-fractions du blanc de protocole. La comparaison est réalisée par l'utilisation du logiciel *Mass Profiler* (Agilent Technologies). Cette étape permet d'isoler uniquement les composés présents dans les sous-fractions de l'échantillon. Les distributions isotopiques des ions moléculaires sélectionnés sont ensuite étudiées. La formule élémentaire du composé est calculée en utilisant C:0-60, H:0-200, N:0-30, O:0-30, S:0-10, Cl:0-10, F:0-10, P:0-10 comme atomes constitutifs. Les atomes de brome ayant une signature isotopique bien identifiable sont ajoutés à cette liste si leur présence est suspectée. Seules les formules brutes les plus probables (ayant un score supérieur à 50%) sont générées. La finalisation de l'identification s'effectue sur les spectres de fragmentations obtenus. Le spectre de fragmentation de l'ion précurseur est alors comparé aux spectres de fragmentation théoriques disponibles dans les bases de données *Metlin*, *Forensics*, *Pesticides*, *ChemSpider* et *MassBank*. Si le spectre obtenu ne peut être corrélé à un spectre référencé, la prédiction de la structure moléculaire est établie par l'utilisation du logiciel *Molecular structure correlator* (Agilent Technologies). Ce logiciel est basé sur des algorithmes mathématiques qui prédisent

la fragmentation des molécules associées à la formule élémentaire définie (Hill and Mortishire-Smith, 2005). Un score de correspondance, entre les fragments prédits et ceux obtenus lors de l'analyse est alors calculé.

Détermination de l'équilibre des masses

L'équilibre des masses est utilisé pour déterminer la contribution des composés, détectés et quantifiés, à l'activité biologique de l'échantillon.

Les activités œstrogénique et *dioxine-like* de l'échantillon sont exprimées en équivalent toxique biologique (TEQ-Bio). Cette valeur s'obtient par le rapport de la concentration donnant 50 % de la réponse maximale (CE 50) du composé de référence (l'œstradiol pour l'activité ER et la TCDD pour l'activité AhR) sur la CE 50 de l'échantillon. Elle est exprimée en masse de ligand de référence par masse d'échantillon (e.g. g d'équivalents-œstradiol par g de lisier sec). En parallèle, les analyses chimiques permettent de déterminer un équivalent toxique chimique (TEQ-Chim) défini comme la somme, sur l'ensemble des composés actifs détectés, des produits de la concentration mesurée d'un composé détecté multipliée par son facteur d'équivalent toxique (TEF) c'est-à-dire l'activité relative du composé sur le récepteur par rapport au composé de référence.

Le ratio entre TEQ-Bio et TEQ-Chim permet d'estimer la contribution des composés quantifiés à l'activité biologique mesurée.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

Isolement et détection de composés connus

L'extrait de lisier a tout d'abord été fractionné par SPE sur cartouches de silice. Chacune des fractions obtenues montre une activité œstrogénique et *dioxine-like* (Figure 2). 70 % de l'activité œstrogénique totale et 69 % de l'activité *dioxine-like* sont localisées dans la fraction 2.

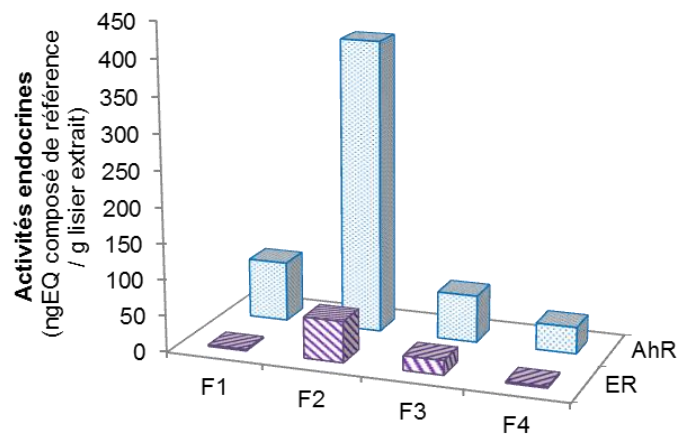


Figure 2 : Quantification des activités endocrines *in vitro* des fractions de l'extrait de lisier obtenues par SPE – Les histogrammes à points correspondent à l'activité *dioxine-like* (AhR) ngTCDD-EQ/g de lisier ; les histogrammes rayés représentent l'activité œstrogénique (ER) en ngE2-EQ/g de lisier.

La polarité faible des solvants d'élution utilisés pour collecter cette fraction suggère la présence de composés plutôt apolaires. Au vu de la réponse biologique, la fraction 2 a été fractionnée par RP-HPLC. Au total, 40 sous-fractions ont été collectées et testées *in vitro*. Les activités endocrines de chaque sous-fraction sont présentées Figure 3. Concernant l'activité AhR, même si 9 fractions présentent une activité (f14, f16-19, f23, f25-27), seulement les activités de deux d'entre elles ont pu être quantifiées grâce à l'obtention de CE 50 (f18 et f23). L'activité œstrogénique des sous-fractions a également été évaluée. 15 sous-fractions sont positives au test ER (f9-10, f12-23, f25-26) et les activités de 11 d'entre elles ont pu être quantifiées (f10-21).

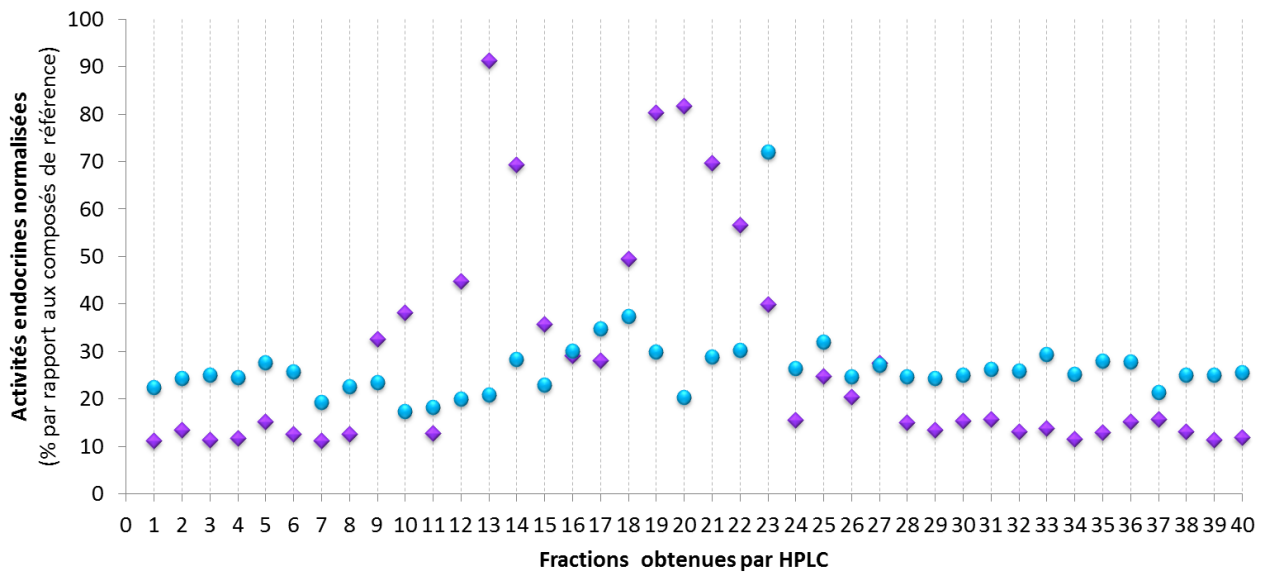


Figure 3 : Pourcentage d'activité endocrine mesurée dans chaque fraction obtenue par HPLC diluée au 1/10 – Les points représentent l'activité *dioxine-like* ; les losanges correspondent à l'activité œstrogénique.

Des analyses chimiques ciblées ont été menées sur les sous-fractions les plus actives : les sous-fractions f18 et f23 pour l'activité AhR et les sous-fractions f13 et f19-22 pour l'activité ER. Au total, 253 molécules appartenant à 5 familles de composés ont été recherchés dans ces sous-fractions. Au vu de l'activité œstrogénique non négligeable de la fraction 3 obtenue par SPE, la détection des stéroïdes a également été conduite sur cette fraction. Les composés détectés sont listés Tableau 2. Au total, 6 stéroïdes, 5 composés pharmaceutiques, un pesticide, un PCB et un HAP ont pu être observés dans les fractions analysées en faible concentration (de l'ordre du ng/g à la dizaine de ng/g) Lors de la première étude menée par Combalbert *et al.*, sur le même échantillon, les concentrations de certains stéroïdes et antibiotiques (lincomycine, œstrone, β - et α - œstradiol et œstriol) étaient de l'ordre de la dizaine voire de plusieurs centaines de ng/g (Combalbert *et al.*, 2010; Capdeville, 2011) . Les pertes de la réponse biologique ont été également estimées. 70 % de l'activité œstrogénique et 78 % de l'activité *dioxine-like* de l'extrait global ont été perdues par le fractionnement sur phase solide. Ces pertes peuvent être attribuées à différents facteurs comme l'évaporation à sec répétée, le transfert successif dans des flacons de différents volumes, l'adsorption sur les parois ou le stockage à -20°C puis la décongélation de l'extrait avant chaque manipulation. Bien que la méthodologie ait été validée sur un sédiment dopé chimiquement (Creusot *et al.*, 2013), il se peut que lors de l'extraction sur phase solide du lisier, tous les composés présents n'ont pas été retenus sur les cartouches ou à contrario élués. L'influence de la matrice sur les rendements d'extraction a été documentée par Arsenault (2012). Le fractionnement secondaire par RP-HPLC peut également entraîner des pertes de composés (e.g. mauvaise solubilisation des composés dans le solvant de reprise avant l'injection, perte d'échantillon dû à l'injecteur) (Meyer, 2010). Certains auteurs ont déjà documenté ces pertes de réponse biologique sur des échantillons soumis à l'approche EDA.

Tableau 2 : Composés connus détectés dans les sous-fractions actives par analyse chimique ciblée

Activités	Sous-fractions	Pesticides	Stéroïdes	Médicaments	Antibiotiques	Polluants organiques persistants	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
AhR	f18	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	Doxépine (1,9 ng.g ⁻¹)	<i>n.d</i>	PCB118 (7,77 ng.g ⁻¹)	<i>n.d</i>
	f23	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	Anthracène (1 ng.g ⁻¹)
ER	f13	<i>n.d</i>	11-Kétotestostérone (2,16 ng.g ⁻¹)	Bromazepam (15,63 ng.g ⁻¹) Théophylline (13,86 ng.g ⁻¹)	<i>Lincomycine</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
	f19	<i>n.d</i>	17 β-œstradiol (0,98 ng.g-1) <i>17α-œstradiol</i>	Imipramine (0,7 ng.g ⁻¹)	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
	f20	<i>n.d</i>	œstrone (4,16 ng.g-1)	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
	f21	<i>n.d</i>	<i>4-Androstène-3,17dione</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
	f22	<i>Azoxystrobine</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>
	F3	<i>n.d</i>	œstriol (68,4 ng.g-1) <i>17α-œstradiol (0,7 ng.g-1)</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>	<i>n.d</i>

En italique : composé à l'état de trace dans l'échantillon (<0,5 ng.g⁻¹)

n.d : non détecté

Brack et Schirmer (2003) ont appliqué quatre étapes successives de fractionnement sur un extrait de sédiment de rivière. La moitié de l'activité éthoxyresorufin-*O*-dééthylase (EROD) de l'échantillon a été perdue lors des deux premières étapes de fractionnement et une perte de 69 % de l'activité EROD a été observée après la troisième étape de fractionnement. Ces pertes ont été imputées par les auteurs à la préparation des fractions. Sur d'autres échantillons de sédiment ayant subi trois processus successives de fractionnement, ces mêmes auteurs ont observé une perte de la quasi-totalité de l'activité EROD (97,5 %) à l'issue du troisième fractionnement effectué par RP-HPLC (Brack et al., 2005c).

Occurrence et contribution des composés identifiés à l'activité biologique de l'extrait brut de lisier

Concernant l'occurrence des composés détectés dans les fractions de lisiers, une partie des molécules identifiées ont déjà été observées dans des déchets d'élevage. Dans les sous-fractions présentant une activité œstrogénique, différentes hormones ont pu être isolées ce qui est en accord avec les résultats de Burnison *et al.* (2003) qui ont détecté le 17 β -œstradiol et l'œstrone dans des lisiers porcins par l'utilisation de l'approche TIE (« *Toxicity Identification Evaluation* »). Les hormones œstrogéniques 17 β - et 17 α -œstradiol, œstriol et œstrone sont naturellement présentes chez les mammifères et sont retrouvées dans les urines et les fèces (Lange et al., 2002; Combalbert et al., 2012; Liu et al., 2012). Une fois dans l'environnement ces stéroïdes peuvent être dégradés et générer des produits de transformation. Plusieurs auteurs rapportent notamment que l'œstriol et l'œstrone sont des métabolites intermédiaires générés par certaines bactéries en présence d'œstradiol (Combalbert et Hernandez-Raquet, 2010; Mashtare *et al.*, 2013). Ces molécules sont des ligands naturels des récepteurs œstrogéniques et contribuent à l'activité endocrine du lisier. La concentration d'œstriol dans la fraction 3 explique à elle seule 58 % de l'activité œstrogénique mesurée et celle du 17 β -œstradiol contribue à 12 % de la réponse biologique déterminée dans la sous-fraction 19. Les faibles concentrations des autres composés œstrogéniques ne permettent pas d'expliquer l'activité mesurée. D'autres hormones ont également été caractérisées dans les fractions actives. L'androstènedione est un métabolite androgénique naturellement excrété et son occurrence dans les déchets d'élevage a été documenté par Liu et al. (2012). Toutefois sa présence peut-être également issue, en condition aérobie, de la dégradation de la testostérone par les microorganismes proliférant au sein des lisiers (Yang et al., 2010; Yang et al., 2011). La dégradation de la testostérone a lieu dans les heures qui suivent son introduction dans le milieu et l'androstènedione est l'un des premiers produits générés. Donova (2007) a montré que les actinomycètes participaient à la transformation des stéroïdes dans les écosystèmes. Ils sont capable de réduire entre autre le groupement 17C=O en 17 β -OH. Dans la même logique, la présence de la 11-kétotestostérone (17 β)-hydroxyandrost-4-ène-3,11-dione) dans les lisiers pourraient provenir de la dégradation de l'androstènedione ou d'autres produits de dégradation de la testostérone. En effet, des auteurs ont identifié la 11-kétotestostérone comme un produit de transformation de l'adrénostérone par *Cunninghamella elegans*, une

souche de champignon appartenant au taxon des zygomycètes, retrouvée dans les sols et végétaux en décomposition (Choudhary et al., 2007). L'androstènedione et le 11-cétotestostérone sont des androgènes qui au vu de leurs faibles concentrations, ne peuvent expliquer l'activité œstrogénique des sous-fractions. Néanmoins, ces molécules peuvent contribuer, certainement à des niveaux faibles, à l'activité androgénique du lisier brut mesurée par Combalbert *et al.* (2010).

Des produits pharmaceutiques ont également été détectés, notamment des antidépresseurs (doxépine, bromazépam et imipramine), des stimulants (la théophylline) et des antibiotiques (lincomycine). La présence de lincomycine dans les lisiers est relativement bien renseignée, à la différence des autres médicaments identifiés (Togola et Desforges, 2009; Capdeville, 2011). Néanmoins, mêmes si leur présence n'est pas documentée dans les déjections animales, tous ces molécules ont pu être retrouvées dans des effluents agricoles (Capdeville, 2011). Tous ces produits pharmaceutiques ne possèdent pas d'activités endocrines de type ER ou AhR.

Le PCB 118 et l'azoxystrobine, un pesticide, ont également été détectés dans les fractions de lisier. La présence de PCB 118 peut être d'origine endogène (liée à une contamination diffuse de l'alimentation), par déjection, ou liée à une contamination par la structure d'élevage (e.g. lubrifiant, peinture...). Le PCB 118 n'est pas actif en AhR. L'azoxystrobine, détecté dans la sous-fraction 22, peut provenir de différentes sources. Le rapport de l'(ANSES, 2010) a listé un certain nombre de sites où est retrouvé l'azoxystrobine (e.g. grandes cultures, eaux de surface et eaux souterraines, air ambiant...).

Un dernier groupe de composés a été recherché, les HAP. L'analyse a permis de détecter de l'anthracène dans la sous-fraction 23. Cette dernière possède la plus forte activité AhR mais la concentration d'anthracène déterminé ne permet pas d'expliquer la réponse cellulaire observée. La présence de ce composé dans les lisiers est probablement due à l'activité agricole (e.g. échappement de moteurs, revêtement...) plutôt qu'aux animaux eux-mêmes (Soleille et Brignon, 2006).

Caractérisation moléculaire de composés non ciblés par LC-QTOF

Les composés isolés et détectés dans les fractions actives par l'analyse chimique ciblée ne permettent pas d'expliquer totalement les réponses biologiques mesurées. Ceci suggère que d'autres composés sont responsables de l'activité endocrine du lisier. Afin de caractériser ces molécules actives, les fractions présentant la plus forte activité (f13, f19, f20 et f23) ont été analysées par LC-QTOF. Plus d'une centaine de composés ont été observés. 523, 147 et 133 ions ont été détectés respectivement dans les sous-fractions œstrogéniques 13, 19 et 20 ; 211 ions ont été mis en évidence pour la sous-fraction 23 présentant une activité *dioxine-like*.

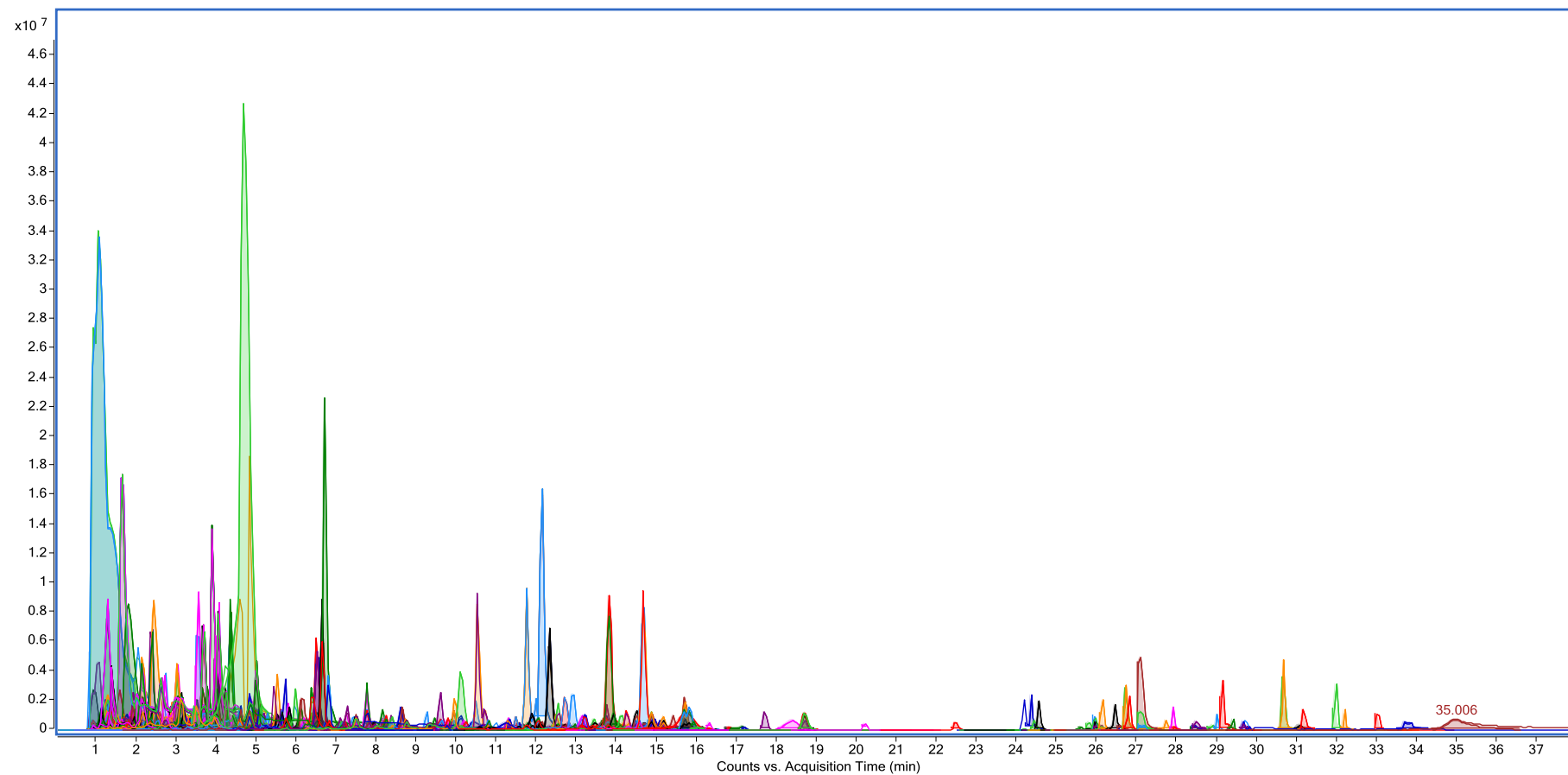


Figure 4 : Chromatogramme des ions détectés dans la sous-fraction 13 en LC-QTOF

La figure 4 représente le chromatogramme reconstitué de l'ensemble des composés détectés dans la sous-fraction 13 et illustre la complexité de l'échantillon même après deux étapes successives de fractionnement. La présence d'un nombre important d'ions rend le procédé d'identification extrêmement long et complexe, chaque amas isotopique devant être vérifié manuellement afin de s'affranchir d'erreurs d'attribution par le logiciel. Des colonnes d'affinité contenant les récepteurs nucléaires ER ou AhR pourraient être utilisées pour purifier les sous-fractions et isoler seulement les composés actifs (Riu et al., 2008). Ceci permettrait de limiter le nombre de molécules détectées et par conséquent de faciliter leur identification.

Concernant la caractérisation des composés dans les sous-fractions, la formule élémentaire pour les ions détectés a pu être établie avec des scores, basés sur la distribution et l'abondance isotopique, supérieurs à 80 % et une différence de masse inférieure à 5 ppm. Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur l'identification des structures moléculaires, les ions précurseurs choisis ont été fragmentés. 143, 67 et 42 ions ont été sélectionnés pour la fragmentation dans les sous-fractions 13, 19 et 20, respectivement. Aucun composé n'a pu être identifié par recherche dans les banques de spectres de fragmentation disponibles. Un logiciel de prédiction de structure moléculaire (*Molecular structure correlator*) a donc été utilisé afin d'isoler une liste de composés suspects. Dans la sous-fraction ayant la plus forte activité œstrogénique, la f13, 50 molécules ont pu être proposées dont une trentaine ayant des scores de prédiction supérieurs à 80 %. Le Tableau 3 liste à titre d'exemple les molécules suspectées, dans cette sous-fraction, ayant un score MS et MS/MS supérieurs à 85%. La présence d'acides gras, de différents médicaments et de métabolites de médicaments peut être envisagée. L'identification des composés dans toutes les sous-fractions analysées est en cours. Néanmoins, la majorité des molécules suspectées, ayant un score prédictif suffisant, ne sont actuellement pas disponibles commercialement. Ceci représente un des verrous majeur de l'analyse par spectrométrie de masse haute résolution et donc un frein important dans la finalisation de l'approche EDA (Brack et al., 2008). Malgré cela, le choix de la matrice lisier représente un enjeu intéressant pour l'application de la méthodologie EDA. Les nombreuses substances actives administrées lors des traitements vétérinaires curatifs ou préventifs et leur possible métabolisation par l'organisme contribuent à la complexité de l'échantillon. De plus, les déjections animales générées sont ensuite stockées. Des micro-organismes prolifèrent au sein de cette matrice et contribuent à la transformation des molécules présentes. Comme le montre la présence des stéroïdes détectés par l'analyse ciblée, il se pourrait que des métabolites primaires de composés initiaux soient à nouveau transformés en métabolites secondaires (Donova, 2007; Combalbert et Hernandez-Raquet, 2010; Mashtare et al., 2013). Les processus abiotiques tels que l'humidité, le pH, la température, les rayonnements solaires peuvent également créer des produits de transformation dans les lisiers. Togola et Desforges (2009) exposent ces différents procédés de dégradation dans les effluents agricoles et illustrent la complexité des processus biotiques et abiotiques pouvant être exercés sur les déchets agricoles. Tous ces processus, non exhaustifs, peuvent générer des composés inconnus rendant l'identification moléculaire d'autant plus difficile. Mais, la démarche EDA

représente à ce jour une méthode de choix pour détecter et identifier parmi ces molécules de nouveaux perturbateurs endocriniens.

CONCLUSION

L'approche EDA a été appliquée à un échantillon de lisier porcin ayant une activité endocrine importante. Cette méthodologie a permis de simplifier et d'isoler des perturbateurs endocriniens et des composés connus tels que des stéroïdes et des produits pharmaceutiques. L'analyse chimique non ciblée des sous-fractions actives a permis de démontrer la présence d'un nombre important de molécules autres que celles couramment recherchées. L'identification de ces composés suspectés encore en cours constitue le point limitant de cette approche par le manque d'étalons commerciaux et de banques de spectres de référence adaptées. Les bases de données actuellement disponibles ne contiennent qu'une quantité relativement faible de composés (quelques milliers), comparativement aux millions de molécules potentiellement présentes dans l'environnement. De plus, afin de confirmer de façon sûre l'identification mais également l'effet biologique des composés suspectés, la disponibilité dans le commerce de composés purs est une étape indispensable pour leur identification sans équivoque, ce qui n'est malheureusement pas toujours le cas. Il est également à noter que sur des matrices extrêmement complexes telles que les lisiers, malgré plusieurs fractionnements successifs, les fractions ultimes générées contiennent un nombre de composés relativement important, rendant le procédé d'identification long et complexe. D'autres étapes de purification seraient intéressantes à utiliser, notamment l'utilisation de colonne d'affinité, mais cela entraînerait inéluctablement une perte supplémentaire de composés actifs. La simplification excessive de l'échantillon peut influencer aussi sur les effets de mélange et donc entraîner la perte d'informations essentielles dans la compréhension du lien cause-effet. Cette étude démontre donc toute la difficulté d'appliquer une telle méthodologie sur des échantillons très complexes et souligne les limites actuelles de cette démarche. Néanmoins, elle représente une alternative intéressante pour l'identification de composés actifs non ciblés a priori ou inconnus.

Tableau 3 : Exemple de molécules suspectées dans la sous-fraction 13 – composés détectés en LC-QTOF ayant des scores MS et MS/MS supérieurs à 85 %.

Identification en mode MS					Composés suspectés en mode MS/MS			
[M+H] ⁺ (m/z)	Masse du neutre (Da)	Formule élémentaire	Score MS	Diff	Nom	Score MS/MS ^a	Base de données	Descriptif
190.1438	189.1363	C9H19NO3	97.35%	1.15 ppm	(2S,3S,4S)-2-[(1S)-1-Hydroxypentyl]-3,4-pyrrolidinediol	95,79%	Chemspider	Traitement de la prévention du diabète, de l'obésité et régulation de l'appétit
222.1488	221.1413	C13H19NO2	97.21%	1.22 ppm	Ibuproxam	88,22%	Forensic	Anti-inflammatoire
301.191	300.1836	C18H24N2O2	85.67%	0,09 ppm	Ergoline-8-methanol, 10-methoxy-1,6 dimethyl	93.14%	Metlin	Métabolite de Nicergoline (vasodilateur)
279.1702	278.1629	C15H22N2O3	97.92%	0.02 ppm	Acetylprocaïne	88,66%	Forensic	Anestésiant
281.1858	280.1784	C15H24N2O3	99.51%	0.67 ppm	Cornecain	92,38%	Forensic	Anestésiant
287.1754	286.1681	C17H22N2O2	86.38%	0 ppm	Fenpipalone	92.15%	Forensic	Anti-inflammatoire
297.1597	296.1525	C18H20N2O2	85.46%	0,06 ppm	Vinconate	89.28%	Metlin	Vasodilateur
311.1753	310.1681	C19H22N2O2	99.36%	0,21 ppm	O-Desmethylquinidine	91.72%	Metlin	Métabolite d'antiarythmique
362.2689	361.2615	C22H35NO3	99.60%	0.11 ppm	1-(4-[3-Amino-4-hydroxy-3-(hydroxymethyl)butyl]phenyl)-5-cyclohexyl-1-pentanone	90.83%	Chemspider	n.r
296.1857	295.1785	C16H25NO4	95.60%	0.53 ppm	Esmolol	93.51%	Forensic	Beta-bloquant
349.2125	348.2052	C19H28N2O4	94.55%	0.1 ppm	Carpindolol	87.27%	Chemspider	Inhibiteur des acides gras libres sanguin et de l'appétit
317.1865	316.1792	C18H24N2O3	97.61%	1.47 ppm	Ergoline-1,8-dimethanol, 10-methoxy-6-methyl-, (8-beta)-	93.81%	Metlin	Métabolite de Nicergoline (vasodilateur)
575.2755	574.2683	C33H38N2O7	99.78%	0.47 ppm	3-[Benzyl(bicyclo[2.2.1]hept-2-ylacetyl)amino]-8-formyl-4-hydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-6-methoxy-3,4,4a,9b-tetrahydrodibenzo[b,d]furan-1-carboxamide	95.94%	Chemspider	n.r
575.2755	574.2683	C33H38N2O7	99.78%	0.47 ppm	3-[Benzyl(bicyclo[2.2.1]hept-2-ylacetyl)amino]-8-formyl-4-hydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-6-methoxy-3,4,4a,9b-tetrahydrodibenzo[b,d]furan-1-carboxamide	90.37%	Chemspider	n.r
295.2266	294.2194	C18H30O3	85.95%	0.44 ppm	9-hydroxy-10E-octadecen-12-ynoic acid	92.06%	Metlin	Acide gras

n.r non renseigné

^aScore obtenu par le logiciel *Molecular Structure Correlator (Agilent Technologies)*

Remerciements

Les auteurs remercient l'Agence Nationale de la Recherche (ANR : projet DIPERPHA), le Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie, la Région Aquitaine, le CPER A2E - projet cofinancé par l'Union européenne et la Région Aquitaine - pour leur soutien financier. L'Europe s'engage en Aquitaine avec le fonds européen de développement régional.

Partie III

*Application de l'analyse dirigée par l'effet pour
l'identification de composés potentiellement
responsable d'une toxicité non expliquée dans
les coquillages du bassin d'Arcachon*

Partie III - Application de l'analyse dirigée par l'effet pour l'identification de composés potentiellement responsable d'une toxicité non expliquée dans les coquillages du bassin d'Arcachon

Bassin d'Arcachon, lagune semi-fermée du Sud-Ouest de la France, est l'un des plus importants producteurs d'huître *Crassosteras gigas* de France (8 à 10 000 tonnes par an). En 2005, sur la base de bio-essais souris, une toxicité ne pouvant être expliquée, ni par la présence d'algues phytoplanctoniques réputées toxiques, ni par la présence de toxines connues, est apparue dans le Bassin d'Arcachon. Cet épisode fût qualifié de « toxicité atypique ». D'autres épisodes de toxicité atypique furent observés en 2006 et 2008, entraînant l'interdiction de la commercialisation des huîtres et ayant de fortes répercussions économiques sur les activités conchylicoles. Aujourd'hui, ces toxicités atypiques sont toujours observées dans le bassin d'Arcachon.

Dans le cadre du programme national Arcachon (PNA), la mise en œuvre d'une approche d'analyse dirigée par les effets biologiques, (EDA ; Effect-Directed Analysis) a été entreprise afin d'identifier les composés potentiellement à l'origine de la toxicité atypique observée en 2006 à partir des coquillages du Bassin d'Arcachon.

- L'approche EDA a été menée sur des extraits de glandes digestives de moules provenant du Bassin d'Arcachon. Deux lots d'échantillons de 2006 ont été utilisés, un lot dit « positif » c'est-à-dire entraînant une mortalité sur souris après injection intra péritonéale et un lot dit « témoin/contrôle » n'entraînant pas de mortalité sur souris. Ces extraits ont été fractionnés de façon très fine par chromatographie en phase liquide (HPLC) afin d'isoler le ou les agent(s) toxique(s). La cytotoxicité des différentes fractions a ensuite été évaluée par une batterie de tests *in vitro* (Chapitre 3, § 2.2.2 p 76).
- Les fractions de l'extrait « positif » présentant une toxicité significativement plus élevée que celle de l'extrait « témoin » ont ensuite été caractérisées par LC-QTOF. Les analyses des fractions « positives » sélectionnées et des fractions « témoins » correspondantes ont permis de mettre en évidence des composés présents uniquement dans les fractions « positives ».
- Les informations structurales obtenues sur ces composés montrent qu'il s'agit d'une famille homologue de composés polycycliques bromés potentiellement d'origine naturelle.

Cette étude a fait l'objet d'un article qui sera prochainement soumis à publication.

Article n°5 : *Identification of potential toxic compounds in marine shellfish using Effect-Directed Analysis approach and detection by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry*

Article n°5

Identification of potential toxic compounds in marine shellfish using Effect-Directed Analysis approach and detection by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry

Identification of potential toxic compounds in marine shellfish using Effect-Directed Analysis approach and detection by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry

Caroline Gardia-Parège¹, Marie-Hélène Dévier¹, Emmanuel Geneste¹, Patrick Pardon¹,
Patrick Mazellier¹, Bénédicte Morin¹, Valérie Fessard², Aurélie Ledreux³, Cécile Bernard³,
Anne-Laure Sérandour⁴, Sophie Krys⁴, Hélène Budzinski¹

¹Université de Bordeaux, Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC, UMR 5805 CNRS), Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'environnement (LPTC), 33405 Talence cedex, France

²Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), Unité de Caractérisation des Toxines, 94700 Maisons-Alfort, France.

³Museum National d'Histoire Naturel (CNRS UMR 7245) 75005 Paris, France.

⁴Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), Unité de Toxicologie des Contaminants, 35300 Fougères, France.

ABSTRACT

Since 2005 toxicity events of shellfish evidenced by mouse bioassays (MBA) were observed in the Arcachon Bay, a semi-enclosed lagoon located on the French South-West Atlantic coast. Classical methods by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) to find marine toxins did not allowed the explanation of this effects; these episodes are defined as atypical toxicity. Considering this, since 2008, a national research program was created to try to identify compounds responsible to this atypical toxicity. To answer this question, recent innovative approach combining biological tools and chemical analysis, EDA approach, was developed to isolate toxic molecules in shellfish from the bay. Thus, this method was performed on mussel sample having a toxicity effect on MBA. The fractionation process by high performance liquid chromatography (HPLC) involving cell-based assays, allowed the simplification of this complex mixture until the isolation of positive hyperfractions. The identification of compounds responsible to the biological effects was carried out using liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (LC-HRMS). Halogenated compounds as brominated molecules were found in positive hyperfractions. This type of compounds could be known for toxicity effects. The confirmation step remained to be performed but the discovery of these molecules was already a possible lead to explain the atypical toxicity observed.

INTRODUCTION

Marine microalgae constitute the elemental food of many filter-feeding shellfish and fish but these organisms have the ability to produce biotoxins and can make unfit for consumption their predator (Huisman, 2005). According to the diversity of species, a wide range of phycotoxins which different mechanisms of action exist (Rossini and Hess, 2010). Moreover, the proliferation of harmful algae blooms increased with changing global climate and eutrophication (O'Neil et al., 2012). In this regards, phycotoxins can cause a real problem for marine activities (shellfish farming, fishery activities, tourism). In France, Arcachon Bay is a semi-enclosed lagoon located in south-western of the French Atlantic coast where an important oyster-farming activity using the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) and fishing from the shore take place. In order to protect human's health of food poisoning, regulations on phycotoxins have been established to allow a sanitary control of sea products. Since 2011, the European commission changed the monitoring based on mouse bioassays (MBA) by a more sensitive and specific method by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (EUROPEAN COMMISSION, 2011). This method based on targeted phycotoxin analysis allows the detection of thirteen known lipophilic toxins but this preselected set of compounds does not often explain the potential toxic effects observed on shellfish. Since 2005, shellfish from the Arcachon Bay, exhibited recurring positive MBA results but any targeted phycotoxins could be linked to these events. These specific episodes described as atypical toxicity have given rise to a national research program since 2008 which aims at identifying the compounds responsible to the positive MBA results observed. In this program, different lines of research have been conducted to meet the assumptions to suspect the presence of derivatives of known phycotoxins, new toxins or toxins associated with microorganisms or contaminants.

To identify unknown toxic compounds, bioanalytical approaches, such as the EDA approach (Effect-Directed Analysis), have been developed. This approach adapted to complex mixture allows the isolation of toxic compounds by a reduction step by step of sample by fractionation process using chromatographic techniques (Schuetzle and Lewtas, 1986; Brack, 2003; Bakker et al., 2007; Hecker and Hollert, 2009). The simplification of sample was directed by bioassays until the isolation of a few molecule groups or ideally to individual toxicants. The final step is the identification of the compounds responsible of the observed effects and confirmation of their biological activity. To date, chemical analysis tool have been optimized (high sensitivity, high resolving power, mass accuracy) to allow for the identification of "unknown" compounds (Dévier et al., 2011). Many studies already proved the usefulness of EDA approach to identify active compounds in different complex matrices like irradiated water (Tobias Schulze et al., 2010), sediment (Bataineh et al., 2010; Lübcke-von Varel et al., 2012), food (Van Ede et al., 2008), and ambient airborne particules (Durant and Lafleur, 2011). Donkin *et al* used a similar approach to separate toxic fractions in mussel sample coming from Sutton Harbour (United Kingdom) in order to identify the cause of this

toxicity and they evidenced the presence of aromatics hydrocarbons in toxic fractions (Donkin et al., 2003).

In this regards, EDA approach was chosen as the analytical method to answer one axis of the national research program. To apply this approach, a collaborative study involving five laboratories was conducted and a standard operating procedure was created to limit the variability of results between laboratories. Previous bioassays development were performed using three cell lines –responses of humans hepatic (HepG2), human intestinal (Caco2), and mouse neuronal (Neuro2a) cell lines - to allow a marine toxins screening (Sérandour et al., 2012). These tests were allowed measuring the biological effects of the fraction drawing dose-response curves and defining the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}). This cell-based assay (CBA) were developed with known lipophilic phycotoxins namely okadaic acid (OA), azaspiracid-1 (AZA1) and pectenotoxin-2 (PTX2) (Sérandour et al., 2012). The three toxin tests induced different biological responses. OA was shown a complete dose-response curve. PTX2 was the less toxic. The third phycotoxin AZA1 produced cytotoxicity response only on HepG2 and Neuro2a, but not on Caco2. The variability of cell responses in intra- and inter-laboratory comparison gave a large percent of variation. The mean values were ranging from 35 to 54% for intra-laboratory comparison and from 37% to 48% for inter-laboratory comparison (Sérandour et al., 2012). Then, CBA were validated using mussel extract and mussel spiked extract with the same phycotoxins (Ledreux et al., 2012). Mussel extracts induced naturally a cytotoxicity on the selected cell lines but the shellfish spiked extract was significantly more toxic than the control (Ledreux et al., 2012). The development of this CBA was necessary to have a discerning bioassays adapted to discriminate different phycotoxins and available to EDA approach.

This article was focused on the fractionation process and the identification of compounds. The simplification of sample was performed using high performance liquid chromatography (HPLC). The setting up of fractionation process required a methodological development to avoid the loss of the toxicity. In order to confirm the fractionation procedure, two analytical HPLC modes were tested and a gradient development was performed using phycotoxin standard solution. After optimization and validation of the fractionation process, two fractionation steps on samples were carried out to isolate toxic fractions. Then identification of compounds was performed using liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole - time of flight system (LC-QTOF). Indeed, liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry was already used as powerful tool to identify marine toxins in biota (Gerssen et al., 2011; Lajeunesse et al., 2012). Thus, the aim of this study was the application of EDA approach to find compounds responsible to the atypical toxicity of shellfish.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and reagents

All solvents used were at least of gradient HPLC grade quality for fractionation process or ultra gradient grade for LC-QTOF-MS analysis and were purchased from VWR International (Strasbourg, France), Acros Organics (Noisy le Grand, France), Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France) and Atlantic labo-ICS (Bruges, France). Milli-Q water was prepared from a Milli-Q water purification system using an EDS-PAK filter (Millipore SA, Guyancourt, France). Argon gas used for solvent drying was of 99.999% purity (Linde Gas, Bassens, France). Standard lipophilic phycotoxin solutions of OA, PTX2 and AZA1 were purchased from the National Research Council Canada (Halifax, NS, Canada). Their concentrations were 17.7 μM , 10 μM and 1.47 μM methanol, respectively.

Shellfish origin and extract preparation

Mussels (*Mytilus sp.*) from the Arcachon Bay (French Atlantic coast) were collected during atypical toxic events in 2006. Two groups of mussels were sampled in two geographic site of the Arcachon Bay. Mussels from site 1 were negative to MBA and qualified as control sample. Mussel group from site 2 was shown as MBA-positive shellfish extract and called as positive sample (Ledreux et al., 2012). Mussel digestive glands (DG) were mixed, homogenated and extracted with methanol and the procedure is fully described elsewhere (Ledreux et al., 2012). Control and MBA-positive mussel extracts had a matrix concentration of 5 g DG/mL methanol. The extracts were stored at -80°C in glass vials and were sent to the different laboratories within 24 hours in dry ice.

Cytotoxicity assays

The responses of human hepatic (HepG2), human intestinal (Caco2), and mouse neuronal (Neuro2a) cell lines were chosen as cytotoxicity assays allowing the detection of the phycotoxin standards tested. The assays were performed using standard operating procedures (SOP). SOP included five laboratories and was carry out for both cell culture and cytotoxicity assays, using the same batches of cell lines, culture media, sera, and certified reference calibration solutions of marine toxins (Sérandour et al., 2012). The cell cytotoxicity was measured using the MTT assay. Procedures are fully described in Ledreux et al., (2012) and Sérandour et al., (2012). Cell responses were expressed by the relative 50% inhibition concentration (IC_{50}) value using dose-response curves. Results were

statistically compared by the non-parametric Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison post-test. Values were significantly different when $p < 0.05$.

Fractionation procedure

The fractionation of mussel samples was performed using high performance liquid chromatography (HPLC). Since no compounds were targeted in this study, procedures on both reversed phase (RP) - HPLC and normal phase (NP) - HPLC were optimized. The methodological developments aimed at ensuring that the HPLC fractionation procedure did not affect the cytotoxic responses on the cell lines, either positively via a contamination (by solvents, glassware, material ...) or negatively via a loss of cytotoxicity during the whole procedure (HPLC, reconcentration ...). The methods were implemented on blank samples (contamination) or phycotoxin standards and control mussel extracts (loss of cytotoxicity). The mussel extract induced a background effect. The IC_{50} was measured at concentration range from 9.1 to 13.6 mg DG/mL on Caco2 cells, from 11.4 to 16.7 mg DG/mL on HepG2 cells, and from 1.9 to 3,5 mg DG /mL on Neuro2a (Ledreux et al., 2012).

Optimization of the HPLC fractionation

RP-HPLC analysis was performed on an Agilent apparatus (1200 Series, Agilent Technologies, Les Ulis, France), equipped with a diode array detector (1200 Series) operated at 210 nm and 254 nm and a fraction collector (1260 Infinity Series), using an analytical Spherisorb ODS (C18) column (250 x 4.6 mm, 2.5 μ m particle size; Waters, Guyancourt, France). The gradient used was a linear gradient from 90/10 water/acetonitrile (v:v) to 100% acetonitrile in 65 min at a flow rate of 1 mL/min.

The NP-HPLC was carried out by on a Thermo Scientific apparatus, coupled with an ultraviolet detector UV 1000 operated at 254 nm (Fisher scientific, Illkirch, France), using a semi-preparative Microsorb NH2 column (Dynamax 250x10 mm, 5 μ m particle size; Agilent Technologies, Les Ulis, France). The gradient used was from 100% cyclohexane to 100% dichloromethane in 60 min at a flow rate of 4 mL/min.

40 μ L of solvent (procedural blank), phycotoxin standard solutions of OA (17 μ M), AZA1 (1.47 μ M) and PTX2 (10 μ M) and shellfish extracts were evaporated under argon flow, reconstituted in methanol for the RP mode or in cyclohexane for the NP mode and injected in the HPLC systems. The eluate was collected manually in integrality for each run (no fractionation). For all tests, the collected eluate was evaporated using Speedvac[®] system (Fisher scientific, Illkrick, France) (45°C; 5.1 torr or at 50°C; 5.1 torr, respectively) and reconstituted in 40 μ L methanol for cytotoxicity assays. In order to verify the absence of loss of toxicity related to the fractionation procedure, a comparison of cytotoxicity between phycotoxin standard solutions or shellfish extracts injected into the HLPC system and the

same solutions or extracts without HPLC process (reconcentration and reconstitution only) was performed. So, together with the preparation of solutions for HPLC injection, an aliquot of 40 μL of each phycotoxin standard solution or shellfish extract was evaporated and reconstituted in 40 μL of methanol. Procedural blanks, phycotoxin solutions or shellfish extracts injected into the HPLC system or not were sent to the different laboratories for cytotoxicity assays within 24 hours in dry ice.

Fractionation of control and positive mussel extracts

Given the results of the optimization step (see below), the fractionation of positive and control mussel extracts was performed by RP-HPLC using the conditions described previously. Compounds were separated on Spherisorb ODS (C18) column using water and acetonitrile as mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. The gradient used was from 90/10 water/acetonitrile (v/v) to 100% acetonitrile in 65 min. 50 μL of extract was injected. For the first fractionation step, 5 fractions (F1-F5) were collected every 13 min. The collected fractions were evaporated under a gentle stream of argon gas and reconstituted in 50 μL of methanol. Each fraction was tested on the three bioassays for cytotoxicity. Then a finest secondary fractionation step was performed on the most cytotoxic fractions F2, F3 and F4. The three fractions were each hyperfractionated into 13 fractions (F2-1 to F2-13; F3-1 to F3-13; F4-1 to F4-13) of 1 min each using the same HPLC procedure. Each collected fraction was dried under argon flow and reconstituted in 50 μL of methanol. Fractions were sent to the different laboratories for cytotoxicity assays within 24 hours in dry ice.

Quality control

To avoid sample contamination during the procedure, all solvent bottles were freshly opened just before the experiment and dedicated to this study. Moreover, prior to use, all glassware was washed with detergent and carefully rinsed with Milli-Q water. The glassware was then calcinated at 450°C overnight.

A blank sample (solvents) was performed for each batch of experiments in order to check the absence of contamination during the whole procedure (fractionation and reconstitution in solvent steps). Each fraction or hyperfraction of blanks were tested on CBA. Before each fractionation step, the repeatability of the fractionation procedure was assessed by injecting a mixture of 6 compounds covering a wide range of hydrophobicity.

Non-target analysis by LC-QTOF-MS

Conditions

The separation of compounds was carried out using an HPLC system (Agilent 1290 Series HPLC, Agilent Technologies, France) equipped with a C18 analytical column (Kinetex Phenomenex[®], 100 x 2.1 mm and 1,7 μ m particle size, Agilent Technologies) maintained at 30°C. Mobile phases were ultra-pure water (A) and acetonitrile (B) in the negative ionization mode, and ultra-pure water with 0.1% formic acid (A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (B) in the positive ionization mode. The optimized chromatographic method used the following time program of the gradient: 0 min 5% B, linear to 50% B at 3 min, linear to 100% B at 18 min, constant 100% B to 20 min, back to 5% B at 22 min and equilibration for 4 min. The flow rate was 0.3 mL/min and the injected sample volume was 1 μ L.

The HPLC system was connected to an Agilent 6540 accurate mass quadrupole time-of-flight mass spectrometer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) using electrospray ionization (ESI) source coupled to Agilent Jet Stream system allowing a better focusing of ions. The QTOF instrument was operated under the following source parameters: gas temperature: 300°C; gas flow 5 mL/min; nebulizer pressure: 20 psi; sheath gas temperature: 325°C; sheath gas flow: 7.5 mL/min; capillary voltage: 3500 V; nozzle voltage: 2000 V in JS-ESI- and 0V in JS-ESI+; fragmentor voltage: 175 V. Before all injection, stability of mass accuracy was checked with Agilent standard solution and the system was re-calibrated if values went above 0.2 ppm error. A standard solution containing 36 compounds was injected before the sample to check the retention time of compounds and the instrumental sensitivity.

The instrument was operated in 4 GHz high resolution mode. Accurate mass spectra (MS and MS/MS) were recorded across the range of 70 – 1700 m/z . A constant flow of Agilent TOF reference solution through the reference nebulizer allowed the system to continuously correct for any mass drift by using the reference mass ion HP-921 [hexakis-(1H,1H,3H-tetrafluoropropoxy)-phosphazine] at m/z 922.0098 $[M+H]^+$, or 966.000725 m/z $[M+HCO_2]^-$ (formate adduct) in the positive and negative ionization mode, respectively. The selected highly active hyperfractions were firstly injected in TOF mode (MS analysis) in order to screen molecules present and to select precursor ions. Then, MS/MS spectra were obtained using a targeted analysis on preselected ions. The collision energy was dependent on ion mass (offset 4 eV, slope 6 eV/100 m/z) and the isolation width was set at wide (\sim 9 m/z).

Data processing

The analytical workflow is described Figure 1. The data recorded were processed using the MassHunter Qualitative software (version B.04.00, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The chromatograms in the total ion current (TIC) of MS analysis was examined. A compound screening was performed on hyperfractions using the molecular feature extraction (MFE) algorithm of the software. Only peaks with intensity > 5 000 counts were searched. The elemental formulae were generated using relative isotopic abundance of mass spectra profiles and precursor ion mass. The composition were defined by generate elemental

formula into software. The calculation of most probable molecular formula included C:0-60, H:0-200, N:0-30, O:0-30, S:0-10, Cl:0-10, Br:0-10, P: 0-10 and score higher than 50 %. In order to isolate compounds of interest, data of control and positive samples were compared using MassProfiler Agilent software. This software is a visualization tool allowing the identification of statistically meaningful differences between sample groups. Compounds found in both samples were excluded and only molecules found in positive hyperfraction data were identified. A manual examination of elemental formula was performed on the selected molecules according the nitrogen rules and the assessment of isotopic pattern in order to confirm elemental composition. A possible name of found compounds was searched interrogating exhaustive databases namely Agilent (Metlin, Forensics, Pesticides database, Chempider and Scifinder. Secondly, the same fractions were analyzed in QTOF mode (MS/MS analysis). Pre-selected precursor ions were fragmented. Product ions and the fragmentation pattern were examined to confirm more precisely the identification of candidate compounds. Finally, the confirmation were achieved by comparing obtained information with MS and MS/MS analysis using database or purchased standard compounds when possible.

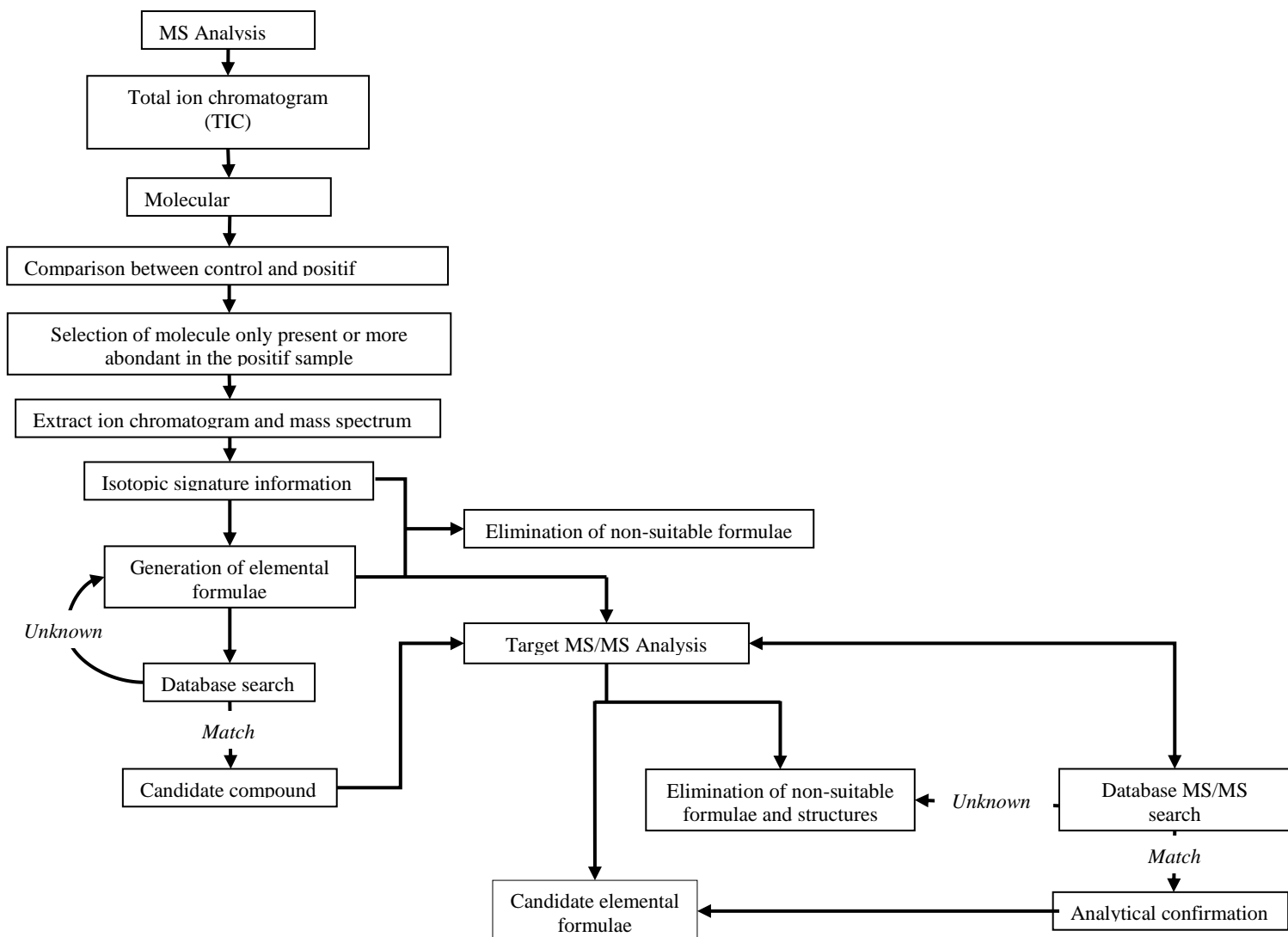


Fig 1: Analytical strategy and data processing for identification of toxic compounds by LC-QTOF

RESULTS AND DISCUSSION

Validation of the fractionation procedure

Preliminary tests were performed in order to evaluate addition or loss of cytotoxicity during the fractionation procedure. This test was to estimate the potential cytotoxicity of solvents used or another contamination (glassware, evaporation process ...) and to compare cytotoxic responses of standard solutions or sample extracts with or without injection on HPLC.

Biological analyses on HepG2 cells performed on blank samples (solvents only) with or without HPLC injection (collected, evaporated and transferred in glassware) showed no cytotoxic effect, with a maximum cell viability reflecting the absence of contamination by using both the RP- and the NP-HPLC fractionation procedures (Fig. 2).

In order to check the absence of cytotoxicity loss resulting from fractionation method, standard phycotoxin solutions and crude mussel extract were injected on RP-HPLC and NP-HPLC. The cytotoxicity of eluates was compared to biological responses of phycotoxins and crude mussel extract without injection (Fig 2). The injections on NP-HPLC led to the loss of almost all cytotoxicity. Only the dose-response curve of AZA1 was presented in Figure 2 but for the other phycotoxins (PTX2 and OA), results were similar (data not shown). The loss can be caused by the injector with a partial mixing of sample and liquid in the loop. Moreover, the possibility in certain cases that organic mobile phase can denatured protein resulting a loss of biological activity (Meyer, 2010). In contrast, RP-HPLC has preserved the cytotoxicity of the phycotoxin standards but for mussel extract, a slightly loss of 15% was observed. In addition to loss by the injector, an incompatibility between the physico chemistry properties of sample and the polarity of solvent recovery before injection was implicated. Indeed, the cytotoxicity of the remaining sample that was not injected, was assessed and 10 % of effect was lost. The extract was lipophilic and the solvent recovery (same composition as mobile phase) was polar solution. So some compounds can be lost by poor miscibility. Considering that RP-HPLC mode was the more conservative of biological activity and was not brought sample contamination (like NP-HPLC), this mode was chosen to start the fractionation process.

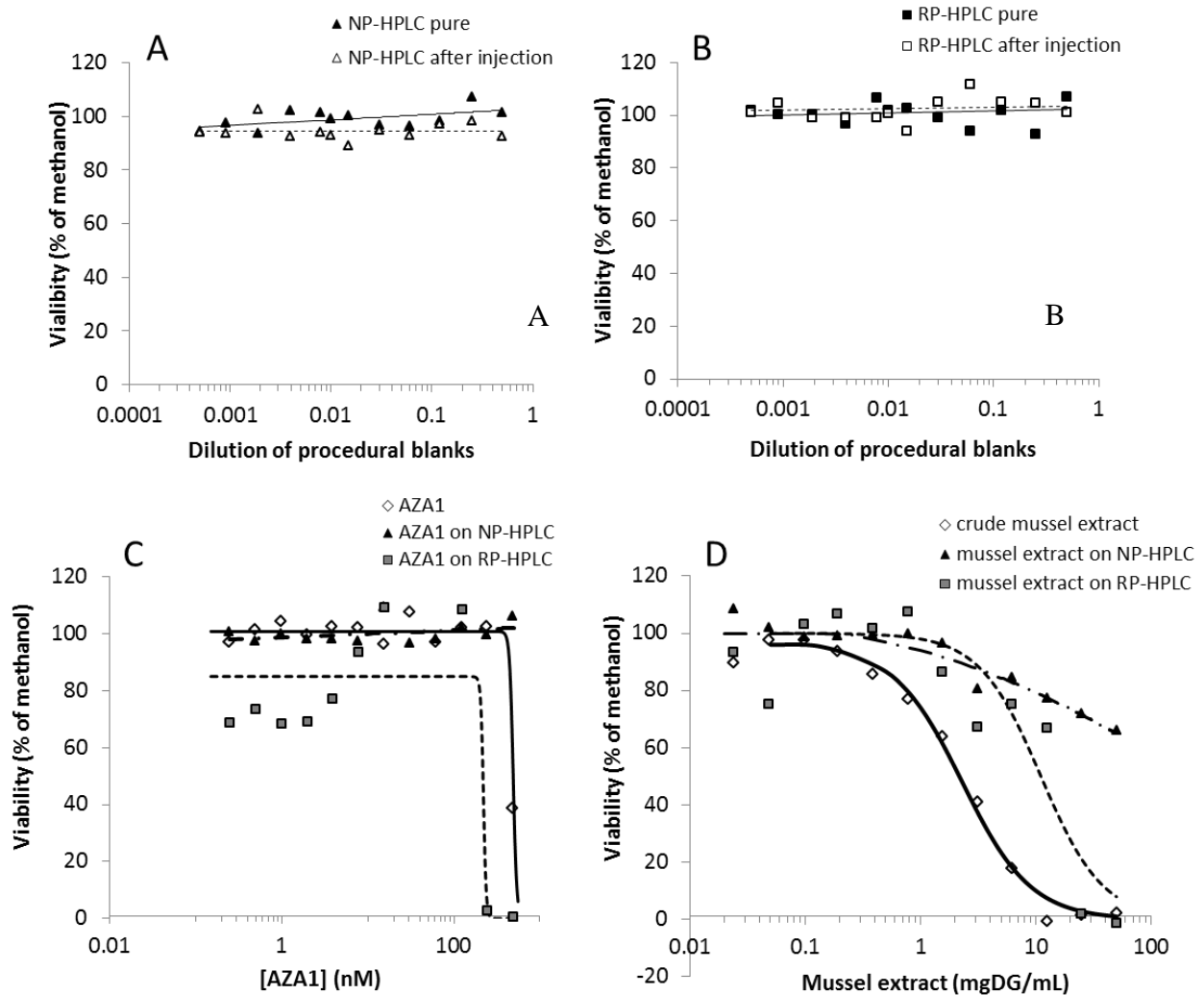


Fig 2 : HepG2 cells dose-response curves obtained for procedural blanks to NP-HPLC (A) and RP-HPLC (B) (pure solvent (solid lines), after HPLC injection (dotted line or broken line); the phycotoxin, AZA1 (C); mussel extract crude (D). They were tested without injection (solid line), after RP-HPLC injection (dotted line) and after NP-HPLC injection (broken line). Results are expressed as percentage of cell viability.

Fractionation of control and positive mussel extracts

The control and positive mussel extracts were fractionated using RP-HPLC. Firstly, five fractions (F1-F5) were collected to reduce the complexity of the sample. Each fraction was tested in CBA and their IC_{50} value was determined for each cell line. Mussel extracts have a naturally background cytotoxicity on selected cell lines. In order to detect active fraction, a relative comparison between biological responses of control and positive samples was performed. For all extracts, a maximum cell viability was found in F1 and F5 showing a non-effect of these fractions on CBA. Nevertheless, the other fractions were cytotoxic on the cell lines. F2 and F3 exhibited a growth inhibition in the three cell lines, whereas F4 was only positive on Caco2 and Neuro2a assays. The most cytotoxic fractions were F3 and F4,

excepted on HepG2 for F4. IC_{50} values for the positive sample were twice lower than IC_{50} value for the control sample. It confirmed the potential cytotoxic and MBA responses observed for this mussel extract.

The hyperfractionation was performed on these three cytotoxic fractions (F2-F4). For each fraction, 13 hyperfractions were collected and their cytotoxicity responses were assessed on the three cell lines. The effect was expressed in relative to the control extract. Two hyperfractions (one before F2-1 and one after F4-13) were collected to prevent a possible variation of retention time of compounds. 41 hyperfractions were obtained (data not shown). Cytotoxicity of Neuro2a cell was detected in 17 hyperfractions (from F2-12 to F4-2). 12 hyperfractions presented a cytotoxic effect on the Caco2 assay (from F3-3 to F3-13). Regarding responses of HepG2 cells, 6 cytotoxic hyperfractions (from F3-3 to F3-9) were identified. The selection of the hyperfractions for the LC-QTOF analyses was performed depending on three conditions: 1) a cytotoxic effect on the three cell lines compared to control sample, 2) a high toxicity on one of them, and 3) the most discriminating hyperfraction showing a response on the three assays. The other factor was to select a few number of hyperfraction.

Considering these results, 7 hyperfractions (F3-1, F3-6, F3-7, F3-8, F3-10, F3-11, F4-1) were selected and analyzed by LC-QTOF.

LC-QTOF-MS analysis

Selection of LC-QTOF-MS parameters

ESI, ESI via Agilent Jet Stream Technology (JS-ESI), and atmospheric-pressure chemical ionization (APCI) were available that ionization sources for LC-QTOF-MS analysis. JS-ESI was chosen as ionization source. Indeed, APCI did not used because this source could have an impact to heat-sensitive chemicals (Bruins, 2005). The ESI coupled with Jet Stream technologie allows a sensitivity gain by a sheath gaz which lead a best focalisation of charged compounds. A test was performed to this source and the focus of electrospray coupled with Jet stream system was detected twice as much as compounds than ESI alone. Due to the large number of molecules observed with the JS-ESI source and based on work of Lajeunesse et al., (2012), this source was chosen as ionization source. In order to achieve the most exhaustive analysis, hyperfractions were injected in positive and negative ionization mode.

Identification of compounds in F3-6

Seven hyperfractions in positif extract (F3-1, F3-6, F3-7, F3-8, F3-10, F3-11, F4-1) were selected to be analyse in LC-QTOF-MS, based on their cytotoxic effect compare to control extract. Each positive fraction with associated control and blank fraction were injected in

mass spectrometer in positive and negative ionization mode using JS-ESI source. The negative ionization mode was presented in this study because compounds of interest were found during this analysis. The example of the fraction F3-6 was chosen to illustrate in detail the results. Hyperfraction F3-6 was the most cytotoxic fraction on CaCo2, HepG2 and Neuro2a cells.

The examination of total ion chromatogram (TIC) of control and positive F3-6 showed a similar profile and can be described as mussel chromatogram pattern. The chromatogram intensity was higher in the F3-6 from the positive sample than the F3-6 from the control sample. Many compounds were found in F3-6 in spite of hyperfractionation process which aimed at a simplification of crude sample complexity. Chromatograms were very heavy and the research of the low intensive compounds was complicated. Focusing on comparison between control and positive F3-6 and on molecular abundance, two compounds could be isolated in the positive hyperfraction (Fig 3). The deprotonated mass $[M-H]^-$ at base peak ion of these molecules were m/z 464.824 and m/z 542.734 at retention time of 9.64 min, 9.76 min respectively and at 9.98 min and 10.0 min.

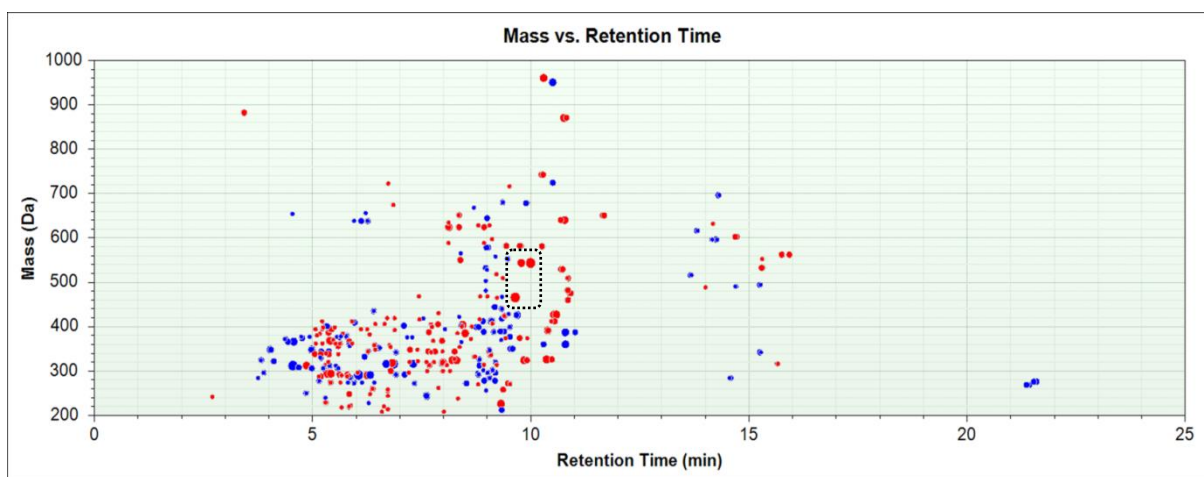


Fig 3: Comparison between molecular mass and compounds retention time. One point represents one compound. Blue points represented data of control extract and red points data of positive hyperfraction F3-6. The point Size is depended on molecular abundance. Surrounded points were the most abundant compounds found only in the positive hyperfraction.

These compounds only presented in the positive hyperfraction were halogenated compounds. The relative abundance of isotopic pattern with peaks height ratio of 1:1 allowed estimating the presence of bromine atoms (3Br in m/z 464.824 and 4Br in m/z 542.734). According the automatic attribution of formula by the software, 38 elemental formulas were obtained for m/z 464.824 and 54 fomulas for m/z 542.734. The best scores were shown in Table 1 and confirmed by nitrogen rules. The elemental composition of these molecules were searched in Chemspider[®] and Scifinder[®] (Grange et al., 2006) and one or

two propositions from the two compounds were found such as 2-[2,3-dibromo-4-(bromomethyl)-1H-indol-1-yl]benzotrile for m/z 464.824 and 2,2',5,5'-tetrabromo-3,3'-bi-1H-indole or 2,2',6,6'-tetrabromo-3,3'-bi-1H-indole for m/z 542.734.

To further characterize the tentatively identified compounds, precursor ion from each compound was fragmented. MS/MS spectrum profiles were obtained but very few information can be extracted. For each product ion, just a loss of HBr^- was observed (Fig 4). An injection in MS/MS mode of standard molecules was needed to confirm the identification but no standard compounds were commercially available. In addition of these two candidate compounds, other polybrominated molecules with low intensity were isolated in this positive hyperfraction. Table 1 showed the isolation of deprotonated molecule groups which had same retention time. Moreover, MS/MS spectra of each compound proved the presence of same product ions among them m/z 464.824 (Fig 5). These results led us to believe that the positive mussel extract contained a family of polybrominated compounds.

But the presence of m/z 464.824 and m/z 542.734 in MS/MS spectra of precursor ion with higher mass implied a fragmentation in analytical source which caused that m/z 464.824 and m/z 542.734 could be product ion and not precursor ions of compounds. Marteau et al showed a production of in-source fragment ion during analysis of polybrominated diphenyl ethers and their metabolites using atmospheric pressure photo-ionization source (Marteau et al., 2012). Moreover, authors reported that organobrominated compounds with high mass could be missing in spectra data (De Boer et al., 2000; Vetter and Jun, 2003). The hypothesis of in-source fragmentation and the loss of higher mass were rendering spectra interpretation and the identification of parent molecules very complex.

Determination of halogenated compounds in other positive hyperfraction

Halogenated compounds were also found in other cytotoxic hyperfractions. The same mass of deprotonated molecule isolated in F3-6 (m/z 464.824 and m/z 542.734) was detected in F3-7, F3-8 and F3-10 but retention times were different resulting to other compounds. This two ions can be in-source fragment ion too.

In the other fraction F3-1, F3-11 and F4-1, the presence of mixed halogenated compounds containing bromine and chlorine atoms and chlorinated molecules were suspected (data not shown). Given the complexity of spectra and the lack of database, the identification of these compounds could not have been successful. Only elemental formulae can be proposed, but no structure or name of molecules can be attributed.

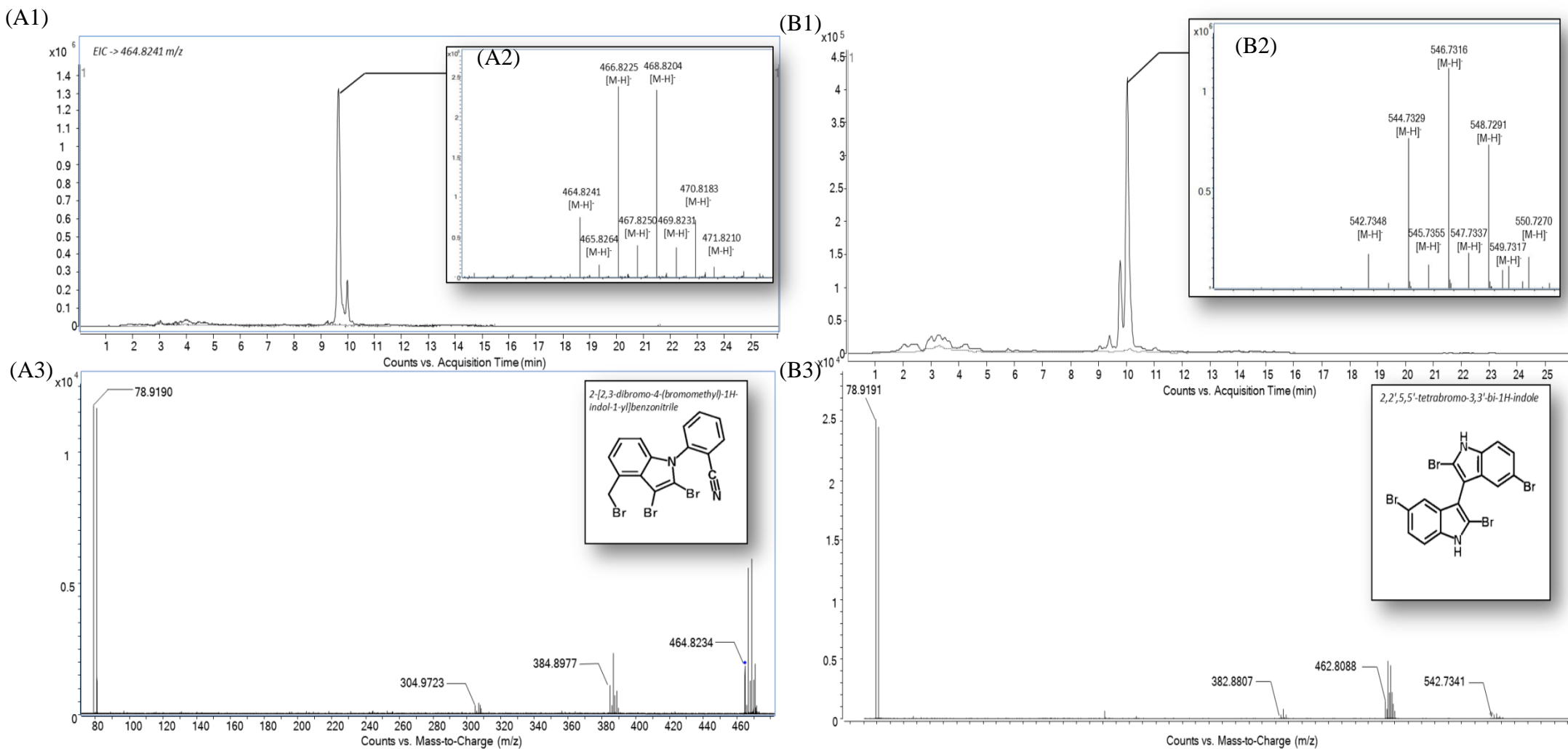


Fig 4: Extract ion chromatogram (A/B 1), molecular isotopic distribution (A/B 2) and MS/MS spectrum (A/B 3) with potential molecular structure of candidate compounds

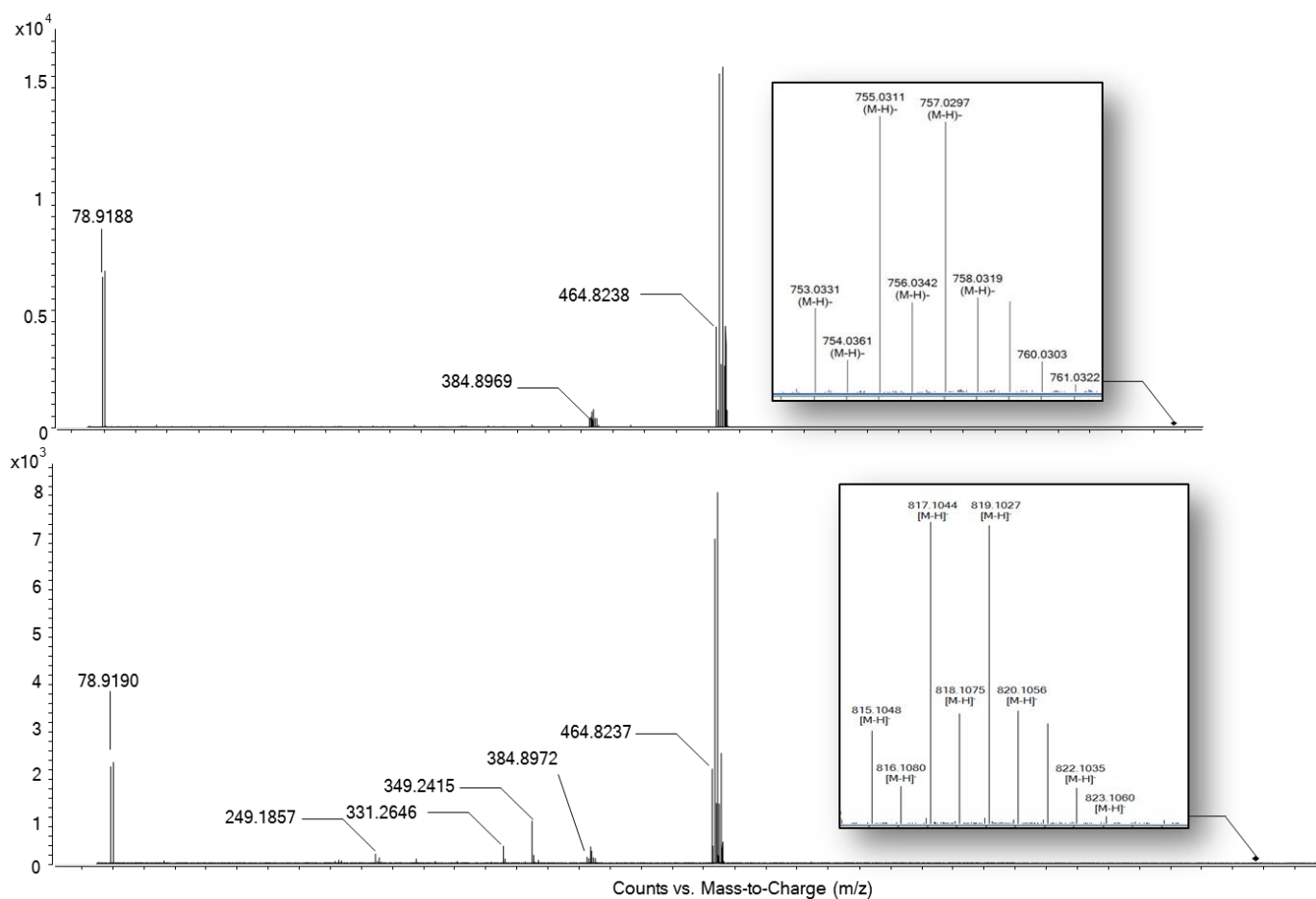


Fig 5 : example of MS/MS spectra of two polybrominated compounds found in positive hyperfraction F3-6

Table 1 : Mass spectrometric data of (the most abundant) candidate compounds in F3-6

Ion	Accurate experimental Mass (<i>m/z</i>)	Theoric Mass (<i>m/z</i>)	Error		Ret. Time (min)	Elemental composition ^a	Score (%)	Frag ion 1	Frag ion 2	Frag ion 3	Frag ion 4	Frag ion 5	Frag ion 6
			mDa	ppm									
[M-H] ⁻	464.8243	464.8243	0.1	0.11	9.64/9.98	C ₁₆ H ₉ Br ₃ N ₂	98.03	464.8234	384.8977	304.9723	78.9190		
[M-H] ⁻	741.0331	741.0332	0.1	0.2	9.64	C ₃₄ H ₃₇ Br ₃ N ₂ O ₂	97.87	464.8243	384.8976	78.9185			
[M-H] ⁻	753.0326	753.0326	-0.1	-	9.64	C ₂₇ H ₄₁ Br ₃ N ₄ O ₄	97.18	464.8238	384.8969	78.9188			
[M-H] ⁻	815.105	815.1049	-0.1	-	9.64	C ₃₂ H ₅₆ Br ₃ N ₂	92.61	464.8237	384.8972	349.2415	331.2646	249.1857	78.9190
[M-H] ⁻	542.7345	542.7348	0.3	0.58	9.76/10.0	C ₁₆ H ₈ Br ₄ N ₂	99.37	542.7341	462.8088	383.8907	78.9191		

^a Elemental formulae corresponding to the neutral molecule

Complementary experiment to confirm the identification

The analysis of hyperfractions on LC-QTOF-MS allowed the identification of halogenated compounds. The characterisation of molecules was stopped to elemental formula. Even if proposal structure were announced, not analytical standard were available commercially. In order to progress in the identification, complementary experiments were performed on cytotoxic hyperfractions.

In attempt to find structural information on detected molecules, hyperfractions F3-6, F3-7 and F4-1 were analyses on nuclear magnetic resonance (NMR). The apparatus was a spectrometer of 800 Hz equipped to a cryoprobe TXI. Data acquisitions were performed on ^1H and ^{13}C at one and two dimension (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC...). The aims of this analysis was to confirm the presence of halogenated atoms in the first time and then, was obtained the molecular structure. Unfortunately, no informations on candidat compounds were find by this approach. The cause was surely the lack of sensibility of NMR. To date, few research use NMR technique for structural confirmation of detected molecules in environmental sample. The complexity of the matrix and the low concentration of compounds prevent having adequate data (Brack et al., 2008).

In parallel to confirm structure of compounds, tests of temperature impact on detected molecule were performed on F3-6. It was observed that the toxicity of shellfish disappears after sample heating (P. Hess, senior researcher, IFREMER, personal communication). In order to prove that suspect compounds could contribute to biological activity of mussel extract, positive crude sample was heated in a bain-marie to 90°C during 20 min. The crude extract and the heated extract were then analysed on LC-QTOF-MS and the ion $464,824\ m/z$ was examined. The extract ion chromatogram is presented Figure 6. Result shows a decrease of ion intensity of twice between crude extract and heated extract. This observation is consistent with the hypothesis that detected halogenated compounds could be responsible of biological effect measured in mussel sample.

However other complementary studies are needed to affirm that halogenated molecules are the cause of toxicity in shellfish extract. The detection of this candidate compounds in other mussel sampling by target chemical analysis during or out of atypical toxicity episodes are interested to confirm their presence. Moreover, it may be envisaged to purify positive mussel extract, by the developpement of solid phase extraction for example, in order to collect only halogenated compounds. This pure eluate could be tested on cells line or directly on MBA. According to perspectives raised by the results of this study, new perspectives will be submitted to different call for project for financial support.

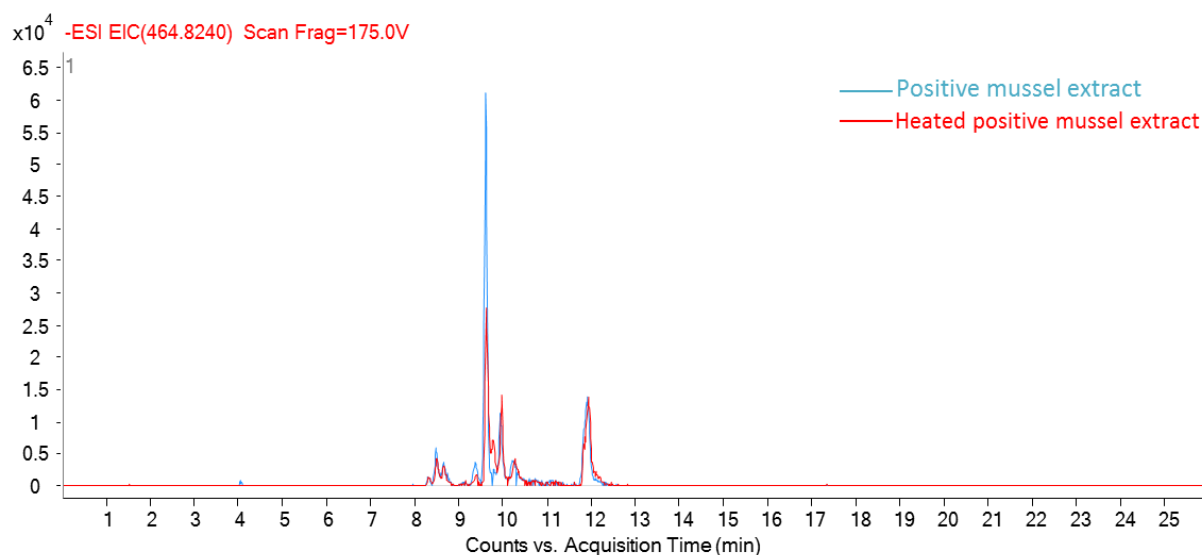


Fig 6 : Extract ion chromatogram of 464,824 m/z for positive mussel extract (blue line) and heated positive mussel extract (red line).

Potential source and presence of polybrominated compounds in coastal waters

In addition of anthropogenic brominated compounds (flame retardants...), several authors have detected natural halogenated compounds among them brominated ones in different aquatic organisms. In 2004, Gribble, (2004) raised the presence of more than 2050 known naturally organobromines produced by marine and terrestrial plants, marine animals, bacteria, fungi, some higher animals and a few mammals (Gribble, 1999; Gribble, 2010), most of them having been found in marine organisms. These natural molecules contained one to eight bromine atoms (Gribble, 1999).

Many studies found brominated compounds in sponge species (Gribble, 1999; Cameron et al., 2000; Guitart et al., 2011). The cyanobacteria present in sponge by symbiotic association can be the source of the production of halogenated compounds, in particular brominated metabolites (Unson et al., 1994; Ridley et al., 2005). Microalgae like red algae are also much cited as producers of brominated molecules (Gribble, 1999; Malmvärn et al., 2005, Malmvärn et al., 2008; Suyama et al., 2010).

In a previous study, the same author Vetter and Jun (2003) detected in mussel sample from Mexico, in addition to a natural chlorinated compound and tribromoanisole, a number of unknown brominated compounds among which tribrominated molecules. Malmvärn et al., (2008) confirmed in their article the presence of tetra- and tribromo dibenzo-p-diozin or furans from natural origin identified by GC-MS (EI) and GC-HRMS in the blue mussel (*Mytilus edulis*) from the Baltic Sea. More recently, Vetter et al., (2007) showed the presence of seven bromophenols or bromoanisoles in blue mussel, in liver sample of fish (cod *Gadus morhua* and saithe *Pollachius virens*), and in liver of their bird predator (European shag

Phalacrocorax a.aristotelis) from the Norwegian coast. They specified that other unidentified analytical peaks could also be halogenated natural products.

Gribble, (2010) reported the identification of 200 halogenated indoles. As regards bromoindoles, 6,6'-dibromoindigo giving the Tyrian Purple is a famous bromoindole produced by marine mollusks (Vetter, 2006; Gribble, 2010). Like other brominated natural products, bromoindoles are produced by many marine organisms among them red algae, cyanobacteria, sponge, bryozan, gasteropods (Gribble, 2010). Concerning shellfish, Maruya, (2003) found di- and tri-bromoindoles in the oyster *Crassostera virginica* but the origin and source remain unexplained. In contrast, Reineke *et al.*, (2006) reported the presence of mono-, di- and tri-bromoindoles in water and sediment samples from the North Sea and the Baltic Sea. The biological origin of these compounds was highly suspected but not confirmed. Indeed, Liu and Gribble, (2002) showed that some bromoindoles can be transformation products by monolithiation induced by marine organisms.

Concerning our suspected molecules, the first found citation of 2,2',5,5'-tetrabromo-3,3'-bi-1H-indole was described in cyanobacteria *Rivularia firma* by Norton and Wells (1982). Later, Hodder and Capon (1991) have confirmed the presence of 2,2',6,6'-tetrabromo-3,3'-bi-1H-indole the neutral molecule proposed of m/z 542.734 in the same cyanobacteria specie.

In addition to brominated compounds, Vetter *et al.* (2008) raised the occurrence of natural mixed halogenated molecules (containing both bromine and chlorine atoms) in red algae *Plocaminum cartilagineum* containing molecules with two bromine and three chlorine atoms.

The occurrence of a variety of bromoindoles in cyanobacteria or algae can be a plausible source of contamination of Arcachon's mussels. Indeed the atypical toxicity have appeared occasionally like phytoplantonic blooms (Tortajada *et al.*, 2012). The presence of new algal species in the Arcachon Bay is difficult to estimate. But it is known that phytoplankton communities vary with the influence of hydro-climatic parameters (Leterme *et al.*, 2008; David *et al.*, 2012). In this regards, it is plausible that a new organism like cyanobacteria or algae was arrived in Arcachon Bay. It was already observed in Mediterranean Sea. The presence of non-endemic toxic species was reported in western of this sea, tied up to global warming (Penna *et al.*, 2005). But the source of polybrominated compounds is very difficult to find because in addition to natural products, unidentified transformation products of anthropic compounds like brominated flame retardants can be existed. So for instance, the origin of these polybrominated molecules in mussels from the Arcachon Bay remains unexplained.

Toxicity of polybrominated compounds

The potential toxicity of anthropogenic brominated compounds was reported by many authors. Shi *et al.* (2010) have denounced the teratogenic effects of brominated flame retardants on frog embryos. While McCormick *et al.* (2010) showed lethal effect of tetrabromobisphenol A on fish embryos.

In regards to natural halogenated compounds, pharmacological properties of some brominated is one reason of the interest of scientists in these compounds (Neilson, 2003; Gribble, 2010). Hodder and Capon, (1991) cited an anti-inflammatory activity of 2,2',6,6'-tetrabromo-3,3'-bi-1H-indole. Another study of Appleton *et al.* reported the potential anti-inflammatory, anti-metabolic and anti-cancer activity of natural compound, kottamide D (C₁₉H₂₀Br₂N₄O₂) from ascidian *Pycnoclavella kottae*, detected by microplate assays on different cell lines (Appleton *et al.*, 2002). In addition to their potential use in medicine, organobrominated compounds can be used as a defense by organisms (Neilson, 2003). For example, the caribbean sponge *Agelas sventres* produce brominated pyrrole alkaloids as fish-feeding deterrents (Assmann *et al.*, 2001). Concerning potential toxicology of bromoindoles, Reineke *et al.*, (2006) showed a strong inhibition of luminescent bacteria *Vibrio fischeri* induced by brominated compounds. In the same study, they proved the teratogen activity of bromoindole on *Danio rerio* embryos. Associated to anti-microbial properties, a cytotoxic activity of brominated bis-indole compounds from sponge *Spongosorites sp.* was reported on cancer cell lines among them HepG2 assay with IC₅₀ values ranging from 12.5 to more than 20 µg/mL (Oh *et al.*, 2006). Suyama *et al.*, (2010) evidenced a neurotoxic effect on mouse neocortical neurons of natural hydroxylated polybrominated diphenyl ethers produced by the red alga *Leptofaushea sp.* and the cyanobacteria *Oscillatoria sp.*. These authors raised a possible exposure of human population through seafood consumption to these brominated compounds

CONCLUSION

EDA approach performed on positive MBA shellfish enable finding candidate compounds allowing the explanation of atypical toxicity observed. Nevertheless, this pluridisciplinary approach was very time consuming. Hyperfractionation remained very complex with numerous of compounds in spite of the simplification process. Moreover, the unknown research required a high quality approach and experimental rigour to prevent from pollution supply. All the same, this method allowed to answer the potential source of positive MBA result unlike classical analytical techniques did not made a success. The confirmation step of this candidate molecules remains to be done. This final step are crucial element and difficult to perform with the limit availability of spectra, a lack of standard compounds and information

on concentration-effect relationship (Brack et al., 2008). Furthermore, unknown molecule structure should be elucidated with other method as nuclear magnetic resonance. But this process is not adapted to environmental complexe mixture for lack of purity. The low sensibility of this technique prevents from analysis our candidate compounds because of their low concentration.

A serious lead was found yet to explain this atypical toxicity. To confirm the EDA result, shellfish collected during other events of toxicity could be analysed to check the presence of the same halogenate compounds. Moreover, in order to have a first idea of effect of these molecules, ultimate fractionation procedure could be performed on positive hyperfraction to isolate this candidates compounds and these “pure” molecules could be tested on MBA.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was carried out as part of the Arcachon National Program funded by the General Directorate for food and the Directorate for Sea Fisheries & Aquaculture (Ministry of Agriculture), by the General Directorate for health (Ministry of Labor, Employment and Health), financial support from the TGIR-RMN-THC Fr3050 CNRS for conducting the research is gratefully acknowledged and from the French National Research Agency (ANR) in the frame of the Investments for the future Programme, within the Cluster of Excellence COTE (ANR-10-LABX-45). The reviewers are acknowledged for their helpful comments on the manuscript.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les principaux travaux réalisés durant cette thèse avaient pour objectif d'une part de mettre en place un protocole de préparation, de fractionnement et d'identification, le plus adapté pour appréhender, de manière la plus exhaustive possible, la contamination de différentes matrices environnementales (Figure 71). D'autre part, l'objectif principal était d'appliquer cette démarche pour répondre à des questionnements scientifiques quant à la pollution liée à la présence de micropolluants biologiquement actifs et d'identifier ces derniers.

Dans ce contexte,

i. Un travail de développements et de validations méthodologiques sur la préparation d'échantillons liquides (*i.e.* eaux usées de stations d'épuration) et le fractionnement par NP-HPLC a été effectué. Une extraction sur phase solide utilisant une phase stationnaire, HLB, a été choisie pour sa capacité à retenir une large gamme de composés aux propriétés physico-chimiques variées. Cette SPE a permis d'extraire des ligands agonistes et antagonistes des récepteurs ER, AR, GR, MR, PR, PXR, AhR dans des matrices complexes telles que les eaux de STEP et l'urine humaine. En parallèle à l'extraction des phases liquides, un fractionnement par NP-HPLC a été développé afin de compléter les développements déjà réalisés par Creusot, (2011), axés principalement sur la préparation de matrice solide et de fractionnement en RP-HPLC. Le fractionnement en NP-HPLC s'est révélé adapté pour la séparation de composés plutôt hydrophobes contenus dans des échantillons solides tels que boues de STEP ou sédiments.

ii. Une stratégie d'identification par HRMS a également été mise en place en LC-QTOF et GC-QTOF pour caractériser les composés présents dans les échantillons et fractions biologiquement actifs. L'emploi de deux types de chromatographie (liquide et gazeuse) permet de détecter des molécules thermolabiles, polaires, apolaires et volatiles. Les démarches élaborées basées principalement sur l'interrogation de bases de données ont amené à l'identification de plusieurs composés, dont quelques perturbateurs endocriniens.

iii. Les développements réalisés ont été appliqués à différents compartiments des écosystèmes aquatiques provenant de milieux urbain, industriel et agricole, dans le but de (1) identifier et comprendre les sources et devenir des polluants, (2) caractériser les molécules potentiellement à risque et appartenant à la famille des perturbateurs endocriniens afin d'appréhender l'impact éco-toxicologique de ces composés. Les études effectuées ont mis en avant la présence d'une multitude d'activités biologiques *in vitro* dans toutes les matrices échantillonnées. Des activités peu référencées telles que l'induction des récepteurs GR, MR, PR et PXR ont été observées en STEP, dans les urines et les boues de STEP en complément

des activités plus classiques comme ER, AR et AhR. La présence de différents ligands principalement des stéroïdes naturels et de synthèse, muscs, phtalates et des HAP, a pu être mise en évidence grâce à l'utilisation de l'analyse dirigée par l'effet. D'autres molécules comme des médicaments, métabolites de médicaments, acides gras, sels biliaires non actifs ou pas encore testés sur bio-essais, mais pouvant présenter un risque environnemental, ont été identifiés voir confirmés dans les matrices échantillonnées.

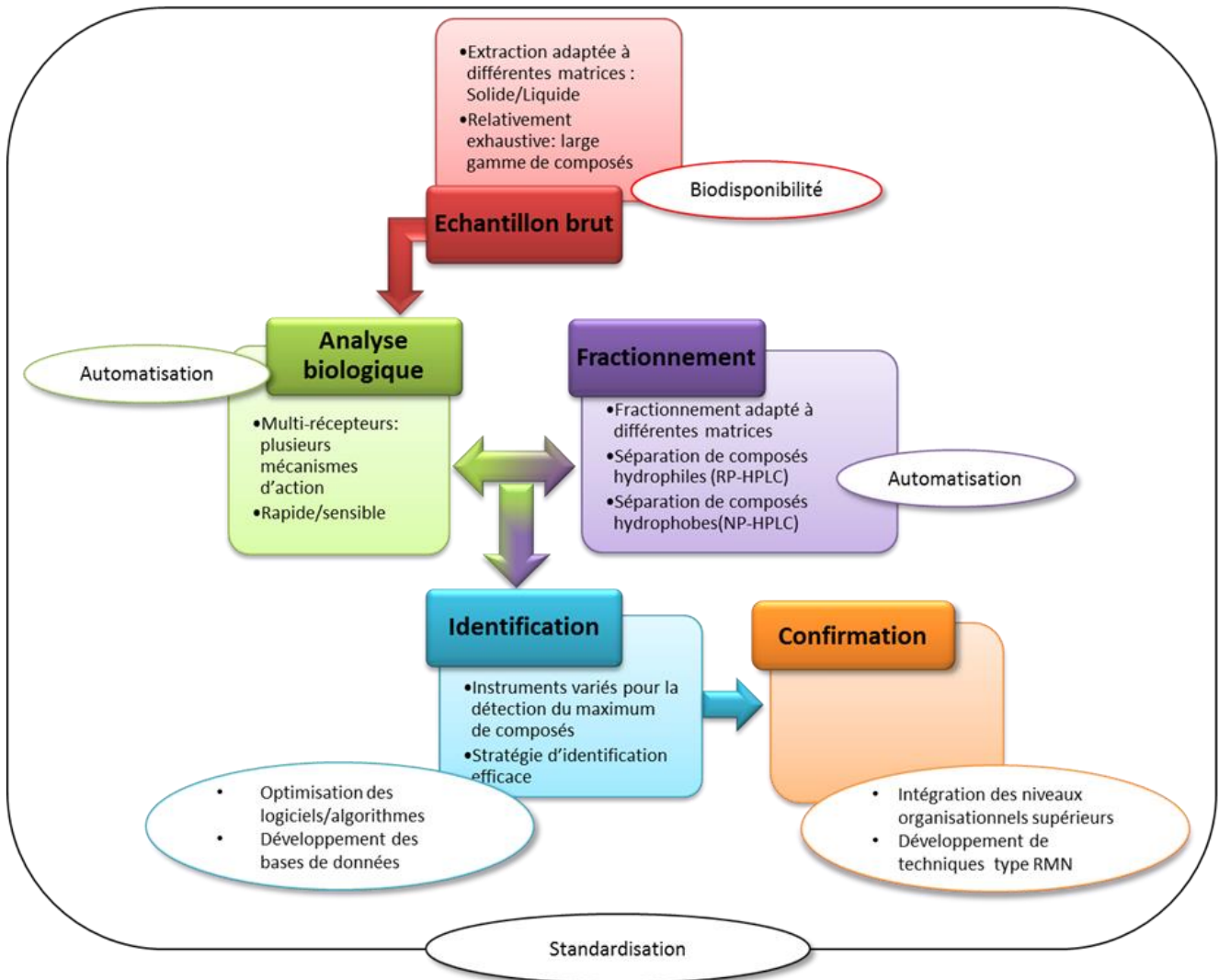


Figure 71 : Schéma bilan de l'analyse dirigée par l'effet, montrant les avancés techniques développées (carré plein) et les perspectives à réaliser (ellipse).

Approche d'intérêt pour l'évaluation des risques environnementaux

Au cours de cette thèse, l'analyse dirigée par l'effet a apporté des explications ou des compléments de réponse à plusieurs problématiques de recherche basées sur différents niveaux de contamination allant des sources aux organismes en passant par le milieu naturel. La démarche a donné la possibilité d'établir un lien entre les effets éco-toxicologiques et les

molécules responsables des anomalies biologiques observés. Le cas de la rivière *La Dore* et l'étude sur les coquillages toxiques ont permis de montrer l'utilité de l'analyse dirigée par l'effet pour comprendre les causes de perturbations écologiques de la faune et la flore dans le milieu aquatique, là où les techniques conventionnelles n'ont pu apporter de réponse. Au vu de sa capacité à corréliser effet/cause, l'EDA est un outil pertinent pour répondre aux enjeux actuels de la DCE qui prône la surveillance chimique du milieu tout en évaluant son état écologique.

Cependant, il est souvent observé que les micropolluants sont présents dans le milieu naturel à des concentrations très faibles qualifiées d'ultra-traces. Diverses molécules possèdent un impact biologique à ces concentrations mais ne peuvent pas être détectées par les instruments analytiques. Le couplage de l'approche EDA avec de nouveaux outils de prélèvements comme les échantillonneurs passifs augmente dans certain cas l'efficacité de la démarche. L'échantillonnage passif comme les POCIS, permet entre autre de retenir les molécules présentes dans le milieu et de les concentrer afin d'aider à leur détection. Le couplage POCIS/EDA amène à l'identification de composés biologiquement actifs qui pourraient passer inaperçus lors d'un prélèvement classique et représente donc une combinaison judicieuse pour l'application de l'EDA dans le milieu.

Pour obtenir une démarche puissante, il est indispensable de coupler l'approche avec l'identification par HRMS afin de pouvoir caractériser un maximum de composés, connus mais également inconnus. Cette combinaison a permis, dans ces travaux, d'identifier plus d'une dizaine de molécules non recherchées a priori. Ces composés ont été identifiés en parallèle à des composés recherchés en routine dans différentes matrices telles que les eaux usées, les boues de stations d'épuration et les lisiers. Parmi eux, deux composés, la daidzéine et la désosimétasone, ont été confirmés comme perturbateurs endocriniens. D'autres composés identifiés soulèvent des questionnements sur leur danger pour les écosystèmes. L'EDA a également permis de trouver la présence de composés halogénés de type polybromés chez des organismes aquatiques présentant une toxicité inexplicée. Ces molécules apportent une piste de recherche alors que les méthodes biologiques et chimiques conventionnelles ne donnaient aucune explication plausible quant aux causes de cette toxicité. Des tests biologiques complémentaires sont à mener pour conclure sur les risques éventuels que représentent toutes les molécules identifiées. Dans l'évaluation des risques environnementaux, il est envisageable que l'identification de « nouvelles » molécules par l'EDA amène à un enrichissement des listes de priorisation des composés dans le cadre réglementaire.

L'un des atouts majeurs dans l'approche est la caractérisation d'effets biologiques régis par un ensemble de molécules. Des effets mélange de composés ont pu être mis en évidence au cours de ces travaux. Une activité androgénique non observable sur l'échantillon brut de boue de stations d'épuration a été remarquée grâce à la séparation des composés par le fractionnement. Cette activité était masquée dans l'échantillon global par la présence d'une activité antagoniste forte. Un effet d'additivité entre des molécules activant les récepteurs X

des prégnanes a été mis en avant dans une eau usée brute et des boues issues de stations d'épuration. Actuellement, les effets de mélange sont très peu abordés dans la littérature scientifique surtout en ce qui concerne leur identification dans des échantillons environnementaux. L'analyse dirigée par l'effet a permis dans ces travaux de mettre en évidence leur présence dans des matrices complexes comme les eaux et boues de STEP. Aujourd'hui, cette approche est l'une des rares permettant d'identifier de tels effets entre les composés. La mise en évidence de ces effets permettrait à terme de modifier la recherche de composés dans l'environnement, si la caractérisation des molécules est finalisée. La surveillance des composés ne se focaliserait plus uniquement sur des molécules actives mais ciblerait un ensemble de composés actifs et/ou non actifs.

Les limites existantes

L'analyse dirigée par l'effet est une méthode alternative novatrice pour l'évaluation des risques dans l'environnement. Cependant, certaines limites de l'approche ont pu être observées au cours de ces travaux et ce aux différents niveaux de la démarche.

– La préparation de l'échantillon

Afin de visualiser au plus juste le danger environnemental que représente un échantillon, la préparation de ce dernier ne doit pas le dénaturer et l'extraction des molécules doit être la plus exhaustive possible. L'EDA est basé sur la simplification de la matrice à étudier. Les étapes successives de préparation, c'est-à-dire l'extraction des composés, le fractionnement et l'évaluation de l'activité biologique, apporte inéluctablement une perte de molécules.

Des problèmes de miscibilité entre les solvants employés et les échantillons entraînant une mauvaise solubilisation des composés ont été observés sur certaines études notamment celles portant sur les boues de STEP, les lisiers et les bivalves lors du fractionnement par HPLC. Si ces effets ont pu être remarqués lors du fractionnement, il est envisageable que le même problème peut avoir lieu lors des tests biologiques avec l'utilisation d'un milieu de culture aqueux. A cette immiscibilité peuvent s'ajouter des phénomènes adsorption, d'évaporation voire de transformations des composés (*e.g.* biotransformations, photo-transformation, dégradation). Il a ainsi été remarqué, lors de l'étude sur les urines, qu'une activité œstrogénique était médiée en partie par des composés androgènes transformés par la présence d'enzyme au sein de la lignée cellulaire. Des pertes d'activités biologiques liées potentiellement aux fractionnements successifs ont été mises en évidence lors de l'étude sur les lisiers porcins. Cependant cette simplification est indispensable afin de permettre l'étape d'identification moléculaire. Il est donc malheureusement impossible d'être exhaustif à 100 % du prélèvement de l'échantillon à l'identification des molécules.

– *L'identification moléculaire*

L'identification moléculaire est l'étape essentielle pour pouvoir caractériser les causes des effets biologiques observés. L'identification par HRMS a initialement été développée pour les études protéomiques et est aujourd'hui utilisée pour les recherches environnementales. L'emploi de cette technique d'analyse durant cette thèse a montré son efficacité mais également ses limites. Les logiciels de traitement des données à optimiser, les bases de données pas assez riches et les spectres de fragmentation fournissant peu d'informations structurales sont les limites qui ont été observées au cours de l'identification moléculaire réalisée sur les échantillons étudiés. Même si certains freins existent actuellement, la caractérisation par HRSM est la seule technique analytique permettant aujourd'hui de pouvoir identifier des composés inconnus pouvant présenter un danger pour l'environnement.

– *La confirmation*

L'étape ultime de l'analyse dirigée par l'effet est la confirmation chimique mais également biologique. L'un des points bloquant de cette étape est l'absence d'étalons analytiques disponibles commercialement. Certains composés comme le produit de transformation de la cortisone, le tétrahydrocortisone-3,21-diacétate, dans la rivière *La Dore* ou les molécules halogénées détectées dans les moules positives au test souris, n'ont pas pu être confirmés par manque de composés de synthèse de référence.

Outre la confirmation chimique, la confirmation biologique reste également une étape bloquante dans la finalisation de l'approche EDA. La confirmation de l'activité s'effectue sur les tests biologiques employés, généralement focalisée sur les bio-essais *in vitro* et/ou *in vivo*. Ces bio-essais ne permettent pas de représenter l'impact réel des composés actifs identifiés sur les niveaux supérieurs de l'organisation biologique (*i.e.* population, écosystème). Pour les composés actifs identifiés sur les tests *in vitro* et/ou *in vivo*, leur contribution à l'activité biologique mesurée est déterminée par MBA. Ce calcul ne peut être effectué que sous réserve que la Bio-TEQ de l'échantillon ou de la fraction ait pu être déterminée. La MBA se base uniquement sur la notion d'additivité entre les molécules, ne prenant pas en compte les effets de synergisme ou d'antagonisme existant qui ont pu être observés au cours de ces travaux dans les échantillons d'eaux et de boues de STEP.

Nonobstant ces barrières, l'analyse dirigée par l'effet a permis d'apporter des résultats intéressants dans l'identification de molécules biologiquement actives. La mise en œuvre de cette démarche est relativement longue, fastidieuse et coûteuse et nécessite de disposer de nombreux outils pour la préparation d'échantillon, les analyses biologiques et chimiques. Cependant, elle représente aujourd'hui à notre connaissance, la seule technique pour établir un lien direct de cause à effet dans le cas des mélanges environnementaux.

Perspectives de recherche

Aujourd'hui, l'utilisation de l'analyse dirigée par l'effet est en pleine expansion pour la recherche de molécules à risque dans l'environnement. Les exemples d'application dans la littérature et dans ces travaux de thèse montrent que cette approche bio-analytique est pertinente, sensible et robuste afin d'évaluer et de comprendre le potentiel actif des échantillons étudiés. Ces travaux permettent de disposer, aujourd'hui, d'une approche EDA complète et adaptée à différents types d'échantillons. Cependant vu des limites existantes, certains aspects demandent à être explorés ou approfondis (Figure 71).

➤ Dans le but de représenter un réel risque environnemental, il est important de faire rentrer lors de l'étape de préparation des échantillons la notion de biodisponibilité (Brack et al., 2009). La recherche d'une extraction exhaustive des composés biologiquement actifs dans l'échantillon étudié est intéressante mais ne reproduit pas systématiquement ce qui se passe dans l'écosystème. La biodisponibilité a été abordée dans ce travail avec les échantillonneurs passifs de type POCIS qui miment, toute proportion gardée, les phénomènes d'accumulation au sein des organismes et intègrent la contamination en fonction du temps. Cependant, cette notion demande à être approfondie pour les matrices solides telles que les sédiments, les boues et les lisiers. En se focalisant sur la biodisponibilité, la quantité de composés présents dans les échantillons environnementaux pourrait être réduite par rapport aux extractions « exhaustives », facilitant ainsi la caractérisation moléculaire et augmentant la pertinence de l'identification de composés pertinents.

➤ Le développement d'une automatisation des procédures de fractionnement et des tests biologiques permettrait un criblage haut débit d'échantillons et rendrait la méthode moins longue et fastidieuse. Il peut même être envisagé la mise en place d'un split permettant d'analyser en simultané les fractions actives et d'identifier les molécules présentes. Des développements d'automatisation commencent à être publiés dans la littérature (Pieke et al., 2013b).

➤ La combinaison de l'EDA avec d'autres outils tels que les colonnes d'affinité au récepteur ER a montré son intérêt dans certaines études (Creusot, 2011). La variété des colonnes (*e.g.* ER, PXR, AR), aujourd'hui disponibles, permet de posséder des outils pertinents pour aborder les effets mélange entre les molécules et simplifier les échantillons afin de séparer les composés actifs des autres molécules présentes.

➤ L'un des points primordial à développer est l'identification moléculaire. Il faut aujourd'hui concentrer les efforts sur l'enrichissement des bases de données et l'optimisation des algorithmes aidant à l'interprétation des spectres de fragmentations. Des outils de traitement des données complets et performants permettraient de faciliter l'étape longue et complexe de l'identification moléculaire.

➤ Des avancées technologiques pour déterminer des structures des composés seraient également intéressantes surtout concernant l'identification de molécules inconnues. Le développement de méthodologies RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) plus sensibles et couplées à des processus de séparation chromatographique tels que l'HPLC pourrait apporter un élément novateur et pertinent pour l'identification et la confirmation des composés biologiquement actifs dans des matrices environnementales.

Afin d'établir une méthode plus robuste, une standardisation de la démarche est inéluctable et commence à apparaître sur le plan européen. Le réseau NORMAN travaille actuellement sur des tests de comparaison inter-laboratoires dans le but d'uniformiser les tests biologiques mais également les démarches d'identification moléculaire. L'approche EDA est une méthode pluridisciplinaire qui nécessite de disposer d'un large panel de compétences. La mise en place de réseaux nationaux (e.g. plateforme EDA) et internationaux (e.g. EDA EMERGE, SOLUTION) permettant de regrouper des compétences variées est actuellement en route ou en cours de création (Brack et al., 2013; Altenburger et al., 2015;).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- ADEME, 2014. Les déchets issus de l'assainissement. URL <http://www.ademe.fr/collectivites-secteur-public/gerer-equipements-services/dechets-services-publics/dechets-issus-lassainissement> (consulté le 7-1-15).
- Adlercreutz, H., Järvenpää, P., 1982. Assay of estrogens in human feces. *J. Steroid Biochem.* 17, 639–645.
- AGRESTE, 2013. Les élevages de porcs en France métropolitaine en 2010.
- Aït-Aïssa, S., Laskowski, S., Laville, N., Porcher, J.-M., Brion, F., 2010. Anti-androgenic activities of environmental pesticides in the MDA-kb2 reporter cell line. *Toxicol. In Vitro* 24, 1979–1985.
- Alexander, M., 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4259–4265.
- Alloway, B.J., Jackson, A.P., 1991. The behaviour of heavy metals in sewage sludge-amended soils. *Honour Vol. Eric Hamilt.* 100, 151–176.
- Altenburger, R., Ait-Aïssa, 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.
- Alves, M.M., Mota Vieira, J.A., Alvares Pereira, R.M., Pereira, M.A., Mota, M., 2001. Effects of lipids and oleic acid on biomass development in anaerobic fixed-bed reactors. Part II: Oleic acid toxicity and biodegradability. *Water Res.* 35, 264–270.
- Aminot, Y., 2013. Etude de l'impact des effluents urbains sur la qualité des eaux de la Garonne estuarienne: application aux composés pharmaceutiques et aux filtres UV (Chimie analytique et environnement). Université Bordeaux 1, Talence, n°ordre 4961.
- Ankley, G.T., Hockett, J.R., Mount, D.I., Mount, D.R., 2011. Early Evolution of the Toxicity identification Evaluation Process: Contributions from the United States Environmental Protection Agency Effluent Testing Program. *Eff.-Dir. Anal. Complex Environ. Contam., The Handbook of Environmental Chemistry* 15, 1–18.
- ANSES, 2010. Exposition de la population générale aux résidus de pesticides en France.
- ANSM - Répertoire des spécialités pharmaceutiques, 2014. URL <http://agence-prd.ansm.sante.fr/> (consulté le 31-10-14).
- Appels, L., Baeyens, J., Degève, J., Dewil, R., 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34, 755–781.

- Appleton, D.R., Page, M.J., Lambert, G., Berridge, M.V., Copp, B.R., 2002. Kottamides A-D: Novel bioactive imidazolone-containing alkaloids from the New Zealand ascidian *Pycnoclavella kottae*. *J. Org. Chem.* 67, 5402–5404.
- Arsenault, J.C., 2012. *Beginner's guide to SPE - Solid- phase Extraction*. Waters Corporation, Milford, MA, USA.
- Assmann, M., Zea, S., Köck, M., 2001. Sventrin, a new bromopyrrole alkaloid from the Caribbean sponge *Agelas sventres*. *J. Nat. Prod.* 64, 1593–1595.
- Bain, P.A., Williams, M., Kumar, A., 2014. Assessment of multiple hormonal activities in wastewater at different stages of treatment.
- Bakker, J.F., Belzunce-Segarra, M.J., Castro, R., van de Heuvel-Greve, M., Klamer, H.J.C., Brack, W., Altenburger, R., Poulsen, V., Thomas, K.V., Leonards, P.E.G., 2007. *Effect Directed Analysis and Toxicity Identification Evaluation*.
- Balaguer, P., Boussioux, A., Demirpence, E., Nicolas, J., 2001. Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands. *Luminescence* 16, 153–8.
- Balaguer, P., François, 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.
- Bandow, N., 2011. *Consideration of Bioavailability in the Effect-Directed Analysis of Contaminated Sediment Samples*. RWTH Aachen University, Aachen.
- Bandow, N., Altenburger, R., Lübcke-Von Varel, U., Paschke, A., Streck, G., Brack, W., 2009a. Partitioning-based dosing: An approach to include bioavailability in the effect-directed analysis of contaminated sediment samples. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3891–3896.
- Bandow, N., Altenburger, R., Streck, G., Brack, W., 2009b. Effect-directed analysis of contaminated sediments with partition-based dosing using green algae cell multiplication inhibition. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7343–7349.
- Baranczewski, P., Stańczak, A., Kautiainen, A., Sandin, P., Edlund, P.-O., 2006. Introduction to early in vitro identification of metabolites of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol. Rep.* 58, 341–352.
- Bartolomé, L., Cortazar, E., Raposo, J.C., Usobiaga, A., Zuloaga, O., Etxebarria, N., Fernández, L.A., 2005. Simultaneous microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, phthalate esters and nonylphenols in sediments. *J. Chromatogr. A* 1068, 229–236.
- Bataineh, M., Lübcke-von Varel, U., Hayen, H., Brack, W., 2010. HPLC/APCI-FTICR-MS as a Tool for Identification of Partial Polar Mutagenic Compounds in Effect-Directed Analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21, 1016–1027.
- Belles, A., 2012. *Développement et applications environnementales des échantillonneurs passifs pour la surveillance des écosystèmes aquatiques (Chimie Analytique et environnement)*. Université Bordeaux 1, Talence, n°ordre, 4723.
- Belles, A., Tapie, N., Pardon, P., Budzinski, H., 2014. Development of the performance reference compound approach for the calibration of “polar organic chemical integrative sampler” (POCIS). *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 1131–1140.

- Bellet, V., Hernandez-Raquet, G., Dagnino, S., Seree, L., Pardon, P., Bancon-Montiny, C., Fenet, H., Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Cavailles, V., Budzinski, H., Antignac, J.-P., Balaguer, P., 2012. Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Res.* 46, 1912–1922.
- Besse, J.-P., Garric, J., 2008. Human pharmaceuticals in surface waters. Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicol. Lett.* 176, 104–123.
- Bester, K., 2007. Personal care compounds in the environment : Pathways, fate, and methods for determination. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Bijoux, H., 2014. Etude de l'impact toxique des contaminants chimiques du bassin d'Arcachon sur l'huître creuse *Crassostrea gigas* ; approche in situ et expérimentale. Université de Bordeaux, Talence.
- Blanchard, M., Teil, M.-J., Ollivon, D., Garban, B., Chestérikoff, C., Chevreuil, M., 2001. Origin and distribution of polyaromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in urban effluents to wastewater treatment plants of the paris area (FRANCE). *Water Res.* 35, 3679–3687.
- Blanchard, M., Teil, M., Ollivon, D., Legenti, L., Chevreuil, M., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in wastewaters and sewage sludges from the Paris area (France). *Environ. Res.* 95, 184–197.
- Blasco, C., Picó, Y., 2009. Prospects for combining chemical and biological methods for integrated environmental assessment. *Appl. Comb. Chem. Anal. Biol. Eff. Environ. Food Samples - II* 28, 745–757.
- Booij, P., Vethaak, A.D., Leonards, P.E.G., Sjollema, S.B., Kool, J., De Voogt, P., Lamoree, M.H., 2014. Identification of photosynthesis inhibitors of pelagic marine algae using 96-well plate microfractionation for enhanced throughput in effect-directed analysis. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8003–8011.
- Brack, W., 2003. Effect-directed analysis: A promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 397–407.
- Brack, W., 2011. Effect-directed analysis of complex environmental contamination, Springer, ed, *The Handbook of Environmental Chemistry*.
- Brack, W., Altenburger, R., Ensenbach, U., Möder, M., Segner, H., Schüürmann, G., 1999. Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediment in the industrial region of Bitterfeld (Germany) - A contribution to hazard assessment. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 164–174.
- Brack, W., Bakker, J., De Deckere, E., Deerenberg, C., Van Gils, J., Hein, M., Jurajda, P., Kooijman, B., Lamoree, M., Lek, S., López De Alda, M.J., Marcomini, A., Muñoz, I., Rattei, S., Segner, H., Thomas, K., Von Der Ohe, P.C., Westrich, B., De Zwart, D., Schmitt-Jansen, M., 2005a. MODELKEY. Models for assessing and forecasting the impact of environmental key pollutants on freshwater and marine ecosystems and biodiversity. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 12, 252–256.
- Brack, W., Bandow, N., Schwab, K., Schulze, T., Streck, G., 2009. Bioavailability in effect-directed analysis of organic toxicants in sediments. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28, 543–549.

- Brack, W., Burgess, R.M., 2011. Considerations for incorporating bioavailability in Effect-Directed Analysis and Toxicity Identification Evaluation. *Effect-Directed Analysis of complex environmental contamination* 15, 41–68.
- Brack, W., Govender, S., Schulze, T., Krauss, M., Hu, M., Muz, M., Hollender, J., Schirmer, K., Schollee, J., Hidasi, A., Slobodnik, J., Rabova, Z., Ait-Aissa, S., Sonavane, M., Carere, M., Lamoree, M., Leonards, P., Tufi, S., Ouyang, X., Schriks, M., Thomas, K., De Almeida, A.C., Froment, J., Hammers-Wirtz, M., Ahel, M., Koprivica, S., Hollert, H., Seiler, T.-B., Di Paolo, C., Tindall, A., Spirhanzlova, P., 2013. EDA-EMERGE: An FP7 initial training network to equip the next generation of young scientists with the skills to address the complexity of environmental contamination with emerging pollutants. *Environ. Sci. Eur.* 25.
- Brack, W., Kind, T., Hollert, H., Schrader, S., Möder, M., 2003. Sequential fractionation procedure for the identification of potentially cytochrome P4501A-inducing compounds. *J. Chromatogr. A* 986, 55–66.
- Brack, W., Klamer, H.J.C., De Alda, M.L., Barcelo, D., 2007. Effect-directed analysis of key toxicants in European river basins a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 14, 30–38.
- Brack, W., Schirmer, K., 2003. Effect-directed identification of oxygen and sulfur heterocycles as major polycyclic aromatic cytochrome P4501A-inducers in a contaminated sediment. *Environ. Sci. Technol.* 37, 3062–3070.
- Brack, W., Schirmer, K., Erdinger, L., Hollert, H., 2005b. Effect-directed analysis of mutagens and ethoxyresorufin-O-deethylase inducers in aquatic sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2445–2458.
- Brack, W., Schirmer, K., Erdinger, L., Hollert, H., 2005c. Effect-directed analysis of mutagens and ethoxyresorufin-O-deethylase inducers in aquatic sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2445–2458.
- Brack, W., Schirmer, K., Kind, T., Schrader, S., Schüürmann, G., 2002. Effect-directed fractionation and identification of cytochrome P4501A-inducing halogenated aromatic hydrocarbons in a contaminated sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2654–2662.
- Brack, W., Schmitt-Jansen, M., MacHala, M., Brix, R., Barceló, D., Schymanski, E., Streck, G., Schulze, T., 2008. How to confirm identified toxicants in effect-directed analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 1959–1973.
- Brack, W., Ulrich, N., Bataineh, M., 2011a. Separation techniques in Effect-Directed Analysis. *Eff.-Dir. Anal. Complex Environ. Contam., Effect-Directed Analysis of complex environmental contamination* 83–118.
- Brack, W., Ulrich, N., Bataineh, M., 2011b. Separative techniques in Effect-Directed Analysis. *Effect-Directed Analysis of complex environmental contamination* 15, 83–118.
- 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.
- Bruins, A.P., 2005. MASS SPECTROMETRY | Atmospheric Pressure Ionization Techniques, in: Editors-in-Chief: Paul Worsfold, Alan Townshend, Colin Poole (Eds.), *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. Elsevier, Oxford, pp. 366–373.

- Bui, V.H., 2013. Contribution à l'étude de la présence et du devenir des résidus de médicaments dans les compartiments aquatiques (Chimie analytique et environnement). Université Bordeaux 1, Talence, n°ordre 4930.
- Bull, I.D., Lockheart, M.J., Elhmmali, M.M., Roberts, D.J., Evershed, R.P., 2002. The origin of faeces by means of biomarker detection. *Environ. Int.* 27, 647–654.
- Burgess, R.M., Ho, K.T., Brack, W., Lamoree, M., 2013. Effects-directed analysis (EDA) and toxicity identification evaluation (TIE): Complementary but different approaches for diagnosing causes of environmental toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1935–1945.
- Burnison, B.K., Hartmann, A., Lister, A., Servos, M.R., Ternes, T., Van Der Kraak, G., 2003. A toxicity identification evaluation approach to studying estrogenic substances in hog manure and agricultural runoff. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2243–2250.
- Buseti, F., Heitz, A., Cuomo, M., Badoer, S., Traverso, P., 2006. Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *J. Chromatogr. A* 1102, 104–115.
- Byford, J.R., Shaw, L.E., Drew, M.G.B., Pope, G.S., Sauer, M.J., Darbre, P.D., 2002. Oestrogenic activity of parabens in MCF7 human breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 80, 49–60.
- Cameron, G.M., Stapleton, B.L., Simonsen, S.M., Brecknell, D.J., Garson, M.J., 2000. New sesquiterpene and brominated metabolites from the tropical marine sponge *Dysidea* sp. *Tetrahedron* 56, 5247–5252.
- Capdeville, M.-J., 2011. Etudes des cycles biogéochimiques des contaminants organiques dits“émergents” dans les systèmes aquatiques (Chimie analytique et environnement). Université Bordeaux 1, Talence, n°ordre 4303.
- Cargouët, M., Perdiz, D., Levi, Y., 2007. Evaluation of the estrogenic potential of river and treated waters in the Paris area (France) using in vivo and in vitro assays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 149–156.
- 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.
- Carvan III, M.J., Dalton, T.P., Stuart, G.W., Nebert, D.W., 2000. Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution, *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- Castillo, M., Barceló, D., 1999. Identification of polar toxicants in industrial wastewaters using toxicity-based fractionation with liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 71, 3769–3776.
- Celander, M.C., 2011. Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aquat. Toxicol.* 105, 72–77.
- Chaler, R., Simoneit, B.R., Grimalt, J., 2001. Bile acids and sterols in urban sewage treatment plants. *J. Chromatogr. A* 927, 155–160. doi:10.1016/S0021-9673(01)01086-X
- Chang, H., Hu, J., Shao, B., 2007. Occurrence of natural and synthetic glucocorticoids in sewage treatment plants and receiving river waters. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3462–3468.

- Chang, H., Wan, Y., Wu, S., Fan, Z., Hu, J., 2011. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. *Water Res.* 45, 732–740.
- Chapman, P.M., Hollert, H., 2006. Should the sediment quality triad become a tetrad, a pentad, or possibly even a hexad? *J. Soils Sediments* 6, 4–8.
- Chemical Abstracts Services, 2015. CAS, Chemical Abstracts Service [WWW Document]. URL <http://www.cas.org/> (accessed 1.26.15).
- Chemspider, 2015. ChemSpider. URL <http://www.chemspider.com/About.aspx> (consulté le 14-1-15).
- Chiaia-Hernandez, A.C., Schymanski, E.L., Kumar, P., Singer, H.P., Hollender, J., 2014. Suspect and nontarget screening approaches to identify organic contaminant records in lake sediments.
- Chochois, L., Migné-Fouillen, V., 2011. Méthodologie utilisée pour la détermination de normes de qualité environnementale (NQE) (No. DRC-11-118981-08866A). INERIS, Verneuil en Halatte (Oise).
- Choubert, J.M., Martin-Ruel, S., Budzinski, H., Miège, C., Esperanza, M., Soulier, C., Lagarrigue, C., Coquery, M., 2011. Evaluer les rendements des stations d'épuration - Apports méthodologiques et résultats pour les micropolluants en filières conventionnelles et avancées. *Tech. Sci. Méthodes* 44–62.
- Choudhary, M.I., Khan, N.T., Musharraf, S.G., Anjum, S., Atta-ur-Rahman, 2007. Biotransformation of adrenosterone by filamentous fungus, *Cunninghamella elegans*. *Steroids* 72,
- Christen, V., Crettaz, P., Oberli-Schrämml, A., Fent, K., 2010. Some flame retardants and the antimicrobials triclosan and triclocarban enhance the androgenic activity in vitro. *Chemosphere* 81, 1245–1252.
- Christen, V., Crettaz, P., Oberli-Schrämml, A., Fent, K., 2012. Antiandrogenic activity of phthalate mixtures: Validity of concentration addition. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 259, 169–176.
- Ciganek, M., Neca, J., 2008. Chemical characterization of volatile organic compounds on animal farms. *Vet. Med. (Praha)* 53, 641–651.
- Clarke, B.O., Smith, S.R., 2011. Review of “emerging” organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environ. Int.* 37, 226–247.
- Combalbert, S., 2011. Dynamique et impact des hormones stéroïdes et des activités endocriniennes dans les effluents porcins et les systèmes de traitement du lisier. Université Montpellier 2.
- Combalbert, S., Bellet, V., Dabert, P., Bernet, N., Balaguer, P., Hernandez-Raquet, G., 2012. Fate of steroid hormones and endocrine activities in swine manure disposal and treatment facilities. *Water Res.* 46, 895–906.
- Combalbert, S., Capdeville, M.-J., Pourcher, A.-M., Budzinski, H., Dabert, P., Bernet, N., Hernandez-Raquet, G., 2010. Impact des systèmes de traitement du lisier dans le transfert des perturbateurs endocriniens et des antibiotiques vers l'environnement naturel. *Journ. Rech. Porc.* 291–296.

- Combalbert, S., Hernandez-Raquet, G., 2010. Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1671–1692.
- Communauté urbaine de Bordeaux, 2011. Rapport annuel d'activité - Service public de l'eau potable et de l'assainissement 2011.
- Cornelissen, G., Rigterink, H., Ten Hulscher, D.E.M., Vrind, B.A., Van Noort, P.C.M., 2001. A simple tenax® extraction method to determine the availability of sediment-sorbed organic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 706–711.
- Crabbe, P., Pieraccini, G., Bartolucci, G., Moneti, G., Van Peteghem, C., 2002. Influence of *Helix pomatia* enzyme preparations on the oxidative conversion of some clostebol acetate metabolites in urine. *J. Anal. Toxicol.* 26, 73–80.
- Creusot, N., 2011. Contribution de l'approche Effect directed analysis à l'identification de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques (Chimie Analytique et environnement). Université Bordeaux 1, Talence, n°ordre 4417.
- Creusot, N., Aït-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.
- 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.
- Creusot, N., Kinani, S., Balaguer, P., Tapie, N., Lemenach, K., Maillot-Maréchal, E., Porcher, J.-M., Budzinski, H., Aït-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, 569–583.
- Dagnino, S., 2009. Caractérisation de perturbateurs endocriniens au cours du traitement des eaux usées à l'aide d'outils bioanalytiques (Biologie des populations et écologie) Université de Montpellier 1, Montpellier.
- Dagnino, S., Bellet, V., Grimaldi, M., Riu, A., Aït-Aïssa, S., Cavaillès, V., Fenet, H., Balaguer, P., 2014. Affinity purification using recombinant PXR as a tool to characterize environmental ligands. *Environ. Toxicol.* 29, 207–215.
- Dagnino, S., Gomez, E., Picot, B., Cavaillès, V., Casellas, C., Balaguer, P., Fenet, H., 2010. Estrogenic and AhR activities in dissolved phase and suspended solids from wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 408, 2608–2615.
- Dagnino, S., Picot, B., Escande, A., Balaguer, P., Fenet, H., 2009. Occurrence and removal of endocrine disrupters in wastewater treatment plants for small communities. *Desalination Water Treat.* 4, 93–97.
- Dang, H.T., Lee, H.J., Yoo, E.S., Hong, J., Bao, B., Choi, J.S., Jung, J.H., 2008. New jasmonate analogues as potential anti-inflammatory agents. *Bioorg. Med. Chem.* 16,
- Dang, H.T., Lee, Y.M., Kang, G.J., Yoo, E.S., Hong, J., Lee, S.M., Lee, S.K., Pyee, Y., Chung, H.-J., Moon, H.R., Kim, H.S., Jung, J.H., 2012. In vitro stability and in vivo anti-inflammatory efficacy of synthetic jasmonates. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 4109–4116.

- D'Ascenzo, G., Di Corcia, A., Gentili, A., Mancini, R., Mastropasqua, R., Nazzari, M., Samperi, R., 2003. Fate of natural estrogen conjugates in municipal sewage transport and treatment facilities. *Sci. Total Environ.* 302, 199–209.
- David, V., Ryckaert, M., Karpytchev, M., Bacher, C., Arnaudeau, V., Vidal, N., Maurer, D., Niquil, N., 2012. Spatial and long-term changes in the functional and structural phytoplankton communities along the French Atlantic coast. *ECSA 46 Conf. Proc. Chang. Chall. Tidal Estuar. Syst.* 108, 37–51.
- Davies, N.M., McLachlan, A.J., Day, R.O., Williams, K.M., 2000. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib. A selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor. *Clin. Pharmacokinet.* 38, 225–242.
- De Boer, J., De Boer, K., Boon, J.P., 2000. Polybrominated biphenyls and diphenylethers, in: *New Types of Persistent Halogenated Compounds, The Handbook of Environmental Chemistry.* p. 95.
- 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.
- 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.* 14, 766–779.
- Directive 2013/39/UE, 2013. , L 226.
- Directive n°76/464/CEE, 1976. , JOCE.
- Directive n°2000/60/CE, 2000. , JOCE.
- Donkin, P., Smith, E.L., Rowland, S.J., 2003. Toxic Effects of Unresolved Complex Mixtures of Aromatic Hydrocarbons Accumulated by Mussels, *Mytilus edulis*, from Contaminated Field Sites. *Environ. Sci. Technol.* 37, 4825–4830.
- Donova, M.V., 2007. Transformation of steroids by actinobacteria: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43, 1–14.
- Dudkowski, A., 2000. Ependage agricole des boues de stations d'épuration d'eaux usées urbaines. *Courr. Environ. INRA.* URL <http://www7.inra.fr/dpenv/lesboues.htm> (consulté le 5-12-14).
- Durant, J.L., Lafleur, A.L., 2011. Effect-Directed Analysis of mutagens in ambient airborne particles. *Effect-Directed Analysis of complex environmental contamination* 15, 199–236.
- Eichbaum, K., Brinkmann, M., Buchinger, S., Hecker, M., Engwall, M., van Bavel, B., Reifferscheid, G., Hollert, H., 2013. The dioRAMA project: Assessment of dioxin-like activity in sediments and fish (*Rutilus rutilus*) in support of the ecotoxicological characterization of sediments. *J. Soils Sediments* 13, 770–774.
- Elhmmali, M.M., Roberts, D.J., Evershed, R.P., 1997. Bile acids as a new class of sewage pollution indicator. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3663–3668.
- Elhmmali, M.M., Roberts, D.J., Evershed, R.P., 2000. Combined analysis of bile acids and sterols/stanols from riverine particulates to assess sewage discharges and other fecal sources. *Environ. Sci. Technol.* 34, 39–46.

- Engwall, M., Brunström, B., Näf, C., Hjelm, K., 1999. Levels of dioxin-like compounds in sewage sludge determined with a bioassay based on EROD induction in chicken embryo liver cultures. *Chemosphere* 38, 2327–2343.
- Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J.-P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J.-C., Cavaillès, V., Balaguer, P., 2006. Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.* 71, 1459–1469.
- Escher, B.I., Baumgartner, R., Koller, M., Treyer, K., Lienert, J., McArdell, C.S., 2011. Environmental toxicology and risk assessment of pharmaceuticals from hospital wastewater. *Water Res.* 45, 75–92.
- Escher, B.I., Bramaz, N., Mueller, J.F., Quayle, P., Rutishauser, S., Vermeirssen, E.L.M., 2008. Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples. *J. Environ. Monit.* 10, 612–621.
- ETIAGE - Étude Intégrée de l'effet des Apport amont et locaux sur le fonctionnement de la Garonne Estuarienne (Séminaire de restitution du programme de recherche), 2014. . Bordeaux.
- EUROPEAN COMMISSION, 2011. amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards recognised testing methods for detecting marine biotoxins in live bivalve molluscs.
- Fan, Z., Wu, S., Chang, H., Hu, J., 2011. Behaviors of glucocorticoids, androgens and progestogens in a municipal sewage treatment plant: Comparison to estrogens. *Environ. Sci. Technol.* 45, 2725–2733.
- Farré, M. la, Pérez, S., Kantiani, L., Barceló, D., 2008. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *Adv. MS Anal. Metab. Degrad. Prod. - II* 27, 991–1007.
- Farré, M., Barceló, D., 2003. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 22, 299–310.
- Fenner, K., Kern, S., Neuwöhner, J., Singer, H., Escher, B., Hollender, J., 2009. Produits de transformation – un risque pour l'environnement ? *Eawag News* 67f, 15–18.
- Fernandez, M.P., Ikonou, M.G., Buchanan, I., 2007. An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters. *Sci. Total Environ.* 373, 250–269.
- Fernández, P., Grifoll, M., Solanas, A.M., Bayona, J.M., Albaigés, J., 1992. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environ. Sci. Technol.* 26, 817–829.
- Fetter, E., Krauss, M., Brion, F., Kah, O., Scholz, S., Brack, W., 2014. Effect-directed analysis for estrogenic compounds in a fluvial sediment sample using transgenic cyp19a1b-GFP zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 154, 221–229.
- Fini, J.B., Le Mével, S., Palmier, K., Darras, V.M., Punzon, I., Richardson, S.J., Clerget-Froidevaux, M.S., Demeneix, B.A., 2012. Thyroid hormone signaling in the *Xenopus laevis* embryo is functional and susceptible to endocrine disruption. *Endocrinology* 153, 5068–5081.

- Furtula, V., Liu, J., Chambers, P., Osachoff, H., Kennedy, C., Harkness, J., 2012. Sewage treatment plants efficiencies in removal of sterols and sterol ratios as indicators of fecal contamination sources. *Water, Air, Soil Pollut.* 223, 1017–1031.
- Gabet-Giraud, V., 2009. Distribution d'estrogènes et de bêtabloquants dans les stations d'épuration des eaux résiduaires et dans les eaux de surfaces. Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon.
- Gabet-Giraud, V., Miège, C., Choubert, J.M., Ruel, S.M., Coquery, M., 2010. Occurrence and removal of estrogens and beta blockers by various processes in wastewater treatment plants. *Sci. Total Environ.* 408, 4257–4269.
- Gardia-Parège, C., Dévier, M.-H., Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Maillot-Maréchal, E., Balaguer, P., Grimaldi, M., Budzinski, H., en préparation. Assessing in vitro activities and identification of endocrine-disrupting compounds in wastewater treatment plant using effect-directed analysis.
- Garric, J., Vollat, B., Duis, K., Péry, A., Junker, T., Ramil, M., Fink, G., Ternes, T.A., 2007. Effects of the parasiticide ivermectin on the cladoceran *Daphnia magna* and the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere* 69, 903–910.
- Geiszinger, A., Bonninaeu, C., Faggiano, L., Guasch, H., López-Doval, J.C., Proia, L., Ricart, M., Ricciardi, F., Romaní, A., Rotter, S., Muñoz, I., Schmitt-Jansen, M., Sabater, S., 2009. The relevance of the community approach linking chemical and biological analyses in pollution assessment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28, 619–626.
- Gerlich, M., Neumann, S., 2013. MetFusion: Integration of compound identification strategies. *J. Mass Spectrom.* 48, 291–298.
- Gerssen, A., Mulder, P.P.J., de Boer, J., 2011. Screening of lipophilic marine toxins in shellfish and algae: Development of a library using liquid chromatography coupled to orbitrap mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 685, 176–185.
- Giesy, J.P., Hilscherova, K., Jones, P.D., Kannan, K., Machala, M., 2002. Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. *Mar. Pollut. Bull.* 45, 3–16.
- Gilbert, N., 2011. Drug waste harms fish. *Nature* 476, 265.
- Giltrap, M., Macken, A., McHugh, B., Hernan, R., O' Rourke, K., McGovern, E., Foley, B., Davoren, M., 2009. Bioassay-directed fractionation of marine sediment solvent extracts from the east coast of Ireland. *Chemosphere* 76, 357–364.
- Gomes, R.L., Scrimshaw, M.D., Lester, J.N., 2009. Fate of conjugated natural and synthetic steroid estrogens in crude sewage and activated sludge batch studies. *Environ. Sci. Technol.* 43, 3612–3618.
- Gomez, E., Pillon, A., Fenet, H., Rosain, D., Duchesne, M.J., Nicolas, J.C., Balaguer, P., Casellas, C., 2005. Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: Parabens, UV screens, and musks. *J. Toxicol. Environ. Health - Part A* 68, 239–251.
- Goodwin, B., Gauthier, K.C., Umetani, M., Watson, M.A., Lochansky, M.I., Collins, J.L., Leitersdorf, E., Mangelsdorf, D.J., Kliewer, S.A., Repa, J.J., 2003. Identification of bile acid precursors as endogenous ligands for the nuclear xenobiotic pregnane X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 223–228.

- Grabicova, K., Grabic, R., Blaha, M., Kumar, V., Cerveny, D., Fedorova, G., Randak, T., 2014. Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant.
- Grange, A.H., Zumwalt, M.C., Sovocool, G.W., 2006. Determination of ion and neutral loss compositions and deconvolution of product ion mass spectra using an orthogonal acceleration time-of-flight mass spectrometer and an ion correlation program. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 89–102.
- Gribble, G., 2004. Amazing organohalogens. *American scientist* 92, 342.
- Gribble, G.W., 1999. The diversity of naturally occurring organobromine compounds. *Chem. Soc. Rev.* 28, 335–346.
- Gribble, G.W., 2010. Naturally Occurring Organohalogen Compounds - A Comprehensive Update, *Chemistry and Materials Science (Springer-11644)*. Springer-Verlag Vienna, Vienna.
- Groh, K.J., Schönenberger, R., Eggen, R.I.L., Segner, H., Suter, M.J.-F., 2013. Analysis of protein expression in zebrafish during gonad differentiation by targeted proteomics. *Gen. Comp. Endocrinol.* 193, 210–220.
- Grote, M., Brack, W., Altenburger, R., 2005a. Identification of toxicants from marine sediment using effect-directed analysis. *Environ. Toxicol.* 20, 475–486.
- Grote, M., Brack, W., Walter, H.A., Altenburger, R., 2005b. Confirmation of cause-effect relationships using effect-directed analysis for complex environmental samples. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1420–1427.
- Grung, M., Lichtenthaler, R., Ahel, M., Tollefsen, K.-E., Langford, K., Thomas, K.V., 2007. Effects-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia. *Chemosphere* 67, 108–120.
- Guitart, C., Slattery, M., Ankisetty, S., Radwan, M., Ross, S.J., Letcher, R.J., Reddy, C.M., 2011. Contemporary ¹⁴C radiocarbon levels of oxygenated polybrominated diphenyl ethers (O-PBDEs) isolated in sponge–cyanobacteria associations. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 631–636.
- Gustavsson, L.K., Klee, N., Olsman, H., Hollert, H., Engwall, M., 2004. Fate of Ah receptor agonists during biological treatment of an industrial sludge containing explosives and pharmaceutical residues. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 11, 379–387.
- Hahn, M.E., Lamb, T.M., Schultz, M.E., Smolowitz, R.M., Stegeman, J.J., 1993. Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquat. Toxicol.* 26, 185–208.
- Hamers, T., Leonards, P.E.G., Legler, J., Dick Vethaak, A., Schipper, C.A., 2010. Toxicity profiling: An integrated effect-based tool for site-specific sediment quality assessment. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 6, 761–773.
- Hamid, H., Eskicioglu, C., 2012. Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: A review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix. *Water Res.* 46, 5813–5833.
- Hanselman, T.A., Graetz, D.A., Wilkie, A.C., 2003. Manure-Borne Estrogens as Potential Environmental Contaminants: A Review. *Environ. Sci. Technol.* 37, 5471–5478.

- Hardy, B., Douglas, N., Helma, C., Rautenberg, M., Jeliaskova, N., Jeliaskov, V., Nikolova, I., Benigni, R., Tcheremenskaia, O., Kramer, S., Girschick, T., Buchwald, F., Wicker, J., Karwath, A., Gütlein, M., Maunz, A., Sarimveis, H., Melagraki, G., Afantitis, A., Sopasakis, P., Gallagher, D., Poroikov, V., Filimonov, D., Zakharov, A., Lagunin, A., Glorizova, T., Novikov, S., Skvortsova, N., Druzhilovsky, D., Chawla, S., Ghosh, I., Ray, S., Patel, H., Escher, S., 2010. Collaborative development of predictive toxicology applications. *J. Cheminformatics* 2.
- Harman, C., Allan, I.J., Vermeirssen, E.L.M., 2012. Calibration and use of the polar organic chemical integrative sampler—a critical review. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2724–2738.
- Harmsen, J., 2007. Measuring bioavailability: From a scientific approach to standard methods. *J. Environ. Qual.* 36, 1420–1428.
- Hauser, B., Schulz, D., Boesch, C., Deschner, T., 2008. Measuring urinary testosterone levels of the great apes—Problems with enzymatic hydrolysis using *Helix pomatia* juice. *Gen. Comp. Endocrinol.* 158, 77–86.
- Hecker, M., Hollert, H., 2009. Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: State of the art and future challenges. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 607–613.
- Hernandez-Raquet, G., Durand, E., Braun, F., Cravo-Laureau, C., Godon, J.-J., 2013. Impact of microbial diversity depletion on xenobiotic degradation by sewage-activated sludge. *Environ. Microbiol. Rep.* 5, 588–594.
- Higley, E., Grund, S., Jones, P.D., Schulze, T., Seiler, T.-B., Varel, U.L.-V., Brack, W., Wölz, J., Zielke, H., Giesy, J.P., Hollert, H., Hecker, M., 2012. Endocrine disrupting, mutagenic, and teratogenic effects of upper Danube River sediments using effect-directed analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1053–1062.
- Hill, A. w., Mortishire-Smith, R.J., 2005. Automated assignment of high-resolution collisionally activated dissociation mass spectra using a systematic bond disconnection approach. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 3111–3118.
- Hilscherová, K., 2014. Passive sampling techniques and EDA.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-L., 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci. Total Environ.* 225, 109–118.
- Hites, R.A., 1990. Handbook of mass spectra of environmental contaminant, 4th ed, Library of congress cataloging. CRC Press.
- Hodder, A.R., Capon, R.J., 1991. A New Brominated Biindole from an Australian Cyanobacterium, *Rivularia firma*. *J. Nat. Prod.* 54, 1661–1663.
- Holbrook, R.D., Novak, J.T., Grizzard, T.J., Love, N.G., 2002. Estrogen receptor agonist fate during wastewater and biosolids treatment processes: A mass balance analysis. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4533–4539.
- Holčapek, M., Jirásko, R., Lísa, M., 2012. Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. *J. Chromatogr. A* 1259, 3–15.
- Hong, S., Khim, J.S., Naile, J.E., Park, J., Kwon, B.-O., Wang, T., Lu, Y., Shim, W.J., Jones, P.D., Giesy, J.P., 2012. AhR-mediated potency of sediments and soils in estuarine and coastal areas of the Yellow Sea region: A comparison between Korea and China. *Environ. Pollut.* 171, 216–225.

- Horai, H., Arita, M., Kanaya, S., Nihei, Y., Ikeda, T., Suwa, K., Ojima, Y., Tanaka, K., Tanaka, S., Aoshima, K., Oda, Y., Kakazu, Y., Kusano, M., Tohge, T., Matsuda, F., Sawada, Y., Hirai, M.Y., Nakanishi, H., Ikeda, K., Akimoto, N., Maoka, T., Takahashi, H., Ara, T., Sakurai, N., Suzuki, H., Shibata, D., Neumann, S., Iida, T., Tanaka, K., Funatsu, K., Matsuura, F., Soga, T., Taguchi, R., Saito, K., Nishioka, T., 2010. MassBank: A public repository for sharing mass spectral data for life sciences. *J. Mass Spectrom.* 45, 703–714.
- Houtman, C.J., Booij, P., Jover, E., Pascual del Rio, D., Swart, K., van Velzen, M., Vreuls, R., Legler, J., Brouwer, A., Lamoree, M.H., 2006. Estrogenic and dioxin-like compounds in sediment from Zierikzee harbour identified with CALUX assay-directed fractionation combined with one and two dimensional gas chromatography analyses. *Chemosphere* 65, 2244–2252.
- 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.
- Huckins, J., Alvarez, D., 2004. Semipermeable membrane device (SPMD). USGS Columbia environmental research center.
- Hug, C., Ulrich, N., Schulze, T., Brack, W., Krauss, M., 2014. Identification of novel micropollutants in wastewater by a combination of suspect and nontarget screening. *Environ. Pollut.* 184, 25–32.
- Huisman, J., 2005. Harmful Cyanobacteria, Biomedical and Life Sciences (Springer-11642; ZDB-2-SBL). Springer, Dordrecht.
- Jacobs, M., Dickins, M., Lewis, D.F., 2003. Homology modelling of the nuclear receptors: human oestrogen receptor β (hER β), the human pregnane-X-receptor (PXR), the Ah receptor (AhR) and the constitutive androstane receptor (CAR) ligand binding domains from the human oestrogen receptor α (hER α) crystal structure, and the human peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) ligand binding domain from the human PPAR γ crystal structure. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84, 117–132.
- Jacobs, M.N., Nolan, G.T., Hood, S.R., 2005. Lignans, bacteriocides and organochlorine compounds activate the human pregnane X receptor (PXR). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 209, 123–133.
- Jálová, V., Jarošová, 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.
- Janošek, J., Hilscherová, K., Bláha, L., Holoubek, I., 2006. Environmental xenobiotics and nuclear receptors—Interactions, effects and in vitro assessment. *Toxicol. In Vitro* 20, 18–37.
- Ji, C., Jin, X., He, J., Yin, Z., 2012. Use of TSH β :EGFP transgenic zebrafish as a rapid in vivo model for assessing thyroid-disrupting chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 262, 149–155.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J.A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P., 1996. Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 194–202.

- Johnson, A.C., Belfroid, A., Di Corcia, A., 2000. Estimating steroid oestrogen inputs into activated sludge treatment works and observations on their removal from the effluent. *Sci. Total Environ.* 256, 163–173.
- Johnson, A.C., Sumpster, J.P., 2001. Removal of endocrine-disrupting chemicals in activated sludge treatment works. *Environ. Sci. Technol.* 35, 4697–4703.
- Jondeau-Cabaton, A., Soucasse, A., Jamin, E.L., Creusot, N., Grimaldi, M., Jouanin, I., Aït-Aïssa, S., Balaguer, P., Debrauwer, L., Zalko, D., 2013. Characterization of endocrine disruptors from a complex matrix using estrogen receptor affinity columns and high performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 2705–2720.
- Jones, O.A.H., Voulvoulis, N., Lester, J.N., 2005. Human pharmaceuticals in wastewater treatment processes. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 35, 401–427.
- Jugan, M.L., Oziol, L., Bimbot, M., Huteau, V., Tamisier-Karolak, S., Blondeau, J.P., Lévi, Y., 2009. In vitro assessment of thyroid and estrogenic endocrine disruptors in wastewater treatment plants, rivers and drinking water supplies in the greater Paris area (France). *Sci. Total Environ.* 407, 3579–3587.
- Kaisarevic, S., Varel, U.L., Orcic, D., Streck, G., Schulze, T., Pogrmic, K., Teodorovic, I., Brack, W., Kovacevic, R., 2009. Effect-directed analysis of contaminated sediment from the wastewater canal in Pancevo industrial area, Serbia. *Chemosphere* 77, 907–913. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.08.042
- Kammann, U., Biselli, S., Reineke, N., Wosniok, W., Danischewski, D., Hühnerfuss, H., Kinder, A., Sierts-Herrmann, A., Theobald, N., Vahl, H.-H., Vobach, M., Westendorf, J., Steinhart, H., 2005. Bioassay-directed fractionation of organic extracts of marine surface sediments from the north and Baltic Sea part II: Results of the biotest battery and development of a biotest index. *J. Soils Sediments* 5, 225–232.
- Kang, J., Price, W.E., 2009. Occurrence of phytoestrogens in municipal wastewater and surface waters. *J. Environ. Monit.* 11, 1477–1483.
- Kapanen, A., Vikman, M., Rajasärkkä, J., Virta, M., Itävaara, M., 2013. Biotests for environmental quality assessment of composted sewage sludge. *Waste Manag.* 33, 1451–1460.
- Kaukonen, A., Vuorela, P., Vuorela, H., Mannermaa, J.-P., 1998. High-performance liquid chromatography methods for the separation and quantitation of spironolactone and its degradation products in aqueous formulations and of its metabolites in rat serum. *J. Chromatogr. A* 797, 271–281.
- 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., 2004. Detection of genistein as an estrogenic contaminant of river water in Osaka. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6424–6429.
- Kelly, M.M., Fleischhacker, N.T., Rearick, D.C., Arnold, W.A., Schoenfuss, H.L., Novak, P.J., 2014. Phytoestrogens in the environment, II: Microbiological degradation of phytoestrogens and the response of fathead minnows to degradate exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 560–566.
- Kemppainen, J.A., Wilson, E.M., 1996. Agonist and antagonist activities of hydroxyflutamide and casodex relate to androgen receptor stabilization. *Urology* 48, 157–163.

- Kerber, A., Laue, R., Meringer, M., Rücker, C., 2004. Molgen-QSPR, a software package for the study of quantitative structure property relationships. *Match* 187–204.
- Khan, S.A., Vanden Heuvel, J.P., 2003. Reviews: Current topics role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids (review). *J. Nutr. Biochem.* 14, 554–567.
- Khim, J.S., Lee, K.T., Villeneuve, D.L., Kannan, K., Giesy, J.P., Koh, C.H., 2001. In vitro bioassay determination of dioxin-like and estrogenic activity in sediment and water from Ulsan Bay and its vicinity, Korea. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 151–160.
- 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.* 158, 74–83.
- Kind, T., Fiehn, O., 2010. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanal. Rev.* 2, 23–60.
- Koch, B.P., Dittmar, T., 2006. From mass to structure: an aromaticity index for high-resolution mass data of natural organic matter. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20, 926–932.
- Kosmehl, T., Otte, J.C., Yang, L., Legradi, J., Bluhm, K., Zinsmeister, C., Keiter, S.H., Reifferscheid, G., Manz, W., Braunbeck, T., Strähle, U., Hollert, H., 2012. A combined DNA-microarray and mechanism-specific toxicity approach with zebrafish embryos to investigate the pollution of river sediments. *Reprod. Toxicol.* 33, 245–253.
- Kostich, M.S., Batt, A.L., Lazorchak, J.M., 2014. Concentrations of prioritized pharmaceuticals in effluents from 50 large wastewater treatment plants in the US and implications for risk estimation. *Environ. Pollut.* 184, 354–359.
- Krauss, M., Singer, H., Hollender, J., 2010. LC-high resolution MS in environmental analysis: From target screening to the identification of unknowns. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 943–951.
- Krüger, T., Long, M., Bonefeld-Jørgensen, E.C., 2008. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology* 246, 112–123.
- Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., Van Der Saag, P.T., Van Der Burg, B., Gustafsson, J.-Å., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 139, 4252–4263.
- Kumar, A., Paliwal, D., Saini, D., Thakur, A., Aggarwal, S., Kaushik, D., 2014. A comprehensive review on synthetic approach for antimalarial agents. *Eur. J. Med. Chem.* 85, 147–178.
- Kumar, V., Johnson, A.C., Nakada, N., Yamashita, N., Tanaka, H., 2012. De-conjugation behavior of conjugated estrogens in the raw sewage, activated sludge and river water. *J. Hazard. Mater.* 227–228, 49–54.
- Kunz, P.Y., Fent, K., 2006. Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217, 86–99.

- Kuster, M., José López De Alda, M., Barceló, D., 2004. Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 23, 790–798.
- Labadie, P., Budzinski, H., 2005. Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environ. Sci. Technol.* 39, 5113–5120.
- Lajeunesse, A., Segura, P.A., Gélinas, M., Hudon, C., Thomas, K., Quilliam, M.A., Gagnon, C., 2012. Detection and confirmation of saxitoxin analogues in freshwater benthic *Lyngbya wollei* algae collected in the St. Lawrence River (Canada) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1219, 93–103.
- Lalman, J.A., Bagley, D.M., 2001. Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids. *Water Res.* 35, 2975–2983.
- Lalone, C.A., Villeneuve, D.L., Cavallin, J.E., Kahl, M.D., Durhan, E.J., Makynen, E.A., Jensen, K.M., Stevens, K.E., Severson, M.N., Blanksma, C.A., Flynn, K.M., Hartig, P.C., Woodard, J.S., Berninger, J.P., Norberg-King, T.J., Johnson, R.D., Ankley, G.T., 2013. Cross-species sensitivity to a novel androgen receptor agonist of potential environmental concern, spironolactone. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2528–2541.
- Lalone, C.A., Villeneuve, D.L., Olmstead, A.W., Medlock, E.K., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Durhan, E.J., Makynen, E.A., Blanksma, C.A., Cavallin, J.E., Thomas, L.M., Seidl, S.M., Skolness, S.Y., Wehmas, L.C., Johnson, R.D., Ankley, G.T., 2012. Effects of a glucocorticoid receptor agonist, dexamethasone, on fathead minnow reproduction, growth, and development. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 611–622.
- Lange, I.G., Daxenberger, A., Schiffer, B., Witters, H., Ibarreta, D., Meyer, H.H.D., 2002. Sex hormones originating from different livestock production systems: Fate and potential disrupting activity in the environment. *Anal. Chim. Acta* 473, 27–37.
- Lara-Martín, P.A., González-Mazo, E., Brownawell, B.J., 2011. Multi-residue method for the analysis of synthetic surfactants and their degradation metabolites in aquatic systems by liquid chromatography–time-of-flight-mass spectrometry. *Sel. Pap. 28th Int. Symp. Chromatogr. 28th Int. Symp. Chromatogr.* 1218, 4799–4807.
- Lara-Martín, P.A., González-Mazo, E., Petrovic, M., Barceló, D., Brownawell, B.J., 2014. Occurrence, distribution and partitioning of nonionic surfactants and pharmaceuticals in the urbanized Long Island Sound Estuary (NY). *7th Int. Conf. Mar. Pollut. Ecotoxicol.* 85, 710–719.
- Laville, N., Aït-Aïssa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J., 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196, 41–55.
- Leatherland, J.F., Li, M., Barkataki, S., 2010. Stressors, glucocorticoids and ovarian function in teleosts. *J. Fish Biol.* 76, 86–111.
- Ledreux, A., Sérandour, A.-L., Morin, B., Derick, S., Lancelleur, R., Hamlaoui, S., Furger, C., Biré, R., Krys, S., Fessard, V., Troussellier, M., Bernard, C., 2012. Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part II: Application to shellfish extracts spiked with lipophilic marine toxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1995–2007.
- Legler, J., Broekhof, J.L.M., Brouwer, A., Lanser, P.H., Murk, A.J., Van Der Saag, P.T., Dick Vethaak, A., 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.
- Legler, J., Van Velzen, M., Cenijn, P.H., Houtman, C.J., Lamoree, M.H., Wegener, J.W., 2011. Effect-directed analysis of municipal landfill soil reveals novel developmental toxicants in the zebrafish *Danio rerio*. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8552–8558.
- Lei, L., Aoyama, I., 2010. Effect-directed investigation and interactive effect of organic toxicants in landfill leachates combining Microtox test with RP-HPLC fractionation and GC/MS analysis. *Ecotoxicology* 19, 1268–1276.
- Le Maire, A., Bourguet, W., Balaguer, P., 2010. A structural view of nuclear hormone receptor: Endocrine disruptor interactions. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 1219–1237.
- Lemaire, G., Mnif, W., Pascussi, J.-M., Pillon, A., Rabenoelina, F., Fenet, H., Gomez, E., Casellas, C., Nicolas, J.-C., Cavallès, 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.
- Leonards, P.E.G., Brix, R., Barceló, D., Lamoree, M.H., 2011. Advanced GC-MS and LC-MS tools for structure elucidation in Effect-Directed Analysis. *Effect-Directed Analysis of complex environmental contamination* 15, 143–166.
- Lephart, E.D., 1996. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res. Rev.* 22, 1–26.
- Leterme, S.C., Pingree, R.D., Skogen, M.D., Seuront, L., Reid, P.C., Attrill, M.J., 2008. Decadal fluctuations in North Atlantic water inflow in the North Sea between 1958–2003: impacts on temperature and phytoplankton populations. *Oceanologia* 50 (1), 59–72.
- Leusch, F.D.L., Chapman, H.F., van den Heuvel, M.R., Tan, B.L.L., Gooneratne, S.R., Tremblay, L.A., 2006. Bioassay-derived androgenic and estrogenic activity in municipal sewage in Australia and New Zealand. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65, 403–411.
- Levasseur, P., 2013. Production et capacités de stockage des lisiers de porc. (No. 10), Techporc.
- Lin, H.-Y., Rockwood, A., Munson, M.S.B., Ridge, D.P., 1993. Proton affinity and collision-induced decomposition of ethoxylated alcohols: Effects of intramolecular hydrogen bonding on polymer ion collision-induced decomposition. *Anal. Chem.* 65, 2119–2124.
- Liscio, C., Abdul-Sada, A., Al-Salhi, R., Ramsey, M.H., Hill, E.M., 2014. Methodology for profiling anti-androgen mixtures in river water using multiple passive samplers and bioassay-directed analyses. *Water Res.* 57, 258–269.
- Liu, S., Ying, G.-G., Zhao, J.-L., Chen, F., Yang, B., Zhou, L.-J., Lai, H.-J., 2011. Trace analysis of 28 steroids in surface water, wastewater and sludge samples by rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1218, 1367–1378.
- Liu, S., Ying, G.-G., Zhou, L.-J., Zhang, R.-Q., Chen, Z.-F., Lai, H.-J., 2012. Steroids in a typical swine farm and their release into the environment. *Water Res.* 46, 3754–3768.

- Liu, Y., Gribble, G.W., 2002. Selective lithiation of 2,3-dibromo-1-methylindole. A synthesis of 2,3-disubstituted indoles. *Tetrahedron Lett.* 43, 7135–7137.
- Liu, Z. -h., Kanjo, Y., Mizutani, S., 2010. A review of phytoestrogens: Their occurrence and fate in the environment. *Water Res.* 44, 567–577.
- Logroschino, G., Traynor, B.J., Hardiman, O., Chió, A., Mitchell, D., Swingler, R.J., Millul, A., Benn, E., Beghi, E., 2010. Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 81, 385–390.
- Lord, H., Pawliszyn, J., 2000. Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A* 885, 153–193.
- Louiz, I., Kinani, S., Gouze, M.-E., Ben-Attia, M., Menif, D., Bouchonnet, S., Porcher, J.M., Ben-Hassine, O.K., Aït-Aïssa, S., 2008. Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: Contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs). *Sci. Total Environ.* 402, 318–329.
- Lübcke-von Varel, U., Bataineh, M., Lohrmann, S., Löffler, I., Schulze, T., Flückiger-Isler, S., Neca, J., Machala, M., Brack, W., 2012. Identification and quantitative confirmation of dinitropyrenes and 3-nitrobenzanthrone as major mutagens in contaminated sediments. *Environ. Int.* 44, 31–39.
- Lübcke-von Varel, U., Streck, G., Brack, W., 2008. Automated fractionation procedure for polycyclic aromatic compounds in sediment extracts on three coupled normal-phase high-performance liquid chromatography columns. *J. Chromatogr. A* 1185, 31–42.
- Lukasewycz, M., Durhan, E., 1992. Strategies for the identification of non-polar toxicants in aqueous environmental samples using toxicity-based fractionation and gas chromatography—mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 580, 215–228.
- Lu, Y., Wang, Z., 2003. Accumulation of organochlorinated pesticides by triolein-containing semipermeable membrane device (triolein-SPMD) and rainbow trout. *Water Res.* 37, 2419–2425.
- Madureira, T.V., Cruzeiro, C., Rocha, M.J., Rocha, E., 2011. The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal)—Experimental assessment using a zebrafish embryo test. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32, 212–217.
- Madureira, T.V., Rocha, M.J., Cruzeiro, C., Rodrigues, I., Monteiro, R.A.F., Rocha, E., 2012. The toxicity potential of pharmaceuticals found in the Douro River estuary (Portugal): Evaluation of impacts on fish liver, by histopathology, stereology, vitellogenin and CYP1A immunohistochemistry, after sub-acute exposures of the zebrafish model. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 34, 34–45.
- Malmvärn, A., Marsh, G., Kautsky, L., Athanasiadou, M., Bergman, Å., Asplund, L., 2005. Hydroxylated and Methoxylated Brominated Diphenyl Ethers in the Red Algae *Ceramium tenuicorne* and Blue Mussels from the Baltic Sea. *Environ. Sci. Technol.* 39, 2990–2997.
- Malmvärn, A., Zebühr, Y., Kautsky, L., Bergman, Å., Asplund, L., 2008. Hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers and polybrominated dibenzo-p-dioxins in red alga and cyanobacteria living in the Baltic Sea. *Chemosphere* 72, 910–916.

- Marteau, C., Chevolleau, S., Jouanin, I., Perdu, E., De Sousa, G., Rahmani, R., Antignac, J.-P., Lebizec, B., Zalko, D., Debrauwer, L., 2012. Development of a liquid chromatography/atmospheric pressure photo-ionization high-resolution mass spectrometry analytical method for the simultaneous determination of polybrominated diphenyl ethers and their metabolites: Application to BDE-47 metabolism in human hepatocytes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 26, 599–610.
- Martínez Bueno, M.J., Agüera, A., Gómez, M.J., Hernando, M.D., García-Reyes, J.F., Fernández-Alba, A.R., 2007. Application of liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry to the determination of pharmaceuticals and related contaminants in wastewater. *Anal. Chem.* 79, 9372–9384.
- Martin-Ruel, S., 2009. Efficacité d'élimination des procédés de traitement pour les substances prioritaires et émergentes.
- Marty, M.S., Carney, E.W., Rowlands, J.C., 2011. Endocrine disruption: Historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicol. Sci.* 120, S93–S108.
- Maruya, K.A., 2003. Di- and tribromoindoles in the common oyster (*Crassostrea virginica*). *Nat. Prod. Organohalogenes* 52, 409–413.
- Marvin, C.H., McCarry, B.E., Lundrigan, J.A., Roberts, K., Bryant, D.W., 1999. Bioassay-directed fractionation of PAH of molecular mass 302 in coal tar-contaminated sediment. *Sci. Total Environ.* 231, 135–144.
- Marvin, C.H., McCarry, B.E., Villeda, J., Allan, L.M., Bryant, D.W., 2000. Chemical and biological profiles of sediments as indicators of sources of contamination in Hamilton Harbour. Part II: Bioassay-directed fractionation using the Ames Salmonella/microsome assay. *Chemosphere* 41, 989–999.
- Marwah, A., Marwah, P., Lardy, H., 2001. High-performance liquid chromatographic analysis of dehydroepiandrosterone. *Gas Liq. Chromatogr. Non-Sapon. Lipids Part I* 935, 279–296.
- Mashtare, M.L., Green, D.A., Lee, L.S., 2013. Biotransformation of 17 α - and 17 β -estradiol in aerobic soils. *Chemosphere* 90, 647–652.
- McCormick, J.M., Paiva, M.S., Häggblom, M.M., Cooper, K.R., White, L.A., 2010. Embryonic exposure to tetrabromobisphenol A and its metabolites, bisphenol A and tetrabromobisphenol A dimethyl ether disrupts normal zebrafish (*Danio rerio*) development and matrix metalloproteinase expression. *Aquat. Toxicol.* 100, 255–262.
- McDermott, C.J., Shaw, P.J., 2008. Diagnosis and management of motor neurone disease. *BMJ* 336, 658–662.
- Mc Lafferty, F.W., 1980. Interpretation of mass spectra, 3rd ed, University Science Source. University science books.
- Meinert, C., Brack, W., 2010. Optimisation of trapping parameters in preparative capillary gas chromatography for the application in effect-directed analysis. *Chemosphere* 78, 416–422.
- Meinert, C., Moeder, M., Brack, W., 2007. Fractionation of technical p-nonylphenol with preparative capillary gas chromatography. *Chemosphere* 70, 215–223.

- Meinert, C., Schymanski, E., Küster, E., Kühne, R., Schüürmann, G., Brack, W., 2010. Application of preparative capillary gas chromatography (pcGC), automated structure generation and mutagenicity prediction to improve effect-directed analysis of genotoxicants in a contaminated groundwater. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17, 885–897.
- Meland, S., Farmen, E., Heier, L.S., Rosseland, B.O., Salbu, B., Song, Y., Tollefsen, K.E., 2011. Hepatic gene expression profile in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to traffic related contaminants. *Sci. Total Environ.* 409, 1430–1443.
- Merck Millipore, 2014. EDS-Pak - POD-Pak Application Paks [WWW Document]. URL http://www.merckmillipore.com/FR/fr/product/EDS-Pak,MM_NF-C84738 (consulté le 21-8-2014).
- Merel, S., Snyder, S., 2014. Screening for emerging chemical contaminants in water using LC/Q-TOF and mass profiler professional software. *Agilent Technologies* 8.
- Mesfioui, R., Love, N.G., Bronk, D.A., Mulholland, M.R., Hatcher, P.G., 2012. Reactivity and chemical characterization of effluent organic nitrogen from wastewater treatment plants determined by Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Water Res.* 46, 622–634.
- Meyer, A., Gross, D., Vorkefeld, S., Kummer, M., Schmidt, J., Sembdner, G., Schreiber, K., 1989. Metabolism of the plant growth regulator dihydrojasmonic acid in barley shoots. *Phytochemistry* 28, 1007–1011.
- Meyer, V., 2010. *Practical High-Performance Liquid Chromatography, Fifth Edition*. ed. Wiley, Switzerland.
- Miersch, O., Porzel, A., Wasternack, C., 1999. Microbial conversion of jasmonates-hydroxylations by *Aspergillus niger*. *Phytochemistry* 50, 1147–1152.
- Miersch, O., Sembdner, G., Schreiber, K., 1989. Occurrence of jasmonic acid analogues in *Vicia faba*. *Phytochemistry* 28, 339–340.
- Milman, B.L., 2005. Identification of chemical compounds. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 24, 493–508.
- Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, 2013. L'élevage en chiffre. L'élevage dans la peau. <http://agriculture.gouv.fr/>. URL <http://agriculture.gouv.fr/L-elevage-dans-la-peau> (consulté le 10-1-14).
- Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, 2014. L'épandage des boues de stations d'épuration urbaines et industrielles sur les sols agricoles : Observation et statistiques. URL <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/272/1122/lepandage-boues-stations-depuration-urbaines-sols.html> (consulté le 7-1-15).
- Mnif, W., Dagnino, S., Escande, A., Pillon, A., Fenet, H., Gomez, E., Casellas, C., Duchesne, M.J., Hernandez-Raquet, G., Cavallès, V., Balaguer, P., Bartegi, A., 2010. Biological analysis of endocrine-disrupting compounds in Tunisian sewage treatment plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 1–12.
- Mnif, W., Pascussi, J.-M., Pillon, A., Escande, A., Bartegi, A., Nicolas, J.-C., Cavallès, V., Duchesne, M.-J., Balaguer, P., 2007. Estrogens and antiestrogens activate hPXR. *Toxicol. Lett.* 170, 19–29.

- Molina-Molina, J.-M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J.-M., Real, M., Fernández, M.F., Balaguer, P., Olea, N., 2013. 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.* 272, 127–136.
- 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.
- Molina-Molina, J.-M., Hillenweck, A., Jouanin, I., Zalko, D., Cravedi, J.-P., Fernández, M.-F., Pillon, A., Nicolas, J.-C., Olea, N., Balaguer, P., 2006. Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 216, 44–54.
- Morgan, W.A., NK, T., Ding, Y., 2008. The use of High Performance Thin-Layer Chromatography to determine the role of membrane lipid composition in bile salt-induced kidney cell damage. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 57, 70–73.
- Morishima, A., Grumbach, M.M., Simpson, E.R., Fisher, C., Qin, K., 1995. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 3689–3698.
- Mortelmans, K., Zeiger, E., 2000. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 455, 29–60.
- Mount, D.I., 1988. Methods for aquatic toxicity identification evaluations. Phase I, Toxicity Characterization Procedures EPA/600/2-88/034.
- Mount, D.I., 1989a. Methods for aquatics toxicity identification evaluations- Phase II- Toxicity identification procedures EPA/600/3-88/035.
- Mount, D.I., 1989b. Methods for aquatic toxicity identification evaluations - Phase III Toxicity confirmation procedures EPA/600/3-88/036.
- Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. A new approach to data evaluation in the non-target screening of organic trace substances in water analysis. *Chemosphere* 85, 1211–1219.
- Muller, M., Combalbert, S., Delgenès, N., Bergheaud, V., Rocher, V., Benoît, P., Delgenès, J.-P., Patureau, D., Hernandez-Raquet, G., 2010a. Occurrence of estrogens in sewage sludge and their fate during plant-scale anaerobic digestion. *Chemosphere* 81, 65–71.
- Muller, M., Patureau, D., Godon, J.-J., Delgenès, J.-P., Hernandez-Raquet, G., 2010b. Molecular and kinetic characterization of mixed cultures degrading natural and synthetic estrogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 691–701.
- Muller, M., Rabenoelina, F., Balaguer, P., Patureau, D., Lemenach, K., Budzinski, H., Barceló, D., López De Alda, M., Kuster, M., Delgenès, J.-P., Hernandez-Raquet, G., 2008. Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1649–1658.
- Mutai, C., Abatis, D., Vagias, C., Moreau, D., Roussakis, C., Roussis, V., 2004. Cytotoxic lupane-type triterpenoids from *Acacia mellifera*. *Phytochemistry* 65, 1159–1164. doi:10.1016/j.phytochem.2004.03.002

- Namieśnik, J., Zabiegała, B., Kot-Wasik, A., Partyka, M., Wasik, A., 2005. Passive sampling and/or extraction techniques in environmental analysis: A review. *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 279–301.
- Neilson, A., 2003. Biological effects and biosynthesis of brominated metabolites, in: *The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 75–204.
- Norman Association, 2010. Working Group 3: Effect-directed analysis for hazardous pollutants identification | NORMAN. *Wwwnorman-Networknet*. URL <http://www.norman-network.net/?q=node/52> (consulté le 5-1-14).
- Norton, R.S., Wells, R.J., 1982. A series of chiral polybrominated biindoles from marine blue-green alga *Rivularia firma*. Application of ¹³C NMR spin-lattice relaxation data and ¹³C-1H coupling constants to structure elucidation. *Am. Chem. Soc.* 104, 3628–3635.
- Oh, K.-B., Mar, W., Kim, S., Kim, J.-Y., Lee, T.-H., Kim, J.-G., Shin, D., Sim, C.J., Shin, J., 2006. Antimicrobial activity and cytotoxicity of bis(indole) alkaloids from the sponge *Spongosorites* sp. *Biol. Pharm. Bull.* 29, 570–573.
- O’Neil, J.M., Davis, T.W., Burford, M.A., Gobler, C.J., 2012. The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae-- Requir. Species-Specif. Inf.* 14, 313–334.
- Otte, J.C., Keiter, S., Faßbender, C., Higley, E.B., Rocha, P.S., Brinkmann, M., Wahrendorf, D.-S., Manz, W., Wetzel, M.A., Braunbeck, T., Giesy, J.P., Hecker, M., Hollert, H., 2013. Contribution of Priority PAHs and POPs to Ah Receptor-Mediated Activities in Sediment Samples from the River Elbe Estuary, Germany. *PLoS ONE* 8.
- Ozcan, S., Tor, A., Aydin, M.E., 2013. Investigation on the levels of heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls in sewage sludge samples and ecotoxicological testing. *Clean - Soil Air Water* 41, 411–418.
- Palaniappan, M., Gleick, P.H., 2009. Peak water. *Worlds Water, The World’s Water* 6, 1–15.
- Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji, S., 2006. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Mar. Pollut. Ecotoxicol.* 32, 265–268.
- Patureau, D., Hernandez-Raquet, G., Balaguer, P., Delgenes, N., Muller, M., Dagnino, S., Delgenes, J.P., 2008. Relevant approach to assess performances of wastewater biosolids composting in terms of micropollutants removal, *Water Science and Technology*.
- Paulson, S.K., Zhang, J.Y., Breau, A.P., Hribar, J.D., Liu, N.W.K., Jessen, S.M., Lawal, W.M., Cogburn, J.N., Gresk, C.J., Markos, C.S., Maziasz, T.J., Schoenhard, G.L., Burton, E.G., 2000. Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats. *Drug Metab. Dispos.* 28, 514–521.
- Penna, A., Vila, M., Fraga, S., Giacobbe, M.G., Andreoni, F., Riobó, P., Vernesi, C., 2005. Characterization of *Ostreopsis* and *Coolia* (Dinophyceae) isolates in the western Mediterranean sea based on morphology, toxicity, and internal transcribed spacer 5.8 r DNA sequences. *J. Phycol.* 41, 212–225.

- Pereira, M.A., Pires, O.C., Mota, M., Alves, M.M., 2005. Anaerobic biodegradation of oleic and palmitic acids: Evidence of mass transfer limitations caused by long chain fatty acid accumulation onto the anaerobic sludge. *Biotechnol. Bioeng.* 92, 15–23.
- Perrodin, Y., 2012. Évaluation des risques écologiques : développements prioritaires et recherches concomitantes. *VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement* 10.
- 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.* 138-139, 88–97.
- Petrovic, M., Farré, M., de Alda, M.L., Perez, S., Postigo, C., Köck, M., Radjenovic, J., Gros, M., Barcelo, D., 2010. Recent trends in the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. *J. Chromatogr. A* 1217, 4004–4017.
- Picó, Y., Barceló, D., 2008. The expanding role of LC-MS in analyzing metabolites and degradation products of food contaminants. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 27, 821–835.
- Pieke, E., Heus, F., Kamstra, J.H., Mladic, M., Velzen, M.V., Kamminga, D., Lamoree, M.H., Hamers, T., Leonards, P., Niessen, W.M.A., Kool, J., 2013a. High-resolution fractionation after gas chromatography for effect-directed analysis. *Anal. Chem.* 85, 8204–8211.
- 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., 2005a. Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor- α : Application to environmental analysis. *Environ. Health Perspect.* 113, 278–284.
- Pillon, A., Servant, N., Vignon, F., Balaguer, P., Nicolas, J.-C., 2005b. In vivo bioluminescence imaging to evaluate estrogenic activities of endocrine disrupters. *Anal. Biochem.* 340, 295–302.
- Pons, J.-L., Labesse, G., 2009. @TOME-2: a new pipeline for comparative modeling of protein–ligand complexes. *Nucleic Acids Res.* 37, W485–W491. doi:10.1093/nar/gkp368
- Portail d'informations sur l'assainissement communal - Accueil [WWW Document], n.d. URL <http://www.assainissement.developpement-durable.gouv.fr/> (consulté le 12-9-14).
- Rastall, A.C., Getting, D., Goddard, J., Roberts, D.R., Erdinger, L., 2006. A biomimetic approach to the detection and identification of estrogen receptor agonists in surface waters using semipermeable membrane devices (SPMDs) and bioassay-directed chemical analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 13, 256–267.
- Rearick, D.C., Fleischhacker, N.T., Kelly, M.M., Arnold, W.A., Novak, P.J., Schoenfuss, H.L., 2014. Phytoestrogens in the environment, I: Occurrence and exposure effects on fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 553–559.
- Regueiro, J., Matamoros, V., Thibaut, R., Porte, C., Bayona, J.M., 2013. Use of effect-directed analysis for the identification of organic toxicants in surface flow constructed wetland sediments. *Chemosphere* 91, 1165–1175.
- Reineke, N., Biselli, S., Franke, S., Francke, W., Heinzl, N., Hühnerfuss, H., Iznaguen, H., Kammann, U., Theobald, N., Vobach, M., Wosniok, W., 2006. Brominated indoles

- and phenols in marine sediment and water extracts from the North and Baltic Seas—concentrations and effects. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 186–196.
- Ridley, C.P., Bergquist, P.R., Harper, M.K., Faulkner, D.J., Hooper, J.N.A., Haygood, M.G., 2005. Speciation and Biosynthetic Variation in Four Dictyoceratid Sponges and Their Cyanobacterial Symbiont, *Oscillatoria spongelliae*. *Chem. Biol.* 12, 397–406.
- Riu, A., Balaguer, P., Perdu, E., Pandelova, M., Piccinelli, R., Gustafsson, J.-A., Leclercq, C., Schramm, K.-W., Dagnino, S., Debrauwer, L., Cravedi, J.-P., Zalko, D., 2008. Characterisation of bioactive compounds in infant formulas using immobilised recombinant estrogen receptor- α affinity columns. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3268–3278.
- Rosal, R., Rodríguez, A., Perdígón-Melón, J.A., Petre, A., García-Calvo, E., Gómez, M.J., Agüera, A., Fernández-Alba, A.R., 2010. Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Emerg. Contam. Water Occur. Fate Remov. Assess. Water Cycle Wastewater Drink. Water* 44, 578–588.
- Rossini, G.P., Hess, P., 2010. Phycotoxins: chemistry, mechanisms of action and shellfish poisoning. *EXS* 100, 65–122.
- Rostkowski, P., Horwood, J., Shears, J.A., Lange, A., Oladapo, F.O., Besselink, H.T., Tyler, C.R., Hill, E.M., 2011. Bioassay-directed identification of novel antiandrogenic compounds in bile of fish exposed to wastewater effluents. *Environ. Sci. Technol.* 45, 10660–10667.
- Sabaliūnas, D., Ellington, J., Sabaliūnienė, I., 1999. Screening Bioavailable Hydrophobic Toxicants in Surface Waters with Semipermeable Membrane Devices: Role of Inherent Oleic Acid in Toxicity Evaluations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 44, 160–167. doi:10.1006/eesa.1999.1802
- Sabik, H., Gagné, F., Blaise, C., Marcogliese, D., Jeannot, R., 2003. Occurrence of alkylphenol polyethoxylates in the St. Lawrence River and their bioconcentration by mussels (*Elliptio complanata*). *Chemosphere* 51, 349–356.
- Salizzato, M., Pavoni, B., Volpi Ghirardini, A., Ghetti, P.F., 1998. Sediment toxicity measured using *Vibrio fischeri* as related to the concentrations of organic (PCBs, PAHs) and inorganic (metals, sulphur) pollutants. *Chemosphere* 36, 2949–2968.
- Sanchez, W., Sremski, W., Piccini, B., Palluel, O., Maillot-Maréchal, E., Betoulle, S., Jaffal, A., Aït-Aïssa, S., Brion, F., Thybaud, E., Hinfrey, 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
- Sarmah, A.K., Meyer, M.T., Boxall, A.B.A., 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 65, 725–759.
- Schmitt, C., Streck, G., Lamoree, M., Leonards, P., Brack, W., de Deckere, E., 2011. Effect directed analysis of riverine sediments—The usefulness of *Potamopyrgus antipodarum* for in vivo effect confirmation of endocrine disruption. *Aquat. Toxicol.* 101, 237–243.
- Schmitt-Jansen, M., Bartels, P., Adler, N., Altenburger, R., 2007. Phytotoxicity assessment of diclofenac and its phototransformation products. *Anal. Bioanal. Chem.* 387, 1389–1396.

- Schmitt, S., Reifferscheid, G., Claus, E., Schlüsener, M., Buchinger, S., 2012. Effect directed analysis and mixture effects of estrogenic compounds in a sediment of the river Elbe. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 3350–3361.
- Schramm, S., Carré, V., Scheffler, J.-L., Aubriet, F., 2011. Analysis of mainstream and sidestream cigarette smoke particulate matter by laser desorption mass spectrometry. *Anal. Chem.* 83, 133–142.
- Schramm, S., Carré, V., Scheffler, J.-L., Aubriet, F., 2014. Active and passive smoking – New insights on the molecular composition of different cigarette smoke aerosols by LDI-FTICRMS. *Atmos. Environ.* 92, 411–420.
- Schreurs, R.H.M.M., Sonneveld, E., van der Saag, P.T., van der Burg, B., Seinen, W., 2005. Examination of the in vitro (anti)estrogenic, (anti)androgenic and (anti)dioxin-like activities of tetralin, indane and isochroman derivatives using receptor-specific bioassays. *Toxicol. Lett.* 156, 261–275.
- Schriks, M., Van Leerdam, J.A., Van Der Linden, S.C., Van Der Burg, B., Van Wezel, A.P., De Voogt, P., 2010. High-resolution mass spectrometric identification and quantification of glucocorticoid compounds in various wastewaters in the Netherlands. *Environ. Sci. Technol.* 44, 4766–4774.
- Schuetzle, D., Lewtas, J., 1986. Bioassay-Directed Chemical Analysis in Environmental Research. *Anal. Chem.* 58, 1060A–1075A.
- Schulze, T., Seiler, T., Streck, G., Braunbeck, T., Hollert, H., 2012. Comparison of different exhaustive and biomimetic extraction techniques for chemical and biological analysis of polycyclic aromatic compounds in river sediments. *J. Soils Sediments* 12, 1419–1434.
- Schulze, T., Weiss, S., Schymanski, E., von der Ohe, P.C., Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., Streck, G., Brack, W., 2010. Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect-directed analysis. *Environ. Pollut.* 158, 1461–1466.
- Schulze, T., Weiss, S., Schymanski, E., von der Ohe, P.C., Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., Streck, G., Brack, W., 2010. Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect-directed analysis. *Environ. Pollut.* 158, 1461–1466.
- Schwab, K., Altenburger, R., Lübcke-Von Varel, U., Streck, G., Brack, W., 2009. Effect-directed analysis of sediment-associated algal toxicants at selected hot spots in the River Elbe basin with a special focus on bioaccessibility. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 1506–1517.
- Schwab, K., Brack, W., 2007. Large volume TENAX® extraction of the bioaccessible fraction of sediment-associated organic compounds for a subsequent effect-directed analysis. *J. Soils Sediments* 7, 178–186.
- Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., Von Gunten, U., Wehrli, B., 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313, 1072–1077.
- Schymanski, E.L., Bataineh, M., Goss, K.-U., Brack, W., 2009. Integrated analytical and computer tools for structure elucidation in effect-directed analysis. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 28, 550–561.

- Schymanski, E.L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ruff, M., Singer, H.P., Hollender, J., 2014. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ. Sci. Technol.* 48, 2097–2098.
- Schymanski, E.L., Meinert, C., Meringer, M., Brack, W., 2008. The use of MS classifiers and structure generation to assist in the identification of unknowns in effect-directed analysis. *Anal. Chim. Acta* 615, 136–147.
- Schymanski, E.L., Singer, H.P., Longrée, P., Loos, M., Ruff, M., Stravs, M.A., Ripollés Vidal, C., Hollender, J., 2014. Strategies to characterize polar organic contamination in wastewater: Exploring the capability of high resolution mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1811–1818.
- Schymanski, E., Schulze, T., Hermans, J., Brack, W., 2011. Computer tools for structure elucidation in Effect-Directed Analysis. *Eff.-Dir. Anal. Complex Environ. Contam., Springer-Verlag* 167–198.
- Sebők, Á., Sezer, K., Vasánits-Zsigrai, A., Helenkár, A., Zárny, G., Molnár-Perl, I., 2008. Gas chromatography–mass spectrometry of the trimethylsilyl (oxime) ether/ester derivatives of cholic acids: Their presence in the aquatic environment. *J. Chromatogr. A* 1211, 104–112.
- Seiler, T.-B., Schulze, T., Hollert, H., 2008. The risk of altering soil and sediment samples upon extract preparation for analytical and bio-analytical investigations—a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 1975–1985.
- Sérandour, A.-L., Ledreux, A., Morin, B., Derick, S., Augier, E., Lancelleur, R., Hamlaoui, S., Moukha, S., Furger, C., Biré, R., Krys, S., Fessard, V., Troussellier, M., Bernard, C., 2012. Collaborative study for the detection of toxic compounds in shellfish extracts using cell-based assays. Part I: Screening strategy and pre-validation study with lipophilic marine toxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1983–1993.
- Shi, H., Qian, L., Guo, S., Zhang, X., Liu, J., Cao, Q., 2010. Teratogenic effects of tetrabromobisphenol A on *Xenopus tropicalis* embryos. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 152, 62–68.
- Shiozawa, T., Tada, A., Nukaya, H., Watanabe, T., Takahashi, Y., Asanoma, M., Ohe, T., Sawanishi, H., Katsuhara, T., Sugimura, T., Wakabayashi, K., Terao, Y., 2000. Isolation and identification of a new 2-phenylbenzotriazole-type mutagen (PBTA-3) in the Nikko River in Aichi, Japan. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 535–540.
- Shore, L.S., Shemesh, M., 2003. Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure Appl. Chem.* 75, 1859–1871.
- Simon, E., 2013. Effect-directed analysis of aquatic biota. VU University Amsterdam, Amsterdam.
- Simon, E., van Velzen, M., Brandsma, S.H., Lie, E., Løken, K., de Boer, J., Bytingsvik, J., Jenssen, B.M., Aars, J., Hamers, T., Lamoree, M.H., 2013. Effect-Directed Analysis To Explore the Polar Bear Exposome: Identification of Thyroid Hormone Disrupting Compounds in Plasma. *Environ. Sci. Technol.* 47, 8902–8912.
- Sinclair, C.J., Boxall, A.B.A., 2009. Ecotoxicity of transformation products.
- Singer, H., Müller, S., Tixier, C., Pillonel, L., 2002. Triclosan: Occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: Field measurements in wastewater

- treatment plants, surface waters, and lake sediments. *Environ. Sci. Technol.* 36, 4998–5004.
- Smital, T., Terzic, S., Zaja, R., Senta, I., Pivcevic, B., Popovic, M., Mikac, I., Tollefsen, K.E., Thomas, K.V., Ahel, M., 2011. Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 844–851.
- Smith, C.A., Maille, G.O., Want, E.J., Qin, C., Trauger, S.A., Brandon, T.R., Custodio, D.E., Abagyan, R., Siuzdak, G., 2005. METLIN: A Metabolite Mass Spectral Database. *Proc. 9th Int. Congr. Ther. Drug Monit. Clin. Toxicol.* 27, 747 – 751.
- Snape, J.R., Maund, S.J., Pickford, D.B., Hutchinson, T.H., 2004. Ecotoxicogenomics: The challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquat. Toxicol.* 67, 143–154.
- 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.
- Soleille, S., Brignon, J.-M., 2006. Données technico-économiques sur les substances chimiques en France - Anthracène. INERIS.
- Sosa-Ferrera, Z., Mahugo-Santana, C., Santana-Rodríguez, J.J., 2013. Analytical methodologies for the determination of endocrine disrupting compounds in biological and environmental samples. *BioMed Res. Int.* 2013.
- Steele, R.E., Mellor, L.B., Sawyer, W.K., Wasvary, J.M., Browne, L.J., 1987. In vitro and in vivo studies demonstrating potent and selective estrogen inhibition with the nonsteroidal aromatase inhibitor CGS 16949A. *Steroids* 50, 147–161.
- Stein, S.E., 1999. An integrated method for spectrum extraction and compound identification from gas chromatography/mass spectrometry data. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10, 770–781.
- Stroheker, T., Cabaton, N., Nourdin, G., Régnier, J.-F., Lhuguenot, J.-C., Chagnon, M.-C., 2005. Evaluation of anti-androgenic activity of di-(2-ethylhexyl)phthalate. *Toxicology* 208, 115–121.
- Suyama, T.L., Cao, Z., Murray, T.F., Gerwick, W.H., 2010. Ichthyotoxic brominated diphenyl ethers from a mixed assemblage of a red alga and cyanobacterium: Structure clarification and biological properties. *Toxicon* 55, 204–210. doi:10.1016/j.toxicon.2009.07.020
- 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
- Taha, S., Raza, M., El-Khawad, I., 1998. Effect of ambrein on smooth muscle responses to various agonists. *J. Ethnopharmacol.* 60, 19–26.
- Takatsu, K., Miyaoku, K., Roy, S.R., Murono, Y., Sago, T., Itagaki, H., Nakamura, M., Tokumoto, T., 2013. Induction of Female-to-Male Sex Change in Adult Zebrafish by Aromatase Inhibitor Treatment. *Sci Rep* 3.
- Takeuchi, S., Iida, M., Kobayashi, S., Jin, K., Matsuda, T., Kojima, H., 2005. Differential effects of phthalate esters on transcriptional activities via human estrogen receptors α

- and β , and androgen receptor. *Toxicology* 210, 223–233. doi:10.1016/j.tox.2005.02.002
- Tang, J.Y.M., Aryal, R., Deletic, A., Gernjak, W., Glenn, E., McCarthy, D., Escher, B.I., 2013. Toxicity characterization of urban stormwater with bioanalytical tools. *Water Res.* 47, 5594–5606.
- Tapie, N., Devier, M.H., Soulier, C., Creusot, N., Le Menach, K., Aït-Aïssa, S., Vrana, B., Budzinski, H., 2011. Passive samplers for chemical substance monitoring and associated toxicity assessment in water. *Water Sci. Technol.* 63, 2418–2426.
- Teerlink, J., Hering, A.S., Higgins, C.P., Drewes, J.E., 2012. Variability of trace organic chemical concentrations in raw wastewater at three distinct sewershed scales. *Water Res.* 46, 3261–3271.
- Ten Hulscher, T.E.M., Postma, J., Den Besten, P.J., Stroomberg, G.J., Belfroid, A., Wegener, J.W., Faber, J.H., Van Der Pol, J.J.C., Jan Hendriks, A., Van Noort, P.C.M., 2003. Tenax extraction mimics benthic and terrestrial bioavailability of organic compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2258–2265.
- Ternes, T.A., 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Res.* 32, 3245–3260.
- Ternes, T.A., Andersen, H., Gilberg, D., Bonerz, M., 2002. Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS. *Anal. Chem.* 74, 3498–3504.
- Ternes, T.A., Joss, A., 2006. Human pharmaceuticals, hormones and fragrances: The challenge of micropollutants in urban water management., IWA Publishing. ed.
- Ternes, T.A., Kreckel, P., Mueller, J., 1999. Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci. Total Environ.* 225, 91–99.
- Terzic, S., Ahel, M., 2011. Nontarget analysis of polar contaminants in freshwater sediments influenced by pharmaceutical industry using ultra-high-pressure liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Environ. Pollut.* 159, 557–566.
- Tetrahydrocortisone-3,21-diacetate, 2014. . Chemspider. URL <http://www.chemspider.com/> (consulté le 31-10-14).
- Thibaut, R., Porte, C., 2008. Effects of fibrates, anti-inflammatory drugs and antidepressants in the fish hepatoma cell line PLHC-1: Cytotoxicity and interactions with cytochrome P450 1A. *Toxicol. In Vitro* 22, 1128–1135.
- Thomas, K.V., Balaam, J., Barnard, N., Dyer, R., Jones, C., Lavender, J., McHugh, M., 2002b. Characterisation of potentially genotoxic compounds in sediments collected from United Kingdom estuaries. *Chemosphere* 49, 247–258.
- Thomas, K.V., Balaam, J., Hurst, M.R., Thain, J.E., 2004. Identification of in vitro estrogen and androgen receptor agonists in North Sea offshore produced water discharges. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1156–1163.
- Thomas, K.V., Hurst, M.R., Matthiessen, P., McHugh, M., Smith, A., Waldock, M.J., 2002a. An assessment of in vitro androgenic activity and the identification of environmental androgens in United Kingdom estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1456–1461.

- Thomas, K.V., Langford, K., Petersen, K., Smith, A.J., Tollefsen, K.E., 2009. Effect-directed identification of naphthenic acids as important in vitro xeno-estrogens and anti-androgens in North Sea offshore produced water discharges. *Environ. Sci. Technol.* 43, 8066–8071.
- Thurman, E.M., Ferrer, I., Blotevogel, J., Borch, T., 2014. Analysis of hydraulic fracturing flowback and produced waters using accurate mass: Identification of ethoxylated surfactants. *Anal. Chem.* 86, 9653–9661.
- Togola, A., Budzinski, H., 2008. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* 1177, 150–158.
- Togola, A., Desforges, M., 2009. Substances pharmaceutiques à usage vétérinaire dans les effluents agricoles : synthèse bibliographique (No. BRGM/RP-580216FR). BRGM.
- Tortajada, S., Niquil, N., Blanchet, H., Grami, B., Montanié, H., David, V., Glé, C., Saint-Béat, B., Johnson, G.A., Marquis, E., Del Amo, Y., Dubois, S., Vincent, D., Dupuy, C., Jude, F., Hartmann, H.J., Sautour, B., 2012. Network analysis of the planktonic food web during the spring bloom in a semi enclosed lagoon (Arcachon, SW France). *Acta Oecologica* 40, 40–50.
- Tremblay, L., Van Der Kraak, G., 1998. Use of a series of homologous in vitro and in vivo assays to evaluate the endocrine modulating actions of β -sitosterol in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 43, 149–162.
- Tryland, I., Fiksdal, L., 1998. Enzyme characteristics of β -D-galactosidase- and β -D-glucuronidase- positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1018–1023.
- Ulrich, N., Schüürmann, G., Brack, W., 2013. Prediction of gas chromatographic retention indices as classifier in non-target analysis of environmental samples. *J. Chromatogr. A* 1285, 139–147.
- Umbuzeiro, G., Machala, M., Weiss, J., 2011. Diagnostic tools for Effect-Directed Analysis of mutagens, AhR agonists, and endocrine disruptors. *Effect-Directed Analysis of complex environmental contamination* 15, 69–82.
- Unceta, N., Sampedro, M.C., Bakar, N.K.A., Gómez-Caballero, A., Goicolea, M.A., Barrio, R.J., 2010. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in wastewaters by dual solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217, 3392–3399.
- UNEP/GRID-Arendal, 2010. Water withdrawal and use.
- UNEP/GRID-Arendal, Ahlenius, H., 2010. Ratio of wastewater treatment.
- Unson, M.D., Holland, N.D., Faulkner, D.J., 1994. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.* 119, 1–12.
- U.S Environmental Protection Agency, 1998. Guidelines for ecological risk assessment, EPA/630/R-95/002F.
- Vaclavik, L., Lacina, O., Haslova, J., 2011. Metabolomic profiling of wines using LC/Q-TOF and masshunter data mining and statistical tools. *Agilent Technologies* 12.

- 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.
- Van Ede, K., Li, A., Antunes-Fernandes, E., Mulder, P., Peijnenburg, A., Hoogenboom, R., 2008. Bioassay directed identification of natural aryl hydrocarbon-receptor agonists in marmalade. *Pap. Present. 3rd Int. Symp. Recent Adv. Food Anal. Food Anal. 2007 Pap. Present. 3rd Int. Symp. Recent Adv. Food Anal.* 617, 238–245. doi:10.1016/j.aca.2008.01.054
- Vetter, W., 2006. Marine Halogenated Natural Products of Environmental Relevance, in: Ware, G., Whitacre, D., Albert, L., Voogt, P., Gerba, C., Hutzinger, O., Knaak, J., Mayer, F., Morgan, D.P., Park, D., Tjeerdema, R., Yang, R.H., Gunther, F. (Eds.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York, pp. 1–57.
- Vetter, W., Jun, W., 2003. Non-polar halogenated natural products bioaccumulated in marine samples. II. Brominated and mixed halogenated compounds. *Nat. Prod. Organohalogenes* 52, 423–431.
- Vetter, W., Rosenfelder, N., Kraan, S., Hiebl, J., 2008. Structure and origin of the natural halogenated monoterpene MHC-1 and its concentrations in marine mammals and fish. *Chemosphere* 73, 7–13.
- Vetter, W., von der Recke, R., Herzke, D., Nygård, T., 2007. Natural and man-made organobromine compounds in marine biota from Central Norway. *Environ. Int.* 33, 17–26.
- Villeneuve, D.L., Khim, J.S., Kannan, K., Giesy, J.P., 2002. Relative potencies of individual polycyclic aromatic hydrocarbons to induce dioxinlike and estrogenic responses in three cell lines. *Environ. Toxicol.* 17, 128–137.
- Vindimian, E., Robaut, C., Fillion, G., 1983. A method for cooperative or noncooperative binding studies using nonlinear regression analysis on a microcomputer. *J. Appl. Biochem.* 5, 261–268.
- Vrana, B., Allan, I.J., Greenwood, R., Mills, G.A., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J., Morrison, G., 2005. Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 24, 845–868.
- Wang, Y., Chirgadze, N.Y., Briggs, S.L., Khan, S., Jensen, E.V., Burris, T.P., 2006. A second binding site for hydroxytamoxifen within the coactivator-binding groove of estrogen receptor β . *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9908–9911.
- Weiss, J.M., Hamers, T., Thomas, K.V., Van Der Linden, S., Leonards, P.E.G., Lamoree, M.H., 2009. Masking effect of anti-androgens on androgenic activity in European river sediment unveiled by effect-directed analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 1385–1397.
- Weiss, J.M., Simon, E., Stroomberg, G.J., De Boer, R., De Boer, J., Van Der Linden, S.C., Leonards, P.E.G., Lamoree, M.H., 2011. Identification strategy for unknown pollutants using high-resolution mass spectrometry: Androgen-disrupting compounds identified through effect-directed analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 400, 3141–3149.

- Weller, M.G., 2012. A unifying review of bioassay-guided fractionation, effect-directed analysis and related techniques. *Sens. Switz.* 12, 9181–9209.
- Wilson, V.S., Bobseine, K., Lambright, C.R., Gray Jr., L.E., 2002a. 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, 69–81.
- Wilson, V.S., Bobseine, K., Lambright, C.R., Gray Jr., L.E., 2002b. 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, 69–81.
- Wolf, S., Schmidt, S., Muller-Hannemann, M., Neumann, S., 2010. In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra. *BMC Bioinformatics* 11, 148.
- World Water Assessment Programme, 2003. Water for people, water for life, United Nations World Water Development Report. Unesco publishing.
- Wund, P., 2013. Développements d'échantillonneurs passifs pour l'étude de la contamination des eaux par les micropolluants organiques (Obtention du grade de Docteur en Chimie analytique et environnement). Université Bordeaux 1, Talence, n°ordre 4966.
- www.assainissement.developpement-durable.gouv.fr, 2013. Portail d'informations sur l'assainissement communal. URL <http://www.assainissement.developpement-durable.gouv.fr/> (consulté le 10-8-13).
- www.atome2.cbc.cnrs.fr, n.d. Atome 2. URL <http://atome2.cbc.cnrs.fr/AT2B/meta.html> (accessed 10-7-14).
- www.eaufrance.fr, n.d. La directive cadre sur l'eau. URL <http://www.eaufrance.fr/s-informer/comprendre/la-politique-publique-de-l-eau/la-directive-cadre-sur-l-eau> (consulté le 21-7-14).
- www.ebpi-kits.com, n.d. Environmental Biodetection Products Incorporated - EBPI-KITS.COM / EBPI.CA . URL <http://www.ebpi-kits.com/> (consulté le 24-7-14).
- www.geoportail.gouv.fr, 2014. Le portail des territoires et des citoyens - Géoportail. URL <http://www.geoportail.gouv.fr/accueil> (consulté le 12-9-14).
- www.massbank.eu, n.d. MassBank | European MassBank Server (NORMAN MassBank) Mass Spectral DataBase. URL <http://massbank.ufz.de/MassBank/> (consulté le 4-1-15).
- www.massbank.jp, n.d. MassBank | High Quality Mass Spectral Database. URL <http://www.massbank.jp/> (consulté le 28-7-14).
- www.pops.int, Stockholm convention. URL <http://chm.pops.int/Home/tabid/2121/mctl/ViewDetails/EventModID/870/EventID/543/xmid/6921/Default.aspx> (consulté le 27-1-14).
- www.sibso.fr, 2014. Les stations d'épuration du SIBSO - Syndicat mixte du Bassin Supérieur de l'Orge. URL <http://www.sibso.fr/assainissement-stations-epuration.html> (consulté le 12-9-14).
- www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr, n.d. L'épandage des boues de stations d'épuration urbaines et industrielles sur les sols agricoles : Observation et statistiques. URL <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/272/1122/lepandage-boues-stations-depuration-urbaines-sols.html> (consulté le 27-2-15).

- Yang, Y.-Y., Borch, T., Young, R.B., Goodridge, L.D., Davis, J.G., 2010. Degradation kinetics of testosterone by manure-borne bacteria: Influence of temperature, pH, glucose amendments, and dissolved oxygen. *J. Environ. Qual.* 39, 1153–1160.
- Yang, Y.-Y., Pereyra, L.P., Young, R.B., Reardon, K.F., Borch, T., 2011. Testosterone-mineralizing culture enriched from swine manure: Characterization of degradation pathways and microbial community composition. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6879–6886.
- You, J., Harwood, A.D., Li, H., Lydy, M.J., 2011. Chemical techniques for assessing bioavailability of sediment-associated contaminants: SPME versus Tenax extraction. *J. Environ. Monit.* 13, 792–800.
- Zhang, T., Yu, G., Wang, B., Fiedler, H., Huang, J., Deng, S., 2009. Bioanalytical characterization of dioxin-like activity in sewage sludge from Beijing, China. *Chemosphere* 75, 649–653.
- Zhou, C.C., Huang, X., Ford, K.L., Hollis, L.S., 2005. Isolation and identification of a novel impurity of erythromycin A 9-oxime desosaminehydrazinium salt. *J. Antibiot. (Tokyo)* 58, 539–544.

Annexes

ANNEXE I

Annexe I : Listes des échantillons collectés dans le cadre de l'étude des eaux de STEP et conditions de prélèvement.

STEP	Prélèvement			Date
	Nature	Type	Matériels	
Clos de Hilde	Entrée/sortie	Moyenné sur 24h (flow proportionnel)	HDPE	Mai 2011 and Avril 2012, Mai 2012, Janvier 2013
Louis Fargue	Entrée/sortie	24 h composite samples (flow proportionnel)	HDPE	Mai 2011
Biganos	Entrée/sortie	24 h composite samples (flow proportionnel)	HDPE (entrée)/	Mai 2011
Laouga	Exutoire de 5 STEP	24 h composite samples (flow proportionnel)	Bouteille en verre (sortie)	Mai 2011
Trelissac	Entrée/sortie	Point-source (4:45 pm)	Bouteille en verre	Mai 2011
Saltgourde	Entrée/sortie	Point-source (4 pm)	HDPE	Mai 2011
Le Havre	Entrée/sortie	24 h composite samples (flow proportionnel)	HDPE	Mai 2011
Tancarville	Entrée/sortie	Point-source (10:15 am)	HDPE	Mai 2011
Elbeuf	Entrée/sortie	Point-source (10:15 am)	HDPE	Mai 2011
Rouen	Entrée/sortie	Point-source (8:45 am)	HDPE	Mai 2011

STEP, station d'épuration, HDPE, bouteille en polyéthylène haute densité

ANNEXE II

Annexe II : Conditions chromatographiques pour l'analyse des HAP.

Éléments	Paramètres GC-MS ¹	Paramètres GC-MS/MS
Colonne	HP5-MS (Agilent technologies, France) 5 % Phényl- 95 % Méthyl-siloxane (30 m x 250 µm x 0,25 µm)	HP5-MS (Agilent technologies, France) 5 % Phényl- 95 % Méthyl- siloxane (30 m x 250 µm x 0,25 µm)
Source / énergie	Impact électronique / 70 ev	Impact électronique / 70 ev
Mode d'injection /Température/ débit de purge	Sans division pulsé / 280°C/ 60 mL.min ⁻¹ pendant 1 min	Sans division pulsé / 280°C/ 60 mL.min ⁻¹ pendant 1 min
Volume d'injection	1 µL	1 µL
Gaz vecteur	Hélium (99,99990%)	Hélium (99,99990%)
Débit	1,3 mL.min ⁻¹	1,3 mL.min ⁻¹
Gaz de cellule de collision	-	Azote (99,9990%)
Débit des gaz de la cellule collision	-	Hélium (99,99990%) Azote : 1,5 mL.min ⁻¹
Gradient de température	50 C pendant 2 min , 10°C.min ⁻¹ jusqu'à 250 C, 2°C.min-1 jusqu'à 280°C, puis 10°C.min ⁻¹ jusqu'à 310 C maintenu durant 10 min	Hélium : 25 mL.min ⁻¹ 50 C pendant 2 min puis 10°C.min ⁻¹ jusqu'à 310 C maintenu durant 5 min
Temps d'acquisition	52 min	33 min

¹(Bijoux,

2014)

AnnexeII : Limites de quantification instrumentales extrapolées des HAP ciblés.

Composés	Étalons internes	Ion de quantification (<i>m/z</i>)	GC-MS
			LQ (pg injecté)
naphtalène	naphtalène-d8	128	0,93
acénaphthylène	phénanthrène-d10	152	0,67
acénaphène	phénanthrène-d10	154	1,21
fluorène	phénanthrène-d10	166	0,69
dibenzothiophène	dibenzothiophène-d8	184	nd
phénanthrène	phénanthrène-d10	178	0,71
anthracène	anthracène-d10	178	0,72
fluoranthène	fluoranthène-d10	202	0,30
pyrène	fluoranthène-d10	202	0,29
benzo[a]anthracène	chrysène-d12	228	0,32
triphenylène + chrysène	chrysène-d12	228	0,33
benzo[b]naphato(1,2-d)thiophène	chrysène-d12	252	nd
benzo[b,j,k]fluoranthène	benzo[e]pyrène-d12	252	1,82
benzo[e]pyrène	benzo[e]pyrène-d12	252	1,06
benzo[a]pyrène	benzo[a]pyrène-d10	252	1,34
pérylène	benzo[a]pyrène-d10	252	nd
indeno(1,2,3-cd)pyrène	benzo[g,h,i]pérylène-d12	276	2,23
dibenzo[a,h]anthracène	benzo[g,h,i]pérylène-d12	276	1,41
benzo[g,h,i]pérylène	benzo[g,h,i]pérylène-d12	278	2,44

LQ : limite de quantification instrumentale extrapolée (Rapport signal/bruit = 9, n=3) ; nd : « non déterminé ».

ANNEXE III

Annexe III : Conditions chromatographiques pour l'analyse des POP.

Éléments	Paramètres en GC-ECD ¹	Paramètres en GC-ECD ²
Colonne	HP5-MS (Agilent technologies, Massy, France) 5 % Phényle- 95 % Méthyle-siloxane (30 m x 250 µm x 0,25 µm)	HP5-MS (Agilent technologies, Massy, France) 5 % Phényle- 95 % Méthyle-siloxane (60 m x 250 µm x 0,25 µm)
Mode d'injection /Température/ débit de purge	Sans division pulsé / 280°C / 60 mL.min ⁻¹ pendant 1 min	Sans division pulsé / 280°C / 60 mL.min ⁻¹ pendant 1 min
Volume d'injection	1 µL	1 µL
Gaz vecteur	(Hélium 99.9996%)	Hélium (99.9996%)
Débit	1,1 mL.min ⁻¹	1,3 mL.min ⁻¹
Gradient de température	Température initial 80°C pendant 2 min, 5°C.min ⁻¹ jusqu'à 320°C maintenu pendant 5 min	Température initial 80°C pendant 2 min, 2°C.min ⁻¹ jusqu'à 280°C
Température du détecteur	320°C	300°C
Temps d'acquisition	55 min	102 min

¹GC-ECD (Agilent technologies, série G 1530 A pour la GC, série G 2397 A pour le détecteur) utilisé pour l'analyse des lisiers porcins.

²GC-ECD (Agilent technologies, série G 1530 N pour la GC, série G 2397 A pour le détecteur) utilisé pour l'analyse des boues de STEP.

Annexe III : Limites de quantification des POP analysés par GC-ECD.

Famille	Composés	Étalons internes	LQ ¹ (pg injecté)
Polychlorobiphényle	PCB 8	PCB 30	nd
	PCB 18	PCB 30	nd
	PCB 29	PCB 30	nd
	PCB 50	PCB 30	0,08
	PCB 28	PCB 30	0,07
	PCB 52	PCB 30	0,09
	PCB 104	PCB 103	nd
	PCB 44	PCB 30	nd
	PCB 66	PCB 30	nd
	PCB 101	PCB 103	0,10
	PCB 87	PCB 103	nd
	PCB 77	PCB 103	nd
	PCB 154 (+ 2,4' DDD)	PCB 155	nd
	PCB 118	PCB 103	0,09
	PCB 188	PCB 198	nd
	PCB 153	PCB 155	0,09
	PCB 105	PCB 103	nd
	PCB 138	PCB 155	0,08
	PCB 126	PCB 155	nd
	PCB 187	PCB 198	nd
	PCB 128	PCB 155	nd
	PCB 201	PCB 198	nd
	PCB 180	PCB 198	nd
	PCB 170	PCB 155	nd
PCB 195	PCB 198	nd	
PCB 206	PCB 198	nd	
PCB 209	PCB 198	nd	
Pesticides organochlorés	Hexachlorobenzène	4,4'-DDT-d8	0,03
	Lindane	4,4'-DDT-d8	nd
	Heptachlor	4,4'-DDT-d8	0,07
	Aldrin	4,4'-DDT-d8	nd
	Heptachlore-époxyde	4,4'-DDT-d8	0,06
	2,4'-DDE	4,4'-DDT-d8	0,09
	Cis- α -chlordanes	4,4'-DDT-d8	0,06
	Trans- γ -chlordanes	4,4'-DDT-d8	0,06
	Dieldrin	4,4'-DDT-d8	nd
	4,4' DDE	4,4'-DDT-d8	0,15
	2,4'-DDD (+ PCB 154)	4,4'-DDT-d8	0,07
	Mirex	4,4'-DDT-d8	0,09
	2,4'-DDT	4,4'-DDT-d8	0,22
4,4'-DDT	4,4'-DDT-d8	0,26	
PBDE	PBDE 47	PCB 198	1,38
	PBDE 99	PCB 198	1,47
	PBDE 119	PCB 198	1,47
	PBDE 153	PCB 198	1,57

¹GC-ECD (Agilent technologies, série 6890 N pour la GC, série G 2397 A pour le détecteur) utilisé pour l'analyse des boues de STEP. PCB, polychlorobiphényle ; DDE, dichlorodiphényldichloroéthylène ; DDD, dichlorodiphényldichloroéthane ; DDT, dichlorodiphényltrichloroéthane ; PBDE, polybromodiphényléther ; LQ, limite de quantification instrumentale (Rapport signal/bruit = 9) ; nd : « non déterminé ».

ANNEXE IV

Annexe IV : Conditions chromatographiques pour l'analyse des antibiotiques (Capdeville, 2011).

Éléments	Conditions d'analyse en mode d'ionisation positif		Conditions d'analyse en mode d'ionisation négatif	
Colonne	Zorbax [®] SB C18 (100 x 2,1 mm, 1,8 µm)		Zorbax [®] SB C18 (50 x 2,1 mm, 1,8 µm)	
Température de la colonne	30°C		30°C	
Source	ESI		ESI	
Température du gaz de désolvatation	300°C		300°C	
Débit du gaz de désolvatation	11 L.min ⁻¹		11 L.min ⁻¹	
Pression de nébulisation	30 psi		30 psi	
Tension du capillaire	3000 V		3000 V	
Solvant d'injection	Eau ultra-pure/Acétonitrile (90 :10, v : v)		Eau ultra-pure/Acétonitrile (90 :10, v : v)	
Volume d'injection	5 µL		5 µL	
Phase éluante	A : Eau ultra-pure + 0,3% acide formique B : Acétonitrile + 0,3% acide formique		A : Eau ultra-pure + 0,1% acide acétique B : Acétonitrile + 0,1% acide acétique	
Gradient d'élution	Temps (min)	% B	Temps (min)	% B
	0	5	0	10
	25	50	5	48
	29,2	60	5,5	95
	30	95	8,5	95
	35	95	9	100
	35,5	0	12	100
	40,5	0	12,5	10
	41	5	18	10
50	5			
Débit	0,4 mL.min ⁻¹		0,6 mL.min ⁻¹	
Temps d'acquisition	50 min		18 min	

ESI, *ElectroSpray ionisation*

Annexe IV : Limites de quantification instrumentales extrapolées des antibiotiques analysés par LC-MS/MS.

Polarité	Composés	Étalons internes	Ion précurseur	LQ (pg injecté)
Positive	abacavir	abacavir d4	287,1	23,90
	acide oxolinique	ofloxacin-d3	262,1	10,39
	acide pipémidique	ofloxacin-d3	304,2	424,87
	amoxicilline	amoxicilline-13C6	366,1	65,81
	ampicilline	ampicilline-15N1	350,1	8,49
	atenolol	atenolol-d7	267,1	23,03
	azithromycine	clarithromycine-d3	375,4	2,99
	bacitracine	<i>étalonnage externe</i>	712	161,31
	bisoprolol	propranolol-d7	326,2	5,47
	cefotaxime	ampicilline-15N	456,2	13,97
	cefpodoxime	ampicilline-15N	558,1	6,17
	ceftiofur	ampicilline-15N	524	15,79
	chlortétracycline	tétracycline-d6	479,1	87,25
	ciprofloxacine	ciprofloxacine d8	332,1	359,27
	ciprofloxacine	ciprofloxacine 13C2-15N	332,1	359,27
	clarithromycine	clarithromycine-d3	748,5	3,17
	clindamycine	lincomycine-d3	425,3	0,57
	cyclophosphamide	cyclophosphamide d4	261,1	72,93
	daunorubicine	<i>étalonnage externe</i>	528,1	16,75
	docetaxel	<i>étalonnage externe</i>	527,1	43,01
	doxorubicine	<i>étalonnage externe</i>	544,1	28,28
	doxycycline	tétracycline-d6	445,2	566,44
	enrofloxacin	ofloxacin-d3	360,3	18,11
	épirubicine	<i>étalonnage externe</i>	544,1	41,45
	érythromycine	érythromycine 13C2	734,5	9,46
	fluméquine	fluméquine 13C13	262,1	87,26
	gemcitabine	<i>étalonnage externe</i>	264	10,35
	ifosfamide	ifosfamide d4	261,1	101,23
	indinavir	Indinavir d6	307,7	3,82
	josamycine	clarithromycine-d3	828,4	56,76
	lamivudine	lamivudine 15N2-13C	230	4,05
	lincomycine	lincomycine-d3	407,2	2,68
marbofloxacine	ofloxacin-d3	363,1	5,43	
methotrexate	méthotrexate d3	455,1	58,32	
metoprolol	propranolol-d7	268,1	5,95	

Polarité	Composés	Étalons internes	Ion précurseur	LQ (pg injecté)
Positive	métronidazole	métronidazole d4	172	7,09
	monensine	<i>étalonnage externe</i>	693,3	2,92
	nelfinavir	<i>étalonnage externe</i>	568,2	2,60
	nevirapine	nevirapine d3	267,1	3,60
	norfloxacin	norfloxacin-d5	320,2	476,39
	ofloxacin	ofloxacin-d3	362,1	6,94
	oxytétracycline	tétracycline-d6	461,1	107,53
	propranolol	propranolol-d7	260,1	3,39
	rifampicine	<i>étalonnage externe</i>	823,4	33,00
	ritonavir	<i>étalonnage externe</i>	721,2	11,68
	roxithromycine	clarithromycine-d3	837,5	3,21
	salinomycine	<i>étalonnage externe</i>	773,4	15,16
	saquinavir	<i>étalonnage externe</i>	336,3	2,66
	sildenafil	sildenafil-d3	238,1	12,32
	sotalol	propranolol-d7	273,1	10,60
	spiramycine	clarithromycine-d3	422,4	6,36
	stavudine	<i>étalonnage externe</i>	127	238,12
	sulfadiazine	sulfadiazine-13C6	251,1	6,27
	sulfadiméthoxine	sulfadiméthoxine-d6	311,1	1,31
	sulfamérazine	sulfaméthazine-13C6	265,2	5,79
	sulfaméthazine	sulfaméthazine-13C6	279,1	6,79
	sulfaméthizole	sulfaméthazine-13C6	271	4,20
	sulfaméthoxazole	sulfaméthoxazole-13C6	254,1	10,20
	sulfanilamide	sulfaméthazine-13C6	173	75,88
	sulfapyridine	sulfapyridine-d4	250	40,60
	sulfathiazole	sulfaméthazine-13C6	256	11,50
	tamoxifen	tamoxifen-d5	372,2	14,42
	tétracycline	tétracycline-d6	445,1	56,03
	timolol	propranolol-d7	317,1	2,69
	triméthoprim	triméthoprim-13C3	291,1	23,09
triméthoprim	sulfaméthazine-13C6	291,1	37,23	
tylosine	clarithromycine-d3	916,5	10,76	
virginiamycine	<i>étalonnage externe</i>	526,2	9,07	
Négative	acide fusidique	<i>étalonnage externe</i>	515,4	11,6
	cefalexine	penicilline G-d7	346,2	132,2
	cefuroxime	penicilline G-d7	423	46,9
	chloramphénicol	chloramphénicol-d5	321	33,7
	cloxacilline	penicilline G-d7	434	3,2
	dicloxacilline	penicilline G-d7	468	9,1

Polarité	Composés	Etalons internes	Ion précurseur	LQ (pg injecté)
Négative	oxacilline	penicilline G-d7	400	7,7
	pénicilline G	penicilline G-d7	333	9,2
	pénicilline V	penicilline G-d7	349	6,8
	thiamphénicol	chloramphénicol-d5	354	20,7
	zidovudine	zidovudine D3	266	9,9

LQ, limite de quantification instrumentale extrapolée (Rapport signal/bruit = 9, n=2).

ANNEXE V

Annexe V : Conditions chromatographiques pour l'analyse des stéroïdes en ULPC-MS/MS.

Éléments	Conditions d'analyse en mode d'ionisation positif	
Colonne	Kinetex [®] C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	
Température de la colonne	35°C	
Source	ESI mode d'ionisation positif	
Température du gaz de désolvation	400°C	
Débit du gaz de désolvation	800 L.h ⁻¹	
Tension du capillaire	3500 V	
Solvant d'injection	100% Méthanol	
Volume d'injection	5 µL	
Phase éluante	A : Eau ultra-pure + 0,1% acide formique B : Acétonitrile + 0,1% acide formique	
Gradient d'élution	Temps (min)	% B
	0	20
	11	40
	15	100
	15,5	100
	16	20
18	20	
Débit	0,6 mL.min ⁻¹	
Temps d'acquisition	18 min	

Conditions chromatographiques pour l'analyse des œstrogènes en LC-MS/MS.

Éléments	Conditions d'analyse en mode d'ionisation positif	
Colonne	Kinetex [®] C18 (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	
Température de la colonne	30°C	
Source	ESI mode d'ionisation négatif	
Température du gaz de désolvation	300°C	
Débit du gaz de désolvation	11 L.min ⁻¹	
Tension du capillaire	3000 V	
Solvant d'injection	90/10 eau/acétonitrile	
Volume d'injection	5 µL	
Phase éluante	A : Eau ultra-pure + 0,1% acide formique B : Acétonitrile + 0,1% acide formique	
Gradient d'élution	Temps (min)	% B
	0	10
	5,5	100
	6	100
	6,5	10
	9	10
Débit	0,6 mL.min ⁻¹	
Temps d'acquisition	9 min	

Paramètres de détection du spectromètre de masse pour l'analyse des stéroïdes.

Composés	Transition de quantification	Énergie de collision (V)	Transition de confirmation	Énergie de collision (V)	Tension du cône ou du fragmentor (V)
11-Cétotestostérone	303.2>121	25	303.2>259.3	23	28
17β-Œstradiol-d4	259.2>160.9	22			25
17α-Ethinylœstradiol-d4	283.3>134.9	20			25
11α-Hydroxyprogestérone	331.3>109	30	331.3>96.9	25	35
17α-Hydroxy-20β-dihydroprogestérone	333.2>96.9	28	333.2>108.9	35	35
17α-Hydroxyprégnénone	315.3>297.3	10	315.3>159.1	25	15
17α-Hydroxyprogestérone	331.3>109	30	331.3>96.9	25	35
4-Androstène-3,17-dione	287.2>96.8	22	287.2>108.9	25	35
5α-Dihydrotestostérone	291.2>159.1	20	291.2>255.2	22	15
6α-Methyl-prednisolone	375.3>357.3	10	375.3>161.2	20	18
Canrénone	341.2>107.1	30	341.2>187.1	20	35
Cortisone	361.3>163.1	25	361.3>121	28	40
Dexaméthasone	393.3>373.3	8	393.3>355.2	10	15
DHA	289.3>271.4	15	289.3>253	17	28
DHEA	271.1>253.2	15	271.1>159	22	20
Œstrone-d4	275.2>257.3	15			25
Hydrocortisone	363.2>121.1	30	363.2>97.1	25	30
Lévonorgestrel	313.3>108.8	30	313.3>90.8	40	30
Méstranol	293.2>173	20	293.2>146.9	20	30
Noréthindrone	299.2>109	28	299.2>90.8	40	35
Norgéstimate	370.2>124.1	35	370.2>91.1	50	50
Prédnisolone	361.3>343.3	10	361.3>147.2	25	25
Prédnisone	359.3>341.3	12	359.3>147.1	25	25
Prégnénone	299.2>281.3	10	299.2>160.9	15	25
Progestérone	315.3>96.9	25	315.3>108.9	25	35
Progestérone d9	324.3>99.9	25			35
Spirolactone	341.2>107.1	30	341.2>187.1	20	35
Testostérone	289.2>96.2	22	289.2>108.8	25	32
Testostérone-d3	292.2>96.9	23			35
Thiocolchicoside	564.2>402.2	22	564.2>360.3	35	35
17α-Ethinylœstradiol	295>145	52	295>143	60	380
17α-Éthinylœstradiol-d4	299>147	52			380
17β-Œstradiol	271>183.2	50	271>143	60	380
17β-Œstradiol-d4	275>147	50			380
Œstriol	287.2>171	32	287.2>142.9	50	380
Œstriol-d2	289.2>147	50			380
Œstrone	269.1>145	45	269.1>142.9	60	380
Œstrone-d4	273>147	45			380

Annexe V : Limites de quantification instrumentale extrapolées des stéroïdes analysés par UPLC-MS/MS.

Composés	Étalons internes	ion précurseur	LQ (pg injecté)
11-cétotestostérone	téostostérone-d3	303,2	1,5
11 α -hydroxyprogestérone	progestérone d9	331,3	2,4
17 α -hydroxy-20 β -dihydroprogestérone	17 α -éthynylestradiol-d4	333,2	0,8
17 α -hydroxyprégnénolone	œstrone-d4	315,3	2,7
17 α -hydroxyprogestérone	progestérone d9	331,3	0,7
4-androstène-3,17-dione	téostostérone-d3	287,2	1,2
5 α -dihydrotéostostérone	œstrone-d4	291,2	7,2
6 α -méthyl-prednisolone	œstrone-d4	3753	0,9
canrénone	téostostérone-d3	341,2	0,4
cortisone	téostostérone-d3	361,3	0,6
dexaméthasone	17 β -œstradiol-d4	393,3	1,2
DHA	œstrone-d4	289,3	2,5
DHEA	œstrone-d4	271,1	5,8
hydrocortisone	téostostérone-d3	363,2	1,1
lévonorgestrel	17 β -œstradiol-d4	313,3	3,6
mestranol	17 α -éthynylestradiol-d4	293,2	1,7
noréthindrone	téostostérone-d3	299,2	0,5
norgéstimat	téostostérone-d3	370,2	0,1
prednisolone	œstrone-d4	361,3	1,6
prednisone	œstrone-d4	359,3	2,3
prégnénolone	œstrone-d4	299,2	35,2
progestérone	progestérone d9	315,3	0,4
spironolactone	téostostérone-d3	341,2	0,2
téostostérone	téostostérone-d3	289,2	0,3
thiocolchicoside	17 β -œstradiol-d4	564,2	0,7

LQ : limite de quantification instrumentale extrapolées (Rapport signal/bruit = 9, n=3). DHEA : (3 β)-3-hydroxyandrost-5-én-17-one ; DHA : 5 α -androstane-3,17-dione.

ANNEXE VI

Annexe VI : Conditions chromatographiques pour l'analyse des pesticides (Belles, 2012)

Éléments	Conditions d'analyse	
Colonne	Kinetex [®] C18, Phenomenex (100 x 2,1 mm, 1,7 µm)	
Température de la colonne	35°C	
Source	Agilent Jet stream ESI	
Mode d'ionisation	Positif	
Température du gaz de désolvatation	300°C	
Débit du gaz de désolvatation	8 L.min ⁻¹	
Pression de nébulisation	40 psi	
Température du gaz fourreau	400°C	
Débit du gaz fourreau	11 L.min ⁻¹	
Tension du « Nozzle »	300V	
Tension du capillaire	3000 V	
Solvant d'injection	100% Méthanol	
Volume d'injection	5 µL	
Phase éluante	A : Eau ultra-pure + 0,1% d'acide acétique+ 5mM d'acétate d'ammonium B : Méthanol	
Gradient d'élution	Temps (min)	% B
	0	0
	14	100
	15	100
	17	0
	19	0
Débit	0,5 mL.min ⁻¹	
Temps d'acquisition	19 min	

Limites de quantification instrumentales extrapolées des pesticides analysés par LC-MS/MS.

Composés	Étalons internes	Ion précurseur	LQ (pg injecté)
1,2,4-DCPU	diuron-d6	205	0,9
1,3,4-DCPU	diuron-d6	205	2,1
1,3,4,3-DCPMU	diuron-d6	219	2,5
acétochlore	alachlore-d13	270,1	5,5
acétochlore-ESA	alachlore-d13	270,1	8,4
acétochlore-OA	alachlore-d13	220,1	8,1
alachlore	alachlore-d13	270,1	4,9
améthryne	terbuthylazine-d5	228,1	0,1
atrazine	atrazine-d5	216,1	1,2
2-hydroxy-atrazine	terbuthylazine-d5	198,1	1,1
azoxystrobine	carbofuran-d3	404,1	1,6
bentazone	carbofuran-d3	241,1	18,8
carbendazime	carbofuran-d3	192,1	0,4
carbétamide	carbofuran-d3	237,1	1,1
carbofuran	carbofuran-d3	225,1	0,3
carbosulfan	carbofuran-d3	222,1	0,1
chlorotoluron	diuron-d6	213,1	0,3
chlorsulfuron	diuron-d6	358	3,8
cyanazine	hexazinone-d6	241,1	0,4
cyromazine	simazine-d10	167,1	13,5
DEA	atrazine-d5	188,1	0,9
DIA	DIA-d5	174,1	3,9
diflufénican	carbofuran-d3	256,1	0,2
dimétachlore	alachlore-d13	256,1	0,7
diuron	diuron-d6	233	1,1
DMSA	carbofuran-d3	201,1	0,2
DMST	carbofuran-d3	215,1	0,4
flazasulfuron	carbofuran-d3	408,1	1,1
fluazifop-p-butyl	carbofuran-d3	384,1	0,2
flusilazole	carbofuran-d3	316,1	1,8
hexazinone	hexazinone-d6	253,2	1,2
hydroxy-simazine	atrazine-d5	184,1	0,3
imidaclopride	carbofuran-d3	256	3,3
irgarol	irgarol-d9	254,2	0,2
isoproturon	diuron-d6	207,2	0,1
linuron	diuron-d6	249	0,5
métazachlore	alachlore-d13	278,1	0,2
methiocarb	carbofuran-d3	226,1	0,1
s-métolachlore	diuron-d6	284,1	3,6

Composés	Etalons internes	Ion précurseur	LQ (pg injecté)
métolachlore-ESA	carbofuran-d3	352,1	7,0
métolachlore-OA	carbofuran-d3	280,2	9,3
métoxuron	diuron-d6	229,1	0,6
metsulfuron-méthyle	DIA-d5	382,1	1,4
nicosulfuron	diuron-d6	411,1	0,2
prométhryne	irgarol-d9	242,2	0,3
propachlore	alachlore-d13	212,1	1,4
propazine	terbuthylazine-d5	230,1	0,9
propiconazole	carbofuran-d3	342,1	3,3
prosulfuron	carbofuran-d3	420,1	2,0
pyméthrozine	terbuthylazine-d5	218,1	0,4
quizalofop-éthyle	carbofuran-d3	373,1	0,9
quizalofop-p-téfuryl	carbofuran-d3	429,1	0,6
simazine	simazine-d10	202,1	4,1
terbuthryne	terbuthylazine-d5	242,2	3,2
terbuthylazine	terbuthylazine-d5	230,1	0,8
terbutylazine déséthyle	simazine-d10	202,1	1,1
thiaméthoxan	carbofuran-d3	292	1,2

LQ : limite de quantification instrumentale extrapolée (Ratio signal/bruit = 9, n=3). 1,2,4-DCPU : 1,2,4-dichloro-phénylurée ; 1,3,4-DCPU : 1,3,4-dichloro-phénylurée ; 1,3,4,3-DCPMU : 1-(3,4 dichlorophényl)-3-méthylurée ; acétochlore-ESA : acétochlore-éthanesulfonic acide ; acétochlore-OA : acétochlore-oxanilic acide ; DEA : déséthyl-atrazine ; DIA : désisopropyl-atrazine ; DMSA : diméthylaminosulfanilide ; DMST : N,N-diméthyl-N'-p-tolylsulfamide ; métolachlore-ESA : métolachlore- éthanesulfonic acide ; métolachlore-OA : métolachlore-oxanilic acide ; LQ : limite de quantification instrumentale (Rapport signal/bruit = 9, n=3).