



# La démarche EDA

*(effect directed analysis – l'analyse dirigée par l'effet)*

**Couplage entre bioessais *in vitro* et méthodes physico-chimiques pour identifier les micropolluants responsables de l'activité biologique**

Nicolas Creusot

**INERIS** : N. Creusot, S. Aït-Aïssa, E. Maillot-Maréchal

**Université de Bordeaux** : H. Budzinski, M.H. Devier, C. Gardia-Parege

**Irstea** : F. Serveto, M.J. Capdeville, C. Miège



# Lexique

- ER: récepteur des oestrogènes
- PXR: récepteur des pregnanes
- AR: récepteur des androgènes
- GR: récepteur des glucocorticoïdes
- AhR: récepteur de la dioxine
- PR: récepteur des progestagènes
- MR: récepteur des minéralocortocoides



Comprendre le monde,  
construire l'avenir®



maîtriser le risque  
pour un développement durable



# Contexte ECHIBIOTEB

**Effluents urbains = source ponctuelle de contaminants**

Diversité des classes chimiques (+ produits de transfo.)

Risque potentiel pour l'Homme et les écosystèmes aquatiques

→ **Besoin d'éliminer ces composés**



*Les procédés de traitements conventionnels et les méthodes pour évaluer leur efficacité sont insuffisants...*



**Traitements complémentaires  
(ozonation, charbon actif ...)**



**Nouvelles méthodes  
d'évaluation  
(Effet ? Danger ? Identité ?)**



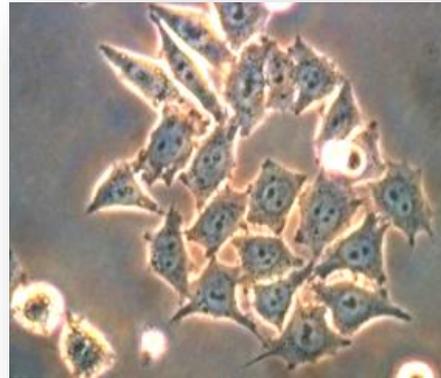
# Contexte méthodologique

## Analyses chimiques (ciblées)



- (+) Sensible, sélective et quantitative
- (-) coût élevé
- (-) Non-intégrateur (ciblées)
- (-) pas d'effet de mélange

## Bioessais *in vitro* (bio-analytique)



- (+) Sensible, spécifique, intégrateur et quantitative (Bio-TEQ)
- (-) Pharmacocinétique ?
- (-) Identité des composés ?

## Bioessais *in vivo* (écotox)

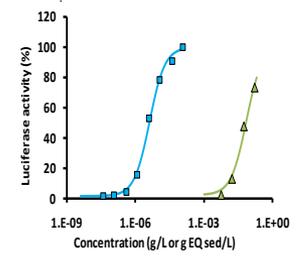
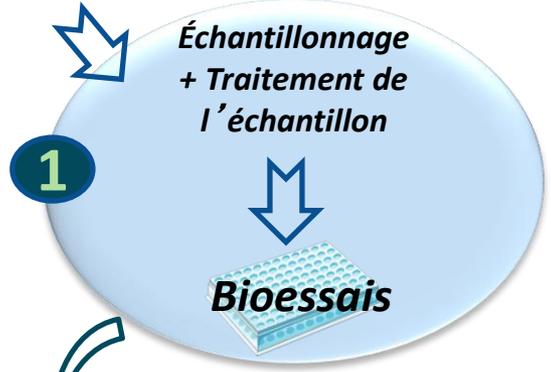


- (+) Intégrateur et pertinence (éco)tox
- (-) non spécifique
- (-) pas d'info sur effet long terme et mécanisme d'action
- (-) identité ?

Approche bio-analytique = identifier la cause de l'activité/effet

# Démarche bio-analytique - EDA

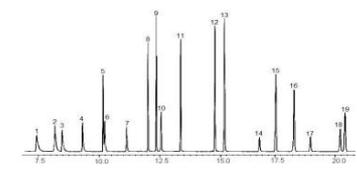
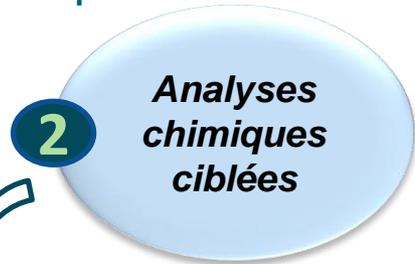
## Extrait environnemental



**Diagnostic de la qualité chimique basé sur le mécanisme d'action/effet**

Profilage toxicologique  
(quantification bio. Bio-TEQ)

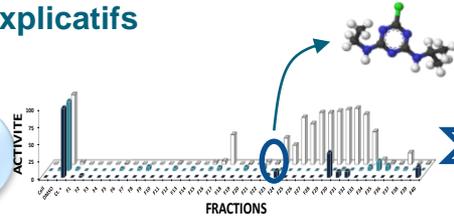
Identité des polluants actifs ?



Quantification chimique  
(Chem-TEQ)

**Contribution des polluants actifs connus**

Si polluants recherchés faiblement explicatifs



Analyses non ciblées  
(HR-MS)

**Identification de polluants (in)connus**



# L'analyse dirigée par l'effet ou comment décrypter l'effet « cocktail » dans l'environnement

Effet du mélange environnemental  
(cellule – tissu – individu - population)



Réduction de la complexité du mélange – Décomposition de l'effet

Isolement et Identification des composés actifs

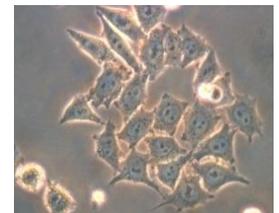


composés seuls

Mélange reconstitué

Confirmation et/ou évaluation des effets

Décryptage des mécanismes sous-jacents



# L'analyse dirigée par l'effet ou comment décrypter l'effet « cocktail » dans l'environnement

Effet du mélange environnemental  
(cellule – tissu – individu - population)



Rédu

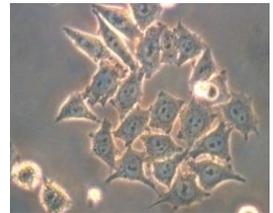
l'effet

Faire le lien de causalité  
entre contaminants et  
réponses biologiques !



Confirmation et/ou évaluation des effets

Décryptage des mécanismes sous-jacents



# Domaines d'application

## ➤ *Pollution du milieu naturel*

- ✓ Source et devenir de la contamination
- ✓ Identification de sites fortement contaminés
- ✓ Identification de nouveaux polluants



## ➤ *Traitement de l'eau*

- ✓ Efficacité de l'épuration
- ✓ Performance de pilotes
- ✓ Qualité rejets
- ✓ Identification de produits de transformation



➔ **Nouvelles stratégies de surveillance** pour l'acquisition de données sur l'occurrence, l'identité et les effets (éco)toxicologiques des PE (et d'autres...)

# Exemple d'application

## Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling

Nicolas Creusot,<sup>†,‡</sup> Selim Aït-Aïssa,<sup>\*,†</sup> Nathalie Tapie,<sup>‡</sup> Patrick Pardon,<sup>‡</sup> François Brion,<sup>†</sup> Wilfried Sanchez,<sup>†</sup> Eric Thybaud,<sup>§</sup> Jean-Marc Porcher,<sup>†</sup> and Hélène Budzinski<sup>‡</sup>

<sup>†</sup>Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité Ecotoxicologie in vitro et in vivo, Parc ALATA, BP2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France

<sup>‡</sup>EPOC/LPTC, Université Bordeaux 1 – UMR 5805 CNRS, F-33405 Talence, France

<sup>§</sup>Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), P  le Dangers et Impacts sur le Vivant, Parc ALATA, BP2, F-60550 Verneuil-en-Halatte, France

### Supporting Information

**ABSTRACT:** A bioanalytical approach was used to identify chemical contaminants at river sites located downstream from a pharmaceutical factory, where reproductive alterations in wild fish have been previously observed. By using polar organic compound integrative samplers (POCIS) at upstream and downstream sites, biological activity profiles based on in vitro bioassays revealed the occurrence of xenobiotic and steroid-like activities, including very high glucocorticoid, antimineralocorticoid, progestogenic and pregnane X receptor (PXR)-like activities ( $\mu\text{g}$  standard-EQ/g of sorbent range), and weak estrogenic activity (ng E2-EQ/g of sorbent range). Chemical analyses detected up to 60 out of 118 targeted steroid and pharmaceutical compounds in the extracts. In vitro profiling of occurring individual chemicals revealed the ability of several ones to act as agonist and/or antagonist of different steroids receptors. Mass balance calculation identified dexamethasone, spironolactone, and 6- $\alpha$ -methylprednisolone as major contributors to corticosteroid activities and levonorgestrel as the main contributor to progestogenic activities. Finally, RP-HPLC based fractionation of POCIS extracts and testing activity of fractions confirmed identified compounds and further revealed the presence of other unknown active chemicals. This study is one of the first to report environmental contamination by such chemicals; their possible contribution to in situ effects on fish at the same site is suggested.



# Exemple d'application

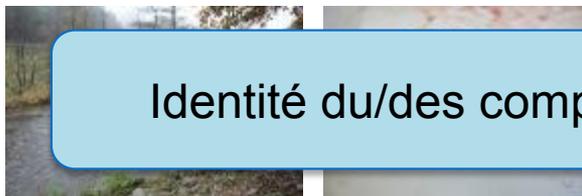
**Observations  
terrain**



**Dégradation de l' assemblage piscicole  
Hypertrophie gonades  
Incapacité de ponte**

# Exemple d'application

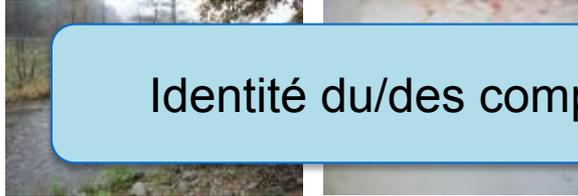
**Observations  
terrain**



Identité du/des composés ? Mécanismes d'action ?

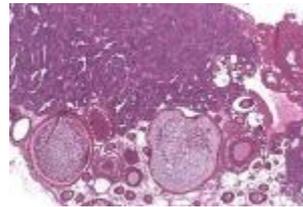
# Exemple d'application

**Observations  
terrain**



Identité du/des composés ? Mécanismes d'action ?

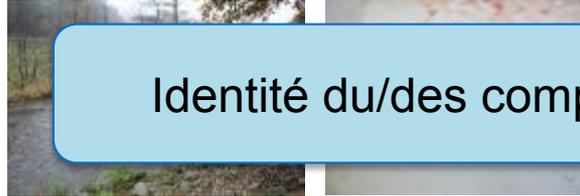
**Biomarqueurs  
biochimique et  
histologique**



**Intersexualité + induction de synthèse de vitellogénine  
(marqueur de féminisation), Sanchez et al. 2011**

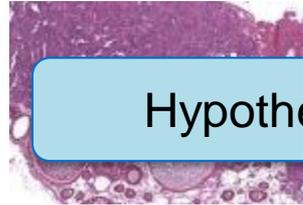
# Exemple d'application

## Observations terrain



Identité du/des composés ? Mécanismes d'action ?

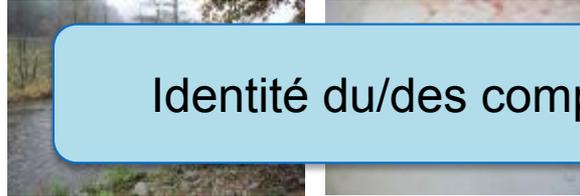
## Biomarqueurs biochimique et histologique



Hypothèse : VTG + intersex  $\rightarrow$  xéno-œstrogènes ?

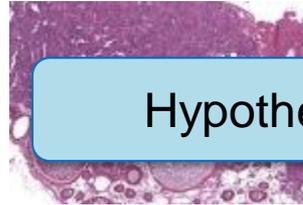
# Exemple d'application

## Observations terrain



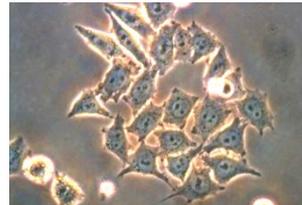
Identité du/des composés ? Mécanismes d'action ?

## Biomarqueurs biochimique et histologique



Hypothèse : VTG + intersex  $\rightarrow$  xéno-œstrogènes ?

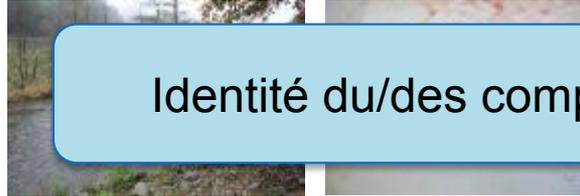
## Outils bio- analytiques in vitro



Détection dans la fraction biodisponible de l'eau de surface (POCIS) de composés interagissant avec les récepteurs GR, MR, PR, PXR, et ER

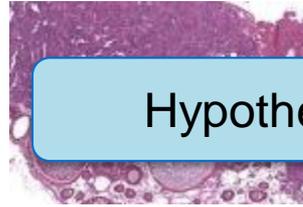
# Exemple d'application

## Observations terrain



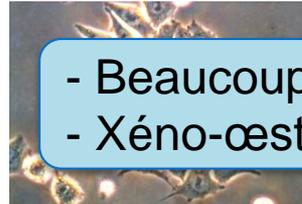
Identité du/des composés ? Mécanismes d'action ?

## Biomarqueurs biochimique et histologique



Hypothèse : VTG + intersex  $\rightarrow$  xéno-œstrogènes ?

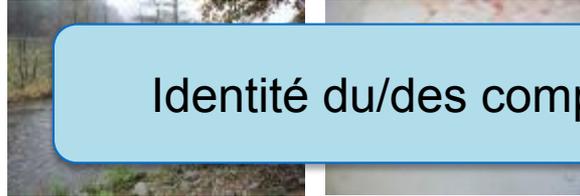
## Outils bio- analytiques in vitro



- Beaucoup de voies de signalisation impliquées
- Xéno-œstrogènes, seuls, n'expliquent pas le phénotype

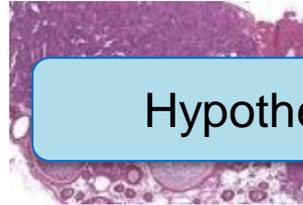
# Exemple d'application

## Observations terrains



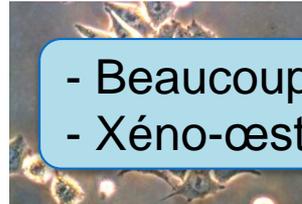
Identité du/des composés ? Mécanismes d'action ?

## Biomarqueurs biochimique et histologique



Hypothèse : VTG + intersex  $\rightarrow$  xéno-œstrogènes ?

## Outils bio-analytiques in vitro



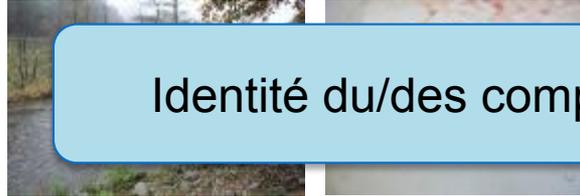
- Beaucoup de voies de signalisation impliquées
- Xéno-œstrogènes, seuls, n'expliquent pas le phénotype

## Fractionnement = Réduction de la complexité

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
ER	■				■								■																
PXR																			■					■	■				
GR							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■								
PR							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■							
a.MR							■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■							
MR						■		■																					

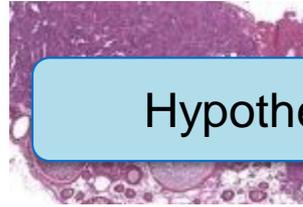
# Exemple d'application

## Observations terrains



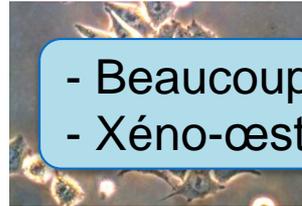
Identité du/des composés ? Mécanismes d'action ?

## Biomarqueurs biochimique et histologique



Hypothèse : VTG + intersex  $\rightarrow$  xéno-œstrogènes ?

## Outils bio-analytiques in vitro



- Beaucoup de voies de signalisation impliquées
- Xéno-œstrogènes, seuls, n'expliquent pas le phénotype

## Fractionnement = Réduction de la complexité

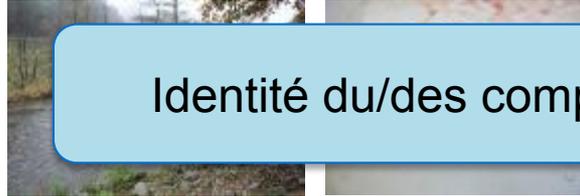
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
EP																														
PX																														
G																														
P																														
a.M																														
MR																														

Réduction des interactions  
 Décomposition de la réponse biologique  
 Isolement des PE responsables de cette réponse



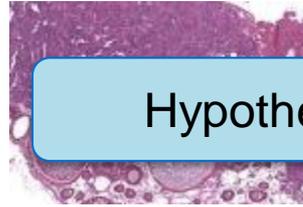
# Exemple d'application

## Observations terrains



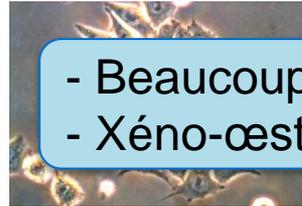
Identité du/des composés ? Mécanismes d'action ?

## Biomarqueurs biochimique et histologique



Hypothèse : VTG + intersex → xéno-œstrogènes ?

## Outils bio-analytiques in vitro



- Beaucoup de voies de signalisation impliquées
- Xéno-œstrogènes, seuls, n'expliquent pas le phénotype

## Fractionnement = Réduction de la complexité

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
EP																														
PX																														
G																														
P																														
a.M																														
MR																														

Réduction des interactions  
 Décomposition de la réponse biologique  
 Isolement des PE responsables de cette réponse

Identification des PE : cortico-stéroïdes, progestatifs → Confirmation de l'effet biologique ...

# Mise en œuvre dans ECHIBIOTEB



Quantifier une concentration en micropolluants pré-ciblés *a priori*



Identifier *a posteriori* de nouveaux micropolluants et produits de dégradation



Mesurer une activité biologique cellulaire ou microbienne (perturbateur endocrinien, dioxin-like, cytotoxicité, ...)

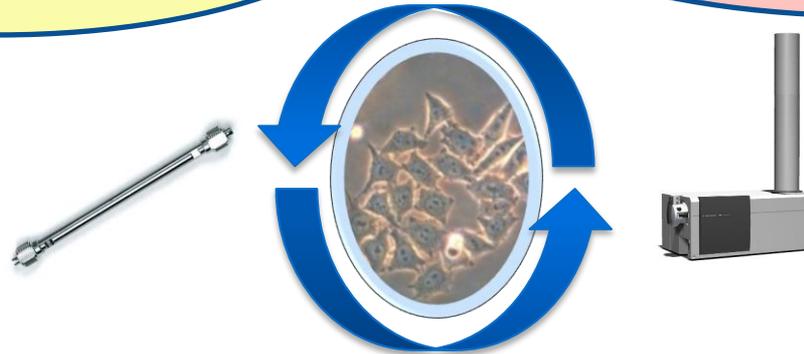
# Mise en œuvre dans ECHIBIOTEB



Quantifier une concentration en micropolluants pré-ciblés *a priori*



Identifier *a posteriori* de nouveaux micropolluants et produits de dégradation



**L'EDA = Faire le lien entre micropolluants et l'activité biologique détectée**



Mesurer une activité biologique cellulaire ou microbienne (perturbateur endocrinien, dioxin-like, cytotoxicité, ...)

# Mise en œuvre dans ECHIBIOTEB



Quantifier une concentration en micropolluants pré-ciblés *a priori*



Identifier *a posteriori* de nouveaux micropolluants et produits de dégradation



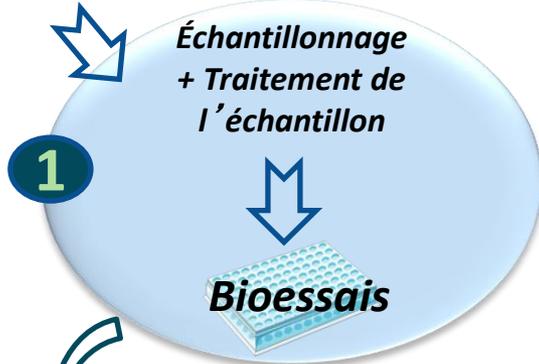
**L'EDA = Faire le lien entre micropolluants et l'activité biologique détectée**



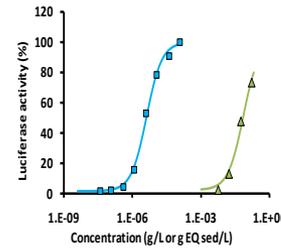
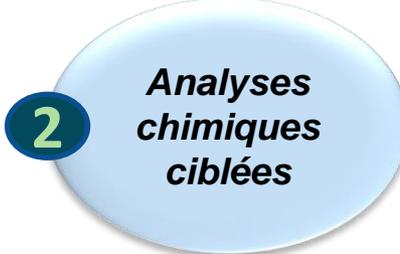
Mesurer une activité biologique cellulaire ou microbienne (perturbateur endocrinien, dioxin-like, cytotoxicité, ...)

# Démarche bio-analytique - EDA

## Extrait environnemental



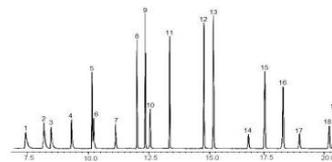
Identité des polluants actifs ?



Profilage toxicologique  
(quantification bio.  
Bio-TEQ)



**Diagnostic de la qualité chimique basé sur le mécanisme d'action/effet**

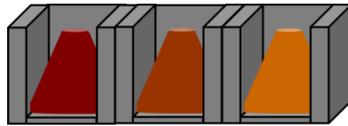


Quantification chimique  
(Chem-TEQ)

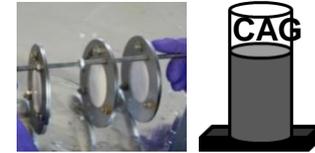


**Contribution des polluants actifs connus**

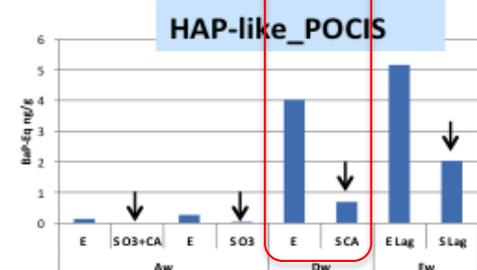
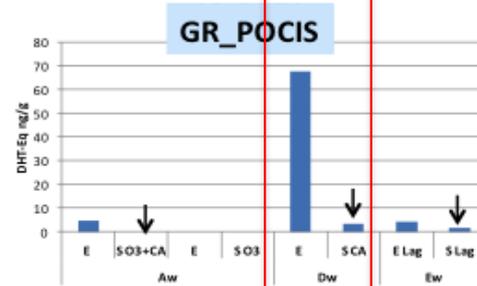
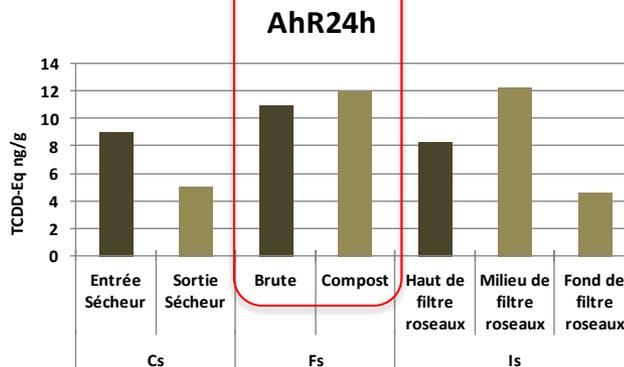
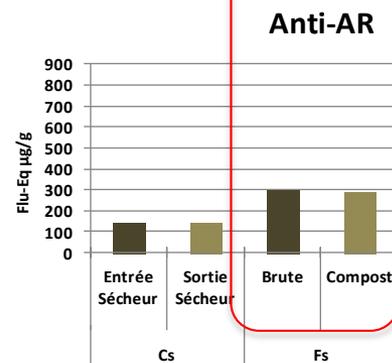
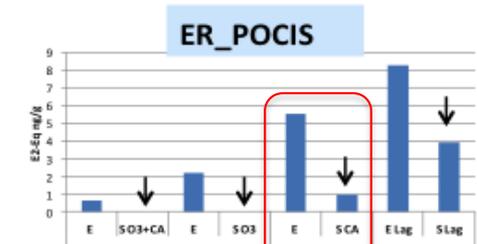
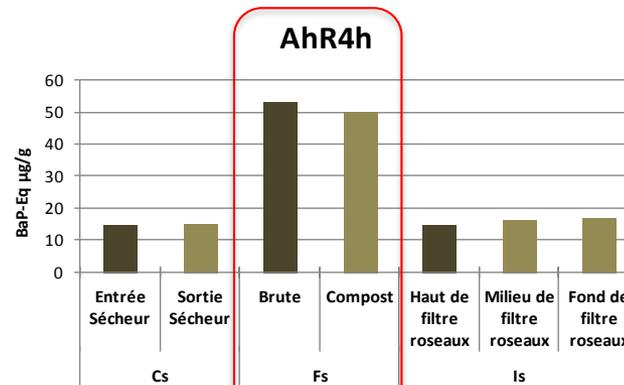
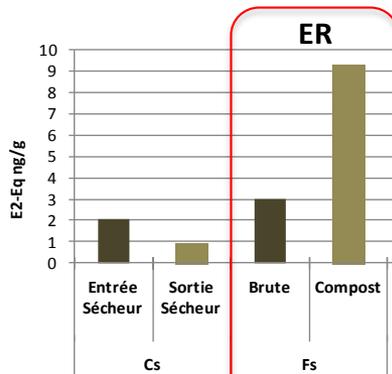
# Profilage toxicologique



**BOUE - COMPOST**

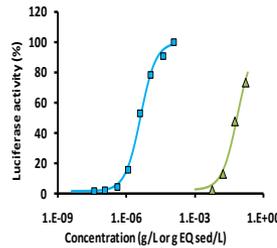
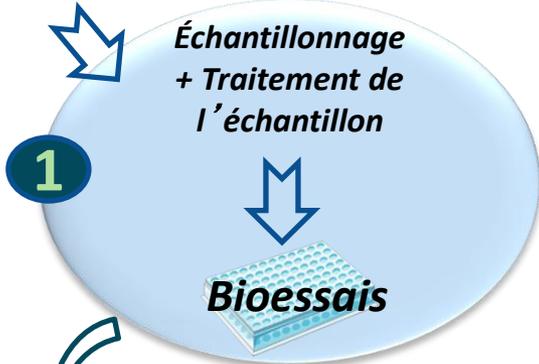


**POCIS - CAG**



# Démarche bio-analytique - EDA

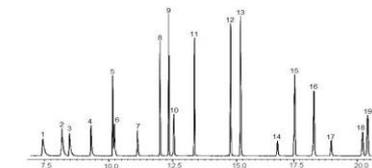
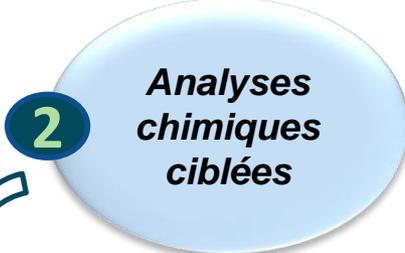
Extrait environnemental



**Diagnostic de la qualité chimique basé sur le mécanisme d'action/effet**

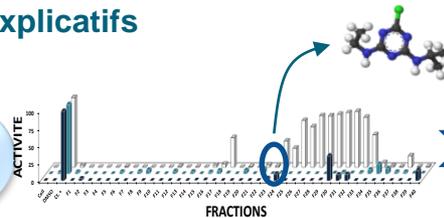
Profilage toxicologique  
(quantification bio. Bio-TEQ)

Identité des polluants actifs ?



**Contribution des polluants actifs connus**

Si polluants recherchés faiblement explicatifs



**Identification de polluants (in)connus**

Analyses non ciblées  
(HR-MS)



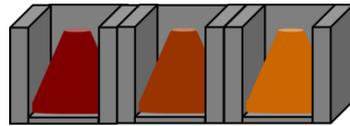
# Fractionnements



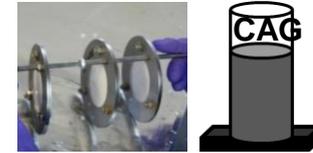
Comprendre le monde,  
construire l'avenir®



maîtriser le risque  
pour un développement durable



**BOUE - COMPOST**



**POCIS - CAG**

***HPLC-NH2 (normale)***



***HPLC-C18 (inverse)***



***Polarité***



**20 fractions**



***Polarité***

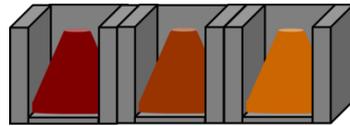


**40 fractions**



***Tests in vitro***

# Fractionnements



**BOUE - COMPOST**

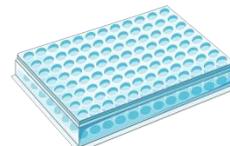
**HPLC-NH2 (normale)**



**Polarité**



**20 fractions**



**Tests in vitro**

**HPLC-C18 (inverse)**



**Polarité**



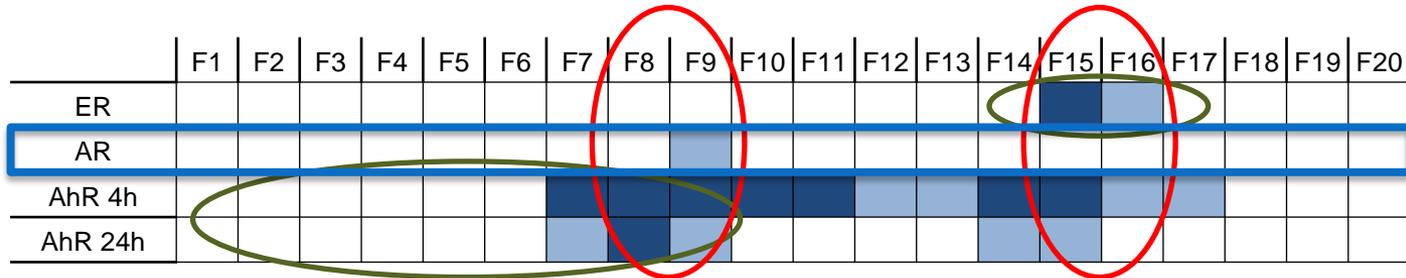
**40 fractions**



Comprendre le monde, construire l'avenir®



# Fractionnements boue-NH2



## Calibration HPLC

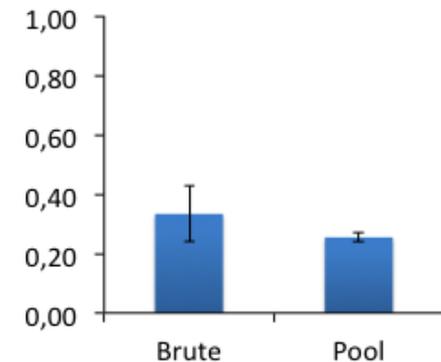
ER : F15-F16 → E1 et E2

AhR : F1-8 → HAP, TCDD, PCB

## Analyse HR-MS (GC-QTOF) → Candidats

<b>F15</b>	<b>Acides gras, composés de forme stéroïdienne (sitostérole...)</b>
F16	Acides gras, Composés de forme stéroïdienne (sitostérole, cholestanone... )
F9	Acide gras, Triterpènes (Lupénone...)
F8	Phtalates (bis(2-éthylhexyle)phtalate ...), muscs (galaxolide...)

## Pool Fraction → antiAR

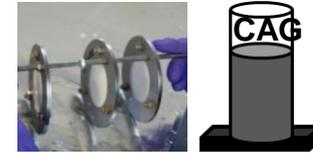


Comprendre le monde, construire l'avenir®





# Fractionnements



POCIS - CAG



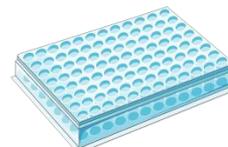
**HPLC-C18 (inverse)**



*Polarité*



40 fractions



**Tests in vitro**



Comprendre le monde,  
construire l'avenir®

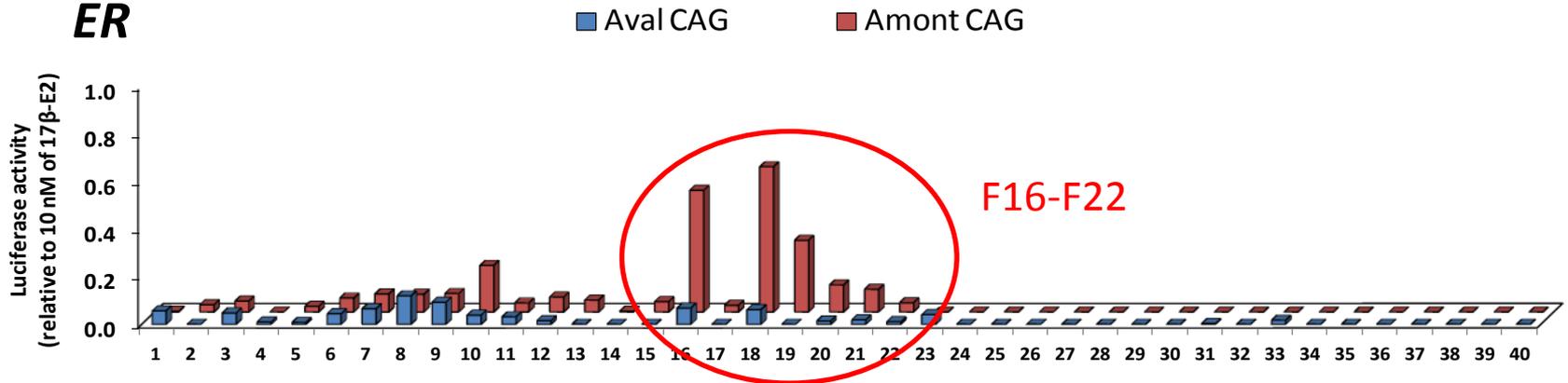


maîtriser le risque  
pour un développement durable

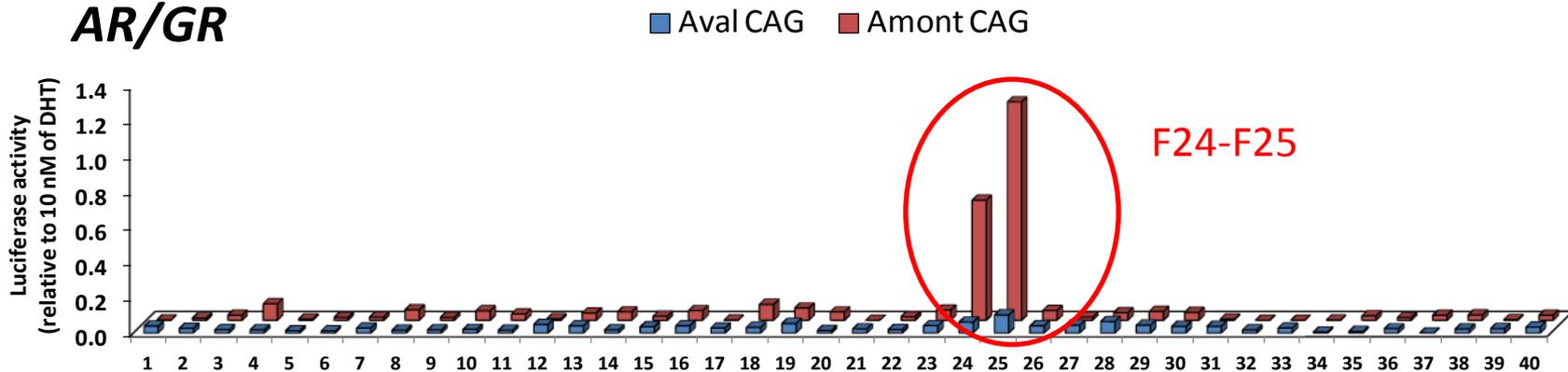


# Fractionnement POCIS-C18, vue globale

**ER**



**AR/GR**



→ Séparation des composés ER / composés gluco

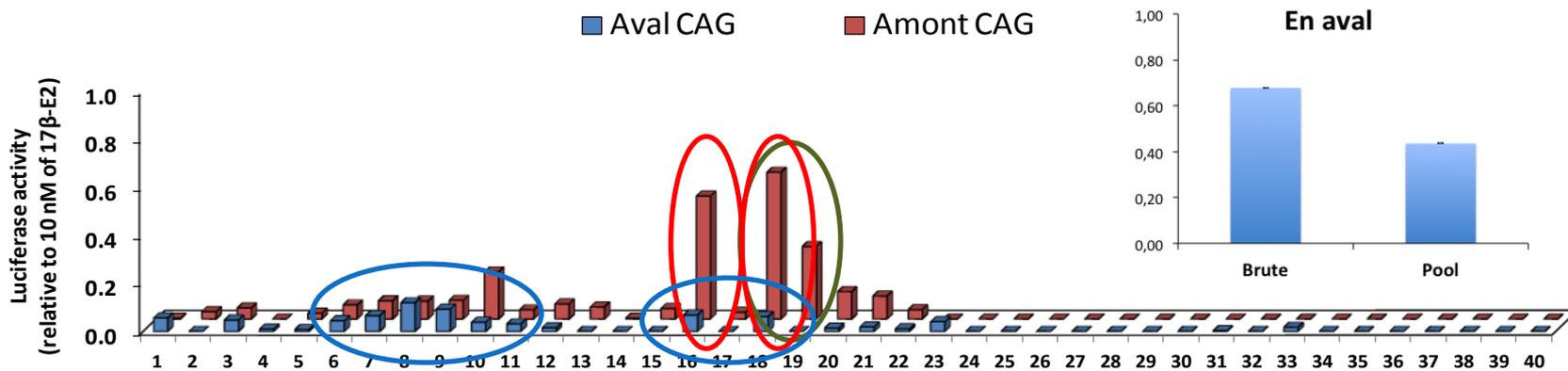


Comprendre le monde, construire l'avenir®



# Fractionnement

## POCIS-C18, Activité oestrogénique



Traitement : Légère persistance après CAG

Calibration HPLC

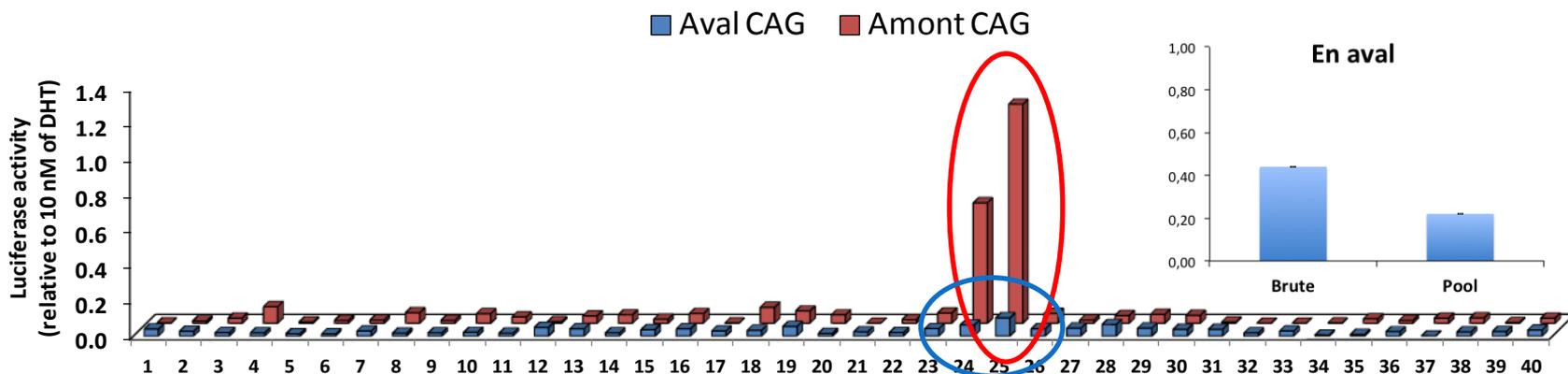
ER : F18-19 → E1, E2, EE2

Analyse HR-MS (LC-QTOF; ESI +/-) → Candidats suspectés

F16	composés pharmaceutiques (bisoprolol, labétalol, doxylamine, dioxoprothazine, étaqualone, fenlafaxine...)
F18	Diterpénoïdes, composés pharmaceutiques (telmisartan ...)

# Fractionnement

## POCIS-C18, activité gluco-corticoïde



Traitement : Légère persistance après CAG

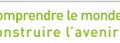
Calibration HPLC → ???

Analyse HR-MS (LC-QTOF; ESI +/-) → Candidats suspectés

F24	composés pharmaceutiques (EDDP [métabolite méthadone], erithromycine, loxapine, trimebutine, norverapamil [métabolite du vérapamil]...), <b>phtalate (MEHP [métabolite actif du DEHP])</b>
F25	composés pharmaceutiques (EDDP [métabolite méthadone], clarithromycine, cyamémazine, propafénone, vérapamil, ...), pesticide (imazalil), <b>stéroïdes (acide canrénoïque, oxymestérone)</b>

# Conclusions & Perspectives dans ECHIBIOTEB :

- ✓ Décryptage des effets de mélange
- ✓ Isolement des composés actifs
- ✓ Informer sur la nature des composés actifs (polarité)
- ✓ Fractions amont vs fractions aval
  - Abattement qualitatif
  - (Apparition de produits de transformation, a priori pas le cas ici)
- Identification de composés actifs (en cours)
  - Composés persistants vs produits de transformation ?
  - Candidats à confirmer ...
- ➔ Base pour la mise en œuvre de nouvelles méthodes de traitement spécifique en vue de réduire le danger associé aux rejets...



# En résumé :

## Intérêts de la démarche bio-analytique - EDA

Enjeux	Profilage toxicologique	EDA	Besoins/Développement
<b>ETAPES</b>	<b>1</b>	<b>2 3</b>	
Qualité chimique <u>intégrée</u> (niveau de contamination)	✓		Autres mécanismes/effets (PR, PXR, PPAR...)
<u>Mécanisme(s) / Effet(s)</u>	✓		Bio-essais <i>in vivo</i>
Sources et devenir	✓		Biote
Identification de sites fortement contaminés -> danger ?...	✓		- Seuils (BioTEQ-NQE) - Extrapolation vitro → vivo
Identification de (nouveaux) polluants actifs (prod. Transf.)		✓	Stratégie d'identification (banque de spectres...)
Identification de la « <u>cause</u> » (lien avec état écologique ?)		(✓)	Confirmation ind. → pop. → comm.

**Approche modulable selon le contexte, les objectifs et les moyens**





Merci de votre attention

