

Projet MICROPOLIS Indicateurs

Livrable N°03

Recherche de l'identité des contaminants actifs dans les échantillons par l'analyse dirigée par l'effet

Caroline Gardia-Parège, Hélène Budzinski (EPOC)

Selim AIT-AISSA (INERIS)

Jérôme COUTEAU (TOXEM)

V1 - Octobre 2018



**AGENCE FRANÇAISE
POUR LA BIODIVERSITÉ**
MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT

Titre : Recherche de l'identité des contaminants actifs dans les échantillons par l'analyse dirigée par l'effet Livrable N°04 – Projet MICROPOLIS Indicateurs

Date: Juin 2018

Auteurs :

Caroline Gardia-Parège, Selim Aït-Aïssa, Jérôme Couteau, Hélène Budzinski

Contributeurs à l'étude

Entité, institution de rattachement	Contributeurs
EPOC	Caroline Gardia-Parège, Hélène Budzinski
INERIS	Sélim Ait-Aïssa, Nicolas Creusot, Emmanuelle Maillot-Maréchal
TOXEM	Jérôme Couteau

Résumé

La présence de micropolluants soulève un véritable problème d'ordre environnemental lié aux effets néfastes qu'ils peuvent induire sur les organismes exposés (e.g. perturbation endocrinienne, toxicité...). Les effluents de stations de traitement des eaux usées représentent la principale source d'entrée de ces contaminants dans le compartiment aquatique. L'identification des composés pouvant potentiellement présenter un danger pour les organismes aquatiques est complexe et nécessite de disposer d'outils alternatifs pour compléter les analyses chimiques ciblées qui ne permettent généralement pas d'expliquer les effets observés biologiquement.

L'analyse dirigée par l'effet est une approche bio-analytique qui permet de guider les analyses chimiques par les bioessais. La démarche nécessite après un premier screening sur l'échantillon initial ou l'extrait brut, de simplifier l'échantillon par un fractionnement physico-chimique. Chaque fraction est testée sur les bioessais. L'analyse chimique se focalise sur les fractions actives contenant les micropolluants d'intérêt. Le but est d'identifier des composés biologiquement actifs non recherchés et/ou inconnus notamment par l'emploi de la spectrométrie de masse haute résolution (HRMS).

Cette démarche a été appliquée sur le site de Sophia Antipolis sur deux points du réseau de collecte des eaux usées, en entrée et en sortie d'une station de traitement des eaux usées. Les profils d'activités « perturbateurs endocriniens » et génotoxiques après fractionnement des différents points étudiés ont été établis. La comparaison de ces profils a permis d'observer que certaines fractions actives sont similaires d'un point à l'autre et contiennent donc les mêmes composés actifs. Pour l'activité « perturbateurs endocriniens », quelques fractions sont actives en sortie de STEU montrant que les molécules actives ne sont que partiellement voire non dégradées par le traitement mis en place.

L'analyse non ciblée sur les fractions actives a permis d'établir une liste de molécules communes aux différents points constituée de composés naturels, de composés de synthèse et de produits de transformation. Parmi les molécules identifiées, des perturbateurs endocriniens tels que la daidzéine, l'éthylparabène et le climbazole ont pu être détectés aux deux points du réseau et en entrée de STEU.

Mots clés : Micropolluants, Approche bio-analytique, Analyse dirigée par l'effet, Bioessais, Spectrométrie de masse haute résolution, Fractionnement, Eaux usées, STEU, Réseau

TABLE DES MATIÈRES

1	INTRODUCTION	6
1.1	Contexte.....	6
1.2	Le principe de l'analyse dirigée par l'effet.....	6
2	OBJECTIFS DE L'ETUDE	8
3	METHODOLOGIE	9
3.1	Les points d'étude.....	9
3.2	Test <i>in vitro</i>	10
3.2.1	Activité « perturbateurs endocriniens »	10
3.2.2	Génotoxicité.....	10
3.3	Fractionnement	11
3.4	Analyses chimiques	11
3.4.1	Acquisition des données.....	11
3.4.2	Stratégie d'identification	12
4	PROFIL BIOLOGIQUE DES ECHANTILLONS APRES FRACTIONNEMENT.....	14
4.1	Evaluation de l'activité « perturbateurs endocriniens » des fractions	14
4.1.1	Profil œstrogénique	14
4.1.2	Profil agoniste (androgénique et glucocorticoïde) dans le test MDA-kb2	15
4.2	Evaluation de l'activité génotoxique des fractions	15
5	IDENTIFICATION DE COMPOSES DANS LES FRACTIONS ACTIVES	17
6	CARACTERISATION DE L'ACTIVITE DES COMPOSES IDENTIFIES	21
7	CONCLUSION.....	22
8	REFERENCES	23

Glossaire

AR	Récepteur des androgènes (en anglais)
EDA	Analyse dirigée par l'effet (en anglais)
ER	Récepteur des oestrogènes (en anglais)
GR	Récepteur des gluco-corticoïdes
HRMS	Spectrométrie de masse haute résolution (en anglais)
LC-QTOF	Chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse haute résolution hydride quadripôle et temps de vol (en anglais)
MICROPOLIS	Projet de R&D "Elimination des MICROpolluants à sophia-antiPOLIS"
PE	Perturbateur endocrinien
PR	Récepteur de la progestérone
PXR	récepteur X des prégnanes
SIF	Facteur d'induction SOS-Chromotest (en anglais)
STEU	Station de traitement des eaux usées

1 INTRODUCTION

1.1 Contexte

La présence de micropolluants dans l'environnement résulte des multiples activités humaines (i.e. industrielle, agricole, domestique). La diversité des usages et des sources amène à l'émission de molécules diverses et variées qui sont véhiculées vers le milieu aquatique principalement par les retombés atmosphériques, le ruissellement des sols et/ou les réseaux d'assainissement. Afin de tenter de maîtriser les risques de ces composés sur les organismes et la santé humaine, des réglementations telle que REACH (enRegistrement, Evaluation, Autorisation et restriction des produits CHimiques) ont été mises en place au sein de l'Union Européenne. Ces réglementations demandent d'évaluer, le danger que peut représenter un composé avant de valider son emploi dans l'industrie ou dans la vie quotidienne. Cependant, l'évaluation des risques est définie par l'utilisation de tests biologiques normalisés qui ne reflètent que de façon partielle le réel impact de ces molécules une fois introduites dans l'environnement. D'autant plus que ces composés peuvent être transformés par des processus physico-chimiques et/ou biologique et que les produits de transformation et surtout leurs effets sur les écosystèmes sont souvent méconnus. L'évaluation du danger que peut représenter l'ensemble de ces micropolluants sur l'environnement est, à plus forte raison, rendue complexe par l'existence d'effet de mélange entre les molécules. A ce jour, la surveillance de la qualité chimique du milieu aquatique est réalisée par le suivi, par analyses chimiques, de différentes listes de composés selon le contexte (e.g. 41 composés prioritaires, 12 molécules supplémentaires selon DCE 2013, ...). Il s'avère que dans la majorité des cas, le suivi analytique de ces listes réduites de molécules ne suffit pas à expliquer les effets observés par la biologie. Dans de nombreux cas même en augmentant le nombre de composés suivis, cela ne résout pas le problème. Par exemple dans le cadre du projet REGARD, la recherche de 160 composés en analyses ciblées, appartenant à diverses classes de molécules (alkylphénols, composés pharmaceutiques, pesticides, phtalates,...), a permis d'expliquer seulement entre <0,1% et 7% de l'activité œstrogénique mesurée dans des eaux usées urbaines brutes et traitées de station de traitement des eaux usées (STEU) (REGARD, Livrable n°1.3.4 (Gardia-Parège et al., 2018)). Il est donc nécessaire de disposer de méthodes alternatives permettant d'identifier les composés responsables des effets observés. De plus il est nécessaire d'identifier principalement les composés susceptibles de présenter un danger de façon à améliorer l'analyse des risques environnementaux. Dans cette optique, les approches bio-analytiques telle que l'analyse dirigée par l'effet (*Effect Directed Analysis*, EDA) permettant de guider les analyses chimiques par les tests biologiques représentent des outils pertinents répondant aux deux verrous cités plus haut.

1.2 Le principe de l'analyse dirigée par l'effet

La démarche EDA permet de diriger les analyses chimiques par les tests biologiques afin d'isoler puis d'identifier les composés responsables des effets. L'approche est basée sur des processus physico-chimiques de fractionnement permettant de réduire la complexité de l'échantillon (Figure 1). Le fractionnement consiste à diviser l'échantillon en différents éléments appelés fractions. Chaque fraction collectée est testée biologiquement pour mettre en évidence les fractions contenant les composés actifs. Des analyses chimiques sont ensuite réalisées sur les fractions actives pour identifier les molécules présentes. La spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) est utilisée pour rechercher et identifier des composés inconnus ou non recherchés dans les fractions. L'étape finale consiste à acheter l'étalon analytique de la molécule suspectée pour confirmer à la fois son identification et son effet sur les tests biologiques.

Cette approche permettant d'établir un lien de cause à effet a démontré son intérêt dans plusieurs études (Creusot et al., 2013, Creusot et al. 2014, Gardia-Parège, 2015; Fuster, 2017). Récemment, le coumarin 47 utilisé dans de nombreux cosmétiques a ainsi pu être détecté en rivière et identifié pour la première fois comme perturbateur endocrinien (antagoniste des récepteurs des androgènes) (Muschket et al., 2018).

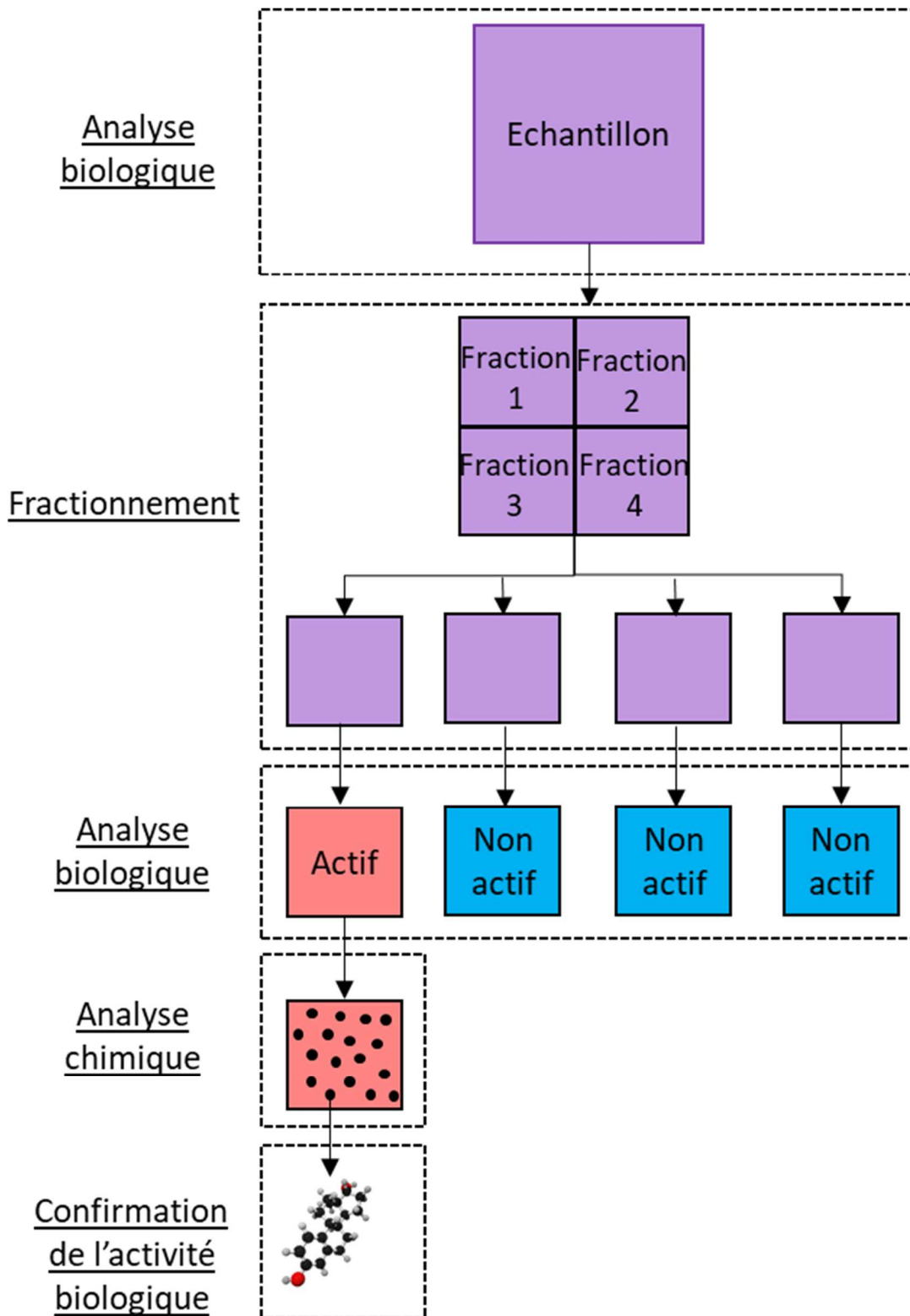


Figure 1 : Démarche schématisée de l'analyse dirigée par l'effet

2 OBJECTIFS DE L'ETUDE

Les bio-essais appliqués sur les échantillons d'eaux provenant de Sophia Antipolis ont montré que les eaux usées brutes avaient une forte (éco)toxicité, génotoxicité et/ou activités biologiques liées à la présence de xénobiotiques dont certains présentent des propriétés de perturbation endocrinienne (PE) (MICROPOLIS, Livrable n°1 (Penru et al., 2017)). Ces effets sont observés tout le long du continuum sources-sortie de la STEU des Bouillides, avec une diminution des effets après les procédés de traitement. Cependant, la génotoxicité et certaines des activités biologiques liées à la présence de PE (molécules œstrogéno- et glucocorticoïdo- mimétiques) persistent malgré les traitements spécifiques appliqués, traduisant que les composés associés à ces activités résistent aux différentes étapes de traitements de la STEU des Bouillides. Des analyses chimiques ciblées sur 8 stéroïdes naturels et synthétiques connus pour être des ligands du récepteur des œstrogènes n'ont permis d'expliquer qu'entre <0,1% et 20% de l'activité œstrogénique des eaux d'entrée et de sortie après ozonation de la STEU des Bouillides (Micropolis, Ait-Aissa, 2018 - communication, journée de restitution). Ces effets sont donc probablement liés à des composés actifs non recherchés ou inconnus. Dans le but de les identifier, l'approche EDA a été mise en place sur 4 points choisis. Il s'agit des points de prélèvement 1 et 3, localisés sur les branches Dm et Dv du réseau de collecte, ainsi que l'eau usée brute et l'effluent traité, prélevés en entrée et en sortie de STEU (MICROPOLIS, Livrable n°1 (Penru et al., 2017)). L'objectif de la démarche est de caractériser les composés actifs récalcitrant aux traitements afin, éventuellement, de mettre en place des actions de réduction à la source et d'éviter leur rejet dans le milieu naturel (La Bouillide).

3 METHODOLOGIE

3.1 Les points d'étude

Le choix des points d'étude sur lesquels a été déployée l'approche EDA est expliqué dans le livrable n°1 du projet MICROPOLIS (Penru et al., 2017). Ce sont les points de prélèvement 1 et 3, localisés sur les branches Dm et Dv du réseau de collecte, l'effluent brut et l'effluent traité, prélevés en entrée et en sortie de STEU. Les réponses biologiques obtenues pour ces 4 points sont résumées (Tableau 1).

Tableau 1 : Bilan des réponses biologiques observées pour les 4 points choisis pour la démarche EDA (MICROPOLIS, Livrable n°1 (Penru et al., 2017)).

Points de prélèvement	Activités PE	Génotoxicité	Cytotoxicité	Ecotoxicité
Point 1	Faible activité GR	SIF > 3 (avec et sans activation)	DL50 < 50%	Toxicité maximum observée (10 equitox/m ³)
Point 3	100% de fréquence de quantification de toutes les activités PE, dont GR et PXR (sauf AR)	SIF assez élevée. Point positionné sur la branche D (Dv) présentant une des toxicités les plus fortes.	DL50 < 90%	Toxicité relativement élevée (au-dessus du seuil de 1,3 equitox/m ³)
Entrée STEU	Toutes les activités recherchées (sauf une) sont quantifiées dans 100% des échantillons. Valeurs élevées pour ER, GR (et PXR).	Génotoxicité supérieure au seuil de référence (SIF > 1,5) avec et sans activation	Cytotoxicité élevée, DL50 _{max} < 60%	Toxicité supérieure au seuil de référence
Sortie STEU	Plusieurs activités quantifiées (ER, GR, PXR, PR) dont une au-dessus du seuil de référence pour l'activité ER (0,4 ng EEQ/L).	Toxicité faible (supérieure au SIF de référence pour une analyse sur 10)	Pas de DL50, Viabilité > 90% à la concentration de 100%	Pas de toxicité

Pour chaque site, un échantillon d'eau a été prélevé puis extrait sur phase solide selon le protocole défini dans le livrable n°1, projet MICROPOLIS.

3.2 Test *in vitro*

Le principe et la mise en œuvre des tests *in vitro* employés pour la démarche EDA sont détaillés dans le livrable 1, projet MICROPOLIS (Penru et al., 2017).

3.2.1 Activité « perturbateurs endocriniens »

Les bioessais de détection des activités de perturbation endocrinienne sont basés sur des cultures cellulaires exprimant un gène rapporteur sous le contrôle spécifique de récepteurs hormonaux. Le Tableau 2 présente les bioessais utilisés pour la détection des activités œstrogénique (MELN) et androgénique et glucocorticoïde (MDA-kb2). Dans le cas spécifique de la lignée cellulaire MDA-kb2 qui co-exprime GR et AR, le gène rapporteur luciférase présent dans cette lignée peut être activé par les deux récepteurs (Wilson et al., 2002). Dans le cas d'une détection d'une activité agoniste par un échantillon (induction de luciférase), un test complémentaire utilisant un inhibiteur spécifique du AR (la flutamide) ou du GR (RU486) est réalisé afin d'identifier le récepteur impliqué dans la réponse à l'échantillon. Avec ce bioessai, nous avons observé qu'en sortie de STEU, les activités détectées étaient liées au GR uniquement (MICROPOLIS, Livrable n°1 (Penru et al., 2017))

Les aspects méthodologiques associés à ces bioessais sont présentés en détail dans le Livrable n°1.

Tableau 2 : Bioessais utilisés pour évaluer les activités liées aux perturbateurs endocriniens.

Lignées cellulaires	Activité	Principe/mode d'action	Exemple de ligands connus
MELN	Œstrogénique	Récepteur des œstrogènes (ER) humain / luciférase	Œstradiol, éthinyloestradiol, Bisphénol A, nonylphénol, octylphénols...
MDA-kb2*	Androgénique et glucocorticoïde	Récepteurs des androgènes (AR) et des glucocorticoïdes (GR) humain / luciférase	Dihydrotestostérone, testostérone, dexaméthasone...

*Les cellules MDA-kb2 coexpriment les récepteurs des androgènes (AR) et des glucocorticoïdes (GR), une co-exposition avec la flutamide (anti-androgène de référence) et la RU486 (antagoniste du GR) permet de statuer sur l'implication de AR et/ou de GR dans le cas d'une réponse positive du bioessai à un échantillon.

3.2.2 Génotoxicité

Le potentiel génotoxique des fractions a été évalué à l'aide du SOS Chromotest (Quillardet et al., 1985). Ce test bactérien colorimétrique qui utilise une souche génétiquement modifiée d'*E. Coli* (PQ37), est un test rapide particulièrement adapté à la démarche EDA. Dans le cadre de ce projet, seules les fractions des extraits concernant les points 1 et 3 qui présentaient un potentiel génotoxique important avec activation métabolique (+S9) (MICROPOLIS, Livrable n°1 (Penru et al., 2017)), ont été testées .

3.3 Fractionnement

Les extraits d'eaux provenant des 4 points sont fractionnés par chromatographie en phase liquide (Prostar series, Agilent technologies). Les composés présents dans chaque extrait sont séparés sur une colonne de silice greffée C18 (Poursuit C18, 5µm, 250 × 4,6, Agilent technologie) suivant un gradient commençant avec un mélange eau ultra-pure/acétonitrile (80/20, v:v) et se terminant à 100 % d'acétonitrile au bout de 120 min avec un débit fixé à 1 mL/min. Une fraction est collectée par pas de 1,25 min. Au total, 96 fractions sont obtenues. La collecte de fractions correspond à un format de plaque 96 puits utilisée pour le criblage des activités biologiques. Ce design permet un criblage haut débit des activités biologiques. Après la collecte, l'ensemble des fractions est mis à sec sous un évaporateur automatique EZ-2 *Plus* (Genevac®). Après reprise dans l'acétonitrile, chaque fraction est divisée en trois, une partie étant destinée aux tests de génotoxicité, la seconde à l'évaluation des activités « PE » et la dernière pour les analyses chimiques. Les fractions destinées à la biologie sont à nouveau évaporées puis reprises dans le diméthylsulfoxyde avant d'être testées biologiquement. Une fois préparées, toutes les fractions sont conservées à -20°C.

3.4 Analyses chimiques

3.4.1 Acquisition des données

Les fractions actives sont analysées par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse haute résolution hybride quadripôle et temps de vol (LC-QTOF 6540, Agilent technologie). Les analytes sont séparés sur une colonne de silice greffée C18 (Kinetex® C18, 100 × 2,1 mm, 1,7 µm, Phenomenex®). La méthode d'analyse permet un criblage d'une large gamme de molécules présentes au sein des fractions. Cette méthode est classiquement employée lors d'approche EDA (Gardia-Parège, 2015). Les paramètres analytiques sont présentés dans le **Erreur ! Référence non valide pour un signet.**

Tableau 3: Conditions analytiques en LC-QTOF

Eléments	Condition d'analyse	
Phase éluante	A : Eau ultra-pure (± 0,1% acide formique)	
	B : Acétonitrile (± 0,1% acide formique)	
Débit	0,3 mL.min ⁻¹	
Gradient	Temps (min)	% B
	0	10
	22	40
	30	100
	32	100
	34	10
38	10	
Temps d'acquisition	38 min	
	ESI +, ESI-	
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 capillaire	3000 V	
Tension du « Nozzle »	0 V (ESI+), 1500 V (ESI-)	

3.4.2 Stratégie d'identification

La stratégie d'identification est détaillée en Figure 2.

La première étape consiste à acquérir les spectres de masse des molécules détectées dans chaque fraction des échantillons des différents points et du blanc protocole (mode MS). Un travail de retraitement permet de relier des signaux communs détectés à une même et unique entité. A ce stade, aucune structure ou nom de molécule ne peut être attribué à une masse. Par conséquent, le terme de composé ne peut être employé et la dénomination d'entité est alors utilisée. La liste des entités obtenue pour une fraction d'un point est comparée à celle acquise pour le blanc expérimental. L'objectif est d'éliminer les molécules qui ne sont pas intrinsèques à l'échantillon mais qui proviennent du processus de préparation. Une fois filtrées, les données sont utilisées pour l'interprétation.

Les fractions actives étant identiques du point 1 à l'entrée de STEU au point 1 à la sortie de la STEU des Bouillides, l'hypothèse est faite que les composés actifs sont également communs aux différents extraits. Les listes d'entités ont donc été comparées entre les mêmes fractions provenant des différents sites/points de collecte. L'identification moléculaire s'est focalisée sur les entités communes. Les fractions sont alors analysées en mode MS/MS pour obtenir les spectres de fragmentation des entités. L'analyse de ces spectres permet de remonter à une structure puis à un nom de composé.

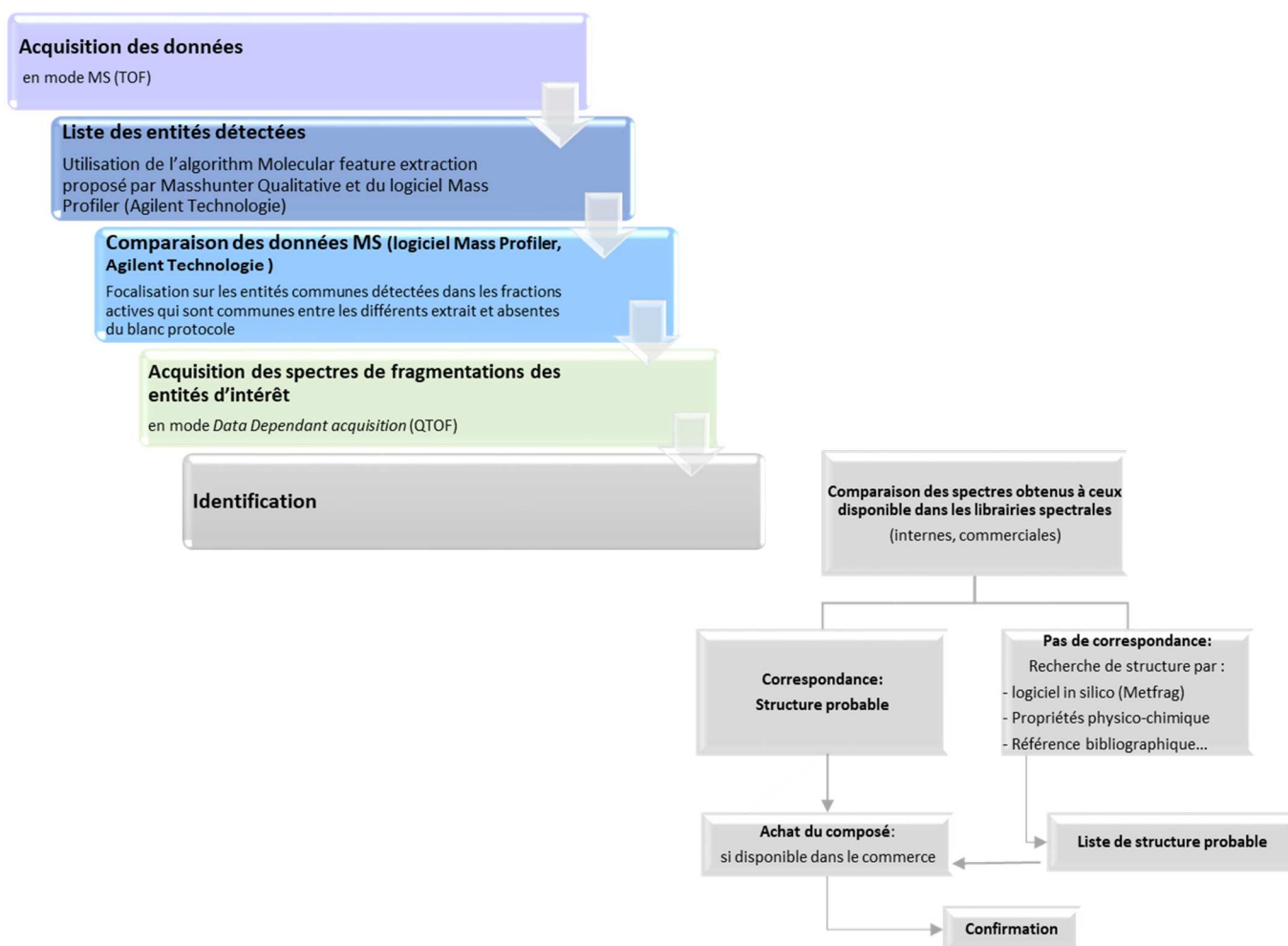


Figure 2 : Stratégie d'identification.

Les données acquises sont hiérarchisées par niveaux d'identification définis selon la classification établie par Schymanski et al., (2014) (Figure 3). Cette classification est divisée en 5 niveaux allant de la masse jusqu'à la confirmation de la structure du composé. Un nom ne pourra être confirmé qu'après l'achat et l'analyse de l'étalon analytique correspondant (niveau 1).

Données MS/MS	Niveau 1	Structure confirmée par étalon analytique
	Niveau 2	Structure probable par librairie spectrale
	Niveau 3	Candidats potentiels (classe, sous-structure, suspecté)
Données MS	Niveau 4	Formule brute
	Niveau 5	Masse d'intérêt

Figure 3 : Niveau d'identification (Schymanski et al, 2014)

4 PROFIL BIOLOGIQUE DES ECHANTILLONS APRES FRACTIONNEMENT

4.1 Evaluation de l'activité « perturbateurs endocriniens » des fractions

4.1.1 Profil œstrogénique

Le profil œstrogénique obtenu après fractionnement des extraits d'eaux provenant du point 1 jusqu'à la sortie de la STEU des Bouillides montre que l'activité œstrogénique se situe dans une quantité limitée de fractions (Figure 4). Le fractionnement a permis d'isoler les molécules actives dans 4 groupes de fractions F11 à F13, F21 et F23, F36 à F38 et F42 à F43. Ces groupes sont identiques entre les extraits d'eaux prélevés au point 1, point 3 et entrée de STEU, pour les fractions F11 à F13, F21 et F23, et l'activité persiste en sortie de traitement de la STEU des Bouillides pour les fractions F36 à F38 et F42 à F43. Ce résultat suggère que les ligands responsables de l'activité œstrogénique sont les mêmes au point 1, point 3 et à l'entrée de STEU voire jusqu'à la sortie de STEU pour les fractions F36 à F38 et F42, F43. Les composés œstrogéno-mimétiques sont donc présents dans le réseau dès le point 1 et point 3 et sont :

- soit éliminés de la phase dissoute par les procédés de traitement pour les molécules actives contenues dans les fractions F11 à F13 et F21, F23 ;
- soit récalcitrants aux traitements pour les ligands collectés dans les fractions F36 à F38 et F42, F43.

Le fractionnement obtenu lors de cette étude possède le même profil œstrogénique que celui obtenu lors d'une précédente étude menée sur les eaux brutes et traitées d'une STEU recevant une plus grande proportion d'effluent urbains et possédant un traitement secondaire par biofiltration (REGARD, Livrable n°1.3.4 (Gardia-Parège et al., 2018)). Cette similitude suggère que les molécules œstrogéno-mimétiques sont potentiellement les mêmes d'un site à l'autre et assez ubiquistes de ce fait.

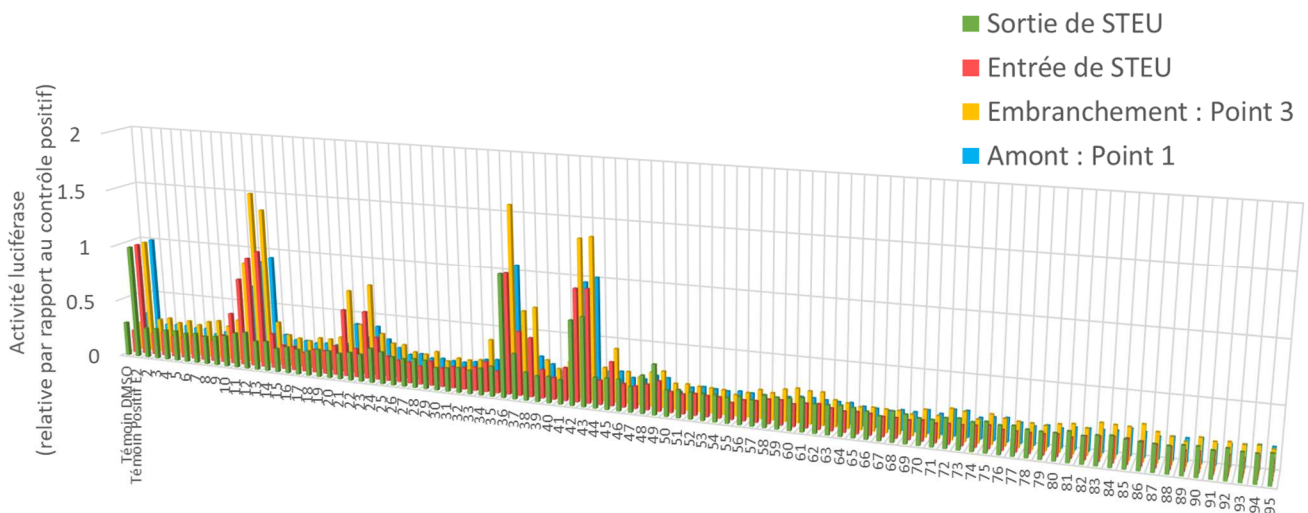


Figure 4 : Profil biologique des activités œstrogéniques (ER) des extraits fractionnés d'eaux du point 1 ou point 3 à la sortie de STEU des Bouillides.

4.1.2 Profil agoniste (androgénique et glucocorticoïde) dans le test MDA-kb2

Concernant l'activité agoniste dans le bioessai MDA-kb2, le fractionnement a permis d'isoler les composés actifs dans les fractions F46, F52 et F58 (Figure 5). L'activité est observée au point 1, au point 3 et en entrée de la STEU des Bouillides puis n'est plus détectée en sortie de STEU pour les fractions F46 et F52. Ce résultat montre que les molécules actives ont été éliminées de la phase dissoute par les procédés de traitement. Pour la fraction F58, l'activité agoniste est détectée du point 1 et à la sortie de STEU. Les molécules actives persistent donc après le traitement appliqué en STEU. Dans ces échantillons, ces activités sont principalement médiées par le récepteur des glucocorticoïdes.

Comme pour l'activité œstrogénique, le profil d'activité agoniste dans le bioessai MDA-kb2 après fractionnement est similaire à celui obtenu pour un autre site possédant une filière de traitement similaire (exceptée l'étape d'ozonation); REGARD, Livrable n°1.3.4 (Gardia-Parège et al., 2018) suggérant que les composés actifs sont potentiellement les mêmes dans les différents sites.

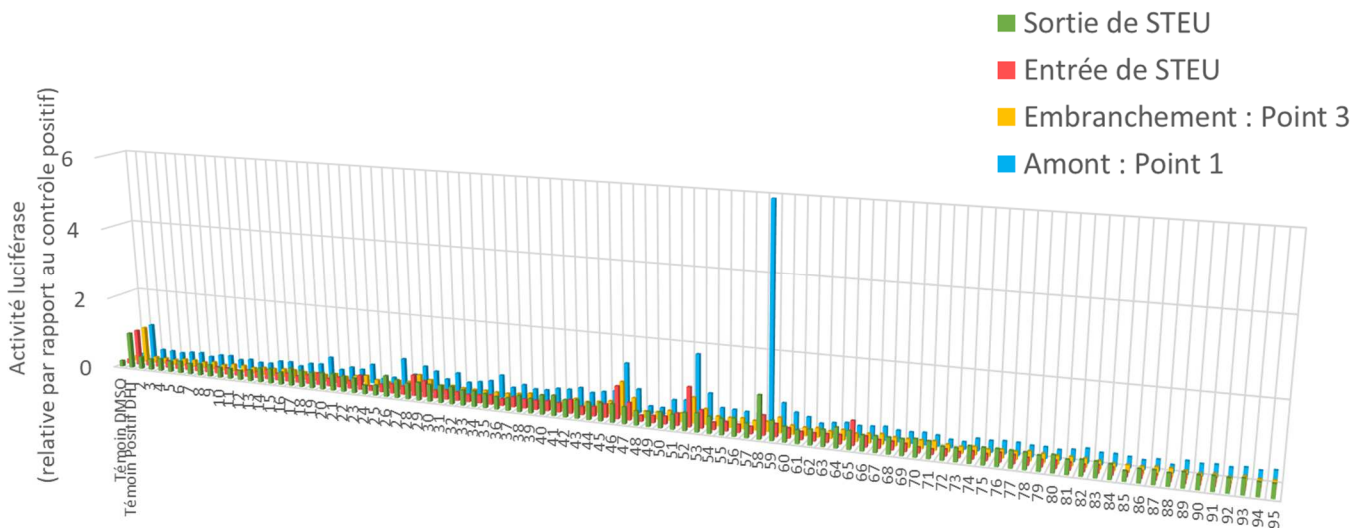


Figure 5 : Profil biologique des activités agonistes (androgéniques et/ou glucocorticoïde) dans le test MDA-kb2 des extraits fractionnés d'eaux du point 1 ou point 3 à la sortie de STEU des Bouillides.

4.2 Evaluation de l'activité génotoxique des fractions

Le fractionnement des extraits du Point 1 et du Point 3 a permis d'isoler des composés actifs dans différentes fractions (Fraction présentant un SIF>1,2). Les deux points ont des profils de fractionnement différents. Pour le point 3, les composés pro-génotoxiques sont localisés dans trois fractions distinctes (F53, F60 et F73). Alors que pour le point 1, choisi pour son activité génotoxique particulièrement forte, les composés sont répartis dans 20 fractions (Figure 6). Ce résultat montre que :

- le nombre de fractions actives et par conséquent de molécules contenues dans l'extrait du Point 1 est nettement plus important que celui observé pour le point 3;
- les composés responsables de la génotoxicité sont différents entre les deux points, seule exception la fraction F60 qui est active pour les deux points et suggère que les molécules sont potentiellement les mêmes. Il est intéressant de constater que certaines fractions pro-génotoxiques ont également une activité œstrogénique (Point 3 : F12, F13 et F46) ou une activité sur la lignée MDA-kb2 (Point 1 : F53).

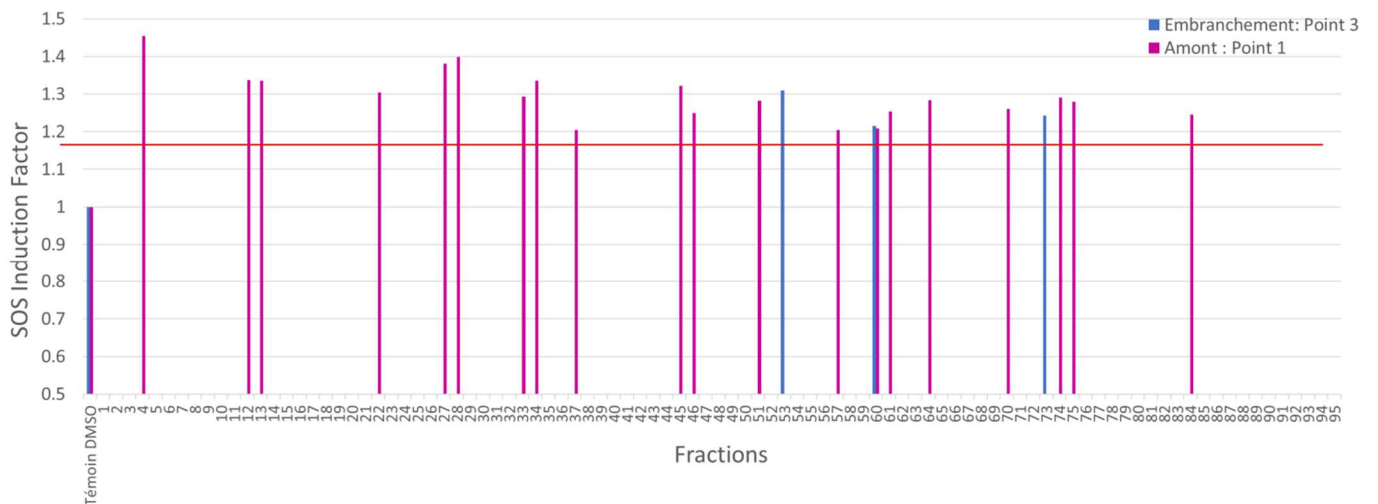


Figure 6 : Profil génotoxique des extraits fractionnés d’eaux du point 1 et du point 3 de Sophia-Antipolis.

Concernant l’entrée qui montrait une activité génotoxique sur l’extrait global (MICROPOLIS, Livrable n°1 (Penru et al., 2017)), aucune fraction n’est apparue active. Une perte même partielle des composés liée au processus de fractionnement (e.g. injection, évaporation, reprise) pourrait expliquer ce résultat. L’effet de mélange (i.e. additivité, synergie) entre les molécules présentes dans l’extrait global peut également constituer un élément de réponse. En effet dans ce cas, le fractionnement amène à une séparation des composés entre eux qui peut entraîner une perte d’activité. Ce phénomène a notamment été observé dans le cas de l’activité liée aux xénobiotiques (récepteur PXR) en STEU urbaine (Gardia-Parège, 2015).

Pour la sortie de STEU, l’extrait n’est plus actif sur le bioessai (MICROPOLIS, Livrable n°1 (Penru et al., 2017)). Les molécules pro-génotoxiques sont donc (partiellement) dégradées par le traitement appliqué en STEU des Bouillides.

5 IDENTIFICATION DE COMPOSES DANS LES FRACTIONS ACTIVES

Après la caractérisation de l'activité biologique des fractions, l'identité des composés présents dans les fractions ayant une activité biologique est recherchée par spectrométrie de masse. L'identification a été axée uniquement sur les fractions présentant des activités liées à la présence de PE du fait d'un abattement important (voire total) de l'activité génotoxique en sortie de STEU et du fait d'un résiduel faible d'activité dans les fractions des points 1 et 2 qui compliquait fortement le travail d'identification et aurait probablement été infructueux du fait d'un défaut de sensibilité. En effet la spectrométrie de masse haute résolution demande des quantités de composés plus importantes que celles nécessaires aux analyses en mode ciblé par spectrométrie de masse en tandem.

Dans un premier temps, les numéros des fractions actives sont comparés aux temps de rétention obtenus par HPLC de différents étalons analytiques (42 composés). Le temps de rétention est directement relié au temps de collecte et donc à une fraction. L'objectif est de vérifier si l'activité des fractions est liée à la potentielle collecte de ligands connus et calibrés. Concernant les fractions F36, F42-43 induisant une activité œstrogénique, le moment de collecte des fractions correspond au temps de rétention du bisphénol A (F36), de l'œstradiol (F36) et de l'éthinyl-œstradiol (F42) (Figure 7). Lors de la caractérisation des points d'études, des analyses chimiques ciblées sur les œstrogènes ont été réalisées sur les extraits d'eaux de STEU. Les analyses ont montré la présence de l'œstradiol et de l'éthinyl-œstradiol dans les extraits d'eaux de STEU à des concentrations de l'ordre du ng/L (MICROPOLIS Procédés, (Choubert et al., 2017)). Concernant le bisphénol A, des analyses ciblées par chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem (LC-MS/MS) ont été réalisées sur la fraction F36 susceptible de contenir le composé. Le bisphénol A est détecté dans la fraction F36 au point 1 et point 3 jusqu'à la sortie des Bouillides. Ce composé ainsi que les œstrogènes sont classiquement rencontrés dans les réseaux d'eaux usées et ce jusqu'en entrée de STEU. Ces composés sont éliminés en grande partie par les procédés de traitement. Une faible quantité peut cependant se retrouver dans les eaux après traitement. En termes de pourcentage d'élimination, le bisphénol A possède un rendement d'élimination de la phase dissoute compris entre 30% et 70% suivant les stations de traitement alors que les hormones telles que l'œstradiol sont éliminées de la phase dissoute à plus de 70% (Choubert et al., 2011). Le traitement complémentaire par ozonation a montré une augmentation de ce rendement d'élimination en particulier pour les hormones œstrogéniques (MICROPOLIS procédés (Choubert et al, 2017)).

Pour les autres fractions actives, aucun temps de rétention des étalons analytiques calibrés ne correspond au temps de collecte des fractions. L'activité biologique mesurée est donc liée à la présence de composés non recherchés et/ou inconnus. Pour identifier les molécules responsables des activités, des analyses chimiques non ciblées ont été réalisées sur les fractions les plus actives à savoir les fractions F12, F13, F21, F23 pour l'activité œstrogénique et F46, F52, F58 pour l'activité glucocorticoïde.

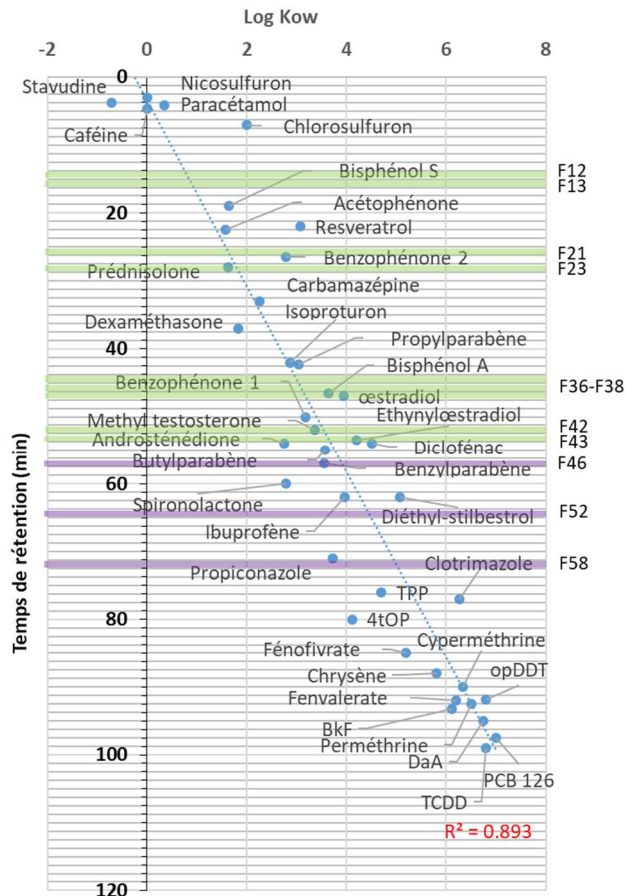


Figure 7 : Temps de rétention des composés servant pour la calibration du fractionnement par HPLC comparés aux temps de collecte des fractions actives (en vert: fraction ER; en violet: fraction AR).

Les analyses permettent de détecter plusieurs centaines d'entités dans chacune des fractions montrant que malgré le fractionnement de l'échantillon, les données restent encore complexes (Tableau 4). Cependant, plusieurs molécules candidates ont été identifiées dans les différentes fractions analysées.

Tableau 4 : Nombre d'entités détectées dans les échantillons par LC-QTOF.

Activité	Fractions	Mode d'ionisation	Point 1	Point 3	Entrée de STEU	Sortie de STEU	Entités communes
ER	F12	ESI+	362	307	680	83	137
		ESI-	169	176	304	49	55
	F13	ESI+	526	326	629	62	120
		ESI-	204	197	326	47	78
	F21	ESI+	616	557	829	77	265
		ESI-	222	191	315	61	66
F23	ESI+	609	525	820	65	265	
	ESI-	198	219	318	60	88	
AR/GR	F46	ESI+	678	467	810	110	199
		ESI-	200	152	154	35	33
	F52	ESI+	571	468	794	86	144
		ESI-	206	160	146	32	48
	F58	ESI+	696	449	902	148	35
		ESI-	175	183	265	18	5

L'activité étant persistante aux points 1, 3, à l'entrée de STEU voire pour certaines fractions jusqu'à la sortie, ceci suggère que les composés actifs sont les mêmes entre les différents sites/points de collecte. L'identification moléculaire s'est donc focalisée uniquement sur les entités communes entre les différents points. Cette stratégie a mis en évidence plusieurs dizaines à quelques centaines d'entités communes entre les différents points pour les mêmes fractions. Des structures de molécules ont pu être déterminées pour quelques entités par l'analyse des spectres de fragmentation et par l'interrogation de bases de données spectrales existantes (Tableau 5). Pour les entités dont les spectres de fragmentation n'ont pas trouvé de correspondance dans les bibliothèques spectrales, un travail plus approfondi pour interpréter les spectres manuellement, notamment par l'emploi d'approches *in silico* ou de filtres pour réduire la liste des structures candidates, aurait pu permettre d'augmenter le nombre de structures probables. Cependant, ce travail est complexe et demande un temps de réalisation assez conséquent qui n'était pas en adéquation avec le calendrier du projet.

Par l'interrogation des bases de données spectrales, contenant plusieurs classes de molécules dont des composés naturels, synthétiques et des produits de transformation, une liste de structures probables a été établie (Tableau 5). L'identité de plusieurs composés a été confirmée par l'achat puis l'injection de l'étalon analytique correspondant.

Activités ER :

Parmi ces composés confirmés sont retrouvés dans les fractions œstrogéniques : une molécule naturelle la daidzéine qui est produite par certains végétaux comme le soja (F12, F13), l'éthylparabène un conservateur pouvant être utilisé dans les cosmétiques (F21) et des produits de transformation de composé naturel comme le 2-oxindole (F12) ou de psychotropes tels que le o-desméthylvenlafaxine (F12, F13).


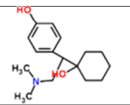
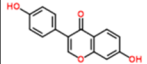

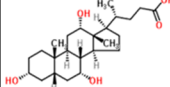
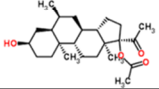
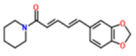
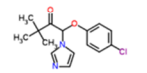
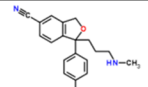
Activités GR

Concernant les fractions à activité de type glucocorticoïde, un alcaloïde naturel, la pipérine (F46) retrouvée par exemple dans le poivre et un fongicide, le climbazole (F52) utilisé dans les shampoings antipelliculaires, ont été confirmés. La présence de toutes ces molécules à l'exception de la pipérine est rapportée en entrée de STEU (Chen et Ying, 2015; Choubert et al., 2011; Lajeunesse et al., 2013). Dans notre étude, ces molécules sont éliminées de la phase dissoute par les procédés de traitement mis en place et ne sont pas détectées dans les fractions de sortie de STEU à l'exception du climbazole qui est détecté mais avec une faible intensité dans la fraction F52 de sortie de STEU.

La présence d'autres molécules est également suspectée dont des acides biliaires, et des métabolites de composés pharmaceutiques (Tableau 5). L'identité de ces composés n'a pu être confirmée de façon certaine soit par manque d'étalon analytique disponible dans le commerce (cas rencontré pour l'acétate de (3 α ,5 β ,6 α)-3-hydroxy-6-méthyl-20-oxoprégnan-17-yle), soit à cause de l'interprétation délicate des spectres de fragmentation. Ainsi, les similitudes structurales des acides biliaires retrouvées dans les spectres de fragmentation n'ont pas permis de d'attribuer un nom précis à l'entité détectée. Concernant le métabolite du citalopram (psychotrope), le temps de rétention, la masse et l'empreinte générale des spectres de fragmentations du composé inconnu correspondent à l'étalon analytiques le desméthylcitalopram. Cependant, l'absence de correspondance entre certains fragments peu intenses ne permet pas de confirmer de façon certaine l'identité du composé mais la structure du composé inconnu est somme toute proche de celle proposée.

Concernant la fraction F58 pour laquelle l'activité glucocorticoïde persiste en sortie de STEU malgré le traitement, aucune structure de molécules n'a pu être déterminée actuellement sur l'ensemble des entités communes ayant été détectées. La possibilité d'analyser les données acquises par HRMS de façon manuelle et de manière rétrospective pourra éventuellement permettre de trouver l'identité des masses observées.

Tableau 5 : Liste des molécules confirmées et suspectées détectées dans les fractions actives.

Activité biologique	Fraction	Nom	Structure	Formule	Ion	Masse monoisotopique (Da)	Famille	Niveau ID*
ER	F12	2-Oxindole		C ₈ H ₇ NO	[M+H] ⁺	133,0528	Métabolite et produit de transformation (tryptophane...)	1
	F12 - F13	O-Desméthylvenlafaxine		C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	[M+H] ⁺	263,1885	Métabolite et produit de transformation de la venlafaxine (psychotrope)	1
	F12 - F13	Daidzéine		C ₁₅ H ₁₀ O ₄	[M+H] ⁺ , [M-H] ⁻	254,0579	Phytoestrogène	1
	F21	Ethylparabène		C ₉ H ₁₀ O ₃	[M-H] ⁻	166,0630	Conservateur	1
	F21-F23	Acide cholique ou composés de la même famille		C ₂₄ H ₄₀ O ₅	[M-H] ⁻	408,2875	Acide biliaire	2
AR/GR	F46	Acétate de (3α,5β,6α)-3-hydroxy-6-méthyl-20-oxoprégnan-17-yle		C ₂₄ H ₃₈ O ₄	[M-H] ⁻	390,277	Métabolite de progestagène (acétate de médroxyprogestérone)	2
	F46	Pipérine		C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	[M+H] ⁺	285,1365	Alcaloïde au goût piquant	1
	F52	Climbazole		C ₁₅ H ₁₇ ClN ₂ O ₂	[M+H] ⁺	292,0979	Fongicide	1
	F52	Desméthylcitalopram		C ₁₉ H ₁₉ FN ₂ O	[M+H] ⁺	310,1481	Métabolite et produit de transformation de la citalopram (psychotrope)	2

*Niveau d'identification défini par Schymanski et al, 2014 : 1= composé confirmé par étalon analytique, 2 = structure probable

6 CARACTERISATION DE L'ACTIVITE DES COMPOSES IDENTIFIES

Parmi les molécules identifiées figurent des ligands connus du récepteur des œstrogènes, la daidzéine en F12 et F13, l'éthylparabène en F21, le bisphénol A (F36) (Escande et al., 2006; Molina-Molina et al., 2013). Ces composés contribuent donc à l'activité des fractions.

D'autres molécules identifiées dans les fractions actives étaient disponibles commercialement et ont donc pu être testées pour les bioessais MELN et MDA-kb2. Il s'agit de la pipérine, le climbazole, le 2-oxindole, l'O-desméthylvenlafaxine et le desméthylcitalopram (Tableau 5). Parmi elles, seul le climbazole a montré une très légère activité œstrogénique dans le test MELN et anti-androgénique dans la lignée MDA-kb2 (uniquement à la concentration 10 µM). En tout état de cause, les analyses biologiques sur les molécules étalons ne permettent pas de confirmer la contribution de ces molécules aux activités agonistes ER et GR détectées dans les fractions actives. D'autres molécules non identifiées par cette approche sont présentes et vraisemblablement responsables des activités biologiques mises en évidence.

7 CONCLUSION

Ce volet du projet Micropolis avait pour objectif de rechercher et d'identifier les contaminants actifs dans les eaux provenant du réseau d'eaux usées jusqu'en sortie de la STEU des Bouillides. Il s'agit d'une étape intermédiaire dans la mise en place de solution de réduction à la source (par l'identification des micropolluants et des sources) et d'évaluation de la solution de traitement par ozonation sur la STEU des Bouillides.

L'activité biologique de ces échantillons n'étant que partiellement expliquée par les stéroïdes classiquement détectés, une approche bio-analytique de type EDA a été réalisée pour identifier les molécules responsables des activités. La démarche a dans un premier temps permis de dresser les profils biologiques après fractionnement de chaque point étudié. La comparaison de ces profils a permis de mettre en évidence que les fractions actives sont les mêmes, avec des variations d'intensité de réponse, au point 1, point 3 et en entrée de STEU suggérant que les composés actifs sont les mêmes. Pour la sortie de STEU, certaines fractions actives sont similaires aux points amont montrant une persistance des composés actifs dans la phase dissoute malgré les procédés de traitement et ce, pour l'activité œstrogénique (F36, F42, F43) et androgénique/glucocorticoïde (F58). En revanche, certaines fractions actives dans les points amont ne le sont plus en sortie de STEU illustrant l'élimination des molécules actives par le procédé.

L'association du fractionnement aux bio-essais permet d'obtenir le profil type de chaque point. La comparaison de ces profils donne des informations qualitatives sur les contaminants actifs. Dans le cas d'étude de STEU, la comparaison des profils apporte une information sur la persistance, l'élimination, voire même la mise en évidence de formation de produits de transformation biologiquement actifs par les procédés, si de nouvelles fractions sont actives après les traitements ce qui n'est pas le cas dans cette étude.

Cependant pour obtenir l'identité des molécules responsables des activités biologiques observées, il est nécessaire de combiner le fractionnement et les bio-essais aux analyses chimiques. Les analyses chimiques ciblées peuvent permettre d'identifier les causes de l'activité biologique dans les fractions connues pour correspondre à la collecte de certains ligands. Ainsi le bisphénol A, ligand œstrogénique, a pu être identifié dans la fraction F36 active pour les différents points d'étude. Mais pour la majorité des fractions, le moment de collecte ne correspond pas aux temps de rétention de ligands connus et les activités observées sont dues à des molécules non recherchées ou inconnues. La spectrométrie de masse haute résolution a donc été utilisée pour identifier ces composés. Les analyses ont permis de confirmer la présence de différentes classes de molécules, dont des composés naturels, des composés de synthèse et des produits de transformation. Parmi les molécules identifiées, des ligands de ER, la daidzéine et l'éthylparabène contribuent à l'activité œstrogénique des fractions F12 et F21 respectivement. Ces travaux n'ont cependant pas permis d'aboutir à l'identification des molécules actives sur le récepteur des glucocorticoïdes, les substances identifiées en chimie et disponibles commercialement s'étant avérées inactives dans le bioessai MDA-kb2. Un travail plus approfondi sur l'identification nécessitant plus de moyens (notamment en termes de temps) pour l'interprétation des spectres de fragmentation permettrait d'établir les structures des autres entités détectées et potentiellement identifier l'ensemble des molécules responsables des activités observées. Ce travail pouvant se révéler long et fastidieux en l'absence de bases de données larges, notre travail met en évidence l'importance de l'établissement et de la structuration d'une base de données internationale concernant les spectres de fragmentation des ligands associés aux différentes activités.

8 REFERENCES

Chen, Z.-F., and Ying, G.-G. (2015). Occurrence, fate and ecological risk of five typical azole fungicides as therapeutic and personal care products in the environment: A review. *Environ. Int.* *84*, 142–153.

Choubert, J.-M., Martin-Ruel, S., Budzinski, H., Miège, C., Esperanza, M., Soulier, C., Lagarrigue, C., and Coquery, M. (2011). Evaluer les rendements des stations d'épuration - Apports méthodologiques et résultats pour les micropolluants en filières conventionnelles et avancées. 44–62.

Choubert, J.-M., Penru, Y., Mathon, B., Guillon, A., Esperanza, M., Crétollier, C., Dherret, L., Daval, A., Masson, M., Lagarrigue, C., et al. (2017). Elimination de substances prioritaires et émergentes des eaux résiduaires urbaines par ozonation : évaluation technique, énergétique et environnementale. Rapport final du projet Micropolis-Procédés.

Creusot, N., Budzinski, H., Balaguer, P., Kinani, S., Porcher, J.-M., and Aït-Aïssa, S. (2013). Effect-directed analysis of endocrine-disrupting compounds in multi-contaminated sediment: Identification of novel ligands of estrogen and pregnane X receptors. *Anal. Bioanal. Chem.* *405*, 2553–2566.

Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, J.-M., and Budzinski, H. (2014). Identification of synthetic steroids in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges based on a bioanalytical approach and passive sampling. *Env. Sci Technol* 3649–3657.

Escande, A., Pillon, A., Servant, N., Cravedi, J.-P., Larrea, F., Muhn, P., Nicolas, J.-C., Cavaillès, V., and Balaguer, P. (2006). Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta. *Biochem. Pharmacol.* *71*, 1459–1469.

Fuster, L. (2017). Mise en oeuvre d'une démarche intégrée pour identifier des contaminants pertinents dans l'environnement. Thèse. Université de Bordeaux.

Gardia-Parège, C. (2015). Développement et applications de l'analyse dirigée par l'effet pour la recherche et l'identification de contaminants à risque pour les écosystèmes aquatiques. Thèse. Université de Bordeaux.

Gardia-Parège, C., Dufour, V., Chollet, C., Cruz, J., Maillot-Maréchal, E., Aït-Aïssa, S., and Budzinski, H. (2018). Livrable 1.3.4 - Développement de nouveaux outils de diagnostic et d'effets (techniques automatisées et EDA). Projet REGARD.

Lajeunesse, A., Blais, M., Barbeau, B., Sauvé, S., and Gagnon, C. (2013). Ozone oxidation of antidepressants in wastewater - Treatment evaluation and characterization of new by-products by LC-QToFMS. *Chem. Cent. J.* *7*.

Molina-Molina, J.-M., Amaya, E., Grimaldi, M., Sáenz, J.-M., Real, M., Fernández, M.F., Balaguer, P., and 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.

Muschket, M., Di Paolo, C., Tindall, A.J., Touak, G., Phan, A., Krauss, M., Kirchner, K., Seiler, T.-B., Hollert, H., and Brack, W. (2018). Identification of Unknown Antiandrogenic Compounds in Surface Waters by Effect-Directed Analysis (EDA) Using a Parallel Fractionation Approach. *Environ. Sci. Technol.* *52*, 288–297.

Penru, Y., Guillon, A., Aït-Aïssa, S., and Couteau, J. (2017). Livrable 1 : Caractérisation de la toxicité des eaux usées à Sophia Antipolis. Projet MICROPOLIS Indicateurs.

Quillardet, P., de Bellecombe, C., and Hofnung, M. (1985). The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: validation study with 83 compounds. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 147, 79–95.

Schymanski, E.L., Singer, H.P., Longrée, P., Loos, M., Ruff, M., Stravs, M.A., Ripollés Vidal, C., and 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.

Wilson, V.S., Bobseine, K., Lambright, C.R., and Gray Jr., L.E. (2002). A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicol. Sci.* 66, 69–81.