



HAL
open science

Contribution de l'approche effect directed analysis à l'identification de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques

Nicolas Creusot

► **To cite this version:**

Nicolas Creusot. Contribution de l'approche effect directed analysis à l'identification de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques. Chimie analytique. Université de Bordeaux 1, 2011. Français. NNT: . tel-02980485

HAL Id: tel-02980485

<https://hal.inrae.fr/tel-02980485v1>

Submitted on 16 Nov 2020

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.

N° d'ordre :

THÈSE

Présentée à

L'Université Bordeaux I
École Doctorale des Sciences Chimiques

Par Nicolas CREUSOT

Pour l'obtention du grade de

Docteur

Spécialité : **Chimie analytique et environnement**

CONTRIBUTION DE L'APPROCHE *EFFECT DIRECTED ANALYSIS* À L'IDENTIFICATION DE PERTURBATEURS ENDOCRINIENS DANS LES MILIEUX AQUATIQUES

Soutenue publiquement

Le 06 décembre 2011

Devant la commission d'examen formée de

Pr. Jérôme Cachot
Dr. Hélène Budzinski
Dr. Sélim Aït-Aïssa
Pr. Paule Vasseur
Pr. Bruno Le Bizec
Dr. Étienne Vermeirssen
Dr. Patrick Balaguer

Université Bordeaux I
Université Bordeaux I
INERIS, Verneuil en Halatte
Université de Metz
LABERCA, Nantes
EAWAG, Dübendorf, Suisse
INSERM, Montpellier

Président du jury
Directeur de thèse
Directeur de thèse
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté la lourde tâche de juger ce travail. Merci donc à monsieur Jérôme Cachot, professeur à l'Université Bordeaux I ; madame Paule Vasseur, Professeur à l'université de Metz et monsieur Bruno LeBizec, Professeur au laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments (LABERCA) à Nantes, en tant que rapporteurs de cette thèse ; monsieur Etienne Vermeirssen, Docteur au sein de l'institut EAWAG à Dübendorf en Suisse et monsieur Patrick Balaguer chargé de recherche de l'institut de recherche en cancérologie de l'institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM) de l'Université de Montpellier.

Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse est le fruit d'une collaboration entre l'équipe d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo* (ECOT) de l'institut nationale de l'environnement industriel et des risques (INERIS) et le laboratoire de physico-toxico chimie (LPTC) de l'Université Bordeaux I. Ces travaux ont conjointement été financés par une bourse CIFRE de l'ARNT (N° 703/2008), l'INERIS, le réseau ERICHE (Evaluer et Réduire l'Impact de la CHimie sur l'Environnement) et les programmes P189-ECOPI et P189-AP08 du ministère de l'Écologie, du Développement durable, des Transports et du Logement (MEDDTL).

Cette thèse est l'aboutissement d'une aventure de trois ans jalonnée de nombreuses rencontres très enrichissantes d'un point de vue personnel et scientifique qui, au fil du temps, ont permis l'aboutissement de ce travail. Je tiens ici à remercier ces personnes.

Alors un grand merci à ...

... Monsieur Eric Thybaud, responsable du pôle VIVA à l'INERIS et monsieur Jean-Marc Porcher, responsable de l'équipe d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo* pour m'avoir accueilli au sein de l'INERIS.

...Monsieur Selim Aït-Aïssa et madame Hélène Budzinski pour avoir assurés la direction de ces travaux de thèse. Merci à toi Sélim de m'avoir fait confiance pendant les 4 années où nous nous sommes côtoyés, pour ta disponibilité, ta rigueur et tes conseils toujours avisés. Merci à toi Hélène de m'avoir ouvert les portes de ton laboratoire et de m'avoir toujours accorder un peu de ton temps lors de mes quelques séjours, malgré un agenda très chargé.

...L'équipe ECOT & Co pour sa bonne humeur, ses délires et son soutien au quotidien sans lesquels je n'aurai « absolument pas » pu mener si sereinement ce projet scientifique. Merci à François Brion, sans qui je n'aurais vraisemblablement jamais atterri à l'INERIS. Merci également pour tes conseils pertinents et nos nombreuses discussions (scientifiques et autres). Un grand merci également à Benj (Mr « Connard ») pour les *balades* à vélo (promis, je vais réellement m'entraîner) ; à Nat pour tes petit plats après le vélo (promis, je vais me mettre à la cuisine) ; à Olivier (*alias* chaton) pour nos séances de stazes (on remet çà dès que j'ai rendu ce manuscrit) et ton rhum melon (huuummm !!) ; à Cyril pour tes magnifiques T-shirt et tes lapins crétiens (Aaaaahhhh !!) ; à Edith pour ta prévenance (si si je t'assure, ça va, et toi ?) ; à Anne (La rousse ! Euuh ... La « blonde vénicienne », excuses moi) pour ta bonne humeur. Merci également à Wilfried pour cette magnifique campagne sur le Réveillon 2010 (belle gamelle ! Je te rassure, j'ai fait la même un mois plus tard), à Sandrine pour ta bonne humeur, ainsi qu'à Vanessa et aux autres résidents du bâtiment 3-2 ème étage pour leur convivialité.

Une pensée toute particulière pour mes deux compères de bureaux, Sabrina et Damien, merci pour nos nombreux délires d'après 19h, nos diverses mésaventures, nos magnifiques décors de Noël, les quelques nocturnes que nous avons pu partagées et les boulettes de Doudou (non Damien, ça c'est la bouteille d'azote). Je n'oublierai pas ces trois années partagées avec vous, merci.

Merci également aux autres thésards de l'équipe (plus ou moins) : Awa (la pro du bowling et toute jeune maman) à qui je souhaite toute la réussite possible ; Mélanie (futur maman), Anne (la globe trotteuse) et Audrey qui nous ont précédés. Merci également à Samir pour nos prises de tête et à Nadia et Marc pour leur motivation. Une pensée aussi pour Arthur, le thésard voyageur, pour les nombreux délires au labo et en congrès (je ne désespère pas de taper un jour la discute avec K.F).

Une pensée aussi pour les différents stagiaires du labo que j'ai pu croiser au cours de ces trois années, en particulier pour Vévé (la pro du bowling également), Renaud (« il fait chaud ! ») et Morgane (il faut vraiment te couper les cheveux Momo). Merci également à Ines Pany, stagiaire de M1 qui a contribué à ce travail.

Enfin, un très très grand merci à Manue, la perle de l'*in vitro*, pour ton énergie, ta disponibilité, ta bonne humeur quotidienne qui m'ont porté pendant ces trois années.

...L'équipe du LPTC-Aqua qui m'a permis de mener à bien ce projet. Merci tout spécialement à Marie-Hélène pour avoir encadrer mes premiers pas dans le labo. Merci également à Nathalie, Karyn, Patrick, Laurent, Sylvie, Pierre L, Pierre WD et Thomas et Maylis pour leur disponibilité.

Une pensée particulière pour les thésards de l'équipe qui ont su me faire une petite place lors de mes séjours. Merci à Amélie, Coralie et Ninette (courage c'est bientôt fini), à Marion (toute jeune docteur) et à Matthieu (bon courage pour la dernière année) pour les petites soirées, les bouffes du midi, les discussions de couloir et de bureaux. Une pensée également pour la relève : Caroline (l'EDA est entre tes mains !) et Perrine (merci pour la méthode stéroïdes sur l'UPLC).

...L'équipe de Patrick Balaguer pour leur accueil lors de mon court séjour à Montpellier. Un grand merci en particulier à Marina pour ton énergie et ta disponibilité lors des manip sur colonnes récepteurs. Merci à toi Patrick pour ta contribution à ce travail et pour la suite.

...L'équipe de Daniel Zalko à l'INRA de Toulouse pour les manip sur l'Orbitrap. Merci à Adeline, Nicolas, Amélie pour la petite visite de Toulouse.

...À Elizabeth Hill pour avoir accepté de participer à mon comité de pilotage et pour ses conseils sur le fractionnement.

J'adresse également mes sincères remerciements à ...

...Kévin Cailleaud et Joelle Forget-Leray qui ont su me faire découvrir le monde de la recherche et y prendre goût lors de mon stage de M2 à l'université du Havre.

Ces remerciements ne seraient pas complet sans une pensée pour ma famille & Co, alors...

...Merci à mes parents, ma sœur, Kévin et mes grands parents paternels (tu as raison papy, « le travail, c'est la santé ! Mais ne pas travailler c'est la conserver ! ») pour leur soutien sans faille malgré leur inquiétude permanente de ne pas me voir prendre de vacances... promis je vais en prendre ! Une très forte pensée également pour mes grands parents maternels qui nous manquent à tous et à qui je dédis ce travail.

...Merci aux amis de toujours...Julien, Kiki et Nonore, Prisca, Gro et Mag, Julien et Céline, Flo pour leur soutien. Une pensée aussi pour Sarah et Martin et Aurélia et Cyril (promis on se voit très bientôt).

Enfin un grand merci à ...

...Amélie pour ton soutien, ta patiente, ta gentillesse, ta douceur et ton amour. Merci d'être là tout simplement.

...Merci à tous, sans vous, cette thèse n'aurait pas « tout à fait » été la même.

Un petit clin d'œil à ceux qui m'ont soutenu pendant ces trois années, sans jamais totalement comprendre ce que je faisais...

Le petit Nicolas en thèse

Avertissement: On nous a souvent demandé ce que nous faisons comme travail de recherche. Malgré tous nos efforts pour rester vagues et un peu compréhensibles, nos parents, nos amis répliquaient invariablement à nos explications: 'oui, oui...' en soupirant plus ou moins, plus intrigués que jamais. Aussi nous sommes nous résignés à raconter aux masses étonnées non pas notre travail, mais ce qu'est la vie du thésard. Il semblerait que nous ayons réussi, à en croire les premières réactions.

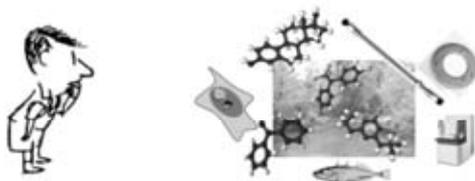
Le Directeur de Thèse

Pour commencer une thèse, il faut avoir un patron. Un patron, c'est un monsieur très, très fort qui me pose un problème et qui va m'aider à le résoudre. Là, c'est mon patron photographié par Christian Mercatier-Bresson.



La Recherche

Au début, c'est tellement compliqué, on n'y comprend rien.



On peut passer des heures et des heures à chercher sans rien trouver. Dans ces moments-là, mon papa et ma maman sont drôlement inquiets et quand ma maman demande si c'était une bonne idée de faire faire une thèse au petit (c'est moi), mon papa ouvre la bouche sans parler, il agite les bras, et il s'en va lire le journal dans le salon.



La Découverte

Des fois, c'est super, parce que je découvre des trucs que mon patron m'avait demandés. Evidemment, ça peut arriver à n'importe quelle heure, et mes parents ne sont pas toujours ravis.



Ils se demandent si je ne deviens pas complètement fou, mais ma maman sait que mon papa n'aime pas qu'elle le lui dise.

Moi, je trouve ça plutôt normal d'être content. D'ailleurs, quand mon patron trouve un théorème, il est super fier et ses copains (qui sont aussi des gens très, très forts) sont super contents de lui. Mais ça mes parents, ils ne le savent pas.



Des fois aussi, ça se passe mal, parce que je me trompe. Et quand je me trompe, avec mon patron, ça ne rigole pas, mais alors pas du tout. 'Regardez-moi dans les yeux, Nicolas', il me dit, pas content du tout. 'Vous appelez ça du travail, peut-être ?' qu'il me demande. Eh ben, là, ça a l'air d'une question, mais il ne faut surtout pas répondre, parce que sinon, il se fâche tout rouge !

Les Séminaires

De temps en temps, un monsieur très, très important et vachement fort (mais pas aussi fort que mon patron, quand même) vient nous parler de trucs super-complicés. ça s'appelle un séminaire, et pendant un séminaire, ça ne rigole pas non plus. Quand le monsieur a fini de parler, mon patron lui pose des tas de questions très compliquées, et il ne sait pas toujours répondre. Et là c'est pas juste, parce que lui, il ne se fait pas disputer !



La Soutenance

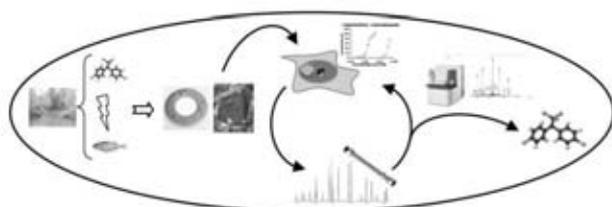


Quand j'aurai fini, il y aura une grande cérémonie avec plein de gens très, très forts (il y aura même d'autres patrons, c'est dire) et il y aura un vieux monsieur très, très important qui me dira que c'est très bien, mon petit, les chemins de la Recherche me sont glorieusement ouverts et je suis l'honneur de mes parents et l'orgueil de mon pays, et tout le baratin. Et après, il y aura un super goûter avec tous mes amis. Génial !

Et quand il lira tout cela dans le journal, mon papa sera très fier et ma maman sera tellement contente qu'elle me servira deux fois de la crème renversée, mon dessert préféré. C'est vraiment super, une thèse, à la fin !



La Gloire



D'ailleurs les filles, ça les impressionne drôlement de savoir qu'on a fait une thèse d'écotoxicologie et qu'on a identifié des tas de perturbateurs endocriniens et tout, et tout. Même la maman d'Amélie, elle me fait des grands sourires maintenant, alors qu'elle trouvait que j'étais un petit garçon très turbulent.

Dessins: Adaptés de J.J. Sempé, Formules: Y. Bugeaud - M. Mignotte - F. Normandin,

Texte: Adapté de G. Taviot, Mise en page: G. Taviot, A. Maes

Sommaire

Table des figures	I
Table des tableaux	III
Liste des abbréviations	IV
Publications et communications	V
Introduction générale	1
Synthèse bibliographique	5
1. Les polluants émergents dans les milieux aquatiques	7
1.1 Niveaux de contamination	7
1.2 Contexte réglementaire	8
1.3 Conclusion	9
2. Les perturbateurs endocriniens (PE)	10
2.1 Définitions	10
2.2 Mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens	11
2.2.1 Effets médiés par les récepteurs nucléaires.....	12
2.2.1.1 Les récepteurs nucléaires : généralités.....	12
<i>Classifications</i>	12
<i>Structure</i>	13
<i>Modes d'actions des récepteurs nucléaires</i>	13
<i>Notion d'affinité, d'efficacité et de potentialité</i>	14
2.2.1.2 Les récepteurs stéroïdiens.....	15
<i>Les récepteurs des œstrogènes (ER)</i>	15
<i>Le récepteur des androgènes (AR)</i>	16
<i>Le récepteur de la progestérone (PR)</i>	17
<i>Les récepteurs des corticostéroïdes</i>	19
2.2.1.3 Les récepteurs des xénobiotiques	19
<i>Le récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR)</i>	19
<i>Les récepteurs PXR/CAR</i>	20
2.2.1.4 Autres récepteurs nucléaires	23
<i>Les récepteurs PPAR et RXR</i>	23
<i>Les récepteurs de la thyroxine (TR)</i>	24
2.2.1.5 Les récepteurs membranaires.....	25
2.2.1.6 Crosstalk et effets de mélange	26
<i>Présentation générale</i>	26
<i>Interaction ER-AhR</i>	27
<i>Interaction GR/PXR, PXR/AhR et GR/AhR</i>	27
2.2.1.7 Conclusion	28
2.2.2 Effets non médiés par les récepteurs nucléaires.....	28
2.2.2.1 Modulation de la biosynthèse hormonale	28
2.2.2.2 Modulation du métabolisme des hormones endogènes.....	30

	<i>Présentation générale</i>	31
	<i>Le CYP1A</i>	32
	<i>Le CYP3A</i>	32
	<i>Perturbation du métabolisme</i>	32
2.2.2.3	Modulation du transport des hormones endogènes.....	33
2.2.3	Conclusions.....	33
2.3	Méthodes biologiques pour l'étude des perturbateurs endocriniens	34
2.3.1	Outils <i>in vivo</i> pour l'étude des PE	34
2.3.1.1	Échelles moléculaire et biochimique	34
2.3.1.2	Échelle tissulaire et de l'organisme	35
2.3.1.3	Réponse moléculaire à l'échelle de l'organisme	35
2.3.1.4	Conclusion.....	36
2.3.2	Outils <i>in vitro</i> pour l'étude des PE.....	36
2.3.2.1	Généralités.....	36
2.3.2.2	Mesure de <i>binding</i>	37
2.3.2.3	Mesure de prolifération cellulaire.....	37
2.3.2.4	Utilisation de gènes naturels ou rapporteurs.....	38
2.3.2.5	Conclusion.....	40
3.	Évaluation de la contamination <i>in situ</i> : les approches bio-analytiques	41
3.1	La préparation des échantillons	41
3.1.1	Le sédiment.....	41
3.1.1.1	Une matrice complexe	41
3.1.1.2	Extraction : Prise en compte de la diversité et de la biodisponibilité	42
3.1.1.3	Purification	44
3.1.2	La colonne d'eau.....	45
3.1.2.1	Une contamination diffuse et périodique.....	45
3.1.2.2	L'échantillonnage passif.....	45
3.2	Détection des perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques	47
3.2.1	Les approches de chimie analytique	47
3.2.1.1	Généralités sur la spectrométrie de masse	48
3.2.1.2	Couplage CPG/SM(SM), CLHP/SM(SM).....	49
3.2.1.3	Tendances actuelles	49
3.2.1.4	Conclusions	51
3.2.2	La bio-détection des PE	52
3.2.2.1	Généralités sur les outils de bio-détection spécifiques	52
3.2.2.2	De nouveaux outils pour des polluants émergents.....	52
3.2.2.3	Approche multi-cibles	54
3.2.2.4	Des outils adaptés au milieu aquatique.....	54
3.2.2.5	Conclusions	54
3.3	L'analyse de l'équilibre des masses ou <i>Mass Balance Analysis</i> (MBA)	55
3.4	L'analyse dirigé par l'effet ou <i>effect directed analysis</i> (EDA)	57
3.4.1	Généralités sur l'approche EDA	57
3.4.2	De nouvelles cibles biologiques.....	60
3.4.3	Des méthodes physico-chimiques adaptées	60
3.4.4	La prise en compte du devenir des contaminants.....	62
3.4.5	Développement de stratégie d'identification et de confirmation	63
3.4.5.1	Identification et confirmation analytique.....	63

Démarche expérimentale	65
1. Objectifs et stratégie bio-analytique.....	67
2. Choix méthodologiques.....	67
2.1 Approche multi-récepteurs	67
2.1.1 La lignée HG5LN-hPXR	68
2.1.2 L'activité du CYP3A surcellules de poissons	68
2.2 Approche multi-compartiment.....	70
2.2.1 Le sédiment.....	70
2.2.1.1 L'échantillonnage	70
2.2.1.2 L'extraction: <i>Accelerated Solvent Extraction</i> (ASE).....	70
2.2.1.3 Purification par chromatographie de perméation de gel (GPC).....	71
2.2.2 La colonne d'eau.....	71
2.2.2.1 L'échantillonnage	71
2.2.2.2 L'extraction	72
2.3 Stratégie de fractionnement des extraits environnementaux.....	72
2.3.1 Fractionnement primaire : pré-fractionnement par SPE.....	74
2.3.2 Fractionnement secondaire : hyperfractionnement par CLHP	74
2.3.3 Fractionnement ciblé sur colonne récepteur.....	76
2.4 Stratégie d'identification chimiques.....	76
2.4.1 Analyses chimiques quantitatives	76
2.4.2 Analyses chimiques non ciblés pour l'identification de composés inconnus.....	77
2.5 Les sites d'études.....	78
2.5.1 Le Réveillon.....	78
2.5.2 La Dore	78
Résultats	81
1. Nouveaux outils <i>in vitro</i> pour la détection de PE émergents	83
1.1 Utilisation du récepteur hPXR	83
1.1.1 Caractérisation de la lignée HG5LN-hPXR.....	84
1.1.2 Détection d'activateurs du hPXR dans les matrices environnementales.....	86
1.2 Utilisation de l'activité CYP3A chez le poisson.....	113
1.2.1 Caractérisation <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de l'activité BFCOD.....	113
1.2.2 Évaluation <i>in situ</i> de l'activité BFCOD	129
1.3 Conclusions.....	131
2. Mise en œuvre de l'EDA pour l'identification de PE.....	132
2.1 Calibration d'outils physico-chimiques	132
2.1.1 Échantillonnage passif de la colonne d'eau	132
2.1.2 Extraction du sédiment	143
2.1.3 Préparation des échantillons de sédiment	143
2.1.3.1 Extraction du sédiment par ASE.....	143
2.1.3.2 Purification par GPC	162
2.2 Application 1 : Le Réveillon : contamination agricole et urbaine.....	165

2.2.1	Identification de ligands du hPXR et du ER dans le sédiment.....	165
2.2.2	Etude de la compartimentation de la contamination	185
2.3	Application 2 : La Dore : contamination pharmaceutique	199
	Discussion générale	231
	Conclusion générale	241
	Références bibliographiques	247

Table des figures

Figure 1. Mode d'action des perturbateurs endocriniens	11
Figure 2. Structure des récepteurs nucléaires	13
Figure 3. Modes d'actions des récepteurs nucléaires	13
Figure 4. Exemple de courbes dose réponse et d'établissements de l'EC50	14
Figure 5. Rôle des récepteur PXR et CAR	21
Figure 6. Pourcentages d'analogie de séquence entre les LBD des PXR et du hCAR	23
Figure 7. Voie d'action génomique (1) et non génomique (2) par les stéroïdes	25
Figure 8. Les différents mécanismes du cross-talk ER-AhR	27
Figure 9. La stéroïdogénèse chez l'Homme	29
Figure 10. Stéroïdogénèse chez les poissons téléostéens	29
Figure 11. Métabolisation de stéroïdes endogènes	31
Figure 12. Paradigme de l'analyse en écotoxicologie	34
Figure 13. Méthodes pour la détection des composés œstrogéniques	37
Figure 14. Principe de la mesure de l'activité EROD <i>in vitro</i>	38
Figure 15. Principe de l'utilisation de gène rapporteur luciférase	40
Figure 16. Approches pour l'évaluation de la contamination des milieux aquatiques par les PE	41
Figure 17. Différentes approches pour la prise en compte de la biodisponibilité	43
Figure 18. Cinétique d'échantillonnage des échantillonneurs passifs	46
Figure 19. Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse	48
Figure 20. Exemple de calcul d'un TEQ-bio à partir d'un bioessai <i>in vitro</i>	52
Figure 21. Le principe de la <i>mass balance analysis</i> (MBA)	55
Figure 22. Principe de l'approche EDA	58
Figure 23. Recensement d'études publiées sur les effets biologiques utilisés dans des études EDA	60
Figure 24. Démarche expérimentale mise en œuvre	66
Figure 25. La lignée HG5LN-hPXR	68
Figure 26. Principe de la mesure de l'activité BFCOD	69
Figure 27. Photographies du prélèvement de sédiment	70
Figure 28. Photographie d'un appareil ASE 350® et son principe d'utilisation	70
Figure 29. Photographies des POCIS et des SPMD	72
Figure 30. Procédure d'utilisation des capteurs passifs	73
Figure 31. Les différentes étapes du pré-fractionnement sur cartouche de silice	74
Figure 32. Système CLHP utilisé pour l'hyperfractionnement	75
Figure 33. Profil de séparation chromatographique du mélange de 35 PE	75
Figure 34. Principe d'utilisation des colonnes d'affinité aux récepteurs nucléaires	76
Figure 35. La rivière Réveillon	78
Figure 36. La rivière Dore	79
Figure 37. Activité EROD/BFCOD dans le modèle embryo-larvaire exposé à des extraits de sédiment	129
Figure 38. Activité EROD et BFCOD dans les modèles <i>in vitro</i> exposés à des extraits environnementaux	130
Figure 39 : Profil d'élution du mélange étalon utilisé pour la calibration de la GPC	162

Figure 40. Classification des sites selon leur profil d'activités biologiques.....	235
Figure 41. Position de l'EDA au regard de l'évaluation du risque écologique	238
Figure 42. Perspectives stratégiques pour la surveillance bio-analytique des milieux aquatiques et leur gestion	244

Table des tableaux

Tableau.1. Niveaux de contamination des milieux aquatiques	6
Tableau 2. Liste des substances prioritaires de la DCE. (En gras, les substances dangereuses).....	8
Tableau 3. Effets biologiques de certains perturbateurs endocriniens	10
Tableau 4. Origine et nature des perturbateurs endocriniens	11
Tableau 5. Classification de la superfamille des récepteurs nucléaires.....	12
Tableau 6. Exemples de ligands environnementaux des récepteurs des œstrogènes	16
Tableau 7. Exemples d'agonistes et d'antagonistes environnementaux du récepteur AR chez l'Homme.....	17
Tableau 8. Exemples de ligands environnementaux du récepteur PR.....	18
Tableau 9. Ligands environnementaux du PXR chez l'Homme et les poissons téléostéens.....	22
Tableau 10. Récepteurs membranaires identifiés chez l'Homme et les poissons téléostéens.....	26
Tableau.11. Les principaux <i>cross-talk</i> décrits dans la littérature	26
Tableau 12. Effets des PE sur la stéroïdogénèse chez les mammifères et les poissons téléostéens	30
Tableau 13. Enzymes de phase I et II du métabolisme des xénobiotiques et des hormones endogènes	31
Tableau 14. Interactions des polluants environnementaux avec les enzymes de phase I et II.	33
Tableau 15. Exemples d'outils <i>in vitro</i> pour l'étude des PE à action œstrogénique	36
Tableau 16. Bioessais <i>in vitro</i> basés sur l'expression de gène naturel ou rapporteur en lignées cellulaire.....	39
Tableau 17. Méthodes d'extraction de matrices solides.....	42
Tableau 18. Capteurs passifs couramment utilisés pour échantillonner la colonne d'eau	46
Tableau 19. Méthodes de chimie analytique utilisées pour la détection des PE dans les milieux aquatiques.....	50
Tableau 20. Quantifications d'activités biologiques dans les matrices environnementales	53
Tableau 21. Etudes basées sur l'approche MBA.....	57
Tableau 22. Etudes basés sur l'approche EDA.	59
Tableau 23. Procédures de fractionnement utilisées dans des études EDA	61
Tableau 24. Comparaison des différents analyseurs utilisés pour l'identification de composés inconnus	64
Tableau 25. Les différentes lignées cellulaires utilisées au cours de cette thèse.....	67
Tableau 26. Gradient d'élution d'élution utilisé pour l'hyperfractionnement.....	75
Tableau 27. Méthodes utilisées pour les analyses chimiques ciblées	77
Tableau 28. Résumé du screening de polluants environnementaux sur la lignée HG5LN-hPXR	85
Tableau 29. Temps de rétention des standards employés pour la calibration de la GPC	162
Tableau 30. Activités détectées au sein de l'extrait de sédiment avant et après purification.....	163
Tableau 31. Distribution des activités entre le sédiment et la colonne d'eau.....	198

Liste des abbréviations

AE : acétate d'éthyle	MBA : <i>mass balance analysis</i>
AhR : récepteur des hydrocarbures aromatiques	MeOH : méthanol
AhRR : répresseur du Récepteur des hydrocarbures aromatiques	MDR : <i>multi-drug resistance</i>
ARNT : agent de translocation du AhR	MR : <i>mineralocorticoid receptor</i> ou récepteurs aux minéralocorticoïdes
AKP : alkylphénols	MRM : <i>multi-reaction monitoring</i>
AR : <i>androgen receptor</i> ou récepteur des androgènes	MRP : <i>multi Resistance protein</i>
ARE : élément de réponse des androgènes	NQE : norme de qualité environnementale
ARNT :	OCP : pesticides organochlorés
ASE : accelerated solvent extraction	PCB : polychlorobiphényles
BkF : benzo[k]fluoranthène	PE : perturbateurs endocriniens
BFC : 7-Benzyloxy-4-trifluorométhylcoumarine	PES : polyester sulfone
BFCOD : benzyloxy-4-[trifluorométhyl]-coumarine-O-debenzyloxylyase	PRC : <i>performance reference compound</i>
BPA : bisphénol A	POCIS : <i>polar organic compound integrative sampler</i>
CA : <i>concentration addition</i>	PNEC : <i>predicted no effect concentration</i> ou concentration sans effet observé
CAR : <i>constitutive androstanes receptor</i> ou récepteur des androstanes	PPAR : <i>peroxisome proliferator activated receptor</i>
CLHP : chromatographie liquide haute pression (RP : phase inverse ; NP : phase normale)	PR : <i>progesterone receptor</i> ou Récepteur des progestagènes
CPG : chromatographie en phase gazeuse	PRE : élément de réponse des progestagènes
DaA : dibenzo[a,h]anthracène	PXR : <i>pregnane X receptor</i> ou Récepteur des pregnanes et des xénobiotiques
DBD : <i>DNA binding domain I</i> ou domaine de fixation à l'ADN	Q : analyseur quadripole
DCE : directive cadre sur l'eau	QqQ : triple quadripole
DCM : dichlorométhane	Q-TOF : spectromètre de masse hydride quadripole / analyseur temps de vol
DEHP : di(2-éthylhexyl)phthalate	RAR : <i>retinoic Acid Receptor</i>
DHT : di-hydroxytestostérone	RMN : résonance magnétique nucléaire
DRE : élément de réponse de la dioxine	RRLC : <i>rapid Resolution Liquid Chromatography</i>
ECD : <i>electron capture detector</i>	RXR : <i>retinoid X receptor</i>
EDA : <i>effect directed analysis</i>	SIM : <i>single ion monitoring</i>
EPA : <i>environmental protection agency</i>	SIS : <i>Single Ion Storage</i>
ER : récepteur des œstrogènes	SM : spectrométrie de masse
ERE : élément de réponse des œstrogènes	SPE : extraction sur phase solide
EROD : éthoxyrésorufine-O-dééthylase	SPMD : <i>semi permeable membrane device</i>
FID : <i>flame ionization detector</i>	SRM : <i>selected reaction monitoring</i>
GFP : <i>green fluorescence protein</i>	STEP : station d'épuration
GPC : <i>gel permeation chromatography</i> ou chromatographie de perméation de gel	SULT : sulfotransférases
GR : <i>glucocorticoid receptor</i> ou Récepteur des glucocorticoïdes	TBT : tributylétain
GRE : <i>glucocorticoid responsive element</i> ou élément de réponse des glucocorticoïdes	TEF : <i>toxic equivalent factor</i> ou facteur de toxicité équivalent
GST : glutathion-S-transférase	TEQ : <i>toxic equivalent</i> ou équivalent toxique
HAH : hydrocarbures aromatique halogénés	TEQ-bio : équivalent toxique biologique
HAP : hydrocarbures aromatique polycyclique	TEQ-chim : équivalent toxique chimique
HFC : 7-hydroxy-4-trifluorométhylcoumarine	TPP : triphényl phosphate
HSD : hydroxystéroïde déhydrogénase	TR : récepteur à la thyroxine
IT : analyseur à trappe à ion	TRE : élément de réponse à la thyroxine
LBD : <i>ligand binding domain</i> ou domaine de liaison du ligand	TTR : transporteur du récepteur à la thyroxine
LDPE : <i>low density lipoprotein</i>	UDP-GT : uridine diphosphate glucuronyltransférase
	UPLC : <i>ultra performance liquid chromatography</i>
	VDR : <i>vitamin-D receptor</i> ou récepteur à la vitamine D
	VTG : vitellogénine

Publications et communications

~ARTICLES PUBLIÉS~

Creusot N., Kinani S., Balaguer P., Tapie N., Lemenach K., Maillot-Maréchal E., Porcher J.-M., Budzinski H., Aït-Aïssa S. Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples *Analytical Bioanalytical Chemistry* 396, 2 (2010) 569-83 (**Article 1**, p87)

Kinani S, Bouchonnet S, **Creusot N**, Bourcier S, Balaguer P, Porcher JM, Aït-Aïssa S. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers *Environmental Pollution* 158, 1 (2010) 74-83 (**Article 2**, p102)

Tapie N., Devier M.H., Soulier C., **Creusot N.**, Le Menach K. Aït-Aïssa S., Vrana B., Budzinski H. Passive samplers for chemical substance monitoring and associated toxicity assessment in water *Water Science and Technology* 63,1 (2011) 2418-2426 (**Article 4**, p133)

~ARTICLES EN PRÉPARATION~

Creusot N, Brion F, Piccini B, Budzinski H, Porcher JM, Aït-Aïssa S. Modulation of CYP3A-like activity by aryl hydrocarbon and nuclear receptor ligands in fish cell lines and zebrafish embryos (**Article 3**, p115)

Creusot N, Aït-Aïssa S, Porcher JM, Dévier MH, Budzinski H. Evaluation of pressurized liquid extraction of mixture of active endocrine disrupting chemicals in sediment using biological and chemical analyses (**Article 5**, p144)

Creusot N, Budzinski H, Balaguer, P, Porcher JM, Aït-Aïssa S. Effect directed analysis (EDA) of multiple endocrine disrupting activities: identification of ER and PXR ligands in a multi-contaminated river sediment. (**Article 6**, p166)

Creusot N, Tapie N, Piccini B, Porcher JM, Budzinski H, Aït-Aïssa S. Distribution of multiple endocrine disrupting activities between sediment and surface water using passive sampling in a French river under mixed anthropogenic pressures. (**Article 7**, p186)

Creusot N, Tapie N, Porcher JM, Budzinski H, Aït-aïssa S. Multiple *in vitro* steroid-like and xenobiotic activities and chemical identification of active synthetic steroid compounds in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges. (**Article 8**, p200)

~CONGRÈS~

Communisations orales

Aït-Aïssa S., **Creusot N.**, Porcher J.-M., Balaguer P., Budzinski H. Approche bio-analytique combinant outils biologiques *in vitro* et analyses chimiques pour la détection et l'identification de composés perturbateurs endocriniens et *dioxin-like* dans des mélanges complexes. Recueil des résumés du colloque de la SEFA 2011.

Dévier M.H., **Creusot N.**, Tapie N., Belles A., Porcher J.M., Aït-Aïssa S., Budzinski H. Utilisation combinée des capteurs passifs et des bioessais *in vitro* : une méthode alternative de surveillance des rejets et des masses d'eau pour la mise en évidence de perturbateurs endocriniens dans le milieu aquatique. Recueil des résumés du colloque de la SEFA 2011.

Creusot N., Dévier M.H., Porcher J.M., Budzinski H. Aït-Aïssa S. Identification and compartmentalization study of emerging EDCs in an impacted river systems by using an EDA approach. Abstract book of the 21th European SETAC, 15-19 Mai 2011, Milan

Creusot N., Tapie N., Lemenach K., Balaguer P., Maillot-Maréchal E., Porcher J.-M., Budzinski H., Aït-Aïssa S. Combined use of passive sampling and *in vitro* bioassays for the detection of emerging pollutants in surface water. Abstract book of the 20th European SETAC, 37-27 Mai 2010, Seville.

Communications par affiches

Creusot N., Dévier M.H., Porcher J.M., Budzinski H. Aït-Aïssa S. Optimization of accelerated solvent extraction (ASE) of wide range of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in sediment. Abstract book of the 21th European SETAC, 15-19 Mai 2011, Milan

Creusot N., Porcher J.M., Budzinski H. Aït-Aïssa S. Multistep-fractionation based on normal phase SPE and reverse phase HPLC (RP-HPLC) for isolation of endocrine disrupting chemicals in environmental extracts. Abstract book of the 21th European SETAC, 15-19 Mai 2011, Milan

Jondeau-Cabaton A., **Creusot N.**, Soucasse A., Grimaldi M., Aït-Aïssa S., Balaguer P., Debrauwer L., Zalko D. Nuclear Receptor-based affinity columns as an innovative tool for the isolation and the identification of estrogenic substances present in complex matrices Abstract book of the 6th Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors April 26-29, 2011

Dévier M.H., Tapie N., **Creusot N.**, Lemenach K., Porcher J.M., Aït-Aïssa S., Budzinski H. Passive samplers and associated endocrine disruption assessment in water. NATO SfP 982590 project workshop. 23-26 September 2010, Dubrovnik, Croatia.

Creusot N., Tapie N., Dévier M.H., Porcher J.M., Budzinski H. et Aït Aïssa S. Comparison of two *in vitro* bioassays for the characterization of dioxin-like compounds in French freshwater sediments Recueil des résumés du colloque Adebitech, eau et polluants émergents, 20 – 22 Octobre 2009

Aït Aïssa S., Maillot-Maréchal E., **Creusot N.**, Porcher J.M. Assessment of steroid- and dioxin-like compounds in sediments and domestic effluents in the Artois-Picardie watershed by using *in vitro* bioassays Recueil des résumés du colloque Adebitech, eau et polluants émergents, 20 – 22 Octobre 2009

Creusot N., Kinani S., Porcher J.M., Balaguer P., Tapie N., Budzinski H., Aït-Aïssa S. Detection of pregnane X receptor (PXR) active chemicals in French rivers by using *in vitro* bioassays and chemical analyses. Abstract book of the 15th PRIMO, 17-20 Mai 2009, Bordeaux.

Introduction générale

L'anthropisation croissante du siècle dernier a conduit à l'émission, dans l'environnement aquatique, d'un grand nombre de contaminants chimiques de nature et d'origine diverses (e.g. urbaine, industrielle, agricole). Parmi ces substances, nombreuses sont celles qualifiées de perturbateurs endocriniens (PE) de par leur capacité à altérer le développement, la reproduction et l'homéostasie des organismes exposés à travers de multiples mécanismes d'action (Kavlock *et al.* 1996). Parmi ces derniers, la fixation des composés aux récepteurs nucléaires et la modulation des voies de signalisation dépendantes de ces récepteurs reste le mécanisme le plus décrit. Du fait des risques encourus par les populations exposées, humaines et animales, une attention croissante a été portée sur ces molécules durant la dernière décennie à la fois dans le domaine des sciences fondamentales et dans celui des sciences appliquées (Hotchkiss *et al.* 2008). Cette prise de conscience des risques posés par les PE s'est également traduite au niveau réglementaire, avec une volonté d'inclure la notion de perturbation endocrine dans les nouvelles politiques d'évaluation des dangers et des risques liés aux substances chimiques (e.g. règlement européen REACH, règlement sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques). Toutefois, les outils actuellement disponibles pour évaluer les risques environnementaux ne fournissent qu'une vision partielle de la complexité environnementale.

La directive cadre sur l'eau (directive 2000/60/CE) qui vise à atteindre un bon état écologique et chimique des eaux de surface et souterraines d'ici 2015, a défini une liste de 41 substances prioritaires afin d'évaluer la qualité chimique des milieux. S'il est nécessaire et indispensable de définir un cadre d'application de la surveillance chimique, ce nombre apparaît très faible au regard des milliers de molécules potentiellement dangereuses présentes dans les systèmes aquatiques européens. Ces polluants incluent entre autre des pesticides, des surfactants, des plastifiants, des retardateurs de flammes, des composés pharmaceutiques, des stéroïdes, des métaux, des composés organiques persistants (polychlorobiphényles, dioxines, furanes, composés aromatiques polycycliques...). Nombre de ces polluants, présents au sein de mélanges complexes et à des concentrations très variables, peuvent contribuer à l'altération de l'état écologique des écosystèmes, en agissant à différents niveaux d'organisation biologique. Face à ce constat, il existe actuellement un besoin de définir et de mettre en place des stratégies permettant la détection d'une large diversité de composés et l'identification de molécules (éco)toxiques dans l'environnement.

Dans ce contexte, l'emploi de bioessais *in vitro* basés sur les mécanismes d'action moléculaire des polluants apparaît pertinent du point de vue (éco)toxicologique. Dans une perspective de détection de PE capables d'interagir avec des récepteurs nucléaires, les systèmes cellulaires *in vitro* basés sur le couplage récepteur/gène rapporteur présentent l'intérêt de permettre une détection spécifique, sensible et quantitative de l'ensemble des polluants actifs au sein de matrices complexes. De tels outils de criblage sont de plus en plus utilisés pour tracer les sources de pollution dans un cadre de surveillance de la contamination chimique environnementale (Louiz *et al.* 2008). Néanmoins, utilisés seuls, ils ne permettent pas l'identification des composés actifs à l'origine des effets mesurés. Ainsi, ils sont fréquemment couplés à des méthodes physico-chimiques d'analyse au sein de stratégies intégrées dites bio-analytiques de manière à identifier les polluants actifs dans des matrices complexes. Les approches basées sur l'analyse dirigée par l'effet ou « *effect directed analysis* » (EDA) ont ainsi connu un essor notable depuis quelques années (Brack 2003).

L'approche EDA vise à identifier les composés actifs en orientant l'analyse chimique par les résultats des bioessais. Dans son principe, elle combine des outils de biodétection avec des outils de fractionnement physico-chimique de manière à réduire la complexité du mélange initial et d'isoler progressivement les composés d'intérêt, lesquels sont finalement identifiés par analyse chimique. Cette approche, bien que relativement récente, a démontré son

efficacité pour l'identification de divers toxiques dans différentes matrices environnementales (Brack *et al.* 2007).

Dans le cas des PE, bien que principalement décrite pour les composés œstrogéniques et *dioxin-like*, sa mise en œuvre avec des outils de biodétection adaptés pourrait permettre l'identification de PE émergents très peu considérés actuellement. En effet, dans l'environnement, les effets majoritairement rapportés sont ceux impliquant les voies de signalisation du récepteur des œstrogènes (ER) ou du récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR). Néanmoins des études récentes rapportent l'occurrence dans les systèmes aquatiques de substances actives sur d'autres récepteurs nucléaires comme le *pregnane X receptor* (PXR), le récepteur des androgènes (AR), le récepteur des glucocorticoïdes (GR) ou encore celui de la progestérone (PR) (Mnif *et al.* 2010, Van der Linden *et al.* 2008). L'identification des composés environnementaux responsables de ces activités constitue donc un nouveau challenge de recherche.

Enfin, les derniers progrès réalisés dans le domaine de la chimie analytique fournissent des outils performants qui permettent d'envisager l'identification des molécules actives détectées par les bioessais à l'état de trace. Néanmoins un certain nombre de verrous méthodologiques persistent actuellement au regard de la diversité des composés actifs et de leur propriétés physico-chimiques. Ces enjeux concernent notamment l'échantillonnage, l'extraction, la stratégie de fractionnement ou encore l'identification finale des composés actifs.

L'objectif général de cette thèse concerne la mise en place et l'évaluation d'une approche de type EDA pour la caractérisation de la contamination des milieux aquatiques par les PE et leur identification. De manière plus spécifique ce travail a visé à :

- (1) développer et évaluer de nouveaux outils *in vitro* pour la détection de polluants émergents et ainsi augmenter la capacité de diagnostic environnemental à travers la mise en œuvre d'approche multi-récepteurs ;
- (2) calibrer des outils physico-chimiques d'échantillonnage, d'extraction et de fractionnement de manière à permettre l'étude d'une diversité de composés actifs pris en compte par les bioessais *in vitro* ;
- (3) étudier la compartimentation de la contamination entre le sédiment et la colonne d'eau, à travers notamment l'utilisation combinée de capteurs passifs et de bioessais *in vitro* ;
- (4) identifier des PE à travers la mise en œuvre d'une approche EDA intégrant l'ensemble de ces outils dans des sites soumis à des sources de contamination différentes.

Ce manuscrit s'organise en trois grandes parties :

- ✓ Une première partie bibliographique dresse un état des lieux non exhaustif sur l'état de contamination des milieux aquatiques par les polluants émergents et les perturbateurs endocriniens. Il s'en suit une description de leurs mécanismes d'action, des méthodes employées pour leur détection dans le milieu et des enjeux de recherche portant sur leur caractérisation environnementale et leur identification.
- ✓ La seconde partie présente la démarche expérimentale employée au cours de cette thèse avec une description de nos objectifs et des choix méthodologiques.
- ✓ La troisième partie est consacrée à la présentation des résultats sous la forme d'articles ainsi qu'à une discussion générale.

Synthèse bibliographique

Tableau 1. Niveaux de contamination des milieux aquatiques par différentes classes de contaminants organiques (Stéroïdes = Estradiol, estrone, oestril, éthinyl-estradiol, progestérone ; Alkylphénols = 4-tert-octylphénol, nonylphénol ; BPA = bisphénol A ; PCP = *personal care product* = benzophénone, triclosan, parabènes, musks)

Eau			Sédiment			
Composés	Concentrations (ng/L)	Références	Composés	Concentrations (ng/g)	Références	
Effluents	1	Ingrand <i>et al.</i> 2002	Lac	Alkylphénols / BPA	100-1000	Koh <i>et al.</i> 2005
	5	Cargouet <i>et al.</i> 2004		HAP / PCB	100-1000	Koh <i>et al.</i> 2005
	1-20	Lagana <i>et al.</i> 2004		Pesticides	10	Koh <i>et al.</i> 2005
	3	Labadie et Budzinski 2005		Alkylphénols / BPA	100-1000	Song <i>et al.</i> 2006
	100-1000	Castiglioni <i>et al.</i> 2005		Alkylphénols / BPA	1-10000	Arditsoglou et Voutsas, 2008
	400	Thomas <i>et al.</i> 2001		10,0-5000	Navarro-Ortega <i>et al.</i> 2010	
	800	Thomas <i>et al.</i> 2001 b	Rivière	PCB	1-10	Liu <i>et al.</i> 2006
	30,0-2000	Lagana <i>et al.</i> 2004		PCB	0,02-0,25	Keiter <i>et al.</i> 2008
	50-1000	Hilton et Thomas 2003			50	Buzitis <i>et al.</i> 2006
	1000	Carballa <i>et al.</i> 2004		PCDD/DF	0,15-5,0	Keiter <i>et al.</i> 2006
	10	Castiglioni <i>et al.</i> 2005			0,100-60,0	Liu <i>et al.</i> 2006
	5-600	Zuccato <i>et al.</i> 2005		PBDE	0,20-10,0	Liu <i>et al.</i> 2006
	100-600	Togola et Budzinski 2007a		HAP	1000-130000	Vondracek <i>et al.</i> 2001
	10-200	Kim <i>et al.</i> 2007			500-13000	Brack et Schirmer 2003
	10-2000	Togola et Budzinski 2008		Pesticides	100	Song <i>et al.</i> , 2006
1-100	Vanderford <i>et al.</i> 2003			10000	Smalling et Kuivila 2008	
1-500	Chang <i>et al.</i> 2010	Côte		1-500	Villaverde <i>et al.</i> 2008	
1	Aerni <i>et al.</i> 2004		Stéroïdes	1	Ternes <i>et al.</i> 2002	
1-10	Zhang <i>et al.</i> 2006			1	Labadie et Hill 2007	
20	Cargouët <i>et al.</i> 2004			1	Kinani <i>et al.</i> 2008	
1000	Aerni <i>et al.</i> 2004		HAP	20-200	Sanctorum <i>et al.</i> 2007	
1-10	Zhang <i>et al.</i> 2006	Stéroïdes	1-500	Louiz <i>et al.</i> 2008		
15-1500	Lagana <i>et al.</i> 2004		0,1-0,4	Houtman <i>et al.</i> 2006		
10-100	Arditsoglou et Voutsas 2008	Boue de station d'épuration				
5000	Navarro-Ortega <i>et al.</i> 2010	Composés pharmaceutiques	1-100	Jelic <i>et al.</i> 2009		
1-100	Vanderford <i>et al.</i> 2003	PCP	20000	Barron <i>et al.</i> 2008		
50	Hilton et Thomas 2003	Stéroïdes	50-400	Nieto <i>et al.</i> 2008		
2-300	Zuccato <i>et al.</i> 2005	Organisme				
1-100	Zhang et Zhou 2007	PCB / Pesticides	0,1-10 / 25	Khim <i>et al.</i> 2000		
1-100	Togola et Budzinski., 2007a	PCB et HAP	1000	Cailleaud <i>et al.</i> 2007a		
1-100	Togola et Budzinski 2008	HAP	100-500	Isobe <i>et al.</i> 2007		
50-300	Cuderman et Heath 2007	Alkylphénols + BPA	50-300	Wang <i>et al.</i> 2007		
1-1000	Brausch et Rand 2010	Alkylphénols + BPA	5000	Cailleaud <i>et al.</i> 2007b		
10-1000	Battaglin 2010	Alkylphénols + BPA	100-1000	Isobe <i>et al.</i> 2007		

1. Les polluants émergents dans les milieux aquatiques

Les écosystèmes aquatiques constituent le réceptacle de milliers de polluants chimiques à travers le déversement intentionnel (e.g. effluent de station de traitement de eaux usées) ou accidentel (e.g. marée noire, dépôt atmosphérique) de substances chimiques dans les rivières, les lacs et les océans du monde. Ces émissions permanentes sont à l'origine d'effets néfastes, telles que les perturbations endocrines, sur les organismes exposés. Ces composés sont caractérisés par une grande variété en termes de structure et de propriété physico-chimique qui vont dicter leur devenir, leur distribution et leurs effets sur les organismes exposés.

1.1 Niveaux de contamination

De nombreuses études se sont intéressées à quantifier des contaminants organiques à travers des analyses ciblées basées sur des méthodes de détection de plus en plus sensibles. Dans le **tableau 1** est présenté un inventaire non exhaustif des niveaux de contamination rencontrés dans les milieux aquatiques pour différentes classes de polluants.

Les niveaux de contamination rencontrés sont extrêmement variables selon la classe considérée, le compartiment étudié et selon la pression anthropique à laquelle le site d'étude est soumis. Ils varient généralement du ng/l au µg/l dans l'eau et du ng/g au µg/g dans les matrices solides.

Parmi les classes les plus décrites dans le milieu figurent les stéroïdes, principalement les œstrogènes, ainsi que le bisphénol A et les alkylphénols dont la capacité à perturber le système endocrinien des organismes aquatiques est avérée (Sumpter 2005).

Par ailleurs, la détection des composés pharmaceutiques est en augmentation continue, principalement dans la colonne d'eau. Les émissions continues de ces molécules actives leur confèrent un caractère pseudo-persistant (Heberer 2002). Considérant la multitude de composés détectés (Benotti *et al.* 2009) et leurs effets néfastes potentiels sur les organismes (Fent *et al.* 2006, Laville *et al.* 2004, Ferrari *et al.* 2003, De Lange *et al.* 2006), il paraît pertinent de suivre l'occurrence environnementale de telles molécules.

Enfin, les fortes concentrations mesurées en aval des stations d'épuration traduisent l'efficacité partielle des stations de traitement des eaux à éliminer certains composés ou encore à « produire » des molécules actives à partir de molécules conjuguées non actives (i.e. déconjugaison bactérienne). De telles observations montrent l'importance de s'intéresser aux métabolites en tant que source potentielle d'effet comme la perturbation endocrine (Farré *et al.* 2008).

Ainsi, des milliers de molécules contaminent les systèmes aquatiques. Pour certaines d'entre elles, leurs effets néfastes sur les organismes aquatiques sont avérés et ont donné lieu à la mise en place de réglementation. Néanmoins pour un grand nombre d'entre elles, il reste à déterminer leur capacité à induire des effets néfastes aux concentrations environnementales retrouvées et, le cas échéant, à mettre en place des mesures limitant la présence de ces composés dans l'environnement.

1.2 Contexte réglementaire

A l'échelle Européenne, la contamination des milieux aquatiques par les substances chimiques a conduit à la mise en place de législations visant à améliorer l'état de santé des écosystèmes aquatiques mais également à limiter l'exposition des populations, humaines et animales, à ces composés toxiques potentiels ou avérés.

La **directive cadre sur l'eau** (DCE , 2000/60/EC) vise à la mise en place d'un système de protection des eaux de surfaces et souterraines à l'échelle de l'union Européenne. Le principal objectif étant de prévenir toute détérioration de l'environnement aquatique et de protéger les écosystèmes aquatiques à travers la mise en place de mesures visant à réduire l'émission de substances prioritaires. Elle vise ainsi à obtenir un bon état écologique et chimique des eaux d'ici 2015.

L'*état écologique* est défini par des éléments biologiques (i.e. phytoplancton, macroalgues, angiospermes, invertébrés, poissons), physico-chimiques (i.e. température, oxygène dissout, nutriment, salinité, turbidité) et hydromorphologiques (e.g. la géométrie du lit, le facies d'écoulement, la granulométrie...), Pour chacun de ces éléments, une valeur de référence à ne pas dépasser est définie.

L'*état chimique* est défini à travers le suivi de 41 substances prioritaires et repose sur l'établissement d'une norme de qualité environnementale (NQE). Cette NQE est définie comme étant « la concentration d'un polluant ou d'un groupe de polluants dans l'eau, les sédiments ou le biote qui ne doit pas être dépassée, afin de protéger la santé humaine et l'environnement » (DCE, article 2). Jusqu'à présent, ces analyses étaient réalisées directement sur l'eau. Toutefois, de nouvelles recommandations tendent à effectuer l'analyse des contaminants hydrophobes sur le sédiment et sur certains mollusques afin de permettre une surveillance plus pertinente.

Les NQE sont déterminées à partir des PNEC (Predicted No effect Concentration ou CSO, Concentration Sans Effet Observé) calculées pour les organismes aquatiques (PNEC aqua), pour les organismes benthiques (PNEC sédiment, effets via les sédiments,) et pour les prédateurs supérieurs (PNEC empoisonnement secondaire, effets via l'ingestion d'organismes contaminés). Elles prennent en compte des critères de toxicité aiguë ou chronique mais ne considèrent pas les effets de perturbations endocrines.

La liste des 41 polluants prioritaires de la DCE (**Tableau 2**) contient notamment des PE avérés (i.e. alkylphénols, phthalates, pesticides). Cependant, ils ne sont pas inclus dans cette liste du fait de leur propriété de PE mais de par leur toxicité globale. Il convient donc de s'interroger sur la pertinence des NQE, notamment vis-à-vis des effets plus spécifiques à faibles doses de certaines molécules.

Tableau 2. Liste des substances prioritaires de la DCE. (En gras, les substances dangereuses)

Classes chimiques	Composés
Pesticides	alachlore , atrazine , chlorfenvinphos , éthylchlorpyrifos , diuron , endosulfan , hexachlorobenzène , hexachlorocyclohexane , isoproturon , pentachlorobenzène , pentachlorophénol , simazine , trifluraline
Métaux lourd	cadmium , mercure , nickel , plomb et les composés de ces métaux
Polluants industriels	anthracène , benzène , C10-13-chloro-alcanes , chloroforme , 1,2-dichloroéthane , dichlorométhane , diphényléther bromé , di(2-éthylhexyl)phthalate (DEHP) , naphthalène , nonylphénol , octylphénol , tributylétain , HAP , benzo(b,k)fluoranthène , benzo(a)pyrène , benzo(g,h,i)perylène et indéno(1,2,3-cd)pyrène , fluoranthène , trichlorobenzène , hexachlorobutadiène
Autres polluants	DDT total , para-para-DDT , pesticides cyclodiènes (aldrine, dieldrine, endrine, isodrine) , tétrachloréthylène , trichloroéthylène , tétrachlorure de carbone

La **réglementation sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques** (REACH), entrée en vigueur le 1^{er} Juin 2007, vise à créer un système de gestion unique de législation pour les 30 000 substances manufacturées ainsi que les nouvelles substances chimiques mises sur le marché ou importées à des quantités annuelles égales ou supérieures à une tonne.

REACH a ainsi pour objectif de fournir des informations sur les effets à court et long termes de ces substances sur la santé humaine et animale. Indirectement, ce système devrait permettre de stimuler l'innovation technologique afin de développer des substituts de substances chimiques présentant un danger moindre pour les individus exposés et l'environnement.

Par ailleurs, REACH vise à définir une liste candidate de « substances extrêmement préoccupantes » qui seront soumises à une procédure d'autorisation. Pour être définie comme telle, une substance doit posséder l'une des caractéristiques suivantes :

- Les CMR (substances cancérigènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction),
- Les PBT (substances persistantes, bioaccumulables et toxiques),
- Les vPvB (substances très persistantes et très bioaccumulables),
- Certaines substances préoccupantes ayant des effets graves irréversibles sur l'être humain et l'environnement, telles que les PE.

Cette liste comprend aujourd'hui une trentaine de substances parmi lesquelles on trouve des PE (e.g. bis-2éthylhexyl-phtalate) (ECHA 2011). Néanmoins, REACH s'adresse seulement à une certaine catégorie de composés chimiques manufacturés. En conséquence, elle ne prend pas en compte le danger lié à des substances de types PE produites en faible quantité mais qui peuvent agir à de faibles concentrations, ni les composés pharmaceutiques.

1.3 Conclusion

Cette première partie de la synthèse bibliographique a permis de dresser les enjeux actuels que suscite la contamination des milieux aquatiques par les polluants émergents. Le contexte actuel est tel que d'une part, des centaines de molécules sont détectées et/ou quantifiées sans qu'on connaisse leur toxicité aux concentrations environnementales (e.g. composés pharmaceutiques, produit cosmétiques, certains stéroïdes, certains pesticides). D'autre part, pour nombre d'effets biologiques néfastes observés (i.e. altération de la reproduction, du développement, du comportement), les molécules classiquement suivies dans un contexte réglementaire ne permettent pas d'expliquer ces effets.

Il existe ainsi, un besoin de mettre en place des stratégies permettant l'identification des composés actifs potentiellement responsables des effets mesurés de manière à affiner des listes de substances prioritaires plus pertinentes afin de permettre une meilleure évaluation du risque pour les organismes exposés. Par ailleurs il est également nécessaire d'établir les mécanismes sous jacents à ces effets.

Dans la seconde partie, nous nous intéressons plus précisément au cas des perturbateurs endocriniens à travers la description de leurs mécanismes d'action, de leurs effets chez les organismes aquatiques et des outils permettant leur étude.

2. Les perturbateurs endocriniens (PE)

2.1 Définitions

Deux définitions sont communément retrouvées concernant les PE. Ils ont tout d'abord été décrits comme des « substances chimiques exogènes qui, interférant avec les fonctions du système hormonal, risquent d'influer négativement sur les processus de synthèse, de sécrétion, de transport, d'action et d'élimination des hormones, hormones responsables de l'homéostasie, de la reproduction et du comportement» (Kavlock *et al.* 1996). Plus récemment et plus simplement, ces composés ont été décrits comme des « substances exogènes qui altèrent le fonctionnement du système endocrinien et par conséquent causent des effets néfastes sur la santé d'un organisme intact, de sa descendance ou d'une sous population » (WHO, 2002). Les PE constituent de ce fait une classe de composé définie non pas chimiquement mais par leur action biologique.

Dans l'environnement, de nombreux exemples de perturbations endocrines ont été rapportés depuis 30 ans et pour lesquels les molécules incriminées ont pu être identifiées (Revue par Jobling *et al.* 1998, Sumpter *et al.* 2005, WHO 2002, Hotchkiss *et al.* 2008). Le **tableau 3** rapporte quelques exemples observés sur différentes organismes ainsi que le type de PE incriminés.

Tableau 3. Effets biologiques de certains perturbateurs endocriniens (AKP, alkylphénols)

Organismes	Effets biologiques	Molécules incriminés	Références
Homme	Neurologique, immunitaire	PCB, PCDDF	Guo <i>et al.</i> 1995
	Comportemental, Reproduction (réduction spermatozoïdes)	DES	Colborn <i>et al.</i> 1993
Otarie	Reproduction (succès reproducteur)	PCB	Reijnders 1986
Oiseaux	Modification comportement	DDE et PCB	McArthur <i>et al.</i> 1983
Alligator	Anomalie du développement	DDT et dérivés	Guillette <i>et al.</i> 1994
Gastéropodes	Imposex	TBT	Matthiessen et Gibbs 1998
Poissons	Féminisation, Intersexe	Effluent station épuration (EE2, AKP)	Desbrow <i>et al.</i> 1998
	Masculinisation	Effluents industriel (trenbolone)	Park <i>et al.</i> 2001

Ces exemples illustrent la diversité des effets et des organismes pouvant être la cible des PE. Toutefois, pour nombre d'effets reportés, les molécules restent à être identifiées ainsi que les mécanismes d'action à l'origine de ces effets. Ces molécules englobent une grande variété de classes chimiques d'origine naturelle et anthropique (industrielle, agricole, urbaine) (**tableau 4**)

Tableau 4. Origine et nature des perturbateurs endocriniens

Origines	Classes chimiques	Exemples	
Naturelle	Phytoestrogènes	génistéine, zéaralénone, coumestrol	
Anthropique	Agricole	Pesticides atrazine, DDT, TBT, méthoxychlor, fenvalérate	
	Industrielle/ Urbaine	Composés halogénés persistants	HAP, PCB, PCDD/DF, PBDE
		Produits cosmétiques	benzophénones, parabènes
		Surfactants	alkylphénols
		Plastifiants	bisphénol A, phtalates
		Hormones naturelles	œstradiol, DHT, progestérone
	Substances pharmaceutiques	fibrates, EE2, DES	

Parmi ces molécules, certaines doivent être présentes à de fortes concentrations pour provoquer un effet néfaste sur un organisme. A l’opposé d’autres, présentes à des niveaux de traces, peuvent entraîner de graves altérations de la reproduction et/ou du développement. Les effets faible dose des xénoestrogènes, associés généralement à une interaction avec le récepteur des œstrogènes, sont parmi les plus décrits dans la littérature (Tyler *et al.* 1998). Néanmoins, d’autres mécanismes d’action des PE existent.

2.2 Mécanismes d’action des perturbateurs endocriniens

Il existe un grand nombre de mécanismes par lesquels les perturbateurs endocriniens peuvent moduler le système endocrinien et causer des effets néfastes sur plusieurs fonctions de l’organisme (e.g. reproduction, développement, système nerveux, immunité...). Ces modes d’action incluent l’altération de la biosynthèse hormonale, le transport, l’action, le métabolisme et l’excrétion des hormones endogènes (**Figure 1**). L’un des mécanismes majeurs qui relient ces altérations, implique la fixation des PE aux récepteurs nucléaires et la modulation des réponses géniques médiées par ces récepteurs.

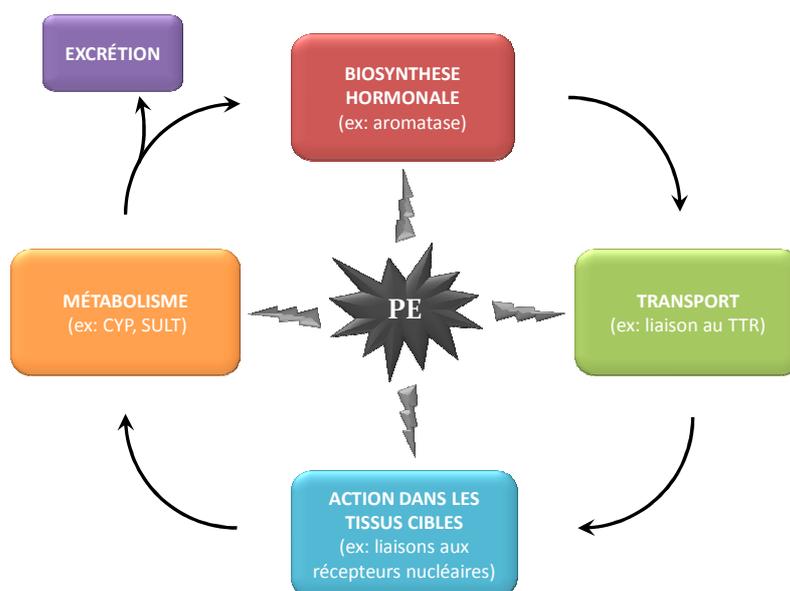


Figure 1. Mode d’action des perturbateurs endocriniens

2.2.1 Effets médiés par les récepteurs nucléaires

2.2.1.1 Les récepteurs nucléaires : généralités

Chez les mammifères, les récepteurs nucléaires (RN) constituent une superfamille de 48 facteurs de transcription impliqués dans des fonctions vitales comme le développement fœtal, l'homéostasie, la reproduction, le développement ou la réponse aux xénobiotiques.

Classifications

Deux classifications des RN sont couramment décrites dans la littérature scientifique. La première, basée sur la nature de leurs ligands respectifs, donne lieu à 3 sous classes (Janosek *et al.* 2006) : les récepteurs de type I (récepteurs des hormones stéroïdes), de type II (Récepteur thyroïdien TR, des hydrocarbures aromatiques (AhR), de la vitamine D (VDR), de l'acide rétinolique (RAR), le RXR (*Retinoid X receptor*) et le PPAR (*peroxisome proliferator activated receptor*), et de type III correspondant aux récepteurs orphelins (e.g. PXR, *Pregnane X Receptor*). La seconde, basée sur des critères phylogénétiques (Laudet 1997) résulte en une classification à 6 groupes avec une nomenclature internationale (**Tableau 5**). On constate dès lors que certains récepteurs présents dans la première classification sont absents de la deuxième (e.g. récepteur Ah).

Tableau 5. Classification de la superfamille des récepteurs nucléaires
(M : monomère, D : dimère, H : hétérodimère)

Sous-Famille	Groupe	Nom (isotype)	Code	Dimérisation
1	A (<i>Thyroid hormones receptors</i>)	TR (α, β)	NR1A1, A2	H
	B (<i>Retinoic acid receptors</i>)	RAR (α, β, γ)	NRB1, B2, B3	H
	C (<i>Peroxisom proliferation activated receptors</i>)	PPAR ($\alpha, \beta/\delta, \gamma$)	NR1C1, C2, C3	H
	D	Rev-Erba (α, β)	NR1D1, D2	M, D
	F (<i>Related orphean receptors</i>)	ROR (α, β, γ)	NRAF1, F2, F3	M
	H (<i>Liver X receptors</i>)	LXR (α, β)/ FXR	NR11, H2, H3, H4, H5	H
	I (<i>Orphean receptors</i>)	VDR/PXR/CAR	NR1I1/ I2/ I3	H
	X	NR avec 2 DBD (α, β, γ)		H
2	A (<i>Hepatocyte nuclear factor</i>)	HNF-4 (α, γ)	NR2A1, A2	D
	B (<i>Retinoid acid receptors</i>)	RXR (α, β, γ)	NR2B1, B2, B3	D
	C (<i>Testicular receptors</i>)	TR (2, 4)	NR2C1, C2	D, H
	E	TLX/PNR	NR2E1, E2	M, D
	F	COUP-TF (I, II)/EAR-2	NR2F1, F2, F6	D,H /M
3	A (<i>estrogen receptors</i>)	ER (α, β)	NR3A1, A2	D
	B (<i>estrogen related receptors</i>)	ERR (α, β, γ)	NR3B1, B2, B3	M, D
	C (<i>3-ketosteroid receptors</i>)	GR/MR/PR/AR	NR3C1, C2, C3, C4	D
4	A	NGFIB/NURR1/NOR1	NR4A1, A2, A3	M,D,H /M,H/M
5	A	SF1/LRH1	NR55A1, A2	M
6	A	GCNF	NR6A1	D
0	A	DAX/SHP	NR0B1, B2	H

Structure

Les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires sont des protéines qui partagent une structure similaire caractérisée par 5 domaines distincts (**Figure 2**).

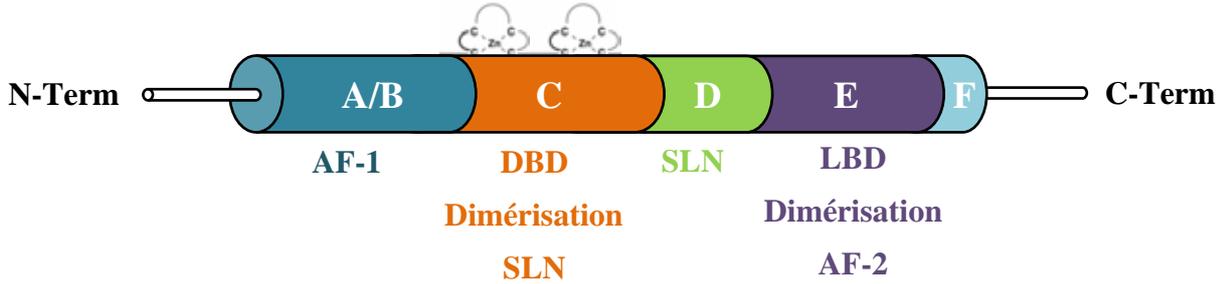


Figure 2. Structure des récepteurs nucléaires

Dans la région N-terminale se situe le domaine de transactivation (**A/B**), responsable du recrutement des co-activateurs au moment de la transcription via le domaine d'activation AF1 (indépendant de la fixation du ligand). Le domaine de fixation à l'ADN (**DBD**, *DNA binding domain*) (**C**) est la région responsable de l'association du récepteur avec les éléments de réponses (séquence d'ADN spécifique localisée dans le promoteur) des gènes cibles. Cette région joue également un rôle dans la dimérisation et contient la séquence de localisation nucléaire (**SLN**) responsable de la translocation vers le noyau. Il faut noter que le DBD est une région hautement conservée qui contient 2 doigts de zinc qui facilitent la fixation du récepteur à la chromatine (Mangelsdorf *et al.* 1995). Le troisième domaine, la région charnière (**D**), varie selon les différents types de récepteurs nucléaires. Il contient également un signal de localisation nucléaire. On trouve ensuite, le domaine de fixation du ligand (**LBD**, *ligand binding domain*) (**E**) qui est hautement conservé et qui est essentiel pour la reconnaissance spécifique des ligands et l'induction du changement de conformation associé à la formation du dimère. Cette région contient également un domaine de transactivation (**AF-2**, dépendant de la fixation du ligand) permettant le recrutement de co-activateurs. Le dernier domaine (**F**) correspond à la région C terminale.

Modes d'actions des récepteurs nucléaires

Les différents modes d'action des RN sont illustrés dans la **figure 3**. En l'absence de ligand, les récepteurs inactivés peuvent être localisés dans le cytoplasme (**Figure 3A**) ou le noyau (**Figure 3B**) et associés à des protéines chaperonnes inhibitrices (e.g. protéine de choc thermique) alors que d'autres peuvent être localisés dans le noyau et associés aux éléments de réponse de leurs gènes cibles et recruter des co-répresseurs (**Figure 3C**).

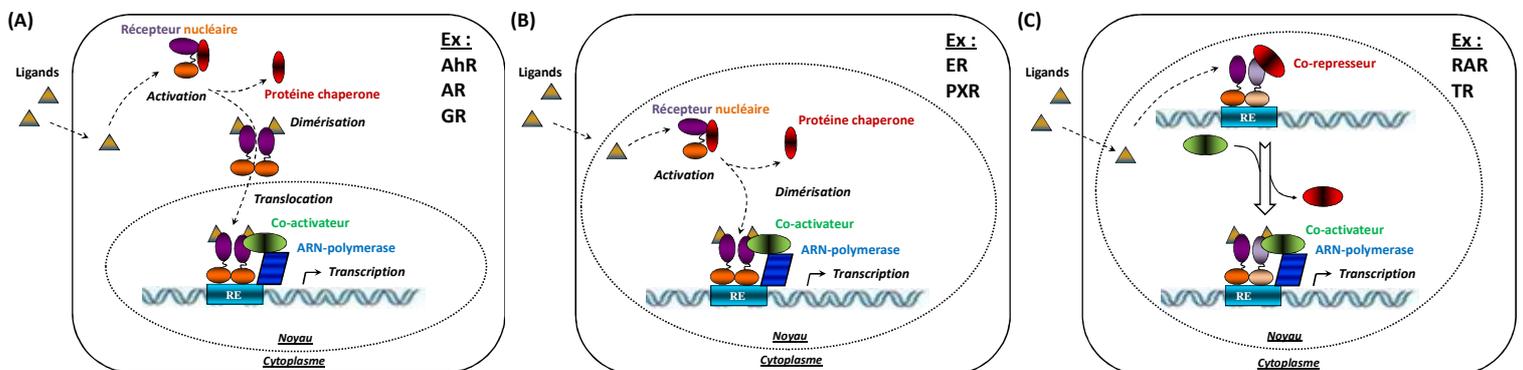


Figure 3. Modes d'actions des récepteurs nucléaires en fonction de leur localisation dans le cytoplasme (A) ou dans le noyau (B et C).

Suite à la fixation d'un ligand au récepteur, un changement conformationnel se produit au niveau du domaine de fixation au ligand conduisant à une dissociation des protéines chaperonnes ou des corépresseurs, parfois à une dimérisation (i.e. hétérodimère ou homodimère) des récepteurs, et dans le cas des récepteurs cytoplasmiques à une libération du signal de localisation nucléaire autorisant la translocation du complexe dans le noyau et la fixation à l'ADN. Finalement le recrutement de co-activateurs provoque la transcription du gène cible à travers un remodelage de la chromatine et l'activation de la machinerie transcriptionnelle (i.e. ARN polymérase et co-facteurs).

Notion d'affinité, d'efficacité et de potentialité

La fonction première d'un récepteur est de répondre à un changement dans son environnement. Dans le cas des récepteurs nucléaires, il va s'agir de répondre à un changement dans la concentration en ligands qui va conduire à la modulation de l'expression de gènes cibles. Toutefois, les ligands d'un même récepteur diffèrent par leur capacité à activer ce récepteur et de ce fait la fixation d'un ligand ne conduit pas toujours à une réponse. Ainsi, l'interaction ligand-récepteur peut être envisagée comme un processus en 3 étapes : (1) Tout d'abord la fixation du ligand au récepteur (*affinité* = « force » de l'interaction), (2) ensuite la conversion du récepteur sous sa forme active ou non (*efficacité*), (3) et enfin la réponse finale mesurée (*potentialité*) (Marty *et al.* 2010).

La mesure de l'*affinité* se fait à travers le calcul de la constante de dissociation (Kd) qui correspond en fait à la concentration en ligands pour laquelle la moitié des récepteurs présents sont sous forme de complexe ligand-récepteur (e.g. mesure de *binding*). La mesure de la *potentialité* est plus complexe car elle ne dépend pas seulement du ligand et du récepteur (i.e. affinité et efficacité) mais également du contexte cellulaire et notamment de la présence d'autres facteurs (e.g. co-activateurs) dans la cellule (Neubig 2003). Elle est généralement évaluée par la mesure d'EC50 (*effective concentration* ou d'IC50) établie sur la base de courbes dose réponses (**Figure 4**).

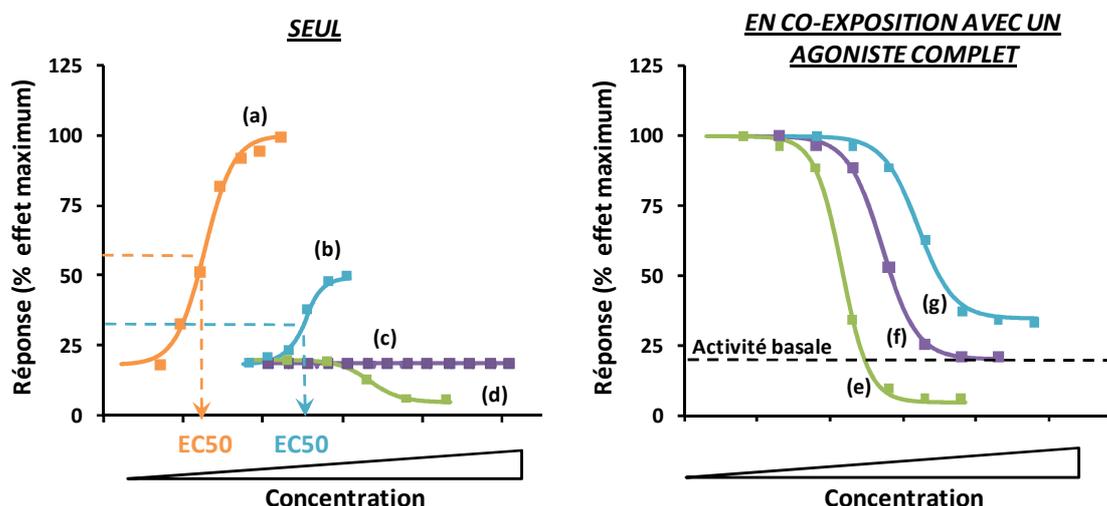


Figure 4. Exemple de courbes dose réponse et d'établissements de l'EC50.

(a : agoniste complet , b/g : agoniste partiel , c/f : antagoniste complet , d/e : agoniste inverse)

En fonction de la réponse qu'ils produisent seuls, les ligands peuvent être considérés comme des *agonistes complets* (induisent une conformation active du récepteur capable de recruter la machinerie transcriptionnelle et donnant une réponse maximale dans un certain contexte cellulaire, **Figure 4a**), des *agonistes partiels* (produisent une réponse inférieure à la réponse maximale même à fortes concentrations, **Figure 4b**), des *antagonistes complets*

(interagissent avec le récepteur sans donner de réponse et empêchent le récepteur d'adopter sa conformation active, **Figure 4c**) et enfin des **agonistes inverses** qui en se fixant au récepteur réduisent la réponse de base (répression transcriptionnelle par le recrutement de co-répresseur) (**Figure 4d**) (Germain *et al.* 2006). En co-exposition avec un agoniste complet, les antagonistes complets (**Figure 4f**), les agonistes inverses (**Figure 4e**) et partiels (**Figure 4g**), de par leur interaction avec le récepteur, empêchent son activation par l'agoniste complet.

Du fait des concentrations variables en récepteurs nucléaires et d'autres facteurs d'un tissu à un autre ou d'une espèce à une autre, il peut s'avérer qu'un même ligand agisse comme agoniste complet dans un cas, partiel dans un autre, ou encore en tant qu'antagoniste (Hahn et Hestermann 2008). Par ailleurs, il arrive que certains ligands ne suivent pas une dose réponse classique (i.e. monotonique, effet augmentant avec la concentration), et conduisent à une réponse globale en forme de U. Par exemple, Pollack *et al.* (2003) ont montré que la génistéine pouvait induire à faible concentration, réprimer à moyenne concentration puis de nouveau induire à forte concentration la synthèse de vitellogénine.

Beaucoup de perturbateurs endocriniens environnementaux peuvent se fixer directement aux récepteurs nucléaires, en tant qu'agoniste ou antagoniste et ainsi augmenter ou diminuer l'effet des hormones endogènes. Jusqu'à aujourd'hui la majorité des études se sont intéressées à l'interaction des PE avec le récepteur des œstrogènes, le récepteur AhR et dans une moindre mesure avec le récepteur des androgènes (Janocek *et al.* 2006). Néanmoins, d'autres récepteurs nucléaires jouent un rôle tout aussi essentiel et peuvent être potentiellement la cible de PE. Ces différentes cibles moléculaires font l'objet des paragraphes suivants.

2.2.1.2 Les récepteurs stéroïdiens

Les récepteurs des œstrogènes (ER)

Chez les vertébrés, les œstrogènes jouent un rôle clef dans les processus de reproduction, de développement, de comportement et de physiologie à travers l'interaction avec leurs récepteurs spécifiques exprimés dans les tissus cibles. A l'état inactif, ces récepteurs ont une localisation nucléaire et sont associés à des protéines chaperonnes (i.e. hsp70/p60) (Janocek *et al.* 2006). Une fois activés, ils vont former des homodimères qui, en se fixant aux éléments de réponse aux œstrogènes (ERE), vont réguler l'expression de gènes.

Il existe plusieurs sous types de ER, les formes ER α et ER β chez les mammifères (Kuiper *et al.* 1997) et les formes ER α , ER β 1 (aussi appelé ER γ) et ER β 2 chez les poissons téléostéens (Hawkins *et al.* 2000). L'expression dans les tissus ainsi que l'interaction avec les ligands (i.e. affinité) diffèrent d'une forme à l'autre et d'une espèce à l'autre suggérant un rôle physiologique différent (Filby et Tyler 2005, Hawkins *et al.* 2000). Il semblerait ainsi que la forme β 1, principalement exprimée dans le foie et le cerveau, joue un rôle crucial dans le développement et la fonction des ovaires.

Bien que l'ensemble des récepteurs ER partage un certain degré d'homologie (Menuet *et al.* 2002), ils n'interagissent pas tous avec la même affinité et ne sont pas tous activés avec la même efficacité par ces différents ligands. Ainsi en fonction du récepteur, du contexte cellulaire et de l'espèce, les réponses peuvent différer (Dang *et al.* 2011, Molina-Molina *et al.* 2008, Cosnefroy *et al.* 2009, Cosnefroy *et al.* soumis, Escande *et al.* 2006). Ces différences sont d'autant plus importantes à considérer lors de l'évaluation de l'effet des PE sur les individus exposés car des différences à l'échelle moléculaire ou cellulaire peuvent se traduire finalement par une réponse biologique différente à l'échelle de l'individu.

Dans les milieux aquatiques, l'activation anormalement excessive du ER conduit généralement à une augmentation de la transcription de ses gènes cibles. L'augmentation de la

synthèse de vitellogénine (Jobling *et al.* 1998), une féminisation ou encore une intersexualité (Nash *et al.* 2004, Flammarion *et al.* 2000) sont les effets les plus fréquemment rapportés. Bien qu'un lien de causalité direct (i.e. démonstration *in situ* du lien entre exposition, fixation au récepteur et effet biologique mesuré) est rarement clairement établi de par la complexité des voies de signalisation impliquées dans ces processus, ces effets ont très longtemps été associés à la présence de stéroïdes naturels ou synthétiques ou encore de surfactants (e.g. alkylphénols) ou de plastifiants (bisphénol A) fréquemment détectés dans les effluents de stations de traitement des eaux usées (Desbrow *et al.* 1998). Cependant, les concentrations environnementales mesurées ont souvent échoué à expliquer les réponses biologiques observées *in situ* (Tyler *et al.* 2008).

D'autres familles de molécules capables de se fixer au ER et d'induire des réponses biologiques, ont été identifiées chez l'homme et les poissons (**Tableau 6**). Néanmoins, de par leur diversité, l'apparition de nouvelles molécules liées aux activités humaines et leur transformation biotique et abiotique dans le milieu, il n'est pas exclu que de nombreuses autres substances présentes dans l'environnement puissent interagir avec le ER et provoquer des effets néfastes sur les populations piscicoles. Ainsi l'identification des ligands environnementaux du ER reste un enjeu de recherche important afin de mieux appréhender les réponses biologiques observées chez les individus et les populations exposés.

Tableau 6. Exemples de ligands environnementaux des récepteurs des œstrogènes

Classes	Composés	Références
Phytoœstrogènes	zéaralénone, génistéine, $\alpha/\beta/\gamma$ -zéaralénol, coumestrol, daidzéine, equol, biochaninA, flavones	Pillon <i>et al.</i> 2005 , Sanseverino <i>et al.</i> 2009 Mueller 2002
Stéroïdes naturels	E1, E2, E3, corticostérone	Escande <i>et al.</i> 2006
Composés pharmaceutiques	EE2, DES, dexaméthasone, tamoxifène	Fent <i>et al.</i> 2006
Plastifiants	BPA, butyl-benzylphthalate	Sanseverino <i>et al.</i> 2009
Surfactants	nonylphénol, 4-tert-octylphénol	Pillon <i>et al.</i> 2005
Pesticides	vinclozoline, o,p'DDT, p,p'DDE, endosulfan, méthoxychlor, butamifos, fénamiol, fénitrothion, pentachlorophénol, chlordécone, heptachlor, prochloraz, nonachlor	Kojima <i>et al.</i> 2010b, McKinlay <i>et al.</i> 2008
Produits cosmétiques	benzophénone 1,2 et 3, tetra-hydroxy-benzophénone	Molina Molina <i>et al.</i> 2008
Autres	OH-PCB	Andersson <i>et al.</i> 1999

Le récepteur des androgènes (AR)

Les androgènes, principaux stéroïdes sexuels chez le mâle, sont impliqués dans la différenciation sexuelle et le développement des caractères sexuels secondaires chez les vertébrés mais également dans le métabolisme ou la régulation du système immunitaire (Li et Al-Azzawi 2009). Sous forme inactive, le récepteur AR associé à des protéines HSP (*heat shock protein*) est localisé dans le cytoplasme. La fixation du ligand va permettre sa translocation, son homodimérisation et l'activation des gènes cibles après fixation aux éléments de réponse aux androgènes (ARE).

Chez les vertébrés, deux sous-types de récepteurs (i.e. α , β) ont été identifiés. Ces récepteurs sont principalement exprimés dans les testicules mais également au niveau de la prostate, du cerveau, des glandes surrénales et de l'hypophyse (Thomas *et al.* 2008). Les

quelques études ayant comparé les propriétés d'interaction (i.e. affinité) entre le AR et ses ligands rapportent certaines différences entre l'Homme et plusieurs espèces de poissons (Wilson *et al.* 2007), notamment vis-à-vis des 17- α -trenbolone et 17- β -trenbolone. Globalement, les interactions sont relativement bien conservées d'une espèce à une autre (Ikeuchi *et al.* 2001).

En comparaison des données sur le ER, il existe moins d'informations disponibles sur les ligands environnementaux du AR (**Tableau 7**) et notamment chez le poisson. Les ligands identifiés chez l'homme sont principalement des antagonistes et correspondent très fréquemment à des agonistes du ER.

De manière concordante, les effets anti-androgéniques sont les plus fréquemment rapportés dans les milieux aquatiques (Jobling *et al.* 2009). Toutefois des effets de masculinisation de poissons liés à la présence de ligands du AR de poissons ont également été rapportés dans des effluents de papeterie bien que les composés responsables de cette activité n'aient pas pu être identifiés (Parks *et al.* 2001). Néanmoins, une étude menée en laboratoire a démontré que la trenbolone, un stéroïde de synthèse agoniste avéré du AR chez l'homme et fréquemment détecté dans les eaux usées, pouvait avoir un effet masculinisant chez les poissons (Ankley *et al.* 2004).

Tableau 7. Exemples d'agonistes et d'antagonistes environnementaux du récepteur AR chez l'Homme

	Classes	Composés	Références
Antagonistes	Phytoœstrogènes	flavonoïdes (5-hydroxyflavone, génistéine)	Nishizaki <i>et al.</i> 2009
	Composés Pharmaceutiques	mifépristone (RU486)	Hackenberg <i>et al.</i> 1996
	Plastifiants	BPA, phtalates (benzyl-butylphtalate)	Paris <i>et al.</i> 2002, Kruger <i>et al.</i> 2008
	Pesticides	chloropropylate, o,p' DDT, p,p' DDT/DDE heptachlor époxide, chlométhoxyfène, fénitrothion, vinzocloline, chlordécone toxaphène, aldrine, fénamirol, métolachlor	Kojima <i>et al.</i> 2010 Scippo <i>et al.</i> 2004 Aït-Aïssa <i>et al.</i> 2010
	Surfactants	4-t-OP, 4-n-NP, parabènes	Kruger <i>et al.</i> 2008 Satoh <i>et al.</i> 2005
	Divers	polyphénols, benzo[a]anthracène, benzo[a]pyrene, PCB	Paris <i>et al.</i> 2002 Roy <i>et al.</i> 2004
Agonistes	Stéroïdes naturels	testostérone, 5 α -dihydroxytestostérone, 17 α - méthyltestostérone, androstènedione	Térouanne <i>et al.</i> 2000
	Divers	trenbolone, mélangestrol acétate, benzophénones	Daxenberger 2002 Ankley <i>et al.</i> 2004 Nashev <i>et al.</i> 2010

Le récepteur de la progestérone (PR)

La progesterone et ses dérivés, via l'activation du PR, jouent un rôle essentiel dans la fonction de reproduction chez la femme (i.e. prolifération et différenciation des tissus reproducteurs). Chez les poissons téléostéens, les progestagènes les plus abondants sont la 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β DHP) et la 17,20 β -trihydroxy-4-pregen-3-one (20 β -S). Elles induisent notamment la maturation finale de l'ovocyte ainsi que l'ovulation chez les organismes femelles (Pinter et Thomas 1999) et stimulent la spermatogénèse et la motilité des spermatozoïdes chez les mâles (Nagahama 1994).

Il existe deux isoformes, PR-A et PR-B, codés par le même gène chez l'Homme, alors que deux paralogues ont été identifiés chez certaines espèces de poissons, PR- β et PR- α codés par des gènes distincts chez l'anguille (*Anguilla japonica*) (Ikeuchi *et al.* 2001). Le PR-B est

caractérisé par la présence d'un troisième facteur d'activation (AF-3) qui permet le recrutement d'un certain nombre de co-activateurs. De ce fait, les formes A et B présentent des propriétés de transactivation différentes et le PR-B semble être notamment un fort activateur de la transcription de nombreux gènes dans une variété de types cellulaires où le PR-A est inactif (Conneely *et al.* 2002). Par ailleurs, il existe un fort degré de conservation dans les séquences du DBD (85% d'analogie) alors qu'il existe moins d'analogie dans les séquences des LBD entre les poissons et le reste des vertébrés. Ces différences pourraient être liées aux progestagènes spécifiques aux poissons (i.e. 17,20βDHP et 20β-S) (Thomas 2000).

Concernant les ligands environnementaux de ce récepteur, à l'exception des progestatifs synthétiques, des antagonistes environnementaux ont surtout été décrits (**Tableau 8**).

Tableau 8. Exemples de ligands environnementaux du récepteur PR

Classes	Composés	Action	Références
Phyto-œstrogènes	biochanine A	Fixation	Scippo <i>et al.</i> 2004
	kaempférol	Fixation	Scippo <i>et al.</i> 2004
Stéroïdes naturels	progestérone	Agoniste	Molina-Molina <i>et al.</i> 2006
Composés Pharmaceutiques (stéroïdes de synthèse...)	gestrinone, trenbolone,		Death <i>et al.</i> 2004
	médroxyprogestérone, lévonorgestrel, mégestrol, noréthindrone,	Agoniste	Sitruk-Ware 2004
	mifépristone	Antagoniste	Jones <i>et al.</i> 2005
Surfactant	nonyphénol	Antagoniste	Viswanath <i>et al.</i> 2008
Plastifiants	BPA	Antagoniste	Viswanath <i>et al.</i> 2008
	diphénylphtalate	Fixation	Scippo <i>et al.</i> 2004
Pesticides	endosulfan, lindane	Antagoniste	Scippo <i>et al.</i> 2004
	vinclozoline	Antagoniste	Molina-Molina <i>et al.</i> 2006

Ils correspondent en partie à des antagonistes du AR, ce qui peut s'expliquer par un certain degré de similitude d'un point de vue évolutif entre ces deux récepteurs (Ikeuchi *et al.* 2001). Par ailleurs nombre de progestatifs synthétiques sont fabriqués à partir d'androgènes et, de ce fait, ont la capacité d'interagir avec les deux récepteurs (Death, 2004, Sitruk-Ware *et al.* 2004).

Aujourd'hui, seulement deux travaux ont étudié les effets potentiellement néfastes sur les organismes aquatiques associés à la présence de progestatifs dans les milieux aquatiques. La première étude rapporte une masculinisation ainsi qu'une diminution du succès de reproduction chez le vairon à tête de boule (*Pimephales promelas*) après une exposition au lévonorgestrel ou à la drospirénone (Zeilinger *et al.* 2009). La deuxième montre une altération de la reproduction chez le médaka (*Oryzias latipes*) et le vairon à tête de boule suite à une exposition à de faibles doses de noréthindrone (Paulos *et al.* 2011). Toutefois dans cette dernière étude, la substance étudiée pourrait agir via le récepteur AR. Des études récentes montrent que ces progestatifs et d'autres ligands potentiels du PR sont détectés dans les milieux aquatiques (voir section 3.2.2, tableau 20, p53). Toutefois, leur impact sur les organismes exposés *in situ* reste à déterminer.

Les récepteurs des corticostéroïdes

Que ce soit chez l'Homme ou les poissons, les corticostéroïdes jouent un rôle majeur dans des fonctions physiologiques essentielles telles que l'osmorégulation, la respiration, les réponses immunitaires, la reproduction, la croissance et le métabolisme (Buckingham 2006, Prunet *et al.* 2006). Les récepteurs des corticostéroïdes comprennent le récepteur des glucocorticoïdes (GR) et le récepteur des minéralocorticoïdes (MR) dont les principaux régulateurs endogènes sont respectivement le cortisol et l'aldostérone. À l'état inactif ces deux récepteurs sont présents dans le cytoplasme, associés à des protéines chaperonnes (Schaaf *et al.* 2009 et Galigniana *et al.* 2004). Activés, ils forment des homodimères et se fixent sur des séquences spécifiques de l'ADN (i.e. éléments de réponses aux glucocorticoïdes et aux minéralocorticoïdes) en amont des gènes cibles, après dissociation des chaperonnes et translocation dans le noyau.

Plusieurs isoformes du GR existent. Ils sont générés à partir d'un seul gène chez l'Homme et de deux gènes chez les poissons -à l'exception de certaines espèces comme le *Danio rerio* qui ne possèdent qu'un seul gène- à travers des épissages alternatifs (Bury *et al.* 2003, Zhou et Cidlowski 2005, Schaff *et al.* 2009). Les deux gènes de téléostéens (i.e. GR1 et GR2) ont une organisation similaire au gène humain unique (Stolte *et al.* 2006). Concernant le MR, on a d'abord pensé qu'il était inexistant chez les poissons de par l'absence d'aldostérone chez ces organismes. Toutefois, Colombe *et al.* 2000 ont isolé ce récepteur chez la truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Il semblerait ainsi que le cortisol assure, chez les poissons, les fonctions associées au GR et au MR.

Bien que les récepteurs humains et poissons possèdent certaines analogies de séquences, des différences fonctionnelles sont rapportées, notamment en termes d'affinité vis-à-vis de certains ligands (Prunet *et al.* 2006, Rashid et Lewis 2005). Toutefois, de manière générale, le MR est décrit comme un récepteur très sensible (i.e. activé à de faibles doses) qui médie les effets des corticostéroïdes à de très faibles concentrations en ligand, alors que le GR répond à de plus fortes concentrations en ligand (Buckingham *et al.* 2006). Ainsi, le GR interviendrait surtout en réponse à des conditions de stress qui provoquent une abondante production de cortisol.

Récemment il a été montré qu'un certain nombre de polluants environnementaux pouvaient affecter la voie de signalisation des corticostéroïdes, notamment à travers une interaction directe avec le récepteur GR (e.g. TCDD, arsenite), bien que d'autres mécanismes soient décrits et suspectés (Odermatt *et al.* 2006, Odermatt et Gumy 2008) : inhibition de la 3 β -HSD2 (enzyme impliquée dans la stéroïdogénèse) (voir section 2.2.2.1, tableau 12, p29) par la génistéine ou la daidzéine, inhibition de la 11- β HSD2 (enzyme responsable de l'inactivation du cortisol en cortisone et ainsi de la protection du MR vis-à-vis de l'activation par les glucocorticoïdes) par le tributylétain (TBT). Néanmoins, il subsiste encore beaucoup d'inconnues concernant les ligands environnementaux de ces cibles biologiques et leurs potentiels effets *in situ*, malgré le rôle physiologique majeur de ces récepteurs.

2.2.1.3 Les récepteurs des xénobiotiques

Le récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR)

Le AhR est un membre de la famille des facteurs de transcription « hélice-boucle-hélice »-Per-ARNT-Sim basique (bHLH-PAS) intervenant dans la réponse aux xénobiotiques (i.e. détoxification). Bien que le AhR ne soit pas un récepteur nucléaire, son mode d'action reste relativement semblable à ces derniers : sous forme inactive, il est localisé dans le cytoplasme et associé à des protéines de choc thermique (HSP90), la fixation du ligand

entraîne un changement de conformation entraînant la translocation dans le noyau, la dimérisation avec l'ARNT (agent de translocation du AhR), la fixation aux éléments de réponses du AhR (e.g. DRE, *dioxin responsive element*) et l'activation ou la répression de l'expression de gènes (Hahn 2002) (voir section 2.3.2.4, figure 14, p38).

Il existe plusieurs formes de ce récepteur dans le règne animal. Globalement, les mammifères possèdent un seul isoforme du AhR, alors qu'on en dénombre au moins 2 chez les poissons, AhR1 (orthologue du AhR de mammifère) et AhR2 (paralogue) (Hahn *et al.* 2006). AhR1 et AhR2 diffèrent par leur expression dans les tissus, suggérant un rôle différent. Plus récemment un troisième membre de la famille AhR a été découvert, le répresseur AhR (AhRR). Ce dernier, capable de former un dimère avec l'ARNT et de se fixer à la séquence AhRE, empêche l'activation transcriptionnelle par le complexe AhR-ARNT (Hahn *et al.* 2009).

La plupart des connaissances concernant la voie de signalisation de ce récepteur proviennent d'études sur des systèmes mammifères (humain et rongeur essentiellement) (Safe 2001). Toutefois, les études réalisées sur les poissons ont montré que les principales propriétés de cette voie de signalisation étaient conservées (Pollenz *et al.* 2002).

Initialement identifié dans le foie de souris (Poland *et al.* 1976), comme fixant de manière spécifique la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), il a été montré par la suite que ce récepteur régulait l'expression d'enzymes impliquées dans la détoxification, aussi bien les monooxygénase de phase I (i.e. CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1) (Pelkonen *et al.* 2008) que les enzymes de conjugaison de phase II (Köhle et Bock 2007). Ces enzymes dont le rôle principal est de faciliter l'élimination des composés hydrophobes, peuvent également conduire à la formation de composés actifs, e.g. activation métabolique des HAP (Machala *et al.* 2001). Par ailleurs nombre d'effets néfastes sur la santé des organismes (e.g. neurotoxicité, immunotoxicité, embryotoxicité, carcinogénèse) liés à l'interaction de xénobiotiques avec le AhR ont été rapportés (Safe 2001, WHO 2002). Les poissons se sont révélés être particulièrement sensibles aux ligands de ce récepteur, notamment durant le développement (Tyler *et al.* 1998).

Chez les mammifères et les poissons, les ligands de haute affinité du AhR sont des composés hydrophobes et ubiquitaires tels que les hydrocarbures aromatiques halogénés (HAH, i.e. PCB, PCDD/DF) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Van den Berg *et al.* 2006, Behrens *et al.* 2001, Billiard *et al.* 2004). Toutefois d'autres familles de molécules peuvent interagir avec ce récepteur (Denison *et al.* 2002) tels que les pesticides (Kojima *et al.* 2010) et des substances issues des plantes (e.g. flavonoïdes, caraténoïdes...) (Van der Heiden *et al.* 2009), bien qu'elles constituent généralement de faibles inducteurs de ce récepteur. Enfin certaines études basées sur l'évaluation de la contamination du sédiment (mélanges complexes) rapportent l'existence de ligands polaires du AhR (Luebecke-von Varel *et al.* 2011, Koh *et al.* 2005, Brack *et al.* 2000), bien qu'ils restent à être identifiés.

Les récepteurs PXR/CAR

Le PXR et le CAR appartiennent à la sous-famille des récepteurs nucléaires orphelins (i.e. NR1I) pour lesquels il n'existe pas encore à l'heure actuelle de ligands endogènes de haute affinité connus. Ces récepteurs jouent un rôle clef dans la détoxification et dans le métabolisme des hormones endogènes en régulant l'expression de gènes cibles associés à ces fonctions (**Figure 5**) (Kretschmer et Baldwin 2005). À l'état inactif, le PXR et le CAR sont localisés respectivement dans le noyau et dans le cytoplasme. Une fois activés par la fixation de leurs ligands respectifs, ils vont former dans le noyau un hétérodimère avec le RXR α et entraîner l'expression de nombreux gènes cibles (Timsit et Negishi 2007) (**Figure 5**).

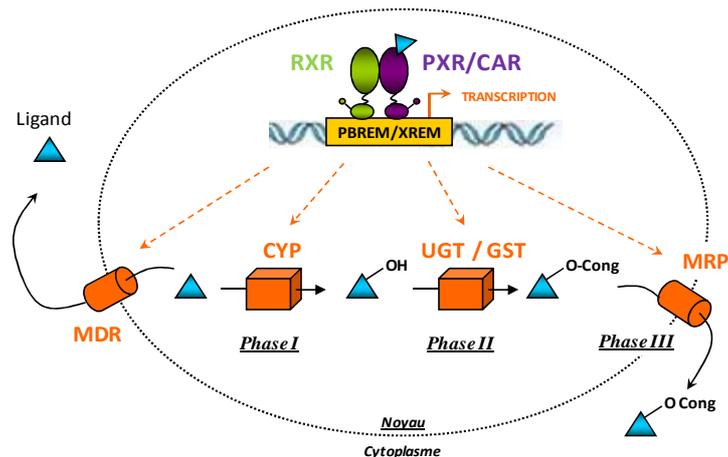


Figure 5. Rôle des récepteur PXR et CAR dans le métabolisme des xénobiotiques et des hormones endogènes. PBREM/XREM : séquences consensus de fixation des hétérodimères RXR-PXR/CAR , CYP : cytochrome P450, UGT : uridine diphosphoglucuronosyltransférase, GST : glutathion-S-transférase , MRP : multi resistance protein, MDR: multi drug desistance

Dérivant d'un gène ancestral commun (Reschly et Krasowski 2006), il existe une vraie redondance fonctionnelle entre le PXR et le CAR chez les mammifères. Chez les poissons, le CAR semble être absent et sa fonction est remplie par un gène commun PXR/CAR. Chez l'Homme, ces récepteurs sont des importants régulateurs de l'expression des gènes impliqués dans l'ensemble des phases de métabolisation et d'excrétion des xénobiotiques. Ils sont ainsi essentiellement exprimés dans le foie (Moore et Kliewer 2000), le principal organe de la détoxification des xénobiotiques. Ils protègent l'organisme à travers le contrôlent des enzymes de phase I (i.e. P450, CYP2B, CYP3A), des enzymes de conjugaison de phase II (uridine diphosphoglucuronosyltransférase (UDP-GT) et glutathion-S-Transférase (GST)), ainsi que des transporteurs de phase III (MDR-1 (*multi drug resistance*) et MRP-2 (*multi resistance protein*)) (Ihunnah *et al.* 2011) (**Figure 5**). Le PXR est notamment largement étudié pour sa capacité à réguler la transcription du CYP3A4 (Goodwin *et al.* 2001), enzyme de phase I qui métabolise près de 60% des médicaments prescrits. De plus, ils sont impliqués dans l'homéostasie du cholestérol, la protection des tissus de composés endogènes potentiellement toxiques et le métabolisme des stéroïdes endogènes (Staudinger *et al.* 2001, Kliewer *et al.* 2002). Chez les poissons, le rôle du PXR/CAR est moins clairement établi. Certaines études très récentes suggèrent son implication dans le contrôle de l'expression du CYP3A (Tseng *et al.* 2005, Meucci et Arukwe 2006, Li *et al.* 2008, Pavlikova *et al.* 2010) (voir section 2.2.2.2, p32).

La structure particulière du domaine de liaison au ligand de ces récepteurs (poche hydrophobe et flexibilité au niveau de l'hélice 6 pour le récepteur PXR) (Kretshmer et Baldwin, 2005) permet leur activation par une large diversité de ligands, essentiellement des xénobiotiques mais aussi des composés endogènes (**Tableau 9**). Cette diversité reste toutefois limitée pour le CAR en comparaison du PXR. Par ailleurs, il est important de préciser que contrairement à la majorité des récepteurs décrits précédemment, ces récepteurs sont caractérisés par une faible affinité pour leurs ligands (i.e. EC50 de l'ordre du μM).

Tableau 9. Ligands environnementaux du PXR chez l'Homme et les poissons téléostéens.
(Cpsés. Pharma.: composés pharmaceutiques)

Classes	Composés	Références	
Agoniste Homme	chlordan, dieldrine, endosulfan	Coumoul <i>et al.</i> 2002	
	transnonachlor, triclosan	Jacobs <i>et al.</i> 2005	
	Pesticides	prétilachlor, fenvalérate, bupirimate, cyperméthryn, métolachlor, oxadiazon, o,p' DDT, propiconazole,	Lemaire <i>et al.</i> 2004
		butamifos, chlorpyrifos, thénylchlor, dymuron, bromopropylate, indanofan, pypérophos	Kojima <i>et al.</i> 2010a
	Cpsés. Pharma.	hyperforin, clotrimazole, rifampicin, dexaméthasone, lovastatin, phénobarbital, spironolactone	Vignati <i>et al.</i> 2004
		SR12813, ICI, tamoxifen	Jacobs <i>et al.</i> , 2005
		clomiphène, raloxifène,	Mnif <i>et al.</i> 2007
		diclofénac, forskolin, ritonavir, mévastatin, mifépristone, diazépam, triazolam, bergamotin	Sinz <i>et al.</i> 2006
		oméprazole, terbinafine, rifabutin, nicardipine	Cui <i>et al.</i> 2008
		amoxicilline, dicloxacilline, céphradine, tétracycline, troléandomycine cindamycin, érythromycine	Yasuda <i>et al.</i> 2008
	Surfactants /plastifiant	phtalates	Milnes <i>et al.</i> 2008
		4-t-OP, m-NP, BPA	Mnif <i>et al.</i> 2007
		PBDE	Pacyniak <i>et al.</i> 2007
	Stéroïdes	pregnénone, cortisone, corticostérone	Vignati <i>et al.</i> 2004
		EE2, hexestriol, 4-OHT	Mnif <i>et al.</i> , 2007
		cortexone, corticostérone, métabolites de l'œstrone progestérone et métabolites	Eckins <i>et al.</i> 2008
	Divers	phyto/myco-œstrogènes, Filtres UV	Mnif <i>et al.</i> 2007
		diphényls ether, carbamates	Kojima <i>et al.</i> 2010
		TCDD	Reschly <i>et al.</i> 2007
TPP		Honkakoski <i>et al.</i> 2004	
Agoniste Poisson	Pesticides	méthoxychlor, toxaphène, endosulfan, chlordan, fenvalérate	Milnes <i>et al.</i> 2008
		chlorpyrifos	Eckins <i>et al.</i> 2008
	Cpsés. Pharma.	nifédipine, clotrimazole, phénobarbital	Moore <i>et al.</i> 2002
	Surfactant /Plastifiants	n-dipropyl-phtalate, 4-t-OP, bisphenol A	Milnes <i>et al.</i> 2008
	Stéroïdes	pregnénone, androstènedione, testostérone, DHT, androstérone, métabolites de l'œstrone	Eckins <i>et al.</i> 2008
	Divers	TCDD	Reshly <i>et al.</i> 2007
Antago-nistes humain	Phyto-œstrogènes	coumestrol	Wang <i>et al.</i> 2008
	Cpsés. Pharma.	sulforaphane	Zhou <i>et al.</i> 2007
	Divers	imidazole (kétoconazole) azoles	Eckins <i>et al.</i> 2007 Venkatesh <i>et al.</i> 2011

Les séquences codant pour les récepteurs nucléaires sont généralement relativement bien conservées chez les mammifères (en moyenne, 95% d'analogie de séquence pour le DBD et 85% pour le LBD, Reshly et Krasowski 2006). En revanche, les récepteurs CAR et le PXR sont caractérisés par d'importantes différences inter-espèces dans les séquences codant le LBD : (Jones *et al.* 2000, Moore *et al.* 2002, Ekins *et al.* 2008) (**Figure 6**). De ce fait, l'activation de ces récepteurs par les xénobiotiques diffère fortement d'une espèce à une autre (Milnes *et al.* 2008, Eckins *et al.* 2008, Moore *et al.* 2002). Il semblerait notamment que le PXR de poisson soit moins activable que celui de mammifère (Moore *et al.* 2002, Wassmur *et al.* 2010).

pgPXR	dgPXR	rbPXR	mPXR	rPXR	CXR ^a	fPXR	xBXR	hCAR	
87	83	83	77	76	49	52	51	45	hPXR
	84	83	78	76	49	51	52	43	pgPXR
		78	76	75	49	50	48	44	dgPXR
			79	78	49	51	50	43	rbPXR
				97	49	53	50	46	mPXR
					49	53	50	46	rPXR
						47	42	54	CXR
							46	44	fPXR
								39	xBXR

Figure 6. Pourcentages d'analogie de séquence entre les LBD des PXR et du hCAR.

(h : homme , pg : cochon , dg : chien , rb : lapin , m : souris , r : rat , f : poisson , x : xénope , ^a chez le poulet). D'après Moore *et al.* 2002.

Ainsi les ligands du PXR humain (hPXR) englobent essentiellement des agonistes tels que des stéroïdes, des composés pharmaceutiques, des acides biliaires et des composés industriels (e.g. pesticides, alkylphénols). En revanche, le PXR de poisson (fPXR) semble être activé par un nombre plus restreint de ligands (Eckins 2008, Moore *et al.* 2002). Enfin, bien que rapportée par certaines études, l'existence de vrais antagonistes du PXR -interagissant directement avec le récepteur- reste à démontrer car une interaction avec le domaine AF-2 (i.e. compétition avec le co-activateur des récepteurs stéroïdiens (SRC)) pourrait expliquer les réponses mesurées (Ekins *et al.* 2007). Concernant le CAR, le nombre de ligands connus est plus restreint, mais à la différence du PXR, il est caractérisé par une activité constitutive en l'absence de ligands (Kretschmer et Baldwin, 2005). De plus des agonistes inverses ont été identifiés pour ce récepteur (e.g. clotrimazole) (Moore *et al.* 2000).

Ainsi, ces récepteurs et particulièrement le PXR sont potentiellement la cible d'un grand nombre de polluants environnementaux, mais il reste à déterminer si les concentrations environnementales de tels composés peuvent provoquer une activation de ces voies de signalisation *in situ*. Si tel était le cas, cela pourrait notamment conduire à une modification des taux d'hormones circulantes ou encore à la métabolisation de composés non-toxiques en métabolites toxiques (Kretschmer et Baldwin 2005). De telles cibles doivent donc être considérées dans l'évaluation des modulateurs endocriniens environnementaux.

2.2.1.4 Autres récepteurs nucléaires

Les récepteurs PPAR et RXR

Les récepteurs PPAR (*Peroxisome Proliferator Activated Receptor*) regroupent une famille de 3 récepteurs impliqués dans le métabolisme, la prolifération, la survie et la différenciation des cellules (Feige *et al.* 2006). Ces récepteurs agissent sous forme d'hétérodimères avec le RXR, qui peuvent se former en l'absence de ligands et interagir avec les ERPP (élément de réponse de PPAR). Les récepteurs RXR ont une place toute particulière dans la famille des récepteurs nucléaires du fait qu'ils forment des dimères avec près d'un tiers des 48 RN connus et régulent ainsi un grand nombre de voies de signalisation.

Il existe 3 isotypes du PPAR chez l'Homme : PPAR α , PPAR β et PPAR γ , codés par 3 gènes distincts. Leur patron d'expression dans les tissus ainsi que leur affinité pour les ligands est propre à chacun. La forme α est principalement exprimée dans les organes où il existe un fort catabolisme des acides gras (e.g. cœur, foie, rein, intestin) alors que la forme β est plus largement distribuée au sein de l'organisme (Michalik *et al.* 2006). De même il existe trois isotypes du récepteur RXR: RXR α , RXR β et RXR γ , qui peuvent interagir avec l'ensemble des isotypes de PPAR. Toutefois des associations spécifiques sont nécessaires pour la

reconnaissance de certains gènes cibles (Feige *et al.* 2006). Chez les poissons téléostéens, l'ensemble des homologues PPAR ont été identifiés, bien qu'il existe des différences dans le nombre total de gènes PPAR et dans leur distribution tissulaire (Batista-Pinto *et al.* 2005).

D'un point de vue fonctionnel PPAR α joue un rôle essentiel dans l'homoéostasie énergétique (e.g. catabolisme des acides gras, stimulation de la néoglucogénèse, synthèse et catabolisme du cholestérol). PPAR β est essentiel au développement du placenta et du gros intestin mais intervient aussi dans l'équilibre énergétique. Enfin, PPAR γ intervient dans la différenciation des tissus adipeux et dans le maintien des fonctions spécifiques des adipocytes.

De manière générale, les PPARs interagissent avec les acides gras naturels ou synthétiques et avec certaines substances thérapeutiques (e.g. les fibrates). Ces ligands ont tendance à se fixer avec une faible affinité, toutefois des ligands endogènes de haute affinité, tels que des acides gras à longue chaîne, ont récemment été identifiés (Hostetler *et al.* 2005). Il semblerait que certains contaminants environnementaux (e.g. phtalates, organo-étains) puissent interagir avec ces récepteurs à très faibles concentrations (i.e. nano-molaires) (Grun et Blumberg 2009) et entraîner des effets néfastes sur les organismes exposés. Le développement d'organes reproducteurs mâles chez des gastéropodes femelles (i.e. imposex) (Nishikawa *et al.* 2004), la masculinisation de poissons ou encore un retard dans le développement des testicules chez le poisson (Zhang *et al.* 2009) ont notamment été rapportés suite à une exposition au TBT. Il semblerait que ces effets soit davantage lié à une activation du RXR que du PPAR (le Maire *et al.* 2009) bien que d'autres hypothèses soient avancées concernant les effets observés chez les poissons (PXR, CYP3A- Pavlikova *et al.* 2010). Enfin des études récentes ont montré que l'activation du PPAR α par des composés perfluorés, une famille de contaminants émergents, pouvait conduire à une réduction de la prise de nourriture et ainsi à une réduction de la prise de poids chez la souris (Asakawa *et al.* 2008).

Les récepteurs de la thyroxine (TR)

Les hormones thyroïdiennes, à travers leurs interactions avec le TR, interviennent dans la régulation de la croissance somatique, le métabolisme, le développement du cerveau ainsi que d'autres fonctions vitales de l'organisme. Ils jouent également un rôle important dans les ovaires et les testicules, notamment au cours du développement chez les mâles (Cooke 2004). Enfin, ils sont aussi impliqués dans la métamorphose chez les poissons et les amphibiens (Nelson et Habibi 2009). Bien qu'ils puissent agir sous forme de monomère ou d'homodimère, les TR se fixent à leurs éléments de réponse (TRE) principalement sous la forme d'hétérodimère avec le RXR. Sous forme inactive, ils sont généralement associés à l'ADN et répriment l'activité basale de leur gènes cibles (Zhang et Lazar 2000).

Chez les mammifères, il existe 5 isoformes du récepteur TR ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$) codés par des 2 gènes distincts et issus d'épissages alternatifs. Alors que les formes TR α sont exprimées dans la plupart des tissus, le gène TR β n'est exprimé que dans le foie, les reins, le système nerveux central et l'hypophyse. La présence de TR $\alpha 1$ ou $\alpha 2$ et β a été démontrée chez plusieurs espèces de poissons téléostéens (e.g. poisson zèbre, tilapia, saumon de l'atlantique). Leurs profils d'expression varient également selon les espèces et le stade de développement (Nelson et Habibi 2009).

Concernant les ligands environnementaux de ces récepteurs, jusqu'à récemment, très peu de composés avaient été identifiés comme pouvant se fixer directement à ce récepteur (e.g. OH-PCB, DDT et dérivés, pesticides organochlorés) (Cheek *et al.* 1999). Plus récemment, des études ont montré que certains retardateurs de flammes bromés tels que le PBDE 209, le tétrabromobisphénol A (TBBPA) ou le 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododécane

(HBCD) ainsi que certains composés perfluorés étaient capables d'interagir directement avec ce récepteur mais aussi avec la protéine de transport des hormones thyroïdienne (TTR) (Hamers *et al.* 2006 et Weiss *et al.* 2009a).

De plus, l'emploi d'outils biologiques spécifiques a permis la détection de ligands de ce récepteur dans des effluents de station d'épuration ou encore dans des sédiments (Jugan *et al.* 2009, Lubke von varel *et al.* 2011). Le rôle clef de ces récepteurs dans le développement (e.g. trouble du compartement associé à une hypothyroïdie) et l'occurrence environnementale de composés susceptibles d'interagir avec le TR, démontrent la nécessité de prendre plus en considération cette voie de signalisation à l'avenir.

2.2.1.5 Les récepteurs membranaires

En plus des récepteurs nucléaires qui médient une action génomique considérée comme lente (i.e. effet quelques heures après exposition), il est maintenant établi que les hormones endogènes ainsi que les PE sont également capables de se fixer à des récepteurs membranaires et de provoquer des réponses non génomiques rapides (i.e. quelques minutes après exposition) (Thomas *et al.* 2000). Il faut préciser que ces deux voies d'action ne sont pas totalement indépendantes l'une de l'autre (**Figure 7**). En effet, des études ont rapporté des interactions directes entre les deux types de récepteur (i.e. *cross-talk*). Par ailleurs, l'activation de second messager par les récepteurs nucléaires (3) ainsi que l'altération de l'expression de gène suite à l'activation de récepteurs membranaires (4) ont également été décrites.

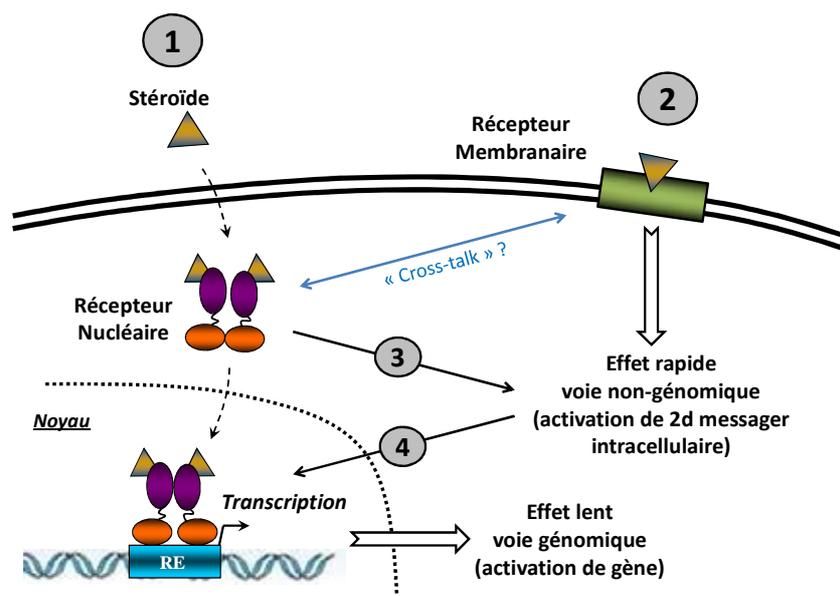


Figure 7. Voie d'action génomique (1) et non génomique (2) par les stéroïdes (d'après Thomas *et al.* 2000)

Des récepteurs membranaires associés à l'action non génomique et rapide de différentes classes de stéroïdes ont ainsi été identifiés chez l'Homme et certaines espèces de poissons (**Tableau 10**). Leur mode d'action ferait notamment intervenir des protéines G à 7 domaines transmembranaires (Thomas *et al.* 2006).

Tableau 10. Récepteurs membranaires identifiés chez l’Homme et les poissons téléostéens

	Récepteurs (expression tissulaire)	Références
Homme	ER , AR	Thomas <i>et al.</i> 2005/Thomas 2008
	PR (gonades)	Zhu <i>et al.</i> 2003
	GR (foie et cerveau)	Falkenstein <i>et al.</i> , 2000
	MR	Fuller et Young 2005
Poissons	ER (gonades)	Loomis et Thomas 2000
	AR (lymphocytes)	Braun et Thomas 2004
	PR (ovaires)	Patino et Thomas 1990

Par ailleurs, une variété de xénobiotiques semble pouvoir interférer avec l’action non génomique des stéroïdes endogènes, notamment chez le poisson. Ainsi, une réduction dans la mobilité des spermatozoïdes associée à l’interaction de certaines substances (i.e. BPA, op’DDT, chlordane) avec le récepteur PR membranaire (mPR) a ainsi été observée (Thomas et Doughty 2004). De même, une diminution dans la production d’androgènes liée à l’interaction de la képone, du nonylphénol et des PCB hydroxylés avec le récepteur membranaire des œstrogènes a été rapportée (Loomis et Thomas 2000, Thomas *et al.* 2006). Les effets sur le mPR restent à ce jour les mieux décrits.

2.2.1.6 Crosstalk et effets de mélange

Présentation générale

Il est de plus en plus établi que les récepteurs agissent de concert afin de réguler un certain nombre de fonctions biologiques et de répondre aux attaques de leur environnement. Des interactions entre différentes voies de signalisation (*cross-talk*) ont ainsi lieu au sein de la cellule et permettent de gérer des situations de stress multiples. Le **tableau 11** présente une liste non-exhaustive des interactions décrites dans la littérature. La plupart de ces interactions ont d’abord été observées chez les mammifères avant d’avoir été, pour certaines, étudiées chez certaines espèces de poissons.

Tableau.11. Les principaux *cross-talk* décrits dans la littérature

Crosstalk	Mécanismes	Effets	Références
AhR/AR	Hétérodimère AhR-ARNT-ERE	Contrôle des gènes cibles du ER	Ohtake <i>et al.</i> 2003
AhR/AR	Élimination par le protéasome (complexe ubiquitine ligase)	Diminution du nombre récepteurs	Ohtake <i>et al.</i> 2007
PXR-CAR/ER	PXR et CAR contrôlent les enzymes métabolisant les stéroïdes endogènes	Diminution du taux d’hormones circulantes	Kliwer <i>et al.</i> 1999
PXR/PPAR	Induction de PPAR γ par PXR activé	Accumulation de tri-glycérides	Pascussi <i>et al.</i> 2008
CAR-PXR-RXR/GR	GR contrôle expression de CAR, PXR et RXR	Contrôle de la détoxification par les ligands du GR	Pascussi <i>et al.</i> 2003 Cooper <i>et al.</i> 2008
PXR/AhR	inconnu	Augmentation expression CYP3A-P450	Gerbal-Chaloin <i>et al.</i> 2006 Tseng <i>et al.</i> 2005

Interaction ER-AhR

Le *crosstalk* AhR/ER reste à ce jour le plus décrit, aussi bien chez les mammifères que chez les poissons téléostéens (Coumoul 2007, Mortensen *et al.* 2006). Il réside notamment dans l'observation que la dioxine peut d'une part antagoniser l'effet des œstrogènes endogènes (Safe *et al.* 2000) mais également avoir un effet pro-œstrogénique (Ohtake *et al.* 2003).

Chez les mammifères, différents mécanismes ont été décrits (Shipley et Waxman 2006, Ohtake *et al.* 2003, Safe *et al.* 2000, Ohtake *et al.* 2007) (**Figure 8**). Chez les poissons, l'inhibition par le AhR de la transcription de gènes œstrogéno-régulés a été rapportée et associée à un *crosstalk* unidirectionnel (Cheshenko *et al.* 2007, Bemanian 2004, Grans *et al.* 2010). Toutefois une inhibition réciproque de ER vers AhR a également été observée (Mortensen et Arukwe 2007).

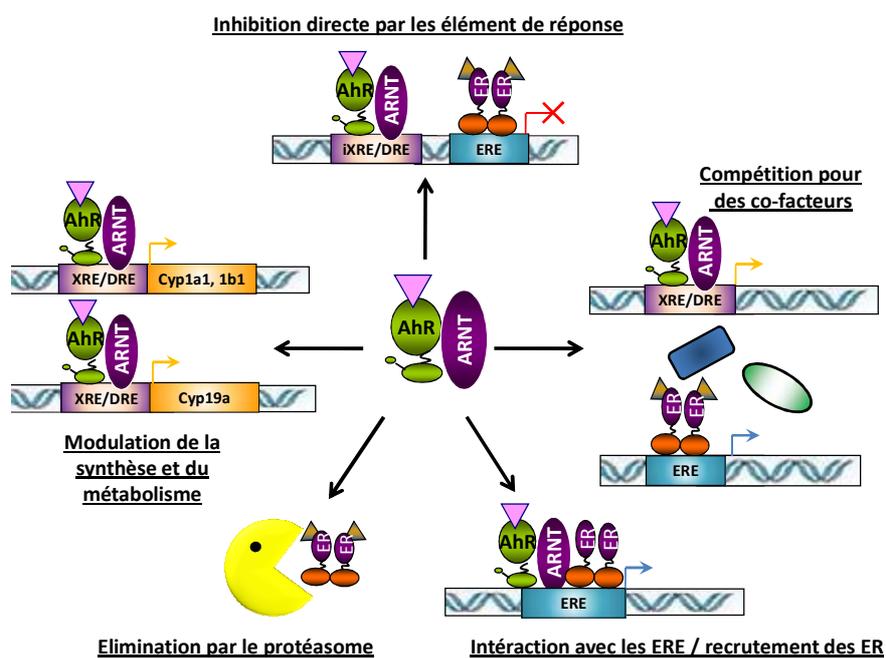


Figure 8. Les différents mécanismes du cross-talk ER-AhR
(inspiré de Matthews et Gustafsson 2006)

Interaction GR/PXR, PXR/AhR et GR/AhR

D'autres *cross-talk* sont rapportés dans la littérature scientifique. Un premier concerne l'interaction entre le **GR** et le **AhR**, observée aussi bien chez les mammifères (Wang *et al.* 2009, Sonneveld *et al.* 2006) que chez les poissons (Celander *et al.* 1996). Les effets diffèrent cependant d'une espèce à l'autre. Ainsi une potentialisation de l'effet de la TCDD par la dexaméthasone a été observée chez le rat (Bielefeld *et al.* 2008) et les poissons (Celander *et al.* 1996) alors qu'une diminution est constatée chez l'homme (Dvorak 2008). Ce *crosstalk* pourrait s'expliquer par la présence d'éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) dans le promoteur du gène AhR, notamment observé chez le rat (Sonneveld *et al.* 2007).

Une interaction entre les récepteurs **GR** et **PXR/CAR** a également été décrite essentiellement chez les mammifères. Il a ainsi été observé que l'exposition à des glucocorticoïdes potentialisait l'effet de ligands du PXR (Pascussi *et al.* 2000, Cooper *et al.* 2008). Un des mécanismes évoqués serait le contrôle de l'expression du PXR par le GR à travers l'activation de GRE au sein des promoteurs des gènes PXR et CAR. Bien que démontré pour le CAR (Pascussi *et al.* 2003), la présence de GRE dans le promoteur du gène PXR n'a pas encore été observée.

Enfin, une interaction entre **AhR** et **PXR** a été décrite chez l'Homme (Pascussi *et al.* 2008) et chez les poissons (Tseng *et al.* 2005) à travers la mesure de l'induction du CYP3A, une enzyme régulée par PXR, en réponse à des ligands du AhR (Raucy *et al.* 2002).

2.2.1.7 Conclusion

L'ensemble des récepteurs décrits ci-dessus jouent un rôle primordial dans la reproduction, le développement, le métabolisme, l'immunité et/ou la détoxification. Ainsi l'altération de leurs voies de signalisation, par des contaminants environnementaux, peut potentiellement conduire à des effets néfastes chez les individus exposés. Dans une perspective d'évaluation des impacts environnementaux des PE, il subsiste un besoin d'identifier ces substances et notamment celles affectant des voies de signalisation autres que celles médiées par ER ou AhR, les mieux décrites actuellement.

Par ailleurs, dans l'environnement, les organismes vivants sont exposés à un « cocktail » de milliers de molécules responsables d'effets de mélange (i.e. additivité, synergisme, antagonisme) au sein d'une même cible mais aussi entre certaines voies de signalisation interconnectées, rendant très difficile l'établissement d'un lien direct de cause à effet. Par conséquent, les mécanismes d'interactions entre ces récepteurs (*cross-talk*) doivent être pris en considération de manière à mieux intégrer les effets de mélange et mieux comprendre les effets observés.

2.2.2 Effets non médiés par les récepteurs nucléaires

D'autres modes d'actions des PE non médiés par les RN ont été identifiés. Ils peuvent interférer directement avec la biosynthèse hormonale, le métabolisme et le transport des hormones endogènes.

2.2.2.1 Modulation de la biosynthèse hormonale

Les enzymes de la stéroïdogénèse sont responsables de la synthèse des hormones stéroïdiennes, incluant les glucocorticoïdes, les minéralocorticoïdes, les progestagènes et les hormones sexuelles (i.e. œstrogènes, androgènes), à partir d'un précurseur commun unique le cholestérol. Cette synthèse se produit majoritairement dans les gonades et les glandes surrénales. Elles englobent des cytochromes P450 (CYP) spécifiques ainsi que des réductases et des déshydrogénases. Les **figures 9 et 10** décrivent respectivement les voies de synthèse des stéroïdes chez l'Homme et les poissons téléostéens. Des différences ont été constatées entre l'Homme et les poissons, notamment au niveau des étapes finales de la stéroïdogénèse. Ainsi les enzymes catalysent la même réaction mais leur position et donc les intermédiaires de synthèse diffèrent d'un cas à l'autre

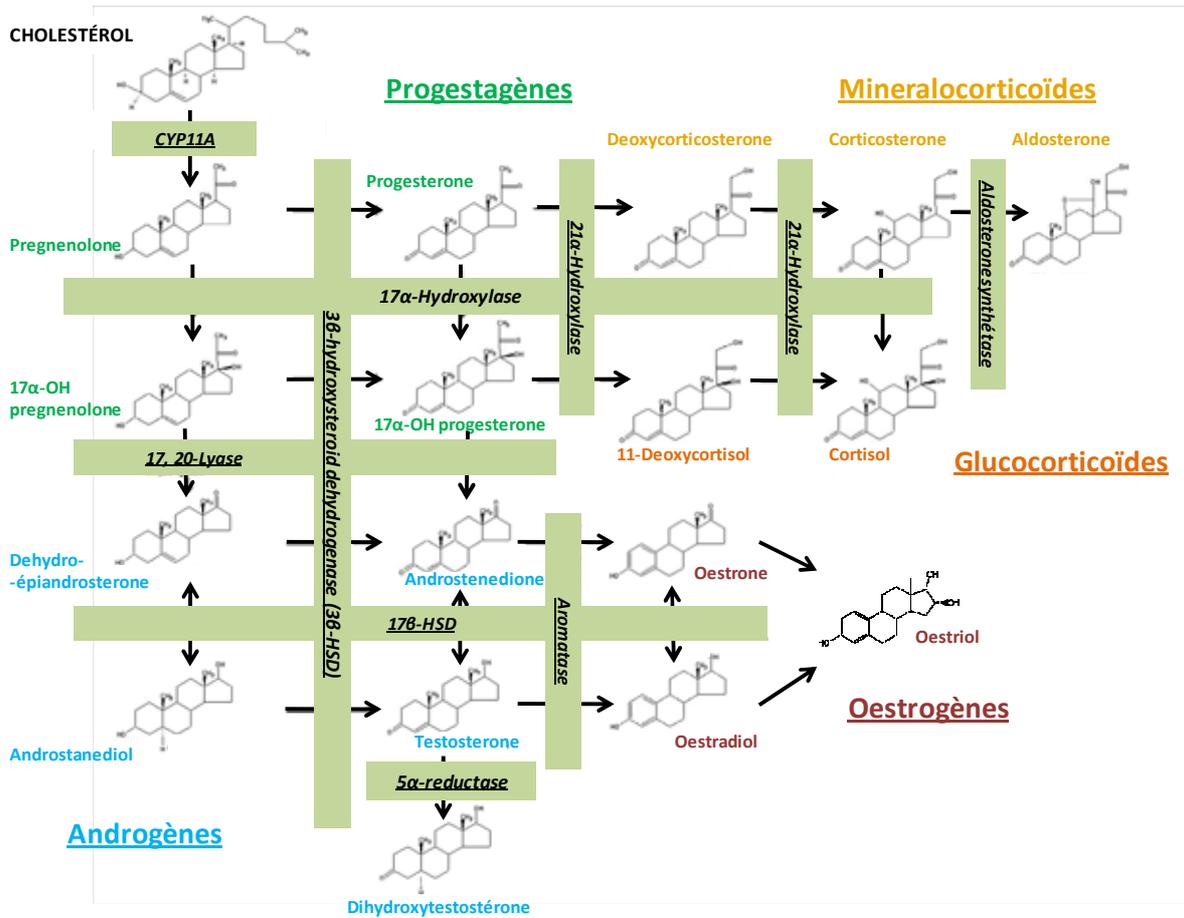


Figure 9. La stéroïdogénèse chez l'Homme (d'après Boron et Boulpaep 2009).

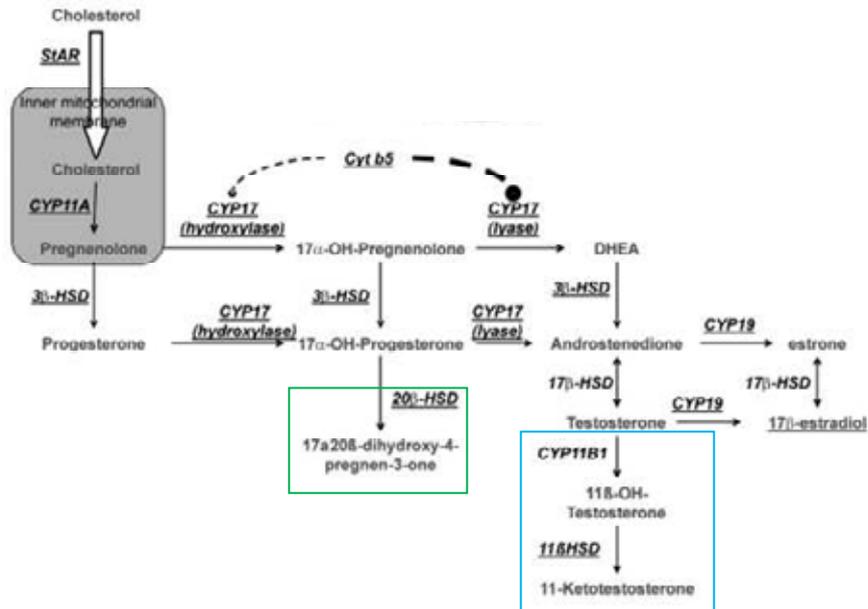


Figure 10. Stéroïdogénèse chez les poissons téléostéens (Villeneuve *et al.* 2007). Les cadres jaunes et bleu marquent les différences entre les systèmes poisson et humain.

L'altération de la biosynthèse des stéroïdes est généralement associée à une inhibition/induction d'une ou de plusieurs enzymes dans cette voie. Chaque enzyme est potentiellement la cible de PE. Ces derniers peuvent agir à travers différents mécanismes (i.e. substrat compétitif, inhibition non-compétitive, inactivation catalytique, modulation de l'expression). L'un des cas le plus décrit est celui de l'aromatase (i.e. CYP19) responsable de la synthèse finale d'œstrogènes à partir d'androgènes qui est la cible d'une grande diversité de composés chimiques. Des effets sur la 5- α réductase, la protéine Star ou encore la 3 β -HSD ont également été rapportés (**Tableau 12**).

Tableau 12. Effets des PE sur la stéroïdogénèse chez les mammifères et les poissons téléostéens
(*en italique* : effet portant sur l'expression médié par les récepteurs nucléaires)

Enzymes ciblés	PEs incriminés	Espèces (mode d'action)	Références
StAR	<i>Lindane, Imidazole</i>	<i>Souris (réduction expression)</i>	Walsh <i>et al.</i> 2000
	<i>β-Naphthoflavone</i>	<i>Poissons (réduction expression)</i>	Aluru et Vijayan 2004
21-Hydroxylase	Flavonoïdes	Homme-H295R (inhibition activité)	Mesiano <i>et al.</i> 1999
3 β -HSD	Flavonoïdes	Homme-H295R (inhibition activité)	Ohno <i>et al.</i> 2002
11 β -Hydroxylase	DDT, imidazole	Homme-H295R (inhibition activité)	Johansson <i>et al.</i> 2002
17 α -hydroxylase	Imidazole	Homme (inhibition activité)	WHO <i>et al.</i> 2002
	Alkylphénols, BPA	Homme (inhibition activité)	Niwa <i>et al.</i> 2002
17-20 Lyase	Imidazole	Homme (inhibition activité)	WHO <i>et al.</i> 2002
17 β -HSD	Organoétain	Poissons (inhibition activité)	Thibaut et Porte 2004
	Benzophénone	Homme (inhibition activité)	Nashev <i>et al.</i> 2010
20 β -HSD	Pesticides	Poissons (Induction activité)	Thibaut et Porte, 2004
Aromatase	Organoétains	Gasteropodes (inhibition activité) Homme - H295R (inhibition activité) Poissons (inhibition activité)	Fent 1996 Sanderson <i>et al.</i> 2002 McAllister <i>et al.</i> 2003
	Imidazoles, OCP	Homme (inhibition activité) Poissons (inhibition activité)	Sanderson et van den Berg 2003
	Triazines	Homme-H295R (induction activité)	Sanderson <i>et al.</i> 2000
	Imidazoles, triazoles	Poissons (inhibition activité)	Hinfray <i>et al.</i> 2006
5- α -reductase	<i>Alkylphénols, BPA</i>	<i>Poissons (augmentation expression)</i>	<i>Denslow et al.</i> 2008
	<i>Stéroïdes synthétiques</i>	<i>Poissons (augmentation expression)</i>	<i>Denslow et al.</i> 2008
	<i>Phtalates</i>	<i>Rat (inhibition expression)</i>	<i>Lovekamp et Davis</i> 2001
5- α -reductase	Phtalate, Organoétains	Poissons (inhibition activité) Homme (inhibition activité)	Thibaut et Porte 2004 Daxenberger <i>et al.</i> 2002
	Atrazine		

2.2.2.2 Modulation du métabolisme des hormones endogènes

L'homéostasie des hormones endogènes n'est pas le seul fait de la stéroïdogénèse, l'augmentation ou la diminution du métabolisme de ces hormones jouent également un rôle important. Ce dernier est réalisé principalement au niveau du foie.

Présentation générale

Le métabolisme est assuré par deux catégories d'enzymes qui interviennent également dans le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques (i.e. détoxification), il s'agit des enzymes de phase I et de phase II (**Tableau 13**).

Tableau 13. Enzymes de phase I et II du métabolisme des xénobiotiques et des hormones endogènes

	Action	Enzymes
Phase I	Oxydation	Cytochrome P450, Amino-oxydase, Deshydrogénase
	Réduction	Nitro/azo-réductase
	Hydrolyse	Estérase
Phase II	Acétylation	Acétyl-transférase
	Conjugaison amino-acide	Glutathione transférase(GST)
	Glucuronidation	Glucuronyl transférase (UGT)
	Méthylation	Méthyl transférase
	Sulfonation	Sulfo-transférase (SULT)

Les *enzymes de phase I* regroupent essentiellement des membres de la famille des cytochromes P450 qui constituent un groupe d'hémo-protéines. Elles ont pour fonction d'ajouter ou d'exposer des groupements polaires à la surface des molécules à travers des réactions d'oxydation, de manière à augmenter leur polarité et favoriser ainsi leur élimination (**Figure 11**). Les *enzymes de phase II*, dites de conjugaison, interviennent ensuite et augmentent encore la polarité des molécules en leur ajoutant des groupements polaires (i.e. sulfo/glucoro-conjugés). Ces enzymes peuvent aussi rendre inactives les molécules à travers le masquage de certains groupements fonctionnels (i.e. stéroïdes conjugués inactifs).

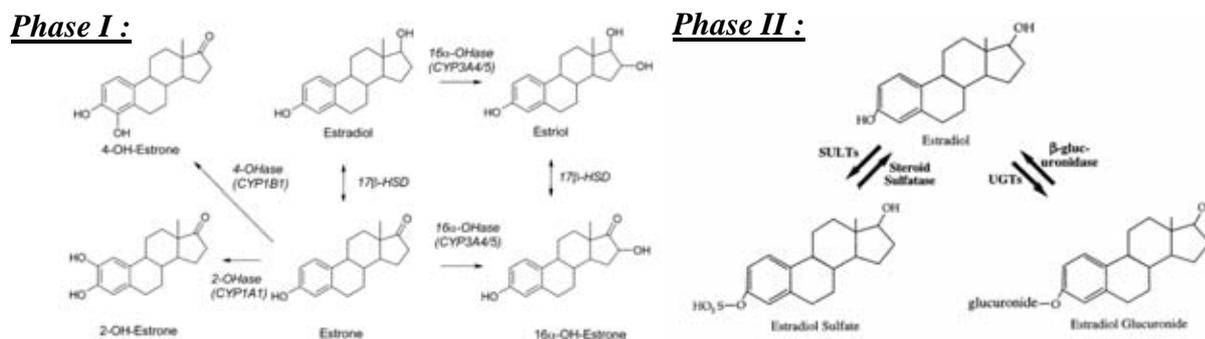


Figure 11. Métabolisation de stéroïdes endogènes par les enzymes de phase I (à gauche, Sanderson et van den Berg 2003) et de phase II (à droite, Raftogianis *et al.* 2000)

Le contrôle transcriptionnel de ces enzymes par les récepteurs nucléaires AhR, PXR et CAR a été mentionné plus haut. Ainsi tout ligand environnemental d'un de ces récepteurs peut potentiellement entraîner un dérèglement du métabolisme de ces hormones en modulant l'expression et l'activité sous-jacente de ces enzymes. Dans cette partie sont décrites uniquement les interactions directes avec les enzymes indépendantes des récepteurs nucléaires et du AhR.

Les effets de contaminants environnementaux ont particulièrement été décrits pour certaines familles d'enzymes de phase I, notamment la famille du CYP1A, et plus récemment celle du CYP3A. Les effets sur les enzymes de phase II restent moins connus.

Le CYP1A

Chez l'Homme, les principaux membres de cette famille sont le CYP1A1 et le CYP1A2. Chez les poissons, on parle généralement de CYP1A du fait des analogies partagées à la fois pour le CYP1A1 et le 1A2 (Schlenk *et al.* 2008). Que ce soit chez l'Homme ou les poissons, les membres de la famille du CYP1A catalysent l'oxydation de substrats endogènes et de polluants environnementaux et jouent de ce fait un rôle clef dans la détoxification.

L'expression génique de tous les membres de cette famille est régulée par le AhR aussi bien chez l'Homme que chez les poissons. De ce fait l'expression peut être induite suite à l'exposition à des contaminants environnementaux spécifiques. Ainsi l'activité enzymatique du CYP1A est très souvent utilisée comme biomarqueur pour la détection spécifique de ces composés (i.e. activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase-EROD, voir section 2.32.4, figure 14, p38)

Le CYP3A

Chez les mammifères et les poissons, cette sous-famille enzymatique est l'une des plus abondantes dans le foie et joue un rôle clef dans le métabolisme des xénobiotiques (Burk et Wojnowski 2004, Gibson et Plant 2002). Jusqu'à aujourd'hui, 14 gènes paralogues du CYP3A ont été identifiés chez les poissons téléostéens (McArthur *et al.* 2003, Tseng *et al.* 2005, Kashiwada *et al.* 2005, Christen *et al.* 2010). Chez l'Homme, le CYP3A4 est le plus caractérisé et il est notamment capable de métaboliser près de 60% des médicaments prescrits (Pelkonen *et al.* 2008).

La régulation de la transcription du CYP3A est modulée par de nombreux xénobiotiques mais aussi par des composés endogènes tels que les hormones stéroïdiennes et leurs métabolites. Cependant elle diffère d'une espèce à une autre (Moore *et al.* 2002) tout comme les mécanismes de régulation sous-jacents. Chez les mammifères, la régulation de la transcription du CYP3A est placée sous le contrôle de plusieurs récepteurs nucléaires : le PXR (Kliewer *et al.* 1998), le CAR (Goodwin *et al.* 2001), le VDR (Burk *et al.* 2004) et le GR (Pascussi *et al.* 2000). L'action du GR semble être indirecte et passerait par une augmentation de l'expression du PXR et du CAR (Pascussi *et al.* 2003, Gibson *et al.* 2002).

Chez les poissons, ces mécanismes de régulation sont moins bien caractérisés. Cependant, il semblerait que le PXR (Moore *et al.* 2002) et le complexe AhR/ARNT (Tseng *et al.* 2005) soient impliqués. Par ailleurs, un certain nombre d'études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont permis de mettre en évidence des divergences dans l'expression, la localisation tissulaire et l'activité catalytique des différentes isoformes (Mortensen et Arukwe 2006, Hasselberg *et al.* 2004, Hasselberg *et al.* 2008, Hegelund *et al.* 2004, Tseng *et al.* 2005, Smith et Wilson 2010, Pavlikova *et al.* 2010).

Perturbation du métabolisme

De manière générale, l'augmentation ou la diminution du métabolisme des stéroïdes peut contribuer à l'effet délétère des PE. L'altération de ce métabolisme induit par des contaminants environnementaux représente un mécanisme important de perturbation endocrinienne. Nombre d'études ont porté sur les enzymes de phase I en comparaison des enzymes de phase II. Le **tableau 14** présente une liste non exhaustive des interactions entre contaminants et enzymes du métabolisme décrits chez l'Homme et les poissons téléostéens dans la littérature scientifique.

Tableau 14. Interactions des polluants environnementaux avec les enzymes de phase I et II.
(D'après Miranda *et al.* 1998, Thibaut et Porte 2004, Pelkonen *et al.* 2008, Denslow *et al.* 2008, Sanderson *et al.* 2003, Song 2001, Harris *et al.* 2004, Waring *et al.* 2008)

	Enzymes	Substrats endogènes	Inducteurs	Répresseurs
Mammifère	CYP1A	œstradiol	caféin, théophyllin, flutamide, lidocaïne HAP, Dioxines, Furanes, PCBs	α-naphtoflavone, kétoconazole, clotrimazole
	CYP3A4	testostérone, progestérone, œstradiol	testostérone, alprazolam, lovastatin, érythromycin, dexaméthasone, rifampicin, α-naphtoflavone, progestérone, tamoxifène, prednisolone, oméprazole, OCP	kétoconazole, clarythromycin
	UGT	œstradiol, thyroxine, testostérone	OH-PCB	BPA
	SULT	œstradiol, thyroxine testostérone	?	flavonoïdes, phénols, plastifiants, alkylphénols
Poissons	CYP1A	œstradiol	HAP, Dioxines, furanes, PCB	élliptiscine, cadmium, TBT, α- naphtoflavone, parathion, clotrimazole, kétoconazole, miconazole, isosafrole et pipéronyl butoxide
	CYP3A	testostérone, progestérone, œstradiol	kétoconazole, nonylphénol, rifampicin, TCDD, DDE, dexaméthasone, fluoxétine,	α-naphtoflavone, parathion, clotrimazole, kétoconazole, miconazole, EE2, nonylphénol, isosafrole et pipéronyl butoxide
	UGT	œstradiol, testostérone	?	alkylphénols, phtalates, organoétains
	SULT	œstradiol, testostérone	?	alkylphénols, phtalates, organoétains

2.2.2.3 Modulation du transport des hormones endogènes

Un autre mécanisme d'action important des PE consiste à interférer avec le transport des hormones endogènes. En effet, les PE peuvent interagir directement et de manière spécifique avec les transporteurs d'hormones telles que les protéines de transport plasmatique ou SHBG (*sex hormones binding protein*) ou encore l'ABP (*Androgen binding protein*). Tollefsen (2002) a notamment décrit l'interaction des alkylphénols avec les SHBG chez les poissons téléostéens. De même, le DDT, le lindane, et l'atrazine ont la capacité de se fixer à l'ABP et de limiter le transport des androgènes endogènes (Daxenberger *et al.* 2002). Enfin, certaines études rapportent la capacité de retardateurs de flammes bromés à interagir avec le TTR (Hamers *et al.* 2006).

2.2.3 Conclusions

Cette partie a permis de montrer la diversité et la complexité des mécanismes d'action par lesquels pouvaient agir les PE. Une bonne connaissance de ces mécanismes a permis le développement d'outils biologiques spécifiques de certaines familles de toxiques et qui sont employés pour la caractérisation des PE. La présentation de ces outils fait l'objet de la partie suivante.

2.3 Méthodes biologiques pour l'étude des perturbateurs endocriniens

Les perturbateurs endocriniens peuvent exercer leur effets à différents niveaux d'organisation biologique, allant de la molécule jusqu'à l'écosystème (**Figure 12**).

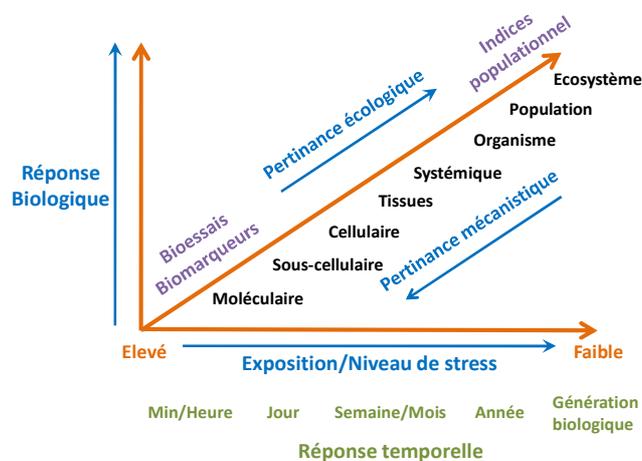


Figure 12. Paradigme de l'analyse en écotoxicologie (d'après Denslow *et al.* 2008)

En fonction du contexte de l'étude, le niveau d'organisation considéré et les outils employés diffèrent. Ainsi, l'étude de l'effet des PE et des mécanismes sous-jacents passe d'avantage par l'analyse de réponses à un faible niveau d'organisation (i.e. moléculaire, biochimique, cellulaire et organisme), à travers l'emploi d'outils spécifiques (i.e. bioessais, biomarqueurs). En revanche dans un contexte d'évaluation du risque pour les populations exposées, des niveaux d'organisation supérieurs sont considérés (i.e. populationnel, communautaire) et des outils plus adaptés tels que les mésocosmes, sont employés pour la mesure d'indices populationnels.

Plusieurs bio-essais *in vivo* et *in vitro*, plus ou moins spécifiques, sont disponibles pour étudier et surveiller les PE, de manière individuelle, en mélanges connus ou dans des mélanges environnementaux complexes.

2.3.1 Outils *in vivo* pour l'étude des PE

Concernant les outils *in vivo*, selon leur utilisation, il faut distinguer d'une part les biomarqueurs d'exposition *in situ* qui sont mesurés sur des individus sauvages et d'autre part les bioessais *in vivo* qui sont basés sur des expositions réalisées en laboratoire en conditions contrôlées. Dans les deux cas, différents niveaux d'organisation peuvent être considérés.

2.3.1.1 Échelles moléculaire et biochimique

Les réponses moléculaires et biochimiques sont généralement les premières réponses détectables associées à un changement environnemental ou à un stress. Elles peuvent ainsi servir d'indicateur précoce d'exposition et d'effet. Les réponses à de tels niveaux sont très sensibles et permettent dans certains cas de prédire une réponse à un plus haut degré d'organisation (i.e. tissu et organisme).

À un niveau moléculaire, ces tests sont en général basés sur l'analyse d'un paramètre spécifique au sein d'un tissu collecté. Il peut par exemple s'agir du suivi du profil d'expression d'un gène (i.e. PCR quantitative, ARNm) (Ankley *et al.* 2004) ou d'une batterie de gènes (i.e. *microarrays*, ADN) (Coe *et al.* 2006).

Concernant les outils biochimiques, certains sont relativement spécifiques d'une voie de signalisation telle que la mesure de la quantité de VTG (Jobling *et al.* 1998) ou des protéines de la zona radiata (Arukwe *et al.* 2000), la mesure de l'activité de l'aromatase cérébrale (Hinfray *et al.* 2006) associées à l'activation du récepteur ER, ou encore la mesure de l'activité EROD associée à l'activation du récepteur AhR (Mortensen *et al.* 2011). D'autres, en revanche, sont moins spécifiques telle que la mesure des concentrations d'hormones circulantes (e.g. ratio œstradiol/testostérone-11-cétotestostérone) (Garcia-Reyero *et al.* 2007)

2.3.1.2 Échelle tissulaire et de l'organisme

Il est également possible de mesurer des impacts à des degrés supérieurs d'organisation. Bien que ces outils soient pertinents et informatifs d'un point de vue biologique et écologique, ils sont souvent plus variables et parfois spécifiques d'une espèce.

A l'échelle tissulaire, on peut citer, la mesure d'indice somatique (e.g. indice gonadosomatique), l'observation d'histopathologie (e.g. ovotestis), l'étude de l'altération des caractères sexuels secondaires ou encore la qualité du sperme (e.g. nombre et motilité des spermatozoïdes). A l'échelle de l'organisme, l'étude du nombre d'œufs, de la maturité sexuelle, de la mortalité embryonnaire et néonatale, des altérations de la reproduction constituent des biomarqueurs d'effet reprotoxique (Gross *et al.* 2001, Scholz et Mayer 2008).

2.3.1.3 Réponse moléculaire à l'échelle de l'organisme

Récemment de nouvelles approches ont été développées pour appréhender certaines voies de signalisation. Leur intérêt principal réside dans le fait que l'on mesure une réponse moléculaire ou biochimique à l'échelle de l'organisme. Ces approches sont basées sur la mesure de l'expression d'un gène rapporteur ou de l'activité d'une enzyme sur des organismes vivants. De tels outils ont notamment été mis au point sur le poisson zèbre (*Danio rerio*).

Carvan *et al.* (2000) ont développé un poisson zèbre transgénique possédant un gène codant la luciférase (de luciole) ou un gène codant la *green fluorescent protein* (GFP) placés sous le contrôle des éléments de réponse de la dioxine. En présence de ligands du AhR, l'activation du récepteur conduit à l'expression de la luciférase ou de la GFP. Ainsi la simple quantification de la lumière ou de la fluorescence permet de mettre en évidence la présence de ligands du AhR.

Plus récemment Tong *et al.* 2009 ont mis au point un système similaire mais portant sur la voie de signalisation du récepteur des œstrogènes. Ils ont introduit chez le poisson zèbre le gène codant pour la GFP placé sous le contrôle du promoteur du gène codant l'aromatase B cérébrale (*cyp19a1b*) dont l'expression est essentiellement contrôlée par le récepteur des œstrogènes (Hinfray *et al.* 2006). En présence de ligand du ER, le récepteur activé se fixe aux éléments de réponse et induit l'expression de la GFP. La quantité de fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité de ligands.

Enfin, une dernière méthode développée ces dernières années consiste à mesurer des activités enzymatiques (e.g. EROD) sur des organismes vivants de petites tailles. La mesure de l'activité EROD en plaque 48 puits sur des larves de poissons zèbres a été développée et s'est montrée très sensible pour la détection des composés *dioxin-like* (e.g. EC₅₀ 2,3,7,8 TCDD à 1 pM) (Brion *et al.* comm pers ; Noury *et al.* 2006).

2.3.1.4 Conclusion

Les outils *in vivo* sont pertinents car ils permettent une mesure intégrative de la réponse des organismes aux contaminants auxquels ils sont exposés. Ils prennent ainsi en considération la complexité de la réponse associée à la pharmacocinétique et au métabolisme des composés. De plus ils permettent, dans certains cas, de faire le lien entre une réponse précoce (échelle moléculaire, biochimique) et un effet global à l'échelle de l'organisme (e.g. anomalies du développement, œdèmes...). Par ailleurs, les nouveaux outils *in vivo* basés sur l'expression de gènes facilement détectable par fluorescence ou luminescence sont adaptés au *screening* à travers la mesure de ces gènes à des stades précoces de développement (i.e. larves).

Néanmoins leur utilisation présente quelques limites dans une démarche bioanalytique. Tout d'abord on pourrait considérer qu'ils sont trop intégratifs, si bien qu'on ne peut jamais totalement spécifier le mécanisme sous-jacent à la réponse mesurée de par les interactions existantes entre les différentes voies de signalisation (i.e. nécessité de multiple co-exposition pour discriminer les voies impliquées). De plus cette réponse est également la résultante d'un certain nombre de facteurs environnementaux et physiologiques totalement indépendants de la seule présence des contaminants. Ces tests *in vivo* restent donc relativement peu spécifiques et, utilisés seuls, ne permettent pas l'identification des composés responsables des effets mesurés. Enfin, la mise en œuvre de tels outils peut s'avérer coûteuse (e.g. élevage) et, de plus, l'utilisation d'organismes vivants pour de telles expériences n'est pas sans poser des problèmes éthiques.

2.3.2 Outils *in vitro* pour l'étude des PE

2.3.2.1 Généralités

Alors que les bioessais *in vivo* sont réalisés sur des organismes vivants entiers, les tests *in vitro* sont basés sur l'utilisation d'une composante d'un organisme, isolée de son contexte biologique naturel. Ces bioessais emploient généralement des cellules isolées à partir d'un organe sain (i.e. culture primaire) ou de tumeurs et immortalisées par l'ajout d'un oncogène ou par une mutation d'un gène impliqué dans le cycle cellulaire (i.e. lignées cellulaires). Une diversité de bioessais *in vitro* a ainsi été développée pour étudier les PE. (**Tableau 15**).

Tableau 15. Exemples d'outils *in vitro* pour l'étude des PE à action œstrogénique

Principes	Exemples	Avantages spécifiques	Limites spécifiques	
Liaison au récepteur <i>Binding</i>	Fixation radioligand marqué sur récepteurs isolés ou cellules entières	Fixation [³ H]-E ₂ au ER	Simple, haut débit, spécifique	Aucune distinction ago/antago.
Réponses cellulaires endogènes	mRNA (PCR-quantitative)	VTG	Réponse spécifique	Mise en œuvre
	Protéines (Western-blot)	VTG	Intégratif	Peu spécifique
	Activité enzymatique	EROD/Aromatase	Intégratif	± Faible spécificité
	Prolifération cellulaire	E-SCREEN	Réponse physiologique + distinction ago/antago	Peu spécifique
Gènes rapporteurs	Transactivation promoteur cible	Luciférase en aval ERE	Simple, très spécifique, très sensible	Réponse artificielle

Les plus décrits restent ceux portant sur l'activité (anti-)œstrogénique (**Figure 13**).

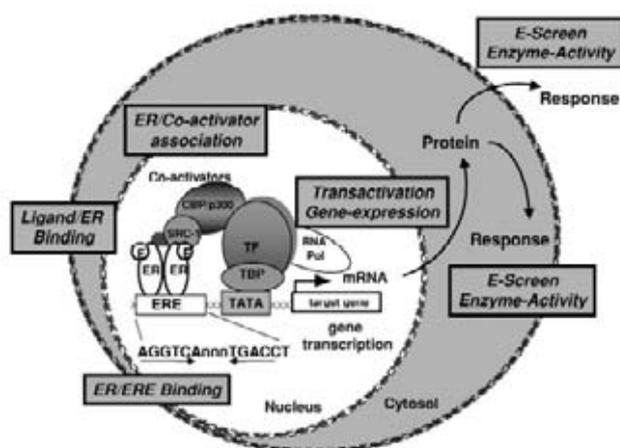


Figure 13. Méthodes pour la détection des composés œstrogéniques (Mueller *et al.* 2002)

Le principal intérêt de ces tests réside dans le fait qu'ils sont sensibles et basés sur des mécanismes d'action plus ou moins spécifiques de PE. De plus, ce sont des outils intégratifs. Ils sont ainsi utiles pour étudier le mécanisme d'action de substances, évaluer les effets de mélange et mettre en évidence des interactions potentielles entre certaines voies de signalisation. Toutefois, il s'agit de systèmes simplifiés et, de ce fait, la réponse mesurée reflète rarement la réponse à l'échelle de l'individu. Les tests les plus employés sont présentés ci-après.

2.3.2.2 Mesure de *binding*

Ce test consiste à mesurer la fixation des ligands au récepteur. Cette mesure peut se faire sur cellules entières lysées ou sur une fraction de cellule (e.g. cytoplasme, membrane, noyau). Elle consiste à évaluer la compétition entre un ligand de haute affinité radiomarqué (e.g. [³H]-E₂) et le composé dont on cherche à évaluer s'il se fixe au récepteur. De telles approches ont été développées pour différents récepteurs nucléaires (Laws *et al.* 2000, Molina Molina *et al.* 2008, Wilson *et al.* 2007, Weiss *et al.* 2009a). Ils ont largement été utilisés par le passé de par leur rapidité et leur facilité de mise en œuvre. Toutefois, ce test ne permet pas de distinguer un agoniste d'un antagoniste.

2.3.2.3 Mesure de prolifération cellulaire

Un deuxième type de bioessais consiste à mesurer la prolifération cellulaire. La mesure de la prolifération des lignées cellulaires MCF-7 (E-Screen) et T47D a très fréquemment été utilisée pour l'étude des composés œstrogéniques (Isidori *et al.* 2009). Des tests similaires existent pour les composés androgéniques (A-screen, Soto *et al.* 2004) sur la lignée MCF7-AR1, ainsi que pour les composés interagissant avec TR (T-Screen, Kitamura *et al.* 2005) sur la lignée GH-3 de rat.

À la différence de la mesure de *binding*, cette mesure comporte l'avantage d'être une réponse biologique secondairement à l'activation du récepteur par des agonistes. Toutefois quelques rares études rapportent des réponses prolifératives de la lignée MCF-7 associées à des molécules non-œstrogéniques (e.g. progestagènes, dihydroxy-testostérone, éthanol...) générant ainsi des faux positifs (Baker 2001).

2.3.2.4 Utilisation de gènes naturels ou rapporteurs

D'autres bioessais, basés sur l'expression de gènes naturels ou rapporteurs (e.g. luciférase, β -galactosidase, GFP), ont été mis en place et se sont révélés particulièrement utiles de par leur sensibilité, leur spécificité, leur simplicité d'utilisation et leur rapidité (**Tableau 16**).

Concernant la mesure de l'expression de gènes naturels, elle peut porter sur la détection et la quantification d'ARNm (Pomati *et al.* 2007) ou de protéines (e.g. VTG), ou encore sur la mesure d'une activité enzymatique résultante de l'activation d'un récepteur nucléaire sur des lignées cellulaires (e.g. HepG2, H4IIE, PLHC-1, RTL-W1) ou en culture primaire (e.g. hépatocytes de truite arc-en-ciel). La mesure de l'activité EROD reste à ce jour la méthode la plus employée pour la détection des composés *dioxin-like* (Behnisch *et al.* 2001) (**Figure 14**). La mesure de l'activité aromatasase et d'autres enzymes de la stéroïdogénèse (e.g. 17β -HSD) sont également rapportées sur des lignées humaines (i.e. H295R, JEG-3) (Hecker et Giesy 2008).

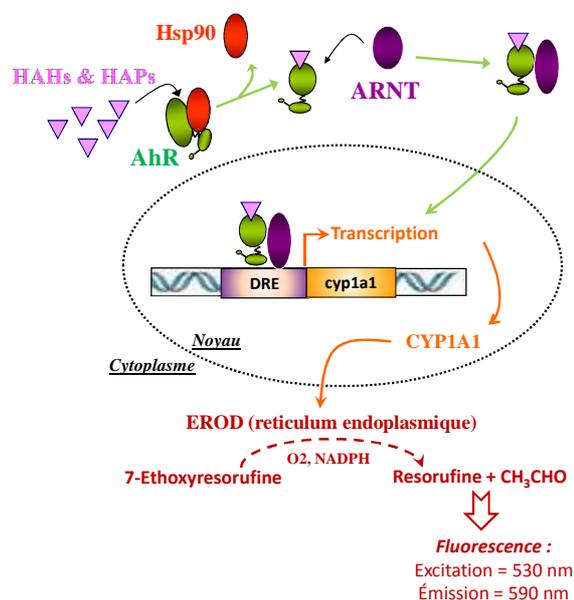


Figure 14. Principe de la mesure de l'activité EROD *in vitro*

Par ailleurs l'utilisation de gènes rapporteurs est très fréquemment rapportée dans la littérature pour évaluer le potentiel de perturbateur endocrinien de polluants environnementaux et détecter des composés actifs dans des extraits environnementaux (*voir section 3.2.2, p52*). Ils sont basés sur des cellules de mammifères mais l'utilisation de levures et plus rarement celles de cellules issues d'organismes non mammaliens (e.g. poisson) sont également rapportées. Néanmoins, les systèmes rapporteurs basés sur des levures ont quelques limites telles qu'une imperméabilité de la membrane à certains composés pouvant générer des faux négatifs (Baker *et al.* 2001).

Généralement, les cellules sont transfectées de manière stable avec un plasmide codant pour un gène rapporteur placé sous le contrôle d'un promoteur contenant des éléments de réponse d'un récepteur donné. Ce récepteur peut être présent de façon endogène ou introduit par transfection stable ou transitoire. Une fois activé, le récepteur se fixe sur le promoteur du gène cible et induit sa transcription (**Figure 15**). Des systèmes chimériques ont également été mis au point pour augmenter la spécificité de la réponse (e.g. système gal-4, Seimandi *et al.* 2005).

Tableau 16. Bioessais *in vitro* basés sur l'expression de gène naturel ou rapporteur en lignées cellulaires (ed : endogène , ex : exogène , R : gène rapporteur , N : gène naturel , St :transfection stable , Tr : tranfection transitoire)

Récepteur	Lignée cellulaire (Isotype, Système)	Lignée Mère (Espèces-Tissus)-	Réf
ER	MELN (hER α -ed, R-Luc-St)	MCF-7 (Homme, cancer du sein)	[1]
	MVLN (hER α -ed, R-Luc-St)	MCF-7 (Homme, cancer du sein)	[8]
	HELN (hER α/β -ex, R-Luc-St)	HeLa (Homme, cancer col de l'utérus)	[1]
	ER-CALUX® (hER α/β ed, R-Luc-St)	T47D (Homme, cancer du sein)	[12]
	YES (hER α -ex, R- β Gal-St)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Levure)	[9]
	T47D-KBluc (hER α/β -ed, R-Luc-St)	T47D (Homme, cancer du sein)	[7]
	BG1Luc4E2 (hER-ed,R-Luc-St)	BG1 (Homme, cancer ovaire)	[32]
	HELN-rtER (rtER α -ex, R-Luc-St)	HeLa (Homme, cancer col de l'utérus)	[10]
	ZELH (zfER α/β 1/ β 2-ex, R-Luc-St)	ZFL (Poisson, hépatocytes)	[14]
	PELN-rtER (rtER α -ex, R-Luc-St)	PLHC-1 (Poisson, hépatocytes)	[11]
	RTG-2-rtER α (rtER α -ex, R-Luc-St)	RTG-2 (Poisson, Gonades)	[35]
AR	PALM (hAR-ed,R-Luc-St)	PC-3 (Homme, adénocarcinome prostate)	[5]
	MDAkb2 (hAR-ed, R-Luc-St)	MBA-MB-453 (Homme, cancer du sein)	[4]
	AR-CALUX® (hAR-ex, R-Luc-St)	U2-OS (Homme, ostéosarcome)	[13]
	CHO-515 (hAR-ex, R-Luc-St)	CHO (Hamster, ovaries)	[22]
	YAS (hAR-ex, R- β Gal-St)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Levure)	[33]
GR	MMLN (hGR-ed, R-Luc-St)	MCF-7 (Homme, cancer du sein)	[2]
	HMLN (hGR-ed, R-Luc-St)	HeLa (Homme, cancer col de l'utérus)	[2]
	HG5LN-GR (Gal4-hGR-ex, R-Luc-St)	HeLa (Homme, cancer col de l'utérus)	[3]
	MDAkb2 (hGR-ed, R-Luc-St)	MBA-MB-453 (Homme, cancer du sein)	[4]
	GR-CALUX®	U2-OS (Homme, ostéosarcome)	[?]
	COS-7-rtGR2 (rtGR2-ex, R-Luc-Tr)	COS-7 (Chimpanzé, fibroblaste rein)	[29]
CHO-K1-rtGR (rtGR-ex, R-Luc-Tr)	CHO-K1 (Hamster, ovaries)	[30]	
PR	HG5LN-PR (Gal4-hGR-ex, R-Luc-St)	HeLa (Homme, cancer col de l'utérus)	[3]
	HELN-PRB (hPRB-ex, R-Luc-St)	HeLa (Homme, cancer col de l'utérus)	[?]
	MMLN (hPR-ed, R-Luc-St)	MCF-7 (Homme, cancer du sein)	[2]
	YPH-499-hPR (hPR-ex, R-GFP-St)	YPH-499 (Levure)	[24]
	PR-CALUX® (hPRB-ex, R-Luc-St)	U2-OS (Homme, ostéosarcome)	[25]
	CHO-hPR (hPRB-ex, R-Luc-St)	CHO (Hamster, ovaries)	[26]
MR	HG5LN-MR (Gal4-hMR-ex, R-Luc-St)	HeLa (Homme, cancer col de l'utérus)	[3]
TR	CHO-TSH (hTSH-ex, R-Luc-St)	CHO (Hamster, ovaries)	[27]
	TR-CALUX (hTR α -ex, R-Luc-St)	U2OS (Homme, ostéosarcome)	[28]
	PC-DR-LUC (hTR α -ex, R-Luc-St)	PC12 (rat, glande surrénale)	[34]
PPAR	HG5LN-PPAR (Gal4-hPPAR-ex, R-Luc-St)	HeLa (Homme, cancer col de l'utérus)	[6]
AhR	DR-CALUX ® (rAhR-ed, R-Luc-St)	H4IIE (Rat, Hépatome)	[31]
	CAFLUX (mAHR-ed, R-GFP-St)	Hepa1c1c7 (Souris, Hépatome)	[36]
	HepG2 (AhR, N-CYP1A)	HepG2 (Homme, Carcinome hépatique)	[37]
	H4IIE (AhR, N-CYP1A)	H4IIE (Rat, Hépatome)	[37]
	RTL-W1, PLHC-1 (AhR, N-CYP1A)	Hépatocytes Truite arc en ciel/ Vairon	[38]
PXR	HepG2-hPXR (hPXR-ex, R-Luc-Tr)	HepG2 (Homme, Carcinome hépatique)	[15]
	Cos-7-hPXR (hPXR-ex, R-Luc-Tr)	Cos-7 (Chimpanzé, fibroblastes rein)	[16]
	HuH-7-hPXR (hPXR-ex, R-Luc-Tr)	HuH-7 (Homme, Carcinome hépatique)	[17]
	HepG2-PXR (hPXR-ex, R-Luc-Tr)	HepG2 (Homme, Carcinome hépatique)	[18]
	CV-1-PXR (hPXR, fPXR, BXR, CXR-ex, R-Luc)	CV-1 (Chimpanzé, fibroblaste rein)	[19]
	HepG2-hPXR (hPXR-ex, R-Luc-St)	HepG2 (Homme, Carcinome hépatique)	[20]
	HG5LN-hPXR (Gal4-hPXR-ex, R-Luc-St)	HeLa (Homme, cancer col de l'utérus)	[21]
	DPX-2 (hPXR-ex, R-Luc-St))	HepG2 (Homme, Carcinome hépatique)	[23]

[1] Balagué et al. 1999 ; [2] Balagué et al. 2000 ; [3] Molina Molina et al. 2000 ; [4] Wilson et al. 2002 ; [5] Térouanne et al. 2000 ; [6] Seimandi et al. 2005 ; [7] Wilson 2004 ; [8] Pons et al. 1990 ; [9] Routledge et Sumpter 1996 ; [10] Molina Molina et al. 2008 ; [11] Cosnefroy et al. 2009 ; [12] Legler et al. 1999 ; [13] Sommevelde et al. 2005 ; [14] Cosnefroy 2010 ; [15] Coumoul et al. 2002 ; [16] Tabb et al. 2002 ; [17] Jacobs et al. 2004 ; [18] Vignati et al. 2004 ; [19] Moore et al. 2002 ; [20] Lemaire et al. 2004 ; [21] Lemaire et al. 2006 ; [22] Paris et al. 2002 ; [23] Raucy et al. 2002 ; [24] Chatterjee 2008 ; [25] Sommevelde et al. 2011 ; [26] Schoonen et al. 1998 ; [27] Sendak et al. 2002 ; [28] Schriks 2006 ; [29] Kugathas 2011 ; [30] Lethimonier et al. 2000 ; [31] Murk et al. 1996 ; [32] Rogers et Demison 2000 ; [33] Sohoni et Sumpter 1998 ; [34] Jugan et al. 2007 ; [35] Ackermann et al. 2002 ; [36] Nagy et al. 2002 ; [37] Westernak et al. 2007 ; [38] Thibaut et al. 2009.

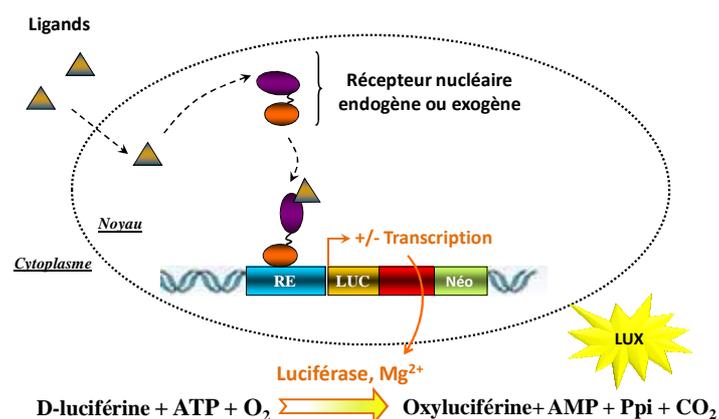


Figure 15. Principe de l'utilisation de gène rapporteur luciférase

De nombreuses études rapportent également avec succès l'emploi de transfection transitoire (Kruger *et al.* 2008, Coumoul *et al.* 2002, Venkatesh *et al.* 2011, Wilson *et al.* 2007) pour le criblage de polluants environnementaux.

Enfin des systèmes hydrides poissons-humains, ont récemment vu le jour et ont permis de mettre en évidence des variations dans les réponses mesurées selon le contexte cellulaire (Molina-Molina *et al.* 2008, Cosnefroy *et al.* 2009).

Globalement, l'intérêt principal des systèmes rapporteurs reste la mesure d'une réponse très précoce (i.e. fixation au récepteur) et spécifique constituant le point de départ d'une multitude de potentiels effets biologiques, contrairement à la mesure d'une activité enzymatique qui reste généralement multi-factorielle (e.g. interaction avec le récepteur ou avec l'enzyme, *cross-talk*...).

2.3.2.5 Conclusion

Les bioessais *in vitro* offrent des outils de détection sensibles, spécifiques, rapides, intégratifs, relativement peu coûteux et sont réellement adaptés à un criblage haut débit de substances ou d'échantillons environnementaux. Ces nombreux avantages les rendent aujourd'hui quasi-incontournables pour l'étude des PE dans l'environnement à travers la mise en évidence du mécanisme d'action de ces composés. Cependant l'utilisation de tels outils n'est pas sans inconvénient du fait d'une certaine simplicité de ces systèmes.

En effet, bien qu'ils tiennent compte des effets de mélange et des interactions entre les voies de signalisation à l'échelle de la cellule, la réponse mesurée ne peut refléter celle à l'échelle de l'individu. Par exemple, les aspects pharmaco-cinétiques, de biotransformation ou encore de fixation à des protéines de transport ne sont pas pris en compte. Or, il est fréquent, par exemple, que certains PE soit activés ou inactivés *in vivo* par une conversion enzymatique. Ainsi certains composés décrits comme actifs sur des modèles *in vitro* ne le seront pas forcément sur des modèles *in vivo* et inversement. Ces limites doivent être considérées dans le cadre d'une démarche d'évaluation du risque pour les organismes exposés et l'utilisation d'outils *in vitro* peut sur/sous-estimer le potentiel PE de composés ou d'échantillon testés (Schlenk 2008). Ainsi la combinaison des outils *in vitro* et *in vivo* est à privilégier pour une meilleure caractérisation du danger des substances chimiques.

3. Évaluation de la contamination *in situ* : les approches bio-analytiques

Cette troisième et dernière partie de la synthèse bibliographique vise à présenter les différentes approches employées actuellement pour l'étude de la contamination *in situ* des milieux aquatiques par les PE (**Figure 16**). Elle présente ainsi pour chacune de ces approches, les méthodes actuelles et leurs limites de manière à définir les futurs enjeux d'une telle démarche pour une caractérisation optimale de la contamination.

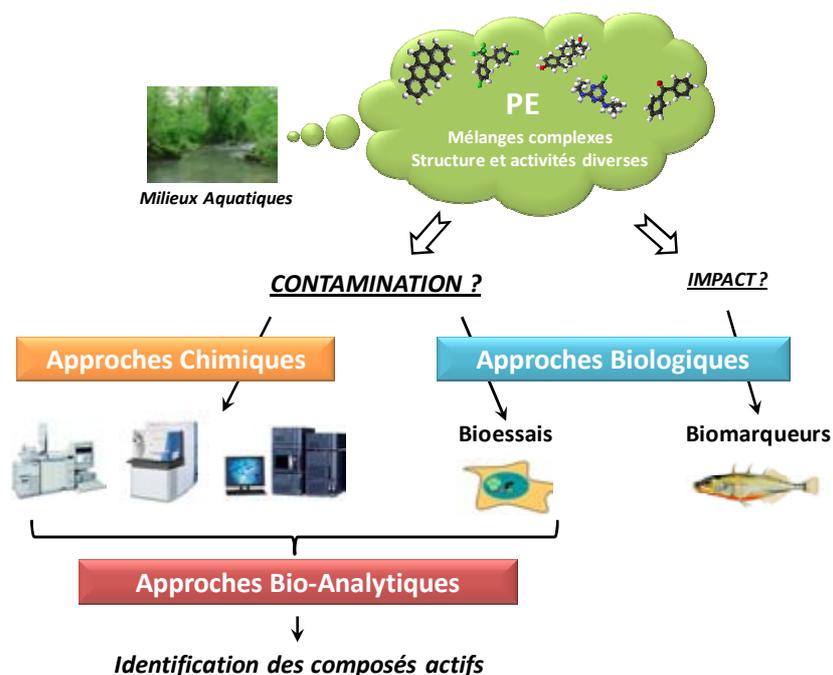


Figure 16. Approches pour l'évaluation de la contamination des milieux aquatiques par les PE

3.1 La préparation des échantillons

La préparation des échantillons est une étape clef dans l'évaluation de la contamination par les PE. Dans une optique d'identification des composés, elle se doit principalement d'être relativement exhaustive (i.e. extraction d'une large gamme de composés) et de permettre des analyses biologiques et chimiques optimales (i.e. limiter les effets de matrices). Dans une optique d'évaluation du risque pour les populations exposées, elle se doit d'être réaliste, et notamment de tenir compte de la biodisponibilité des contaminants pour les organismes aquatiques.

3.1.1 Le sédiment

3.1.1.1 Une matrice complexe

Le sédiment est un compartiment du milieu aquatique où sont stockés à long terme des milliers de molécules (e.g. métaux, polluants organiques hydrophobes...). Il se compose de l'eau interstitielle ($\geq 50\%$ de son volume), de la phase minérale inorganique (e.g. argiles, silicates) et de la phase organique. Cette dernière, de par la diversité de sa composition chimique et structurale (i.e. granulométrie, association à la phase minérale) contrôle le transport, la biodisponibilité et l'extractabilité (i.e. bioaccessibilité) des contaminants organiques qu'elle contient (Seiler *et al.* 2008, Jeanneau *et al.* 2007).

3.1.1.2 Extraction : Prise en compte de la diversité et de la biodisponibilité

Du fait de la diversité des contaminants présents dans le sédiment, la méthode d'extraction se doit de pouvoir extraire une large gamme de composés en termes de propriétés physico-chimiques et d'activité biologique globale de l'échantillon.

Différentes méthodes sont utilisées pour l'extraction des contaminants organiques dans les matrices solides (**Tableau 17**). Elles diffèrent notamment par leur rapidité, leur consommation en solvant, leur possible automatisation et leur coût. Historiquement, l'extraction par Soxhlet a été la plus employée mais de par sa grande consommation en solvant et la lenteur de l'extraction, d'autres techniques ont été développées. Actuellement l'extraction assistée par micro-ondes (MAE) et l'extraction en phase liquide à haute pression (PLE ou ASE®) sont les techniques les plus employées car elles permettent une extraction rapide, efficace et automatisée d'un grand nombre d'échantillons. Toutefois ce sont des méthodes considérées comme drastiques, et une étape de purification de l'extrait post-extraction est souvent nécessaire.

Tableau 17. Méthodes d'extraction de matrices solides employées pour l'étude des PE (DCM : dichlorométhane , AE : acétate d'éthyl)

Méthodes	Composés étudiés	Solvant	Rendements (%)	Références
Soxhlet	HAH, HAP, OCP alkylphénols	DCM	84-105 60-73	Khim <i>et al.</i> 1999
	alkylphénols	DCM:Hexane (3:1)	90-105%	Khim <i>et al.</i> 2000
	alkylphénols, stéroïdes	DCM:Hexane (3:1)	?	Song <i>et al.</i> 2006
	HAH, HAP, OC	DCM:Hexane (1:1)	?	Song <i>et al.</i> 2007
	HAP, OCPs, PCB	DCM	?	Brack <i>et al.</i> 2003
	HAP, PCDD/DF, PCB	Acétone	84	Keiter <i>et al.</i> 2008
	pesticides	Hexane:Acétone (1:1)	48-100	Villaverde <i>et al.</i> 2008
	PCB, PBDE, OCP, Alkylphénols, E2	DCM:Acétone (3:1) Hexane:Acétone (3:1)	87 89	Houtman <i>et al.</i> 2007
ASE	PCN, HAP, OCP, PCB	Toluène:Acétone (70:30, v/v)	?	Brack <i>et al.</i> 2008
	pesticides	Hexane:Acétone (1:1)	27-161	Villaverde <i>et al.</i> 2008
	PCB, PBDE, OCP, alkylphénols, E2	DCM:Acétone (3:1) Hexane:Acétone (3:1)	86 84	Houtman <i>et al.</i> 2007
	HAP, PCDD/DF, PCB	Toluène	?	Sanctorum <i>et al.</i> 2005
	alkylphénols	MeOH:Acétone (1:1)	73-97	Petrovic <i>et al.</i> 2002c
	stéroïdes, HAP, PCB	Heptane:Acétone	?	Louiz <i>et al.</i> 2008
	Pesticides	Hexane:Acétone (1:1)	63-123	Villaverde <i>et al.</i> 2008
	pharmaceutiques	MeOH:H2O (1:2, v/v)	34-160	Jelic <i>et al.</i> 2009
	pharmaceutiques	MeOH:H2O acidifié (1:1, v/v)	70-125	Nieto <i>et al.</i> 2007
	filtres UV	AE:Hexane (50:50, v/v)	88-120	Rodil et Moeder 2008
pharmaceutiques	MeOH:H2O (1:2, v/v)	3-129	Radjenovic <i>et al.</i> , 2009	
Ultrasons	stéroïdes	MeOH + Acétone	73-104	Ternes <i>et al.</i> 2002
	stéroïdes et métabolites	ACN:H2O (9:1, v/v)	85-117	Isobe <i>et al.</i> 2006
	pesticides	Hexane:Acétone (1:1)	47-134	Villaverde <i>et al.</i> 2008
	pesticides, alkylphénols, stéroïdes, benzophénones, parabènes	Hexane:Acétone (2:1, v/v)	85-108	Kinani <i>et al.</i> 2008
Micro Onde	stéroïdes	MeOH	> 92	Labadie <i>et al.</i> 2007
	pesticides	MeOH:DCM (1:9)	73-118	Smalling <i>et al.</i> 2008
	pharmaceutiques	DCM:MeOH (2:1, v/v)	20-105	Rice et Mitra 2007
	PCB/PBDE	Hexane:Acétone (1:1)	60-140	Wang <i>et al.</i> 2010

Les composés œstrogéniques et *dioxin-like* restent les plus étudiés et ont souvent été associés à une extraction ciblée d'une certaine classe de contaminants (i.e. composés semi-polaires et polaires pour les xœstrogènes et composés apolaires pour les substances *dioxin-like*). Toutefois, certaines études rapportent l'utilisation de méthodes plus exhaustives avec l'emploi de mélanges de solvants à large spectre (e.g. DCM:acétone, hexane:acétone), mais généralement validées pour une seule catégorie de composés (Houtman *et al.* 2007). Ainsi il subsiste un besoin de mettre en place et d'évaluer une/des méthode(s) permettant l'extraction d'une large gamme de composés présentant des activités biologiques (i.e. autres que œstrogénique et *dioxin-like*) et des propriétés physico-chimiques différentes.

Jusqu'à présent, la plupart des études sur le sédiment ont utilisé des méthodes ne tenant pas compte de la biodisponibilité des polluants. Nous définissons ici la fraction biodisponible comme la fraction désorbable et dissoute libre pouvant être absorbée par les organismes (i.e. circulation à travers les membranes biologiques) selon des processus de partitionnement associés aux propriétés physico-chimique des molécules (Seiler *et al.* 2008). Nous la distinguons ainsi de la biodisponibilité toxicologique correspondant à la fraction absorbable produisant un effet chez l'organisme selon des processus de transport de métabolisme et d'excrétion conditionnant la concentration finale au niveau des cibles biologiques (**Figure 17**).

Il est désormais avéré que si la biodisponibilité est ignorée, les risques associés à ces contaminants peuvent être mal estimés (Brack *et al.* 2009) (e.g. sur-estimation du risque pour les organismes exposés dans le cas de composés très toxiques mais très peu biodisponibles *in situ*). Dès lors, plusieurs études ont porté sur le développement d'approches permettant de tenir compte de cette biodisponibilité (**Figure 17**).

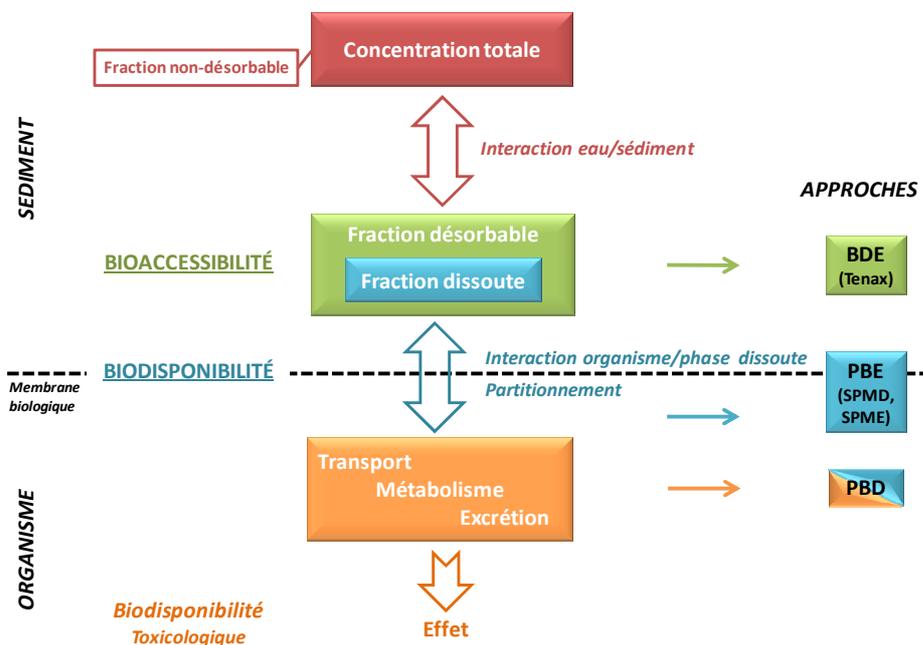


Figure 17. Différentes approches pour la prise en compte de la biodisponibilité

Une première série d'approche a porté sur la détermination de la fraction bioaccessible de contaminants organiques, c'est-à-dire la fraction désorbable des particules et accessible aux organismes benthiques. Des outils basés sur la désorption dans l'eau d'échantillons de sédiment suivie d'une adsorption utilisant un adsorbant compétitif suivie d'une extraction de cet adsorbant ont notamment été développés (e.g. TENAX, Schwab *et al.* 2009). Ces extractions dirigées par la bioaccessibilité (*bioaccessibility-directed extraction*, **BDE**) constituent une approche intéressante, cependant elles ne rendent pas compte des phénomènes

de partitionnements entre la colonne d'eau, le sédiment et les organismes qui conditionnent la biodisponibilité des contaminants.

Des approches plus récentes tiennent compte de cette biodisponibilité. Il s'agit d'extractions (*partition based-extraction*, **PBE**) ou de dosages basés sur le partitionnement (*partition based-dosing*, **PBD**). Dans le premier cas, elles sont basées sur le dosage de la fraction des contaminants dissouts libres au sein de l'eau interstitielle en équilibre avec la matrice solide et les organismes. Elle consiste principalement à faire de l'extraction passive (e.g. *Semi Permeable Membrane Device* (Leppänen et Kukkonen 2006)). Toutefois les quantités extraites sont souvent limitées et insuffisantes pour permettre une analyse complète (i.e. analyses biologiques et chimiques) des contaminants. Dans le cas du **PBD** il s'agit d'exposer les modèles *in vitro* et/ou *in vivo* à un adsorbant artificiel (e.g. ruban de silicone, (Bandow *et al.* 2009) préalablement mis au contact d'un extrait environnemental. Cette approche permet ainsi de simuler le phénomène de partitionnement se produisant naturellement entre le sédiment, l'eau et les organismes.

Il faut noter que les méthodes PBD peuvent être combinées aux méthodes BDE de manière à considérer l'ensemble des processus régissant la contamination des organismes aquatiques par le sédiment. Ainsi de manière à mieux évaluer les risques encourus par les populations exposées, il conviendra d'intégrer progressivement ces nouvelles méthodes.

3.1.1.3 Purification

De nombreux composés naturels présents dans le sédiment (i.e. glucides, lipides, soufre, acides humiques, pigments...) ou chez les organismes (i.e. stéroïdes, cholestérol, acides gras) ont été décrits comme pouvant interférer avec les analyses biologiques et chimiques. Notamment les substances humiques ont été montrées comme pouvant altérer la biodisponibilité de contaminants organiques *in situ* mais aussi post-extraction en complexant les composés organiques (Steinberg *et al.* 2003, Seiler *et al.* 2006). Il semblerait également que les acides humiques puissent agir de manière directe sur les cibles biologiques (e.g. récepteur AhR, Janosek *et al.* 2007). Enfin d'autres types de substances, tels que le soufre, peuvent endommager les colonnes analytiques (i.e. CPG) et ainsi altérer l'analyse. Ces composés sont qualifiés d'interférents matriciels.

L'extraction conduit généralement à la co-extraction de ces interférents. Ainsi la mesure d'une activité biologique sur des extraits bruts peut ne pas être suffisante pour évaluer le vrai potentiel PE et il en va de même pour les analyses chimiques (e.g. extinction de signal ou signal sur-évalué). Une étape de purification est donc souvent nécessaire pour éliminer ces interférences.

Il existe une diversité de méthodes de purification plus ou moins spécifiques. Dans le cadre d'une caractérisation complète de la contamination, cette méthode de purification se doit d'éliminer une majorité d'interférents matriciels tout en conservant une large gamme de composés actifs.

L'élimination du soufre par l'acide sulfurique, par le cuivre activé ou par la chromatographie de perméation de gel (GPC), est quasi-universellement réalisée de manière à limiter l'endommagement des colonnes analytiques. L'utilisation de l'acide sulfurique ou du cuivre pouvant altérer l'extrait environnemental (i.e. oxydation, changement de pH, effet catalytique...), la GPC est souvent la plus utilisée.

Concernant les autres molécules naturelles tels que les lipides ou les substances humiques, des méthodes de chromatographie d'adsorption ou de GPC, d'extraction sur phase solide seules ou combinées permettent leur élimination (Isobe *et al.* 2007, Simon *et al.* 2011). Parmi ces techniques la GPC offre le spectre le plus large et le moins spécifique. Elle permet ainsi l'élimination de la plupart des interférents matriciels, tout en conservant une large

gamme de composés. Toutefois, elle reste très consommatrice en solvant et dans certains cas s'avère moins efficace pour certains interférents du fait d'une capacité de rétention limitée (i.e. *overloading*, Streck *et al.* 2008).

Les méthodes d'extraction sur phase solide sont également très largement utilisées de par leur simplicité et le coût relativement faible d'utilisation. Leur limite principale est d'être relativement spécifique d'une classe de contaminants (i.e. phase inverse pour les composés polaires et semi-polaire *versus* phase normale pour les composés apolaires).

Enfin, récemment, des techniques automatisées dites *online* ont été développées. Ainsi, Streck *et al.* (2008) ont développé une technique de purification sur des extraits d'organismes basée sur l'emploi d'une membrane LDPE (*low density polyethylene*) placée dans une cellule ASE. Cette dialyse automatisée, permettant une très bonne élimination des lipides, a depuis été utilisée pour la purification d'extraits de sédiments (Bandow *et al.* 2009). Toutefois elle a principalement été utilisée pour l'étude de composés *dioxin-like* (Kaisarevic *et al.*, 2009) et il reste à étudier son efficacité pour des composés plus polaires.

En résumé, les techniques de purification utilisées actuellement restent généralement ciblées sur une catégorie de contaminants associés à une classe de contaminants. Dans le sédiment, les méthodes de purification associées aux composés *dioxin-like* ont été les plus décrites. L'exhaustivité de ces techniques vis à vis d'une plus large gamme de composés et d'activités biologiques reste à être évaluée.

3.1.2 La colonne d'eau

3.1.2.1 Une contamination diffuse et périodique

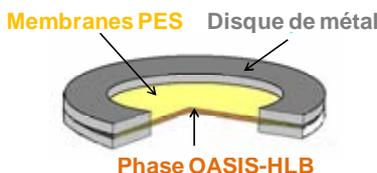
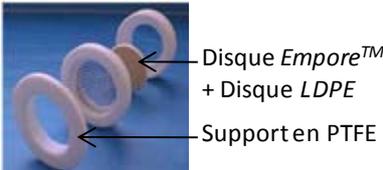
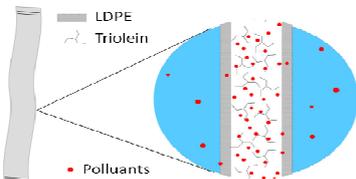
La colonne d'eau est un compartiment contaminé de manière diffuse où les polluants sont généralement présents à l'état de traces avec des concentrations de l'ordre du ng/L. Par ailleurs, ces niveaux de contamination varient très rapidement, selon le débit de la rivière et les épisodes de pollution périodique (e.g. relarguage STEP).

Les prélèvements ponctuels ne sont pas adaptés à la détection de concentrations traces. De plus, ils donnent une image de la contamination à un instant et un endroit donnés. Enfin, ils ne tiennent donc pas compte des pollutions périodiques, de l'exposition moyenne des organismes dans la colonne d'eau et de la biodisponibilité des contaminants. Les échantillonneurs passifs semblent pouvoir répondre à ces contraintes.

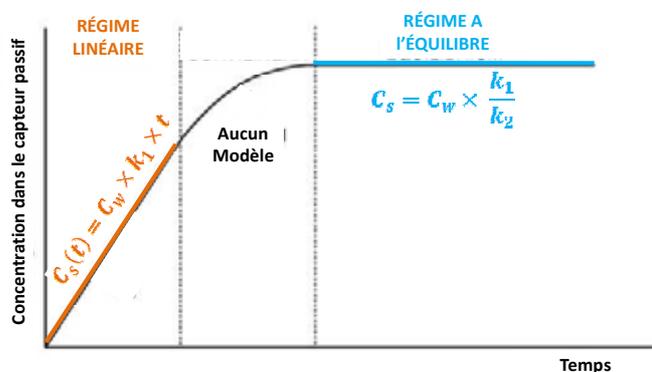
3.1.2.2 L'échantillonnage passif

De nouvelles méthodes ont été développées pour l'échantillonnage d'une diversité de contaminants chimiques (**Tableau 18**) aussi bien dans l'eau que dans l'air. Ces méthodes, dites « passives », sont basées sur la libre circulation des composés depuis le milieu échantillonné vers une phase réceptrice liquide ou solide et sont généralement spécifiques d'une catégorie de contaminants (i.e. fonction de leur polarité).

Tableau 18. Capteurs passifs couramment utilisés pour échantillonner la colonne d'eau (POCIS : Polar organic integrative sampler , SPMD : semi permeable membrane device)

	Conception	Composés ciblés	Avantage	Inconvénients	Références
POCIS	 <p>Membranes PES Disque de métal Phase OASIS-HLB</p>	Composés organiques polaires (log $K_{OW} < 3$)	Haute sensibilité Faible biofouling Rs disponible	Semi-quantitatif ± phase dissoute	Alvarez <i>et al.</i> 2004 Vermeirssen <i>et al.</i> 2005 Togola et Budzinski 2007b Arditsoglou, et Voutsas 2008 Harman <i>et al.</i> 2008
Chem-catcher	 <p>Disque Empore™ + Disque LDPE Support en PTFE</p>	Composés organiques polaires et apolaires	Échantillonnage modulable	Durée période d'échantillonnage intégratif (souvent < 10 jours)	Vrana <i>et al.</i> 2006 Aguilar-Martínez <i>et al.</i> 2008 Vermeirssen <i>et al.</i> 2009
SPMD	 <p>LDPE Triolein Polluants</p>	Composés organiques apolaires (Log $K_{ow} > 3$)	Disponibilité commerciale, Haute sensibilité	Coûteux Biofouling Clean-up	Huckins <i>et al.</i> 2006 Esteve-Turrillas <i>et al.</i> 2007 Rastall <i>et al.</i> 2006

La cinétique d'échange entre le milieu et l'échantillonneur suit généralement 2 régimes (**Figure 18**) : un régime cinétique ou intégratif (linéaire) durant lequel la concentration dans la phase augmente de manière linéaire et un régime à équilibre durant lequel la concentration reste constante du fait d'un équilibre adsorption/désorption.



C_s , concentration dans le capteur
 C_w , concentration dans l'eau
 k_1 et k_2 , constante d'échantillonnage et de relargage
 t , durée de l'exposition

Figure 18. Cinétique d'échantillonnage des échantillonneurs passifs.

L'avantage de l'échantillonnage passif en régime cinétique est qu'il est intégratif. Ainsi il permet de calculer pour un composé donné, à partir de son taux d'échantillonnage (R_s), une concentration moyennée dans l'eau sur l'ensemble de la période d'exposition (i.e. *time weigh average*, TWA). Cette TWA ($C_w(t)$) correspond à l'exposition moyenne à laquelle ont été soumis les organismes.

$$C_w(t) = \frac{C_s \times M_s}{R_s \times t}$$

C_s , concentration en composé dans le capteur passif, M_s , quantité de phase dans l'échantillonneur,
 R_s , taux d'échantillonnage, t , durée d'exposition du capteur

Toutefois ce taux d'échantillonnage peut être affecté par différents facteurs environnementaux comme la température, la salinité, la turbulence ou le *biofouling* (i.e. accumulation d'organismes animaux et/ou végétaux sur la surface des dispositifs) (Togola et Budzinski 2007). De ce fait l'emploi de tels capteurs à des fins quantitatives nécessite des étapes de calibration importantes en laboratoire de manière à déterminer ces taux d'échantillonnage (Alvarez *et al.* 2004, Harman *et al.* 2008). Cependant, les conditions environnementales sont difficilement reproduites en laboratoire. Ainsi, pour certains préleveurs passifs (e.g. SPMD, POCIS), des composés généralement non présents dans l'environnement (i.e. composés deutérés) sont placés pré-échantillonnage dans ces dispositifs, on parle de *performance reference compounds* (PRC, Huckins *et al.* 2002, Mazzella *et al.* 2008). La perte de ces composés par désorption permet de corriger le taux d'échantillonnage et de déterminer des Rs *in situ*.

Un autre intérêt de ces échantillonneurs passifs est leur capacité à tenir compte de la biodisponibilité des polluants. En effet, de par leur conception, ils sont fabriqués de manière à mimer la circulation à travers les membranes biologiques (pores de 1 à 100 nm pour les capteurs) et la bioaccumulation se produisant dans certains tissus animaux. Ainsi l'ensemble des échantillonneurs ont en commun la présence d'une barrière physique limitant le passage de certaines macromolécules mais contrôlant également la vitesse d'échantillonnage des composés en fonction de leur concentration (Vrana 2005).

La porosité de cette barrière diffère d'un dispositif à l'autre. Dans certains cas, elle va permettre la circulation des molécules réellement dissoutes et biodisponibles (e.g. SPMD dont la taille des membranes LDPE est de l'ordre de 10Å). En revanche dans d'autres cas, la porosité permet la circulation de certains colloïdes, c'est le cas des POCIS dont la taille des pores des membranes de polyéther sulfone (PES) est de 0,1 µm. Pour ces derniers dispositifs, on ne peut pas parler de mimétisme réel du phénomène de bioaccumulation par absorption cutanée rencontré chez les organismes aquatiques mais simplement d'échantillonnage de la phase dissoute.

Par ailleurs, de par cette capacité d'accumulation des contaminants, ces échantillonneurs permettent de détecter, et dans certains cas de quantifier, des contaminants présents à l'état de trace non détectés par un prélèvement ponctuels habituels (Togola et Budzinski 2007, Alvarez *et al.* 2004).

L'intérêt croissant pour les capteurs passifs a conduit à leur utilisation pour la détection d'activités biologiques dans les eaux de surface ou les effluents de STEP (Rastall *et al.* 2006, Alvarez *et al.* 2008, David *et al.* 2010). À l'avenir, le couplage de tels dispositifs avec des outils de biodétection adaptés pourraient permettre la détection voire même l'identification de polluants émergents.

3.2 Détection des perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques

3.2.1 Les approches de chimie analytique

Les méthodes de chimie analytique sont utilisées depuis de nombreuses années afin de déterminer la présence et les concentrations en contaminants organiques dans les différents compartiments de l'environnement aquatique (i.e. eau, sédiment, matière en suspension, organisme...). Concernant les PE, ces analyses sont rendues particulièrement difficiles de par la diversité des classes de molécules concernées et leur présence à l'état de trace. Un certain nombre de techniques ont été rapportées pour leur détection (RIA, ELISA, ou analytique telle

que la chromatographie en phase gazeuse ou liquide couplée à différents détecteurs). Parmi ces outils, la spectrométrie de masse est la plus fréquemment employée.

3.2.1.1 Généralités sur la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est basée sur la détermination des masses des composés présents dans l'échantillon étudié. Dans son principe, une petite partie des composés à analyser est fragmentée en ions par différentes méthodes (e.g. bombardement d'électron, d'atomes ou de photons...). Ces ions sont alors soumis, sous vide, à l'action d'un champ électrique et/ou magnétique. Les forces qui s'exercent sur ces ions permettent de les accélérer et de les séparer selon leur rapport masse/charge (m/z). Les résultats sont présentés sous la forme d'un spectre de masse sur lequel on reporte l'abondance des ions formés en les classant par ordre croissant de leur rapport m/z . En opérant dans les mêmes conditions d'analyse, la fragmentation est reproductible et devient caractéristique du composé. La **figure 19** présente les différentes étapes pour l'obtention d'un spectre de masse et les différentes méthodes associées utilisées pour l'analyse des échantillons environnementaux. Les étapes d'ionisation et d'analyse (i.e. séparation) sont ainsi caractérisées par une diversité de méthodes offrant une multitude de combinaisons dont le choix sera déterminé par la nature des composés à analyser.

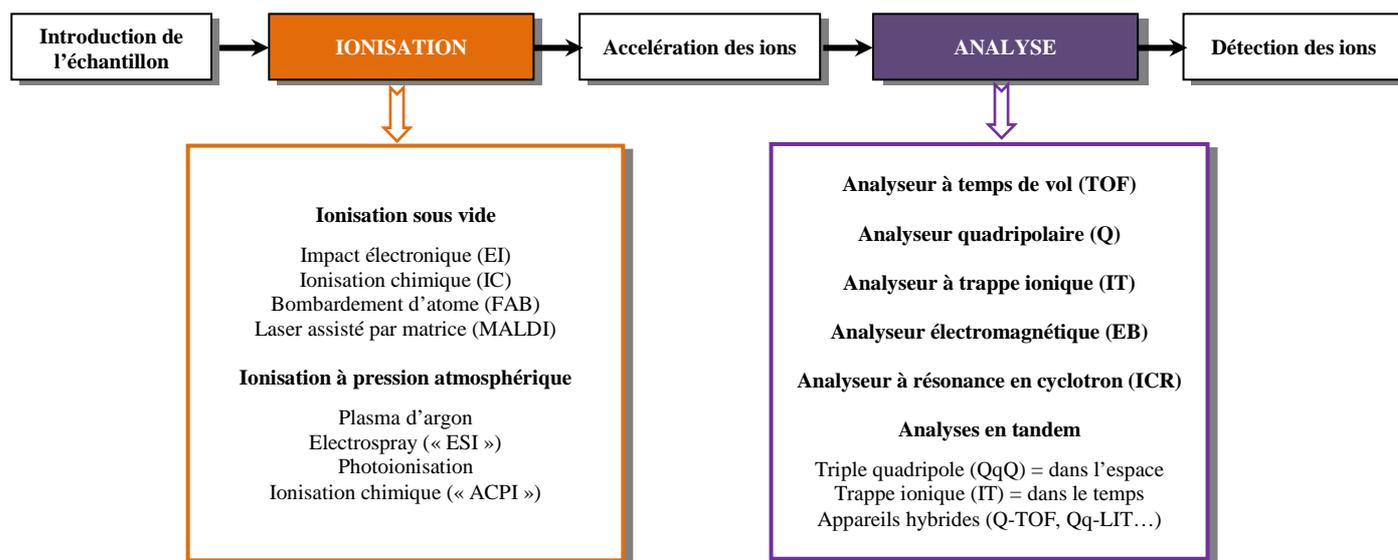


Figure 19. Principe de fonctionnement d'un spectromètre de masse

Quelle que soit la technique d'ionisation utilisée, on distingue trois modes d'acquisition de données au sein des analyseurs : le balayage (*full-scan*), la détection d'ions sélectionnés (*selected ion monitoring*, SIM/SIS) ou la détection de réactions sélectionnées (*selected reaction monitoring*, SRM/MRM).

(1) En mode balayage, on prend des spectres complets entre 2 masses extrêmes de façon répétée. En fonction du temps de balayage par unité de masse, la sensibilité sera plus ou moins importante. Plus le temps sera important, meilleure sera la sensibilité car le nombre d'ions comptés sera d'autant plus grand.

(2) Si on cherche à détecter des substances cibles dont les caractéristiques spectrales sont connues et avec un maximum de sensibilité, le mode SIM sera privilégié. En ciblant les ions à compter, le temps passé sur chaque masse sera fortement augmenté et la sensibilité tout autant.

(3) Le mode SRM (ou MRM) permet encore un gain de sensibilité et de sélectivité par rapport au mode SIM (ou SIS). Il nécessite l'emploi d'un spectromètre de masse en tandem, dans le temps (e.g. trappe ionique) ou dans l'espace (e.g. triple quadripôle).

Ces différents modes de détection sont couramment employés pour la détection des PE basés sur le couplage entre technique de séparation chromatographique et spectrométrie de masse.

3.2.1.2 Couplage CPG/SM(SM), CLHP/SM(SM)

La chromatographie en phase liquide à haute pression (CLHP) ou phase gazeuse (CPG) couplée à un spectromètre de masse simple (SM) ou en tandem (SM/SM) fournissent une sensibilité et une sélectivité suffisante pour l'analyse de mélanges environnementaux. Notons toutefois que d'autres couplages peuvent également être utilisés (e.g. CPG-ECD, CPG FID, CLHP-UV...) mais sont dédiés à certaines familles de composés (e.g. détecteur ECD pour les PCB, OCP) ou possèdent une sensibilité moindre que la SM.

Le choix entre la CPG ou la CLHP, dépend essentiellement de la volatilité et de la stabilité thermique des composés à analyser. Ainsi la CPG est préférentiellement employée pour les composés apolaires volatils et thermiquement stables (e.g. PCB, HAP, PCDD/DFs) alors que la CLHP est utilisée pour les composés polaires. L'utilisation de la CPG nécessite souvent une étape de dérivation afin de permettre l'analyse de composés non volatils et thermiquement labiles (e.g. stéroïdes, pesticides). Ainsi, la CLHP est souvent préférée pour l'analyse des composés polaires.

Le **tableau 19** présente une liste de méthodes analytiques employées pour la détection de différentes classes de PE dans les milieux aquatiques. La CLHP-SM/SM est la plus largement employée actuellement mais d'autres tendances apparaissent également.

3.2.1.3 Tendances actuelles

La dernière décennie a vu l'apparition d'un certain nombre d'innovations technologiques dans le domaine de la chimie analytique environnementale. Ces développements ont aussi bien porté sur la séparation chromatographique que sur l'analyse *sensu-stricto* des contaminants.

Concernant la chromatographie en phase liquide, la tendance actuelle porte sur l'évolution de la CLHP vers la CLUHP (chromatographie liquide ultra-haute-performance, e.g. UPLC[®] développée initialement par Waters). Cette dernière est une technique récente de chromatographie en phase liquide basée sur l'emploi de colonnes plus petites avec une granulométrie de la phase stationnaire réduite (1,7 µm) permettant d'augmenter la pression et de réduire la largeur des pics (i.e. meilleure séparation chromatographique, donc meilleure résolution). Elle permet aussi de réduire les temps d'analyse (i.e. <10 min) et la consommation des solvants.

Des innovations en CPG ont également vu le jour avec notamment l'emploi de la CPG bidimensionnelle (CPG x CPG). Cette technique permet d'augmenter la séparation de mélanges complexes grâce une plus grande capacité de pic. Il autorise ainsi une identification plus facile des composés et la détection de certains composés non identifiés en CPG simple. Le couplage CPG x CPG-TOF est souvent employé de par sa capacité d'acquisition rapide (Houtman *et al.* 2006).

Tableau 19. Méthodes de chimie analytique utilisées pour la détection des PE dans les milieux aquatiques (D : dérivation, AKP : alkylphénols, pharma : composés pharmaceutiques)

	Composés	Méthode	analyseur	LOD/LOQ	Références
Eau de surface	AKP, œstrogènes	RP-HPLC	Fluo	- / 50ng/mL	Snyder <i>et al.</i> 1999
	stéroïdes	GC-MS (D, EI)	Quad (SIM)	1-8 ng/L / -	Labadie et Budzinski 2005
	œstrogènes	GC-HRMS (D, EI)	Quad (SIM)	1 ng/L	Aerni <i>et al.</i> 2004
	AKP	NP-HPLC	DAD	0,1 ng/L	
	stéroïdes	GC-MS (D, EI)	Quad (SIM)	- / 10,0-20 ng/L	Jeannot <i>et al.</i> 2002
	AKP	LC-MS	Quad (SIM)	- / 0,1 µg/L	Jeannot <i>et al.</i> 2002
	pharma, stéroïdes	GC-MS	Quad (SIM)	10-20 ng/L /	Soliman <i>et al.</i> 2004
	œstrogènes, AKP	GC-MS (D, EI)	Quad (SIM)	0,1-1 ng/L /	Zhang <i>et al.</i> 2006
	harma., stéroïdes...	LC-MS-MS (ESI)	QqQ (MRM)	1 ng/L /	Vanderford <i>et al.</i> 2003
	pharma	RPLC-MS-MS (ESI)	QqQ (MRM)	0,05/0,1 ng/L	Zhang et Zhou., 2007
	pharma	RP-HPLC -MS-MS (ESI)	QqQ (MRM)	- / 1 ng/L	Castiglioni <i>et al.</i> 2005
	AKP	GC-MS (EI)		1 ng/L	Fenet <i>et al.</i> 2003
	PCP	GC-MS (D, EI)	Quad (SIM)	10-100 ng/L	Cuderman et Heath 2007
	stéroïdes	UPLC-MS/MS (ESI)	QqQ (MRM)	0,04-10 ng/L	Chang <i>et al.</i> 2010
	stéroïdes AKP	GC-MS (D, ESI)	IT (SIS)	5 ng/L / 15 ng/L 5 ng/g / 20 ng/g	Arditsoglou et Voutsas 2008
	stéroïdes, AKP	LC-MS/MS (ESI / ACPI)	QqQ (MRM)	0,1 ng/L	Lagana <i>et al.</i> 2004
pharma	LC-MS-MS (ESI) UPLC-TOF-MS (NI/PI)	QqQ (MRM) TOF (full scan)	0,1 ng/L / - - / -	López-Roldán <i>et al.</i> 2010	
Effluents	stéroïdes, AKP, BPA	LC-MS/MS (ESI / ACPI)	QqQ (MRM)	1 ng/L	Lagana <i>et al.</i> 2004
	stéroïdes	LC-MS-MS (ESI)	QqQ (MRM)	2 / 10 ng/L	Ingrand <i>et al.</i> 2002
	stéroïdes conjugués	LC-MS/MS (ESI)	QqQ (MRM)	0,1 ng/L / -	Reddy <i>et al.</i> 2005
	pharma	GC-MS (D, EI)	Quad (SIM)	1 ng/L / -	Togola et Budzinski 2007a
	pharma	LC -MS-MS (ESI)	QqQ (MRM)	10-50 ng/L / -	Hilton et Thomas 2003
	pharma	LC-LTQ-Orbitrap (ESI)	LTQ-Orbitrap	0,1-1ng/L / 1 ng/L	Krauss et Hollender 2008
	pharma	UPLC-QTOF/-MS (ESI)	QTOF	- / 10-500 ng/L	Petrovic et Barcelo 2006
Sédiment	HAP	GC-MS (EI)	IT (SIS)	- / 0,02-1,2 ng/g	Louiz <i>et al.</i> , 2008
	stéroïdes, AKP	GC-MS-MS (D, EI)	IT (SRM)	- / -	Houtman <i>et al.</i> 2006
	AKP	GC-MS (EI)	Quad (SIM)	1 ng/g	Fenet <i>et al.</i> 2003
	PCDD/DFs	GC-HRMS		0,01 ng/g / -	Brack <i>et al.</i> 2002
	stéroïdes	GC-MS-MS (D, EI)	IT (SRM)	- / 2 ng/g	Ternes <i>et al.</i> 2002
	PCP	GC-MS (EI)	Quad (SIM)	10 ng/g /	Rodil <i>et al.</i> 2008
	stéroïdes	LC-TOF-MS	TOF	20 pg/g	Labadie <i>et al.</i> 2007
	PCB	CLHP	PDA	0,5 ng/g / -	Buzitis <i>et al.</i> 2006
	stéroïdes, AKP...	GC-MS-MS (D, EI)	IT (SIS, SRM)	0,01 ng/g	Kinani <i>et al.</i> 2008
	pesticides	GC-MS (EI) LC-MS-MS (ESI)	IT (SIS) QqQ (MRM)	1 ng/g 1 pg/g	Smalling et Kuivila 2008
Boue	pharma	LC-MS/MS (ESI)	Qq-LIT (MRM)	0,1 ng/g / 1 ng/g	Jelic <i>et al.</i> 2009
	pharma	LC-MS/MS (ESI)	QqQ (MRM)	- / 1-50 ng/g	Radjenovic <i>et al.</i> 2009
	stéroïdes	LC-MS/MS (ESI)	QqQ (MRM)	10-100/10-250 ng/g	Nieto <i>et al.</i> , 2008
	stéroïdes	GC-MS-MS (D, EI)	IT (SRM)	- / 0,1 ng/g	Jeannot <i>et al.</i> 2002
	AKP	LC-MS (ESI)	Quad (SIM)	- / 1 ng/g	
Biota	stéroïdes, AKP	GC-MS-MS (D, EI)	IT (SRM)	0,5-1,5 ng/100 µL / -	Houtman <i>et al.</i> 2004
	PCB, OCP	GC-ECD		0,01-1 ng/g / -	Khim <i>et al.</i> 2000
	stéroïdes	GC-MSD (S, EI)	Quad (SIM)	0,1 ng/g / -	Budzinski <i>et al.</i> 2006
	PCP	GC-MS/MS (D, EI)	Quad (SIM-MRM)	10 ng/g	Mottaleb <i>et al.</i> 2009

Concernant l'utilisation de la SM pour la détection des PE, on distingue 2 tendances actuellement. La première vise à développer des méthodes mono- ou multi-résidus très sensibles et spécifiques pour la quantification des polluants dans les matrices environnementales. Ces développements ont porté par le passé sur l'emploi de la CLHP-SM (ESI ou ACPI) mais sont aujourd'hui largement dominés par la CLHP-SM munie d'un analyseur QqQ ou IT basé sur un mode de détection en MRM (Radjenovic *et al.* 2009, Nieto *et al.* 2007, Barron *et al.* 2008).

La deuxième concerne l'emploi d'analyseurs permettant l'élucidation de la structure et/ou la masse de la molécule et son identification. Les analyseurs SM en tandem fournissent notamment des informations structurales alors que les analyseurs à haute résolution permettent d'identifier les composés à travers leurs masses exactes (i.e. formule empirique). Les appareils hydrides combinent ces deux approches. Ainsi, les analyseurs de type TOF-MS, Q-TOF-MS ou encore QqLIT-MS (i.e. triple quadripole + trappe à ion linéaire) (Petrovic *et al.* 2006, Jelic *et al.* 2009) ont vu leur utilisation croître au cours des 5 dernières années (voir section 3.3.1.5, tableau 24, p64).

De manière plus générale, les développements analytiques tendent à diminuer les seuils de détection des composés. Il y a quelques années, la détection au µg/L était la règle, aujourd'hui rares sont les méthodes dont les limites de détection sont supérieures au ng/L. Certaines études rapportent mêmes des limites de détection de l'ordre du pg/L (Richardson 2008). Par ailleurs, le **tableau 19** montre un intérêt croissant pour les polluants émergents, notamment les composés pharmaceutiques et les produits cosmétiques, laissant légèrement en retrait les stéroïdes et surfactants largement recherchés ces dernières années. De manière concomitante, les analyses portent davantage sur les eaux de surface que sur le sédiment dont la contamination par les composés persistants est aujourd'hui bien avérée. Néanmoins, de par la présence de composés polaires actifs non identifiés dans le sédiment (Koh *et al.* 2005), ce compartiment continue de faire l'objet d'investigations afin d'identifier ces inconnus (Lübke-von-varel *et al.* 2011).

3.2.1.4 Conclusions

Les méthodes de chimie analytique fournissent des outils sensibles et sélectifs pour la détection d'une diversité de contaminants organiques. Néanmoins, ces analyses nécessitent généralement une purification et une préconcentration des extraits environnementaux. Ainsi, la plupart des méthodes actuelles sont développées pour une unique classe de composés, et des méthodes multirésiduelles seraient nécessaires pour les PE et les polluants émergents (Kinani *et al.* 2008, Togola et Budzinski 2008). Par ailleurs, bien que certains PE soient présents à l'état de trace, il convient de s'interroger sur la pertinence d'abaisser les seuils analytiques au regard de l'activité des composés actifs recherchés. Enfin, ces analyses considèrent chaque molécule individuellement et ne tiennent donc pas compte des effets de mélange.

En conséquence, dans une optique d'évaluation du risque pour les populations exposées, il apparaît évident que le seul niveau de contamination de différentes classes de polluants n'est pas suffisant. Par ailleurs, au vu du nombre de molécules émises dans l'environnement il semble impossible de suivre l'ensemble des composés dans la totalité des compartiments notamment du fait des coûts financiers et de la durée de ces analyses. D'autres méthodes doivent donc être mises en œuvre.

3.2.2 La bio-détection des PE

3.2.2.1 Généralités sur les outils de bio-détection spécifiques

Les méthodes bio-analytiques basées sur le mécanisme d'action sont définies comme des outils biologiques utilisant des principes de détection spécifiques et quantifiables. Dans le cas présent, le terme « analyse » ne fait pas référence à un concept physique comme pour les analyses chimiques, mais à la détection basée sur une interaction biologico-chimique. Différentes méthodes sont décrites dans la littérature (Eggen et Segner 2003): inhibition enzymatique, interaction avec récepteurs, induction de gène. La mesure d'induction de gène, en réponse à l'interaction spécifique de composés avec un récepteur nucléaire, reste à ce jour la méthode la plus employée et fait l'objet de cette thèse.

L'intérêt principal de ces outils demeure leur capacité à mesurer et à quantifier l'activité biologique d'un extrait environnemental en tenant compte de l'ensemble de sa composition chimique tout en fournissant une information sur le mécanisme d'action de ces substances. Ce potentiel, établi à partir de courbes dose réponse, est quantifiable à travers le calcul de l'équivalent toxique biologique (TEQ-bio) (**Figure 20**).

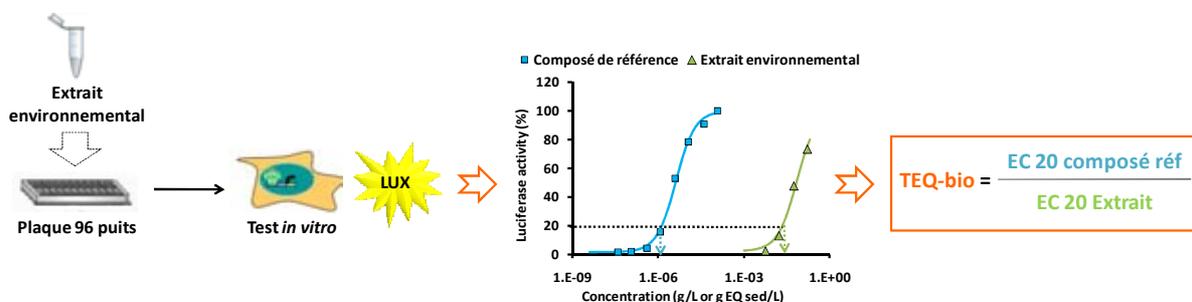


Figure 20. Exemple de calcul d'un TEQ-bio à partir d'un bioessai *in vitro* (EC20 : concentration en composé ou en extrait donnant 20 % de la réponse maximale)

Les bioessais *in vitro* basés sur l'expression de gènes naturels ou rapporteurs sont actuellement les plus utilisés pour la détection de composés actifs dans des extraits environnementaux. Jusqu'à aujourd'hui cette détection a porté très majoritairement sur les activités œstrogénique et *dioxin-like* (**Tableau 20**) bien que d'autres cibles aient également été explorées avec succès (e.g. ligand de GR, PR, PXR). Ce constat traduit le besoin d'orienter la bioanalyse des milieux vers de nouvelles cibles biologiques pour une meilleure intégration de la contamination réelle des systèmes aquatiques.

3.2.2.2 De nouveaux outils pour des polluants émergents

Récemment Runnalls *et al.* 2010 soulignaient le décalage existant entre les quantités de stéroïdes de synthèses prescrites au Royaume-Uni et les orientations scientifiques concernant la caractérisation de la contamination des milieux aquatiques. Ainsi, alors que les quantités prescrites de corticostéroïdes ou de progestatifs (i.e. agonistes) sont respectivement 10 et 4 fois supérieures à celles des androgènes ou des œstrogènes, l'étude des stéroïdes dans les milieux aquatiques a porté principalement sur ces deux dernières catégories. Cela peut s'expliquer par la découverte précoce d'un lien de causalité entre des altérations de la reproduction chez les poissons et la présence de xœstrogènes agissant à très faibles concentrations (Desbrow *et al.* 1998). Toutefois, dans bien des cas, les xœstrogènes n'ont pas pu expliquer les effets observés. À l'heure actuelle peu de données existent concernant l'effet PE *in situ* de ces polluants émergents. Un tel constat traduit la nécessité d'inclure ces voies stéroïdiennes (i.e. PR, MR, GR) afin de mieux caractériser la contamination et mieux

Tableau 20. Quantifications d'activités biologiques dans les matrices environnementales par des bioessais *in vitro*. (Aff : affluent , Eff M , effluent municipal , Eff H : effluent hospitalier , Eff I : effluent industriel , E.S : eau de surface , OHTam : Hydroxy-tamoxifen , ORG : Org2058 , Pg : progesterone , Th :Thyroxine , Dex :dexamethasone)

	Compartiment	Bioessais	TEQ-bio		Références
ER	eau (Aff / Eff M / E.S)	MELN	100 / 10 / 1	ngE ₂ EQ/L	Cargouet <i>et al.</i> 2004
	eau (Eff M)	YES	5,0-20,0	ngE ₂ EQ/L	Thomas <i>et al.</i> 2001
	eau (Eff M)	YES	53	ngE ₂ EQ/L	Aerni <i>et al.</i> 2004
	eau (Eff M)	YES	10	ngE ₂ EQ/L	Hill <i>et al.</i> 2010
	eau (Eff I / Eff H / Eff M / E.S)	ER-CALUX	3,4 / 24/ 1 / 0,5	ngE ₂ EQ/L	Van der Linden <i>et al.</i> 2008
	sédiment (lac)	MVLN	50-500	pgE ₂ EQ/g	Koh <i>et al.</i> 2005
	sédiment (rivière)	MVLN	100000	pgE ₂ EQ/g	Song <i>et al.</i> 2006
	sédiment (rivière)	YES	1000-10000	pgE ₂ EQ/g	Wang <i>et al.</i> 2011
	sédiment (rivière)	ER-LUC	50-500	pgE ₂ EQ/g	Schmitt <i>et al.</i> 2010a
	sédiment (rivière)	ER-CALUX	20-100	pgE ₂ EQ/g	Lubke von Varel <i>et al.</i> 2011
	sédiment (marin)	MELN	500	pgE ₂ EQ/g	Louiz <i>et al.</i> 2008
	sédiment (portuaire)	ER-CALUX	500	pgE ₂ EQ/g	Houtman <i>et al.</i> 2006
	organisme (bile)	ER-CALUX	22	ngE ₂ EQ/mL	Houtman <i>et al.</i> 2004
	organisme (bile)	YES	30-1000	ngE ₂ EQ/mL	Gibson <i>et al.</i> 2005
organisme (bile)	YES	200-1000	ngE ₂ EQ/mL	Hill <i>et al.</i> 2010	
Anti-ER	organisme (bile)	YES	100	µgOHTam/mL	Hill <i>et al.</i> , 2010
AR	eau (Eff. I / Eff H / Eff M / E.S)	AR-CALUX	100 / 100 / 1 /12	ngDHT-EQ/L	Van der Linden <i>et al.</i> 2008
	sédiment (rivière)	AR-CALUX	30	ngDHT-EQ/g	Weiss <i>et al.</i> 2009b
	organisme	YAS	1500	ngDHT-EQ/mL	Hill <i>et al.</i> 2010
Anti-AR	eau (eff M)	YAS	0,1-1,0	ngFluEQ/L	Hill <i>et al.</i> 2010
	sédiment (rivière)	AR-CALUX	36	µg FluEQ/g	Weiss <i>et al.</i> 2009b
	sédiment (rivière)	MDAkb2	1,08-32,49	µg FluEQ/g	Kinani <i>et al.</i> 2008
	sédiment (rivière)	AR-CALUX	1,3	µgFluEQ/g	Schmitt <i>et al.</i> 2010b
	sédiment (rivière)	YAS	50-150	µgFluEQ/g	Urbatzka <i>et al.</i> 2007
PR	eau (Eff I / Eff H / Eff M / E.S)	PR-CALUX	2/ n.d / 1 / 5	ngOrgEQ/L	Van der Linden <i>et al.</i> 2008
	eau (Eff M)	HEK-hPR-luc	5-10	ngPgEQ/L	Viswanath <i>et al.</i> 2008
GR	eau (Eff I / Eff H / Eff M / E.S)	GR-CALUX	250 / 100 / 50 / 1	ngDexEQ/L	Van der Linden <i>et al.</i> 2008
TR	eau (Aff / Eff M)	PC-DR-LUC	25	ng ThEQ/EQ	Jugan <i>et al.</i> 2009
AhR	sédiment (lac)	H4IIE-luc	50-500	pgTCDD-EQ/g	Koh <i>et al.</i> 2005
	sédiment (rivière)	H4IIE-luc	1000-13000	pgTCDD-EQ/g	Song <i>et al.</i> 2006
	sédiment (rivière)	H4IIE	3000-40000 5000-50000	ngBaP-EQ/g pgTCDD-EQ/g	Vondracek <i>et al.</i> 2001
	sédiment (rivière)	H4IIE/RTL-W1	1000-10000	pgTCDD-EQ /g	Keiter <i>et al.</i> 2008
	sédiment (rivière)	H4IIE-luc	1000-5000000	pgTCDD-EQ /g	Brack <i>et al.</i> 2008
	sédiment (rivière)	DR-CALUX	10000	pgTCDD-EQ /g	Lubke von Varel <i>et al.</i> 2011
	sédiment (marin)	PLHC-1	10000 100-6000	pgTCDD-EQ /g ngBAP-EQ /g	Louiz <i>et al.</i> 2008
	sédiment (marin)	DR-CALUX	12,0-7000	pgTCDD-EQ /g	Sanctorum <i>et al.</i> 2007
	sédiment (marin)	DR-CALUX	2-100	pgTCDD-EQ /g	Hurst <i>et al.</i> 2004
	sédiment (portuaire)	DR-CALUX	5000	pgTCDD-EQ /g	Houtman <i>et al.</i> 2006

appréhender le risque pour les populations exposées. De plus, lorsque de telles activités ont été recherchées, elles ont très souvent été détectées et généralement en forte quantité (Van den Linden *et al.* 2008, Streck 2009).

Par ailleurs, les PE n'agissent pas que sur des cibles stéroïdiennes, des modifications du métabolisme endogène et/ou de la détoxification sont également en jeu (*voir section 2.2.2.2, p30*). De telles altérations sont fréquemment évaluées par l'étude de la voie de signalisation du AhR. Or, d'autres récepteurs interviennent dans ces processus (i.e. PXR, CAR, *voir section 2.2.1.3, p19*). Il apparaît donc important d'étudier ces autres voies. Le PXR est notamment connu pour la très grande diversité de ses ligands et, de par sa fonction, il est probablement activé par un grand nombre de substances environnementales dont on ignore encore l'identité.

3.2.2.3 Approche multi-cibles

De manière à intégrer la plus grande diversité de composés possible, l'étude simultanée de plusieurs cibles biologiques est nécessaire. Ce type d'approche est de plus en plus fréquemment employée pour l'évaluation de la contamination du milieu aquatique (Schmitt *et al.* 2010b, Smital *et al.* 2010). Cependant, ces études emploient généralement des outils peu spécifiques (e.g. croissance algale, reproduction de nématodes).

Au-delà d'une meilleure intégration de la contamination, l'utilisation d'une approche multi-spécifique (e.g. plusieurs systèmes rapporteurs) permet également de tenir compte des interactions potentielles entre ces voies de signalisation (i.e. *crossstalk*) et ainsi de mieux appréhender les mécanismes d'actions sous jacents aux réponses mesurées et plus largement aux effets observés sur les organismes. Par ailleurs, certains composés, notamment des stéroïdes de synthèse, sont connus pour agir sur différentes cibles biologiques. Ainsi, en première approche, un profil croisé sur plusieurs récepteurs permet d'émettre des hypothèses quant à l'identité des composés responsables des activités mesurées.

3.2.2.4 Des outils adaptés au milieu aquatique

Les tests *in vitro* employés actuellement sont majoritairement basés sur des modèles mammifères. Compte tenu des différences pouvant exister dans certaines voies de signalisation entre les systèmes mammifère et poisson (*voir section 2.2.1, p12*), de tels outils ne permettent pas d'établir avec certitude le lien entre les réponses observées chez les organismes aquatiques et les composés détectés. Dès lors, dans un contexte d'évaluation du risque, l'emploi de modèles cellulaires de poissons basés sur des systèmes rapporteurs spécifiques semble nécessaire (Molina-Molina *et al.* 2008, Cosnefroy *et al.* 2009, Cosnefroy 2010, Cosnefroy *et al.* soumis).

Par ailleurs, globalement, les outils *in vitro* ne peuvent rendre compte de la réponse d'un organisme entier (*voir section 2.3.2, p36*). *In situ*, ces outils permettent de mettre en évidence la présence d'une certaine catégorie de molécules susceptibles d'activer certaines voies de signalisation. Toutefois, pour mettre en évidence un lien de causalité réel, des outils *in vivo* sont nécessaires. L'utilisation d'outils *in vivo* spécifique (e.g. poisson zèbre AroB-eGFP) suite à une détection *in vitro* permettrait de confirmer le mécanisme d'action et l'effet associé à la présence de contaminants.

3.2.2.5 Conclusions

Les outils *in vitro* apparaissent quasi-incontournables pour la détection spécifique de composés actifs dans l'environnement. Néanmoins, les cibles les plus couramment étudiées

(i.e. ER, AhR) restent insuffisantes pour rendre compte de la diversité de PE. Notamment, nombre de polluants émergents (e.g. antibiotiques, stéroïdes de synthèse, pesticides) ne sont pas détectés par ces tests. Il existe donc un besoin de se tourner vers d'autres voies de signalisation pour pouvoir détecter et identifier les polluants émergents (i.e. composé parents et métabolites) et ainsi évaluer les risques encourus par les organismes exposés à ces composés. A ce titre, l'emploi d'approches multi-cibles spécifiques devrait permettre d'intégrer une grande diversité de composés actifs. Par ailleurs, dans un contexte d'évaluation du risque, il conviendra de s'intéresser à des outils basés sur des récepteurs de poissons (*in vitro* ou *in vivo*)

Enfin, à elles seules, les méthodes biologiques, tout comme les analyses chimiques, ne permettent pas d'identifier les substances à l'origine des activités biologiques mesurées. Dans un cas on mesure une activité globale sans connaître les composés à l'origine de cette réponse. Dans l'autre, on quantifie des composés dont on ne connaît pas, pour la plupart d'entre eux, leur activité biologique. L'approche idéale consisterait à diriger les analyses chimiques vers les composés actifs. Ainsi des approches combinant des analyses biologiques et chimiques ont vu le jour de manière à identifier les contaminants responsables des activités mesurées. Deux sont classiquement décrites dans la littérature et sont présentées ci-après.

3.3 L'analyse de l'équilibre des masses ou *Mass Balance Analysis* (MBA)

Cette approche, également appelée *potency balance analysis* (Khim *et al.* 2001), est communément utilisée pour évaluer si la composition chimique d'un extrait environnemental, déterminée par des analyses chimiques ciblées, peut expliquer, au moins en partie, la réponse biologique mesurée. D'autres approches similaires ont également été décrites (e.g. approche *toxic unit* (TU), Altenburger *et al.* 2004). Dans son principe, cette approche comporte deux volets (**Figure 21**).

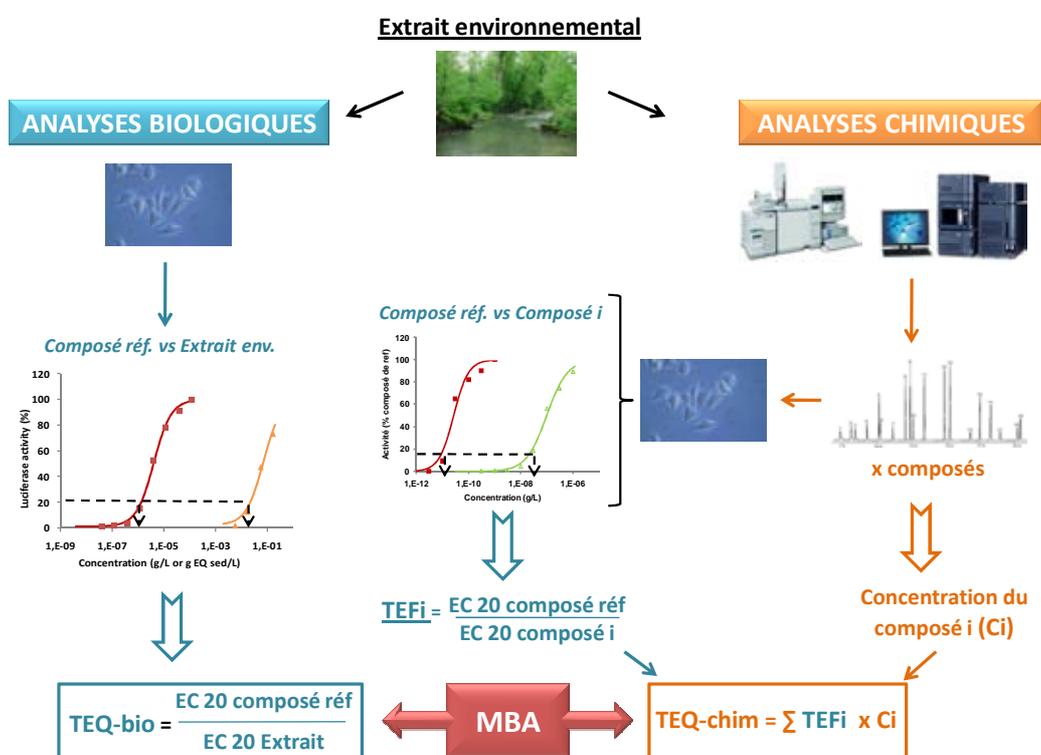


Figure 21. Le principe de la *mass balance analysis* (MBA)
(réf. = référence)

Pour un extrait environnemental donné, l'activité biologique globale de cet extrait est mesurée avec l'établissement d'une courbe dose réponse qui est ensuite comparée à la courbe dose réponse du composé de référence. Cette comparaison permet la détermination du **TEQ-bio**, comme décrit précédemment (voir section 3.2.2, Fig.20, p52), selon l'équation :

$$TEQ - Bio = \frac{ECy \text{ composé de référence}}{ECy \text{ de l'extrait environnemental}}$$

Avec ECy = Concentration donnant y % de la réponse maximale pour l'activité considérée

En parallèle des analyses chimiques ciblées sont réalisées sur ce même extrait. Ces analyses peuvent ou non être dirigées, selon les activités biologiques détectées, vers des composés connus pour être actifs (e.g. Recherche BPA, 4tOP, E2, EE2 pour l'activité œstrogénique ; recherche de HAP, PCB pour l'activité *dioxin-like*). A l'issue de ces analyses, si elle n'est pas déjà connue, l'activité biologique de chacun des composés détectés est évaluée par les bioessais. Pour chacun de ces composés, un facteur de toxicité équivalent (TEF) est calculé selon l'équation :

$$TEF_i = \frac{ECy \text{ composé de référence}}{ECy \text{ composé } i}$$

Ce TEF correspond au potentiel de chacun des composés à produire une réponse équivalente à celle du composé de référence.

Enfin, pour une activité donnée (e.g. œstrogénique, androgénique, *dioxin-like*), sur la base de la composition du mélange environnemental et de la concentration des constituants de ce mélange, une activité théorique globale (TEQ-chim) est calculée selon l'équation :

$$TEQ - Chim = \sum_{i=1}^n \frac{ECy \text{ composé de référence}}{ECy \text{ composé } i} \times Ci$$

Avec ECy = Concentration donnant y % de la réponse maximale pour l'activité considérée, Ci = Concentration du composé dans l'extrait environnemental.

Ainsi, le ratio entre TEQ-Bio et TEQ-chim fournit une première évaluation de la contribution des composés ciblés à la réponse biologique mesurée. Une telle approche fournit un outil utile pour émettre des hypothèses concernant l'identité des composés responsables de cette activité biologique.

Cette approche a largement été utilisée pour l'évaluation de la contamination par des composés œstrogéniques ou *dioxin-like* dans des extraits environnementaux alors que le suivi d'autres activités reste beaucoup moins décrit. L'efficacité de cette approche varie d'une étude à l'autre, selon les sites et selon les familles de contaminants recherchées. Dans certains cas, les analyses chimiques ciblées ont permis d'expliquer une grande partie de l'activité biologique mesurée par les bioessais *in vitro* (\geq à 70%). Toutefois dans la majorité des cas, les composés recherchés n'expliquent seulement qu'une petite partie de l'activité (**Tableau 21**).

Tableau 21. Etudes basées sur l'approche MBA

	Cibles	Composés incriminés (contribution)	Références
Eau	ER	Stéroïdes + AKP (50-70 %)	Aerni <i>et al.</i> , 2004
	GR	Corticostéroïdes (70%)	Schriks <i>et al.</i> 2010
Sédiment	ER AhR	AKP, BPA (20%) + composés inconnus acido-labiles PCDD/DFs and composés polaires inconnus	Khim <i>et al.</i> 1999
	ER AhR	AKP, BPA + composés inconnus HAP (<10%) + composés inconnus	Khim <i>et al.</i> 2001
	ER AhR	Stéroïdes HAP	Vondracek <i>et al.</i> 2001
	AhR	HAP prioritaires et non prioritaire (produit de dégradation du 2-naphtol)	Brack et Schirmer 2003
	ER AhR	composés inconnus HAP et composés inconnus polaires	Koh <i>et al.</i> , 2005
	AhR	PAH + composés polaires inconnus	Song <i>et al.</i> 2006
	ER	Stéroïdes (76%) + composés inconnus apolaires	Houtman <i>et al.</i> , 2006
	AhR	HAP (10-40%) + PCB/PCDD (<8%) + inconnus	Keiter <i>et al.</i> 2008
	AhR ER + AR	HAP prioritaires (1%) + composés inconnus ?	Louiz <i>et al.</i> 2008
	AhR	PCB, PCDD/DF, PAH (82%)	Shen <i>et al.</i> 2008
	Biota	AhR	PCB/PCDD (5%)
ER		Composés organochlorés	Garcia Reyero <i>et al.</i> 2007

Cela peut s'expliquer en partie par le fait que cette approche est basée sur un mode d'action additif des composés (i.e. activité individuelle de chaque composé s'ajoute les unes aux autres). Ce modèle semble être adapté à certaines activités pour certaines familles de composés comme les ligands de ER (Kunz et Fent 2009). Mais des phénomènes de synergisme ou d'antagonisme ont également été décrits dans la littérature (Arnold et McLachlan 1996). En conséquence l'activité potentielle établie par la composition chimique peut être sous- ou sur-estimée par rapport à l'activité biologique réelle (Kaisarevic *et al.* 2009). Toutefois la principale raison de ces différences reste le fait que d'autres composés que ceux ciblés par les analyses chimiques choisis car prioritaires et/ou connus pour être actifs sont responsables des activités mesurées. L'approche MBA reste donc limitée pour identifier les composés actifs détectés par les bioessais.

3.4 L'analyse dirigé par l'effet ou *effect directed analysis* (EDA)

3.4.1 Généralités sur l'approche EDA

Cette approche, décrite par Brack en 2003, dérive de la méthodologie TIE (*Toxicity Identification Evaluation*) mise en place par l'agence de protection de l'environnement Américaine (US-EPA) au début des années 90 visant à identifier des substances actives dans les effluents municipaux (Ho *et al.* 2007).

Cette approche emploie une combinaison d'outils biologiques de détection (e.g. bioessais *in vitro*) et d'outils physico-chimiques (i.e. extraction, fractionnement, analyses

chimiques) dans le but de réduire la complexité du mélange environnemental et de diriger les analyses chimiques vers des composés effectivement actifs afin de permettre leur identification (Leonard et Lamoree 2008).

De manière conceptuelle, cette approche est composée de trois phases (**Figure 22**). Une phase de caractérisation de l'échantillon (i.e. mesure de l'activité biologique dans l'extrait brut et au sein de fractions), une phase d'identification des composés actifs et une phase de confirmation de l'activité biologique des composés identifiés (Bakker *et al.* 2007). Dans la pratique, les mélanges complexes (e.g. extraits environnementaux) sont d'abord testés pour leurs effets biologiques (i.e. activité PE ou autres) et sont ensuite soumis à un ou plusieurs fractionnements physicochimiques de manière à réduire la complexité du mélange initial afin d'isoler des fractions actives. Les fractions isolées actives sont alors soumises à une identification chimique, généralement par spectrométrie de masse. *In fine*, les composés identifiés sont testés sur les bioessais de manière à confirmer leur(s) activité(s) biologique(s).

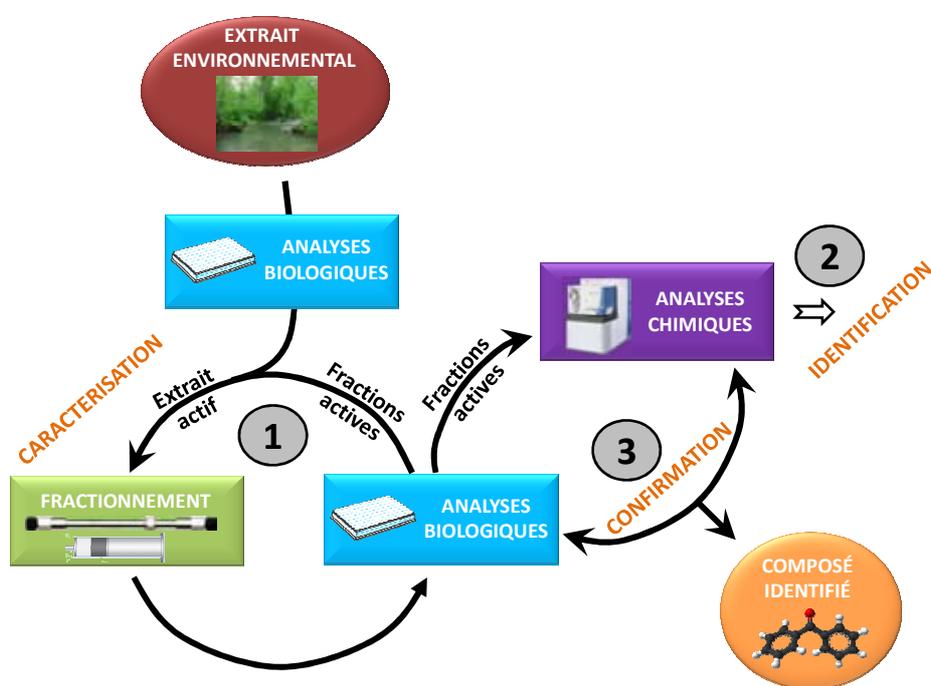


Figure 22. Principe de l'approche EDA (inspiré de Brack 2003)
(1) Caractérisation, (2) Identification, (3) Confirmation.

Cette approche a été utilisée avec succès pour l'identification d'une diversité de composés effecteurs (**Tableau 22**). L'étude de la génotoxicité, de la mutagénécité, du caractère de perturbateurs endocriniens, de l'inhibition de la croissance algale sont parmi les bioessais les plus couramment employés. Pour la majorité des études répertoriées dans ce tableau les effets des composés identifiés ont pu être confirmés.

Tableau 22. Etudes basés sur l'approche EDA.

En italique, composés détectés dans les fractions actives mais dont l'activité biologique ou la contribution n'ont pas été déterminées. ^aComposés inconnus signifie que les composés identifiés n'expliquent que partiellement les activités mesurées ; ^b(C) croissance, (R) reproduction et (M) mortalité

	Bioessais	Composés identifiés et confirmés	Références
Eau	ER	17 β -E2, E1, E3	Thomas <i>et al.</i> 2001
	AR		Thomas <i>et al.</i> 2002
	ER	17 β -E2, EE2	Snyder <i>et al.</i> 2001
	ER AhR	stéroïdes, alkylphénols, benzophénone, parabènes, HAP, pesticides, dibenzofurane	Grung <i>et al.</i> 2007
	ER	BPA, bis(2-éthylhexyl)phthalate, dibutyl-phthalate	Fernandez <i>et al.</i> 2007
	ER	E1, E2, EE2, nonylphénol, 17 β -dihydroéquilenin	Gibson <i>et al.</i> 2005
	ER AhR	<i>stéroïdes, alkylphénols, phtalates, benzophénones</i> composés polaires inconnus^a	Smital <i>et al.</i> 2010
	(Anti)-AR	di(chlorométhyl-1)anthracène, di(chlorométhyl)phénanthrène et composés inconnus^a	Hill <i>et al.</i> 2010
	AhR	<i>benzophénones, phtalates, sitostérole</i>	Rastall <i>et al.</i> 2006
	ER	EE2	Desbrow <i>et al.</i> 1998
Croissance algale	2-[(2-chlorophényl)amino] benzaldéhyde (CPAB) (métabolite diclofenac)	Schulze <i>et al.</i> 2010	
Sédiment	Croissance algale	HAP prioritaires, prométhryn, N-phényl-2-naphthalamine, tributylétain	Brack <i>et al.</i> 1999
	AhR	PCDD/DF et HAP	Brack <i>et al.</i> 2002
	AhR	HAP prioritaires, dinaphtofurans, 9-méthylben[a]anthracène, 2-(2naphthalényl-benzothiophène), 1-méthylchrysène	Brack et Schirmer 2003
	AhR	composés inconnus^a	Brack <i>et al.</i> 2005
	Genotoxicité	HAP prioritaires (pérylene, benzo[a]fluoranthène)	Brack <i>et al.</i> 2005
	ER	E1, E2 + composés apolaires inconnus^a	Houtman <i>et al.</i> , 2006
	(Anti)-AR	<i>HAP prioritaires, dibutyl-phthalate,</i>	Weiss <i>et al.</i> 2009b
	AhR	HAP méthylés <i>et</i> alkylés	Kaisarevic <i>et al.</i> , 2009
	ER / AR Invertébrés (C/R/M) ^b	BPA, AKP / composés inconnus^a	Schmitt <i>et al.</i> 2010b
	TR AhR ER	DDT et dérivés + composés inconnus^a HAP, PCB, PCN, PCDD/DF stéroïdes, AKP, BPA	Lubke von varel <i>et al.</i> 2011
ER	nonylphénol	Hollert <i>et al.</i> 2005	
AhR	polychloro-naphtalènes	Brack <i>et al.</i> 2008	
Biota	ER	E1, E2, EE2, NP, 17 β -dihydroéquilénine	Gibson <i>et al.</i> 2005
	AR	di(chlorométhyl-1)anthracène di(chlorométhyl)phénanthrène et composés inconnus^a	Hill <i>et al.</i> 2010
	ER	E1, E2, EE2 + Chloroxylénol + composés inconnus^a	Houtman <i>et al.</i> 2004

L'EDA constitue aujourd'hui la seule démarche permettant d'identifier des molécules actives au sein de matrices environnementales. Aussi son utilisation et les développements méthodologiques associés n'ont cessé de croître durant la dernière décennie. Néanmoins, cette approche reste optimisable tant au niveau de la préparation des échantillons (extraction, purification), du fractionnement que des analyses biologiques et chimiques.

3.4.2 De nouvelles cibles biologiques

Dans les milieux aquatiques, les approches EDA ont principalement été focalisées sur l'identification des PE bien que d'autres effets biologiques aient également été considérés (Figure 23).

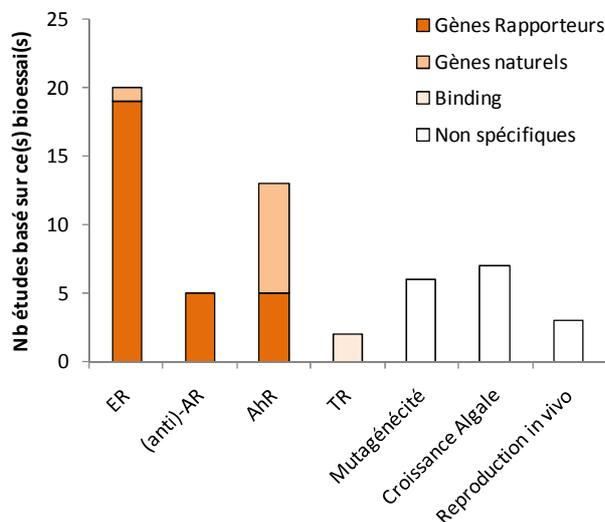


Figure 23. Recensement d'études publiées sur les effets biologiques utilisés dans des études EDA (Source : Web of Sciences; 2003-2011)

Une diversité d'outils biologiques a été utilisée. Pour l'essentiel, il s'agit de tests *in vitro* basés sur des gènes naturels ou rapporteurs permettant la détection spécifique de composés interagissant avec les récepteurs nucléaires (voir section 2.3.2.4, tableau 16, p39). Des tests *in vitro* et *in vivo* moins spécifiques ont également été employés.

A l'image de l'étude globale des PE, *in situ* et en laboratoire, cette identification a principalement porté sur les composés œstrogéniques et *dioxin-like*. Précédemment, nous avons vu que, à elle seule, l'étude de ces voies de signalisation ne permettait pas de rendre compte de la diversité des contaminants environnementaux (voir section 3.2.2.2, p52). Actuellement, nombre de polluants émergents (e.g. composés pharmaceutiques, pesticides, produits cosmétiques) sont émis dans l'environnement sans que l'on connaisse nécessairement leurs effets biologiques. En parallèle, certaines études rapportent la présence de composés capables d'activer certains récepteurs nucléaires mais l'identité de ces substances reste inconnue (Brack *et al.* 2005, Schmitt *et al.* 2010b, Smital *et al.* 2010). La prise en considération de ces contaminants est indispensable pour une évaluation réaliste du risque pour les organismes exposés. Notamment, l'intégration dans une démarche de type EDA d'outils *in vitro* spécifiques basés sur des cibles biologiques différentes du ER ou du AhR (e.g. AR, GR, PR, MR, PXR), permettrait la prise en compte et l'identification de ces composés émergents.

3.4.3 Des méthodes physico-chimiques adaptées

La prise en compte de nouvelles cibles biologiques et l'emploi d'approches multi-cibles impliquent de disposer de méthodes physico-chimiques permettant de tenir compte de cette plus grande diversité de composés actifs. Les enjeux des méthodes d'extraction et de purification ont été discutés dans la section 3.1.1.2 (Tableau 17, p42). Concernant l'extraction, plus particulièrement dans le cadre d'une approche EDA, il est important de souligner que généralement les bioessais sont appliqués sur des échantillons dont on ne

connait pas la composition et dans lesquels des composés inconnus participent à la réponse biologique. En conséquence, les bioessais devraient être intégrés à la calibration des méthodes d'extraction comme le préconise Houtman *et al.* (2007). Concernant le fractionnement, une diversité de procédures est décrite dans la littérature (**Tableau 23**).

Tableau 23. Procédures de fractionnement utilisées dans des études EDA
(^a,Lubcke-von Varel *et al.* 2008)

	Cibles	Fractionnement	Références
Eau	ER	SPE-C18 (9 F) => RP-HPLC (30 F)	Desbrow <i>et al.</i> 1998
	ER	NP-CLHP (3 F) => RP-CLHP (9 F)	Snyder <i>et al.</i> 2001
	ER, AR	RP-CLHP (30 F)	Thomas <i>et al.</i> 2001
	ER	RP-CLHP (60 F)	Gibson <i>et al.</i> 2005
	ER	RP-CLHP (60 F)	Rastall <i>et al.</i> 2006
	AhR, ER	RP-CLHP (30 F)	Grung <i>et al.</i> 2007
	ER	SPE-OasisHLB (5 F) => NP-CLHP (20 F)	Fernandez <i>et al.</i> 2007
Sédiment	AhR	Col-Alu (5 F) => NP-CLHP (6 F)	Brack <i>et al.</i> 1999
	Genotox	SPE-silice (4 F) => NP-CLHP (30 F) <i>versus</i> RP-CLHP (30 F)	Thomas <i>et al.</i> , 2002
	AhR	Col-Alu (5 F) => NP-CLHP (4 F) => CLHP (11 F) => SEC	Brack <i>et al.</i> 2002
	ER AhR	GPC (60 F)	Houtman <i>et al.</i> 2002
	AhR	Col-Alu (5 F) => NP-CLHP (7 F) => RP-CLHP (10 F) => RP-HPLC (4 F)	Brack et Schirmer 2003
	AhR	Col-Alu (4 F) => NP-CLHP (8 F) => RP-CLHP	Brack <i>et al.</i> 2005
	ER, AhR	RP-CLHP (5 F) => NP-HPLC (8 F)	Houtman <i>et al.</i> , 2006
	Croiss. Alg.	NP-CLHP automatisée ^a : CN-NO-PGC => 18 F	Schwab <i>et al.</i> 2009
	Croiss. Alg	NP-CLHP automatisée ^a : CN-NO-PGC => 18 F	Bandow <i>et al.</i> 2009
	(anti)-AR	RP-CHLP (5 F) => NP-CHLP (8 F)	Weiss <i>et al.</i> 2009b
	ER, AR + vivo	NP-CLHP automatisée ^a : CN-NO-PGC => 18 F	Schmitt <i>et al.</i> , 2010b
	AhR, TR, ER, muta.	NP-CLHP automatisée ^a : CN-NO-PGC => 18 F	Lubke von Varel <i>et al.</i> 2011
Biota	ER	RP-HPLC (10 F)	Houtman <i>et al.</i> 2004
	ER	RP-CLHP (60 F)	Gibson <i>et al.</i> , 2005
	ER	RP-CLHP (60 F)	Hill <i>et al.</i> 2010

Ces fractionnements sont réalisés par extraction sur phase solide, sur colonne chromatographique ouverte ou encore en CLHP sur la base de la polarité des molécules. On distingue généralement le fractionnement en phase normale (NP, e.g. alumine, silice, cyano-propyl...) et le fractionnement en phase inverse (RP, e.g. C18). Mais des fractionnements selon la taille des molécules sont également rapportés (i.e. GPC, Houtman *et al.* 2002 et Brack *et al.* 2002). Le choix du mode de fractionnement est généralement fonction de la nature de la matrice puisqu'à priori on ne connaît pas la nature des composés actifs. Ainsi la phase inverse est préférentiellement utilisée pour les extraits d'eau, alors que la phase normale est plus fréquemment employée pour les extraits de sédiment.

Fréquemment, les études EDA font appel à une succession de phases de fractionnement, entrecoupées de bioessais, de manière à isoler finement les composés actifs (Brack *et al.* 2008a, Houtman *et al.* 2007). Récemment, Lubke-von-varel *et al.* (2008) ont développé un fractionnement automatisé en phase normale pour l'étude des composés *dioxin-like*. Ce système a depuis été utilisé pour l'étude d'autres activités (e.g. mutagénicité, reproduction d'invertébrés, activité œstrogénique).

Néanmoins, de manière générale, bien qu'a priori on ne connaisse pas la nature des composés, ces études partent du postulat que les ligands du AhR sont des composés apolaires (i.e. utilisation de la phase normale prépondérante) et que les ligands du AR et du ER sont plutôt polaires (i.e utilisation de la phase inverse). Ainsi ces procédures de fractionnement sont généralement calibrées et validées pour une certaine catégorie de composés. Hors, certaines études rapportent l'existence de ligands polaires du AhR, ou encore de ligands apolaires du récepteur des œstrogènes (Koh *et al.* 2005, Houtman *et al.* 2006). Il reste donc à optimiser et valider de telle procédure pour une plus grande diversité de composés.

Par ailleurs, malgré l'emploi de plusieurs phases de fractionnement, il est fréquent de retrouver dans les fractions finales plusieurs activités biologiques (Lubke-von-Varel *et al.* 2011, Schmitt *et al.* 2010b). Dès lors il n'est pas toujours possible, en première approche, d'identifier les composés responsables d'une activité donnée. Ainsi, l'un des points limitants aujourd'hui reste la confirmation de l'activité biologique des composés isolés au sein des fractions actives. De nouvelles stratégies doivent donc être développées.

L'utilisation de colonnes greffées avec des récepteurs nucléaires est une approche très récente pour l'isolement de ligands (i.e. agonistes et antagonistes) au sein de matrices environnementales complexes. Contrairement aux méthodes de fractionnement traditionnelles basées sur les propriétés physico-chimiques des contaminants (polarité essentiellement), elles permettent de séparer les composés en fonction de leur affinité pour le récepteur (Fechner *et al.* 2010). A notre connaissance seulement quelques études rapportent l'emploi de telles colonnes pour l'isolement de ligands environnementaux. La majorité de ces travaux sont basées sur le récepteur humain des œstrogènes (Ferguson et Shaw 2009, Pillon *et al.* 2005). Ces dispositifs ont notamment permis de séparer efficacement des ligands AhR et des ligands du ER sur des extraits de sédiment (Pillon *et al.* 2005). De la même manière, Riu *et al.* 2008 ont isolé avec succès des ligands du récepteur ER dans du lait maternel. Récemment, des colonnes basées sur d'autres récepteurs, comme le PXR, ont vu le jour (Dagnino 2009). L'étape cruciale concernant la mise en place de ces outils est la production du récepteur, limitée essentiellement par sa solubilité.

Bien que ces outils semblent très prometteurs pour l'isolement de composés actifs, il reste néanmoins à évaluer la faisabilité de l'intégration de tels outils dans une démarche EDA.

En résumé, un des défis actuels est de développer et d'évaluer des stratégies de fractionnement à large spectre permettant d'isoler progressivement, rapidement et efficacement, au sein d'un même extrait environnemental, des ligands présentant des propriétés physico-chimiques (e.g. polarité) et des activités biologiques différentes. A terme, l'automatisation de telles procédures pourrait permettre l'utilisation d'approche EDA de manière moins contraignante et plus routinière.

3.4.4 La prise en compte du devenir des contaminants

La connaissance du devenir des contaminants dans les milieux aquatiques est un point crucial dans l'évaluation du risque. Jusqu'à présent, cet aspect n'a été que rarement considéré dans le cadre d'études EDA (Gibson *et al.* 2005, Hill *et al.* 2010).

La diversité des composés et celles de leurs propriétés physico-chimiques imposent de s'intéresser à l'étude simultanée du sédiment et de la colonne d'eau. Notamment, la prise en compte de la distribution des polluants entre le sédiment et la colonne permettrait de tenir compte de l'ensemble des sources potentielles de contamination et, dans le cadre d'approche EDA, renseignerait sur l'origine des composés actifs identifiés.

Par ailleurs l'intégration de la biodisponibilité dans une telle démarche permettrait l'identification de composés actifs qui représentent un risque réel pour les organismes exposés. L'étude de la distribution au sein même des organismes ou des systèmes permettant de rendre compte de l'activité de la fraction biodisponible ont ainsi été utilisés ou sont en cours de développement (*voir section 3.1.1.2, Figure 17, p43*) (Houtman *et al.* 2004, Budzinski *et al.* 2006, Hill *et al.* 2010, Simon *et al.* 2011).

Enfin au-delà de la distribution, le suivi de la transformation *in situ* (e.g. biotransformation biotique/abiotique, phototransformation, ozonation) des polluants paraît également important. Certaines études rapportent notamment la transformation de composés non-actifs en métabolites actifs (La Farré *et al.* 2008). Dans ce contexte, l'EDA pourrait permettre l'identification de métabolites actifs comme des études l'ont montré récemment (e.g. métabolite du diclofénac - Schulze *et al.* 2010).

3.4.5 Développement de stratégie d'identification et de confirmation

3.4.5.1 Identification et confirmation analytique

Une fois les molécules isolées, il convient de les identifier. L'enjeu de cette identification est notamment la confirmation analytique, c'est à dire la confirmation de la structure de la molécule. En effet, à une molécule donnée peut correspondre une multitude de structures dont l'activité biologique peut différer.

La résonance magnétique nucléaire (RMN) est un outil puissant pour déterminer la structure des composés, mais elle est très rarement utilisée de par sa faible sensibilité et le manque de pureté des fractions. Ainsi, jusqu'à récemment, cette identification passait systématiquement par l'emploi de méthodes analytiques de type CPG-SM en mode *full-scan* du fait de l'existence d'importantes bases de données spectrales disponibles (e.g. NIST, Wiley) et de la bonne reproductibilité des spectres en ionisation électronique (EI). Néanmoins de par l'incapacité de la CPG à analyser les composés non volatils, thermolabiles ou polaires, les méthodes basées sur la CLHP sont de plus en plus utilisées pour l'identification de composés.

Les dernières innovations réalisées dans le domaine de la chromatographie en phase liquide ont permis d'optimiser cette identification (*voir section 3.2.1.3, p49*). Notamment, la CLHP-SM/SM (QqQ ou IT) peut fournir des informations structurales (e.g. MRM, balayage des ions fragments ou précurseurs, patron de fragmentation en MSⁿ) (Krauss *et al.* 2010). Elles sont notamment utilisées pour l'identification de métabolites de phototransformation (Petrovic et Barceló 2007). Néanmoins, la fragmentation dépendant fortement des conditions d'analyse (i.e. ionisation, phase mobile), on constate une mauvaise reproductibilité des spectres de masse qui rend difficile la mise en place de banques spectrales (Schymanski *et al.* 2009). Ainsi, ces méthodes sont très rarement utilisées pour l'identification de composés inconnus dans le cadre d'approches EDA.

Le développement de la haute résolution a ouvert de nouvelles perspectives. Par exemple, les outils tels que les analyseurs à temps de vol (TOF) permettent de mesurer la masse des ions avec une très grande précision et de déterminer leur formule empirique. Cependant, sans des informations de fragmentation (i.e. MS², et MSⁿ), la formule empirique, seule, est insuffisante pour identifier la structure d'un composé. Ainsi l'emploi d'appareil hybride combinant la précision de la masse à la fragmentation progressive est préconisé

(Kraus *et al.* 2010). Plusieurs appareils hydrides regroupent ces compétences (e.g. QqTOF-MS, QqLIT-MS, LTQ-FT-Orbitrap) (**Tableau 24**).

Tableau 24. Comparaison des différents analyseurs utilisés pour l'identification de composés inconnus. (d'après Petrovic *et al.* 2006, Kraus *et al.* 2010, de Hoffman et Stroobant 2007)

Analyseurs	Sensibilité	Résolution (FWHM)	Précision (ppm)	Limite en masse
Q	Moyenne (SIM)	Unitaire	Faible (100)	10 ⁴
QqQ	Moyenne (full-scan) Haute (MRM) = pg-fg	Unitaire	Faible (50)	10 ⁴
IT	Moyenne (MS ²)	Unitaire	Faible (10-100)	10 ⁴
TOF	Haute (full-scan) = pg	20 000	Haute (200)	10 ² -10 ³
QqLIT	Haute (MRM) = pg-fg	10 000	Faible (50)	10 ³
QqTOF	Moyenne	30 000	Haute (2)	10 ⁴
Orbitrap	Haute (full-scan) = pg-fg	100 000	Haute (2)	10 ³ -10 ⁴
FT-ICR	Haute (full-scan) = pg	1 000 000	Haute (≤ 1)	10 ⁴

Actuellement, l'emploi de tels outils reste relativement restreint de par le coût élevé de ces appareils. De plus, l'utilisation de ces outils implique de nombreuses mises au point méthodologiques (e.g. ionisation, colonne, gradient...) de manière à pouvoir les utiliser de manière optimale. On observe ainsi, actuellement, la mise en place de stratégies moins coûteuse. La première est basée sur la recherche de candidats dans des banques de données de spectre de masse ou de formule empirique. Toutefois elle reste limitée aux composés répertoriés. La seconde, plus récente, est basée sur l'identification de sous structures et la génération de structures à partir de logiciel de traitement de spectre de masse (e.g. AMDIS, MOLGEN-MS) puis sur la réduction du nombre de structure selon les propriétés physico-chimique des candidats (e.g. log-kow, indices de rétention) (Schymanski *et al.* 2008, Schymanski *et al.* 2011).

Ainsi, l'enjeu actuellement est de mettre en place des outils (e.g. haute résolution, appareil hydride) et/ou des stratégies permettant de récupérer suffisamment d'information pour pouvoir identifier le composé et sa structure.

3.4.5.2 Confirmation biologique

Tous les composés identifiés ne sont pas forcément actifs. En première approche, certains outils permettent de déterminer, en fonction de la structure des composés, leur activité biologique potentielle (e.g. QSAR). Ils permettent ainsi d'isoler les composés potentiellement actifs des autres composés identifiés dans les fractions actives (Balaam *et al.* 2009). Par la suite il convient de confirmer que les composés potentiellement actifs le sont effectivement. Si une fraction contient un unique composé et si ce dernier est commercialement disponible, il suffit de le tester sur le(s) bioessai(s) de manière à confirmer ce potentiel. Cependant, généralement, les fractions finales contiennent plusieurs composés et il convient alors d'évaluer l'activité du mélange de ces contaminants.

Démarche expérimentale

OBJECTIFS

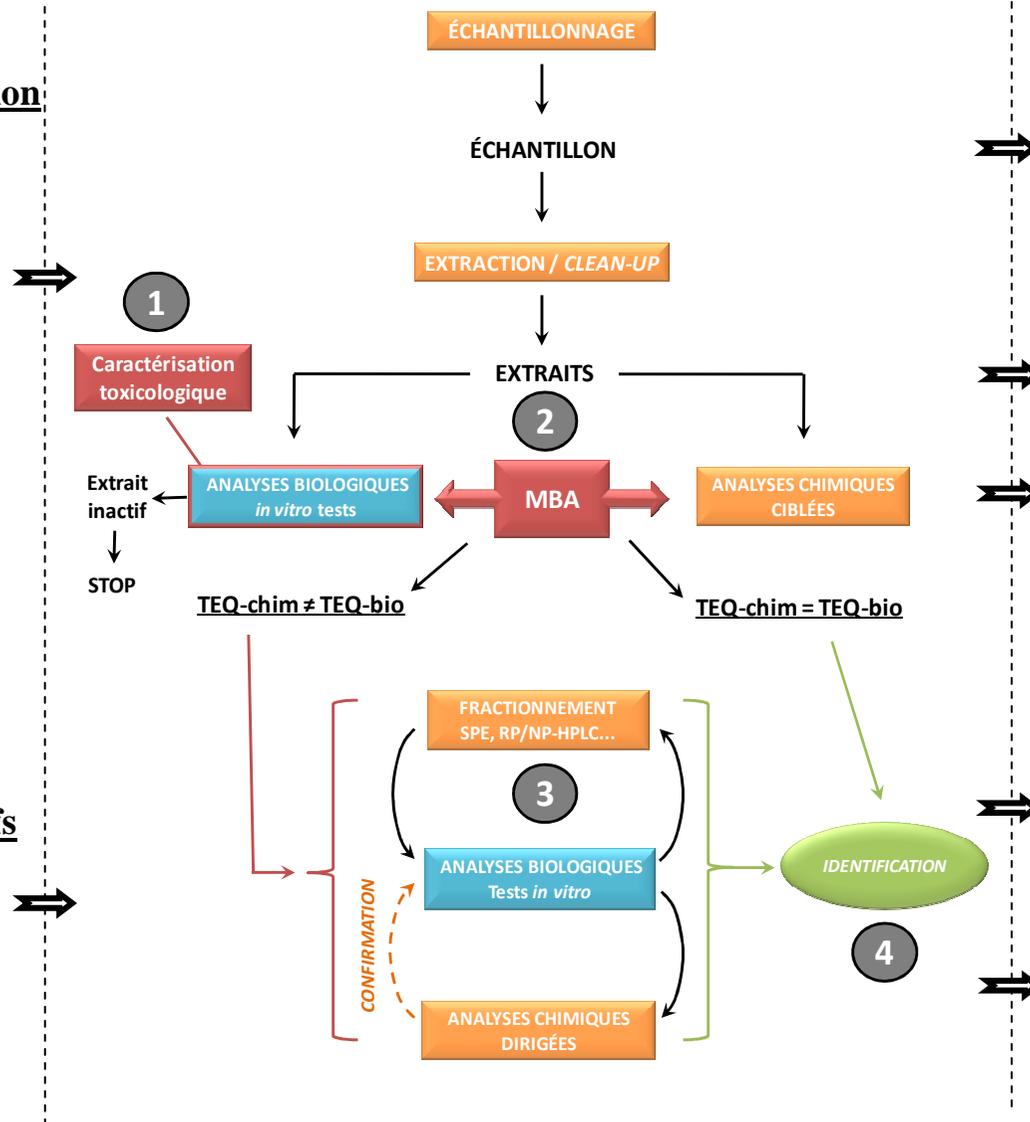
Caractérisation de la contamination par les polluants organiques

- Recherche de PE actifs sur des cibles multiples
- Étude des polluants émergents
- Compartimentation ?

Identification de composés actifs

- Isolement ?
- Confirmation ?

STRATÉGIE BIO/ANALYTIQUE



CHOIX MÉTHODOLOGIQUES

Approche multi-compartiments « exhaustive »

POCIS + SPMD
Sédiment (ASE + GPC)

Approche multi-récepteurs

Activités stéroïdiennes (ER, AR, MR, GR, PR)
Métabolisme des xénobiotiques (AhR, PXR)

Analyses chimiques ciblées

stéroïdes, alkylphénols, composés dioxin-like...

Stratégie de fractionnement

Pré-fractionnement par SPE
Hyperfractionnement par CLHP
Fractionnement sur colonne récepteur

Stratégie d'identification chimique

GC-MS full scan => banque NIST

Figure 24. Démarche expérimentale mise en œuvre pour la caractérisation de la contamination et l'identification des PE dans les milieux aquatiques.
(MBA= mass balance analysis ou analyse de l'équilibre des masses)

1. Objectifs et stratégie bio-analytique

Ce travail de thèse vise à contribuer à la mise en œuvre de nouvelles stratégies bio-analytiques qui permettent une caractérisation de la contamination chimique des milieux aquatiques par les PE ainsi que leur identification. Dans ce but, la démarche expérimentale a consisté à la mise en place et l'évaluation d'une approche de type EDA intégrant plusieurs étapes (**Figure 24**):

- (1) La caractérisation toxicologique de la contamination sur la base d'une approche multi-récepteurs *in vitro* réalisée dans le sédiment et la colonne d'eau.
- (2) La mise en œuvre d'une MBA à travers des analyses chimiques ciblées.
- (3) L'isolement et la purification des composés détectés au sein des échantillons actifs à travers la mise en place de fractionnements physico-chimiques et biochimiques.
- (4) L'identification des composés isolés à l'aide de différentes techniques spectrométriques et définie selon les propriétés physico-chimiques des fractions.

À chaque étape, des développements méthodologiques ont été opérés afin d'optimiser la démarche de sorte à prendre en compte une diversité de polluants chimiques PE. Cette démarche a pu ensuite être éprouvée sur deux rivières impactées de typologies très différentes en termes d'impacts chimiques et écotoxicologiques. Les choix méthodologiques et leurs enjeux spécifiques ainsi que les sites d'études sont détaillés ci-après.

2. Choix méthodologiques

2.1 Approche multi-récepteurs

Les outils biologiques utilisés au cours de ce travail sont des modèles cellulaires basés sur l'expression d'un gène rapporteur ou de gène naturel régulé par différents récepteurs cibles de xénobiotiques. Ces modèles et leurs spécificités sont décrits dans le **tableau 25**.

Tableau 25. Les différentes lignées cellulaires utilisées au cours de cette thèse
(* , bioessais mis en place à l'INERIS dans le cadre de cette thèse)

	Lignées cellulaire (Récepteur -Principe)	Reference ligands (EC50)	Ligands environnementaux
Activité Hormonale	MELN (hER - LUC)	ago :17β-E2 (0,01 nM) antago : ICI ()	Xéno-œstrogènes (e.g. BPA, Alkylphenols, EE2, E2, Parabens, pesticides, phtalates...)
	MDA-kb2 (hGR > hAR - LUC)	ago : DEX (10 nM) / DHT (0.1 nM) antago : RU486 (μM) / FLU	Glucocorticoïdes naturels et de synthèse (e.g. cortisol, prednisone, dexamethasone...)
Métabolisme des xénobiotiques	HG5LN-hPXR * (hPXR-LUC)	ago SR12813 (70 nM)	Pesticides, composés pharmaceutiques, stéroïdes, phtalates, plastifiants, surfactants...
	PLHC-1, H4IIE (AhR-EROD)	ago : TCDD (0.1/0.07 nM) antago : α-NF (10 μM)	PAHs, PCBs, PCDD/Fs...
	PLHC-1, ZFL, RTL-W1 (CYP3A-BFCOD)*	?	?

De manière à obtenir une large capacité de diagnostic environnemental, la mise en œuvre d'une approche multi-cibles est indispensable. A l'initiation de ce travail les bioessais existants et utilisés au sein de notre laboratoire (MELN, MDA-kb2, PLHC-1) permettaient la détection des composés œstrogénique, (anti)androgénique et *dioxin-like* dans les matrices environnementales (Louiz *et al.* 2008).

De manière à accroître notre capacité de détection, un travail spécifique a été réalisé sur le récepteur PXR permettant potentiellement la détection d'une diversité de contaminants organiques non considérés par les outils actuels (voir section 2.2.1.3 de la synthèse bibliographique, tableau 9, p22). De par les fortes différences inter-espèces rapportées dans l'activation de ce récepteur et travaillant dans le milieu aquatique, nous avons entrepris d'étudier à la fois le récepteur humain (i.e. cellules HG5LN-hPXR) et celui de poisson (i.e. induction CYP3A sur cellules de poissons). Un travail spécifique a consisté, après une optimisation des conditions de culture et des conditions de tests, à cribler une diversité de ligands environnementaux pour établir la capacité de ces modèles à les détecter.

2.1.1 La lignée HG5LN-hPXR

Cette lignée, fournie par le Dr Patrick Balaguer (INSERM, U896, Montpellier, France), est issue d'une double transfection stable de la lignée HeLa (cancer du col de l'utérus) (**Figure 25**).

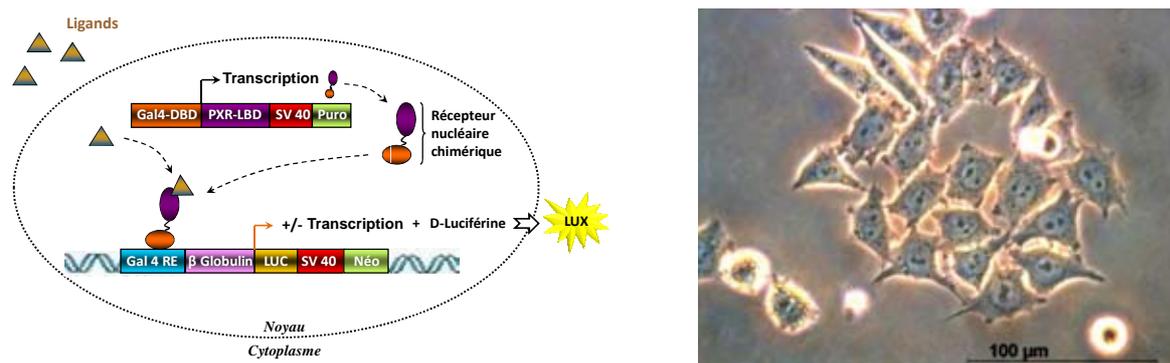


Figure 25. La lignée HG5LN-hPXR (Lemaire *et al.* 2006)

Une première transfection conduit à la lignée HG5LN (Seimandi *et al.* 2005) par intégration du plasmide pGal4RE-βglob-Luc-Sv40-Neo, puis la transfection stable du plasmide pGal4DBD-PXRLBD, a permis l'obtention de la lignée HG5LN-hPXR (Lemaire *et al.* 2006). L'intérêt de la double transfection et du système Gal-4 réside dans la spécificité de la réponse. En effet, la lignée HG5LN permet de mettre en évidence une activation/inhibition de la luciférase non spécifique. Le système gal-4 permet lui de supprimer le bruit de fond engendré par le récepteur endogène.

Enfin, des études antérieures ont déjà montré la capacité de ce modèle cellulaire à être activé par une diversité de ligands, notamment présents dans l'environnement (Lemaire *et al.* 2006, Mnif *et al.* 2007).

2.1.2 L'activité du CYP3A surcellules de poissons

Ne disposant pas d'un modèle cellulaire basé sur le récepteur PXR de poisson, nous avons décidé de nous orienter vers une méthode alternative. La mesure de l'activité du CYP3A, enzyme dont l'expression est régulée par le PXR chez l'Homme, mécanisme fortement suspecté chez les poissons (Tseng *et al.* 2005), a ainsi été choisie.

Des différences pouvant exister entre certaines espèces de poissons, nous avons décidé d'utiliser des lignées appartenant à trois espèces différentes. Par ailleurs, de par l'implication du PXR et du CYP3A dans la détoxification se déroulant principalement dans le foie, nous avons décidé de travailler sur des lignées hépatiques. Les lignées PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*), ZFL (*Danio rerio*) et RTL-W1 (*Oncorhynchus mykiss*) ont été choisies pour ce travail. Enfin, de manière à évaluer si les résultats observés *in vitro* étaient en adéquation avec les réponses *in vivo*, nous avons également entrepris la mesure de cette activité sur des larves de poissons zèbre.

Plusieurs méthodes sont employées pour la mesure de cette activité *in vitro*. Chez les mammifères, elles consistent à mesurer le métabolisme par le CYP3A d'un substrat en un produit fluorescent [e.g. 7-Benzyloxy-4-trifluorométhylcoumarine (BFC) en 7-hydroxy-4-trifluorométhylcoumarine (HFC) et Benzyloxyrésorufin (BzRes) en resorufin] (Donato *et al.* 2004, Mensah-Osman *et al.* 2007) ou luminescent (i.e. Luciférine PFBE, P450-Glo™ de chez Promega) (Cali *et al.* 2006, Westerink et Schoonen 2007). Chez les poissons, elle consiste le plus souvent en une mesure indirecte par le suivi de l'activité de la 6β-testostérone hydroxylase ou de l'erythromycin N-demethylase (Vaccaro *et al.* 2003, Li *et al.* 2008). Néanmoins, ces méthodes impliquent un travail important d'analyse chimique en aval (i.e. CLHP avec détection UV) pour déterminer la quantité de métabolites. La mesure de l'activité benzyloxy-4-[trifluorométhyl]-coumarine-*O*-debenzyloxyase (BFCOD) est également de plus en plus rapportée chez le poisson, en particulier sur les fractions S9 ou microsomaux hépatiques (Smith *et al.* 2010, Hasselberg *et al.* 2004, Hegelund *et al.* 2004) et plus récemment sur lignées cellulaires (Christen *et al.* 2009). Au regard des autres méthodes existantes chez les poissons, sa mise en œuvre semble relativement facile.

Dans le cas de ce travail, nous avons choisi la mesure de l'activité BFCOD (**Figure 26**). Au-delà de la simple détection des polluants émergents, la mesure de cette activité devrait également nous permettre de répondre à des questions mécanistiques portant sur la régulation du CYP3A chez le poisson.

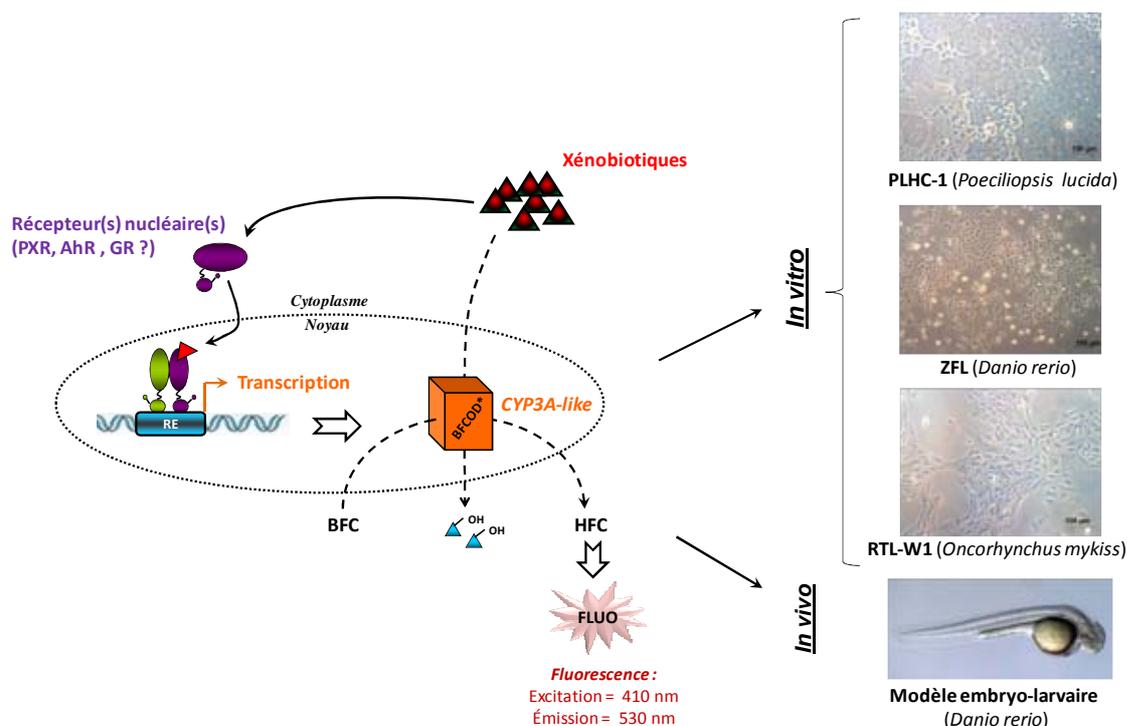


Figure 26. Principe de la mesure de l'activité BFCOD (BFCOD = benzyloxy-4-[trifluorométhyl]-coumarine-*O*-debenzyloxyase, BFC = benzyloxy-4-[trifluorométhyl]-coumarine, HFC = 7-hydroxy-4-133 [trifluorométhyl]-coumarine)

2.2 Approche multi-compartiment

Une grande partie de cette thèse a été consacrée à la calibration de méthodes physico-chimiques de manière à permettre l'étude d'une multitude de contaminants organiques caractérisés par des propriétés physico-chimiques et des activités biologiques différentes. Ces calibrations, pour l'essentiel, ont porté sur le traitement des échantillons de sédiment mais également de la colonne d'eau

2.2.1 Le sédiment

2.2.1.1 L'échantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'une benne Van Veen. Le sédiment a été tamisé sur site à 1 mm et stocké dans des barquettes aluminium au -20°C (**Figure 27**).



Figure 27. Photographies du prélèvement de sédiment
Benne VanVeen (a) , Tamis (b) , Barquettes d'aluminium pour le stockage du sédiment (c)

2.2.1.2 L'extraction: *Accelerated Solvent Extraction (ASE)*

Diverses méthodes sont décrites dans la littérature pour l'extraction des matrices solides (voir section, 3.1.1.2 de la synthèse bibliographique, tableau 17, p42). Cependant, la variété des propriétés chimiques des PE rend leur extraction commune difficile et la validation de méthodes d'extraction en vue d'analyses bio-analytique multi-bioessais reste très peu décrite. Parmi les techniques existantes, l'ASE très largement utilisée et permettant une extraction rapide et automatisée, a été choisie pour l'extraction de matrices solides dans le cadre de notre travail (**Figure 28**).

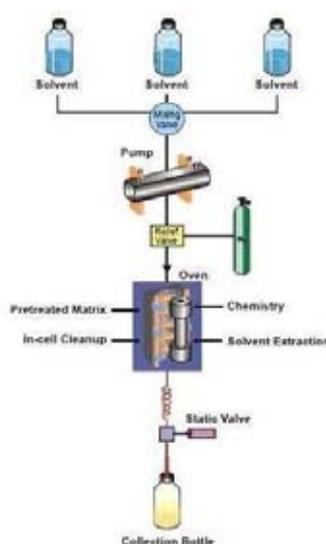


Figure 28. Photographie d'un appareil ASE 350® et son principe d'utilisation

Dans le cadre de la mise en œuvre de cet outil, nous avons évalué une méthode permettant l'extraction d'une large gamme de composés actifs dans le sédiment. Il nous a paru intéressant de comparer un rendement issu des analyses chimiques à un rendement issu des analyses biologiques *in vitro*, notamment vis-à-vis des potentiels effets de mélange ou de matrice. Cette comparaison a été réalisée d'une part sur un sédiment artificiel non actif dopé avec un mélange de composés actifs donnant théoriquement une réponse maximale pour les différentes activités mesurées (i.e. calcul d'un rendement réel) et d'autre part pour des PE natifs présents dans un sédiment naturel actif (i.e. détermination des concentrations et des activités biologiques). Ce travail spécifique est décrit dans la partie résultats (**Article 5**).

2.2.1.3 Purification par chromatographie de perméation de gel (GPC)

L'extraction des échantillons environnementaux conduit généralement à une co-extraction de substances naturelles constituant la matrice et pouvant interférer avec les analyses biologiques et chimiques (*voir section 3.1.1.3 de la synthèse bibliographique, p44*). Dans le cadre de ce travail, l'effet de la purification par GPC sur nos réponses biologiques a été évalué.

La GPC est une technique de chromatographie d'exclusion stérique (CES) basée sur la différence de pénétration des molécules de l'échantillon dans la phase stationnaire. Celle-ci comporte des pores dont le diamètre est comparable à celui des espèces présentes lorsqu'elles sont en solution dans la phase mobile. Selon la nature de la phase stationnaire, la CES est désignée par filtration sur gel quand la phase est hydrophile (phase mobile aqueuse) et par perméation de gel (GPC) quand elle est hydrophobe (phase mobile organique). Le principe de la GPC est la rétention/piégeage des molécules de petites tailles alors que les macromolécules sont éluées plus rapidement.

Actuellement, cette technique est la plus largement utilisée pour la purification des extraits organiques (e.g. sédiment, organimes, SPMD) vis-à-vis de macromolécules (e.g. lipides, acides humiques). Cela s'explique notamment de par son universalité vis à vis d'une large gamme de contaminants organiques. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser cette méthode de purification.

Dans le cas présent, l'objectif était d'évaluer l'importance de cette purification pour la bio-détection d'une multitude de composés actifs. Il a ainsi été question de comparer les activités brutes mesurées au sein des extraits bruts à celle issues des extraits purifiés sur GPC. Pour réaliser cette purification, nous avons utilisé deux colonnes en série *Waters Envirogel™ GPC clean-up* (19 x 150 mm et 19 x 300 mm) couplées à une colonne de garde (4.6 x 30 mm) et montées sur un système CLHP Thermo SpectraSystem équipé d'un passeur d'échantillon AS300, d'une seringue de 5 mL, d'une boucle d'injection de 2 mL, d'une pompe binaire P4000 et d'un détecteur UV1000. La méthode de purification a été calibrée selon les recommandations de Waters®, basées sur le protocole EPA-3604A (1994). Les conditions d'analyses étaient les suivantes : phase mobile cyclohexane/AE (50/50, v:v), débit 5 mL/min, injection 1 mL, température de 20°C.

2.2.2 La colonne d'eau

2.2.2.1 L'échantillonnage

La colonne d'eau est généralement caractérisée par une variation périodique des niveaux de contamination qui peuvent être assez faibles selon le débit, ce qui constitue une contrainte importante dans leur évaluation. Pour pallier ces limites, des capteurs passifs ont été déployés. L'intérêt de tels dispositifs a été discuté dans *la section 3.1.2.2 de la synthèse bibliographique (p45)*. En fonction des objectifs des études *in situ* et toujours dans une

optique d'avoir une approche la plus exhaustive possible, 2 types de capteurs ont été utilisés de manière à couvrir un large spectre de polarité: les POCIS permettant l'échantillonnage des composés polaires ($\log K_{ow} < 3$) et les SPMD permettant l'échantillonnage des composés apolaires ($\log K_{ow} > 3$) (**Figure 29**).



Figure 29. Photographies des POCIS et des SPMD avant leur déploiement
Dispositifs utilisés pour l'échantillonnage (a) , Cannister équipé de 3 POCIS (b) , Cannister *spider* équipé d'une membrane SPMD (c)

2.2.2.2 L'extraction

Les procédures de traitement des POCIS et des SPMD sont présentées en **figure 30**. Les POCIS, après un nettoyage des membranes à l'eau distillée, ont été extraits par extraction sur phase solide (SPE) en transférant la phase HLB, piégée entre les membranes PES, dans des cartouches SPE en verre. Après séchage de la phase, les composés retenus sur la phase ont été élués par une élution séquentielle avec 10 mL de MeOH, 10 mL de MeOH/DCM et 10 mL de DCM. Après évaporation sous flux d'azote, chaque extrait a été repris dans un volume de 200 μ L de MeOH pour les bioessais *in vitro* et les analyses chimiques.

Concernant les SPMD, le biofouling (i.e. inscrustation d'organismes végétaux ou animaux) étant plus important, un premier nettoyage des membranes a été effectué *in situ* avec de l'eau distillé. Avant extraction, les membranes ont de nouveau été nettoyées à l'aide d'un chiffon imbibé d'eau distillé, puis d'acétone et enfin de cyclohexane. L'extraction a consisté en une dialyse de 2 fois 24 h dans 125 mL de cyclohexane. Après reconcentration au RotavapTM (Heidolph, Schwabach, Allemagne), les extraits ont été purifiés par GPC de manière à éliminer la trioléine et d'autres lipides persistant dans les SPMD après la dialyse et pouvant interférer avec les analyses biologiques et chimiques.

2.3 Stratégie de fractionnement des extraits environnementaux

La stratégie bio-analytique de type EDA mise en place au cours de ce travail vise à isoler et identifier des PE actifs. Cette approche utilise notamment des étapes de fractionnement de manière à réduire la complexité du mélange environnemental (*voir section 3.4.3 de la synthèse bibliographique, p60*). Le couplage de bioessais et de plusieurs étapes successives de fractionnement permet notamment d'isoler progressivement les composés d'intérêts. Jusqu'à aujourd'hui de tels couplages ont le plus souvent été dédiés à une classe spécifique de contaminants (composés œstrogénique et *dioxin-like* –Houtman *et al.* 2007, Brack *et al.* 2005) et des méthodes plus intégratives ont rarement été développées.

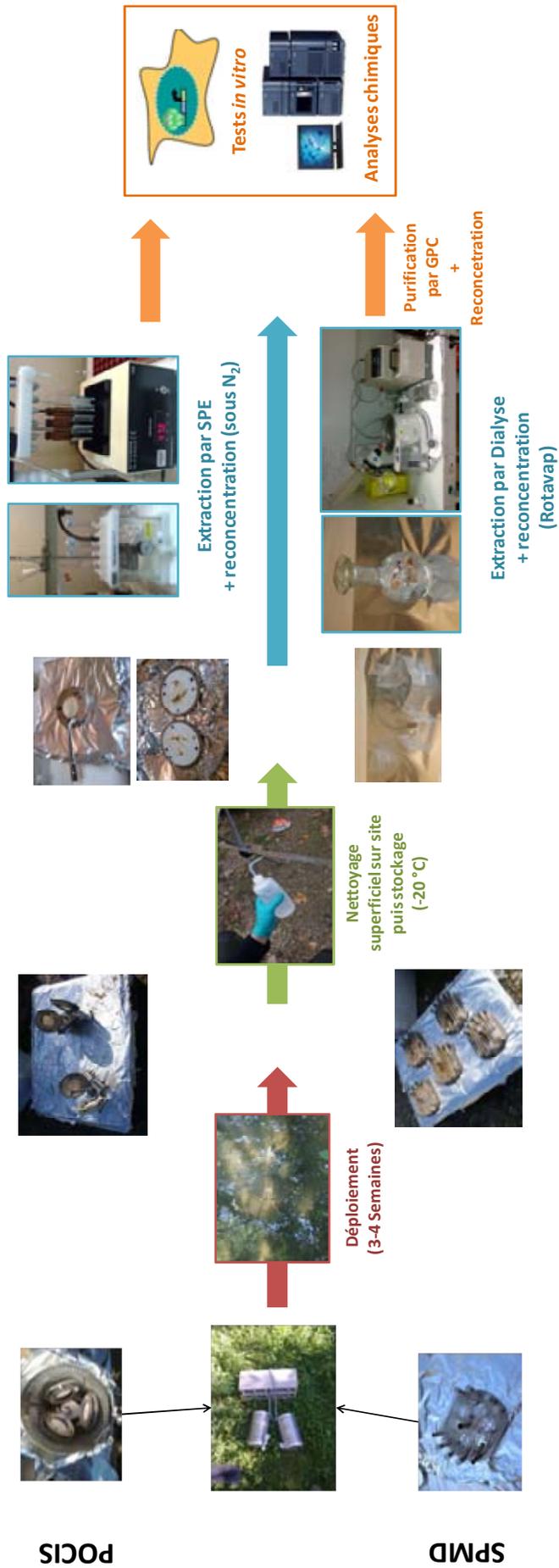


Figure 30. Procédure d'utilisation des capteurs passifs

Dans notre étude, il a été question de développer et d'évaluer une stratégie de fractionnement permettant l'analyse simultanée de plusieurs activités PE liés à la présence de ligands du ER, du AR, du PXR et du AhR.

2.3.1 Fractionnement primaire : pré-fractionnement par SPE

Plusieurs études rapportent l'emploi d'un fractionnement primaire « grossier » ou pré-fractionnement permettant une première réduction de la complexité de mélange à travers l'obtention d'un nombre réduit de fractions (Khim *et al.* 1999, Thomas *et al.* 2002, Brack *et al.* 2005). Dans le cas présent, le pré-fractionnement est réalisé par extraction sur phase solide (SPE) sur cartouches de silice selon les étapes décrites **figure 31**.

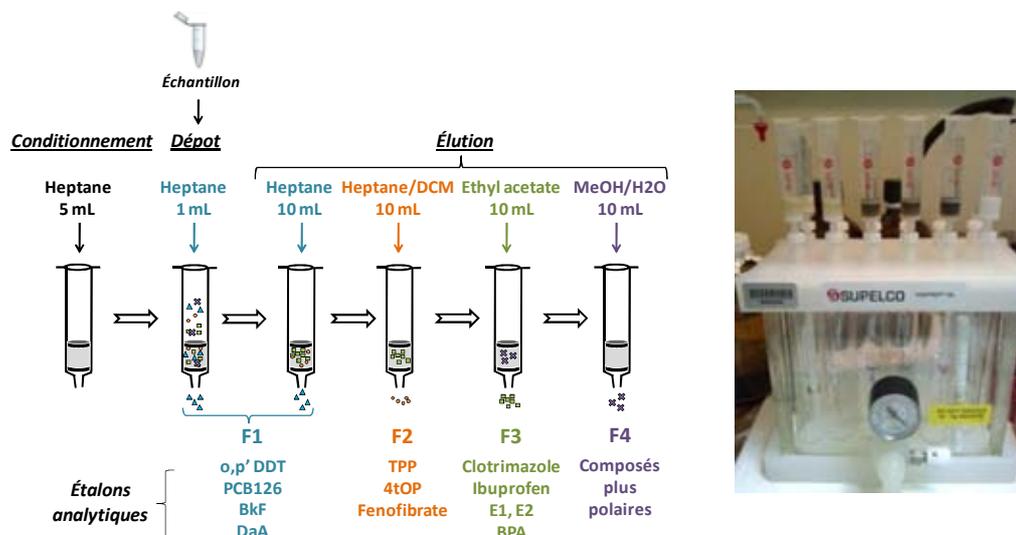


Figure 31. Les différentes étapes du pré-fractionnement sur cartouche de silice

En amont, différentes cartouches et différentes conditions d'élutions ont été testées pour l'isolement de 12 composés standards présentant des propriétés physico-chimiques et des activités différentes. Les cartouches de silice permettant la meilleure séparation ont été choisies. La **Figure 31** présente le profil d'élution des standards analytiques utilisés pour la calibration de la procédure. Les investigations portant sur cette calibration (i.e. établissement de rendement de pré-fractionnement) sont présentés dans l'**article 6**.

2.3.2 Fractionnement secondaire : hyperfractionnement par CLHP

Le pré-fractionnement fournit une première information sur la polarité des ligands mais reste généralement insuffisant pour séparer finement les activités les unes des autres. Par conséquent un deuxième fractionnement par CLHP en phase inverse sur colonne C18 (Poursuit-C18, 5 µm, 250 x 4,6 d.i.) (**Figure 32**) a été développé. Pour la calibration de cette méthode, un mélange de 35 molécules standards, couvrant une large gamme de polarité ($-1 < \log Kow < 7$), a été utilisé. Les conditions du gradient d'élution sont résumées dans le **tableau 26**. La détection a été réalisée en UV à 210 nm. Les composés sont élués entre 4 (caféine) et 99 (TCDD) min (**Figure 33**).



Figure 32. Système CLHP utilisé pour l'hyperfractionnement

Tableau 26. Gradient d'élution d'élution utilisé pour l'hyperfractionnement

min	Débit (mL/min)	%ACN	%H2O
0	1	20	80
10	1	20	80
60	1	45	55
100	1	100	0
120	1	100	0
120,01	1	20	80
125	1	20	80

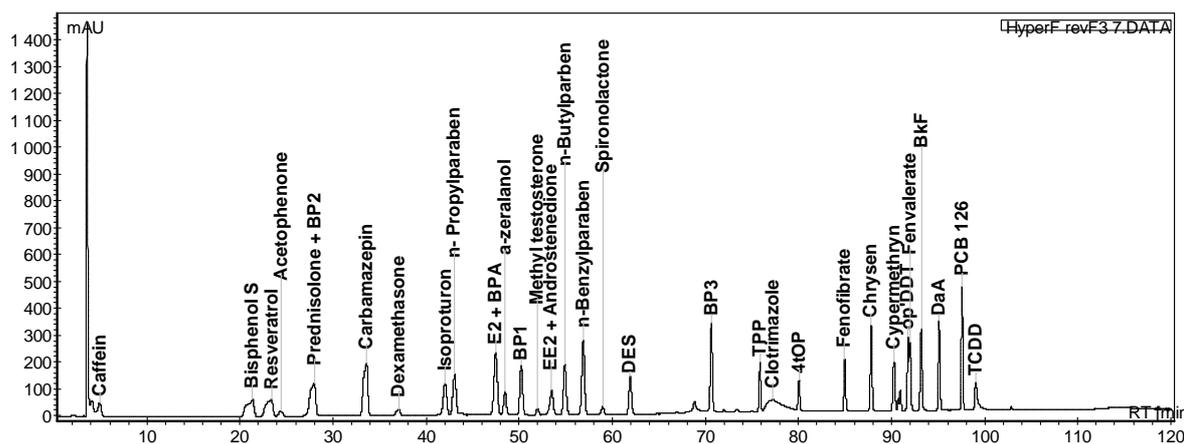


Figure 33. Profil de séparation chromatographique du mélange de 35 PE
 (BP : benzophénone , EE2 : éthinyl-œstradiol , DES : Diéthyl-stilbestrol)

2.3.3 Fractionnement ciblé sur colonne récepteur

Comme évoqué dans la *section 3.4.3 de la synthèse bibliographique (p62)*, il est fréquent que les fractions finales contiennent encore plusieurs activités. De manière à isoler efficacement les activités les unes des autres, nous avons utilisé des colonnes d'affinité contenant des récepteurs nucléaires purifiés permettant de séparer les composés qui lient les récepteurs de ceux qui ne les lient pas. Dans ce travail, selon la méthode décrite par Pillon *et al.* (2005), Riu *et al.* (2008) et Dagnino (2009), des colonnes ER α et PXR ont été employées. Leur principe d'utilisation est décrit **figure 34**.

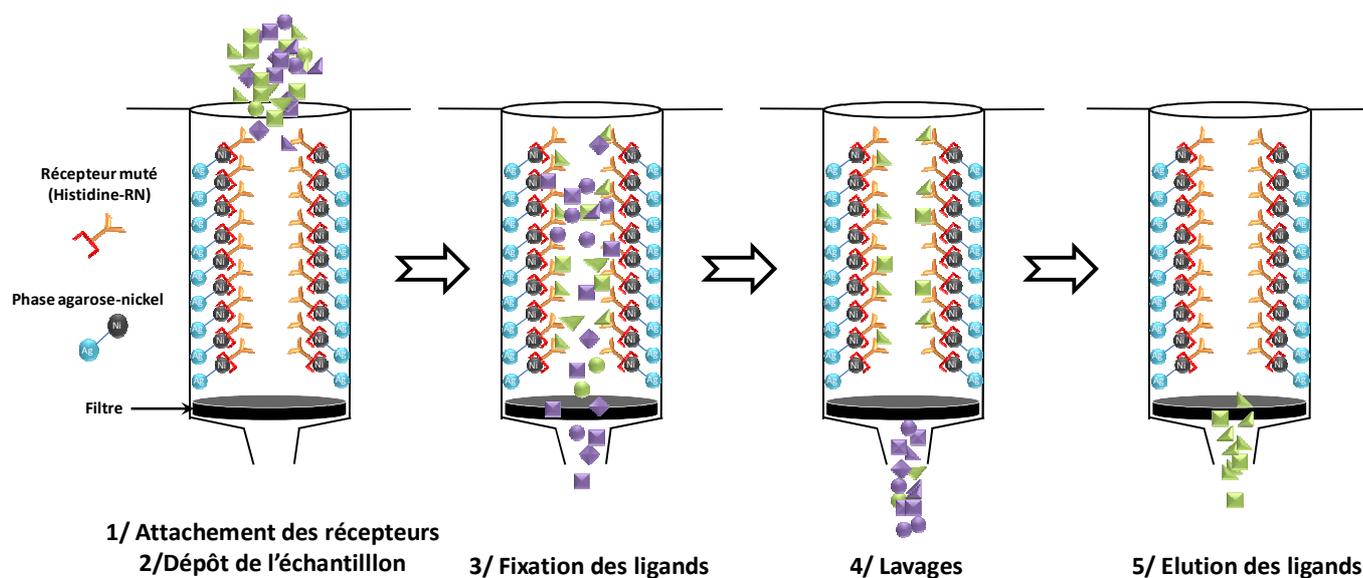


Figure 34. Principe d'utilisation des colonnes d'affinité aux récepteurs nucléaires

2.4 Stratégie d'identification chimiques

2.4.1 Analyses chimiques quantitatives

Des analyses chimiques ciblant différentes classes de composés, majoritairement des PE, ont pu être réalisées à différentes étapes de la stratégie bio-analytique. Avant chaque injection, les extraits ont subi une purification par extraction sur phase solide ou sur micro-colonne de manière à optimiser leur détection. Les différentes classes de composés analysés ainsi que les méthodes de purification et d'analyses utilisées pour leur détection et leur quantification sont présentées dans le **tableau 27**.

Tableau 27. Méthodes utilisées pour les analyses chimiques ciblées

(^a. TPP : triphenyl phosphate analysé directement sans purification)

Classes de composés	Méthodes de purification	Méthodes d'analyse	Composés quantifiés	Réf
HAP	μcolonne d'alumine + μcolonne de silice	CPG-SM (SIM) 	naphtalène, acenaphthylène, acenaphtène, fluorène, anthracène, fluoranthène, dibenzothiophène, pyrène, benzo[a]anthracène, triphenylène, chrysène, benzo[b/j/k]fluoranthène, benzo[e]pyrène, benzo[a]pyrène, indeno[1,2,3,c,d]pyrène, dibenzo[a,h]anthracène, benzo[g,h,i]perylène, TPP ^a	
PCB, OCP	Micro-colonne silice acide après purification HAP	CPG-μECD	PCB 08 / 30 / 18 / 29 / 50+ 28 / 52 / 44 / 104 / 103 / 66 / 155 / 101 / 87 / 154 + 77 / 188 / 153 / 105 / 138 / 126 / 187 / 128 / 200 / 180 / 170 / 198 / 195 / 206/ 209, BDE47 / 119 / 99 / 153 hexachloro-benzène, lindane, heptachlor, heptachlore époxide, 2,4'DDE, cis-chlordane, trans-nonachlore, 4,4'DDE, dieldrin, 2,4'DDD, 4,4'DDD, 2,4'DDT, 4,4'DDT d8, 4,4'DDT, mirex	
Stéroïdes	Cartouche Oasis HLB (200 mg, 6cc WATERS®) + Cartouche NH2 (500mg, 3cc, Supelco)	UPLC-MS/MS (MRM) 	œstriol, noréthindrone, testostérone, éthinylœstradiol, œstrone, 17α-œstradiol, 17β-œstradiol, lévonorgestrel, progestérone, mestranol	
Composés pharmaceutiques	Cartouche Oasis MCX (60mg, 3cc, WATERS®)	RRLC-MS/MS (MRM) 	caféine, carbamazépine, diazepam, nordiazepam, amitryptiline, doxepine, imipramine, ibuprofène, paracétamol, kétoprofène, naproxène, aspirine, diclofénac, gemfibrozil, clenbuterol, salbutamol, terbutaline, théophylline, alprazolam, bromazepam, fluoxétine, clotrimazole, fénofibrate	
Alkylphenols BPA	Cartouche Bond Ellut C18 (200 mg, 3cc, Varian®) + HF-Bondelut PSA (500 mg, 3cc, Varian®)	UPLC-MS/MS (MRM) 	NP2EO, NP1EO, NP1EC, BPA, 4-tOP, 4-NP	

2.4.2 Analyses chimiques non ciblées pour l'identification de composés inconnus

La CPG-SM utilisant un simple quadripole associée à un mode de détection en *full-scan* reste actuellement la méthode la plus employée pour l'identification de composés inconnus dans les matrices environnementales à travers une comparaison avec des bases de données de spectres de masses (e.g. NIST).

Dans le cadre de ce travail, cette méthode a été utilisée en première approche. Les analyses ont été réalisées en utilisant un CPG (GC, Agilent 6890, France) équipé d'une colonne HP-5MS couplé un SM (MS, Agilent 5973) et d'un passeur d'échantillon (Agilent 7683). Les conditions d'analyse étaient les suivantes : phase mobile : Helium (1.3 mL/min), Injection 1 μl en *splitless*, Température de l'injecteur : 250°C, T°C du four : 50°C à 300°C (4°C /min), Gamme de masse : 50-500 m/z (70 eV). Les spectres de masse obtenus ont été comparés avec ceux de la banque NIST98.

2.5 Les sites d'études

2.5.1 Le Réveillon

Le Réveillon est une rivière française localisée en région parisienne (**Figure 35**). D'une longueur de 21,6 km, elle prend sa source en Seine et Marne et constitue l'un des affluents de l'Yerres dans l'Essone. Son débit moyen est de 0.304 m³/s et elle couvre un bassin de versant de 1020 km². De par son cheminement, cette rivière est soumise à une pression anthropique mixte d'origine agricole et urbaine et de ce fait charrie potentiellement une diversité de contaminants chimiques.



Figure 35. La rivière Réveillon

Le site de prélèvement, localisé au sein de la commune de Villecresnes (94), a fait l'objet de plusieurs investigations par l'INERIS ces dernières années. Initialement, le choix de ce site comme site d'étude a été dicté par la mise en évidence d'un impact sur les populations de poissons à l'aide de certains biomarqueurs biochimiques d'exposition (i.e. VTG et EROD) (Sanchez *et al.* 2007).

Le caractère multi-contaminé de ce site a pu être confirmé à l'aide d'analyses *in vitro* et chimiques appliquées au sédiment avec notamment la mise en évidence d'activités œstrogénique, *dioxin-like* et anti androgénique (**Article 2**). Toutefois, la majorité des PE détectés dans cette étude restait à être identifiée et la contamination de la colonne d'eau restait à être évaluée.

Enfin, des analyses réalisées au cours de la première année de thèse ayant montré une certaine constance dans les niveaux de contamination entre l'année 2004 (Kinani *et al.* 2010) et l'année 2009, nous avons décidé d'utiliser ce site comme site atelier pour la calibration des outils physico-chimiques mise en œuvre dans le cadre de notre démarche. La mise en œuvre de notre stratégie bio-analytique sur ce site fait l'objet de l'**article 6** alors que l'étude de la distribution de la contamination est rapportée dans l'**article 7**.

2.5.2 La Dore

La Dore est une rivière française localisée pour l'essentiel dans le Puy de Dôme. D'une longueur de 1065 km, elle constitue l'un des affluents de l'Allier. Le site d'étude est localisé au niveau de la commune de Vertelaye à proximité d'un rejet pharmaceutique et d'un rejet municipal (**Figure 36**).



Figure 36. La rivière Dore
(U : STEP urbaine , P : Usine pharmaceutique)

Le choix de cette rivière pour site d'étude a été déterminé par l'observation en aval d'une usine pharmaceutique et d'une STEP urbaine d'anomalies morphologiques (i.e. hypertrophie des gonades, **Figure 36**) et d'une incapacité de ponte associées à une intersexualité marquée chez des goujons (Sanchez *et al.* 2011). Ces résultats suggéraient fortement une contamination par des composés de type PE.

Le contexte particulier de contamination de ce site (i.e. rejet pharmaceutique) et le besoin d'identifier les molécules à l'origine des effets observés chez les poissons nous ont conduits à mettre en œuvre notre stratégie bio-analytique. La source de contamination pouvant être multiple nous avons investigué le sédiment et la colonne d'eau. Concernant les bioessais *in vitro*, la proximité d'une industrie pharmaceutique comme source potentielle de contamination, nous a amené à intégrer à une batterie de bioessais incluant de nouvelles cibles biologiques : GR, MR et PR. Les investigations réalisées sur ce site font l'objet de l'**article 8**.

Résultats

1. Nouveaux outils *in vitro* pour la détection de PE émergents

La contamination des milieux aquatiques par les PE est aujourd'hui un fait avéré. Plusieurs études rapportent des altérations de la reproduction et/ou du développement chez les poissons associées à la présence de composés pouvant interagir avec le système endocrinien. Ces effets délétères soulignent le besoin de caractériser la contamination par ces substances de manière à évaluer les risques encourus pour les populations exposées. Actuellement les outils bio-détection sont fréquemment employés pour cette caractérisation de par leur capacité à détecter de manière sensible et intégrative les composés actifs. Jusqu'à présent, l'emploi de tels outils a essentiellement porté sur la détection des composés interagissant avec le ER ou le AhR. Néanmoins, quelques études rapportent l'occurrence environnementale de substances qui n'interagissent pas avec ces voies de signalisation et dont les impacts *in situ* restent souvent méconnus. La bio-détection de composés actifs reste donc un enjeu de recherche important et il existe actuellement un besoin d'évaluer de nouveaux outils permettant de rendre compte de la diversité des contaminants actifs présents dans les milieux aquatiques.

La première partie des résultats est consacrée à l'évaluation de nouveaux bioessais *in vitro*. Parmi les nombreuses cibles éventuelles des PE, nous nous sommes notamment intéressés à l'utilisation du récepteur PXR au sein d'une démarche bio-analytique. Ce dernier, décrit dans la littérature comme un *xenosensor* (détecteur des xénobiotiques) (Kretschmer et Baldwin 2005), peut potentiellement permettre la détection d'une diversité de substances regroupant une multitude de classes chimiques, notamment de polluants émergents non considérés par les outils généralement utilisés (i.e. ER, AhR). Par ailleurs, au delà de la seule détection de composés actifs, l'étude du PXR revêt une pertinence mécanistique et fonctionnelle du fait de son rôle clef dans la régulation de gènes, dont le CYP3A, impliqués dans la détoxification des xénobiotiques et le métabolisme des hormones endogènes.

Du fait des fortes différences inter-espèces rapportées pour ce récepteur (Moore *et al.* 2000, Eckins *et al.* 2008), il nous a paru pertinent d'étudier les systèmes humain et poisson à travers (1) l'utilisation d'un modèle gène rapporteur basé sur le PXR humain (hPXR) ; (2) la mesure de l'activité CYP3A dans des lignées de poissons.

1.1 Utilisation du récepteur hPXR

Des différents analogues identifiés dans le règne animal, le hPXR reste à ce jour le mieux décrit, d'une part d'un point de vue mécanistique et fonctionnel et d'autre part en termes de diversité de ligands. Parmi les différents systèmes cellulaires rapportés dans la littérature pour l'étude de ce récepteur, une majorité sont basés sur des systèmes de transfection transitoires (voir section 2.3.2.4, tableau 16, p39). Dans le cas de notre travail nous avons utilisé la lignée HG5LN-hPXR issue d'une double transfection stable (Lemaire *et al.* 2006).

Les objectifs étaient de caractériser (1) l'utilisation de la lignée HG5LN-hPXR pour la détection de polluants environnementaux, purs et au sein d'échantillons complexes ; (2) son degré de complémentarité avec d'autres tests *in vitro* au sein d'une démarche bio-analytique intégré pour informer sur l'état de contamination des milieux aquatiques.

Ci-après sont ainsi présentés la caractérisation de cette lignée vis-à-vis d'une diversité de ligands puis son évaluation pour la détection d'activateurs du hPXR dans des matrices environnementales. Ces premiers travaux ont donné lieu à deux articles publiés dans *Analytical Bioanalytical chemistry* (Creusot *et al.* 2010, **Article 1**) et *Environmental pollution* (Kinani *et al.* 2010, **Article 2**).

1.1.1 Caractérisation de la lignée HG5LN-hPXR

De précédentes études utilisant cette lignée ont décrit divers composés comme des activateurs spécifiques du hPXR (pesticides, stéroïdes, surfactants...) (Lemaire *et al.* 2006, Mnif *et al.* 2007). Dans le cadre de notre travail, il nous a paru intéressant d'étendre cette caractérisation à d'autres classes chimiques présentes dans les milieux aquatiques incluant notamment des polluants émergents. Parmi ces composés, certains avaient déjà été décrits comme activateurs du hPXR, mais il nous a paru important de confirmer leur capacité à activer ce récepteur dans notre lignée et dans nos conditions de test. Au total, plus d'une centaine de composés ont été testés à la fois sur la lignée HG5LN-hPXR et sur la lignée HG5LN de manière à garantir la spécificité de l'activation. *Une partie de ce criblage (57 composés) est présenté dans l'article 1.*

Les résultats (**Tableau 28**) confirment l'activation spécifique du récepteur hPXR dans la lignée HG5LN-hPXR par une diversité de polluants environnementaux. Sur les 110 composés testés, 58 se sont révélés être actifs incluant 17 nouveaux ligands non décrits jusqu'alors. Parmi les composés actifs un certains nombres sont décrits comme pouvant interagir avec d'autres cibles moléculaires (ER, AhR, AR, MR, GR et PR). C'est notamment le cas des pesticides, des surfactants/plastifiants/conservateurs et des stéroïdes. Dans un contexte de caractérisation de la contamination du milieu, le recouvrement de plusieurs activités peut permettre d'orienter les analyses chimiques. Concernant les composés pharmaceutiques, nos résultats confirment l'intérêt d'utiliser la lignée HG5LN-hPXR pour leur détection potentielle.

Au vu de ces premiers résultats, la lignée choisie permettait potentiellement la détection d'une multitude de composés actifs. Une limite réside toutefois dans le fait que beaucoup des ligands du hPXR ont une potentialité relativement faible car ils activent le récepteur à de fortes concentrations ($>\mu\text{M}$), généralement au dessus des concentrations environnementales observées pour ces composés. Il a donc été question, dans un deuxième temps, d'évaluer la capacité de cette lignée à détecter des ligands du hPXR dans les matrices environnementales.

	Composés	EC 50	TEF	Autre(s) cible(s) PE	
Pesticides (27)	Actifs (21)	Pretilachlore	1.3E-07	0.440	
		Metolachlor	4.2E-06	0.074	
		Oxadiazon	5.3E-07	0.053	
		Bupirimate	2.8E-06	0.046	
		pp'DDD	2.0E-06	0.041	ER, AR
		Fenvalerate	1.0E-06	0.038	ER, AR
		pp'DDE	6.1E-06	0.030	ER, AR
		pp'DDT	5.5E-06	0.029	ER, AR
		Cypermethryn	2.5E-06	0.029	ER
		Trans-nonachlor	3.6E-06	0.024	
		Lindane	5.5E-06	0.021	ER
		Chlordane	3.2E-06	0.020	ER
		o,p' DDT	4.0E-06	0.018	ER, AR
		Endosulfan	3.8E-06	0.015	ER, AR
		Terbutryn	1.8E-05	0.010	
		Prometryn	1.4E-05	0.010	
		Triclosan	1.4E-06	0.006	
Terbutylazine	3.3E-05	0.004			
Linuron	3.7E-05	0.003	AR		
Diuron	4.8E-05	0.002	AR		
Isoproturon	7.5E-05	0.002			
Non actifs (6)	TBT, chlorotoluron, metoxuron, chlorosulfuron, nicosulfuron, hexachlorobenzène				
Composés pharmaceutiques (39) (cosmétiques, médicaments, antibiotiques)	Actifs (19)	T0901317	5.2E-09	10.2	
		SR 128113	6.9E-08	1.0	
		Rifampicin	3.8E-07	0.162	
		Clotrimazole	4.7E-07	0.043	AhR
		Fénofibrate	1.2E-06	0.025	
		Mévastatin	2.4E-06	0.013	
		Médazepam	1.4E-06	0.009	
		Masoprocol	1.2E-05	0.007	AR
		Tamoxifen	1.3E-06	0.007	ER
		Propiconazole	1.4E-05	0.006	AhR
		Gemfibrozil	6.1E-05	0.003	
		Diazépam	6.2E-05	0.002	
		Clonazépam	1.1E-04	0.001	
		Carbamazépin	2.7E-04	0.001	
		Diclofénac	1.2E-04	0.001	
		Triazolam	3.8E-04	0.0004	
		Kétoprofène	3.5E-04	0.0004	
Bézafrate	2.0E-04	0.0003			
Erythromycin	4.3E-03	0.0001			
Non actifs (20)	Loprazolam, bromazepam, alprazolam, naproxen, ibuprofen, aspirin, caféine, flumazémil, pravastatin, sulfaméthoxazole, paracétamol, roxithromycin, clarythromycin, sotalol, staduvine, bisoprolol, aténolol, théophyllin, propranolol, benzophénone 2				
PCB + HAP (14)	Actifs (5)	PCB 118	2.8E-05	0.007	
		PCB 153	1.5E-05	0.006	
		PCB 180	1.5E-05	0.006	
		PCB 138	1.5E-05	0.005	
		PCB 101	2.1E-05	0.003	
Non actifs (9)	PCB 28, PCB 52, PCB 77, PCB 126, PCB 169, benzo[k]fluoranthène, OH-benzo[a]pyrene, fluoranthène, naphthalène				
Surfactant, plastifiant et conservateurs (12)	Actifs (7)	4tOP	1.4E-06	0.061	ER
		mNP	4.2E-06	0.031	ER
		DIOP	2.8E-06	0.025	
		TPP	1.4E-06	0.019	ER
		BPA	2.7E-05	0.006	ER, anti-AR
		NP1EO NP1EC			ER, anti-AR
Non actifs (5)	n-butyl parabens, n-benzyl paraben, n-pentyl paraben, BHT, 4NP				
Stéroïdes naturels et de synthèse (18)	Actifs (6)	Spirolactone	1.4E-05	0.006	PR, GR, MR,
		E1	3.2E-05	0.004	ER
		17BE2	4.3E-05	0.003	ER
		EE2	3.0E-06	0.003	ER
		Norgestimate	2.4E-05	0.003	ER, PR, MR
		Pregnenolone	3.5E-05	0.002	ER, MR
Non actifs (12)	Mestranol, prednisone, 6- α -methylprednisone, cortisone, OH-Cortisone, testostérone, progesterone, lévonorgestrel, DHEA, prednisolone, prednisone, DHT,				

Tableau 28. Résumé du screening de polluants environnementaux sur la lignée HG5LN-hPXR (en gras : nouveaux ligands)

1.1.2 Détection d'activateurs du hPXR dans les matrices environnementales

Pour évaluer la capacité de la lignée HG5LN-hPXR à détecter des ligands du hPXR dans les milieux aquatiques, un premier criblage de différents types d'échantillons déjà collectés au laboratoire a été réalisé. Il s'agissait d'une part d'extraits d'eau de surface (3 fractions POCIS) et d'effluents industriels et municipaux et d'autre part d'extraits de sédiment issus de sites impactés et de sites de référence. Ces investigations ont fait l'objet des **articles 1** et **2**, respectivement. En parallèle de l'activité PXR, les activités œstrogénique, (anti)-androgénique et *dioxin-like* ont été caractérisées.

Article 1 : Creusot *et al.* (2010) publié dans *Analytical Bioanalytical Chemistry*
Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples

Article 2 : Kinani *et al.* (2010) publié dans *Environmental pollution*
Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers

Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples

Nicolas Creusot · Saïd Kinani · Patrick Balaguer · Nathalie Tapie · Karyn LeMenach · Emmanuelle Maillot-Maréchal · Jean-Marc Porcher · Hélène Budzinski · Sélim Aït-Aïssa

Received: 31 July 2009 / Revised: 29 October 2009 / Accepted: 11 November 2009 / Published online: 29 November 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Many environmental endocrine-disrupting compounds act as ligands for nuclear receptors. Among these receptors, the human pregnane X receptor (hPXR) is well described as a xenobiotic sensor to various classes of chemicals, including pharmaceuticals, pesticides, and steroids. To assess the potential use of PXR as a sensor for aquatic emerging pollutants, we employed an *in vitro* reporter gene assay (HG5LN-hPXR cells) to screen a panel of environmental chemicals and to assess PXR-active chemicals in (waste) water samples. Of the 57 compounds tested, 37 were active in the bioassay and 10 were identified as new PXR agonists: triazin pesticides (promethryn, terbuthryn, terbuthylazine), pharmaceuticals (fenofibrate, bezafibrate, clonazepam, medazepam) and non co-planar polychlorobiphenyls (PCBs; PCB101, 138, 180). Furthermore, we detected potent PXR activity in two types of water samples: passive polar organic compounds integrative sampler (POCIS) extracts from a river moderately impacted by agricultural and urban inputs and three effluents from sewage treatment works (STW). Fraction-

ation of POCIS samples showed the highest PXR activity in the less polar fraction, while in the effluents, PXR activity was mainly associated with the dissolved water phase. Chemical analyses quantified several PXR-active substances (i.e., alkylphenols, hormones, pharmaceuticals, pesticides, PCBs, bisphenol A) in POCIS fractions and effluent extracts. However, mass-balance calculations showed that the analyzed compounds explained only 0.03% and 1.4% of biological activity measured in POCIS and STW samples, respectively. In effluents, bisphenol A and 4-*tert*-octylphenol were identified as main contributors of instrumentally derived PXR activities. Finally, the PXR bioassay provided complementary information as compared to estrogenic, androgenic, and dioxin-like activity measured in these samples. This study shows the usefulness of HG5LN-hPXR cells to detect PXR-active compounds in water samples, and further investigation will be necessary to identify the detected active compounds.

Keywords Reporter bioassays · Endocrine disrupters · Passive sampling · Wastewater

N. Creusot · S. Kinani · E. Maillot-Maréchal · J.-M. Porcher · S. Aït-Aïssa (✉)
INERIS, Unité Écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*,
Parc ALATA, BP2,
F-60550 Verneuil-en-Halatte, France
e-mail: selim.ait-aissa@ineris.fr

P. Balaguer
INSERM U896, IRCM-UM1-CRLC Val d'Aurelle,
34298 Montpellier, France

N. Tapie · K. LeMenach · H. Budzinski
ISM/LPTC-UMR 5255 CNRS Université Bordeaux I,
33405 Talence, France

Introduction

Anthropogenic activities lead to a continuous contamination of aquatic environment by a wide variety of chemicals. Among them, the so-called endocrine-disrupting compounds (EDCs) can mimic or alter the action of endogenous hormones, through multiple mechanisms of action as they can interfere with the synthesis, transport, action, metabolism, and excretion of natural hormones, which control homeostasis, development, and reproduction functions [1]. Abnormalities linked to EDCs exposure has been several

times observed in aquatic environment, such as disrupted vitellogenin synthesis or development of ovo-testis in male fish [2]. In this context, characterization and identification of aquatic contamination by EDCs has become a major issue for the last decade. To tackle this challenge, the recent development of integrated bioanalytical approaches using *in vitro* bioassays combined to chemical analyses has proven powerful methodology to detect and identify bioactive compounds within complex environmental samples [3]. Particularly, *in vitro* reporter gene bioassays based on the mechanisms of action of chemicals (e.g., hormone receptor activation) serve as screening tools for sensitive and specific detection of hormone-like activities in complex samples.

To date, *in vitro* bioanalytical assessment of EDCs has mainly concerned estrogen receptor (ER) and androgen receptor (AR)-mediated activities [4–6]. However, these bioassays do not take into account the large diversity of EDCs since several emerging contaminants, such as some pharmaceutical compounds, are not ligands of these receptors. Apart from ER and AR, other key nuclear receptors (NRs) such as pregnane X receptor (PXR) [7], peroxisome proliferator-activated receptor [8] or glucocorticoid receptor (GR) [9], are known to be directly activated by environmental contaminants, and thus can be potentially used as xenobiotic sensors for environmental bioanalytical purpose. Among them, the PXR, also called steroid and xenobiotic receptor (SXR) or pregnane-activated receptor, is of high interest for such purpose since it has been shown to be activated by a diversity of environmental ligands such as steroids, pharmaceuticals, pesticides, alkylphenols, PCBs, and polybromodiethylethers [10–17].

The PXR is an orphan NR because no endogenous ligand with high affinity has been identified so far [18]. As a nuclear receptor, PXR acts as a transcription factor. After ligand binding, it functions as a heterodimer with the retinoid X receptor (RXR), in a non-permissive way [19]. It is mainly expressed in the liver and the intestine, the main organs involved on the metabolism of endogenous and exogenous compounds, where it plays a crucial role in the regulation of genes involved in xenobiotic detoxification. PXR controls the transcription of phase I cytochrome P450 (CYP) genes (e.g., CYP3A4, -2B6, -2C8, -2C9, and -2C19), phase II conjugating enzymes (e.g., UDP-glucuronosyltransferases and glutathione-S-transferase), as well as phase III transporter genes (e.g., MDR-1 and MRP-2 multidrug resistance proteins) [20]. In addition, PXR is also activated by endogenous ligands, notably biliary acids, pregnanes, and hormones and thereby regulates the transcription of CYP7A and *oatp2* transporter involved in cholesterol homeostasis and tissue protection from potent toxic endogenous compounds [21]. Overall, the essential biological role in both xenobiotic and endogenous metabolism regulation together with its ability to directly interact

with various environmental chemicals make the PXR a toxicologically and environmentally relevant target for EDCs.

The aim of this study was to explore the potential use of a recently described human PXR (hPXR) reporter gene bioassay [12] for the detection of EDCs in the aquatic environment. This *in vitro* bioassay is based on cultured HeLa cells that permanently express the luciferase reporter gene under the control of a chimeric hPXR (HG5LN-hPXR cells), and has been shown to sensitively respond to several pesticides [12], as well as antiestrogens, mycoestrogens, and phthalates [14]. In the present study, in order to characterize the activity of a broader range of environmental contaminants, more than 60 environmentally occurring chemicals including pharmaceuticals, pesticides, plasticizers, and persistent organic pollutants (POPs) were tested in this *in vitro* system. In addition, the detection of hPXR ligands in different effluent samples and polar organic compound integrative samplers (POCIS) extracts from freshwater sites has been investigated. The detected biological responses were compared to targeted chemical analyses by using mass-balance calculation in order to identify candidate hPXR ligands in active samples.

Materials and methods

Chemicals and reagents

All standard chemicals listed in Tables 1, 2, and 3 were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France), except PCB congeners that were from LGC standards (Molsheim, France). Luciferin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrasodium bromide tetrazolium (MTT), methanol, and dimethylsulfoxide (DMSO) were also purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

In vitro bioassays

Cell culture

The HG5LN-hPXR cell line results from a two-step stable transfection [12]. As a first step, HeLa cells were stably transfected with a GAL4RE5-BGlob-Luc-SVNeo plasmid, leading to the HG5LN cell line which expresses constitutively luciferase activity. Then, HG5LN cells were stably transfected, with the pSG5-GAL4(DBD)-hPXR(LBD)-puro plasmid to obtain the HG5LN-hPXR cell line. The HG5LN cell line was used to assess toxic or unspecific effects on luciferase in the bioassay, hence providing information on the specificity of hPXR activation in HG5LN-hPXR cells.

Both cell lines were routinely cultured in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C in Dulbecco's Modified

Table 1 Summary of hPXR activation by pesticides in HG5LN-hPXR cells

	Compound	EC ₅₀ (mol/l)	Maximal luciferase induction ^a	Concentration at max. induction (μM)
Active compounds	Oxadiazon ^b	5.31 E-07	68±2	3
	Pretilachlore ^b	1.32 E-07	94±8	3
	<i>o,p'</i> -DDT ^b	3.96 E-06	143±19	10
	Linuron ^b	3.68 E-05	32±3	10
	Lindane	5.45 E-06	71±4	10
	Endosulfan	3.84 E-06	73±3	10
	Triclosan	8.0 E-06	32±2	3
	Prometryn	1.44 E-05	51±2	10
	Terbutryn	1.78 E-05	48±2	10
	Terbutylazine	3.34 E-05	32±1	10
No active compounds	Tributyltin, chlorotoluron, metoxuron, chlorosulfuron, nicosulfuron, and hexachlorobenzene			

^a Maximal luciferase induction is expressed as a percentage of maximal luciferase activity induced by SR12813 at 3 μM (mean value of triplicates±SD)

^b Compounds already tested by Lemaire et al. [12, 13]

Eagle's Medium (DMEM) containing phenol red (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) and supplemented with 5% fetal calf serum (FCS), 1% nonessential amino acids, penicillin/streptomycin (50 U/mL each) and 1 mg/mL G418 (all purchased from Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Additionally, 0.5 μg/mL puromycin was added in HG5LN-hPXR cell medium.

Luciferase assay

The cells were seeded in 96-well white opaque culture plates (Greiner cellStar ; D. Dutscher, Brumath, France) at a density of 1×10^5 cells per well in 100 μl of DMEM without phenol red, supplemented with 6% dextran-coated charcoal-treated fetal calf serum (DCC-FCS). After 24 h, a

Table 2 Summary of hPXR activation by pharmaceuticals in HG5LN-hPXR cells

	Compounds	EC ₅₀ (mol/l)	Maximal luciferase induction ^a	Concentration at max. induction (μM)
Active compounds	Rifampicin ^b	3.80 E-07	87±6	3
	Clotrimazole ^b	4.71 E-07	54±2	3
	T0901317 ^b	5.24 E-09	83±2	0.1
	EE2 ^b	3.01 E-06	37±2	10
	SR 12813 ^b	6.90 E-08	100±5	3
	Fenofibrate	1.21 E-06	61±8	3
	Tamoxifen	1.26 E-06	39±6	10
	Mevastatin	2.39 E-06	80±1	30
	Medazepam	4.22 E-06	50±4	10
	Diazepam	8.15 E-05	39±3	30
	Clonazepam	1.11 E-04	27±1	10
	Diclofenac	1.23 E-04	48±1	100
	Bezafibrate	2.02 E-04	39±4	100
	Carbamazepine	2.72 E-04	40±1	100
	Ketoprofene	3.49 E-04	30±3	100
	Triazolam	3.77 E-04	36±1	30
Inactive compounds	Loprazolam, bromazepam, alprazolam, naproxen, ibuprofen, aspirin, caffen, flumazemil, pravastatin, and sulfamethoxazole			

^a Maximal luciferase induction is expressed as a percentage of maximal luciferase activity induced by SR12813 at 3 μM (mean value of triplicates±SD)

^b Compounds already tested by Lemaire et al. [12, 13] and/or Mnif et al. [14]

Table 3 Summary of hPXR activation by POPs, plasticizers and other compounds tested on HG5LN-hPXR cells

	Compound	EC ₅₀ (mol/l)	Maximal luciferase induction ^a	Concentration at max. induction (μM)
Active compounds	PCB 180	1.50 E-05	82±6	30
	PCB 138	1.51 E-05	112±4	30
	PCB 153	1.53 E-05	85±11	30
	PCB 101	2.06 E-05	74±5	30
	PCB 118	2.83 E-05	38±2	30
	BPA ^b	2.71 E-05	37±2	10
	TPP	1.36 E-06	62±2	10
Inactive compounds	PCB 28, 52, 77, 126, 169, benzo[k]fluoranthene, 3OH-benzo[a]pyrene, fluoranthene, naphthalene and TCDD BHT, DHT, <i>n</i> -butyl paraben, <i>n</i> -benzyl paraben, <i>n</i> -pentyl paraben			

^a Maximal luciferase induction is expressed as a percentage of maximal luciferase activity induced by SR12813 at 3 μM (mean value of triplicates±SD)

^b Compound already tested by Mnif et al. [14]

range of concentration of compounds to be tested was added to the culture medium in triplicates and cells were then incubated for 16 h. For environmental samples, cells were exposed to serial dilution of extracts. At the end of exposure, the medium was removed and 50 μl per well of medium containing 0.3 mM luciferin were added. Five minutes later, necessary for luciferin to diffuse into the cell and to produce a stable luminescence signal, the intact living cells luminescence was measured in for 2 s per well with a microtiter plate luminometer (MicroBeta, PerkinElmer SAS, Courtaboeuf, France).

Cytotoxicity assay

In order to assess the effect of test compounds on cell viability in HG5LN-hPXR cells, the metabolism of MTT, was measured. After luciferase assay, culture medium containing the luciferin was removed and replaced by 100 μl of DCC-FCS with 0.5 mg/mL of MTT. Cells were incubated for 3 h. In metabolically active cells, MTT is reduced by the mitochondria onto a blue formazan precipitate, which was solubilized by adding 80 μl of isopropanol and agitation for 30 min. Plates were then read at 570 nm against a 640-nm reference wavelength on a microplate reader (KC-4, BioTek Instruments, France). Cell viability was expressed as a percentage of the control value. By using the MTT assay, no significant cytotoxic effects of chemicals were noted at the concentrations tested in luciferase assays.

Other in vitro bioassays

The estrogenic, (anti-)androgenic, and dioxin-like activities of the extracts were assessed by using three in vitro bioassays based on marker gene activation in the MELN, MDA-kb2, and PLHC-1 cell lines, respectively. The MELN

cells consist of the human MCF-7 cells that were stably transfected by the luciferase reporter gene controlled by endogenous estrogen receptor alpha (ERα) [22]. The MDA-kb2 cell line (ATCC, #CRL-2713) was derived from the MDA-MB-453 human breast cancer cells. They were stably transfected by a MMTV promoter-luciferase plasmid construct, which is under the control of endogenous androgen receptor (AR) and glucocorticoid receptor (GR) [23]. The fish hepatic PLHC-1 cell line (ATCC, #CRL-2406) was described by Ryan and Hightower [24]. Protocols for routine cell culture and environmental sample assessment have been reported in details previously [25]. Briefly, in the MELN and MDA-kb2 bioassays, cells were exposed for 16 h and processed for luciferase activity assay as described above. In the PLHC-1 bioassay, cells were exposed for 4 h (PAH-like activity) and 24 h (dioxin-like activity) and were then processed for 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity assessment in intact cells.

Environmental samples

Wastewater effluents

Three sewage water effluents, called A, B, and C, were sampled in the South West of France at three different stations: effluent A was a paper mill effluent; effluent B was sampled at the outlet of an urban wastewater treatment plant which serves a catchment of about 150,000 equivalent/inhabitant population equivalent, and ensured the treatment of mainly domestic sewage; effluent C was a mix of sewage effluents A and B.

Effluent extracts were prepared as summarized in Fig. 1. Briefly, a part of each effluent was filtered on GFF filters immediately after collection. Then, liquid/liquid extractions were performed on both the filtered fraction and the crude fraction of each effluent (A, B, and C). A volume of

250 mL of each fraction was extracted three times by shaking with 50 mL of dichloromethane. The total extract was dried with anhydrous sodium sulfate. It was concentrated with a rotary evaporator, and then under a gentle flow of nitrogen and transferred into 200 µL of methanol. Procedural blank using ultra-pure water was also prepared in the same conditions in order to test the potential influence of the extraction process on bioassay responses. Each extract was used for bioassay and chemical analyses.

POCIS extracts

POCIS samplers (version for sampling pharmaceuticals) were deployed in May 2007 in the Baïse River (South West of France) for 1 month. This site is under mixed anthropogenic pressures and is classified as good-quality water. POCIS were provided by Exposmeter (Tavelsjö, Sweden). They contain 200 mg of Oasis HLB sorbent enclosed between two polyethersulfone (PES) membranes. The membranes, which confine the sorbent, are compressed between two metal disks (5.1 cm ID, 8.9 cm OD). The total exchanging surface area of the membranes is 41 cm². The ratio surface area to mass of sorbent is about 200 cm²/g. After exposure, each POCIS was rinsed with ultra-pure water to remove any material present on the outer surface of the membranes (particles and biofilms). The metal disks were disassembled and the membranes were detached from the disk. The sorbent was carefully transferred into an empty glass SPE tube by rinsing it with ultrapure water and then dried by applying vacuum for 1 h. The organic compounds were eluted in three fractions: a first fraction (F1) of 10 ml of dichloromethane, a second fraction (F2) of

10 ml of a dichloromethane–methanol mixture (50:50 v/v), and a third one (F3) of 10 ml of methanol. After elution, extracts were evaporated to complete dryness and dissolved in 200 µl of methanol. Each of the three fractions was assessed by bioassays and chemical analyses.

Chemical analysis

Pharmaceuticals, alkylphenols, and a part of pesticides (phenylurea herbicides) were analyzed by LC/MS/MS. PAHs, hormones and remaining pesticides (triazines, organophosphate, and pyrethroid pesticides) were analyzed by GC/MS. PCBs and organochlorinated pesticides were analyzed by GC/ECD. The analytical procedures were adapted from Togola and Budzinski [26] for the pharmaceuticals, Labadie and Budzinski [27] for the hormones, Budzinski et al. [28] for the PAHs, Alder et al. [29] for the pesticides, Cailleaud et al [30] for the PCBs and Cailleaud et al. [31] for the alkylphenols. Hydrophilic compounds (pharmaceuticals, phenylureas, triazines, organophosphate, and pyrethroid pesticides) have been analyzed only on dissolved phase of effluent samples.

Data analysis

Bioassay data modeling

The Regtox 7.5 Microsoft Excel™ macro, freely available at <http://eric.vindimian.9online.fr>, and using the Hill equation [32], was used to model sigmoid dose–response curves and to calculate efficient concentrations (i.e., EC₂₀ and EC₅₀, corresponding to concentrations of chemical and samples that induced 20% and 50% of maximal luciferase activity, respectively). For compounds that provided incomplete dose–responses curves, i.e., that does not reached a plateau, the Hill parameter for maximal effect was fixed at 100% (maximal response given by the positive control SR12813) before modeling of the data.

Mass-balance calculations

Toxic equivalent activities derived from chemical analysis (Chem-TEQ) in environmental samples were calculated according to the following equation: $TEQ = \sum (C_i \times SREF_i)$, where, for a given chemical *i*, *C_i* is the measured concentration in a sample and *SREF_i* is the inducing equivalent factor relative to the reference ligand SR12813 ($IEF_i = EC_{20}$ of reference compound/ EC_{20} of test compound, on mass basis) and expressed as SR12813-equivalent quantities (SR-EQ). *SREF_i* were determined by establishing dose–response curves for individual standard chemicals according to the criteria proposed by Villeneuve et al [33] (i.e., parallel dose–

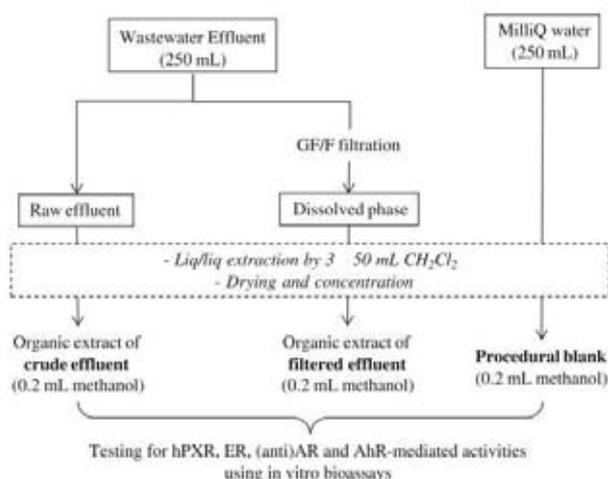


Fig. 1 Schematic presentation of the preparation of effluent extracts and in vitro testing using bioassays

response curves and equal efficacy). Thus, for all compounds, including those with incomplete dose–response curves, we fixed the minimal and maximal activity and the slope as identical to that of SR12813 before modeling of experimental data (data not shown). The biological toxic equivalent activities (Bio-TEQ) in environmental samples were calculated as the ratio of EC_{20} of reference compound (expressed as grams per liter) to that of the sample expressed as EQ-L water per liter (equivalent liter of water sample per liter). For the samples that yielded incomplete dose–response curves, we fixed the minimal and maximal activity and the slope as identical to that of SR12813 for experimental data modeling. Although fixed-effect level modeling often assumes an extrapolation of experimental data, it allows standardized treatment of all data and thus EC_{20} comparison between samples and reference compounds.

Statistics

Significant luciferase induction in treated cells as compared to solvent-treated cells was determined by one-way analysis of variance followed by a Dunnett's unilateral post hoc test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Activation of hPXR by reference and environmental chemicals

In order to validate the use of the hPXR bioassay in our experiments, four reference hPXR ligands were first tested (Fig. 2). They induced potent and complete dose–response curves with sensitivities that were very similar to those previously reported in the same cell model [12]. The specific hPXR-mediated activity by these ligands was confirmed by a lack of effect on luciferase expression in the parental HG5LN cell line that does not express hPXR (Fig. 2b). These cells were then further used to assess the activity of a panel of about 60 compounds that belong to different classes of contaminants. In each group of compounds, some chemicals, which PXR activity has been previously reported in this or other cell models, were also assessed in order to determine their hPXR potency in our test conditions.

Activation of hPXR by pesticides

Sixteen pesticides from different classes (organochlorine, triazin, and urea) were screened (Table 1). Oxadiazon, pretilachlore, *o,p'*-DDT, and linuron activated the luciferase with the same induction pattern (i.e., in terms of affinity,

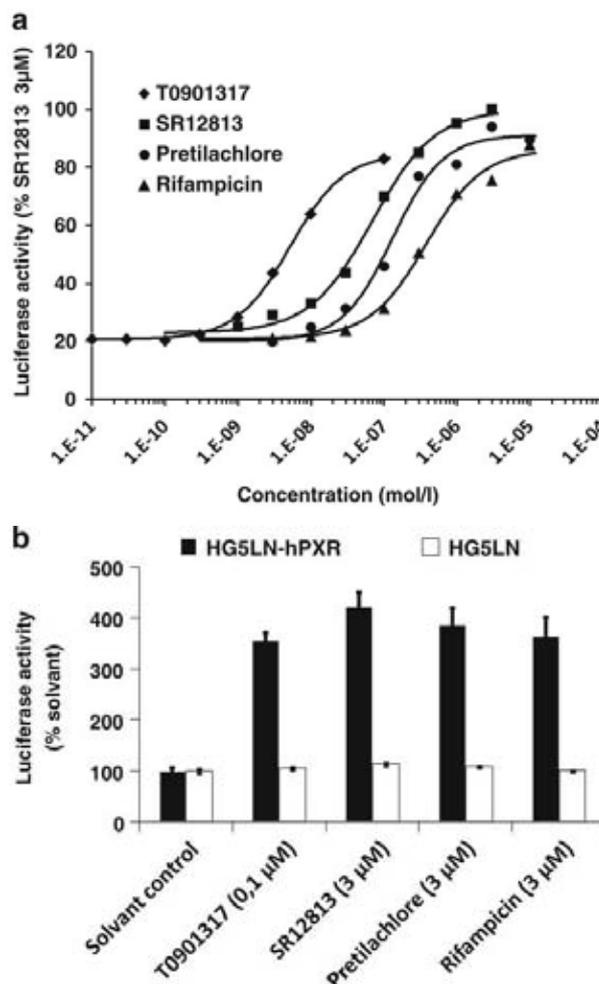


Fig. 2 **a** Dose–response curves of reference compounds in HG5LN-hPXR cells. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induced by SR12813 at 3 μM. **b** Specificity test for luciferase induction in HG5LN cells. Results are expressed as percentage of luciferase activity measured in DMSO-treated cells (solvent control). Values are means of triplicates \pm SD and are representative of at least three independent experiments

maximal activity, and specificity) as previously reported by Lemaire et al. [12] by using the same cell line (Fig. 3 and Table 1). The organochlorine lindane and endosulfan were strong hPXR activators in HG5LN-hPXR cells, while triclosan, terbutylazine, terbuthryn, and promethryn were found as weak to moderate hPXR activators (Fig. 3a). Moreover, terbutylazine, terbuthryn, and promethryn, could be considered as specific hPXR activators since they did not alter luciferase expression in HG5LN cells, whereas triclosan was slightly toxic in this cell line as indicated by a decrease of luciferase (Fig. 3b). Finally TBT, chlorotoluron, metoxuron, chlorosulfuron, nicosulfuron, and hexachlorobenzene were found as inactive compounds (Table 1).

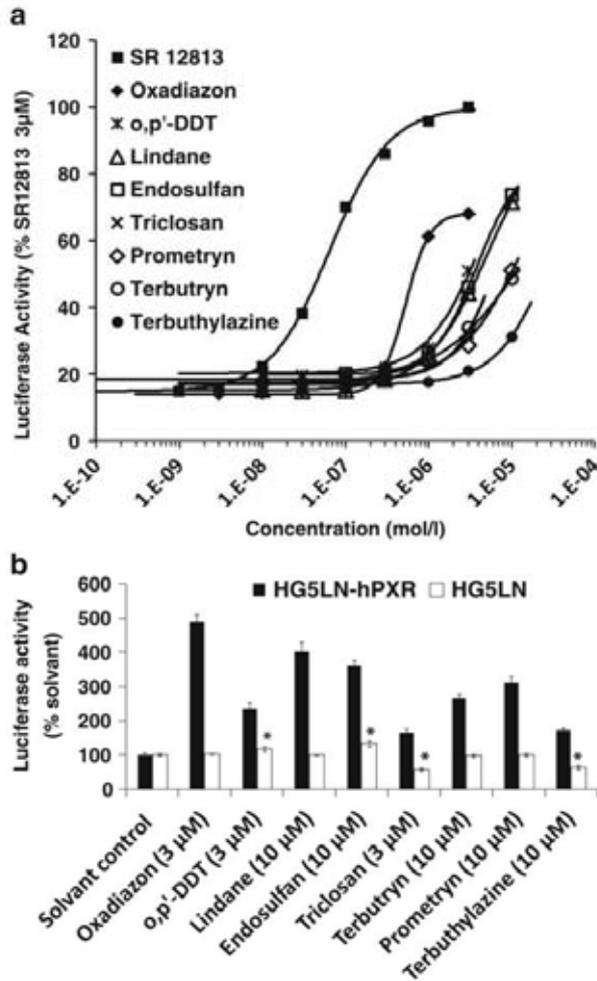


Fig. 3 **a** Dose–response curves of several pesticides in HG5LN-hPXR cells. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induced by SR12813 at 3 µM. **b** Specificity test of luciferase induction by pesticides in HG5LN cells. Results are expressed as percentage activity measured in the presence of DMSO (solvent control). *Significantly different from solvent control in HG5LN cells ($p < 0.05$). In HG5LN-hPXR cells, all values are significantly different from control ($p < 0.05$). Values are means of triplicates \pm SD and are representative of at least three independent experiments

Activation of hPXR by pharmaceuticals

Studies on in vitro hPXR transactivation by environmental pharmaceuticals are scarce. Here, we have tested hPXR activation by 21 compounds that were selected among those commonly found in surface waters (Table 2). Ten out of 21 environmental pharmaceuticals were specific hPXR activators in HG5LN-hPXR cells (Fig. 4a, Table 2), with induction patterns varying according to effective concentration and maximal levels of luciferase induction. Mevastatin and fenofibrate were the most potent hPXR activators as they induced more than 60% of luciferase activity at 10

and 3 µM, respectively. Diclofenac, tamoxifen, medazepam, carbamazepine, triazolam, diazepam, clonazepam, and bezafibrate were weak to moderate hPXR activators as they induced partial dose–response curves at relatively high concentrations (3 to 100 µM; Fig. 4a, Table 2). Ketoprofen also slightly induced luciferase at 100 µM; however, luciferase induction by this compound is likely to be non-specific of the hPXR as it similarly occurred in HG5LN cells (Fig. 4b). Finally, loprazolam, bromazepam, alprazolam, naproxen, ibuprofen, aspirin, caffenin, flumazemil, pravastatin, and sulfamethoxazole were found inactive in HG5LN-hPXR cells (Table 2).

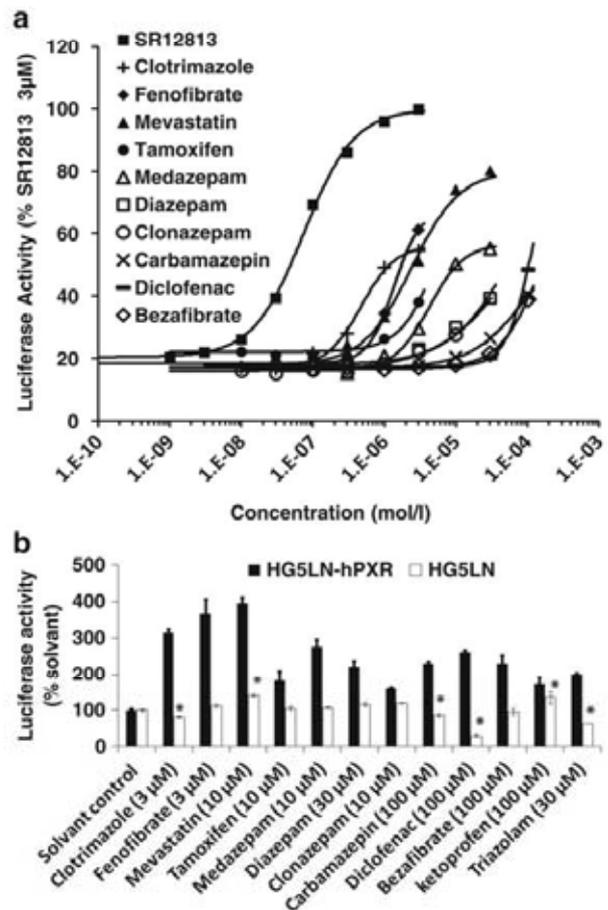


Fig. 4 **a** Dose–response curves of pharmaceuticals compounds in HG5LN-hPXR cells. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induced by SR12813 at 3 µM. **b** Specificity test of luciferase activity induction by pharmaceuticals in HG5LN cells. Results are expressed as percentage activity measured in the presence of DMSO (solvent control). *Significantly different from solvent control ($p < 0.05$). In HG5LN-hPXR cells, all values are significantly different from control ($p < 0.05$). Values are means of triplicates \pm SD and are representative of at least three independent experiments

Activation of hPXR by POPs

Because of the ubiquitous character of PCBs and PAHs as environmental contaminants, we looked at hPXR activation by ten dioxin- and non-dioxin-like PCBs and four toxic PAHs. Strong luciferase induction was observed with the non-dioxin-like PCBs congeners #101, 138, 153 and 180, albeit at relatively high concentrations ($EC_{50}s > 10 \mu M$; Fig. 5a, Table 3). In HG5LN cells, PCB101, PCB153, and PCB180 were also able to slightly increase luciferase (i.e.,

by twofold for PCB101), thus suggesting that a small part of their induction potency in HG5LN-hPXR was due to non-specific activation of luciferase at high concentrations (Fig. 5b). PCB118 was found to weakly increase luciferase in both HG5LN-hPXR and HG5LN cells and thus should not be considered as an hPXR activator (Fig. 5). Finally, the other PCBs #28, 77, 126, and 169 as well as the four PAHs tested, i.e., benzo[k]fluoranthene, fluoranthene, naphthalene, and 3OH-benzo[a]pyrene, were unable to activate the hPXR after a 24-h exposure at concentrations up to $1 \mu M$ (Table 3).

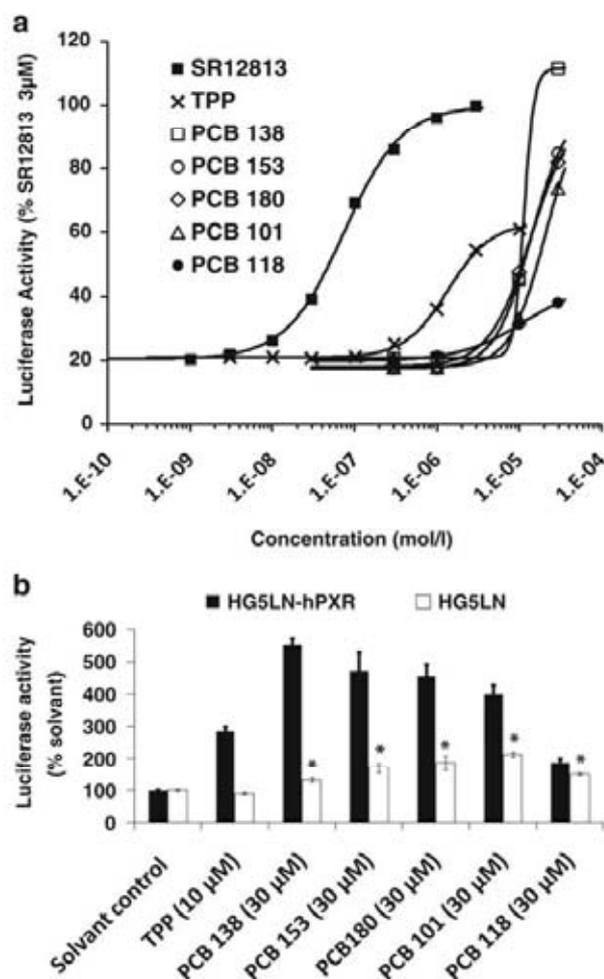


Fig. 5 a Dose–response curves of TPP and non co-planar PCBs in HG5LN-hPXR cells. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induced by SR12813 at $3 \mu M$. b Specificity test of luciferase activity induction by TPP and non co-planar PCBs in HG5LN cells. Results are expressed as percentage activity measured in the presence of DMSO (solvent control). *Significantly different from solvent control ($p < 0.05$). In HG5LN-hPXR cells, all values are significantly different from control ($p < 0.05$). Values are means of triplicates \pm SD and are representative of at least three independent experiments

Activation of hPXR by other compounds

Other emerging pollutants, including parabens, antioxidants, and plasticizers, were tested (Table 3). Among them, triphenyl phosphate (TPP), which is used as plasticizer and fire retardant, induced partially (Fig. 5a) but specifically (Fig. 5b) the hPXR. Conversely, no effect was noted with parabens and butylated hydroxytoluene.

Detection of hPXR activities in environmental samples

In order to assess the environmental occurrence of hPXR ligands in surface waters, the hPXR bioassay was applied to different water samples issued from a contaminated river (POCIS extracts) and three sewage water effluents.

Activation of hPXR by POCIS extracts

POCIS samplers were deployed for 1 month in the Baise River, which is under agricultural and urban pressure, and were then extracted and fractionated onto three fractions of increasing polarity (F1, F2, F3), as described in the “Materials and methods” section. Biological analysis showed that among the three fractions, F1 and F2 expressed a PXR activity (Fig. 6a), whereas protocol blanks were inactive (data not shown). F1 and F2 gave an incomplete dose–response curve with the highest activation for F1 ($61 \pm 4\%$) and a moderate activation for F2 ($38 \pm 1\%$; Fig. 6a). In HG5LN cells, no significant alteration of luciferase activity was noted (Fig. 6b). These results show that POCIS extracts contained specific hPXR ligands that were likely to be semi-polar rather than polar compounds (i.e., hormones).

Targeted chemical analyses of POCIS fractions showed the presence of PXR ligands such as several pharmaceuticals compounds, pesticides, alkylphenols, and hormones. Table 4 summarizes those chemicals that were identified as hPXR ligands among all chemicals analyzed; a detailed analytical evaluation of these samples has been reported elsewhere ([34] and Tapie et al., in prep). On the basis of SR12813-Equivalent Factors (SREF) for individual compounds determined in the present study, instrumentally derived SR12813-equivalents

(Chem-SR-EQ) were calculated and compared to SR-EQ determined by the bioassay (Bio-SR-EQ). The results (Table 4) showed that on an additive model basis, the targeted compounds weakly contributed (<0.1%) to Bio-SR-EQs in the samples and the detected PXR activities were likely due to other non-analyzed compounds.

Activation of hPXR by effluent extracts

All three effluent samples induced significant activation of luciferase activity in a dose-dependent (Fig. 7a) and -specific (Fig. 7b) manner. Procedural blanks were inactive in HG5LN-hPXR cells (data not shown). The paper mill

effluent (site A) was the most active site, followed by the mixed industrial/urban effluent (site C) and then by the urban effluent (site B). When comparing the response of crude effluent extract to that of filtered effluent extracts, no significant difference could be noted on hPXR activation, suggesting that the detected compounds were associated with the soluble phase of the samples. Only a toxic effect was noted for the crude extract of site A (sample A-c in Fig. 7), which led to a decrease of luciferase activity at higher sample concentrations (not illustrated).

Targeted chemical analyses of the samples showed the occurrence of several compounds that were hPXR ligands such as pharmaceuticals, hormones, pesticides, PCBs, bisphenol A (BPA), and 4-*tert*-octylphenol (4tOP; Table 5). Mass-balance calculation showed that the quantified chemicals explained only a few part of the biological activity determined by the bioassay (0.13–1.42%). Nevertheless, it was noted that BPA, which was among the most abundant contaminants, contributed to more than 95% of the total Chem-SR-EQs at sites A and C, and to 10% at site B. In this later site, an urban one, 4tOP contributed to more than 62% of the calculated Chem-SR-EQs. Pharmaceuticals, hormones, and pesticides (i.e., diuron and linuron) were also present at significant concentrations in the urban and mixed effluent (sites B and C), but they were identified as minor contributors to the Chem-SR-EQs. Moreover, effluent filtration had very low influence on Chem-SR-EQ determination, which confirmed the biological assessment and strengthened the hypothesis that the detected PXR ligands were mainly present in the dissolved phase. However, except for BPA and 4tOP, the compounds that mainly contributed to biological activities remain to be identified.

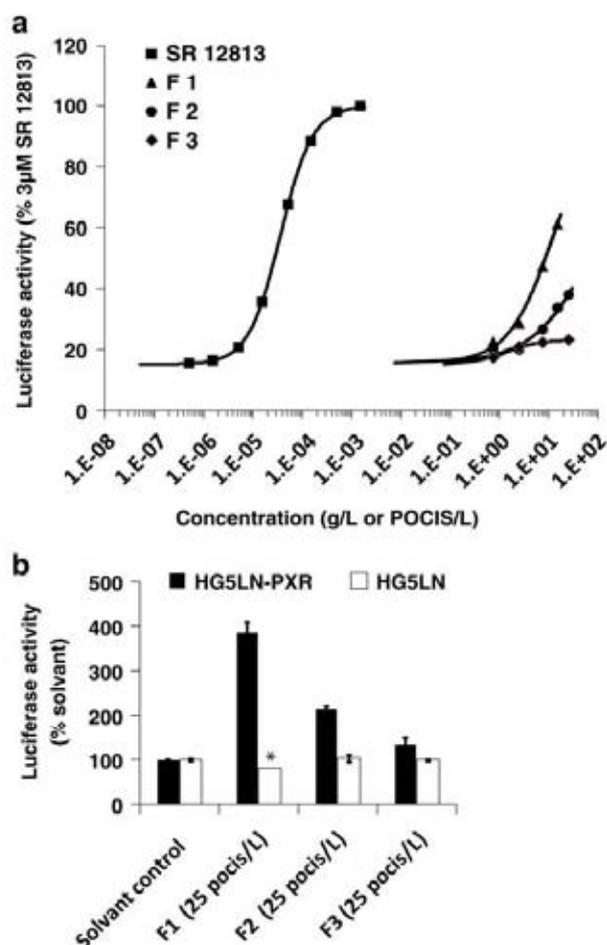


Fig. 6 **a** Dose-response of POCIS extracts in HG5LN-hPXR cells. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induced by SR12813 at 3 μ M. **b** Specificity test of luciferase activity induction by POCIS extracts in HG5LN cells. Results are expressed as percentage activity measured in the presence of DMSO (solvent control). *Significantly different from solvent control ($p < 0.05$). In HG5LN-hPXR cells, all values are significantly different from control ($p < 0.05$). Values are means of triplicates \pm SD and are representative of at least three independent experiments

Comparison with ER, AR, and AhR activities

To get further knowledge of the contamination of the samples by EDCs, we measured estrogenic, (anti-)androgenic, and AhR activities by using in vitro bioassays and compared them with hPXR activity (Table 6). In POCIS fractions, estrogenic and PAH-like activities were mainly detected in F1 and, to a lesser extent, in F2, yielding the same elution pattern as hPXR activities. No (anti-)androgenic or TCDD-like activity was detected in the three POCIS fractions. In effluent samples, ER and PAH-like activities were detected in all samples while a significant AR activity was also present at site C (Table 6). Effluent filtration had either no influence at site A or enhanced ER and AR activity at sites B and C, thus showing that the detected active substances were in the soluble phase. Conversely, PAH-like activities were higher in crude than in filtered samples suggesting that the detected chemicals were mainly associated with the particulate fraction. Unlike POCIS fractions, profiles of ER activities in effluent samples

Table 4 Chemical analyses and SR12813-EQ determination in POCIS

Detected compounds	SREF ^a	Concentration (ng/POCIS)			
		F1	F2	F3	
Pharmaceuticals	Carbamazepine	6.0E-04	1.6	0.1	n.d.
	Diclofenac	5.4E-04	0.5	3.7	n.d.
Pesticides	Terbutylazine	4.1E-03	2	n.d. ^b	n.d.
	Promethryn	1.0E-02	2	n.d.	n.d.
	Terbutryn	1.0E-02	1	n.d.	n.d.
	Lindane	2.7E-02	2	n.d.	n.d.
	Isoproturon	1.9E-02	6	n.d.	n.d.
	Linuron	3.1E-03	12	n.d.	n.d.
	Diuron	1.9E-03	23	n.d.	n.d.
Alkylphenols	<i>o,p'</i> -DDT	1.7E-02	1	n.d.	n.d.
	4tOP	5.8E-02	10	<1	<1
	4NP	3.0E-02	20	<3	<3
	BPA	5.8E-03	6	<1	<1
Hormones	E2	3.0E-03	n.d.	n.d.	2
	Σ Chem-SR-EQ ^c	(μg/POCIS)	1.5E-03	1.4E-04	1.1E-04
Bio-SR-EQ ^d	(μg/POCIS)	3.59	1.01	n.d.	
Chem-SR-EQ / Bio-SR-EQ	(%)	0.037	0.013	–	

^a SREF SR12813 equivalence factor relative to SR12813, determined as described in the "Materials and methods" section

^b n.d. not detected

^c Chem-SR-EQs: chemical SR12813 equivalents based on chemical analyses

^d Bio-SR-EQs: biological SR12813 equivalents based on EC₂₀ effective sample concentration in the HG5LN-hPXR bioassay

differed from patterns of PXR responses, i.e., in a decreasing order, for estrogenic activity: site C > site B > site A, whereas for PXR activity: site A > site C >> site B. These results suggest that different chemicals were detected by the two bioassays, and stress the view that PXR activity provided additional information about chemical contamination.

Discussion

By using a recently developed stable reporter gene bioassay, we report (1) the characterization of the hPXR transactivation potency of a large panel of environmental chemicals, including emerging pollutants that were not tested before, and (2) the occurrence of hPXR ligands in effluents and surface water samples.

hPXR is activated by various chemicals occurring in aquatic environment

Of the 53 substances tested on HG5LN-hPXR cells, 37 were found active and ten were identified as new hPXR agonists. These include three triazin pesticides (prometryn, terbutryn, terbutylazine), four pharmaceuticals (fenofibrate, bezafibrate, clonazepam, medazepam) and three PCB congeners (PCB 101, 138, and 180).

Pesticides and human pharmaceuticals were selected as relevant emerging contaminants that are increasingly detected in surface waters. Several pesticides have been described as potent PXR activators, among which organo-

chlorinated pesticides, chloroacetanilides, pyrimidines, and azole fungicides were the most active ones [12, 35]. In complement to these previous studies, we report here three triazin pesticides as hPXR modulators in HG5LN-hPXR cells. These triazin pesticides are widespread aquatic contaminants and among the most frequently detected pesticides in surface waters [36, 37]. Accordingly, they were also detected in POCIS extracts from the Baïse River in the present study (Table 4).

A number of human pharmaceutical drugs have been described as CYP3A inducers through their capacity to bind and activate PXR [15]. Ten out of 21 compounds tested were found to partially but specifically activate hPXR in HG5LN-hPXR cells. Some of them such as tamoxifen [10], mevastatin [38], and carbamazepine [17] have previously been described as PXR ligands. Our data confirmed their activity and depicted their potency in our bioassay. Moreover, to our knowledge, the cholesterol-lowering drugs fenofibrate and bezafibrate and the benzodiazepines medazepam and clonazepam were here newly described as hPXR ligands. For fibrates, Prueksaritanont et al. [39] reported a lack of hPXR transactivation by fenofibric acid, the metabolite of fenofibrate, in HepG2 cells transfected with a Gal-PXR/luciferase system. To some extent, this partly contrasts with our results with fenofibrate, the parent compound, however, which activated the hPXR at micromolar concentrations. Finally, diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug usually found in the aquatic environment [40], was also active on hPXR, in agreement with a recent report [15]. Besides, it is noted that 11 of the

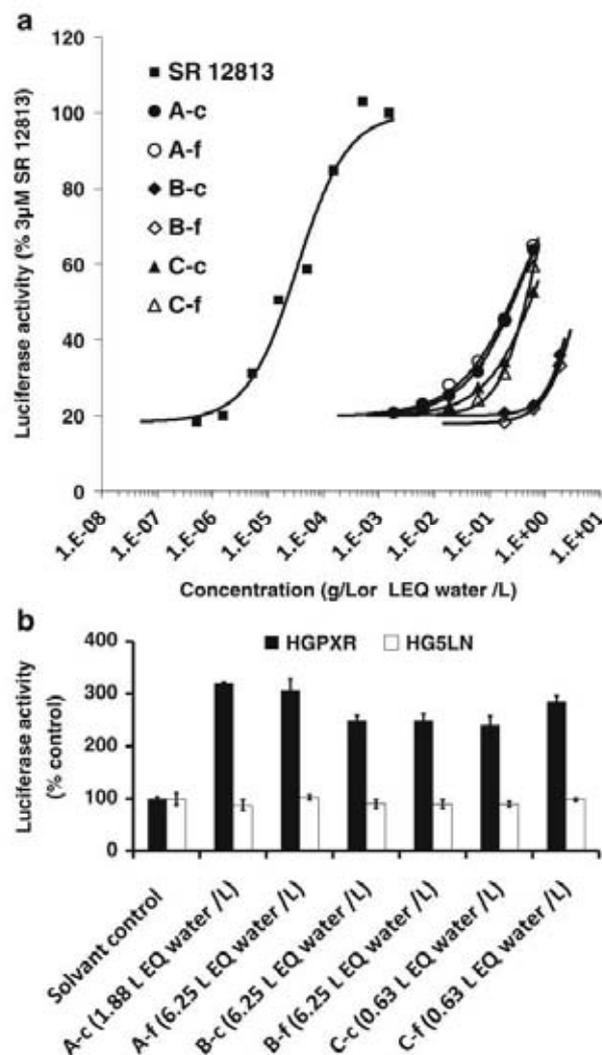


Fig. 7 a Dose–response curves by organic extracts of crude (-c) or filtered (-f) effluents A, B, and C in HG5LN-hPXR cells. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induced by SR12813 at 3 µM. b Specificity test of luciferase activity induction by effluents extracts in HG5LN cells. Results are expressed as percentage activity measured in the presence of DMSO (solvent control). Values are means of triplicates±SD and are representative of at least three independent experiments

tested drugs, including environmentally recurrent ones (e.g., caffeine), were not active in the assay, hence showing some limitation of the bioassay as a biodetector for pharmaceuticals. Overall, our data on hPXR activation by various classes of pesticides and environmental pharmaceuticals confirm its potential use as a sensor for certain emerging aquatic contaminants.

Previous studies pointed out the ability of nonplanar PCBs to bind and activate or inhibit PXR from different species [11, 16, 41]. Accordingly, we observed that

nonplanar PCBs but not co-planar PCBs were hPXR ligands, although some discrepancies with previous studies were noted. By using a transient Gal-hPXR reporter gene assay, Tabb et al. [16] described several highly chlorinated PCBs as very weak hPXR agonists and as potent hPXR antagonists, especially for congeners #153, 145, 184, and 197. In contrast, we found that nonplanar PCBs with more than five chlorine substituents (PCBs #101, 138, 153, and 180) were potent hPXR activators (Fig. 5), but they were unable to antagonize hPXR in HG5LN-hPXR cells after co-exposure with 0.1 µM SR12813 (data not shown). Our results are however in agreement with other published studies reporting the agonistic effect of nonplanar PCBs on mouse (i.e., for PCB #47, 184, 188, 196, 200 [41]) and human PXR (i.e., for PCB #118, 153 [11]) in transient hPXR transactivation assays. For PCB118, however, we strongly suspected unspecific luciferase activation in both HG5LN-hPXR and HG5LN cells; hence, we ranked this compound as a negative compound. Altogether, the ability of non co-planar PCBs to interfere with hPXR, here reinforced by our new results with PCB101, 138, and 180, stresses the view that such a PXR bioassay could serve as a biodetector for non-dioxin-like PCBs in environmental bioanalysis.

Among the other emerging EDCs tested, we notably report TPP as a relatively potent active chemical on HG5LN-hPXR cells, in accord with a previously published work [42]. TPP belongs to high-production-volume organophosphate esters (OPEs) widely used as flame retardant and plasticizers in several applications. OPEs are widespread water, air, sediment, and soil contaminants [43]. Recently, TPP was shown to bioaccumulate in aquatic organisms such as mollusks (mussels, oysters, clams) at concentration up to 378 ng/g dry wt. [44] and environmental risk assessment for this substance is of current concern [45].

Overall, the chemical screening carried out in the present study complemented previous studies performed with HG5LN-hPXR cells [12, 14] in that it further characterized and extended to various structurally different contaminants the range of chemicals to be detected by this bioassay. In a bioanalytical perspective, establishment of dose–response curves for each individual compound allowed determining their relative potency as SREF essential for mass-balance calculation in the bioanalysis of environmental samples. This has been investigated in the second part of the study.

HG5LN-hPXR cell line as a biosensor for the detection of emerging compounds in environmental matrices?

To our knowledge, this is one of the first reports of the biological detection of PXR-activating substances in surface water (POCIS) and effluent samples. Although we did

Table 5 Chemical analyses and SR12813-EQ determination in effluents

Detected compounds	SREF ^a	Concentration (ng/L)						
		Site A		Site B		Site C		
		Crude	Filtered	Crude	Filtered	Crude	Filtered	
<i>Pharmaceuticals</i>	Carbamazepine	6.8E-04	– ^b	6	– ^b	559	– ^b	248
	Diazepam	1.9E-03	– ^b	n.d. ^c	– ^b	11	– ^b	n.d.
	Ketoprofen	4.0E-04	– ^b	n.d.	– ^b	950	– ^b	303
<i>Hormones</i>	Diclofenac	5.4E-04	– ^b	27	– ^b	310	– ^b	245
	E1	4.1E-03	– ^b	83	– ^b	8	– ^b	58
	EE2	4.8E-03	– ^b	n.d.	– ^b	10	– ^b	n.d.
<i>Pesticides</i>	Diuron	1.9E-03	– ^b	70	– ^b	430	– ^b	349
	Linuron	3.1E-03	– ^b	5	– ^b	294	– ^b	126
	Isoproturon	1.8E-03	– ^b	12	– ^b	0.4	– ^b	9
	Lindane	2.2E-02	4.5	4	7.3	7	20.5	19
	<i>o,p'</i> -DDT	1.8E-02	0.3	n.d.	0.3	0.1	0.3	n.d.
<i>PCBs</i>	PCB 101	3.4E-03	10.8	5.3	3.3	2.3	16	9
	PCB 138	5.3E-03	3.2	n.d.	0.7	n.d.	7.5	4
	PCB 153	6.0E-03	14	10.2	3.1	2.4	19.4	15
	PCB 180	6.1E-03	0.8	n.d.	0.1	n.d.	0.7	n.d.
<i>Alkylphenols</i>	BPA	5.8E-03	6474	5100	232	230	13809	13600
	4tOP	6.1E-02	n.d.	n.d.	124	124	9	n.d.
Σ Chem-SR-EQ ^d	(µg/L)		0.038	0.030	0.009	0.012	0.081	0.081
Bio-SR-EQ ^e	(µg/L)		23.0	22.8	0.76	0.85	9.45	10.7
Chem-SR-EQ / Bio-SR-EQ	(%)		0.16	0.13	1.20	1.39	0.86	0.76

^a SREF: SR12813 equivalence factor relative to SR 12813, determined as described in the “Materials and methods” section.

^b Only analyzed in dissolved phase due to hydrophilic properties

^c n.d. not detected or below quantification limits

^d Chem-SR-EQs: chemical SR12813 equivalents

^e Bio-SR-EQs: biological SR12813 equivalents based on EC₂₀ effective sample concentration in the HG5LN-hPXR bioassay.

not identify the nature of major chemicals responsible for the detected activities, mid-polar compounds in the dissolved water phase from both river and effluent samples could be suspected. In addition, the comparison of PXR activity with other receptor-mediated activities suggested that the PXR bioassay provided different information on chemical contamination, likely related to different detected compounds, and was thus complementary to the other assays within such a multi-test battery (Table 6).

By using the same in vitro model as in the present study, very recent studies reported the detection of PXR activities in wastewaters [46, 47] and river sediments from contaminated areas [48]. In these studies, instrumental analyses of target chemicals, including alkylphenols, steroid estrogens, or organochlorinated pesticides, did not permit to identify the active chemicals responsible for the PXR activity. Moreover, recent studies reported induction of Cyp3A expression by municipal effluents in cultured trout hepato-

cytes in vitro [49] or in zebrafish liver in vivo [50]. In the study of Lister et al., PXR mRNA expression in zebrafish was not affected after effluent exposure. In any case, the substances responsible for biological activities were not identified.

Altogether, these results clearly show that chemical agents that can affect the PXR signaling pathway are present in the aquatic environment. Due to the important role of PXR in endocrine and xenobiotic metabolism regulation, identification of these agents is an important issue to be addressed. For such purpose, application of mass-balance analysis (MBA) based on targeted chemical analyses coupled to in vitro bioassays has proven useful as a first-characterization step of the chemicals responsible for biological effects, provided that significant information background on environmental levels of bioactive substance is available. For instance, by targeting steroid estrogens or PAHs, MBA approach has often succeeded in characterizing,

Table 6 Estrogenic, (anti-)androgenic, PAH- and dioxin-like activities in POCIS and effluents

		Measured activities				
		Estrogenic E2-EQ	Androgenic DHT-EQ	Anti-androgenic FLU-EQ	PAH-like BaP-EQ	Dioxin-like TCDD-EQ
POCIS						
Procedural blank		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
F1		0.44 ng/POCIS	n.d.	n.d.	47.5 ng/POCIS	n.d.
F2		0.06 ng/POCIS	n.d.	n.d.	15.8 ng/POCIS	n.d.
F3		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
LD		0.02 ng/POCIS	0.2 ng/POCIS	0.5 ng/POCIS	1.1 ng/POCIS	0.6 ng/POCIS
Effluents						
Procedural blank		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
A	crude	2.2 ng/L	n.d.	n.d.	0.320 ng/L	n.d.
	filtered	2.0 ng/L	n.d.	n.d.	0.107 ng/L	n.d.
B	crude	1.9 ng/L	n.d.	n.d.	0.453 ng/L	n.d.
	filtered	3.2 ng/L	n.d.	n.d.	0.231 ng/L	n.d.
C	crude	5.8 ng/L	8.1 ng/L	n.d.	0.608 ng/L	n.d.
	filtered	8.2 ng/L	14.1 ng/L	n.d.	0.245 ng/L	n.d.
LD		0.09 ng/L	0.98 ng/L	0.45 ng/L	0.004 ng/L	2.7 ng/L

LD limit of detection

at least partly, the chemicals responsible for “classical” activities such as ER or AhR activity, respectively [48, 51, 52]. For PXR activity however, such an a priori-based investigation failed in identifying the main substances responsible for PXR activities in our study. Only BPA and 4tOP were shown to weakly contribute to overall PXR activity in wastewater effluent samples, while the other analyzed substances known to activate hPXR, including pharmaceuticals, planar PCBs, or pesticides, were present at too low concentrations to significantly account for the measured biological activities.

Several hypotheses can be advanced to explain the lack of concordance between biological and chemical analyses. The most probable cause is that we did not target the “good” chemicals by the chemical analyses. As a matter of fact, PXR can be activated by a wide diversity of known (and likely unknown) environmental compounds [53], and it is technically impossible to perform exhaustive analyses. For instance, it is noted that some strong PXR activators like mevastatin, clotrimazole, pretilachlor, or oxadiazon could not be measured in our samples. Moreover, the serious lack of data on the environmental occurrence of PXR-active substances makes difficult an a priori-based investigation, as stated above. On the other hand, the mass-balance approach we used assumes a concentration-additive model, based on parallel dose–response curves and equal efficacy of chemical agonists [33]. It is noteworthy that some of the individual chemicals that we tested behave as

partial PXR agonists (e.g., clotrimazole, mediazepam, oxadiazon, and TPP) and it can be expected that other interactions than additive interactions may occur when they are present in complex mixtures, hence impeding PXR activity prediction on the basis of individual potency of measured active compounds. Moreover, hPXR has a large and flexible ligand-binding domain, allowing the binding of a wide range of structurally different ligands with molecular weights ranging from less than 250 kDa to more than 800 kDa [19, 54]. Thus, its smooth binding pocket could host several ligands at the same time, which might result in synergic response. However, to our knowledge, interactive effects of chemical mixtures on PXR activation has not been reported so far, and would thus be an important issue to be addressed within the context of the present study.

Overall, this study should be considered as an exploratory study and further research will be necessary to identify PXR-active chemicals in environmental samples. This will go through the implementation of effect-directed analyses coupled to dedicated sample fractionation protocols [55]. Also, the development of nuclear receptor-affinity columns [56], based on recombinant hPXR, represents a promising way to isolate and purify hPXR ligands from complex mixtures. These approaches are under evaluation in our laboratories and are expected to provide new information on the chemical nature of active PXR ligands present in the environment.

Conclusion

In this work, we report the successful use of the stable HG5LN-hPXR reporter gene assay to detect hPXR activation by a panel of emerging compounds and by surface and waste water samples, albeit the main compounds that contributed to the detected activities remain to be identified. Combined to other in vitro bioassays for EDCs and AhR-activating chemicals, the hPXR assay provided complementary information on bioactive contaminants and thereby enhanced the environmental diagnostic. As PXR plays a crucial role in xenobiotic detoxification and hormone metabolism, alteration of PXR signaling pathway may lead to biological effects in exposed organisms, as recently reported in fish [50]. However, marked cross-species differences have been reported for PXR transactivation by xenobiotics [57]. Thus, for a proper risk assessment to aquatic organisms, the use of a dedicated fish PXR bioassay to characterize potential hazard to fish population may also be considered.

Acknowledgments This study was supported by the French Ministry of Ecology (grant P189-AP08, to INERIS), the "Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail" (AFSSET, RD-2005-02), the "Agence de l'Eau Adour-Garonne", and by a doctoral fellowship to N.C. (contract no. CIFRE703/2008).

References

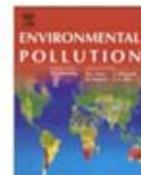
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson HA (1996) *Environ Health Perspect* 104:715–740
- Tyler CR, Jobling S, Sumpter JP (1998) *Crit Rev Toxicol* 28:319–361
- Eggen RIL, Segner H (2003) *Anal Bioanal Chem* 377:386–396
- Khim JS, Villeneuve DL, Kannan K, Koh CH, Giesy JP (1999) *Environ Sci Technol* 33:4206–4211
- Snyder SA, Villeneuve DL, Snyder EM, Giesy JP (2001) *Environ Sci Technol* 35:3620–3625
- Thomas KV, Hurst MR, Matthiessen P, McHugh M, Smith A, Waldock MJ (2002) *Environ Toxicol Chem* 21:1456–1461
- Timsit YE, Negishi M (2007) *Steroids* 72:231–246
- Grun F, Blumberg B (2009) *Mol Cell Endocrinol* 304:19–29
- Odermatt A, Gummy C, Atanasov AG, Dzyakanchuk AA (2006) *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:222–231
- Desai PB, Nallani SC, Sane RS, Moore LB, Goodwin BJ, Buckley DJ, Buckley AR (2002) *Drug Metab Dispos* 30:608–612
- Jacobs MN, Nolan GT, Hood SR (2005) *Toxicol Appl Pharmacol* 209:123–133
- Lemaire G, Mnif W, Pascussi JM, Pillon A, Rabenoelina F, Fenet H, Gomez E, Casellas C, Nicolas JC, Cavaillès V, Duchesne MJ, Balaguer P (2006) *Toxicol Sci* 91:501–509
- Lemaire G, Terouanne B, Mauvais P, Michel S, Rahmani R (2004) *Toxicol Appl Pharmacol* 196:235–246
- Mnif W, Pascussi J-M, Pillon A, Escande A, Bartegi A, Nicolas J-C, Cavaillès V, Duchesne M-J, Balaguer P (2007) *Toxicol Lett* 170:19–29
- Sinz M, Kim S, Zhu ZR, Chen TS, Anthony M, Dickinson K, Rodrigues AD (2006) *Current Drug Metabolism* 7:375–388
- Tabb MM, Kholodovych V, Grun F, Zhou CC, Welsh WJ, Blumberg B (2004) *Environ Health Perspect* 112:163–169
- Vignati LA, Bogni A, Grossi P, Monshouwer M (2004) *Toxicology* 199:23–33
- Orans J, Teotico DG, Redinbo MR (2005) *Mol Endocrinol* 19:2891–2900
- Jones SA, Moore LB, Shenk JL, Wisely GB, Hamilton GA, McKee DD, Tomkinson NCO, LeCluyse EL, Lambert MH, Willson TM, Kliewer SA, Moore JT (2000) *Mol Endocrinol* 14:27–39
- Xu CJ, Li CYT, Kong ANT (2005) *Arch Pharm Res* 28:249–268
- Staudinger J, Liu YP, Madan A, Habeebu S, Klaassen CD (2001) *Drug Metab Dispos* 29:1467–1472
- Balaguer P, Boussioux AM, Demirpence E, Nicolas JC (2001) *Luminescence* 16:153–158
- Wilson VS, Bobseine K, Lambright CR, Gray LE (2002) *Toxicol Sci* 66:69–81
- Ryan JA, Hightower LE (1994) *Environ Toxicol Chem* 13:1231–1240
- Louiz I, Kinani S, Gouze ME, Ben-Attia M, Menif D, Bouchonnet S, Porcher J-M, Ben-Hassine OK, Ait-Aïssa S (2008) *Sci Total Environ* 402:318–329
- Togola A, Budzinski H (2008) *J Chromatogr A* 1177:150–158
- Labadie P, Budzinski H (2005) *Anal Bioanal Chem* 381:1199–1205
- Budzinski H, Letellier M, Thompson S, LeMenach K, Garrigues P (2000) *Fresenius J Anal Chem* 367:165–171
- Alder L, Greulich K, Kempe G, Vieth B (2006) *Mass Spectrom Rev* 25:838–865
- Cailleaud K, Forget-Leray J, Souissi S, Hilde D, LeMenach K, Budzinski H (2007) *Chemosphere* 70:270–280
- Cailleaud K, Forget-Leray J, Souissi S, Lardy S, Augagneur S, Budzinski H (2007) *Chemosphere* 70:281–287
- Vindimian E, Robault C, Fillion G (1983) *J Appl Biochem* 5:261–268
- Villeneuve DL, Blankenship AL, Giesy JP (2000) *Environ Toxicol Chem* 19:2835–2843
- Budzinski H, Soulier C, Lardy S, Capdeville MJ, Tapie N, Vrana B, Miège C, Ait-Aïssa S (2009) *Xenobiotics in the urban water cycle—XENOWAC 2009*. Paphos, Cyprus
- Coumoul X, Diry M, Barouki R (2002) *Biochem Pharmacol* 64:1513–1519
- IFEN (2007) *Pesticides in waters, 2005 data*, Institut Français de l'Environnement
- Thurman EM, Bastian KC, Mollhagen T (2000) *Sci Total Environ* 248:189–200
- Raucy J, Warfe L, Yuch MF, Allen SW (2002) *J Pharmacol Exp Ther* 303:412–423
- Prueksaritanont T, Richards KM, Qiu Y, Strong-Basalyga K, Miller A, Li CZ, Eischenhandler R, Carlini EJ (2005) *Pharm Res* 22:71–78
- Togola A, Budzinski H (2007) *Anal Chem* 79:6734–6741
- Schuetz EG, Brimer C, Schuetz JD (1998) *Mol Pharmacol* 54:1113–1117
- Honkakoski P, Palvimo JJ, Penttilä L, Vepsäläinen J, Auriola S (2004) *Biochem Pharmacol* 67:97–106
- Reemtsma T, Quintana JB, Rodil R, Garcia-Lopez M, Rodriguez I (2008) *Trac, Trends Anal Chem* 27:727–737
- Hoenicke R, Oros DR, Oram JJ, Taberski KM (2007) *Environ Res* 105:132–144
- OECD (2002) *Triphenyl phosphate, SIDS Initial Assessment Report*, For SIAM 15. UNEP, Boston, Massachusetts
- Patureau D, Hernandez-Raquet G, Balaguer P, Delgenes N, Muller M, Dagnino S, Delgenes JP, Lhoutellier C (2008) *IWA World Water Congress and Exhibition*. Vienna, September, 7–12th
- Mahjoub O, Leclercq M, Bachelot M, Casellas C, Escande A, Balaguer P, Bahri A, Gomez E, Fenet H (2009) *Desalination* 248:104–113

48. Kinani S, Bouchonnet S, Creusot N, Bourcier S, Balaguer P, Porcher JM, Aït-Aïssa S (2010) *Environ Pollut* 158:74-83
49. Gagne F, Blaise C, Andre C (2006) *Ecotoxicol Environ Saf* 64:329-336
50. Lister A, Regan C, Van Zwol J, Van Der Kraak G (2009) *Aquat Toxicol* doi:10.1016/j.aquatox.2009.04.011
51. Houtman CJ, Booij P, Jover E, del Rio DP, Swart K, van Velzen M, Vreuls R, Legler J, Brouwer A, Lamoree MH (2006) *Chemosphere* 65:2244-2252
52. Kinani S, Bouchonnet S, Bourcier S, Creusot N, Porcher JM, Aït-Aïssa S (2008) *Rapid Commun Mass Spectrom* 22:3651-3661
53. Kretschmer XC, Baldwin WS (2005) *Chem Biol Interact* 155:111-128
54. di Masi A, De Marinis E, Ascenzi P, Marino M (2009) *Mol Aspects Med* 30:297-343
55. Brack W (2003) *Anal Bioanal Chem* 377:397-407
56. Pillon A, Boussioux AM, Escande A, Aït-Aïssa S, Gomez E, Fenet H, Ruff M, Moras D, Vignon F, Duchesne MJ, Casellas C, Nicolas JC, Balaguer P (2005) *Environ Health Perspect* 113:278-284
57. Milnes MR, Garcia A, Grossman E, Grun F, Shiotsugu J, Tabb MM, Kawashima Y, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T, Blumberg B (2008) *Environ Health Perspect* 116:880-885



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers

Said Kinani^{a,b}, Stéphane Bouchonnet^b, Nicolas Creusot^a, Sophie Bourcier^b,
Patrick Balaguer^c, Jean-Marc Porcher^a, Sélim Aït-Aïssa^{a,*}

^aUnité d'Ecotoxicologie, Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP2, F-60550 Verneuil en Halatte, France

^bDépartement de Chimie des Mécanismes Réactionnels, Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau Cedex, France

^cInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U896, Montpellier, F-34298, France

Multiple endocrine disrupting chemicals (ER, AR, AhR and PXR ligands) are detected in French river sediments using a panel of *in vitro* bioassays and analytical methods.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2009

Received in revised form

29 July 2009

Accepted 30 July 2009

Keywords:

River sediment

Endocrine disrupting chemicals

In vitro bioassays

GC-MS & LC-MS analysis

Mass balance analysis

ABSTRACT

A comprehensive evaluation of organic contamination was performed in sediments sampled in two reference and three impacted small streams where endocrine disruptive (ED) effects in fish have been evidenced. The approach combined quantitative chemical analyses of more than 50 ED chemicals (EDCs) and a battery of *in vitro* bioassays allowing the quantification of receptor-mediated activities, namely estrogen (ER), androgen (AR), dioxin (AhR) and pregnane X (PXR) receptors. At the most impacted sites, chemical analyses showed the presence of natural estrogens, organochlorine pesticides, parabens, polycyclic aromatic hydrocarbons (16 PAHs), bisphenol A and alkylphenols, while synthetic steroids, myco-estrogens and phyto-estrogens were not detected. Determination of toxic-equivalent amounts showed that 28–96% of estrogenic activities in bioassays (0.2–6.3 ng/g 17 β -estradiol equivalents) were explained by 17 β -estradiol and estrone. PAHs were major contributors (20–60%) to the total dioxin-like activities. Interestingly, high PXR and (anti)AR activities were detected; however, the targeted analysed compounds could not explain the measured biological activities. This study highlighted the presence of multiple organic EDCs in French river sediments subjected to mixed diffuse pollution, and argues for the need to further identify AR and PXR active compounds in the aquatic environment.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The rapid industrial and urban development which occurred in the second half of the 20th century allowed the emergence of millions of persistent anthropogenic chemicals in our environment without prior study of their toxicity. In recent years, a newly defined category of these chemicals, with the potential to interact with the endocrine system have emerged and aroused considerable interest of scientific communities. Named endocrine disrupting-chemicals (EDCs), these substances are defined as "exogenous agents that interfere with the synthesis, secretion, transport, binding, action, or elimination of natural hormones which are responsible for maintenance of homeostasis, reproduction, development and/or behavior" (Kavlock et al., 1996). In the aquatic

environment, occurring EDCs are very diverse in terms of chemical nature and origins (Vos et al., 2000).

Up to date, most attention has been directed to identifying estrogenic chemicals, i.e. those capable of binding to and activating the estrogen receptor (ER), because many of the effects reported in wildlife appear to be a consequence of feminization of males (Sumpter, 2005). However, many environmental contaminants can interfere with other molecular targets involved in the regulation of the endocrine system. These include other nuclear receptors like androgen receptor (AR), pregnane X receptor (PXR, e.g. Mnif et al., 2007) as well as steroidogenesis enzymes like aromatase (e.g. Laville et al., 2006). EDCs can also act via indirect mechanisms such as (anti)estrogenic effect mediated by aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligands through an ER/AhR cross-talk dependent mechanism (Ohtake et al., 2003, 2007). Therefore, a comprehensive assessment of EDC hazard should take into account the ability of chemicals to interfere with different targets of the endocrine system (Houtman et al., 2004).

Regarding the large diversity of EDCs and their effects, bio-analytical approaches using mechanism-based biological screening

* Corresponding author. Tel.: +33 344 556 511; fax: +33 344 556 767.

E-mail addresses: said@dcmr.polytechnique.fr (S. Kinani), stephane.bouchonnet@dcmr.polytechnique.fr (S. Bouchonnet), selim.ait-aissa@ineris.fr (S. Ait-Aïssa).

Table 1
Summary of some general characteristics of sampling sites.

Sites	Aisne (Ais)	Vallon du Vivier (VdV)	Rhonelle (Rho)	Réveillon (Rev)	Lézarde (Lez)
GPS coordinates	N 49° 23' 55" E 3° 28' 31"	N 49° 43' 23" E 0° 27' 42"	N 50° 17' 49" E 3° 32' 41"	N 48° 34' 00" E 2° 32' 09"	N 49° 34' 09" E 0° 13' 20"
Pressures ^a	Low	Mixed	Urban dense	Urban dense	Mixed
Water quality ^b	Good	Very good	Bad	Very bad	Good
Biomarker responses in fish (<i>Gasterosteus aculeatus</i>) ^c	No data	No alteration (reference site)	Induction of vitellogenin in male and spigging in female	Induction of EROD and vitellogenin in male	Induction of EROD

^a Data obtained from the Rivers Waterbase of the European Environmental Agency.

^b Data from obtained from French water agencies.

^c Data from Sanchez et al. (2008).

tools have emerged to monitor such substances in complex environmental mixtures (Eggen and Segner, 2003). In particular, *in vitro* assays using reporter gene activation in stably transfected cell lines provide robust, sensitive and specific bioassays to screen and quantify endocrine activities in environmental samples. Combining such tools with powerful chemical analyses within integrated approaches permits to identify key toxicants to be monitored in the environment (Brack, 2003). By using such bioanalytical approaches, the occurrence of EDCs and their effects to aquatic organisms has been several times reported in different industrialised countries like the United Kingdom (e.g. Jobling et al., 2006) or the Netherlands (e.g. Vethaak et al., 2005). However in France, much fewer data have been reported. Recent studies showed occurrence of steroid estrogens and alkylphenols in effluents from sewage treatment plants (Labadie and Budzinski, 2005; Muller et al., 2008) or in water and sediment from the Seine River (Fenet et al., 2003; Cargouet et al., 2004). More recently, abnormal elevated levels of vitellogenin and spigging, used as biomarkers of estrogen and androgen exposure respectively, have been reported in three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) sampled in different small streams subjected to diffuse pollution like agricultural run-off or domestic effluents (Sanchez et al., 2008). Thus, more investigation is needed in order to characterize and identify key EDCs in French aquatic ecosystems.

This study aimed at performing a comprehensive evaluation of the chemical contamination by EDCs in sediments sampled in small streams at sites where endocrine disruptive effects in fish have been previously evidenced (Sanchez et al., 2007, 2008). The five selected sites, located in the North of France, were representative of different levels of water and ecological quality (Table 1). For this purpose, we used a combined approach involving i) targeted

chemical analyses of more than 50 chemicals (Table 2) selected on the basis of both their environmental occurrence and their known EDC potency, and ii) a panel of *in vitro* bioassays that allowed the detection of different receptor-mediated activities, namely ER, AR, AhR and PXR. Since all activities were detected in at least two of the five studied sites, the contribution of analysed EDCs in the biological activities detected by the bioassays was estimated by comparing toxic-equivalent quantities from both approaches.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

List, abbreviation and source of analytical standards are given in Table 2. Flutamide (Flut), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrasodium bromide tetrazolium (MTT), 5 α -dihydrotestosterone (DHT), as well as the analytical internal standards including [¹³C₆]4-n-nonylphenol, [²H₂]17 β -estradiol, [²H₁₀]phenanthrene, [²H₁₀]acenaphthene, [²H₁₂]perylene and [²H₁₂]chrysene were purchased from Sigma–Aldrich (St Quentin Fallavier, France). ICI-182,780 (ICI) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) were obtained from Tocris Bioscience (Ellisville, USA) and Promochem (Molsheim, France), respectively. All standards were of 98.1–99.9% purity. Chromatographic-grade solvents: acetone, methanol, acetonitrile, dimethylsulfoxide (DMSO) and n-hexane were also purchased from Sigma–Aldrich. Stock solutions of β -E2 2.72 g/L, DHT 2.90 g/L and B[a]P 2.52 g/L were prepared by dissolving crystalline compound in DMSO. A solution of TCDD was prepared by drying an aliquot of TCDD in methanol under a nitrogen stream and dissolving the residue in DMSO to reach a concentration of 3.22 g/L.

2.2. Site description and sampling

Surface sediment samples were collected in five rivers located in the North of France during July 2004. The selected stations presented different levels of impacts in terms of anthropogenic pressures, chemical contamination and impacts on fish populations (Table 1): the Aisne (Ais) and the Vallon du Vivier (VdV) rivers were considered as reference sites; the Lézarde (Lez) as a moderately impacted site and the Réveillon (Rév) and Rhonelle (Rho) as heavily impacted sites. At each site, at least

Table 2
Overview of investigated chemicals: chemical families, analytical standard sources and methods used for their quantification in samples.

Classes (Providers)	Chemicals	Analytical methods (Reference)
Natural and synthetic estrogens (Sigma–Aldrich)	Estrone (E1), 17 β -estradiol (17 β -E2), 17 α -estradiol (17 α -E2), 17 α -ethynilestradiol (EE2), estriol (E3), mestranol (MeEE2), diethylstilbestrol (DES)	GC/MS with derivatization (Kinani et al., 2008a)
Alkylphenols (Sigma–Aldrich)	4-n-nonylphenol (4-n-NP), 4-tert-octylphenol (4-t-OP), 4-n-butoxyphenol (4-BuOP), 4,4'-isopropylidene diphenol (bisphenol A, BPA)	GC/MS/MS with derivatization (Kinani et al., 2008a)
Parabens (Sigma–Aldrich)	n-propylparaben (PrP), n-butylparaben (BP), benzylparaben (BzP)	GC/MS and GC/MS/MS with derivatization (Kinani et al., 2008a)
Hydroxy-PAHs (Sigma–Aldrich)	1-hydroxypyrene (1-OHPyr), 2-hydroxyfluorene (2-OHFlu)	GC/MS/MS with derivatization (Kinani et al., 2008a)
PAHs (Sigma–Aldrich)	Naphthalene (Nap), acenaphthylene (Acy), acenaphthene (Ace), fluorene (Flu), phenanthrene (Phe), anthracene (Ant), fluoranthene (Flt), pyrene (Pyr), benzo[a]anthracene (B[a]A), chrysene (Chr), benzo[b]fluoranthene (B[b]F), benzo[k]fluoranthene (B[k]F), benzo[a]pyrene (B[a]P), indeno[1,2,3-c,d]pyrene (Ind), dibenz[a,h]anthracene (DBA), benzo[g,h,i]perylene (B[ghi]P)	GC/MS (Louiz et al., 2008)
Organochlorine pesticides (Promochem)	Hexachlorobenzene (HCB), lindane (γ -HCH), vinclozolin, metolachlor, endosulfan (2 α :1 β), o,p'-DDT, methoxychlor, fenarimol	GC/MS and GC/MS/MS see Section 2.5.1
Phyto-estrogens (Sigma–Aldrich)	Daidzein, genistein, biochanin A, equol, coumestrol, resveratrol	LC/MS/MS see Section 2.5.2
Mycro-estrogens (Sigma–Aldrich)	Zearalenone (ZON), α -zearalenol (α -ZOL), β -zearalenol (β -ZOL), zearalanone (ZEA), α -zearalanol (α -ZAL) and β -zearalanol (β -ZAL)	GC/MS with derivatization (Kinani et al., 2008b)

five grab sediment samples were taken alongside the river section of the study sites and were pooled to obtain an average sediment sample and to minimize intra-site variability. All sediment samples were passed through a 2 mm sieve pore, stored in aluminium boxes and immediately transferred to the laboratory where they were stored at -20°C in order to inhibit biological activity until extraction.

2.3. Extraction procedure

The sediment samples were extracted as previously described (Kinani et al., 2008a). Briefly, 5 g of lyophilised and homogenised sediment were extracted three times with 10 mL of a hexane/acetone (2:1, v/v) mixture. For each extraction step, the sample was sonicated 10 min (ENMA Transsonic 460/H, Frequency 50–60 Hz, Germany) at room temperature. The extracts were combined and the supernatant was transferred to a 50 mL vial containing 1.0 g of anhydrous sodium sulphate. The organic extracts were then centrifuged for 10 min at 3000 rpm and the supernatant was collected, filtered onto a 0.45 μm Acrodisc CRPTE Syringe filter (Gelman-Sciences, USA), reduced to about 1 mL using rotary evaporation at 30°C or lower, evaporated to complete dryness under a gentle nitrogen stream and reconstituted into 1 mL of the extraction solvent. The final extract was then divided into two parts, the first one for chemical analysis and the second one for bioassay testing. The extraction solvent was subsequently replaced by DMSO for bioassay experiments.

2.4. Cell cultures and in vitro bioassays

2.4.1. Estrogenic, PXR and (anti)-androgenic activities in reporter gene assays

The estrogenic, PXR and (anti)-androgenic activities of the extracts were monitored by using the MELN, HG₅LN-PXR and MDA-kb2 reporter cell lines, respectively. The MELN cell line was obtained by stable transfection of MCF-7 human breast cancer cells by an ERE- β Glob-Luc-SVNeo plasmid (Balaguer et al., 2001). The HG₅LN-PXR cell line was derived from HeLa cells that were first stably transfected with GAL4RE₃-bGlob-Luc-SV-Neo (HG₅LN cells) before being stably transfected with the pSG5-GAL4(DBD)-hPXR(LBD)-puro plasmid (Lemaire et al., 2006). The MDA-kb2 cell line (ATCC, #CRL-2713) was derived from the MDA-MB-453 human breast cancer cells. They were stably transfected by a MMTV promoter-luciferase plasmid construct, which is under the control of endogenous AR and glucocorticoid receptor (GR) (Wilson et al., 2002). All reporter cell lines were routinely cultured in phenol red containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), supplemented with 5% foetal calf serum (FCS), 1% nonessential amino acids and penicillin/streptomycin (50 U/mL each) in a 5% CO₂ humidified atmosphere at 37°C . For experiments, cells were left to incubate for 2 days in phenol red free DMEM supplemented with 3% dextran charcoal coated-FCS (DCC medium) before seeded in white opaque 96-wells culture plates at a density of 50,000 cells per well. Serial dilutions of reference chemicals or organic extracts were added in triplicates 24 h later and then left to incubate for 16 h. In all assays, DMSO in the culture medium was always at 0.5% v/v, including in cell controls. At this concentration, it did not affect cell viability or luciferase activity. At the end of the incubation period, the medium was removed and replaced by 50 μL of DCC medium containing 0.3 mM of *o*-luciferin and the luminescence signal was measured in living cells for 2 s per well with a microtiter plate luminometer (μ Beta, Wallac). Relative luminescence units (RLU) were converted to relative response units expressed as percent of maximal luciferase activity induced by the positive controls: E2 10 nM, SR12813 0.3 μM , DHT 10 nM (for AR agonist activity) and DHT 0.3 nM (for AR antagonist activity) in MELN, HG₅LN-PXR and MDA-kb2 cell lines, respectively. For ER and AR agonistic responses, the specificity of luciferase induction by samples was checked by co-exposure experiments with 0.1 μM ICI182,780 or 1 μM flutamide, as reference ER and AR antagonists, respectively.

2.4.2. Dioxin-like activity in PLHC-1 cell line

The fish hepatic PLHC-1 cell line (ATCC, #CRL-2406) was described by Ryan and Hightower (1994). The cells were routinely grown at 30°C in E-MEM culture media supplemented with 10% FCS and 1% antibiotics in a 5% CO₂ humidified atmosphere. For experiments, cells were seeded in 96-well plates at a density of approximately 50,000 cells per well. After 24 h of incubation, cells were exposed to test chemicals or sample extracts for either a 4 h or 24 h incubation period, in order to differentiate between dioxin-like compounds that are rapidly metabolized (e.g. PAHs) in the cells and dioxin-like chemicals that are persistent in the cells (e.g. dioxins) (Louiz et al., 2008). Then, plates were processed for 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in intact cells, following the protocol previously described by Laville et al. (2004). Results were expressed as percent of EROD activity induced by the positive control (TCDD 1 nM).

2.4.3. Cell viability

The effect of test compounds or samples on cellular viability in the different cell lines was evaluated by using the methyl-thiazol-tetrazolium (MTT) assay (Mossman, 1983), as previously described (Laville et al., 2004).

2.5. Chemical analyses

Two mass spectrometers coupled with chromatography have been used for the quantitative analysis: a "CP3800" gas chromatograph system equipped with

a "CP8400" autosampler and coupled to a "Saturn 2000" ion trap mass spectrometer (Varian, Les Ulis, France) for the GC-MS and a "alliance 2690" liquid chromatography coupled to a Q-TOF Premier (Waters, France) mass spectrometer for LC-MS/MS. Before performing the chemical analysis, a portion of each extract was purified according to a method previously described by Hartmann et al. (2007).

2.5.1. GC-MS and GC-MS/MS analyses

The chromatographic separation was performed with a 60 m "Factor four VF-10-MS" (10% phenyl, 90% methylpolysiloxane) capillary column (internal diameter: 0.25 mm, film thickness: 0.25 μm) from Varian. All experiments were performed by automatically injecting 2.0 μL of sample in the splitless mode at a rate of 50 $\mu\text{L}/\text{s}$. Helium (99.999% purity) was used as the carrier gas at a constant flow of 1.0 mL/min for PAHs analysis and at 1.4 mL/min for the other target compounds; and was held a constant flow by electronic pressure control. The injector temperature was set to 300°C . The split valve opened after 1 min, with a split ratio of 35/100. The manifold, ion trap source and transfer line temperatures were set to 120, 220 and 300°C , respectively.

For the GC-MS analysis, except for organochlorines pesticides, all acquisition methods have been previously described, the corresponding references being reported on Table 2 according to the investigated chemical families. For HCB, γ -HCH, vinclozolin, metolachlor, α -endosulfan, *o,p'*-DDT, β -endosulfan, methoxychlor and fenarimol analysis, the capillary column was initially set at 80°C for 30 s, then ramped up to 280°C at $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$. After 4.0 min at this value, the temperature was finally increased at $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to 350, where it was held for 3.67 min. The total duration of GC analysis was 21 min. Ions were formed under electro-ionization at 70 eV with an emission current of 80 μA . The mass spectrometer was operated using a hybrid acquisition mode alternating MS/MS and SIS detection.

2.5.2. LC-MS/MS analyses

LC/MS is equipped with an electrospray ionization (ESI) source operated in negative-ion mode. The analytical column used was a Pursuit C18 (150 mm \times 2.1 mm I.D., 5 μm particle size, Varian, France) and a mobile phase consisting of acetonitrile (A) and water (B). The gradient conditions were as followed: 25% of (A) and 75% of (B) for 2 min, followed by a linear increase to 75% (A) at 16 min and 2 min hold at 75% (A). The flow rate was 0.2 mL/min and the injection volume was 20 μL . Only phytoestrogens were analysed by LC-MS. The mass spectrometer was operated in order to record the MS/MS spectrum of deprotonated pseudomolecular ion $[\text{M} - \text{H}]^{-}$. Collision energies have been optimized between 20 and 30 eV for each compound to obtain three characteristic ions. The optimized instrument conditions were as followed: capillary voltage -3.4 kV, cone voltage, 50 V; multiplier voltage, 2250 V; source temperature, 100°C ; desolvation temperature, 450°C . Nitrogen was used as both the nebulizing (50 L/h) and desolvation gas (700 L/h). Argon was used as collision gas at flow 0.28 (mL/min).

2.6. Data analysis and determination of bioassay- and instrumental-derived toxic-equivalents

Sigmoid dose-response curves and efficient concentrations (i.e. EC₂₅ and EC₅₀, corresponding to concentrations of sediment extracts and chemical standards giving respectively 25 and 50% of the maximum luciferase or EROD activities) were determined with the Regtox 7.5 Microsoft Excel™ macro by using Hill equation (Vindimian et al., 1983) and freely available at <http://eric.vindimian9online.fr>. In all bioassays, significant responses were defined as those greater than two times the standard deviation of the response obtained with DMSO (solvent control). The dioxin-like, estrogenic, (anti)androgenic and PXR activities in samples derived from bioassays were expressed as BaP- or TCDD-, E2-, DHT-, Flu- and SR12813-equivalents (Bio-ref-EQs), respectively, which were determined as the ratio of the EC₂₅ of the reference chemicals expressed as ng/L or $\mu\text{g}/\text{L}$ to that of the sample expressed as equivalent gram of dry weight sediment per litre (g EQ/L).

In order to estimate the contribution of analysed compounds to the total activity detected by a bioassay, the measured concentrations (as ng/g sed wt) were converted to toxic-equivalent activities derived from chemical analysis (Chem-ref-EQs), that is Chem-BaP-EQ, Chem-TCDD-EQ, Chem-E2-EQ, Chem-DHT-EQ, Chem-Flu-EQ and Chem-SR12813-EQ, in each respective bioassay. The Chem-ref-EQ were calculated according to the following equation: Chem-ref-EQ = $\sum (C_i \times \text{ref-EF}_i)$, where, for a given chemical *i*, C_i is the measured concentration in a sample and ref-EF_{*i*} is the inducing/inhibiting equivalent factor relative to the reference ligand (i.e. BaP, TCDD, E2, DHT, Flu or SR12813) in a given bioassay. The equivalent factors were calculated as follows: ref-EF_{*i*} = EC₂₅ of reference compound/EC₂₅ of test compound *i*, on mass basis. Unless otherwise specified in Tables 3–5, ref-EFs of each analysed compound were determined experimentally in each bioassay by establishing dose-response curves for individual standard chemicals and by comparing them to that of the reference compound. For instance, the 21 individual molecules listed in Table 4 were tested for their ability to induce luciferase activity in MELN cells in our assay condition, and their E2-equivalent factors (EEF) were then determined and used to calculate Chem-E2-EQ in the samples. Finally, the ratio Chem-ref-EQ/Bio-ref-EQ allowed evaluating the contribution of quantified compounds to the biological activity detected by the bioassay, i.e. a ratio near 100% means that all analysed

Table 3
Concentrations of the 16 PAHs and their relative contribution to the total dioxin-like activity in sediment organic extracts from the five studied sites.

Chemicals	LOQ ^a (ng/g)	IEF ^b		Concentration in sampling sites in ng/g d.w.				
		BaP 4 h	TCDD 24 h	Ais	VdV	Rho	Rev	Lez
Nap	0.11	n.i. ^c	n.i.	n.d. ^d	3.21	2.30	5.42	3.73
Acpy	0.17	5.56E-3	n.i.	n.d.	3.57	15.28	54.96	77.27
Acp	0.08	n.i.	n.i.	n.d.	4.94	2.56	26.18	38.66
Flu	0.09	1.44E-2	n.i.	n.d.	9.01	8.74	38.97	73.46
Phe	0.06	n.i.	n.i.	10.67	132.66	96.61	612.83	1706.67
Ant	0.11	n.i.	n.i.	3.30	37.44	46.01	225.27	712.69
Flt	0.05	n.i.	n.i.	46.35	307.42	267.01	1533.00	3367.66
Pyr	0.17	3.58E-3	3.85E-5	36.11	231.11	168.45	1307.67	2907.47
B[a]A	0.06	2.58E-1	9.77E-5	11.14	110.79	150.53	761.47	1477.33
Chr	0.06	2.92E-1	3.76E-4	8.02	102.24	172.16	1013.47	1596.00
B[b]F	0.13	6.94E-1	4.63E-4	15.59	69.66	723.05	2760.67	4674.00
B[k]F	0.11	2.94	4.23E-3	4.14	57.38	370.71	1602.09	2681.37
B[a]P	0.20	1	5.13E-4	15.26	97.99	138.03	841.60	1685.49
Ind	0.07	8.43E-1	1.64E-3	35.76	171.62	116.08	723.40	1190.89
DBA	0.12	3.66	6.11E-3	1.97	8.38	16.62	45.09	98.72
B[ghi]P	0.16	n.i.	n.i.	21.00	115.42	71.09	423.98	786.24
Sum-PAHs (ng/g d.w.)				209.3	1462.8	236.5	11976.1	23,077.7
Chem-BaP-EQ (ng/g d.w.)				81	550	1978	8740	15,037
Bio-BaP-EQ (ng/g d.w.)				200	910	7334	31,556	75,435
Chem-BaP-EQ/Bio-BaP-EQ (%)				41	60	27	28	20
Chem-TCDD-EQ (ng/g d.w.)				0.11	0.72	2.35	10.45	17.78
Bio-TCDD-EQ (ng/g d.w.)				0.67	4.49	5.89	38.43	48.38
Chem-TCDD-EQ/Bio-TCDD-EQ (%)				16	16	40	27	37

^a LOQ: limits of quantification provided by the GC–MS method.
^b IEF: induction equivalent factors relative to BaP after 4 h and to TCDD after 24 h of exposure (from Louiz et al., 2008).
^c n.i.: no EROD induction detected within the 0.1 nM–10 μM concentration range.
^d n.d.: not detected or below quantification limit.

Table 4
Concentrations of estrogenic compounds measured in sediment organic extracts from the five studied sites, and their relative contribution to the total estrogenic activity measured in the MELN bioassay.

Chemical classes	Chemicals	EEF ^a	LOQ ^b (ng/g)	Concentration in sediment extracts (ng/g d.w.)				
				Ais	VdV	Rho	Rev	Lez
Natural estrogens	α-E2	0.02	0.04	0.04	n.d. ^c	0.2	n.d.	n.d.
	β-E2	1	0.05	0.27	0.78	0.58	1.58	0.18
	E1	0.02	0.02	0.3	0.58	0.48	1.28	0.36
	E3	0.17	0.6	n.d.	n.d.	n.d.	1.26	n.d.
Synthetic estrogens	EE2	0.93	0.07	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	MeEE2	0.02	0.08	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	DES	0.17	0.03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Alkylphenols	4-t-OP	1.1E-04	0.03	n.d.	n.d.	0.56	6.3	n.d.
	4-n-NP	3.3E-06	0.01	n.d.	0.52	n.d.	0.04	n.d.
	BPA	4.5E-05	0.01	2.29	11.67	7.92	47.28	1.24
Parabens	PrP	7.4E-06	<0.01	n.d.	n.d.	n.d.	0.11	n.d.
	BuP	4.9E-06	<0.01	n.d.	n.d.	n.d.	0.07	n.d.
	BzP	6.6E-06	0.02	n.d.	n.d.	n.d.	0.79	n.d.
PAHs metabolites	1OHFlu	9.9E-07	0.02	0.11	0.26	0.3	0.41	0.37
	2OHFlu	6.3E-06	0.02	n.d.	n.d.	0.19	0.3	0.6
Pesticides	Endosulfan(α)	2.0E-06	0.21	n.d.	n.d.	n.d.	63.84	n.d.
	Endosulfan(β)	2.0E-06	1.25	n.d.	n.d.	n.d.	29.2	n.d.
	o,p'-DDT	1.7E-05	0.22	6.52	n.d.	n.d.	7.25	n.d.
Phyto-estrogen	Equol	2.8E-04	0.15	n.d.	n.d.	0.17	n.d.	n.d.
Myc-estrogens	α-ZAL	0.14	0.13	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
	β-ZAL	0.03	0.02	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	n.d.
Chem-E2-EQ (ng/g) ^d			–	0.28	0.79	0.59	1.82	0.19
Bio-E2-EQ (ng/g) ^e			0.010	0.29	0.83	1.69	6.43	0.20
Chem-E2-EQ/Bio-E2-EQ (%)				96	95	35	28	94

^a EEF: estradiol equivalence factors relative to estradiol, determined as described in the Materials and methods section.
^b LOQ: limit of quantification.
^c n.d.: not detected or below quantification limits.
^d Chem-E2-EQs: chemical estradiol equivalents.
^e Bio-E2-EQs: biological estradiol equivalents based on EC₂₅ effective concentration in the MELN bioassay.

Table 5
Summary of anti-androgenic and PXR-mediated activities in sediment extracts and relative contribution of known anti-androgenic and PXR ligands measured in organic extracts from the five studied sites.

Chemicals	FEF ^a	SREF ^a	LOQ ^b (ng/g)	Concentration at sampling sites (ng/g sed d.w.)				
				Ais	VdV	Rho	Rev	Lez
BPA	0.394	0.025	0.01	2.29	11.67	7.92	47.28	1.24
4-t-OP	0.339	0.099	0.03	n.d.	n.d.	0.56	6.3	n.d.
BHT	0.101	n.a.	0.07	n.d.	3.13	3.6	14.14	0.61
4-n-NP	0.016	n.a.	0.01	n.d.	0.52	n.d.	0.04	n.d.
Endosulfan(α)	0.058	0.029	0.21	n.d.	n.d.	n.d.	63.84	n.d.
o,p'-DDT	0.15	0.032	0.22	6.52	n.d.	n.d.	7.25	n.d.
Vinclozolin	2.68	n.a.	0.24	4.57	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
β-E2	n.a.	0.129	0.05	0.27	0.78	0.58	1.58	0.18
E1	n.a.	0.13	0.02	0.3	0.58	0.48	1.28	0.36
Chem-Flu-EQ (ng/g)				14.1	4.9	3.7	27.0	0.6
Bio-Flu-EQ (ng/g) ^c			17.0	n.d.	1089.4	n.d.	32,493.4	7444.9
Chem-Flu-EQ/Biol-Flu-EQ (%)				-	0.45	-	0.08	0.01
Chem-SR12813-EQ (ng/g) ^d				0.34	0.47	0.39	4.26	0.10
Bio-SR12813-EQ (ng/g) ^d			40.0	964.8	1647.2	14,322.2	51,317.3	2147.1
Chem-SR12813-EQ/Biol-SR12813-EQ (%)				0.035	0.028	0.003	0.008	0.005

n.a.: non active compound.
n.d. not detected.

^a FEF (Flutamide equivalent factors) were determined as described in Materials and methods; SREF (SR12813-equivalent factors) were from Lemaire et al. (2004) for endosulfan and from Mnif et al. (2007) for all other compounds.

^b LOQ: limit of quantification.

^c Chem-Flu-EQ: flutamide equivalents derived from chemical analyses; Bio-Flu-EQ: flutamide equivalents based on EC₂₅ in the MDA-kb2 bioassay; Chem-SR12813-EQ: SR12813 equivalents derived from chemical analyses; Bio-SR12813-EQ: SR12813 equivalents based on EC₂₅ in the HG₃LN-hPXR bioassay.

compounds were explicative for biological results; otherwise other non analysed compounds may be present in the samples.

3. Results

3.1. Dioxin-like activity in river sediment extracts

The dose-response curves for EROD induction by all organic extracts are shown in Fig. 1. All samples elicited significant EROD activity, indicating a general contamination by dioxin-like compounds in all studied sites. Sample responses varied greatly depending on the studied site and exposure duration. Except for the Ais site after 24 h of exposure, the dose-response curves were fairly complete and almost parallel to the dose-response curves for reference chemicals. This allowed us to use EC₅₀ values for calculation of biological BaP-EQs and TCDD-EQs (summarized in Table 3). The highest values were found for Lez site followed by Rev, Rho,

VdV and Ais. For all sediment extracts, EROD induction potency based on sample concentration was higher after 4 h (Fig. 1a) than after 24 h of exposure (Fig. 1b) by approximately one to three orders. This indicates a major contribution of non persistent compounds, like PAHs, in the observed dioxin-like activities.

In order to test this hypothesis, the 16 priority PAHs were analysed in the extracts (Table 3). Total PAHs concentrations indicate large between-site variations ranging from low contamination levels in Ais site (0.22 µg/g d.w.) up to very high levels in Rev (11.98 µg/g d.w.) and Lez (23.08 µg/g) d.w. sites. All sediment samples were dominated by high molecular mass PAHs (4- to 6-ring).

The results given in Fig. 2 showed that chemical- and bioassay-derived BaP-EQs and TCDD-EQs were highly correlated (r² = 0.99 and 0.97, respectively), which confirmed the involvement of PAHs in the detected biological activities at both exposure durations. However, in all sediment extracts, the Chem-EQs were significantly

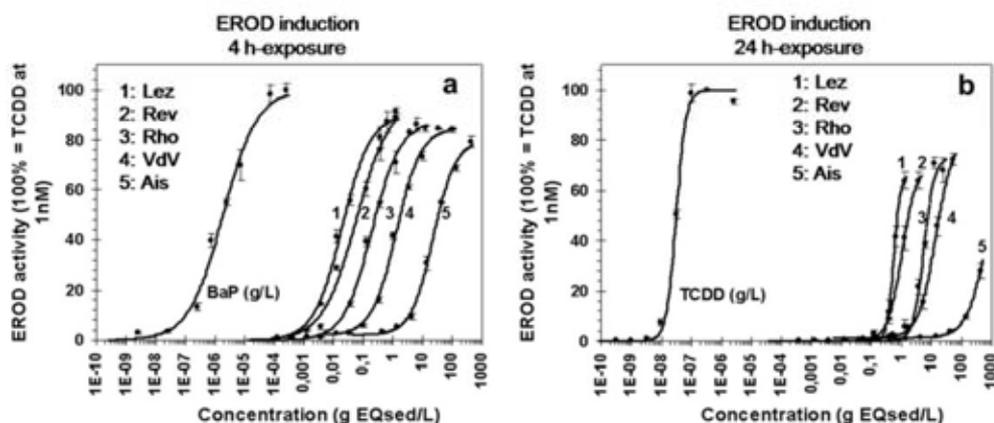


Fig. 1. Doses-response curves for EROD induction by sediment organic extracts in PLHC-1 cells measured after (a) 4 h and (b) 24 h exposure periods. Numbers correspond to the different sites, with 1: Lez, 2: Rev, 3: Rho, 4: VdV, 5: Ais. Values represent the mean ± SD, n = 3.

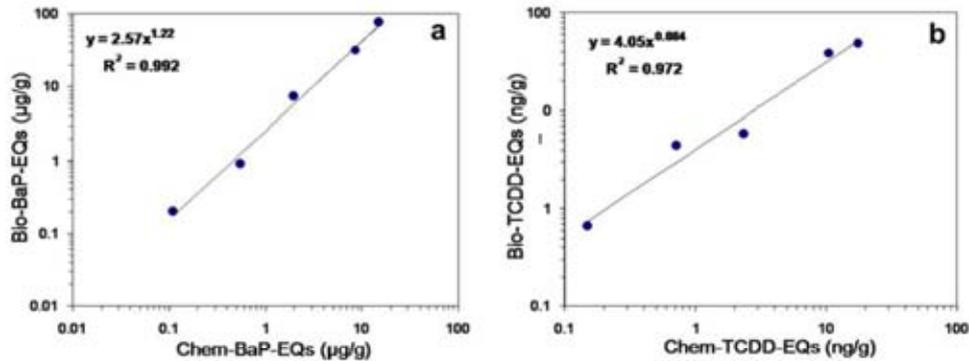


Fig. 2. Linear regression (log scale) showing correlation between PLHC-1 bioassay- (Bio-) and PAH chemical analyses- (Chem-) derived BaP-EQs (a) and TCDD-EQs (b) in sediment samples.

lower than the Bio-EQs, indicating that only a part of activity was explained by analysed PAHs, which accounted for approximately 20–60% and 16–40% of the BaP-EQs and TCDD-EQs measured in PLHC-1, respectively.

3.2. Estrogenic activity in river sediment extracts

The presence of estrogenic compounds in sediment extracts was tested in the MELN reporter cell line (Fig. 3). Significant dose-dependent induction of luciferase activity was obtained for all tested sediment extracts; the response magnitudes varied between 34% and 67% of the maximal response elicited by β -E2. Moreover, co-exposure with the pure anti-estrogen ICI-182,780 led to inhibition of the luminescent signal (data not shown), thus showing the specific involvement of the ER in the detected effects and indicating that estrogenic compounds were present in samples. Because the slopes of dose-response curves for different sediment extracts were not parallel to that of β -E2, the use of EC₂₅ was chosen to derive Bio-E2-EQs. The Bio-E2-EQs values in the different extracts of sediment samples ranged from 0.20 to 6.43 ng/g d.w (Table 4), with the highest activity in the Réveillon sediment extract.

Overall, the results presented in Table 4 showed that E1, β -E2, 1OH-Pyr and BPA were detected in all samples, while the synthetic estrogens were never detected. The Réveillon site was the most contaminated by xeno-estrogens, with measurable levels of natural

estrogens, alkylphenols, PAH metabolites, parabens, chlorinated pesticides, as well as detectable levels of the zearalenone metabolites α -ZAL and β -ZAL. α -E2 was detected at Rhonelle and Aisne sites; equol was present at Rhonelle site, while other myco- and phyto-estrogens were not detected.

In Aisne, Vallon du Vivier and Lézarde sediments, the Bio-E2-EQs were totally explained only by the presence of E1 and β -E2. However, differences between chemical and biological measurements were observed for Réveillon and Rhonelle sediments with Chem-E2-EQs/Biol-E2-EQs ratio values of 28 and 35%, respectively. This suggests that these sediments may contain estrogenic substances that were not included in our analytical methods.

3.3. (Anti)androgenic activity in river sediment extracts

The dose-response curves show detectable androgenic activity in Aisne and Rhonelle samples (Fig. 4a), giving bioassay-derived Bio-DHT-EQs values of 0.40 and 3.60 ng/g d.w., respectively. No androgenic activity was observed in the total sediment extract of Vallon du Vivier, Lézarde and Réveillon sediments. In DHT co-exposure experiments (Fig. 4b), significant anti-androgenic activities were detected in Vallon du Vivier, Lézarde and Réveillon samples, with respective Flu-EQs of 1.1, 7.4 and 32.5 μ g/g d.w. By using the MTT test, no cytotoxic effects could be observed for any

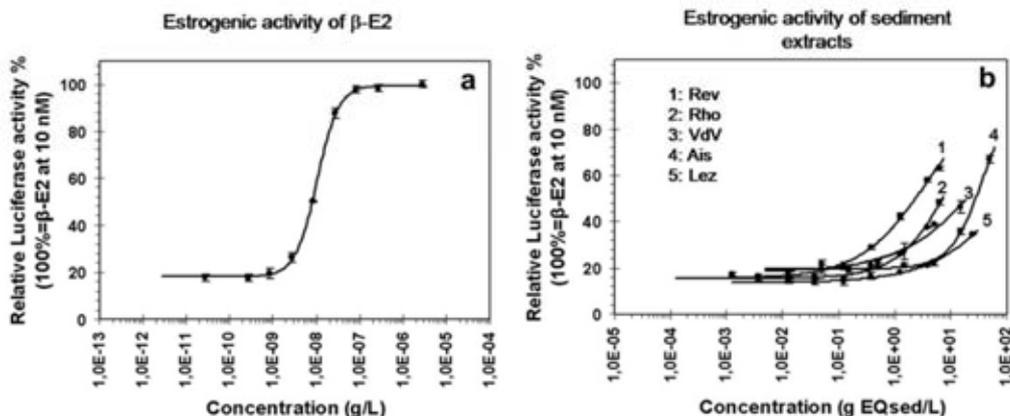


Fig. 3. Estrogenic activity of (a) 17 β -estradiol and (b) the five sediment extracts (1: Rev, 2: Rho, 3: VdV, 4: Ais, 5: Lez) in MELN cells. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induced by β -E2 at 10 nM. Values are means of triplicates \pm SD.

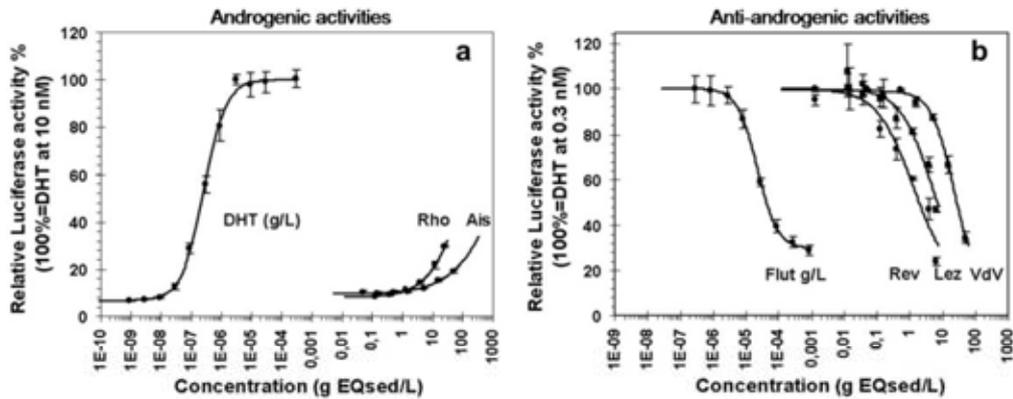


Fig. 4. (a) Androgenic and (b) anti-androgenic activities of the reference chemicals [dihydrotestosterone (DHT) and Flutamide (Flut)] and sediment extracts in MDA-kb2 cells. Results are expressed as percentage of the maximal luciferase activity induced by DHT at (a) 10 nM and (b) 0.3 nM. Values are means of triplicates \pm SD.

working concentration of chemicals or organic extracts (data not shown), thus indicating a specific effect on luciferase expression.

Determination of Chem-Flu-EQs showed that several anti-androgenic compounds were present, but at concentrations that could explain only a very minor part of the observed biological anti-androgenic activities (Table 5).

3.4. Detection of PXR ligands in river sediment extracts

No anti-PXR activity was noted in these samples (data not shown). However, all five samples induced PXR activation in a dose-response manner (Fig. 5a). The response magnitudes were always inferior to the maximum response produced by positive control (SR 12813 at 3 μ M), and ranged from 30% to 73%. Nevertheless, luciferase induction was specific to PXR activation since no luciferase increase was noted in the parental HG₅LN cell line, which expresses only the GAL4-luciferase construct (Fig. 5b). In HG₅LN cell line, inhibition of luciferase at high concentrations of Rev and Lez extracts was noted and reflected early toxic events.

The low Chem-SR12813-EQ/Bio-SR12813 ratios showed that 4tOP, 4nNP, β E2, E1, BPA, endosulfan and *o,p'*-DDT, which are known PXR ligands, poorly contributed to Bio-SR12813-EQs in the

samples (Table 5). Thus, the detected PXR activities were due to other non analysed compounds.

4. Discussion

In vitro profiling of sediment extracts showed multiple contaminations by dioxin-like and endocrine active chemicals in small streams subjected to diffuse anthropogenic pollution. The natural estrogens β E2 and E1 and of PAH-like compounds were identified as main contributors to estrogenic and dioxin-like activities, respectively, as determined by the bioassays. Conversely, (anti)androgenic and PXR-mediated activities were detected but the responsible compounds could not be identified using targeted chemical analyses.

4.1. PAHs and EROD inducing compounds

To some extent, the levels of PAHs measured in this study were in line with previous studies in French freshwater watersheds. For instance, total PAH content ranged from 1.2 to 12.5 μ g/g of dry sediment at various sites from the Seine estuary (Cachot et al., 2006), and from 2.3 to 41.3 μ g/g in the Seine and Marne rivers sampled at

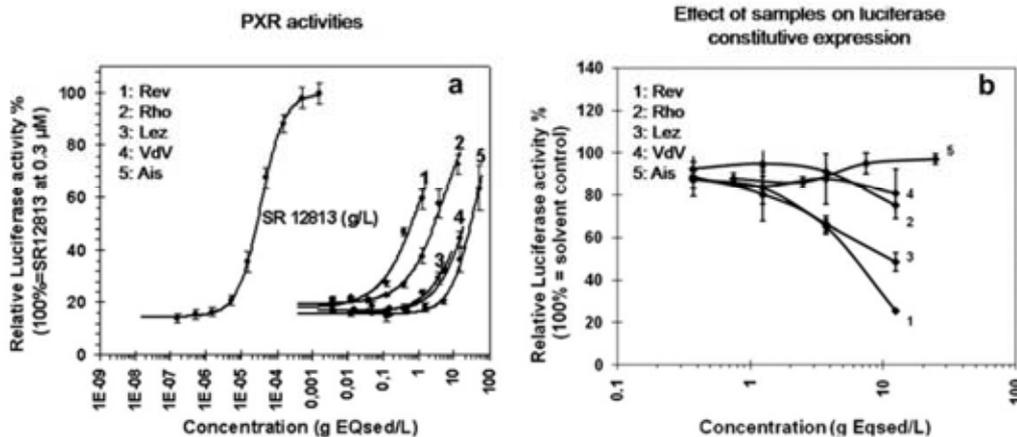


Fig. 5. (a) PXR-mediated dose-response curves of reference chemical (SR 12813) and sediment extracts (1: Rev, 2: Rho, 3: Lez, 4: VdV, 5: Ais) in HG₅LN-PXR cells. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induced by SR 12813 at 0.3 μ M. (b) Non specific effect of sediment extracts on constitutive luciferase expression in HG₅LN cells. Results are expressed as percentage of luciferase activity in control cells. Values are means of triplicates \pm SD.

urban sites nearby Paris (Ollivon et al., 2002). In our study, the highest PAH levels were detected in areas subjected to mixed anthropogenic pressures like the Réveillon, located in urban area upstream of Paris, and the Lézarde river, located nearby a highway road. Conversely, the Aisne site was located in a non urbanized area and was logically found as low contaminated by PAHs.

In all samples, PAH-like compounds were major contributors of dioxin-like activity, which mostly explained by PAHs with molecular weights (M.W.) of 228 and 252; however analysed PAHs explained only part of overall activity in PLHC-1 cells. This is not surprising since the priority PAHs are used as qualitative tracers of pollution and we noted that other high molecular weight PAHs, presumably active, were present in the samples (Fig. 2). Indeed, fullscan chromatogram of Lézarde extract (data not shown) showed the presence of detectable concentrations of several isomers of Chry (M.W. 228) and BaP (M.W. 252) that probably accounted for the detected activity in PLHC-1 cells, although this could not be tested in this study. Similar conclusions have been reported by other studies that showed that a major portion of AhR activity in river sediments was caused by nonpriority PAHs such as methylated PAHs (e.g. Hollert et al., 2002; Brack et al., 2005). In addition, many other dioxin-like compounds such as polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), polychlorinated biphenyls (PCBs), polychlorinated naphthalenes (PCNs) and some organochlorine pesticides, which were not included in the analyses, might also explain the differences between chemical and biological analyses.

4.2. (Xeno)estrogens

The contamination of aquatic ecosystems by estrogenic compounds has been few reported in France as compared to other industrialized countries. Nonetheless, effluents from sewage water treatment plant (SWTP) have been shown to be the source of steroid estrogens at different locations (Labadie and Budzinski, 2005; Muller et al., 2008; Cargouet et al., 2004); in surface waters, natural and synthetic estrogens were also described as main estrogenic chemicals in the Seine river downstream Paris, France (Cargouet et al., 2004). In sediments sampled downstream from a large SWTP in the Seine river, Fenet et al. (2003) reported that alkylphenols were the main contributors to the estrogenic activities detected by MELN bioassay while steroid estrogens were not measured in their study. This contrasts with the very low contribution of alkylphenols measured in the present study where estrogenic activities were predominantly explained by the natural estrogens β E2 and E1. Since alkylphenols are often considered as tracer compounds of water treatment effluents, the low levels measured in our study could reflect the fact that our sites were not directly impacted by SWTP effluents, the main source of aquatic pollution by alkylphenols. Nevertheless, other studies in European countries have reported occurrence of steroid estrogens in river sediments at similar levels than those found in our study, i.e. in the 0.3–5 ng/g range (Houtman et al., 2006; Labadie and Hill, 2007; Reddy and Brownawell, 2005; Matejicek et al., 2007). Moreover, the large contribution of natural estrogens to biological E2-EQs is in agreement with the study of Houtman et al. (2006) who reported that E1 and β E2 were responsible for more than 75% of the estrogenic activity in sediments from Zierikze harbour, The Netherlands. In the low impacted sites (Aisne, Vallon du Vivier and Lézarde), natural estrogens nearly explained 100% of the estrogenic activity detected by the bioassay. Conversely, in Réveillon and Rhonelle samples, only a part (28 and 35%) of the estrogenic activity was explained by β E2 and E1, suggesting the presence of other xenoestrogens in the samples. The Réveillon River is under pressure of multiple sources of contamination and was indeed found to be

contaminated by many organic chemicals from agricultural (pesticides) and urban/industrial (BPA, alkylphenols, parabens) origins. However, the targeted xeno-estrogens could not explain the overall estrogenic of the sample, hence suggesting the presence of other ER ligands that were not included in our analyses. This stresses the limits of the Chem-EQ based approach to identify bioactive compounds in complex mixtures and argues for further investigations, for instance by using effect directed analysis (EDA) approaches based on sample fractionation and identification of bioassay active fractions (Brack, 2003), in order to better characterize the contamination of this site by EDCs.

4.3. (Anti)androgenic activities

The occurrence of (anti)androgenic compounds in river sediments has been rarely reported as compared to estrogenic or dioxin-like compounds. However, such compounds can be present in river sediment since high levels of androgenic activities (1–15 ng DHT-EQ/g) were quantified by using the YAS assay in sediment from United Kingdom estuaries (Thomas et al., 2002). Natural androgenic steroids in sewage treatment effluents were identified as possible source of contamination (Thomas et al., 2002). Recently, Urbatzka et al. (2007) reported both androgenic and anti-androgenic activities in fractionated sediment extracts from the river Lambro, Italy, but the chemicals responsible for androgenicity in YAS assay were not identified. Other studies have shown that pulp mill effluents (Jenkins et al., 2004) or livestock feedlot effluents (Soto et al., 2004) are potential sources for androgens in the aquatic environment. In our study, we detected androgenic activity (4 ng DHT-EQ/g) in Rhonelle river sediment but the responsible compounds remain to be identified. In addition, anti-androgenic activities were detected in three other sites (Rév, Lez and VdV). Although several anti-androgenic chemicals were detected at these sites (i.e. BHT, BPA, alkylphenols, pesticides, Table 5), the measured concentrations could explain only a minor part of the activities measured in the MDA-kb2 bioassay. Therefore, the later were likely due to the presence of other EDCs that have not been investigated in our chemical analyses.

4.4. PXR activities

To our knowledge, the present study is the first demonstration of PXR-mediated activity in river sediments. The human PXR is known to be activated by a large panel of environmental chemicals that belong to different classes, like pharmaceuticals, steroids, alkylphenols (Mnif et al., 2007), polybrominated diphenyl ethers (Pacyniak et al., 2007), as well as various pesticides (Lemaire et al., 2006). In the present study, human PXR activating substances were detected in all analysed samples, at concentrations in the μ g/g range in terms of SR12813-EQs. Since PXR shares several ligands with the estrogen receptor (ER), it was hypothesized that several of the (xeno)estrogens detected in our samples could have contributed to the PXR-mediated activity. However, the Chem-SR12813-EQ/Bio-SR12813-EQ ratios showed that, at the measured concentrations, analysed (xeno)estrogens only poorly contributed to the SR12813-EQ quantities determined by the bioassay. Thus, more investigations using fractionation and isolation procedures will be necessary to characterize the compounds responsible for PXR activation in sediments. One promising methodology will likely consist in the use of purified PXR immobilized on columns in order to isolate PXR ligands from complex mixtures (Pillon et al., 2005; Balaguer et al., unpublished). It is expected that such approach will allow identifying environmental PXR ligands and thus providing further useful information on the toxicological relevance of detection of PXR activity in aquatic ecosystems.

4.5. Comparison with fish biomarkers

In the present study, toxicological profiling of sediments showed the presence of a wide range of chemicals that could potentially affect different molecular targets, namely ER, AR, AhR and PXR, involved in the regulation of the endocrine system of exposed organisms. At the studied sites, recent biomarker studies in wild three-spine stickleback (*G. aculeatus*) revealed fish exposure to different chemical stress including endocrine disrupters and dioxin-like compounds (Sanchez et al., 2007, 2008). Although statistical correlation between fish biomarker and *in vitro* bioassays could not be tested because of the small number of sites, some concordances between the two approaches were noted. For instance, vitellogenin induction in male stickleback has been evidenced in Réveillon and Rhonelle rivers, which were the most active in the MELN assay (Table 4). In addition, female stickleback from the Rhonelle River abnormally produced elevated levels of spigging, a male glue protein synthesized in the kidney and used for building nest (Sanchez et al., 2008). This suggested exposure to androgenic compounds, which correlates with the finding of AR-mediated activity in MDA-kb2 cells in our study (Fig. 4a). For dioxin-like activities, significant EROD induction in male and female stickleback was reported in Réveillon and Lézarde (Sanchez et al., 2007), the most active samples in the PLHC-1 assay (Table 3). On the whole, the bioanalytical approach confirmed the multi-pollution context at impacted sites like Réveillon and Rhonelle, and provided new information on possible causal agents for abnormal endocrine responses in fish. Although we identified some of the chemicals responsible for *in vitro* activities in sediment extracts, the direct extrapolation to fish exposure is rather risky since it may depend on site specific characteristics that can influence pollutant partitioning between sediment, suspended matter and dissolved phase in the water column. Thus, more investigation using appropriate sampling methods like passive samplers will be needed in order to link chemical contamination by EDCs and fish exposure and effects.

5. Conclusion

In summary, this study reports for the first time the simultaneous assessment of multiple endocrine active and dioxin-like chemicals, in French river sediments sampled in small streams subjected to various diffuse pollutions. Besides the major contribution of natural steroids and PAH-like compounds to estrogenic and dioxin-like activities, (anti)androgenic and PXR-mediated activities were detected although the individual active compounds could not be identified using targeted chemical analyses. These samples are thus interesting candidates for further EDA studies, which are under progress in order to elucidate the causal agents.

Acknowledgements

The authors wish to thank Emmanuelle Maillot-Maréchal for excellent technical help with the cell cultures. This study was funded by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development (Program 189), the "Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail" (AFSSET, RD-2005-02) and by a doctoral fellowship from the ANRT and INERIS (to SK).

References

Balaguer, P., Boussioux, A.M., Demirpence, E., Nicolas, J.C., 2001. Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands. *Luminescence* 16, 153–158.

- Brack, W., 2003. Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures? *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377, 397–407.
- Brack, W., Schirmer, K., Erdinger, L., Hollert, H., 2005. Effect-directed analysis of mutagens and ethoxyresorufin-O-deethylase inducers in aquatic sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2445–2458.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H., 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79, 257–267.
- Cargouet, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y., 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of the Total Environment* 324, 55–66.
- Eggen, R.I.L., Segner, H., 2003. The potential of mechanism-based bioanalytical tools in ecotoxicological exposure and effect assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377, 386–396.
- Fenet, H., Gomez, E., Pillon, A., Rosain, D., Nicolas, J.C., Casellas, C., Balaguer, P., 2003. Estrogenic activity in water and sediments of a French river: contribution of alkylphenols. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 1–6.
- Hartmann, N., Erbs, M., Wettstein, F.E., Schwarzenbach, R.P., Bucheli, T.D., 2007. Quantification of estrogenic mycotoxins at the ng/L level in aqueous environmental samples using deuterated internal standards. *Journal of Chromatography A* 1138, 132–140.
- Hollert, H., Durr, M., Olsman, H., Halldin, K., Van Bavel, B., Brack, W., Tysklind, M., Engwall, M., Braunbeck, T., 2002. Biological and chemical determination of dioxin-like compounds in sediments by means of a sediment triad approach in the catchment area of the River Neckar. *Ecotoxicology* 11, 323–336.
- Houtman, C.J., Ceni, P.H., Hamers, T., Lamoree, M.H., Legler, J., Murk, A.J., Brouwer, A., 2004. Toxicological profiling of sediments using *in vitro* bioassays, with emphasis on endocrine disruption. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 32–40.
- Houtman, C.J., Booij, P., Jover, E., del Rio, D.P., 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.
- Jenkins, R.L., Wilson, E.M., Angus, R.A., Howell, W.M., Kirk, M., Moore, R., Nance, M., Brown, A., 2004. Production of androgens by microbial transformation of progesterone *in vitro*: a model for androgen production in rivers receiving paper mill effluent. *Environmental Health Perspectives* 112, 1508–1511.
- Jobling, S., Williams, R., Johnson, A., Taylor, A., Gross-Sorokin, M., Nolan, M., Tyler, C.R., van Aerle, R., Santos, E., Brighty, G., 2006. Predicted exposures to steroid estrogens in UK rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environmental Health Perspectives* 114, 32–39.
- Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T., 1996. A report of the US EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* 107, 715–740.
- Kinani, S., Bouchonnet, S., Bourcier, S., Creusot, N., Porcher, J.M., Ait-Aissa, S., 2008a. Extraction and purification procedures for simultaneous quantification of phenolic xenoestrogens and steroid estrogens in river sediment by gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 3651–3661.
- Kinani, S., Bouchonnet, S., Bourcier, S., Porcher, J.-M., Ait-Aissa, S., 2008b. Study of the chemical derivatization of zearalenone and its metabolites for gas chromatography-mass spectrometry analysis of environmental samples. *Journal of Chromatography A* 1190, 307–315.
- Labadie, P., Budzinski, H., 2005. Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environmental Science & Technology* 39, 5113–5120.
- Labadie, P., Hill, E.M., 2007. Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry – comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1141, 174–181.
- Laville, N., Ait-Aissa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M., 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196, 41–55.
- Laville, N., Balaguer, P., Brion, F., Hinfray, N., Casellas, C., Porcher, J.-M., Ait-Aissa, S., 2006. Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology* 228, 98–108.
- Lemaire, G., Mniif, W., Pascucci, J.M., Pillon, A., Rabenoelina, F., Fenet, H., Gomez, E., Casellas, C., Nicolas, J.C., Cavailles, V., Duchesne, M.J., Balaguer, P., 2006. Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system. *Toxicological Sciences* 91, 501–509.
- Lemaire, G., Terouanne, B., Mauvais, P., Michel, S., Rahmani, R., 2004. Effect of organochlorine pesticides on human androgen receptor activation *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196, 235–246.
- Louiz, I., Kinani, S., Gouze, M.E., Ben-Attia, M., Menif, D., Bouchonnet, S., Porcher, J.-M., Ben-Hassine, O.K., Ait-Aissa, 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). *Science of the Total Environment* 402, 318–329.
- Matejcek, D., Houserova, P., Kuban, V., 2007. Combined isolation and purification procedures prior to the high-performance liquid chromatographic-ion-trap tandem mass spectrometric determination of estrogens and their conjugates in river sediments. *Journal of Chromatography A* 1171, 80–89.

- 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. *Toxicology Letters* 170, 19–29.
- Mossman, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology* 65, 55–63.
- Muller, M., Rabenoelina, F., Balaguer, P., Patureau, D., Lemenach, K., Budzinski, H., Barcelo, D., De Alda, M.L., Kuster, M., Delgenes, J.P., Hernandez-Raquet, G., 2008. Chemical and biological analysis of endocrine-disrupting hormones and estrogenic activity in an advanced sewage treatment plant. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 1649–1658.
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S., 2003. Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545–550.
- Ohtake, F., Baba, A., Takada, I., Okada, M., Iwasaki, K., Miki, H., Takahashi, S., Kouzmenko, A., Nohara, K., Chiba, T., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S., 2007. Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 446, 562–566.
- Ollivon, D., Garban, B., Blanchard, M., Teil, M.J., Carru, A.M., Chesterikoff, C., Chevreuil, M., 2002. Vertical distribution and fate of trace metals and persistent organic pollutants in sediments of the Seine and Marne rivers (France). *Water Air and Soil Pollution* 134, 57–79.
- Pacyniak, E.K., Cheng, X.G., Cunningham, M.L., Crofton, K., Klaassen, C.D., Guo, G.L., 2007. The flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, are pregnane X receptor activators. *Toxicological Sciences* 97, 94–102.
- Pillon, A., Boussioux, A.M., Escande, A., Ait-Aissa, S., Gomez, E., Fenet, H., Ruff, M., Moras, D., Vignon, F., Duchesne, M.J., Casellas, C., Nicolas, J.C., Balaguer, P., 2005. Binding of estrogenic compounds to recombinant estrogen receptor alpha: application to environmental analysis. *Environmental Health Perspectives* 113, 278–284.
- Reddy, S., Brownawell, B.J., 2005. Analysis of estrogens in sediment from a sewage-impacted urban estuary using high-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 1041–1047.
- Ryan, J.A., Hightower, L.E., 1994. Evaluation of heavy-metal ion toxicity in fish cells using a combined stress protein and cytotoxicity assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 1231–1240.
- Sanchez, W., Katsiadaki, I., Piccini, B., Ditche, J.M., Porcher, J.M., 2008. Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: a multiparametric approach. *Environment International* 34, 490–498.
- Sanchez, W., Ait-Aissa, S., Palluel, O., Ditche, J.M., Porcher, J.-M., 2007. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* 16, 279–287.
- Soto, A.M., Calabro, J.M., Prechtl, N.V., Yau, A.Y., Orlando, E.F., Daxenberger, A., Kolok, A.S., Guillet, L.J., le Bizec, B., Lange, I.G., Sonnenschein, C., 2004. Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in eastern Nebraska, USA. *Environmental Health Perspectives* 112, 346–352.
- Sumpter, J.P., 2005. Endocrine disrupters in the aquatic environment: an overview. *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* 33, 9–16.
- Thomas, K.V., Hurst, M.R., Matthiessen, P., McHugh, M., Smith, A., Waldock, M.J., 2002. An assessment of in vitro androgenic activity and the identification of environmental androgens in United Kingdom estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1456–1461.
- Urbatzka, R., van Cauwenberge, A., Maggioni, S., Vigano, L., Mandich, A., Benfenati, E., Lutz, I., Kloas, W., 2007. Androgenic and antiandrogenic activities in water and sediment samples from the river Lambro, Italy, detected by yeast androgen screen and chemical analyses. *Chemosphere* 67, 1080–1087.
- Vethaak, A.D., Lahr, J., Schrap, S.M., Belfroid, A.C., Rijs, G.B.J., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A.S., Grinwis, G.C.M., Kuiper, R.V., Legler, J., Murk, T.A.J., Peijnenburg, W., Verhaar, H.J.M., de Voogt, P., 2005. An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of The Netherlands. *Chemosphere* 59, 511–524.
- Vindimian, E., Robault, C., Fillion, G., 1983. A method for co-operative and non co-operative binding studies using non-linear regression analysis on a microcomputer. *Journal of Applied Biochemistry* 5, 261–268.
- Vos, J.G., Dybing, E., Greim, H.A., Ladefoged, O., Lambre, C., Tarazona, J.V., Brandt, L., Vethaak, A.D., 2000. Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical Reviews in Toxicology* 30, 71–133.
- Wilson, V.S., Bobseine, K., Lambright, C.R., Gray, L.E., 2002. A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicological Sciences* 66, 69–81.

Synthèse des articles 1 et 2

Les résultats de ces deux études montrent la présence d'une activité *PXR-like* dans l'ensemble des extraits environnementaux testés, confirmant ainsi la capacité de notre lignée à détecter des composés actifs dans des matrices complexes. En particulier, les résultats de l'**article 1** ont montré l'intérêt du couplage entre les bioessais *in vitro* et des capteurs passifs pour la détection de contaminants actifs dans les eaux de surfaces, notamment pour la détection de polluants émergents polaires. Dans l'ensemble, ces résultats témoignent de la diversité des ligands environnementaux du hPXR, regroupant des composés présentant des propriétés physico-chimiques très variées et distribués aussi bien dans la colonne d'eau que le sédiment. Ils soulignent ainsi le besoin de considérer plusieurs compartiments (approche multi-compartiment) pour une caractérisation optimale de la contamination.

Par ailleurs, au regard des autres activités détectées, il semble que le hPXR apporte des informations supplémentaires concernant la contamination chimique. Notamment, les profils des activités œstrogénique et *PXR-like* différaient pour les effluent dans l'**article 1** et pour les sédiments dans l'**article 2**, suggérant que les composés détectés par les bioessais n'étaient pas les mêmes. Ces observations sont en faveur de la mise en œuvre d'approche multi-récepteurs intégrant le hPXR pour une détection optimale de polluants actifs.

Enfin, pour l'ensemble des échantillons analysés, une *mass balance analysis* a été entreprise. Globalement, les résultats montrent que les composés ciblés n'expliquent qu'une infime partie de l'activité *PXR-like* (<0.1% dans les POCIS et de 0.13 à 1.42 % dans les effluents-**article 1**, entre 0,005 et 0,035 % dans le sédiment-**article 2**). Ces résultats traduisent le manque de connaissance sur les ligands environnementaux du hPXR et soulignent le besoin de mettre en place des approches de type EDA pour leur identification.

1.2 Utilisation de l'activité CYP3A chez le poisson

La précédente partie a permis de mettre en évidence la présence de composés activateurs du hPXR d'une part dans la colonne d'eau et d'autre part dans le sédiment. Ces résultats confirment donc la pertinence de suivre d'autres voies de signalisation que celles médiées par le ER et le AhR pour une meilleure évaluation de la contamination. Néanmoins, compte tenu des fortes différences inter-espèces dans l'activation du PXR (Moore *et al.* 2002, Eckins *et al.* 2008), la présence de ligand du hPXR ne peut pas rendre compte d'un risque pour les organismes aquatiques. Nous avons donc entrepris de travailler sur le PXR de poisson. Ne disposant pas de modèle rapporteur de poisson pour ce récepteur, nous avons utilisé la mesure de l'activité du CYP3A dans différentes lignées cellulaires dérivés de cet organisme.

Le CYP3A est une enzyme jouant un rôle clef dans le métabolisme des xénobiotiques. Chez l'Homme elle est principalement régulée par le PXR (Kliwer *et al.* 2002), mais également par le CAR, le VDR et le GR (Pascussi *et al.* 2003). Chez le poisson, sa régulation est moins clairement établie, le PXR et le AhR pourraient être impliqués (Tseng *et al.* 2005, Bresolin *et al.* 2007, Li *et al.* 2008). Ainsi, à l'image de l'activité EROD utilisée pour la détection des composés *dioxin-like* activant le AhR, l'activité CYP3A pourrait potentiellement être employée pour la détection de xénobiotiques interagissant avec le PXR (Christen *et al.* 2009). Par ailleurs d'autres récepteurs intervenant également dans sa régulation, elle pourrait s'avérer intégratrice d'une diversité de voies de signalisation.

Dans le cadre de ce travail nous avons utilisé l'activité associée BFCOD fréquemment employée dans le règne animal pour le suivi de l'activité du CYP3A, notamment chez l'Homme et le poisson (Westerink et Schoonen 2007, Miranda *et al.* 2007, Hegelund *et al.* 2004, Hasselberg *et al.* 2005). De manière générale, il subsiste actuellement un manque d'information concernant la modulation de cette activité chez le poisson par des composés autres que des ligands du PXR. De plus, les résultats obtenus restent souvent contradictoires entre deux études. Notamment, Christen *et al.* (2009) rapporte une induction de cette activité par la rifampicin, un fort activateur du hPXR, sur des lignées cellulaires de poissons (i.e. PLHC-1, ZFL, RTG-2) alors que Smith *et al.* (2010) n'ont observé aucune modulation de l'activité par la rifampicin, la dexaméthasone ou encore le pregnenolone 16 α -carbonitrile (PCN) sur des microsomes hépatiques chez la truite arc en ciel et le choquemort (*Fundulus heteroclitus*).

Les objectifs étaient donc de déterminer (1) si l'activité BFCOD pouvait être utilisée comme un marqueur de l'activation du PXR ou d'autres récepteurs nucléaires chez le poisson pouvant témoigner de la contamination par des polluants émergents, (2) si elle pouvait apporter des informations supplémentaires sur la contamination d'échantillons environnementaux. Ainsi, nous avons d'abord entrepris la caractérisation de l'activité BFCOD *in vitro* et *in vivo* chez le poisson, pour ensuite mesurer cette activité dans des extraits de sédiment et de POCIS issus de sites impactés.

1.2.1 Caractérisation *in vitro* et *in vivo* de l'activité BFCOD

Compte tenu des différences inter-espèces marquées dans l'expression et l'activité catalytique de cette enzyme chez les poissons téléostéens (Schlenk *et al.* 2008), nous avons choisi de réaliser cette caractérisation *in vitro* sur trois lignées cellulaires hépatiques (PLHC-1, ZFL, RTL-W1) et *in vivo* sur larves de poisson zèbre de manière à tenir compte des aspects pharmaco-cinétiques à l'échelle de l'organisme, non considérés par nos bioessais *in vitro*.

La mesure de l'activité BFCOD sur des lignées cellulaires reste à ce jour très peu décrite dans la littérature. Actuellement seulement deux études rapportent son utilisation : Mensah Osman *et al.* (2007) sur lignées humaines (LS174T-adénocarcinome du colon ; OS187-ostéosarcome) et Christen *et al.* (2009) sur des lignées humaines (Huh7-Hépatome) et de poissons (PLHC-1, ZFL, RTG2-cellule gonadique de la truite arc en ciel, FHM- cellules épithéliale du vairon à tête de boule) En revanche, actuellement, aucune étude ne rapporte la mesure de l'activité BFCOD ou équivalente sur des larves de poissons vivantes.

Les objectifs de cette partie étaient (1) le développement et la caractérisation de bioessais *in vitro* et *in vivo* chez le poisson par la mise en place de la mesure de l'activité BFCOD en plaque 96 puits ; (2) le criblage de divers polluants environnementaux incluant des composés pharmaceutiques, des stéroïdes, des alkylphénols, des HAP et des dioxines (i.e. TCDD, HCDD, PCDD) de manière à établir si l'activité BFCOD pouvait permettre la détection de polluants émergents et plus particulièrement la détection spécifique de ligand du PXR. L'ensemble de ces investigations ont fait l'objet de l'**article 3**.

Article 3: Creusot *et al.*, (en préparation)

Modulation of CYP3A-like activity by aryl hydrocarbon and nuclear receptor ligands in fish cell lines and zebrafish embryos

Modulation of CYP3A-like activity by aryl hydrocarbon and nuclear receptor ligands in fish cell lines and zebrafish embryos

N. Creusot¹, F. Brion¹, B. Piccini¹, H. Budzinski², J.M. Porcher¹, and S. Aït-Aïssa^{1*}

¹ INERIS, Unité Écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, Parc ALATA, BP2, f-60550 Verneuil-en-Hallate, France

² EPOC/LPTC – UMR 5255 CNRS Université Bordeaux I, f-33405 Talence, France

*, Corresponding author:

Tel +33 344 556 511, Fax +33 344 556 767, E-mail adress: selim.ait-aissa@ineris.fr

Abstract

Assessment of exposure of fish to pharmaceuticals that contaminate aquatic environment is a major issue in ecotoxicology and there is a need to develop specific biological marker to achieve this goal. In mammal, cytochrome P4503A (CYP3A) is known to play a crucial role in the metabolism of endogenous and exogenous compounds and to be disrupted by various xenobiotics, notably pharmaceuticals. However, in fish, much less is known about the effect of chemicals on CYP3A activity. In this study, we assessed the capacity of several compounds belonging to different chemical families to modulate CYP3A in fish using benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin-O-debenzyloxylase (BFCOD) activity. For this purpose we developed 96 well plate *in vitro* and *in vivo* fish bioassays based on three liver cell lines (PLHC-1, ZFL, RTL-W1) and zebrafish embryos, respectively. Background BFCOD activity was detectable in all biological models and could be differently modulated by chemicals. Ligands for fish and/or human pregnane X receptor and glucocorticoid receptor (e.g. dexamethasone, rifampicin, RU486, clotrimazole, testosterone and di-hydroxytestosterone) were able to alter BFCOD activity but their effects differed among the models used. No common feature could be draw

considering their capacity to bind to these receptors, which contrast markedly with their known effect on mammalian CYP3A. In contrast, we found that both halogenated aromatic hydrocarbons (HAHs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) strongly induced BFCOD activity in a concentration-dependent manner *in vitro* (up to 30-fold induction), in all three cell lines, as well as *in vivo* in zebrafish embryos, in a AhR dependent manner. These data suggest a critical role of the AhR signaling pathway in the regulation of CYP3A in fish and raise the question of the relevance of using CYP3A activity to assess exposure of fish to pharmaceuticals. Altogether our results argue for a better understanding of the molecular mechanisms controlling transcription of CYP3A genes in fish.

Keywords : Fish CYP3A, xenobiotic, AhR, PXR

1. Introduction

Over the last decade, the effects of aquatic pollutants on endocrine functions in aquatic species has become a major issue in aquatic toxicology (Jobling and Tyler 2003). Disruption of hormonal homeostatis via alteration of cytochrome P450s (CYP) expression has been identified as one mechanism underlying endocrine disruption, among several others (Hotchkiss *et al.* 2008).

In mammals, CYP3A is one of the most abundant enzymes that plays a crucial role in the xenobiotic and endogenous steroids metabolism in the liver (Gibson and Plant 2002). In particular, the human CYP3A is able to metabolize 60 % of the current prescribed drugs (Burk and Wojnowski 2004). The transcription of gene coding for CYP3A is induced by many xenobiotics and endogenous substances such as steroids and their metabolites through their interaction with multiple nuclear receptor (Pelkonen *et al.* 2008). CYP3A is known to be mainly under the control of pregnane X receptor (PXR) but constitutive androstane receptor (CAR), vitamine D receptor (VDR) and glucocorticoid receptor (GR), are also involved (Moore and Kliewer 2000, Goodwin *et al.* 2001, Burk and Wojnowski, 2004, Pascucci *et al.* 2000). The human PXR is known to be the target of a diversity of environmental pollutants including numerous pharmaceuticals (Creusot *et al.* 2010 ; Sinz *et al.* 2006; Cui *et al.* 2008).

There exists evidence that various pharmaceuticals contaminate aquatic environment (Heberer 2002, Togola and Budzinski 2008, Barcelo and Petrovic 2008) and are able to impact non-target species, notably fish (Laville *et al.* 2004, Fent *et al.* 2006). Assessment of environmental contamination by pharmaceuticals and exposure of fish to these compounds has become a major issue in ecotoxicology (Fent *et al.* 2006). Given that mammalian CYP3A metabolized various xenobiotics compounds and can be disrupted by pharmaceuticals, *in vitro* measurement of CYP3A activity in fish has been proposed to assess contamination to these chemicals in aquatic systems (Gagne *et al.* 2006). However, recent studies have highlighted strong interspecies differences between human and fish PXR activation by various chemicals (Moore *et al.* 2002, Ekins *et al.* 2008). Furthermore, up to date, most of investigations in fish have concerned modulation of CYP3A activity and expression by a limited number of chemicals, including mainly human PXR ligands (e.g. rifampicin, clotrimazole and dexamethasone) (Tseng *et al.* 2005, Li *et al.* 2008, Christen *et al.* 2009, Wassmur *et al.* 2010, Vaccaro *et al.* 2007, Smith and Wilson 2010, Thibaut *et al.* 2009). These

studies have shown that CYP3A paralogs may differ between fish species with regards to modulation of gene expression and catalytic activity by such chemicals. But they also suggested that fish CYP3A is controlled by PXR (Li *et al.* 2008, Christen *et al.* 2009) and AhR/ARNT (Tseng *et al.* 2005), although the accurate mechanism remains unclear. Overall, there are needs to better characterize the effect of chemicals on fish CYP3A. The aim of this study was to assess the modulation of CYP3A activity in fish by various environmental ligands in specific fish bioassays. For this purpose, we developed 96 well plate *in vitro* and *in vivo* fish bioassays based on the 7-benzyloxy-4-trifluoromethylcoumarin-O-debenzyloxyase (BFCOD) (Mensah-Osman *et al.* 2007), which has been previously successfully used in fish cell lines (Christen *et al.* 2009) and in fish liver microsomes (Hegelund *et al.* 2004, Hasselberg *et al.* 2008). Because of the differential pattern gene expression between fish species (Bresolin *et al.* 2005, Li *et al.* 2008), and the major hepatic localization of CYP3A expression, we used three liver cell lines derived from different fish species. In addition, in order to take into account pharmacokinetic processes (adsorption, transport, metabolism...), we developed a bioassay based on living zebrafish embryos. First we characterized basal activity in three fish hepatic derivated cell lines (PLHC-1, ZFL and RTL-W1) and in zebrafish embryos. Then, we screened BFCOD activity modulation by a panel of environmental chemicals including persistent organic pollutants, pharmaceuticals, alkylphenols and steroids.

2. Materials & methods

2.1. Chemicals

2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), 1,2,3,7,8 Pentachlorodibenzo-p-dioxin (PCDD), Hexachlorodibenzo-p-dioxin (HCDD), benzo[a]pyrene (BaP), dibenzo[a]anthracene (DaA), benzo[a]anthracene (BaA), benzo[k]fluoranthene, dexamethasone (DEX), rifampicin (RIF), testosterone (T), carbamazepin, SR12813, clotrimazole, T0901317, ibuprofen, naproxen, bezafibrate, fenofibrate, aspirin,

ketoconazole, 8-methoxypsoralen (8-MOP), α -naphthoflavone, RU486, benzyloxy-4-[trifluoromethyl]-coumarin (BFC), 7-hydroxy-4-133 [trifluoromethyl]-coumarin (HFC), 7-ethoxyresorufin (7-ERF), resorufin ethyl ether, 17 β -estradiol (E2), 4-nonylphenol (4-NP), mixture of nonylphenol (mNP) were all purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

2.2. Cell culture and bioassay

2.2.1. Cell lines and culture condition

PLHC-1 cells derived from topminow (*Poeciliopsis lucida*) hepatoma provided by American Tissue Culture Collection (ATCC # CRL-2406). This cell model expresses single CYP1A isoform, which is strongly inducible by AhR ligands (Hahn *et al.* 1996). Cells were grown at 30°C in 5% CO₂ humidified atmosphere in Eagle's Minimal Essential Medium (E-MEM) supplemented with 10% of inactivated fetal calf serum (FCS), 1 % nonessential amino acids, penicillin/streptomycin (50 U/mL each) (all purchased from Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

ZFL (Zebrafish liver cells) were purchased from the ATCC (# CRL2643). They were derived from primary culture of normal adult zebrafish liver and exhibited an epithelial morphology (Gosh *et al.* 1994). ZFL cells were grown at 28°C in a mixture of Leibovitz's medium (L15) (50%, v/v), DMEM (35%, v/v) and Ham-F12 (15%, v/v) supplemented with mouse epidemial growth factor (EGF, 20 μ g/L), bovine insulin (10 mg/L) and inactivated FCS (5%).

RTL-W1 was a kind gift from Dr Kristin Schirmer (Department of Chemical Ecotoxicology, UFZ Centre for Environmental Research, Leipzig, Germany). This cell line was derived from primary cultures of normal liver of adult rainbow trout (Lee *et al.* 1993). These cells were grown in L15 medium supplemented with 7.5% of FCS.

2.2.2. CYP1A and CYP3A activity measurement

Cells were seeded into transparent 96-well plates at 1.10⁵ cells per well in 150 μ L culture medium. After 24h, cells were exposed to tested compound

for either 4, 24 or 48 h. Carrier solvent final concentration was always 0,1% v/v.

CYP3A was based on the measurement of BFC metabolism to fluorescent HFC (Stresser *et al.* 2000). Optimal assay condition were determining as following. After exposure to contaminants, medium culture was removed, each well was rinsed once with PBS, and refilled with 100 μ L of PBS containing 40 μ M of BFC. Kinetics of BFC metabolism by CYP3A was then monitor for 15 min in living cells with a spectrofluorophotometer (Saphire II, Tecan, Männedorf, Switzerland) using excitation and emission wavelenves of 410 nm and 530 nm, respectively (Mensah-Osman *et al.* 2007). For CYP1A, EROD measurement was processed exactly as previously described in Laville *et al.* (2004) for PLHC-1. Briefly, 5.10⁴ cells/well were seeded in transparent 96-well plate and left to grow up for 24h. Cells were exposed for 4h, 24h or 48h to serial dilution of toxic. EROD was processed in intact cells by the addition of 7-ERF 2 μ M (PLHC-1) or 7ERF 5 μ M (RTL-W1 and ZFL).

After the measurement of HFC or resorufin production kinetics, wells were washed twice with PBS and plates were frozen for 1 hour at -80°C. Total cellular proteins were then determined with the fluorescamine assay (Lorenzen and Kennedy 1993), using bovine serum albumin (BSA) as a standard for basal activity characterization. BFCOD and EROD activities were reported to total protein and expressed as pmol HFC or resorufin /min/mg protein.

2.2.3. Cytotoxicity assay

In order to assess cytotoxicity of contaminants, the 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay was used (Mosmann 1983). After cell exposure, culture medium was removed and replaced by 100 μ L of medium containing MTT. Cells were incubated for 3 h. In metabolically active cells, MTT is reduced onto a blue formazan precipitate, which was solubilised by adding 100 μ L of isopropanol after removal of MTT containing medium. Plates were then read at 570 nm against a 640 nm reference wavelength on a microplate reader (KC-4, BioTek Instruments, France).

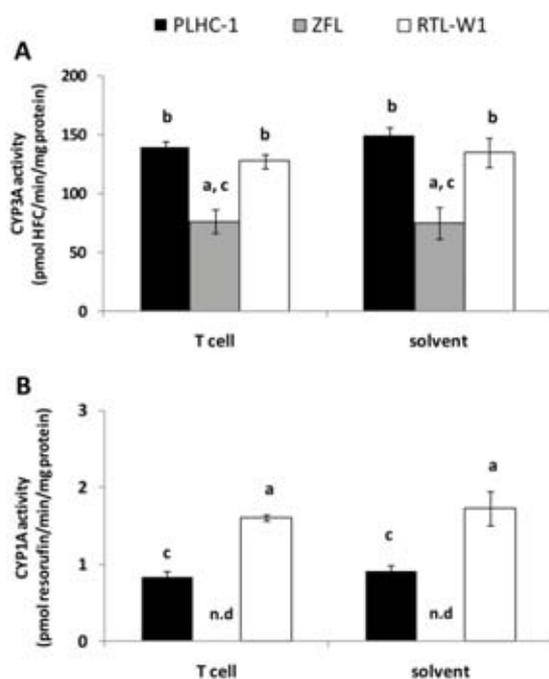


Figure 1. BFCOD (A) and EROD (B) basal activities in PLHC-1, ZFL and RTL-W1 cell lines. Results are expressed as pmol HFC/min/mg protein for BFCOD activity and as pmol resorufin/min/mg protein for EROD activity. a: significantly different from PLHC-1; b: significantly different from ZFL; c: Significantly different from RTL-W1 ($p < 0.05$).

2.3. Zebrafish embryos, xenobiotics exposures and CYP3A activity measurement

Sexually mature male and female zebrafish (*Danio rerio*, AB strain) were used as breeding stocks. The fish were raised in a re-circulated water system at 27°C under a controlled photoperiod (14h light/10 hdark cycle). They were fed twice daily with TetraMin fish flake and live brine shrimp (*Artemia* spp; Ocean Nutrition). For breeding, a spawning tray was placed in an aquarium containing 50 fish (sex ratio: 1 female : 2 males) and spawning of fish was stimulated by light. The next morning, eggs were collected, cleaned and randomly distributed into experimental groups. Each group consisted of 15 embryos in 100 ml of water kept in an incubator at 28 °C. Exposure to chemicals was from 0 to 4 dpf. Control groups were exposed to DMSO alone (DMSO;0.01%, v/v). At the end of the exposure period, each zebrafish larvae was manually

distributed into black 96-well microplates for fluorescence (Fluotrac 200, Greiner), at a rate of one 4 dpf-old zebrafish per well containing 200 μ L of water supplemented with BFC at a final concentration of 100 μ M. Kinetics of HFC production by BFCOD was then directly measured in living zebrafish for 5 hours with a spectrofluorophotometer thermostated at 27°C (Sapphire II, Tecan, Männedorf, Switzerland), using excitation and emission wavelenves of 410 nm and 530 nm, respectively. For each compound, at least three independent experiments were performed with $n = 3$ to 6 replicates per condition and per assay. BFCOD activities were calculated as UF/min and expressed as mean \pm SD of fold CYP3A activities above control.

2.4. Statistic analysis

Significant differences between exposed cells were determined by one way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey's bilateral posthoc test. A value of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

3.1. BFCOD and EROD basal activities in fish cell lines

BFCOD basal activity was detected in all three cell lines (**Figure 1A**). PLHC-1 and RTL-W1 cells showed the strongest BFCOD basal enzymatic activity, with 150 and 135 pmol HFC/min/mg prot, respectively. ZFL cells had a significantly 2-fold lower basal activity than the other cell lines (75 pmol/min/mg prot, $p < 0.05$). Interestingly, patterns of EROD activity differed from BFCOD activity. Basal EROD activity was detectable in PLHC-1 and RTL-W1 cells (1.0 and 1.6 pmol resorufin/min/mg prot, respectively) but not in ZFL cells (**Figure 1B**). Overall, the measured EROD specific activities were lower than BFCOD activity in all the three cell lines tested.

3.2. Screening of AhR, PXR, GR and AR ligands on BFCOD activity in fish cell lines

Several prototypical or well-described ligands of various nuclear receptor and AhR were tested for their capacity to alter BFCOD activity (**Table 1**). A range of concentrations of each substance was

Table 1. Screening of various nuclear receptor ligands in PLHC-1, ZFL and RTL-W1.
(No significant induction in white; Significant induction in gray; Significant inhibition in dark gray)

Chemicals	Receptors	Conc. (mol/l)	Fold effects (concentration for maximal effect)								
			PLHC1			ZFL			RTL-W1		
			4h	24h	48h	4h	24h	48h	4h	24h	48h
TCDD	AhR	1.E-12 - 1.E-8	5.0 (1 nM)	16.1 (1 nM)	17.4 (1 nM)	1.8 (1 nM)	11.2 (10 nM)	9.42 (10 nM)	3.13 (3 nM)	34.3 (0.1 nM)	33.4 (0.1 nM)
PCDD	AhR	1.E-12 - 1.E-9	3.5 (1 nM)	18.3 (1 nM)	15.8 (1 nM)	2.7 (3 nM)	5.6 (1 nM)	6.9 (1 nM)	2.6 (0.3 nM)	30.8 (0.1 nM)	25.9 (0.1 nM)
HCDD	AhR	3.E-13 - 1.E-9	1.6 (1 nM)	3.9 (1 nM)	3.3 (1 nM)	0.9 (1 nM)	9.9 (3 nM)	7.3 (1 nM)	2.1 (1 nM)	28.9 (1 nM)	28.6 (1 nM)
BAP	AhR	3.E-10 - 1.E-6	1.8 (0.3 nM)	4.5 (1 nM)	2.6 (1 nM)	0.9 (1 nM)	2.4 (1 nM)	2.5 (1 nM)	3.0 (0.1 nM)	28.7 (0.3 nM)	25.1 (1 nM)
BaA	AhR	3.E-10 - 1.E-6	2.6 (0.3 nM)	6.3 (0.3 nM)	4.9 (0.3 nM)	1.0 (0.3 nM)	1.2 (0.3 nM)	2.4 (0.3 nM)	2.9 (0.1 nM)	29.4 (0.3 nM)	27.8 (0.3 nM)
DaA	AhR	3.E-10 - 1.E-6	4.6 (0.3 nM)	16.2 (0.3 nM)	14.1 (0.3 nM)	4.8 (0.1 nM)	8.6 (1 nM)	11.8 (1 nM)	2.8 (0.3 nM)	20.4 (0.3 nM)	34.5 (0.3 nM)
BkF	AhR	3.E-10 - 1.E-6	4.0 (30 nM)	19.6 (0.3 nM)	13.2 (1 nM)	4.0 (3.E-7)	10.1 (0.3 nM)	12.7 (1 nM)	3.5 (30 nM)	23.6 (30 nM)	29.2 (0.1 nM)
Chlorimazole	AhR, PXR, GR	1.E-8 - 1.E-5	0.4 (3 nM)	0.3 (3 nM)	0.3 (3 nM)	0.6 (3 nM)	0.3 (1 nM)	0.4 (1 nM)	0.7 (3 nM)	5.5 (3 nM)	4.3 (3 nM)
Ketoconazole	AhR, PXR, GR	3.E-9 - 1.E-5	0.4 (3 nM)	0.3 (3 nM)	0.3 (3 nM)	0.7 (3 nM)	0.6 (3 nM)	0.6 (3 nM)	0.7 (3 nM)	7.3 (3 nM)	6.9 (3 nM)
SR12813	hPXR	1.E-6 - 1.E-5	0.4 (3 nM)	0.4 (3 nM)	0.3 (3 nM)	1.0 (3 nM)	1.0 (3 nM)	1.1 (3 nM)	0.9 (1 nM)	0.8 (3 nM)	1.2 (1 nM)
T0901317	hPXR	1.E-8 - 1.E-5	0.6 (3 nM)	0.5 (3 nM)	0.5 (3 nM)	0.9 (3 nM)	0.8 (1 nM)	0.7 (3 nM)	0.7 (3 nM)	1.5 (10 nM)	0.6 (3 nM)
Rifampicin	hPXR	1.E-5 - 2.E-4	1.2 (100 nM)	1.3 (100 nM)	1.8 (100 nM)	1.1 (100 nM)	1.0 (100 nM)	2.6 (100 nM)	1.3 (100 nM)	1.2 (100 nM)	2.2 (100 nM)
Carbamazepin	hPXR	1.E-6 - 1.E-4	1.0 (10 nM)	0.9 (10 nM)	0.5 (10 nM)	0.9 (10 nM)	1.0 (10 nM)	0.4 (10 nM)	0.9 (10 nM)	0.9 (10 nM)	0.6 (10 nM)
Dexamethasone	PXR, GR	1.E-8 - 1.E-5	1.0 (10 nM)	1.4 (10 nM)	1.7 (10 nM)	1.3 (3 nM)	0.9 (10 nM)	1.9 (10 nM)	1.6 (0.1 nM)	1.4 (3 nM)	1.6 (3 nM)
RU486	GR, AR, PXR	3.E-7 - 1.E-5	0.6 (3 nM)	0.5 (1 nM)	0.5 (3 nM)	0.9 (3 nM)	0.7 (3 nM)	0.5 (3 nM)	0.6 (3 nM)	0.5 (3 nM)	0.5 (3 nM)
Testosterone	AR, zPXR	1.E-6 - 1.E-4	1.1 (1 nM)	1.2 (100 nM)	1.4 (100 nM)	1.2 (10 nM)	0.9 (3 nM)	1.9 (100 nM)	1.0 (3 nM)	1.8 (1 nM)	1.7 (1 nM)
DHT	AR, zPXR	3.E-10 - 1.E-9	1.2 (1 nM)	1.0 (100 nM)	1.6 (100 nM)	1.2 (1 nM)	1.1 (3 nM)	1.8 (100 nM)	1.3 (3 nM)	1.9 (1 nM)	1.3 (1 nM)
17βE2	ER, PXR	1.E-8 - 1.E-7	1.1 (10 nM)	1.9 (10 nM)	1.1 (10 nM)	1.0 (0.1 nM)	1.0 (10 nM)	1.0 (10 nM)	1.2 (10 nM)	1.2 (10 nM)	1.1 (10 nM)
mNP	ER, PXR	1.E-7-1.E-5	0.9 (10 nM)	0.8 (10 nM)	0.9 (10 nM)	0.8 (10 nM)	0.9 (10 nM)	0.8 (1 nM)	1.1 (10 nM)	0.8 (10 nM)	0.9 (10 nM)

Values are expressed as the mean of three independent experiments

tested using three exposure durations in all the cell lines. Unless otherwise specified, MTT assays ran in parallel showed no alteration of cell viability at the concentrations described here as being active on BFCOD activity. The results summarized in the **table 1** show that AhR ligands were the strongest BFCOD inducing compounds in all three cell lines. The highest induction levels (from 20 up to 34-fold over control cells) were noted in RTL-W1 cells after 24 h exposure to dioxins (TCDD, PCDD) and PAHs (BkF, BaP, BaA, DaA), while induction levels were slightly lower in PLHC-1 (up to 20-fold) and ZFL (up to 12-fold) cells. In all cell lines, induction was maximal after 24 h and persisted after 48 h of exposure. However some differences were noted between cell lines regarding the potency of certain chemicals. For instance, BaP and BaA induced weakly to moderately CYP3A activity in PLHC-1 and ZFL cells whereas they behave as very strong inducers in RTL-W1 after 24 h (30-fold induction).

To a lesser extent than AhR ligands, other nuclear receptor ligands were also capable of significantly modulating BFCOD activity, either by inducing or inhibiting it. Among the eight human PXR ligands tested, RIF led to an increase of CYP3A-like activity in all the cell lines with a 2-3 fold induction of basal activity after 48 h exposure, while the imidazole compounds, clotrimazole and ketoconazole, induced BFCOD activity only in RTL-W1. The fungicide clotrimazole, known as a PXR agonist in human and fish (Moore *et al.* 2002), markedly induced CYP3A activity in RTLW-1 cells by 6 to 7-fold, while it led to a strong and significant decrease of this activity in PLHC-1 and ZFL cells (0.3 and 0.4 fold weaker than DMSO control respectively) at non cytotoxic concentrations. Ketoconazole, described as a hPXR antagonist (Eckins *et al.* 2007), showed a similar pattern of response in the different cell lines. Interestingly, the synthetic human PXR ligands (i.e. SR12813, T0901317) as well as carbamazepine led to an inhibition of basal BFCOD activity. Finally we tested also ligands of steroid receptor. Among them, DEX, T and DHT, which are GR and AR ligands respectively, induced the BFCOD activity in all the cell lines by 1.7 to 1.9-fold while RU486 a

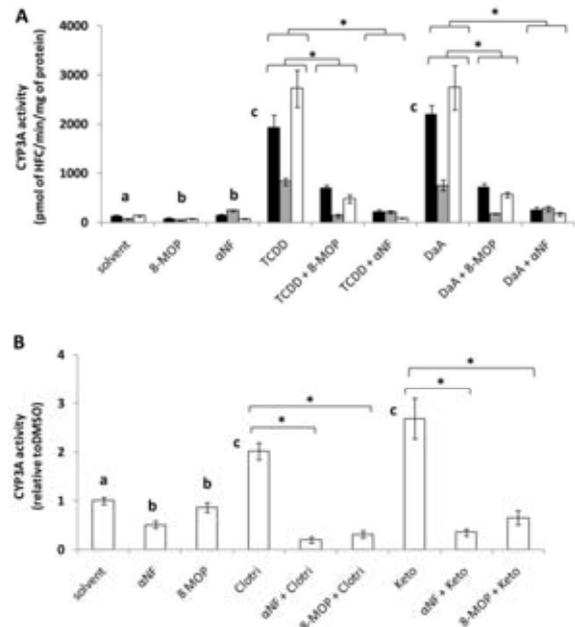


Figure 2. Modulation of BFCOD activities in PLHC-1, ZFL and RTL-W cell lines. **A-** Co-exposure to TCDD (1nM for PLHC-1 and RTL-W1, 10 nM for ZFL) or DaA (0.3 µM) and aNF (10 µM) or 8-MOP (10 µM); Results are expressed as pmol HFC/min/mg protein for BFCOD activity. *, significantly different from other conditions in the cell lines. **B-** Co-exposure to clotrimazole (Clotri) (3 µM) or ketoconazole (Keto) (3 µM) and aNF (10 µM) or 8-MOP (10 µM) in RTL-W1; Results are expressed as relative activity measured in the presence of solvent.

GR partial agonist, strongly reduced basal activity. 17β-E2 and mNP, known as estrogenic compounds and PXR activator respectively, did not modulate BFCOD activity.

3.3. Effect of binary mixtures on BFCOD activity in fish cell lines

As regard to our first results it seemed that CYP3A-like activity was mainly modulated by AhR ligands although other several NRs could be also potentially involved. In order to confirm the major role of AhR in the response observed, we evaluated the effect of binary mixture of TCDD/DaA/ketoconazole and aNF or 8-MOP, two repressors of AhR signaling pathway. ANF is a partial agonist of AhR, as well as a CYP1A enzyme inhibitor (Scott and Hodson 2008). 8-MOP is known to block AhR transactivation by interfering with the binding of activated AhR to xenobiotic

Table 2. Screening of AhR ligands in zebrafish embryos.

compounds	concentrations	Mean \pm SEM BFCOD (UF/min/larvae) activity expressed as fold activity above control
DMSO		1.00 \pm 0.02
HCDD	0.694 pM	1.05 \pm 0.11
	1.5625 pM	1.07 \pm 0.19
	3.125 pM	1.63 \pm 0.14 ^a
	6.25 pM	2.14 \pm 0.21 ^a
	12.5 pM	2.47 \pm 0.24 ^a
	25 pM	2.87 \pm 0.23^a
TCDD	0.694 pM	1.18 \pm 0.01
	1.5625 pM	1.11 \pm 0.04
	3.125 pM	1.30 \pm 0.23 ^a
	6.25 pM	2.18 \pm 0.18 ^a
	12.5 pM	2.71 \pm 0.21^a
	25 pM	2.11 \pm 0.22 ^a
PCDD	0.694 pM	1.25 \pm 0.21
	1.25 pM	1.76 \pm 0.16 ^a
	2.5 pM	1.74 \pm 0.14 ^a
	5 pM	2.34 \pm 0.12 ^a
	10 pM	2.92 \pm 0.25^a
	25 pM	1.37 \pm 0.07
BaA	0.03125 μ M	1.09 \pm 0.06
	0.0625 μ M	1.08 \pm 0.06
	0.125 μ M	1.26 \pm 0.07
	0.25 μ M	1.30 \pm 0.04
	0.5 μ M	1.42 \pm 0.09 ^a
	1 μM	1.83 \pm 0.02^a
BaP	0.03125 μ M	1.06 \pm 0.18
	0.0625 μ M	1.16 \pm 0.02
	0.125 μ M	1.33 \pm 0.10 ^a
	0.25 μ M	1.51 \pm 0.23 ^a
	0.5 μ M	1.92 \pm 0.12 ^a
	1 μM	2.06 \pm 0.43^a
daA	0.015625 μ M	0.99 \pm 0.13
	0.03125 μ M	1.04 \pm 0.19
	0.0625 μ M	1.10 \pm 0.23
	0.125 μ M	1.67 \pm 0.23 ^a
	0.25 μM	2.31 \pm 0.15^a
0.5 μ M	2.00 \pm 0.07 ^a	

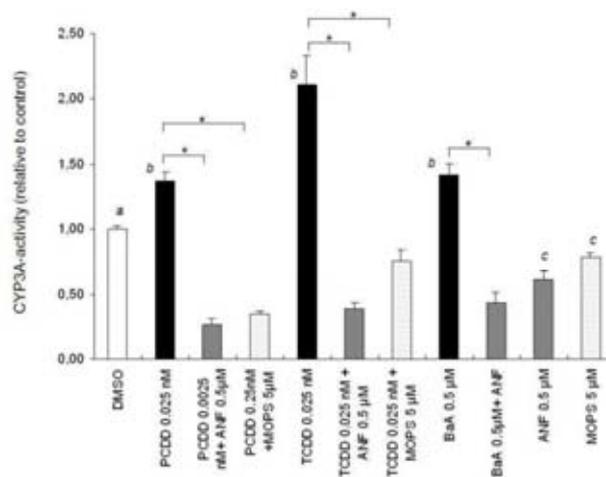
responsive elements (Navas and Segner 2000). Our results showed that α NF and 8-MOP led to the suppression of BFCOD activity induction by prototypical and atypical AhR ligands (**Figure 2**). Interestingly, α NF alone was able to increase BFCOD activity in ZFL cells while it decreased basal activity in RTL-W1 and had no significant effect in PLHC-1. Concerning 8-MOP, it reduced

significantly BFCOD basal activity in all the cell lines.

3.4. Basal activity and screening of AhR and nuclear receptors ligands on BFCOD activity in zebrafish embryos

In 4 dpf-old zebrafish embryos, BFCOD activity was consistently measured in control groups while at the same stage of development no EROD activity could be detected (data not shown). *In vivo* screening of various AhR agonists revealed that they triggered an increased of CYP3A-like activity (**Table 2**). Levels of inductions were weaker than in fish cell lines but inducing effects occurred at lower concentrations of AhR ligands as compared to *in vitro*. For instance, PCDD elicited maximal inducing effect at 10 pM in zebrafish embryos while it was 10 nM in ZFL cells. Interestingly, this higher sensitivity was found for all tested dioxin-like compounds (i.e. PCDD, HCDD and TCDD). PAHs (i.e. BaA, BaP, diBaA) were all able to induce BFCOD activity in a concentration-dependent manner but at higher concentration than *in vitro* assays.

Co-exposure of zebrafish embryos with either α NF or 8-MOP significantly blocked induction of BFCOD activity by AhR ligands, hence showing the involvement of functional AhR in mediating these effects. Interestingly, both α NF or 8-MOP


Figure 3. BFCOD activity measured in zebrafish embryos after an exposure to dioxin like compounds, alone or in mixture with α NF or 8-MOP (MOPS)

alone significantly reduced BFCOD activity in comparison to control zebrafish (**Figure 3**). Although EROD activity was not detected in control fish, all the dioxin-like compounds tested in this study were able to strongly induced EROD activity in a concentration-dependent manner at similar concentrations than those leading to BFCOD induction. These inducing effects were also blocked when embryos were co-exposed to α NF (data not shown).

Regarding other nuclear receptor ligands, we found that exposure of zebrafish embryos to RU486, clotrimazole and ketoconazole significantly inhibited BFCOD activity which is in agreement with the results found in ZFL cells (**Figure 4**). Interestingly, inhibitions of CYP3A-like activity by these compounds occurred at similar concentrations than those in ZFL cells. Regarding the effect of the human PXR ligands, RIF and DEX, no significant effect on BFCOD activity was detected in zebrafish embryos (data not shown).

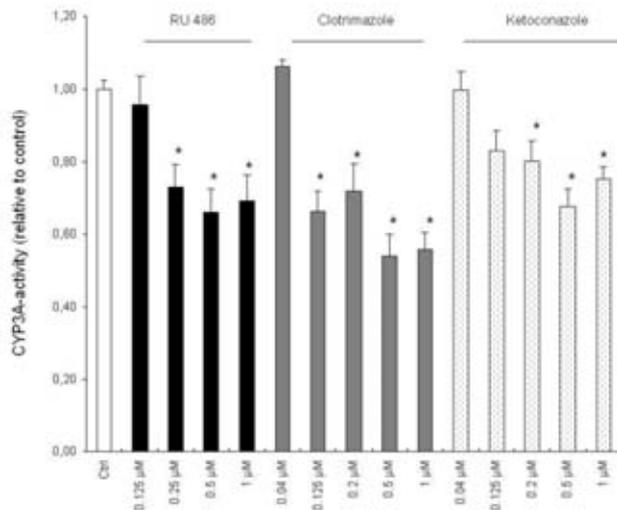


Figure 4. BFCOD activity measured in zebrafish embryos after an exposure to a range of concentration of RU486, clotrimazole and ketoconazole. Results are expressed as relative to the response measured in presence of solvent control. *, significantly different from control.

4. Discussion

4.1. BFCOD basal activity was detectable in the three cell lines and in zebrafish embryos

In this study, we characterized basal BFCOD activity in various *in vitro* and *in vivo* fish models by using BFC and compare it to the EROD activity, linked to CYP1A1.

First, up to date there is limited published data on BFCOD basal activity in fish organisms. Christen *et al.* (2009) have already reported the detection of BFCOD activity in control ZFL and PLHC-1 cells while Li *et al.* (2008) reported CYP3A-like activity in GCL (Grass Carp Liver) cells using the testosterone 6 β -Hydroxylase activity. Our results (**Figure 1**) are in accordance with the levels reported by Christen *et al.* (2009) who observed a stronger BFCOD activity in PLHC-1 than in ZFL cells. CYP3A enzymatic activity has been reported in liver of different fish species as several studies quantified BFCOD activity in S9 fraction, liver microsomes and hepatocytes of atlantic cod, killifish or rainbow trout (Hegelund *et al.* 2004, Hasselberg *et al.* 2005, Hasselberg *et al.* 2008, Smith *et al.* 2010). To our knowledge this study is the first to report CYP3A-like activity in zebrafish measured *in vivo* in living embryos.

Then, in the three fish cell lines, the basal EROD activity was detectable in PLHC-1 and RTL-W1 cells, which are well known as possessing phase I xenobiotic-metabolizing capacity (Behrens *et al.* 2001 and Bols *et al.* 1999). Overall, EROD levels in these cells were found as similar to those described in the literature (Thibaut *et al.* 2009). In ZFL cells and zebrafish embryos, no basal EROD activity was detected, however this activity was induced by various AhR ligands, either *in vitro* as previously reported (Miranda *et al.* 1993) or *in vivo* (data not shown).

Overall our results suggested that basal EROD and BFCOD activities differed between fish species, as previously reported in the litterature. Hasselberg *et al.* (2008) reported stronger EROD activity that BFCOD one in liver of juvenile rainbow trout while Hasselberg *et al.* (2005) found a stronger CYP3A than CYP1A activity in Atlantic cod. In teleost species, 15 CYP3A genes have been

identified in rainbow trout, killifish and medaka (McArthur *et al.* 2003, Schlenk *et al.* 2008). As in mammals, these CYP3A isoforms may differ with regard to gene expression, tissue distribution and catalytic activity (Kashiwada *et al.* 2005). This may account for observed between species differences concerning CYP3-like activity in control fish.

4.2. The fish BFCOD activity is modulated by various environmental compounds belonging to different chemical families.

With the view to characterize CYP3A-like activity in response to chemicals, we screened several compounds selected as belonging to different chemical families and able to interact with different nuclear receptors or AhR.

We first evaluated the modulation of BFCOD activity by human PXR ligands which are known to modulate CYP3A in mammals (Moore and Klierer 2000). The two hPXR agonists, RIF and DEX (Lehmann *et al.* 1998), induced BFCOD activity in all fish cell lines but had no significant effect *in vivo* in zebrafish embryos. The effects of these compounds on CYP3A expression and activity have been addressed in different fish species but contradictory results were reported. For instance, RIF have been shown to induce CYP3A-like activity in PLHC-1, ZFL and in GCL cells (Christen *et al.* 2009, Li *et al.* 2008) but was inactive in PLHC-1 and RTL-W1 (Thibaud *et al.* 2009). In PLHC-1, rainbow trout hepatocytes and GCL cells, no effect of DEX were reported (Celander *et al.* 1996, Wassmur *et al.* 2010, Li *et al.* 2008) while a 2-fold induction of BFCOD activity was reported in our study. *In vivo*, RIF and DEX failed to induce CYP3A-like activity in killifish or rainbow trout while in zebrafish embryos, Tseng *et al.* (2005) measured a significant up-regulation of the *cyp3a65* gene using *in situ* hybridization. In our study, no significant effect of RIF or DEX were measured on BFCOD activity *in vivo* in zebrafish.

Overall, these data show that these typical hPXR ligands had limited effect on CYP3A-like activity in fish either *in vitro* or *in vivo*, which contrasts markedly with their effect on human CYP3A activity (Pelkonen *et al.* 2008, Stresser *et al.* 2000). Such differences could rely on the species

difference between fish and human PXR. In this regard, DHT, T and CLO are interesting compounds since they have been shown to bind to zfPXR, CLO being a potent zfPXR agonist as compared to hPXR ((Milnes *et al.* 2008; Eckins *et al.* 2008, Moore *et al.* 2002). Our results indicate that DHT and T induced BFCOD activity in all the three fish cell lines while CLO induced it only in RTL-W1. In contrast, CLO inhibited BFCOD activity in PLHC-1 and ZFL as well as *in vivo* in zebrafish embryos. Conversely, increased mRNA expression of zfPXR and CYP3A genes has been reported in zebrafish liver treated with clotrimazole (Bresolin *et al.* 2005). Overall, these data indicate that PXR ligands led to different effect on CYP3A activity and behaved as inducing, inhibiting or inactive compounds depending on the biological model used; thus, no common feature could be drawn considering their capacity to bind to the zf or hPXR receptor.

As mentioned in **table 1**, these compounds are able to interact with other NR. For instance, CLO has been shown to interact with AhR but also to inhibit various CYPs enzymatic activities involved in the synthesis of hormones or in the xenobiotic metabolism (Miranda *et al.* 1998, Schlenck *et al.* 2008, Pelkonen *et al.* 2008, Hegelund *et al.* 2004, Hasselberg *et al.* 2008, Hinfray *et al.* 2006). The capacity of CLO to act as direct inhibitor of CYPs enzymes might explain its inhibitory effect on BFCOD activity in PLHC-1, ZFL cells and in zebrafish embryos. Interestingly, a structurally-related compound, ketoconazole, led to similar effect in these models. Conversely to CLO, ketoconazole was recently described as an antagonist of hPXR (Ekins *et al.* 2007) and human GR (Duret *et al.* 2006) but also acts as an agonist of AhR, as CLO (Korashy *et al.* 2007, Navas *et al.* 2004). Interestingly, CLO and KETO behaved as a potent inducers of CYP3A-like activity in RTL-W1 likely due to their capacity to activate the Ah receptor.

In addition to PXR, recent evidence suggests that GR is also indirectly involved in the regulation of CYP3A in mammals. Pascussi *et al.* 2003 reported that exposure of human hepatocytes to the glucocorticoid DEX increases the levels of PXR

mRNA and protein, leading to the potentiation of xenobiotic-mediated induction of CYP3A4. Such potentiation has been also reported in rat (Cooper *et al.* 2008). In the present study, exposure to binary mixture of DEX and RIF also led to a potentiation of CYP3A-like response in PLHC-1 and ZFL cells (up to two fold potentiation, data not shown) suggesting that similar effect occurred in these cell contexts. In addition, we showed that the GR antagonist RU486 background inhibited BFCOD activity in all the cell lines and in zebrafish embryos thus reinforcing the involvement of GR receptor in the regulation of fish CYP3A.

4.3. The fish BFCOD activity is strongly induced by all AhR ligands *in vitro* and *in vivo*.

A major outcome of this study is the finding that all the halogenated aromatic hydrocarbons (HAHs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) tested in this study strongly induced CYP3A-like activity in a concentration-dependent manner *in vitro* (up to 30-fold induction), in all the three cell lines, as well as *in vivo* in zebrafish embryos (**Tableau 1** and **2**, **Figure 2** and **3**). In vertebrates, these compounds are well known to induce CYP1A1 expression and activity notably in fish. As expected, HAHs and PAHs were able to induce EROD activity in our models. By co-exposing fish cell lines and zebrafish embryos to α NF and 8-MOP, we further show that functional AhR were involved in mediating these effects. Our results clearly agree with the study of Tseng *et al.* (2005) who showed that, in early developmental stage of zebrafish, CYP3A65 expression was up-regulated by TCDD through a mechanism involving the AHR2 signaling pathway. These authors also pointed out that the AhR2 signaling pathway plays a critical role in constitutive CYP3A65 transcription (Tseng *et al.* 2005).

In other fish species, very few information is available regarding modulation of CYP3A expression and activity by AhR ligands. For instance, exposure of killifish and rainbow trout to β -naphthoflavone, a prototypical AhR ligand, had no effect on CYP3A-like activity (Smith *et al.* 2010). Conversely, α NF induced BFCOD activity in rainbow trout (Schlenk *et al.* 2008) and CYP3A

expression in a human cell line (Yueh *et al.* 2005). In our study, induction of BFCOD was also observed in ZFL cells exposed to α NF alone while it inhibited activity induced by AhR ligands. The inducing effect of α -NF observed in ZFL could rely on the fact that this compound is able to activate the AhR receptor (Navas *et al.* 2000). Besides hydrocarbons, imidazole compounds clotrimazole and ketoconazole induced BFCOD activity in RTL-W1 through a mechanism that also involved AhR since induction were blocked by α -NF and 8-MOP. Difference of response between RTL-W1 and other fish cells tested in this study may rely on transcriptional co-factors expressions that differ between models that could influence the responsiveness of the cell lines (Marty *et al.* 2010). Differential expression levels of nuclear receptors and AhR may also have favoured one signaling pathway in a given cell line.

Overall, *in vitro* and *in vivo* effect of dioxin-like compounds showed that the AhR signaling pathway plays a major role in CYP3A expression and activity in fish. Since the promoter region of genes encoding for CYP3A has not been identified and their regulatory mechanism of transcription are still unclear. However, several hypotheses can be drawn such as direct activation of CYP3A promoter through the AhR binding on dioxin responsive element, indirect modulation through interaction of AhR with other transcription factors, such as PXR or GR or other unidentified factors that control CYP3A genes transcription directly (Tseng *et al.* 2005). Clearly, further researches are needed to decipher the molecular mechanism of regulation of CYP3A in fish by these compounds.

5. Conclusions and perspectives

In this study, we reported (1) the successfully detection and quantification of fish-BFCOD activity in three fish cell lines and zebrafish embryos; (2) its the modulation by various environmental pollutants; (3) and the inducing effect of dioxine-like compounds on CYP3A activity in both *in vitro* and *in vivo* fish models suggesting a critical role of the AhR signaling pathway in its regulation.

Given the widespread contamination of the aquatic environment by several of these compounds, modulation of CYP3A activity in fish inhabiting contaminated rivers should be interpreted with caution. Overall, our study underline that extrapolation from mammals to fish systems, and between fish species, should be carefully considered for CYP3A responses and thus argue for a better understanding of the molecular mechanisms controlling transcription of CYP3A genes in fish.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr K. Schirmer and Dr N.C Bols for the kind gift of RTL-W cells.

References

- Barcelo, D. and M. Petrovic (2008). "Emerging contaminants from industrial and municipal waste." *The handbook of environmental chemistry*.
- Behrens, A., K. Schirmer, N. C. Bols and H. Segner (2001). "Polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1, and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes." *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(3): 632-643.
- Bols, N. C., K. Schirmer, E. M. Joyce, D. G. Dixon, B. M. Greenberg and J. J. Whyte (1999). "Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-o-deethylase activity in a trout liver cell line." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **44**(1): 118-128.
- Bresolin, T., M. D. Rebelo and A. C. D. Bairy (2005). "Expression of PXR, CYP3A and MDR1 genes in liver of zebrafish." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **140**(3-4): 403-407.
- Burk, O. and L. Wojnowski (2004). "Cytochrome P450 3A and their regulation." *Naumyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology* **369**(1): 105-124.
- Celander, M., M. E. Hahn and J. J. Stegeman (1996). "Cytochromes P450 (CYP) in the Poeciliopsis lucida hepatocellular carcinoma cell line (PLHC-1): Dose- and time-dependent glucocorticoid potentiation of CYP1A induction without induction of CYP3A." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **329**(1): 113-122.
- Christen, V., D. M. Oggier and K. Fent (2009). "A Microtiter-Plate-Based Cytochrome P450 3a Activity Assay in Fish Cell Lines." *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**(12): 2632-2638.
- Cooper, B. W., T. M. Cho, P. M. Thompson and A. D. Wallace (2008). "Phthalate induction of CYP3A4 is dependent on glucocorticoid regulation of PXR expression." *Toxicological Sciences* **103**(2): 268-277.
- Cui, X. M., A. Thomas, V. Gerlach, R. E. White, R. A. Morrison and K. C. Cheng (2008). "Application and interpretation of hPXR screening data: Validation of reporter signal requirements for prediction of clinically relevant CYP3A4 inducers." *Biochemical Pharmacology* **76**(5): 680-689.
- Duret, C., M. Daujat-Chavanieu, J. M. Pascussi, L. Pichard-Garcia, P. Balaguer, J. M. Fabre, M. J. Vilarem, P. Maurel and S. Gerbal-Chaloin (2006). "Ketoconazole and Miconazole Are Antagonists of the Human Glucocorticoid Receptor: Consequences on the Expression and Function of the Constitutive Androstane Receptor and the Pregnane X Receptor." *Molecular Pharmacology* **70**(1): 329-339.
- Ekins, S., C. Chang, S. Mani, M. D. Krasowski, E. J. Reschly, M. Iyer, V. Kholodovych, N. Ai, W. J. Welsh, M. Sinz, P. W. Swaan, R. Patel and K. Bachmann (2007). "Human pregnane X receptor antagonists and Agonists define molecular requirements for different binding sites." *Molecular Pharmacology* **72**(3): 592-603.
- Ekins, S., E. J. Reschly, L. R. Hagey and M. D. Krasowski (2008). "Evolution of pharmacologic specificity in the pregnane X receptor." *Bmc Evolutionary Biology* **8**.
- Fent, K., C. Escher and D. Caminada (2006). Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. 34th Annual Conference of the European-Teratology-Society, Abano Terme, ITALY, Pergamon-Elsevier Science Ltd.
- Gagne, F., C. Blaise and C. Andre (2006). "Occurrence of pharmaceutical products in a municipal effluent and toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **64**(3): 329-336.
- Gibson, G. G. and N. J. Plant (2002). "Receptor-dependant transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man " *xenobiotica* **32**(3): 165-206.
- Goodwin, B., L. B. Moore, C. M. Stoltz, D. D. McKee and S. A. Kliewer (2001). "Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor." *Molecular Pharmacology* **60**(3): 427-431.
- Gosh, Zhou and Collodi (1994). "Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line." *Cell biology and toxicology* **10**: 167-176.
- Hahn, M. E., B. L. Woodward, J. J. Stegeman and S. W. Kennedy (1996). "Rapid assessment of induced cytochrome P4501A protein and catalytic activity in fish hepatoma cells grown in multiwell plates: Response to TCDD, TCDF, and two planar PCBS." *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(4): 582-591.
- Hasselberg, L., B. E. Grøsvik, A. Goksøyr and M. C. Celander (2005). "Interactions between xenoestrogens and ketoconazole on hepatic CYP1A and CYP3A, in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*)." *Comparative Hepatology* **4**(2).
- Hasselberg, L., S. Westerberg, B. Wassmur and M. C. Celander (2008). "Ketoconazole, an antifungal imidazole, increases the sensitivity of rainbow trout to 17 alpha-ethynylestradiol exposure." *Aquatic Toxicology* **86**(2): 256-264.

- Heberer, T. (2002). "Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data." *Toxicology Letters* **131**(1-2): 5-17.
- Hegelund, T., K. Ottosson, M. Radinger, P. Tomberg and M. C. Celander (2004). "Effects of the antifungal imidazole ketoconazole on CYP1A and CYP3A in rainbow trout and killifish." *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(5): 1326-1334.
- Hinfray, N., J. M. Porcher and F. Brion (2006). "Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **144**(3): 252-262.
- Hotchkiss, A. K., C. V. Rider, C. R. Blystone, V. S. Wilson, P. C. Hartig, G. T. Ankley, P. M. Foster, C. L. Gray and L. E. Gray (2008). "Fifteen years after "Wingspread" - Environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go." *Toxicological Sciences* **105**(2): 235-259.
- Jobling, S. and C. R. Tyler (2003). "Endocrine disruption in wild freshwater fish." *Pure and Applied Chemistry* **75**(11-12): 2219-2234.
- Kashiwada, S., D. E. Hinton and S. W. Kullman (2005). "Functional characterization of medaka CYP3A38 and CYP3A40: Kinetics and catalysis by expression in a recombinant baculovirus system." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **141**(4): 338-348.
- Korashy, H. M., A. Shayeganspour, D. R. Brocks and A. O. S. El-Kadi (2007). "Induction of Cytochrome P450 1A1 by Ketoconazole and Itraconazole but not Fluconazole in Murine and Human Hepatoma Cell Lines." *TOXICOLOGICAL SCIENCES* **97**: 32-43.
- Laville, N., S. Ait-Aissa, E. Gomez, C. Casellas and J. M. Porcher (2004). "Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes." *Toxicology* **196**(1-2): 41-55.
- Lee, L. E. J., J. H. Clemons, D. G. Bechtel, S. J. Caldwell, K. B. Han, M. Pasitschniakarts, D. D. Mosser and N. C. Bols (1993). "Development and Characterization of a Rainbow-Trout Liver-Cell Line Expressing Cytochrome P450-Dependent Monooxygenase Activity." *Cell Biology and Toxicology* **9**(3): 279-294.
- Lehmann, J. M., D. D. McKee, M. A. Watson, T. M. Willson, J. T. Moore and S. A. Kliewer (1998). "The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions." *Journal of Clinical Investigation* **102**(5): 1016-1023.
- Li, D., X. L. Yang, S. J. Zhang, M. Lin, W. J. Yu and K. Hu (2008). "Effects of mammalian CYP3A inducers on CYP3A-related enzyme activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): Possible implications for the establishment of a fish CYP3A induction model." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **147**(1): 17-29.
- Lorenzen, A. and S. W. Kennedy (1993). "A Fluorescence-Based Protein Assay for Use with a Microplate Reader." *Analytical Biochemistry* **214**(1): 346-348.
- Marty, M. S., E. W. Carney and J. C. Rowlands (2010). "Endocrine Disruption: Historical Perspectives and its Impact on the Future of Toxicology Testing." *Toxicological Sciences*: S93-S108.
- McArthur, A. G., T. Hegelund, R. L. Cox, J. J. Stegeman, M. Liljenberg, U. Olsson, P. Sundberg and M. C. Celander (2003). "Phylogenetic analysis of the cytochrome P450 3 (CYP3) gene family." *Journal of Molecular Evolution* **57**(2): 200-211.
- Mensah-Osman, E. J., D. G. Thomas, M. M. Tabb, J. M. Larios, D. R. Hughes, T. J. Giordano, M. L. Lizyness, J. M. Rae, B. Blumberg, P. F. Hollenberg and L. H. Baker (2007). "Expression levels and activation of a PXR variant are directly related to drug resistance in osteosarcoma cell lines." *Cancer* **109**(5): 957-965.
- Miranda, C. L., Collodi and X. Zhao (1993). "Regulation of cytochrome P450 expression in a novel liver cell lines from zebrafish." *Archives of biochemistry and biophysics* **305**(2): 320-327.
- Miranda, C. L., M. C. Henderson and D. R. Buhler (1998). "Evaluation of chemicals as inhibitors of trout cytochrome P450s." *Toxicology and Applied Pharmacology* **148**(2): 237-244.
- Moore, J. T. and S. A. Kliewer (2000). "Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions." *Toxicology* **153**(1-3): 1-10.
- Moore, L. B., J. M. Maglich, D. D. McKee, B. Wisely, T. M. Willson, S. A. Kliewer, M. H. Lambert and J. T. Moore (2002). "Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors." *Molecular Endocrinology* **16**(5): 977-986.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays." *Journal of Immunological Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Navas, J. M., A. Chana, B. Herradón and H. Segner (2004). "Induction of cytochrome P4501A (CYP1A) by clotrimazole, a non-planar aromatic compound. Computational studies on structural features of clotrimazole and related imidazole derivatives." *Life Sciences* **76**(6): 699-714.
- Navas, J. M. I. a. and H. Segner (2000). "Anti-estrogenicity of ̢-naphthoflavone and PAHs in cultured rainbow trout hepatocytes: evidence for a role of the arylhydrocarbon receptor." *Aquatic Toxicology* **51**(1): 79-92.
- Pascussi, J. M., L. Drocourt, J. M. Fabre, P. Maurel and M. J. Vilarem (2000). "Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-α expression in human hepatocytes: Synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators." *Molecular Pharmacology* **58**(2): 361-372.
- Pascussi, J. M., S. Gerbal-Chaloin, L. Drocourt, P. Maurel and W. Vilarem (2003). The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. 12th International Symposium on Cellular Biology of Cytochrome P450 Regulation, La Grande Motte, France, Elsevier Science Bv.
- Pelkonen, O., M. Turpeinen, J. Hakkola, P. Honkakoski, J. Hukkanen and H. Raunio (2008). "Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes:

- current status." *Archives of Toxicology* **82**(10): 667-715.
- Schlenk, D., M. Celander, E. P. Gallagher, S. George, M. James, S. W. Kullman, P. van den Hurk and K. Willett (2008). Biotransformation in Fishes. *The toxicology of fishes* R. T. Di Giulio and D. E. Hinton, CRC Press - Taylor & Francis Group: 153-234.
- Scott, J. A. and P. V. Hodson (2008). "Evidence for multiple mechanisms of toxicity in larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) co-treated with retene and alpha-naphthoflavone." *Aquatic Toxicology* **88**(3): 200-206.
- Sinz, M., S. Kim, Z. R. Zhu, T. S. Chen, M. Anthony, K. Dickinson and A. D. Rodrigues (2006). "Evaluation of 170 xenobiotics as transactivators of human pregnane X receptor (hPXR) and correlation to known CYP3A4 drug interactions." *Current Drug Metabolism* **7**(4): 375-388.
- Smith, E. M. and J. Y. Wilson (2010). "Assessment of cytochrome P450 fluorometric substrates with rainbow trout and killifish exposed to dexamethasone, pregnenolone-16 alpha-carbonitrile, rifampicin, and beta-naphthoflavone." *Aquatic Toxicology* **97**(4): 324-333.
- Stresser, D. M., A. P. Blanchard, S. D. Turner, J. C. L. Erve, A. A. Dandeneau, V. P. Miller and C. L. Crespi (2000). "Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: Analysis of 27 test compounds with four fluorometric substrates." *Drug Metabolism and Disposition* **28**(12): 1440-1448.
- Thibaut, R., S. Schnell and C. Porte (2009). "Assessment of metabolic capabilities of PLHC-1 and RTL-W1 fish liver cell lines." *Cell Biology and Toxicology* **25**(6): 611-622.
- Togola, A. and H. Budzinski (2008). "Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples." *Journal of Chromatography A* **1177**(1): 150-158.
- Tseng, H. P., T. H. Hseu, D. R. Buhler, W. D. Wang and C. H. Hu (2005). "Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva." *Toxicology and Applied Pharmacology* **205**(3): 247-258.
- Vaccaro, E., A. Salvetti, R. Del Carratore, S. Nencioni, V. Longo and P. G. Gervasi (2007). "Cloning, tissue expression, and inducibility of CYP 3A79 from sea bass (*Dicentrarchus labrax*)." *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **21**(1): 32-40.
- Wassmur, B., J. Grans, P. Kling and M. C. Celander (2010). "Interactions of pharmaceuticals and other xenobiotics on hepatic pregnane X receptor and cytochrome P450 3A signaling pathway in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Aquatic Toxicology* **100**(1): 91-100.
- Yueh, M. F., M. Kawahara and J. Raucy (2005). "High volume bioassays to assess CYP3A4-mediated drug interactions: Induction and inhibition in a single cell line." *Drug Metabolism and Disposition* **33**(1): 38-48.

Synthèse de l'article 3

Les résultats de cette étude montrent que l'activité BFCOD, détectable et inductible dans l'ensemble des modèles considérés, est principalement modulée par des ligands du AhR mais également, dans une moindre mesure, par des ligands du PXR et du GR. L'activité BFCOD n'est donc pas un marqueur spécifique de l'activation du PXR et à ce titre ne peut pas être utilisée pour l'unique détection des ligands du PXR de poisson. Ainsi, nos résultats mettent en évidence que d'autres outils devront être développés et évalués pour la détection de ligand de ce récepteur chez le poisson. A ce titre, l'utilisation de modèles *in vitro* ou *in vivo* avec gènes rapporteurs basés sur le PXR de poisson semble une piste intéressante.

D'un point de vue mécanistique, ces résultats suggèrent le rôle majeur du récepteur AhR dans la régulation du CYP3A chez le poisson ce qui est peu décrit dans la littérature. Néanmoins, en accord avec la littérature, nos résultats indiquent également que les récepteurs PXR et GR pourraient aussi intervenir dans cette régulation. Toutefois, des investigations supplémentaires seront indispensables afin de mieux caractériser les mécanismes sous-jacents aux réponses mesurées dans nos bioessais (e.g. expression de gène, fixation à l'ADN, fixation au récepteur...).

Enfin, nos résultats mettent en évidence des différences inter-modèles dans l'inductibilité, la sensibilité et les réponses aux composés testés. Globalement, les modèles *in vitro* sont plus sensibles et plus inductibles que le modèle *in vivo*. Mais des différences ont également été observées entre les modèles *in vitro* (e.g. imidazoles). Dans le cas présent les modèles cellulaires PLHC-1 et ZFL semblaient être les plus prédictifs de la réponse mesurée sur le modèle embryo-larvaire. Ces résultats mettent en lumière l'importance du contexte cellulaire et/ou physiologique pour la caractérisation de l'effet de contaminants.

L'ensemble des résultats souligne que la régulation du CYP3A chez le poisson reste encore mal connue et que des investigations seront nécessaires afin de mieux établir le risque environnemental associés aux composés pouvant interagir avec cette enzyme clef du métabolisme des xénobiotiques.

1.2.2 Évaluation *in situ* de l'activité BFCOD

En complément aux résultats présentés dans l'article 3, il nous a paru important de déterminer si l'activité BFCOD pouvait apporter des informations supplémentaires, en comparaison de l'activité EROD dédiée à la détection spécifique des ligands du AhR, sur la contamination chimique des matrices environnementales.

Ainsi, nos différents modèles ont été exposés à des gammes de dilution d'extraits environnementaux, et les activités BFCOD et EROD ont été mesurées après 24 et 4 h d'exposition. Pour les modèles *in vitro*, deux extraits ont été testés : le premier est un extrait de sédiment fortement contaminé par des composés *dioxin-like*, le deuxième un extrait de POCIS faiblement contaminé par des composés *dioxin-like* mais très fortement contaminé par des ligands du hPXR (Figure 38). En parallèle, des larves de poisson zèbre ont été exposées à quatre extraits de sédiment plus ou moins contaminés en composés *dioxin-like* (Figure 37).

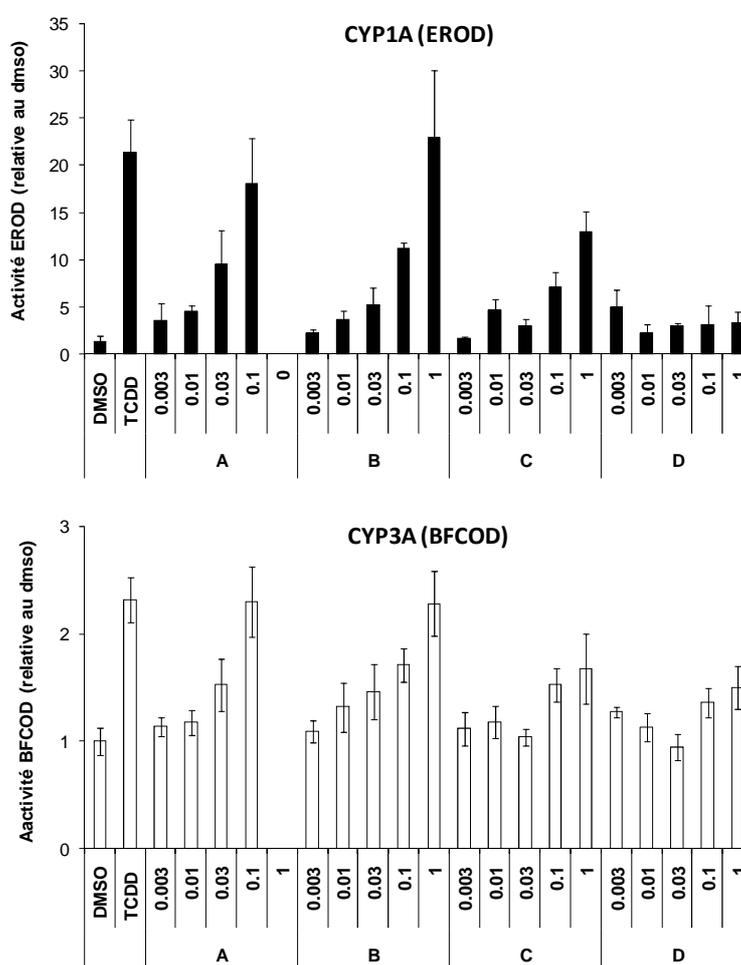


Figure 37. Activité EROD/BFCOD dans le modèle embryo-larvaire exposé à des extraits de sédiment (Contamination en composés dioxin-like : A>B>C>D)

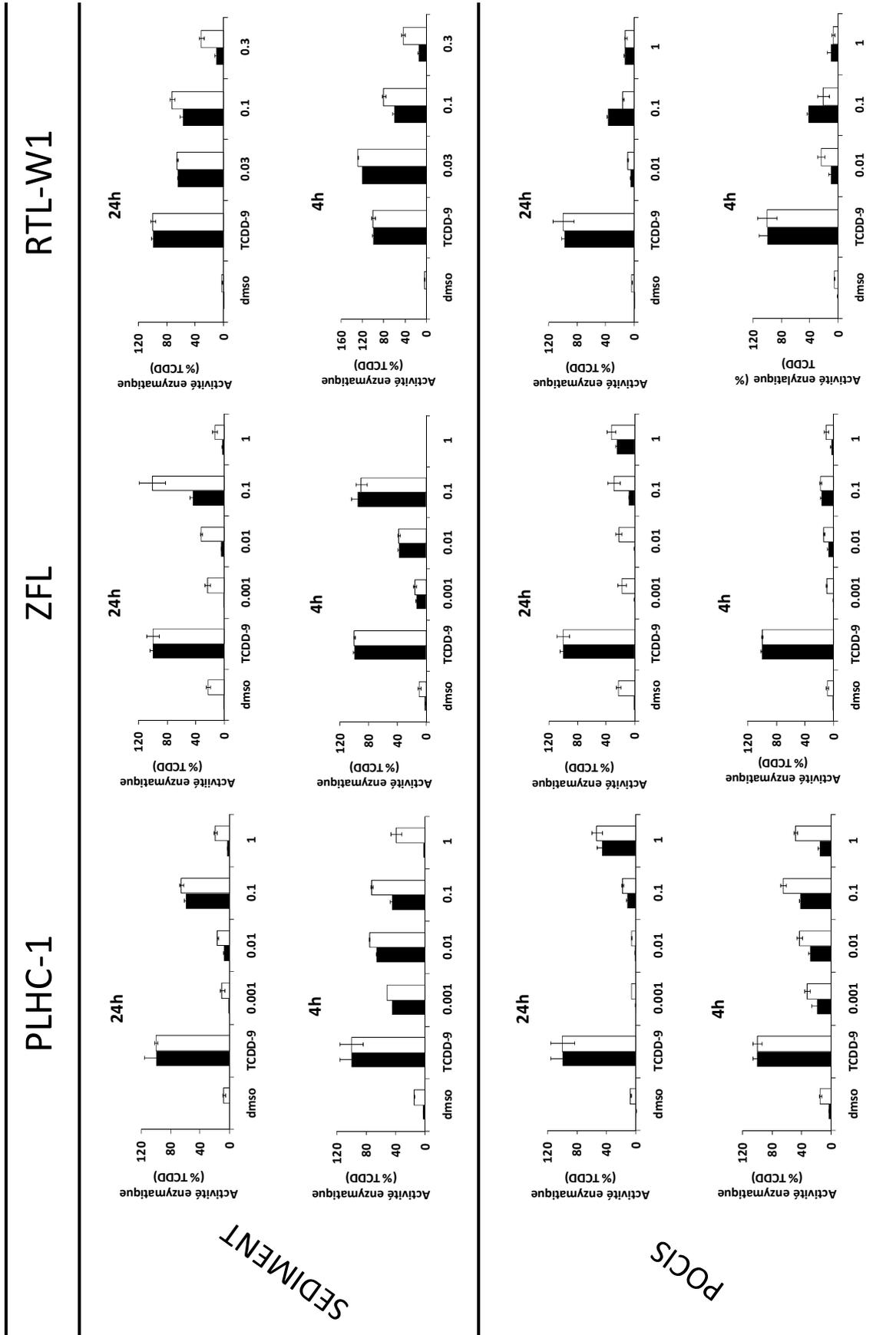


Figure 38. Activité EROD et BFCOD dans les modèles *in vitro* exposés à des extraits environnementaux (EROD en noir et BFCOD en blanc)

Les résultats montrent un très fort parallélisme dans les réponses obtenues pour l'activité EROD et l'activité BFCOD aussi bien pour les modèles *in vitro* que pour les larves de poisson zèbre. Ces observations confirment que l'activité BFCOD est principalement un marqueur du AhR mais montrent également que le suivi de cette activité au sein de matrices environnementales ne fournit pas d'informations supplémentaires sur l'état de contamination en comparaison à l'activité EROD.

1.3 Conclusions

Cette première partie des résultats nous a amené à évaluer de nouveaux outils pour la biodétection de PE dans les matrices environnementales de manière à accroître notre capacité de diagnostic environnemental. Nos résultats montrent que la lignée HG5LN-hPXR permet la détection d'une diversité de composés et qu'utilisée en combinaison à d'autres bioessais (ER, AR, AhR), elle apporte des informations supplémentaires sur l'état de contamination. En ce qui concerne la mesure de l'activité BFCOD, nos résultats semblent indiquer que cette activité est majoritairement un marqueur de l'activation du AhR et qu'à ce titre elle n'apporte aucun complément d'information sur l'état de contamination au regard de l'activité EROD. Ainsi, suite à ces observations, seule la lignée HG5LN-hPXR a été intégrée à notre batterie de bioessais.

Dans la démarche bio-analytique du travail de thèse, cette première partie a permis de montrer que la mise en œuvre d'une approche multi-récepteurs était particulièrement pertinente en première approche pour une caractérisation de la contamination d'échantillons multi-contaminés. Par ailleurs, elle confirme également le besoin de considérer plusieurs compartiments pour une meilleure évaluation de la contamination. Enfin, elle met en évidence que le couplage d'analyses biologiques et chimiques (i.e. ciblés sur des substances prioritaires) dans le cadre d'une approche MBA est généralement insuffisant pour l'identification des composés responsables des activités mesurées. Ainsi d'autres approches doivent être mises en jeu pour une caractérisation complète de la contamination, tout particulièrement pour l'identification de substances actives.

2. Mise en œuvre de l'EDA pour l'identification de PE

L'approche EDA est employée et reconnue comme une méthode permettant l'identification de composés actifs au sein de matrices environnementales (Brack *et al.* 2007). Elle a pour vocation d'aider à optimiser l'évaluation du risque environnemental à travers la caractérisation du potentiel toxique de certains contaminants présents dans des mélanges complexes. Concernant les perturbateurs endocriniens, cette approche s'est principalement intéressée aux composés œstrogéniques et *dioxin-like* dont l'occurrence environnementale est largement décrite (Tyler *et al.* 1998, Sumpter *et al.* 2005, Hotchkiss *et al.* 2008) mais dont l'identité reste souvent non établie.

La présence avérée de contaminants émergents dans le milieu aquatique (composés pharmaceutiques, produits cosmétiques) (Barcelo et Petrovic 2008, Runnalls *et al.* 2010) suscite actuellement un grand intérêt pour l'étude d'autres voies de signalisation associées à d'autres récepteurs nucléaires (GR, TR, PR, AR). Ainsi de récentes études rapportent la présence dans les milieux aquatiques de composés activateurs d'autres voies de signalisation (Van der Linden *et al.* 2008, Weiss *et al.* 2009b, Jugan *et al.* 2009). Dans la première partie des résultats, nous avons notamment mis en évidence la présence d'activateurs du hPXR dans la colonne d'eau mais également dans le sédiment. Les rôles clef de ces récepteurs et la présence dans l'environnement de composés susceptibles de les activer soulignent d'une part la nécessité d'intégrer ces voies de signalisation pour une meilleure évaluation de la contamination chimique et d'autre part le besoin d'identifier ces substances.

La deuxième partie des résultats présente la mise en œuvre d'une stratégie bio-analytique de type EDA pour la caractérisation de la contamination par les PE et leur identification. La mise en œuvre d'une telle stratégie a impliqué en amont d'optimiser les différentes étapes (i.e. extraction, fractionnement) de manière à tenir compte d'une diversité de PE actifs au regard de l'approche multi-récepteurs employée. Ainsi, dans un premier temps, sont présentés la calibration d'outils physico-chimique pour l'étude des PE dans la colonne d'eau (**Article 4**) et le sédiment (**Article 5**). Il s'en suit l'application de notre démarche d'une part sur une petite rivière française soumise à une contamination d'origine urbaine et agricole (**Articles 6 et 7**) et d'autre part sur une rivière exposée à un rejet pharmaceutique (**Article 8**).

2.1 Calibration d'outils physico-chimiques

2.1.1 Échantillonnage passif de la colonne d'eau

De manière à palier les limites liées à l'échantillonnage ponctuel, nous avons décidé d'utiliser des capteurs passifs de type POCIS permettant l'échantillonnage de composés polaires ($\log K_{ow} < 3$) présents à l'état de trace. L'**article 4** présente ainsi l'évaluation des performances d'échantillonnage des POCIS au regard des prélèvements ponctuels classiquement employés. Au delà du seul échantillonnage, il est important de garantir la bonne extraction des composés captés par de tels dispositifs, les rendements d'extractions de diverses classes de contaminants organiques captés par les POCIS sont ainsi mesurés. Enfin cet article présente une illustration de l'utilisation combinée de ces échantillonneurs avec des bioessais *in vitro* déjà abordée dans l'**article 1**.

Article 4 : Tapie *et al.* (2011) publié dans *Water Sciences and Technology*.

Passive samplers for chemical substance monitoring and associated toxicity assessment in water.

Passive samplers for chemical substance monitoring and associated toxicity assessment in water

N. Tapie, M. H. Devier, C. Soulier, N. Creusot, K. Le Menach, S. Aït-Aïssa, B. Vrana and H. Budzinski

ABSTRACT

The European legislation, and in particular the Water Framework Directive requires the development of cost efficient monitoring tools that can provide the required information for the assessment of water contamination. Passive sampling methods represent one of the novel tools that have a potential to be used in various regulatory monitoring programmes aimed at assessing the levels of chemical pollutants. These methods are particularly interesting for sampling polar organic pollutants in water because they provide representative information of the water quality over extended time periods (days to weeks) in environments with fluctuating contaminant concentrations. This is achieved by integrative sampling of pollutants over the whole sampler deployment period. These tools can be coupled to toxicity testing using bioassays that give information on toxic and ecotoxic hazards associated to substances that are present, these substances being identified or not. In this study the polar organic chemical integrative sampler (POCIS) was used in surface water to evaluate the water contamination by polar organic compounds and their potential toxicity.

Key words | Biotests, hormones, passive sampling, pesticides, pharmaceuticals, POCIS

N. Tapie
M. H. Devier
C. Soulier
K. Le Menach
H. Budzinski (corresponding author)
 LPTC/ISM – UMR 5255 CNRS University Bordeaux 1,
 33405 Talence,
 France
 E-mail: h.budzinski@ism.u-bordeaux1.fr

N. Creusot
S. Aït-Aïssa
 INERIS, Unité Ecotoxicologie in vitro et in vivo – BP2
 60550 Verneuil en Halatte,
 France

B. Vrana
 Research Centre for Toxic Compounds in the
 Environment (RECETOX) Faculty of Science,
 Masaryk University Kamenice 126/3
 625 00 Brno
 Czech Republic

INTRODUCTION

The restoration of good ecological and chemical status of all water bodies in Europe by 2015 as requested in the Water Framework Directive (WFD, Directive 2000/60/EC) is an important stake. One of the goals of this directive is to improve the water quality by reversing, when necessary, the degradation trend of underground and surface waters by gradually reducing the discharges of substances that have been classified as priority pollutants. Discharges should even be stopped for substances classified as hazardous priority compounds. To achieve this goal, the WFD requires the development of cost efficient monitoring tools that can provide the required information for the assessment of water contamination.

Checking water quality compliance with regulatory provisions is usually based on the chemical analysis of spot (bottle) samples of water taken at a defined frequency. This approach suffers from several drawbacks. Spot samples

provide concentrations of pollutants only at the moment of sampling. Thus, in water bodies characterized by marked temporal and spatial variability there is an increased risk of a false classification of the chemical status. Further, the laboratory methods commonly used for the analysis of spot samples of water are often not sensitive enough to fulfil the required minimum performance criteria associated with the current environmental quality standards for pollutants (Commission Directive 2009/90/EC).

A promising alternative for monitoring pollutants in aquatic systems is based on the use passive sampling techniques. In comparison to spot sampling techniques, passive samplers provide a more representative picture of the water quality. This is achieved by the integrative sampling of contaminants during sampler deployment periods up to several weeks. Passive samplers can be used alongside spot sampling in order to corroborate or contradict the data obtained. This

approach can provide additional 'weight-of-evidence' in water bodies where concentrations of contaminants are expected to fluctuate widely with time. The measurement of time-weighted average (TWA) concentrations over periods of weeks to months using passive sampling seems to be a promising approach.

A range of passive samplers has been developed for monitoring organic pollutants in water. Their different designs and field performance have been reviewed (Namiesnik *et al.* 2005; Stuer-Lauridsen 2005; Vrana *et al.* 2005). Among available passive sampling techniques polar organic chemical integrative sampler (POCIS) has shown a potential to be used in various monitoring programmes aimed at assessing the levels of polar organic compounds in the aquatic environment.

In addition to instrumental analysis of pollutants in sampler extracts, these can be subjected to toxicity testing using bioassays that give information on toxic and ecotoxic risks associated with the sampled substances (substances being identified or not (Alvarez *et al.* 2007)).

In this study field trials were carried out to assess the performance of the POCIS alongside spot sampling for monitoring a wide range of polar organic pollutants in surface water. Moreover, toxicity of the extracts from the field exposed samplers was evaluated to identify potential environmental hazards from compounds accumulated in the samplers during exposure, by using *in vitro* bioassays that detect endocrine-like and dioxin-like compounds.

MATERIALS AND METHODS

Materials

POCIS samplers (version for sampling pharmaceuticals) were provided by Exposmeter AB (Tavelsjö, Sweden). Acetonitrile, dichloromethane, isooctane and methanol (HPLC reagent grade, Scharlau) were purchased from ICS (Instrument Consommable Service, Belin Beliet, France). Glass solid phase extraction (SPE) cartridges of 6 mL with PTFE frits (20 µm porosity) and Oasis HLB bulk sorbent (60 µm) were purchased from Supelco (Saint Quentin-Fallavier, France) and Waters (Guyancourt, France), respectively. Pharmaceuticals and hormones were provided by Sigma

Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by LGC Standard (Molsheim, France), Alkylphenols and pesticides by Cluzeau (Sainte Foy La Grande, France). The studied compounds were:

Pharmaceuticals (PHARM): amitriptyline, aspirin, caffeine, carbamazepine, diazepam, doxepin, gemfibrozil, ibuprofen, imipramine, ketoprofen, naproxen, nordiazepam, paracetamol, theophylline.

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): acenaphthene, acenaphthylene, anthracene, benzo(a)anthracene, benzo(a)pyrene, benzo(b)fluoranthene, benzo(j)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(e)pyrene, benzo(g,h,i)perylene, chrysene, dibenzo(a)anthracene, fluoranthene, fluorene, indeno(1,2,3-c,d)pyrene, naphthalene, perylene, phenanthrene, pyrene.

Hormones (HORM): 17 α -ethynylestradiol, 17 β -estradiol, levonorgestrel, mestranol, norethindrone, estrone, progesterone.

Pesticides (PEST): alachlore, atrazine, desethyl atrazine (DEA), desisopropyl atrazine (DIA), bifenthrin, chlorfenvinphos, chlortoluron, methyl chlorpyrifos, chlorpyrifos, chlorsulfuron, cyanazine, cyfluthrin, cypermethrin, cyromazine, 1-(3,4dichlorophenyl)-3 methyl-urea (DCPMU), 1-(3,4dichlorophenyl)-urea (DCPU), 1-(2,4dichlorophenyl)-urea, dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE), dichlorodipenyldichloroethane (DDD), deltamethrin, diazinon, dichlorvos, dimethachlor, dimethoate, diuron, esfenvalerate, ethroprophos, fenithrothion, fenvalerate, irgarol, isoproturon, lindane, linuron, malathion, metazachlor, metoxuron, nicosulfuron, permethrin, phosmet, prometryn, propachlor, propazine, pymetrozine, simazine, s-metolachlor, temephos, terbutryn, terbuthylazine, methyl tolclofos.

Phenols (AKP): 4-nonylphenol (NP), 4-ter-octylphenol (OP), nonylphenol ethoxyacetic acid (NP1EC), 4-nonylphenol monoethoxylate (NP1EO), 4-nonylphenol diethoxylate (NP2EO), bisphenol A.

Field experiments

POCIS (pharmaceutical version) were exposed in Nerac in the surface water in the Baïse River (Garonne basin, south west of France) (Figure 1). Two triplicates of POCIS (3 for chemical analysis and 3 *in vitro* bioassays, respectively) were deployed in May 2007 over a period of one month.

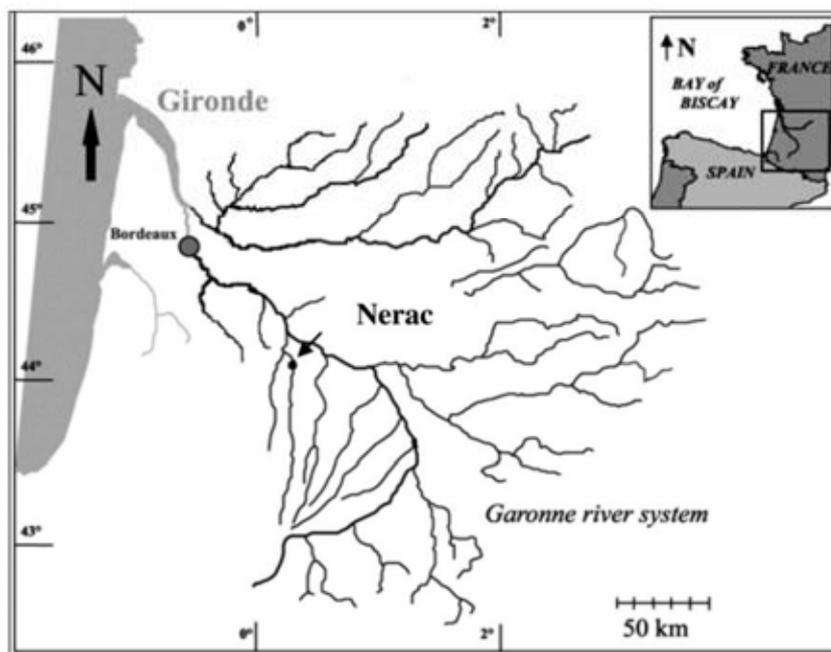


Figure 1 | Sampling site in Nérac in the Baise River (Garonne River Basin, South West of France).

During exposure POCIS were placed in a perforated canister made of high quality stainless steel to protect them from mechanical damage. Field control POCIS were used to follow an eventual contamination during transport and manipulation with samplers during deployment and retrieval. They were taken to the sampling site and exposed to the air during the immersion and the withdrawal of POCIS. Control POCIS were processed simultaneously and equally to the exposed samplers.

Spot water samples were also collected at the beginning, in the middle and at the end of the one month exposure period, to compare with the data obtained with passive sampling for several groups of compounds (PAHs, pharmaceuticals, alkylphenols, hormones, organophosphate pesticides, organochlorine pesticides, pyrethroid pesticides, triazines, phenylurea herbicides).

Chemical analysis

POCIS: After exposure, each POCIS was rinsed with ultra pure water to remove particles and biofilms present on the outer surface of the membranes. Control POCIS were processed using

the same procedure. The metal disks were disassembled and the membranes were detached from the disks. The sorbent was carefully transferred into an empty glass solid phase extraction (SPE) tube by rinsing it with ultrapure water. The sorbent was dried by applying vacuum for 1 h. Analytes were eluted by 30 mL of dichloromethane/methanol mixture (50:50 v/v). The extract was concentrated first by using a rapidvap vacuum evaporation system (25 min), then by a gentle stream of nitrogen and finally dissolved in 150 μ L of a solvent suitable for injection to an analytical instrument.

Water: Spot samples of water were collected during POCIS exposure. Water samples were collected to 4 L amber glass bottles. Before use, the bottles were detergent washed, acid rinsed and heated at 450 °C for 6 h. Immediately after collection, the samples were filtered through a glass fibre filter (GF/F 0.7 μ m pore size). The analytes were measured in the filtrate.

Pharmaceuticals, alkylphenols, and phenylurea herbicides were analysed by LC/MS/MS. PAHs, hormones and remaining pesticides (triazines, organophosphate pesticides, pyrethroid pesticides) were analysed by GC/MS. The analytical procedures were adapted from Togola & Budzinski

(2008) for the pharmaceuticals, from Labadie & Budzinski (2005) for the hormones, from Budzinski *et al.* (2000) for the PAHs, from Alder *et al.* (2006) for the pesticides analysis and from Cailleaud *et al.* (2007) for the alkylphenols.

Procedural blanks were also regularly performed during the sample extraction process and all the results presented are corrected by taking the blank levels into account. The performance of analytical methods was checked by the extraction of a spiked sample in each series of analyses.

Analysed compounds were quantified using internal standard calibration. The response factors of the various compounds were measured by injecting a mixture of standard reference solutions.

Extraction recoveries

POCIS sampler contains 200 mg of Oasis HLB sorbent enclosed between two polyethersulfone (PES) membranes. The membranes which confine the sorbent are compressed between two metal disks (5.4 cm ID). The total exchanging surface area of the membranes is about 46 cm². The ratio surface area to mass of sorbent is 230 cm²g⁻¹.

To determine the extraction recovery of analytes from the Oasis HLB sorbent empty glass solid phase extraction tubes with PTFE frits were packed with 200 mg of Oasis HLB sorbent and triplicate solid phase extraction cartridges were placed on a Visiprep vacuum manifold (Supelco). Each cartridge was spiked with a mixed standard solution of pharmaceuticals, pesticides, alkylphenols, hormones and PAHs by adding 50 µL of a standard solution in ethyl acetate to the sorbent. The analytes were eluted from the sorbent by 30 mL of dichloromethane/methanol mixture (50:50 v/v), which is quite a large volume that has been optimized to maximize extraction recoveries. The extract was concentrated first by using a rapidvap vacuum evaporation system (25 min) and then by using a gentle stream of nitrogen. These stages of evaporation require about 45 min. The losses of compounds have been tested during the development of the extraction method; no significant losses were observed (less than 5%). After the evaporation steps, the extract was dissolved into a solvent suitable for instrumental analysis.

Morover the validity of the methods analysis was confirmed by the extraction of a spiked sample for each series of analyses.

Table 1 | Extraction recoveries of some compounds from the Oasis HLB sorbent (n = 3)

Compound	Recovery (%) (n = 3)	
	Mean	rsd
PAH	Acenaphthene	79 ±7
	Acenaphthylene	92 ±12
	Anthracene	99 ±4
	Benzo(a)anthracene	86 ±11
	Benzo(a)pyrene	99 ±3
	Benzo(b,j,k)fluoranthene	88 ±8
	Benzo(e)pyrene	101 ±5
	Benzo(g,h,i)perylene	104 ±2
	Chrysene	100 ±8
	Dibenzo(a,c)anthracene	104 ±4
	Fluoranthene	105 ±6
	Fluorene	84 ±6
	Indeno(1,2,3-c,d)pyrene	109 ±8
	Naphthalene	108 ±13
	Perylene	83 ±5
	Phenanthrene	99 ±10
Pyrene	102 ±7	
PHARM	Amitriptyline	97 ±3
	Aspirin	66 ±19
	Caffeine	77 ±34
	Carbamazepine	71 ±5
	Diazepam	105 ±2
	Doxepin	58 ±12
	Gemfibrozil	97 ±7
	Ibuprofen	71 ±9
	Imipramine	82 ±11
	Ketoprofen	64 ±12
	Naproxen	61 ±17
AKP	Nordiazepam	99 ±1
	Paracetamol	63 ±3
	Theophylline	81 ±16
	NP	96 ±5
	OP	75 ±2
	NP1EC	78 ±3
	NP1EO	97 ±6
	NP2EO	85 ±9
HORM	BPA	92 ±9
	17α-Ethynylestradiol	103 ±15
	17β-Estradiol	99 ±17

(continued)

Table 1 | continued

Compound	Recovery (%) (n = 3)	
	Mean	rsd
Levonorgestrel	94	±16
Mestranol	92	±19
Norethindrone	93	±20
Estrone	108	±18
Progesterone	98	±15
PEST		
Alachlore	104	±4
Atrazine	87	±5
Desethyl atrazine	92	±3
Desisopropyl atrazine	106	±5
Bifenthrin	70	±27
Chlorfenvinphos	133	±19
Chlorotoluron	100	±1
Methyl chlorpyrifos	94	±2
Chlorpyrifos	100	±1
Chlorsulfuron	128	±1
Cyanazine	70	±36
Cyfluthrine	72	±22
Cypermethrin	73	±20
Cyromazine	85	±4
DCPMU	71	±1
DCPU	73	±2
124-Dichlorodiphenylurea	72	±2
DDT+DDE+DDD	53	±9
Deltamethrine	61	±23
Diazinon	117	±5
Dichlorvos	74	±30
Dimethachlor	148	±7
Dimethoate	104	±14
Diuron	94	±1
Esfenvalerate	71	±24
Ethrophosphos	151	±23
Fenithrothion	115	±14
Fenvalerate	80	±18
Irgarol	113	±10
Isoproturon	107	±1
Lindane	59	±6
Linuron	70	±1
Malathion	108	±2
Metazachlor	132	±11

(continued)

Table 1 | continued

Compound	Recovery (%) (n = 3)	
	Mean	rsd
Metoxuron	102	±1
Nicosulfuron	131	±3
Permethrin	74	±21
Phosmet	95	±25
Prometryn	112	±9
Propachlor	108	±15
Propazine	97	±4
Pymetrozine	76	±37
Simazine	93	±4
s-Metolachlor	123	±5
Temephos	83	±22
Terbutryn	96	±9
Terbutylazine	134	±11
Methyl tolclofos	97	±1

Coupling of passive sampling with *in vitro* bioassays

In addition to the chemicals analysis, POCIS were also used for toxicity testing using bioassays. After exposure, the sorbent was transferred into glass solid phase extraction tube for extraction. The organic compounds were eluted in 3 fractions: the first fraction (F1) with 10 ml of dichloromethane, the second fraction (F2) with 10 ml of dichloromethane/methanol mixture (50:50 v/v) and the final fraction (F3) with 10 ml of methanol. Each fraction was analysed for all selected compounds. Toxicity tests were performed on each fraction. The estrogenic, (anti-)androgenic and dioxin-like activities of the extracts were assessed by using three *in vitro* bioassays based on MELN (MCF-7 cells stably transformed with the firefly luciferase gene under the control of endogenous estrogen receptor; Balaguer *et al.* 2001), MDA-kb2 (MDA-MB-453 cells stably transformed with the firefly luciferase gene driven by a promoter regulated by endogenous androgen receptor; Wilson *et al.* 2002) and PLHC-1 (fish hepatoma derived cells; Louiz *et al.* 2008) cell lines, respectively. Description of cell lines and protocols for routine cell culture and environmental sample assessment has been reported in details previously (Louiz *et al.* 2008; Creusot *et al.* 2010). In brief, cells were seeded in 96-wells plates and left to grow up

to confluence before being exposed to carrier solvent (negative control) and serial dilutions of reference ligand (positive control) and POCIS extracts (test sample). In the MELN and MDA-kb2 assays, cells were exposed for 16 h and processed for luciferase activity assay. In the PLHC-1 assay, cells were exposed for 4 h (PAH-like activity) and 24 h (dioxin-like activity) and then were processed for 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity assessment in intact cells. Toxic-equivalent quantities relative to reference compounds in samples were determined by comparing modelled dose-response curves of samples and reference compounds, as previously described (Louiz *et al.* 2008).

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction of POCIS and recoveries

To determine the extraction recovery of analytes from the Oasis HLB sorbent, elution of analytes from spiked sorbent was performed. The percentage recoveries ($n=3$) were higher than 70% for most of the compounds (Table 1). Only 9 compounds showed low extraction recovery. These were bifenthrin ($70 \pm 27\%$), cyanazine ($70 \pm 36\%$), aspirin ($66 \pm 19\%$), ketoprofen ($64 \pm 12\%$), paracetamol ($63 \pm 3\%$), naproxen ($61 \pm 17\%$), deltamethrin ($61 \pm 23\%$), lindane (59 ± 6) and DDT + DDE + DDD (53 ± 9).

The applied extraction protocol is efficient for 91 compounds belonging to 5 classes including PAHs, pharmaceuticals, alkylphenols, hormones and pesticides. For each set of analysed samples, a spiked sample was processed in order to monitor the performance of the extraction protocol.

Field exposures

POCIS samplers were deployed in May 2007 in the Baïse River (South West of France) during a period of one month. After exposure, sorbent was extracted to determine the mass of compounds (M_s) accumulated in POCIS. Only compounds found in POCIS are presented (Table 2).

Assuming linear uptake of all contaminants in the sampler during field exposure, TWA concentrations of studied compounds in water were calculated from the amount of analytes accumulated in POCIS (M_s) using laboratory-derived

Table 2 | Mass of analyte accumulated in the sorbent after an exposure time (M_s) and sampling rates (R_s) used for the calculation of the TWA concentration of sampled analytes (only compounds detected in field exposed samplers are shown)

	M_s (ng)	R_s (L·J ⁻¹)	References
Atrazine désisopropyl (DIA)	6	0.06	Mazzella <i>et al.</i> (2007)
Atrazine déséthyl (DEA)	18	0.12	Mazzella <i>et al.</i> (2007)
Simazine	Nd	0.31	Budzinski <i>et al.</i> (2009)
Atrazine	2	0.33	Budzinski <i>et al.</i> (2009)
Terbuthylazine	2	0.25	Mazzella <i>et al.</i> (2007)
Promethryn	2	0.36	Personal data
Terbuthryn	1	0.34	Personal data
Lindane	2	0.09	Alvarez <i>et al.</i> (2007)
Σ DDT	1	0.02	Alvarez <i>et al.</i> (2007)
Diuron	23	0.25	Mazzella <i>et al.</i> (2007)
Isoproturon	6	0.22	Mazzella <i>et al.</i> (2007)
Metoxuron	35	0.20	Mazzella <i>et al.</i> (2007)
Linuron	12	0.24	Mazzella <i>et al.</i> (2007)
Chlorsulfuron	5	0.11	Alvarez <i>et al.</i> (2007)
Nicosulfuron	119	0.04	Mazzella <i>et al.</i> (2007)
Caféine	13	0.08	Togola & Budzinski (2007)
Carbamazépine	2	0.40	Togola & Budzinski (2007)
Aspirine	15	0.01	Togola & Budzinski (2007)
Paracétamol	18	0.02	Togola & Budzinski (2007)
Gemfibrozil	3	0.05	Togola & Budzinski (2007)
Diclofénac	2	0.17	Togola & Budzinski (2007)
Nonylphénol	26	0.02	Budzinski <i>et al.</i> (2009)
NP1EC	9	0.28	Personal data
17-Oestradiol (E2)	2	0.04	Zhang <i>et al.</i> (2008)
Testostérone (T)	2	-	No R_s data available

sampling rates R_s :

$$C_w = \frac{M_s(t)}{R_s \times t} \quad (1)$$

where, C_w is the TWA concentration in water over the sampler deployment period, $M_s(t)$ is the mass of analyte

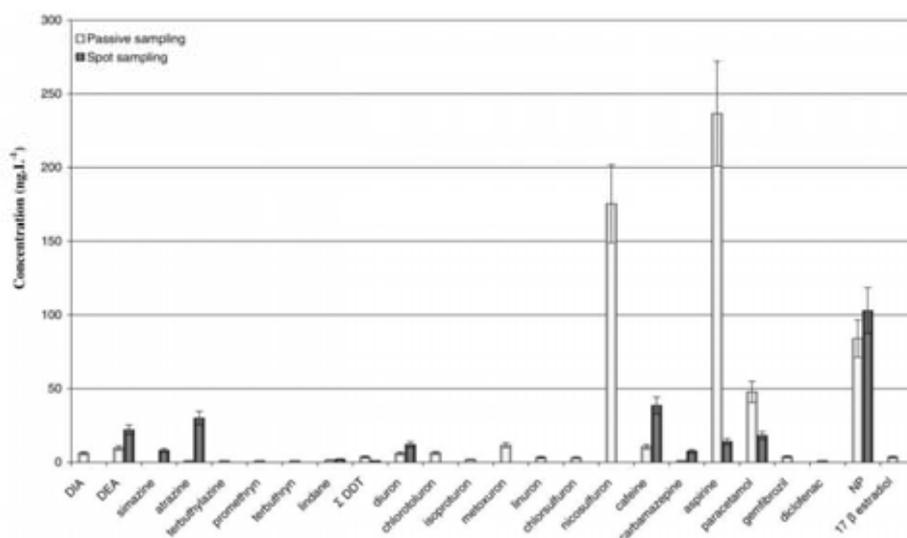


Figure 2 | Comparison of water concentrations determined by spot sampling and by passive sampling ($n = 3$).

accumulated in the sorbent after an exposure time (t) and R_s is the sampling rate. Data (R_s and M_s) used for the calculation are shown in Table 2, unfortunately no R_s data are available for testosterone.

The concentrations in water obtained by POCIS were compared to the water concentrations determined by spot sampling (Figure 2). Both sampling techniques are not fully comparable because spot sampling gives only a snapshot of contamination while POCIS provides an integrated concentration (the TWA value). Moreover, the filtering threshold used for water filtration is $0.7 \mu\text{m}$, while the pores of the membranes of POCIS are $0.1 \mu\text{m}$. Nevertheless, a good correlation between the concentration of water obtained by spot sampling and that obtained by passive sampling can be observed if the compounds are in sufficient concentration to be detected by passive sampling and if the concentration in water is constant over time. This was the case for DEA, lindane, diuron and NP (Figure 2).

On the contrary several phenylurea pesticides, like nicosulfuron, chlorotoluron, isoproturon, metoxuron, linuron, chlorsulfuron were detected by POCIS whereas they were not found in spot samples. This was also the case for pharmaceuticals gemfibrosil and diclofenac which were present in POCIS, but not detected in water samples. POCIS are able to accumulate quantifiable amounts compounds that were below the detection limit of the spot sampling

method. Significant preconcentration of analytes from water together with integrative sampling that allows retention of episodic concentration peaks (normally not detected by low frequency spot sampling) enable POCIS to provide a better (more sensitive and more representative) information on the pollution of the sampled environment by polar organic compounds in comparison with spot sampling.

Coupling of passive sampling with *in vitro* bioassays

After exposures in the Baïse River, some POCIS were fractionated and each fraction was tested for estrogenic, (anti) androgenic, PAH-like, and dioxin-like activities using *in vitro* bioassays. Estrogenic activity was detected in the F1 fraction and to a lesser extent in F2 (Table 3). The most abundant compounds in fraction F1 were alkylphenols and pesticides, including estrogenic ones like 4-tert-octylphenol, bisphenol A and DDT metabolites (Table 4). Unexpectedly, the F3 fraction, which contained trace levels of steroid hormones, was not estrogenic in the MELN bioassay. The two fractions (F1 and F2) exhibited PAH-like activity of 47.5 and 15.8 ng of BaP-EQ per POCIS, respectively. Accordingly, PAHs were mainly detected in F1 but not in F2. So the activity detected in F2 could be due either to a higher sensitivity of the bioassay

Table 3 | Estrogenic, PAH-like, dioxin-like and androgenic activities detected in POCIS fraction using *in vitro* bioassays

POCIS fractions	E2-EQ ^a (ng/POCIS)	BaP-EQ ^b (ng/POCIS)	TCDD-EQ ^c (ng/POCIS)	DHT-EQ ^d (ng/POCIS)
F1	0.44	47.5	<0.6	<0.2
F2	0.06	15.8	<0.6	<0.2
F3	<0.02	<1.1	<0.6	<0.2

^aE2-EQ: 17βestradiol-equivalents.

^bBaP-EQ: benzo(a)pyrene-equivalents.

^cTCDD-EQ: dioxin-equivalent.

^dDHT-EQ: dihydrotestosterone-equivalent.

Table 4 | Quantity of studied compounds in POCIS Fraction (ng)

	Fraction 1 (ng)	Fraction 2 (ng)	Fraction 3 (ng)
Pharmaceuticals	20	14	Nd
PAHs	128	1	Nd
Alkylphenols + BPA	36	12	3
Hormones	nd	nd	4
Triazine	31	nd	Nd
Pyrethroids	nd	nd	Nd
Organophosphate pesticides	nd	nd	Nd
Phenyl urea pesticide	212	5	7

or to compounds that were not targeted in this study, such as transformation product of PAHs. Finally, no dioxin-like or (anti)androgenic activity could be detected in these samples.

CONCLUSIONS

Field studies in which the results obtained with passive samplers are compared to those obtained with conventional sampling techniques increase the body of evidence that is available to underpin acceptance of the validity of passive sampling. The data sets obtained in this study show the effectiveness of the POCIS in integrative sampling of a broad range of organic chemicals in the surface water. Moreover, the potential of coupling chemical and toxicological characterization of water quality using passive samplers was demonstrated. However, the detection of biological activities that could not be explained by chemical analyses supports further investigation to identify biologically active substances sampled by POCIS.

ACKNOWLEDGEMENTS

The 'Agence de l'eau Adour Garonne', the 'Région Aquitaine' and the 'Agence Nationale de la Recherche' (ANR) are acknowledged for their financial support, and by the French Ministry of Environment (grant P189-AP08 to INERIS).

REFERENCES

- Alder, L., Greulich, K., Kempe, G. & Vieth, B. 2006 Residue analysis of 500 high priority pesticides: better by GC-MS or LC-MS/MS? *Mass Spectrometry Reviews* **25**, 838–865.
- Alvarez, D. A., Huckins, J. N., Petty, J. P., Jones-Lepp, T., Stuer-Lauridsen, F. S., Getting, D. T., Goddard, J. P. & Gravel, A. 2007 Tool for monitoring hydrophilic contaminants in water. Polar organic chemical integrative sampler (POCIS). In: *Passive Sampling Techniques in Environmental Monitoring* (R. Greenwood, G. Mills & B. Vrana, eds). Wilson and Wilson Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier, Amsterdam, pp. 171–197.
- Balaguer, P., Boussioux, A. M., Demirpence, E. & Nicolas, J. C. 2001 Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands. *Luminescence* **16**, 153–158.
- Budzinski, H., Letellier, M., Thompson, S., LeMenach, K. & Garrigues, P. 2000 Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBx) from sediments using focussed microwave assisted (FMW) extraction at atmospheric pressure. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **367** (2), 165–171.
- Budzinski, H., Soulier, C., Lardy, S., Capdeville, M. J., Tapie, N., Vrana, B., Miège, C. & Ait-Aïssa, S. 2009 *Xenobiotics in the Urban Water Cycle - XENOWAC 2009*. Paphos, Cyprus.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Lardy, S., Augagneur, S. & Budzinski, H. 2007 Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoid, copepod). Part 2: Alkylphenols polyethoxylates. *Chemosphere* **70**, 281–287.
- Commission Directive 2009 Commission Directive 2009/90/EC of 31 July 2009 laying down, pursuant to Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, technical specifications for chemical analysis and monitoring of water status.
- Creusot, N., Kinani, S., Balaguer, P., Tapie, N., Maillot-Maréchal, E., Porcher, J. M., Budzinski, H. & Ait-Aïssa, S. 2010 Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396**, 569–583.

- Directive 2000 Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy.
- Labadie, P. & Budzinski, H. 2005 Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **381** (6), 1199–1205.
- 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). *Science of the Total Environment* **402**, 318–329.
- Mazzella, N., Dubernet, J.-F. & Delmas, F. 2007 Determination of kinetic and equilibrium regimes in the operation of polar organic chemical integrative samplers. Application to the passive sampling of the polar herbicides in aquatic environments. *Journal of Chromatography A* **1154**, 42–51.
- Namiesnik, J., Zabiegała, B., Kot-Wasik, A., Partyka, M. & Wasik, A. 2005 Passive sampling and/or extraction techniques in environmental analysis: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **381**, 279–301.
- Stuer-Lauridsen, F. 2005 Review of passive accumulation devices for monitoring organic micropollutants in the aquatic environment. *Environmental Pollution* **136**, 503–524.
- Togola, A. & Budzinski, H. 2007 Development of polar organic integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems. *Analytical Chemistry* **79**, 6734–6741.
- Togola, A. & Budzinski, H. 2008 Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A* **1177** (1), 150–158.
- Vrana, B., Mills, G. A., Allan, I. J., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J., Morrison, G. & Greenwood, R. 2005 Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *Trends in Analytical Chemistry* **24**, 844–868.
- Wilson, V. S., Bobseine, K., Lambright, C. R. & Gray, L. E. 2002 A novel cell line, MDA-kb2 that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicological Sciences* **66**, 69–81.
- Zhang, Z., Hibberd, A. & Zhou, J. L. 2008 Analysis of emerging contaminants in sewage effluent and river water: Comparison between spot and passive sampling. *Analytica Chimica Acta* **607**, 37–44.

Synthèse de l'article 4

Les résultats de cette étude confirment que les POCIS permettent la détection de composés présents à l'état de trace en dessous des limites de détection de l'échantillonnage ponctuel. Par ailleurs, ils démontrent également que ces capteurs passifs ont la capacité d'échantillonner des contaminants dont le log Kow est supérieur à 3, valeur seuil rapportée dans la littérature (Vrana *et al.* 2005). En effet, dans le cas présent ils ont permis l'échantillonnage de composés tels que le lindane ainsi que le DDT et ses dérivés dont les log Kow sont autour de 4 et 7 respectivement.

De manière complémentaire, notre méthode d'extraction des POCIS, validée dans le cadre de ce travail, permet la récupération optimale d'une diversité de classes chimiques telles que les HAP, les alkylphénols, les stéroïdes, les pesticides ainsi que des composés pharmaceutiques. Dans ce contexte l'utilisation d'outils *in vitro* pour la détection sensible des contaminants au sein des extraits semble une approche particulièrement intéressante pour la caractérisation de la contamination de composés actifs présents à l'état de trace dans la colonne d'eau.

2.1.2 Extraction du sédiment

2.1.3 Préparation des échantillons de sédiment

La mise en œuvre d'une stratégie bio/analytique basée sur une approche multi-cibles implique de pouvoir extraire en amont une multitude de composés présentant des propriétés physico-chimiques et des activités biologiques différentes. Actuellement, la littérature rapporte l'existence de nombreuses méthodes pour l'extraction et la purification de PE dans les matrices solides (voir section 3.1.1 de la synthèse bibliographique, p 41). Ces méthodes de préparation d'échantillon étant très souvent dédiées à une classe spécifique de composés (Petrovic *et al.* 2002, Labadie et Budzinski 2005) ou d'activités (Kinani *et al.* 2008, Houtman *et al.* 2007), nous avons entrepris ici:

- (1) l'évaluation d'une méthode permettant l'extraction par ASE (*Accelerated Solvent Extraction*) d'un large spectre de composés actifs dans les sédiments.
- (2) l'évaluation de l'effet de composés matriciels sur les réponses biologiques mesurées à travers une purification par GPC d'un extrait de sédiment actif.

2.1.3.1 Extraction du sédiment par ASE

Les bioessais utilisés dans le cadre d'une stratégie bio-analytique étant appliqués sur des extraits au sein desquels des composés inconnus participent à l'activité mesurée, il nous a paru important de les intégrer à l'évaluation de la méthode d'extraction en complément des analyses chimiques généralement utilisées.

De manière à pouvoir déterminer un rendement d'extraction sur la base des activités biologiques, un mélange d'une douzaine de molécules actives couvrant un large spectre de polarité ($2 < \log K_{ow} < 8$) et présentant plusieurs activités biologiques (ER, PXR, AhR) a été préparé et utilisé pour doper du sédiment artificiel non actif. La constitution du mélange a été déterminée sur la base du modèle d'additivité des effets, vérifié expérimentalement pour les trois récepteurs. Les performances d'extraction d'une dizaine de solvants (seul et en mélange binaire) ont ainsi été évaluées biologiquement et chimiquement sur ce sédiment. Par ailleurs, les interactions naturelles entre le sédiment et les contaminants étant difficiles à reproduire, les performances de ces différents solvants ont également été évaluées pour l'extraction de PE natifs au sein d'un sédiment naturel actif. Ces investigations ont fait l'objet de l'**article 5**.

Article 5 : Creusot *et al.* (en préparation)

Evaluation of pressurized liquid extraction of mixture of active endocrine disrupting chemicals in sediment using biological and chemical analyses

Evaluation of pressurized liquid extraction of mixture of active endocrine disrupting chemicals in sediment using biological and chemical analyses

Nicolas Creusot ^{1,2}, Selim Aït-Aïssa ¹, Jean-Marc Porcher ¹, Marie Hélène Dévier ², Hélène Budzinski ²

1 Unité Écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, INERIS, Verneuil-en-Halatte, France;

2 EPOC / LPTC – UMR 5805 CNRS Université Bordeaux I, Talence, France.

* Corresponding author: E-mail: selim.ait-aissa@ineris.fr, fax +33 344 556 767

Abstract :

Aquatic sediments are contaminated by a wide diversity of pollutants such as endocrine disrupting chemicals (EDCs) including broad range of chemical classes from natural and anthropogenic origins. The use of *in vitro* bioassays is now widely accepted as an integrative method for their detection in complex samples. However, the diversity of EDCs chemical properties makes difficult their common extraction and validation of extraction methods for a bioanalysis purpose is still weakly documented. Here, we evaluated the efficiency of several solvents (acetone, methanol, dichloromethane, heptane, dichloromethane/acetone (50:50, v/v), dichloromethane/methanol (50:50, v/v), heptane/acetone (50:50, v/v), heptane/methanol (50:50, v/v)) to extract a broad range of activate chemicals in sediment using accelerated solvent extraction (ASE[®]). For this purpose, we first determined a mixture of 12 EDCs (i.e. estrone, 17 β -estradiol, bisphenol A, *o,p'*DDT, 4-*tert*-octylphenol, fenofibrate, triphenyl phosphate, clotrimazole, PCB-126, 2,3,7,8 TCDD, Benzo[k]fluoranthene and dibenzo[a,h]anthracene) with wide range of polarity ($2 < \log K_{ow} < 8$). Working concentrations of individual compounds were defined as equipotent concentrations on the basis of the concentration addition (CA) model applied to estrogenic, dioxin-like and PXR-like activities. Extraction efficiencies were assessed in triplicates in both an artificial blank sediment spiked with this active mixture and a

natural sediment contaminated by native EDCs, using chemical and biological analyses. In the spiked sediment, mixture of MeOH/DCM yields the best recovery although there were no marked differences between extraction solvent efficiency. Investigations in natural sediment confirmed these results. In summary, our study provided further validation of such extraction methodology for specific bioanalysis purpose that can be used for more holistic environmental contamination characterization

Keywords: pressurized liquid extraction; EDC; mixture effect; bioanalytical tools

1. Introduction

Sediment is the sink for thousands of chemicals pollutants. Among them, a wide diversity has received increasing attention due to their capacity to interfere with hormonal system. These endocrine disrupting chemicals (EDCs) encompass a wide range of chemical classes (steroid, alkylphenols, pesticides, pharmaceuticals, surfactants, plasticizers...) from natural and anthropogenic origins (Hotchkiss *et al.* 2008). Laboratory and field studies have shown that exposure to such chemicals may possibly cause adverse effects (i.e. reproduction and/or development) on organisms (Desbrow *et al.* 1998, Jobling *et al.* 2002). However, environmental endocrine disruption risk assessment remains a difficult task due to the wide range of active EDCs in terms of both chemical classes and sources.

Chemicals analyses provide important tool to assess environmental concentrations of such compounds in order to evaluate potential risk for exposed organisms. However, they have restricted to known active chemicals and they do not take account of mixture effect. Hence they often failed to explain the global biological effect. Bioassays, such as *in vitro* reporter gene assays, provide sensitive, specific and integrative tool to assess contamination by EDCs. The biological responses integrate the contribution of all active compounds present in examined sample. Bioassays allow quantifying biological toxic-equivalent (bio-TEQ) loads in environmental extract and directing chemical analysis to the identification of active chemicals (Brack 2003). A broad range of such bio-analytical tools have been developed for the last decade. While most of them target estrogenic and dioxin-like activities, other signaling pathways have been also recently considered such as glucocorticoid, progestative, androgenic (Van der Linden *et al.* 2008, Hill *et al.* 2010) or Pregnane X Receptor (PXR) (Creusot *et al.* 2010) pathways. Although the compounds responsible for these activities have been rarely identified, the detection of such active chemicals underscores the need to consider other pathways than ER and AhR ones.

Organic extraction is a critical step for the optimal use of these bioassays as it should recover the broadest range of active compounds. Such development remains a challenge as regard to the diversity of active chemical classes and their respective physico-chemical properties (e.g. log Kow...) that render difficult their common extraction (Seiler *et al.* 2008). In most of studies, validated extraction method have focused on targeted chemical classes of known active compounds, such as estrogenic (Jeannot *et al.* 2002, Kinani *et al.* 2008, Arditoglou and Voutsas 2008) or dioxin-like (Helaleh *et al.* 2005, Kishida *et al.* 2010, Wang *et al.* 2010) compounds. Besides, validation of extraction method for more exhaustive bioanalysis is still weakly documented (McCant *et al.* 1999, Houtman *et al.* 2007). As a consequence, development of extraction methods validated for both chemical and bioassay analyses of EDCs in sediment is still needed. Such approach has been assessed only for the estrogenic Houtman *et al.*

2007) and dioxin-like activities (McCant *et al.* 1999). Regarding the diversity of active EDCs including pharmaceuticals and pesticides that are usually not taken into account by estrogenic or dioxin-like bioassays, other activities should be integrated to such extraction evaluation.

Many procedures are currently used for the extraction of EDCs in solid matrices (sediment, sludge, organisms). They comprise soxhlet extraction (Khim *et al.* 1999), microwave assisted extraction (Labadie and Hill 2007), ultrasonication assisted extraction (Kinani *et al.* 2008), supercritical liquid extraction (Xue *et al.* 2008), steam distillation (Lye *et al.* 1999) and pressurized liquid extraction or accelerated solvent extraction (ASE[®]) (Andreu *et al.* 2007). ASE is of recent development and has been successfully used for the rapid and automatized extraction of wide range of chemical classes including steroids (Nieto *et al.* 2008), pharmaceuticals (Jelic *et al.* 2009, Radjenovic *et al.* 2009), pesticides (Schafer *et al.* 2008, Wang 2009), PAHs (Hollert *et al.* 2002, Burkhardt *et al.* 2005), PCDD/Fs (Kiguchi *et al.* 2006), PCBs (Focant *et al.* 2001) and alkylphenols (Petrovic *et al.* 2002). In its principle, working at high temperature and pressure facilitates the desorption and the diffusion of organic compounds from the solid matrix. Hence, ASE is often more efficient than soxhlet or other extraction methods. In addition it reduces solvent consumption in comparison to other extraction tools.

The aim of this study was to evaluate an ASE method for the assessment of a broad range of chemicals classes with various physico-chemical properties and exerting several biological activities. For this purpose, we first designed a mixture of 12 EDCs, covering a wide range of polarity and exerting additive estrogenic, dioxin-like and PXR-like activities as assessed using concentration addition (CA) model. This mixture was then used to spike an artificial blank sediment and extraction recoveries of the mixture components were assessed using several extraction solvents based on chemical and biological analyses. Finally these extraction performances were compared to those for the extraction of native EDCs in a known active sediment.

Table 1. Identity, Provider, Purity, log Kow, biological target of mixture components.^a from LogKow win Syracuse Research Corporation (Syrres), <http://www.syrres.com/esc/physprop.htm>

Compound	CAS	Provider	Purity (%)	Log-Kow ^a	Biological target
Estrone (E1)	53-16-7	Sigma-Aldrich	≥ 99%	3.43	ER
17β-estradiol (E2)	50-28-2	Sigma-Aldrich	≥ 98%	3.94	ER
Bisphenol A (BPA)	80-05-7	Sigma-Aldrich	97%	3.64	ER
4-tert-octylphenol (4tOP)	140-66-9	Sigma-Aldrich	97%	5.5	ER
o,p'DDT	789-02-6	Sigma-Aldrich	-	6.79	ER
Fenofibrate	49562-28-9	Sigma-Aldrich	≥ 99%	3.26	PXR
Triphenyl phosphate (TPP)	115-86-6	Sigma-Aldrich	≥ 99%	4.7	PXR
Clotrimazole	23593-75-1	Sigma-Aldrich	-	6.26	PXR
Benzo[k]fluoranthén (BkF)	207-08-9	Sigma-Aldrich	≥ 98%	6.11	AhR
Dibenzo[a,h]anthracen (DaA)	53-70-3	Sigma-Aldrich	-	6.11	AhR
PCB 126	40186-72-9	LGC-Standard	≥ 99%	6.98	AhR
2,3,7,8 TCDD	1746-01-6	LGC-Standard	≥ 99%	6.92	AhR

2. Materials and methods

2.1. Chemical and reagents

All the compounds used for spiking mixture and listed in **table 1** were purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). The analytical standards listed in **table 5** were purchased from Sigma-aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), LGC-standard (Molsheim, France) and Cluzeau (Sainte Foy La Grande, France). Dimethyl-sulfonide (DMSO) and luciferin were from Sigma-Aldrich. Dichloromethane (DCM), methanol (MeOH), heptane, acetone (HPLC reagent grade, Merck) used for ASE extraction were purchased from VWR; acetonitrile, dichloromethane, isooctane and methanol (HPLC reagent grade, Scharlau) used for purification before chemical analysis were from ICS (Belin Beliet, France).

2.2. Mixture design

In order to establish recoveries based on biological analysis, we prepared a mixture of 12 ER, AhR and/or PXR active EDCs with log Kow comprise between 2 and 8 (**Table 1**). The concentrations of chemicals to be used in the mixture were determined on the concept of concentration addition (CA) assuming a similar mode of action of mixture components. The CA model was originally outlined for binary mixtures (Loewe and Muischnek 1926) and then extended to mixture with n components, according to the equation 1 (Berenbaum 1985):

$$\sum_{i=1}^n \frac{C_i}{EC_{x_i}} = 1 \quad (1)$$

where C_i is the individual concentration of the i compound in the mixture leading to $x\%$ of effect and EC_{x_i} , the concentration of the i compound alone giving the same effect. This equation can be rearranged to yield the equation 2 where $EC_{x_{mix}}$ is the total concentration of the mixture leading to the effect x , and p_i is the fraction of the i compound in the mixture

$$EC_{x_{mix}} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{EC_{x_i}} \right)^{-1} \quad (2)$$

In our experiments, selected compounds were mixed at equi-effective concentrations. These concentrations were determined from individual dose response curves (see below).

The biological effect of the mixture was assessed by testing serial dilution of this mixture at fixed ratio (Brian 2005). The obtained dose response curve was then compared to the CA prediction curve based on theoretical effective concentration calculated using the equation 2 where p_i were based on actual concentration of mixture components.

2.3. Spiking procedure of blank sediment

Because, the calculation of mixture recovery based on biological activity requires non active sediment, we prepared an artificial blank sediment as previously described (Kinani *et al.* 2008) according to OECD recommendation (OECD-218 2004). Briefly brown peat (5%), CaCO₃ (0.1%), kaolin (20.0%) and quartzic sand (75%) (HN38, 50-200 μm) were mixed. Culture medium (294.0 mg of CaCl₂, 2H₂O, 123.2 mg of MgSO₄, 7H₂O, 64.7 mg of NaHCO₃ and 5.7 mg of KCl in 1 L of deionized

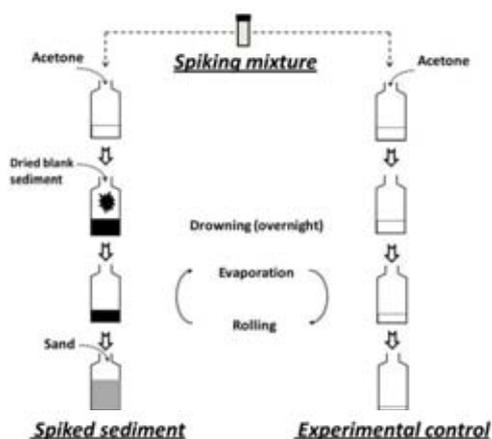


Figure 1. Spiking procedure

water) was then added to this composition in a ratio medium/sediment of 4:1, v/v. This mixture was incubated during 10 days at 23.0 °C with a continuous ventilation of the water column. The volume of medium was supplemented 3 times a week, in order to compensate for the evaporation. The obtained blank sediment (COT, 10%) was then sieved at 1 mm, freeze dried, homogenized and stored at -20°C in amber glass bottle before analysis.

The mixture of 12 EDCs was prepared in acetone. The quantity of this mixture used for spiking was calculated in order to obtain maximal biological response for each bioassay based on mixture determination (see above) from the extraction of 5 g of dry blank sediment. The spiking procedure (Figure 1) consisted of drowning the sediment in the *spiking mixture* in an amber glass bottle during one night in order to simulate partition process between dissolved and particulate phase. Then, alternative rolling and evaporation under fume hood were conducted for 6 hours. Finally, bottle was left under fume hood overnight for total evaporation of acetone. Then, bottle was rolled for 1 hour to complete homogenization. The dried *spiked sediment* was then stored at -20°C before for extraction. In order to evaluate the potential lost or contamination during this procedure, a *experimental control* was also performed.

2.4. Real sample study

In addition to evaluate extraction recovery of mixture of EDCs at known concentrations, we also

evaluate the efficiency of the method to extract environmental EDCs in a river sediment. For this purpose, a sediment where estrogenic, anti-androgenic, PXR-like and dioxin-like activities have been previously characterized was selected (Kinani *et al.* 2010). Sediment was collected with a grab, sieved at 1 mm, freeze dried, homogenized and stored at -20°C in amber glass bottle before analysis.

2.5. Extraction procedure

To optimize extraction conditions of a broad range of active chemicals, we evaluated the extraction efficiency of non polar (heptane, dichloromethane (DCM)), polar (acetone, methanol (MeOH)) and mixture (50:50, v/v) of polar and non polar solvents (Heptane:Acetone, DCM:Acetone, MeOH:DCM and MeOH:Heptane). Extraction was carried out using ASE 350[®] apparatus (Dionex, France) with 10 mL extraction cells filled with mixture of sediment/sand (50:50, w/w) (approximately, 5 g of sediment in each cells). Extraction conditions were the following: extraction temperature, 75°C; extraction pressure, 1500 PSI; preheating period, 5 min; static extraction, 5 min; number of extraction cycles, 3; final extraction volume 25 mL; flush volume, 60% of the cell volume; nitrogen purge, 60 s. Procedural blank were obtained using sand alone.

2.6. Chemical analyses

Quantitative analysis of compounds was performed using GC-MS (PAHs), GC-ECD (PCB, BDE and OCPs), UPLC-MS/MS (steroids, alkylphenols and bisphenol A), RRLC-MS/MS (fenofibrate, clotrimazole and pharmaceuticals) as previously described in Creusot *et al.* (in prep).

2.7. Biological analysis

Estrogenic, PXR-like and dioxin-like activities were assessed by using three *in vitro* bioassays based on MELN (luciferase reporter gene assay coupled to ER, Balaguer *et al.* 1999), HG5LN-hPXR (luciferase reporter gene assay coupled to hPXR, Lemaire *et al.* 2006) and PLHC-1 (EROD assay, Louiz *et al.* 2008) cell lines, respectively. Details on routine cell culture and exposure conditions have been previously described in Creusot *et al.* (2010). Cells were exposed in microtiter plates to range of

concentrations of standard or sediment extract for 16h (MELN, HG5LN-hPXR) or 4h and 24h (PLHC-1). Luciferase (MELN, HG5LN-hPXR) and EROD (PLHC-1) assays were then performed exactly as previously described (Creusot *et al.* 2010).

2.8. Data analysis

Bioassay data modeling

All dose response curves were modeled with the Hill equation model by using the RegTox 7.5 Microsoft Excel Macro, freely available on http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html. This allowed to calculate effective concentrations for each compound alone (i.e. EC_x, the concentration of compound leading to the *X* effect). When a chemical or environmental extract gave incomplete dose response curves, the Hill parameter for maximal response was fixed to 100%. The relative potencies (REP) of individual compounds were calculated as the ratio of the EC₂₀ of the reference compound to the EC₂₀ of the standard. Bio-TEQ was calculated as the ratio of EC₂₀ of the reference compounds on the EC₂₀ of the environmental extracts.

Recoveries calculation

Extraction recoveries of the spiked sediment were established from both chemical and biological analyses. These were run in triplicates for each condition. For chemical analysis, concentrations of the mixture components in the spiked sediment were compared to actual concentrations in the spiking solution. For biological analysis, the biological toxic equivalent (bio-TEQ) loads of the spiked sediment were compared to those of the spiking mixture.

Statistic

Statistical analyses were assessed using the freely available software R (<http://www.r-project.org/>). In order to compare CA prediction effect to the experimental effect, we first assess the non-parametric Shapiro-wilk test on residues in order to address the normality of the distribution of the residues. We then processed to a student test on the mean of the residues in order to assess if it differed significantly from 0 (n=15-18; n-1 f.d; $\alpha=0.05$). For a p-value <0.05, we can conclude that CA experimental effect differed significantly from the predicted effect.

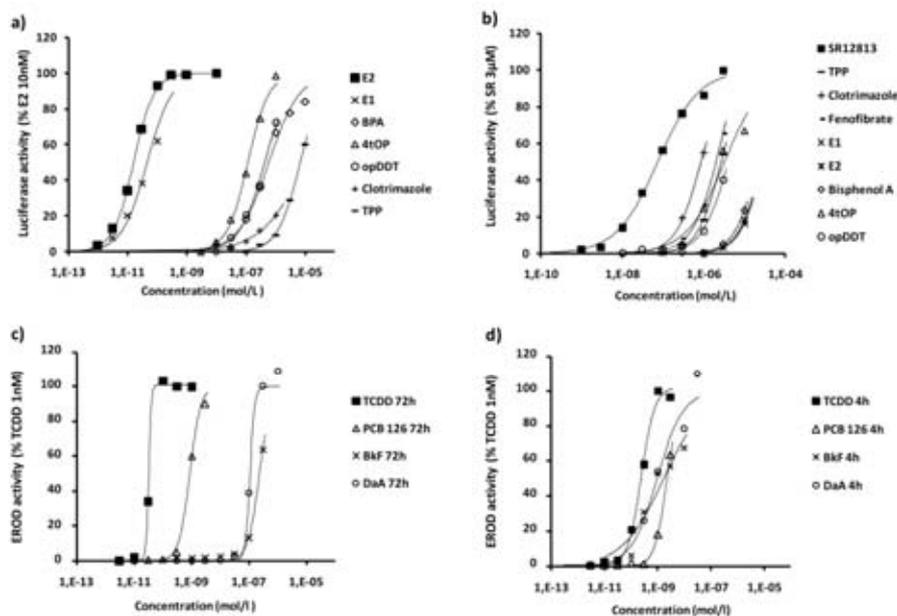


Figure 2. Dose responses curves of individual compounds for (a) estrogenic, (b) PXR-like and (c and d) dioxin-like activities.

Table 2. Parameters of dose responses curves for individual compounds used for mixture determination.

Biological target	Active chemicals	Range concentration (mol/l)		Slope	Maximal induction	Hill Equation parameters										REP	Cj ^a	pi
		EC5	EC10			EC15	EC20	EC25	EC50	EC70								
ER	Predicted mixture Effect (CA)	1.E-13-1.E-8	1.26	2.7E-12	5.5E-12	8.6E-12	1.2E-11	4.6E-11	1.0E-10	0.02	1.5E-11	7.2E-06						
		3.E-12-1.E-8	1.03	1.6E-12	3.8E-12	4.1E-12	5.3E-12	6.7E-12	1.6E-11	3.3E-11	1	3.2E-12	1.4E-06					
	Measured mixture effect	1.E-8-1.E-5	0.85	1.8E-08	4.5E-08	7.7E-08	1.2E-07	1.6E-07	6.0E-07	1.7E-06	4.5E-05	1.1E-07	5.0E-02					
		3.E-9-1.E-5	1.23	1.1E-08	2.0E-08	3.8E-08	4.8E-08	1.2E-07	2.4E-07	2.4E-07	1.1E-04	4.1E-08	1.9E-02					
	Predicted mixture Effect (CA)	1.E-9-1.E-5	2.01	2.3E-08	4.9E-08	7.7E-08	1.1E-07	1.8E-07	4.3E-07	1.0E-06	1.7E-05	1.5E-07	7.2E-02					
		1.E-7-1.E-5	1.13	5.1E-07	9.8E-07	1.5E-06	2.0E-06	2.6E-06	6.9E-06	1.2E-05	2.2E-06	1.5E-06	7.2E-01					
	Measured mixture effect	1.E-9-1.E-5	0.57	6.4E-08	2.4E-07	5.3E-07	9.7E-07	1.6E-06	1.1E-05	2.8E-06	4.4E-06	3.1E-07	1.4E-01					
		1.E-7-3.E-5	1.03	6.7E-08	1.5E-07	2.4E-07	3.4E-07	4.5E-07	1.3E-06	2.8E-06	3.1E-07	1.3E-06	3.8E-06					
	PNR	Predicted mixture Effect (CA)	1.E-13-1.E-8	1.50	4.2E-06	6.8E-06	9.3E-06	1.2E-05	1.4E-05	2.9E-05	4.1E-03	1.5E-11	4.2E-06					
			3.E-12-1.E-8	1.54	3.9E-06	6.3E-06	8.6E-06	1.1E-05	1.3E-05	2.6E-05	3.0E-03	3.2E-12	8.3E-07					
Measured mixture effect		1.E-8-1.E-5	1.49	3.1E-06	5.1E-06	6.9E-06	8.8E-06	1.1E-05	2.2E-05	5.8E-03	1.1E-07	2.9E-02						
		3.E-9-1.E-5	0.92	1.3E-07	3.0E-07	5.0E-07	7.3E-07	1.0E-06	3.3E-06	8.4E-06	6.1E-02	4.1E-08	1.1E-02					
Predicted mixture Effect (CA)		1.E-9-1.E-5	1.34	4.5E-07	7.8E-07	1.1E-06	1.4E-06	1.8E-06	4.1E-06	6.5E-06	1.8E-02	1.5E-07	4.2E-01					
		1.E-7-1.E-5	2.38	3.7E-07	6.2E-07	8.4E-07	1.1E-06	1.3E-06	2.7E-06	3.6E-06	2.2E-02	1.5E-06	4.2E-01					
Measured mixture effect		1.E-9-1.E-5	1.79	1.1E-07	1.8E-07	2.5E-07	3.2E-07	4.0E-07	8.7E-07	2.0E-06	6.8E-02	3.1E-07	8.3E-02					
		1.E-7-3.E-5	1.28	2.8E-07	4.3E-07	5.9E-07	7.5E-07	9.2E-07	2.0E-06	3.5E-06	2.8E-02	1.5E-06	4.2E-01					
Ahr 24h		Predicted mixture Effect (CA)	1.E-11-1.E-8	1.44	2.7E-07	4.5E-07	6.3E-07	8.0E-07	9.7E-07	2.1E-06	3.5E-06	5.0E-6	5.0E-6					
			3.E-12-1.E-9	0.80	4.7E-08	1.2E-07	2.1E-07	3.3E-07	4.7E-07	1.8E-06	5.0E-6	1.7E-10	4.3E-10	6.1E-10	0.1	5.4E-10	8.2E-01	
	Measured mixture Effect	1.E-11-1.E-8	3.11	1.2E-10	1.7E-10	2.0E-10	2.4E-10	2.7E-10	4.3E-10	6.1E-10	6.1E-10	1.0E-10	1.0E-10	1	6.1E-11	9.1E-02		
		3.E-12-1.E-9	3.23	9.8E-12	1.6E-11	2.1E-11	2.6E-11	3.2E-11	6.5E-11	1.0E-10	3.0E-08	3.2E-10	4.5E-02					
	Predicted mixture Effect (CA)	3.E-10-1.E-6	5.32	7.0E-10	1.7E-09	2.8E-09	4.2E-09	5.9E-09	2.6E-08	8.0E-08	1.7E-3	2.9E-10	4.5E-02					
		3.E-10-1.E-6	3.82	4.5E-09	7.9E-09	1.1E-08	1.5E-08	1.8E-08	4.2E-08	8.0E-08	1.7E-3	2.9E-10	4.5E-02					
	Measured mixture Effect	1.E-11-1.E-8	1.94	6.1E-11	9.3E-11	1.2E-10	1.4E-10	1.7E-10	3.0E-10	4.4E-10	4.4E-10	6.6E-10	6.6E-10					
		3.E-12-1.E-9	1.76	7.6E-11	1.2E-10	1.5E-10	1.8E-10	2.2E-10	4.1E-10	6.6E-10	4.1E-10	6.6E-10	6.6E-10					
	Ahr 4h	Predicted mixture Effect (CA)	1.E-11-1.E-8	1.87	4.8E-10	6.9E-10	8.8E-10	1.1E-09	1.2E-09	2.2E-09	3.6E-09	0.1	5.4E-10	8.2E-01				
			3.E-12-1.E-9	1.74	4.5E-11	6.8E-11	8.9E-11	1.1E-10	1.3E-10	2.4E-10	3.8E-10	1	6.1E-11	9.1E-02				
Measured mixture Effect		3.E-10-1.E-6	0.89	3.5E-11	8.0E-11	1.3E-10	2.0E-10	2.7E-10	9.4E-10	2.4E-09	0.5	3.2E-10	4.5E-02					
		3.E-10-1.E-6	0.84	8.6E-12	3.3E-11	7.5E-11	1.4E-10	2.3E-10	1.7E-09	7.8E-09	0.8	2.9E-10	4.5E-02					
Predicted mixture Effect (CA)		1.E-11-1.E-8	1.44	9.7E-11	2.2E-10	3.5E-10	4.6E-10	5.8E-10	1.2E-09	2.0E-09	2.0E-09	2.0E-09	2.0E-09					
		3.E-12-1.E-9	1.22	6.9E-11	1.3E-10	1.8E-10	2.5E-10	3.1E-10	7.6E-10	2.1E-09	2.1E-09	2.1E-09	2.1E-09					

^a, actual concentration measured by chemical analysis

2.9. Quality assurance

All glassware was cleaned with detergent, rinsed with ultrapure water, followed by heating at 450°C overnight. Procedural blanks (glass material and solvents) were performed for both chemical and biological analyses. Limit of detection (LODs) in chemical analysis were evaluated with signal/noise ratios equal to or greater than 3. LODs of biological analyses were based on the EC₅ of the extract.

3. Results & Discussion

3.1. Determination of the spiking solution: individual and mixture effects in bioassays

To determine the mixture to be used for spiking solution, we initially selected 5 estrogenic compounds, 3 hPXR activators and 4 dioxin-like chemicals (Table 1). As a first step, each compound was tested alone in order to determine its individual potency through establishment of dose response curve (Figure 2) and calculation of effective concentrations (Table 2). It is noticeable that several mixture components exerted multiple activities at different concentration. For instance, all

(xeno-)estrogens were also PXR activators at higher concentration while clotrimazole and TPP exerted preferential PXR-like activities. PXR is known to be activated by a wide diversity of chemicals including ER ligands (Mnif *et al.* 2007, Creusot *et al.* 2010). Clotrimazole was described as PXR ligand (Moore *et al.* 2002) but its estrogenicity has not been described before. To our knowledge this is the first study to report estrogenic activity of clotrimazole and TPP. Co-exposure with ICI 182,780, an ER antagonist, confirmed that luciferase induction in MELN cells by TPP and clotrimazole was mediated by ER although their direct binding to the receptor remains to be tested. In agreement with previous reported (Louiz *et al.* 2008), PAHs were more potent in the AhR assay after 4 h whereas PCB126 and TCDD were active at lower concentration after 24 h (Table 2).

Chemical mixture was then prepared by mixing equi-effective concentration of the most potent compounds in each bioassay, that is : EC₂₀ of E1, E2, BPA, 4tOP, o,p' DDT for estrogenic assay; EC₃₀ of TPP, clotrimazole and fenofibrate for PXR assay; EC₅₀-24h of TCDD, PCB126, EC₃₀-4h of DaA

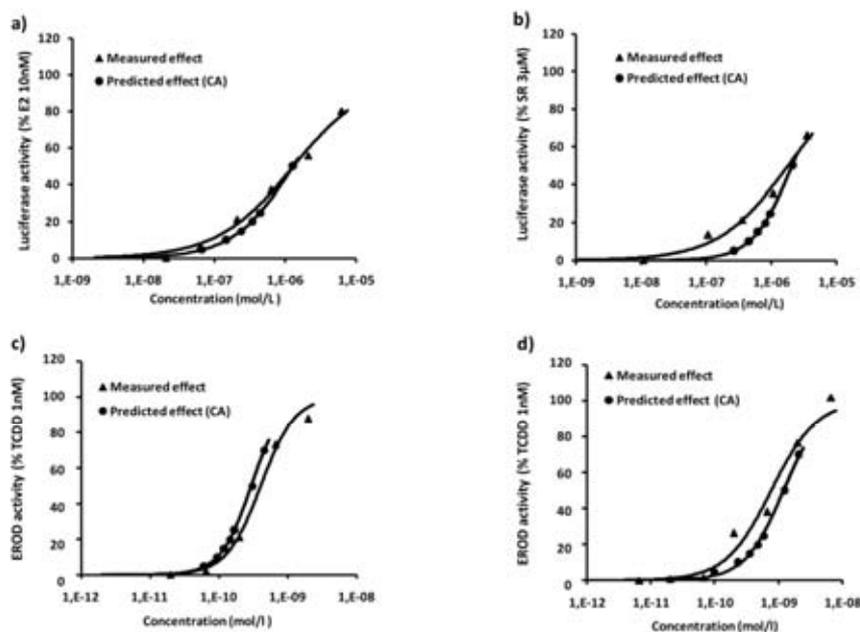


Figure 3. Dose responses curves of measured and predicted effect of the spiking mixture, (a) for estrogenic, (b) PXR-like and (c and d) dioxin-like activities.

Table 3. Extraction recoveries in spiked blank sediment based on biological and chemical analyses. Biological recoveries were calculated by a comparison of Bio-TEQ of the spiked-sediment and the Bio-TEQ of the spiking solution (means \pm sd, n=3).

Activity	Analysis	Compounds	Extraction solvent										Control
			MeOH	Acetone	MeOH/DCM	Hep/MeOH	DCM/Ac	Hep/Ac	DCM	Heptane			
Estrogenic	BIO	mix	80 \pm 3,7	64 \pm 1,2	93 \pm 15	110 \pm 14,4	86 \pm 4	77 \pm 19	80 \pm 3,1	56 \pm 6	85		
		E1	77 \pm 38	78 \pm 5	68 \pm 5	74 \pm 16	94 \pm 31	50 \pm 19	82 \pm 10	26 \pm 2	106		
	CHEM	E2	89 \pm 16	89 \pm 23	103 \pm 4	91 \pm 19	104 \pm 6	62 \pm 32	90 \pm 1	22 \pm 8	66		
		4OP	78 \pm 1	99 \pm 17	76 \pm 2	88 \pm 27	96 \pm 4	98 \pm 12	83 \pm 19	84 \pm 19	102		
		BPA	75 \pm 11	105 \pm 10	86 \pm 4	97 \pm 14	112 \pm 36	105 \pm 19	85 \pm 16	17 \pm 15	86		
PXR-like	BIO	op'DDT	74 \pm 11	83 \pm 2	144 \pm 0	85 \pm 12	99 \pm 5	73 \pm 17	122 \pm 4	73 \pm 6	102		
		mix	74 \pm 2	79 \pm 32	97 \pm 15	117 \pm 24	76 \pm 16	75 \pm 7	61 \pm 5	62 \pm 3	88		
	CHEM	Fenofibrate	66 \pm 26	64 \pm 16	98 \pm 5	91 \pm 16	59 \pm 29	82 \pm 26	92 \pm 21	66 \pm 19	56		
		Chlorimazole	53 \pm 15	81 \pm 3	70 \pm 14	64 \pm 0	46 \pm 1	22 \pm 9	10 \pm 2	7 \pm 1	57		
		TPP	72 \pm 1	108 \pm 7	88 \pm 0	102 \pm 18	94 \pm 17	79 \pm 1	68 \pm 3	73 \pm 4	92		
PAH-like	BIO	mix	86 \pm 4	73 \pm 1	76 \pm 9	88 \pm 7	84 \pm 1	72 \pm 6	76 \pm 4	71 \pm 7	82		
		DsaA	92 \pm 11	124 \pm 9	85 \pm 5	77 \pm 25	95 \pm 19	85 \pm 16	96 \pm 13	34 \pm 4	86		
	CHEM	B&F	85 \pm 1	107 \pm 8	87 \pm 1	78 \pm 23	94 \pm 22	88 \pm 13	92 \pm 11	36 \pm 4	82		
		mix	100 \pm 2	90 \pm 11	66 \pm 1	95 \pm 4	80 \pm 16	76 \pm 25	86 \pm 2	110 \pm 17	80		
		FCB 126	99 \pm 3	117 \pm 19	87 \pm 2	99 \pm 3	103 \pm 21	115 \pm 9	107 \pm 7	87 \pm 10	89		
TCDD-like	CHEM	TCDD	72 \pm 30	73 \pm 28	79 \pm 3	61 \pm 13	76 \pm 9	92 \pm 16	66 \pm 16	45 \pm 14	68		

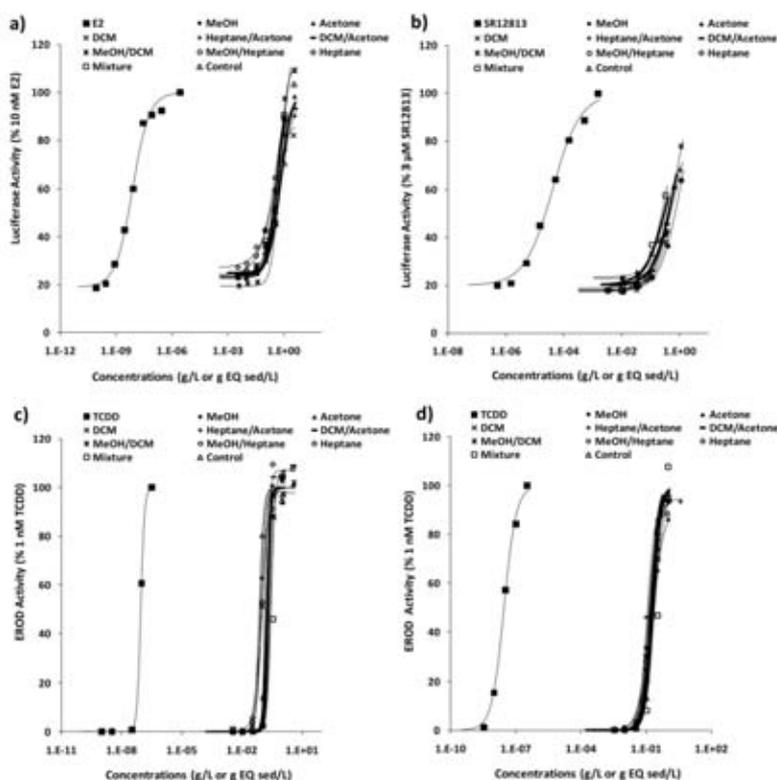


Figure 4. Dose responses curves of spiked blank sediment extracted with different solvent, for (a) estrogenic, (b) PXR-like and (c and d) dioxin-like activities. No activity could be detected in non spiked blank sediment

and BkF for AhR assay. Chemical analysis revealed that the actual concentrations (C_i) slightly differed from the theoretical ones (Table 2). Then, both the relative proportion of each components in the final mixture (p_i), based on C_i concentrations, and the individual effective concentrations of this compounds (EC_x) were used to calculate the predicted mixture effect based on CA model according to equation 2. The experimentally established dose responses curves for mixture of 12 EDCs showed that measured effect significantly differed from that predicted by CA model. The difference was slight for estrogenic and AhR-24h ($p < 0.05$) and more marked for PXR-like and AhR-4h activities ($p < 0.01$) (Figure 3). For estrogenic, PXR-like and AhR-4h activities, the CA model underestimates the actual effect whereas it overestimates AhR 24h activity. Concerning estrogenic, PXR, AhR-4 activities, effect underestimation was mainly noted at low effective concentration while experimental and predicted effect curves fitted well at higher mixture concentration. This discrepancy may be explained

by the contribution of mixture components that were not taken into account in the CA calculation but could even interfere with examined pathway. For estrogenic activity for instance, the calculation of measured and predicted effect of the spiking mixture were based on the concentration of the most potent (xeno-)estrogens (i.e. E1, E2, BPA, 4tOP, opDDT, clotrimazole and TPP). However PAHs and TCDD are known to indirectly activate the ER through an ER-AhR cross-talk mechanism (Ohtake *et al.* 2003) but were not taken into account in the calculation because their estrogenic effect in MELN cells is reported to occur at much higher concentrations than those used in the present study (i.e. 10^{-7} to 10^{-5} M, data not shown). Nevertheless, Silva *et al.* 2002 have demonstrated that mixture of chemicals at concentration under their individual measurable effect could trigger a response. As a consequence, it cannot be excluded that active mixture components, present at non active concentration when tested individually, may have contributed to the measured estrogenic, PXR-like and dioxin-like effect when present in the mixture.

Mixture effects of estrogenic chemicals have been widely studied during the last decade using *in vitro* (Payne 2000, Silva *et al.* 2002, Kunz and Fent 2006, Petersen and Tollefsen 2010) or *in vivo* (Kunz and Fent 2009, Brian *et al.* 2005) models. Most of them were based on CA prediction. Overall these studies showed good fitting between CA predicted response and experimental response and observed that the more chemicals are in the mixture, the more the models fit (Petersen *et al.* 2010). Mixture effects of AhR ligands were less studied and they are often estimated using the toxic equivalency factor (TEF) approach, a special case of CA (Van den Berg *et al.* 2006), which is restricted to full agonist mixture but remains a widely accepted risk assessment method. Recently, Howard *et al.* (2010) described a generalized concentration addition model for the prediction of mixture effect of dioxin-like chemicals. Finally, to our knowledge, this study is the first to evaluate mixture effect of hPXR ligands. Nevertheless, Baldwin and Roling (2009) have showed an additive effect of ligands of constitutive androstane

receptor (CAR), a cousin of the PXR. As observed in the present study, these authors reported also an underestimation of the mixture effect by the CA model when the mixture contained more than three chemicals.

3.2. Recoveries in the spiked blank sediment

The determined mixture of 12 EDCs was then used to spike blank sediment (**Figure 1**), which was further extracted on ASE-350 using different extraction solvents. Several studies have reported minor effect pressure, static time, flush volume and major effect of temperature and solvent on the extraction efficiency (Schafer *et al.* 2008, Nieto *et al.* 2008, Olivella 2005). Here, we evaluated the effect of solvent composition on the extraction efficiency while the other ASE parameters were fixed. The temperature of 75 °C was chosen as regard to the temperature commonly used in the literature with the aim to limit the loss of thermo-labile chemicals. The recoveries derived from chemical and biological analyses after complete extraction of mixture components from spiked

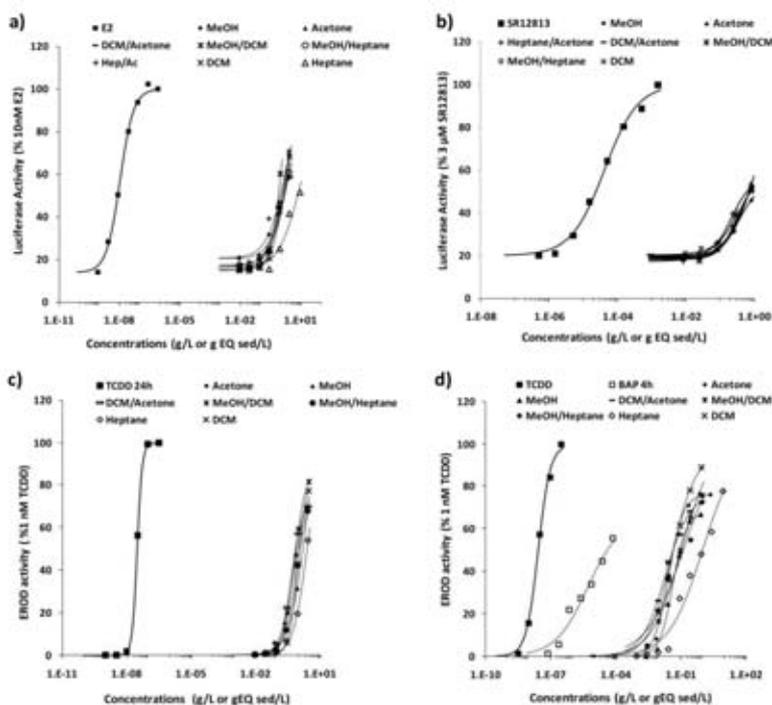


Figure 5. Dose responses curves of natural sediment extracted with different solvent, for (a) estrogenic, (b) PXR-like and (c and d) dioxin-like activities.

Table 5. Concentrations of native EDCs in the natural sediment (means ± sd, n=3).

	LOD	MeOH	Acetone	MeOH/DCM	Hept/MeOH	DCM/Ac	Hept/Ac	DCM	Heptane
Naphthalene	0.4	9.9 ± 10.4	9.3 ± 7	2.1 ± 3.2	19.5 ± 9.1	20.8 ± 8.8	4.7 ± 5.3	12.4 ± 4.9	31.1 ± 7.1
Acenaphthylene	0.9	16.8 ± 0.8	15 ± 5	16.8 ± 3.2	10.3 ± 3.4	23.9 ± 6.8	19.8 ± 5.0	14.7 ± 3.6	10.6 ± 2.8
Acenaphthene	n.d ^a	6.9 ± 4.8	12 ± 10	0.1 ± 0.4	8.8 ± 6.5	10.7 ± 3.4	10.1 ± 3.1	5.9 ± 2.7	9.5 ± 1.0
Fluorene	0.4	56.3 ± 32.3	34 ± 8	48.7 ± 15.6	35.2 ± 12.7	41.9 ± 9.0	42.3 ± 8.7	31.6 ± 9.0	39.8 ± 13.6
Phenanthrene	4.3	444.7 ± 28.6	352 ± 36	479.1 ± 44.8	339.2 ± 80.3	374.1 ± 12.3	440.5 ± 104.4	377.7 ± 64.3	435.2 ± 137.9
Anthracene	3.4	56.1 ± 23.8	74 ± 30	59.5 ± 21.7	43.3 ± 11.2	37.4 ± 32.4	265.8 ± 345.3	57.4 ± 14.4	36.4 ± 47.4
Fluoranthene	6.7	1020.4 ± 118.9	1004 ± 153	1264.2 ± 606.0	870.5 ± 99.0	1008.7 ± 54.4	1264.5 ± 476.1	898.0 ± 44.6	1059.2 ± 252.3
Pyrene	8.1	885.8 ± 25.7	667 ± 249	902.8 ± 171.1	731.6 ± 93.2	851.5 ± 58.0	1083.3 ± 316.1	701.2 ± 93.4	889.3 ± 207.1
Benzo[<i>a</i>]anthracene	6.6	950.2 ± 53.1	792 ± 157	903.9 ± 98.7	683.5 ± 178.2	857.5 ± 75.7	883.5 ± 39.0	737.8 ± 157.8	642.7 ± 198.1
Triphenylene + chrys	4.9	880.3 ± 39.4	751 ± 167	816.6 ± 88.4	659.5 ± 145.9	756.8 ± 43.6	1081.2 ± 517.9	673.0 ± 77.5	513.8 ± 165.9
PAHs	2.2	1555.9 ± 6.4	1316 ± 289	1450.4 ± 352.4	1120.5 ± 149.6	1347.3 ± 310.2	1110.1 ± 533.1	1157.6 ± 342.3	612.9 ± 605.7
BbF+BF+BkF	8.4	579.4 ± 86.2	540 ± 85	544.9 ± 57.3	446.4 ± 102.4	519.6 ± 39.3	610.0 ± 91.0	479.1 ± 38.1	402.4 ± 108.9
BeP	2.9	698.0 ± 108.2	686.2 ± 108	703.6 ± 18.3	535.7 ± 138.7	645.7 ± 28.9	543.2 ± 287.4	618.5 ± 56.9	450.6 ± 149.8
BaP	1.8	210.9 ± 47.6	187 ± 21	209.0 ± 16.6	156.3 ± 44.8	193.8 ± 4.4	324.2 ± 192.3	171.7 ± 37.1	93.4 ± 44.3
Per	3.2	379.5 ± 35.8	506 ± 84	486.8 ± 72.1	364.8 ± 99.7	499.8 ± 36.5	412.0 ± 253.8	436.2 ± 28.7	274.5 ± 91.9
IP	4.9	88.2 ± 5.6	103 ± 10	112.4 ± 7.1	86.6 ± 26.4	107.5 ± 6.0	225.1 ± 180.4	86.9 ± 3.2	53.5 ± 18.8
DaA+DaC	3.1	213.4 ± 205.2	459 ± 79	436.3 ± 66.2	330.3 ± 75.5	422.6 ± 32.1	454.2 ± 1.5	369.6 ± 7.6	273.2 ± 81.9
BP	7829.6 ± 402.9	7498 ± 1228	8435.1 ± 1066	6426.5 ± 1174.3	7706.5 ± 537.5	9021.6 ± 1217.3	6818.0 ± 979.8	5801.3 ± 1598.8	0.4 ± 0.1
Σ PAHs (ng/g)	0.4	0.7 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.8 ± 0.5	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.3 ± 1.5	0.4 ± 0.1
CB 50:28	0.4	1.3 ± 1.8	0.3 ± 0.3	1.7 ± 0.9	0.3 ± 0.3	1.0 ± 0.8	1.2 ± 0.4	1.3 ± 1.7	1.1 ± 0.4
CB 52	0.4	4.8 ± 0.3	1.7 ± 0.8	3.6 ± 1.8	2.1 ± 0.3	2.9 ± 1.6	0.6 ± 1.1	4.0 ± 3.4	2.4 ± 0.7
CB 101	0.4	7.5 ± 0.3	3.8 ± 1.5	3.7 ± 3.5	3.3 ± 0.5	5.0 ± 1.7	5.0 ± 0.3	3.8 ± 0.4	5.2 ± 0.8
CB 118	0.4	11.1 ± 0.4	4.3 ± 2.0	4.9 ± 4.6	4.6 ± 1.0	7.9 ± 3.2	7.0 ± 0.2	5.6 ± 0.8	6.3 ± 1.6
CB 153	0.4	12.6 ± 3.3	5.7 ± 2.8	9.2 ± 2.9	6.2 ± 0.7	9.7 ± 3.5	8.7 ± 0.4	7.3 ± 0.6	8.5 ± 2.3
CB 138	0.4	8.8 ± 0.2	3.8 ± 1.4	6.1 ± 1.6	3.9 ± 0.5	6.4 ± 2.3	3.9 ± 3.4	3.8 ± 2.1	5.6 ± 1.2
CB 180	0.4	40.6 ± 9.4	19.9 ± 9.0	30.1 ± 4.5	21.0 ± 3.2	35.2 ± 11.2	27.1 ± 3.2	27.1 ± 3.1	29.5 ± 7.0
Σ PCBs (ng/g)	0.5	4.1 ± 0.1	1.9 ± 0.8	3.7 ± 1.2	2.3 ± 0.2	2.7 ± 0.8	3.0 ± 0.3	2.1 ± 0.2	2.5 ± 0.5
BDE 47	1.3	5.2 ± 0.6	2.5 ± 0.6	2.8 ± 2.5	2.4 ± 0.2	2.3 ± 2.0	2.2 ± 0.1	1.8 ± 1.6	2.4 ± 0.1
BDE 119	n.a	n.d ^b	n.d	n.d	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	n.d
BDE 99	n.a	0.8 ± 1.1	0.5 ± 0.7	< LOD	< LOD	< LOD	0.9 ± 0.4	< LOD	0.6 ± 0.1
BDE 153	n.a	10.1 ± 0.3	4.8 ± 2.1	6.1 ± 4.3	4.7 ± 0.3	5.0 ± 1.2	3.3 ± 4.9	5.5 ± 0.6	6.1 ± 0.7
Σ PBDEs (ng/g)	0.4	1.7 ± 0.3	5.7 ± 5.9	1.5 ± 1.7	0.9 ± 0.2	1.2 ± 1.1	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.0	1.4 ± 1.4
HCB	0.3	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1
gamma-HCH	0	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.1
Hepachlor	0.2	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.1
Hep.Hépoiside	0.4	0.8 ± 0.2	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.1	0.5 ± 0.0	3.0 ± 3.5
2,4'DDE									

sediment are shown in **table 3**. The dose responses curves allowing calculating bio-TEQ of spiked sediments are presented in **figure 4**. In spiking control, the recoveries based on biological activity (**Figure 1**) were higher than 80% suggesting that the pre-extraction procedure did not led to a marked loss of mixture components.

3.2.1. Estrogenic chemicals

For the estrogenic compounds, biological and chemical analyses showed good recoveries. Based on biological analysis, all the tested solvents yielded a recovery higher than 80% with MeOH/DCM and Heptane/MeOH offering the best recoveries except for acetone (64%) and heptane (56%) (**Table 3**). Based on chemical analysis, recoveries were higher than 75% except for E1 (50%) and E2 (62%) with heptane/acetone and for E1 (26%), E2 (22%) and BPA (17%) with heptane. Heptane is a non-polar solvent whereas E1, E2 and BPA are mid-polar compounds. This could explain the weak extraction recoveries for biological and chemicals analysis with this solvent. Up to date, the assesment of extraction efficiency for estrogenic chemicals in solid matrices has been often restricted to steroids or alkylphenols (Arditsoglou *et al.* 2008, Ahn *et al.* 2007). Hence, these studies reported often the efficient use of polar solvent (i.e. MeOH, Acetone, MeOH/Acetone) (Nieto *et al.* 2008, Petrovic *et al.* 2002, Jeannot *et al.* 2002) for the extraction of estrogenic compounds whereas less polar estrogenic compounds were not considered.

Nevertheless, our results were in accordance with those of Houtman *et al.* (2007) reporting efficient use of mixture of polar and non polar solvent for the extraction of estrogenic chemicals with wide range of polarity.

3.2.2. PXR activators

For PXR-like activity, biological and chemical analyses showed similar and acceptable recoveries, except for clotrimazole with DCM/Acetone (46%), Heptane/Acetone (22%), DCM (10%) and Heptane (7%) based on chemical analysis. This contributed to the weaker extraction recoveries of PXR-like activity also observed for heptane and DCM. Altogether, these results highlighted that a part of clotrimazole has not been extract during the extraction step. Absorption of clotrimazole on plastic or glassware has been previously described (Peschka *et al.* 2007). However, Huang *et al.* (2010) obtained good recovery of this compound (70%) in spiked sludge using ultrasonic-assisted extraction with acidified methanol whereas this recovery decreased with less polar solvent. Hence, both absorption and solvent polarity may contribute to weaker recovery of clotrimazole in the present case. Concerning the difference observed between chemical and biological analyses in the PXR-like activity recovery, this could be explained by the contribution of other compounds than TPP, clotrimazole or fenofibrate to overall PXR-like activity in the spiked sediment. In addition, we showed that CA predicted effect based on all the

Table 4. Bio-TEQ values in a natural sediment extracted by different solvent conditions (means \pm sd, n=3).

	LOD ^a	MeOH	Acetone	MeOH/DCM	Hept/MeOH	DCM/Ac	Hept/Ac	DCM	Heptane
Estrogenic (ngE2-EQ/g d.w)	0.017	8.8 \pm 1.0	8.0 \pm 1.8	9.7 \pm 1.8	8.0 \pm 1.8	8.6 \pm 0.8	7.8 \pm 0.8	6.2 \pm 1.7	1.4 \pm 0.6
PXR-like (μ gSR-EQ/g d.w)	0.185	31.0 \pm 5.4	28.8 \pm 2.4	50.6 \pm 11.3	46.4 \pm 3.4	34.9 \pm 4.8	28.5 \pm 5.5	35.6 \pm 5.4	n.d ^b
PAH-like (μ gBaP-EQ/g d.w)	1.5	25.4 \pm 6.5	36.6 \pm 4.8	46.2 \pm 2.5	46.4 \pm 2.9	31.1 \pm 4.7	54.5 \pm 2.3	32.6 \pm 4.4	11.0 \pm 2.4
TCDD-like (ngTCDD-EQ/g d.w)	8.4	37.3 \pm 7.9	37.2 \pm 1.1	34.9 \pm 8.9	32.3 \pm 7.3	26.8 \pm 4.7	31.3 \pm 4.5	33.5 \pm 5.1	14.1 \pm 3.9

^a. LOD : limit of detection in ng of standard/g d.w.; ^b. n.d : not detected

PXR-ligands occurring in the mixture underestimate the experimental effect. Despite these observations, overall, the best recoveries for both chemical and biological analysis were obtained with mixture of MeOH/DCM as previously observed for estrogenic activity.

3.2.3. Dioxin-like chemicals

For dioxin-like compounds, extraction recoveries based on biological analyses were always higher than 70% for both persistent and non-persistent chemicals whereas chemical analysis showed different trends. Overall recoveries were also higher than 70 % except for DaA (24%), BkF (36%) and TCDD (45%) using heptane while strong recoveries were observed for PAHs with acetone. Several studies have previously reported a greater efficiency of acetone or methanol than non polar solvent for the extraction of PAHs (Oluseyi *et al.* 2011) or PCBs, PCDD/DFs (Kigushi *et al.* 2006, Kishida *et al.* 2010) and persistent organic pollutants (Camino-Sánchez *et al.* 2011). However, the reason for weaker extraction efficiency of PAH and TCDD using heptane remains unclear.

4.3. Extraction efficiency of native EDCs: application to a known active natural sediment

It is difficult to ensure that the binding of chemicals to the blank sediment reflect the binding of compounds on natural sediment. For example, addition of spiking compounds to sediment samples may result in less strong binding than is the case in natural samples and thus lead to higher recoveries (de Boer *et al.* 2001). Therefore, we assessed extraction efficiency of the different solvent condition in a natural sediment from a river contaminated by EDCs (Kinani *et al.* 2010).

For biological analysis, dose response curves (Figure 5) allowed calculating bio-TEQ that were reported in the table 4. Concerning the extraction efficiency of native EDCs, there were no marked differences between the solvent used for the extraction. In accordance with the results obtained for the spiked sediment, heptane did not allowed optimal extraction of active chemicals whereas mixture of MeOH/DCM offered the most efficient extraction for the three biological activities especially for PXR-like activity (Table 4).

Results of chemical analysis (Table 5) showed high levels of PAHs, akyphenols and BPA ($\mu\text{g/g}$ d.w range), moderate levels of OCPs, PCBs and PBDEs (ng/g d.w range) and weak levels of steroids ($< \text{ng/g}$ d.w range) while no pharmaceuticals could be detected (data not shown). The diversity and quantity of pollutants were equivalent to that reported by of Kinani *et al.* (2010) showing the continuous contamination of this river. Overall, as previously noted for biological analysis, the extraction efficiency of the tested solvent did not strongly differed. As previously reported in other studies the polar solvent MeOH allowed the best extraction of OCPs, PCBs and PBDEs non polar chemicals (Camino-Sanchez *et al.* 2011) while mixture of polar and non polar solvents allowed the best efficient extraction (Kigushi *et al.* 2006), notably mixture of MeOH/DCM.

5. Conclusion

In the present study, we aimed at evaluating the potency of several solvents to extract a broad range of active chemicals in sediment extract for a bioanalytical purpose. Using sediment spiked with a defined mixture of active chemicals, good recoveries were obtained for both chemical and biological analysis while mixture of non polar and polar solvent allowed the best efficient extraction. In particular, biological analysis revealed the involvement of complex mixture effect other than additive interactions between the mixture components, especially for PXR-like activity although the contribution of theoretically not active chemicals in the observed effect could not be excluded. Finally, the assesement of extraction efficiency of native EDCs in natural sediment exerting estrogenic, PXR-like and dioxin-like activities confirmed that mixture of polar and non polar solvent, especially MeOH/DCM, allowed the best extraction although there were no much marked differences between tested solvents.

This study further validated extraction methodology, which provides a useful tool for the assesement of a broad range of knowns and unknowns active chemicals occurring in sediment that can be used for bio-analytical purpose.

Acknowledgements

This study was supported by the French Ministry of Ecology (grant P190-ECOPI) and by a doctoral fellowship to N.C (contract no. CIFRE703/2008). The authors wish to thank Benjamin Piccini with field sampling.

References

- Andreu, V., E. Ferrer, J. L. Rubio, G. Font and Y. Pico (2007). "Quantitative determination of octylphenol, nonylphenol, alkylphenol ethoxylates and alcohol ethoxylates by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in soils treated with sewage sludges." *Science of the Total Environment* **378**(1-2): 124-129.
- Arditsoglou, A. and D. Voutsas (2008). "Determination of phenolic and steroid endocrine disrupting compounds in environmental matrices." *Environmental Science and Pollution Research* **15**(3): 228-236.
- Balaguer, P., F. Francois, F. Comunale, H. Fenet, A. M. Boussioux, M. Pons, J. C. Nicolas and C. Casellas (1999). "Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens." *Science of the Total Environment* **233**(1-3): 47-56.
- Baldwin, W. S. and J. A. Roling ((2009). "A Concentration Addition Model for the Activation of the Constitutive Androstane Receptor by Xenobiotic Mixtures." *Toxicological Sciences* **107**(1): 93-105.
- Berenbaum, M. C. (1985). "The Expected Effect of a Combination of Agents - the General-Solution." *Journal of Theoretical Biology* **114**(3): 413-431.
- Brack, W. (2003). "Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures?" *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377**(3): 397-407.
- Brian (2005). "Accurate Prediction of the Response of Freshwater Fish to a Mixture of Estrogenic Chemicals." *Environmental Health Perspectives* **113**.
- Burkhardt, M. R., S. D. Zaugg, T. L. Burbank, M. C. Olson and J. L. Iverson (2005). "Pressurized liquid extraction using water/isopropanol coupled with solid-phase extraction cleanup for semivolatile organic compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), and alkylated PAH homolog groups in sediment." *Analytica Chimica Acta* **549**(1-2): 104-116.
- Camino-Sánchez, F. J., A. Zafra-Gómez, J. P. Pérez-Trujillo, J. E. Conde-González, J. C. Marques and J. L. Vilchez (2011). "Validation of a GC-MS/MS method for simultaneous determination of 86 persistent organic pollutants in marine sediments by pressurized liquid extraction followed by stir bar sorptive extraction." *Chemosphere In Press*, **Corrected Proof**.
- Creusot, N., S. Kinani, P. Balaguer, N. Tapie, K. LeMenach, E. Maillot-Marechal, J. M. Porcher, H. Budzinski and S. Ait-Aissa (2010). "Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396**(2): 569-583.
- de Boer, J., C. Allchin, R. Law, B. Zegers and J. P. Boon (2001). "Method for the analysis of polybrominated diphenylethers in sediments and biota." *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **20**(10): 591-599.
- Desbrow, C., E. J. Routledge, G. C. Brighty, J. P. Sumpter and M. Waldock (1998). "Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening." *Environmental Science & Technology* **32**(11): 1549-1558.
- Focant, J. F., G. Eppe, C. Pirard and E. De Pauw (2001). "Fast clean-up for polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls analysis of high-fat-content biological samples." *Journal of Chromatography A* **925**(1-2): 207-221.
- Helaleh, M. I. H., A. Al-Omair, A. Nisar and B. Gevao (2005). "Validation of various extraction techniques for the quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using gas chromatography-ion trap mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1083**(1-2): 153-160.
- Hill, E. M., K. L. Evans, J. Horwood, P. Rostkowski, F. O. Oladapo, R. Gibson, J. A. Shears and C. R. Tyler (2010). "Profiles and some initial identification of (anti)androgenic compounds in fish exposed to wastewater treatment works effluents." *Environmental Science & Technology* **44**(3): 1137-1143.
- Hollert, H., M. Durr, H. Olsman, K. Halldin, B. Van Bavel, W. Brack, M. Tysklind, M. Engwall and T. Braunbeck (2002). "Biological and chemical determination of dioxin-like compounds in sediments by means of a sediment triad approach in the catchment area of the River Neckar." *Ecotoxicology* **11**(5): 323-336.
- Hotchkiss, A. K., C. V. Rider, C. R. Blystone, V. S. Wilson, P. C. Hartig, G. T. Ankley, P. M. Foster, C. L. Gray and L. E. Gray (2008). "Fifteen years after "Wingspread" - Environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go." *Toxicological Sciences* **105**(2): 235-259.
- Houtman, C. J., P. E. G. Leonards, W. Kapiteijn, J. F. Bakker, A. Brouwer, M. H. Lamoree, J. Legler and H. J. C. Klamer (2007). "Sample preparation method for the ER-CALUX bioassay screening of (xeno-)estrogenic activity in sediment extracts." *Science of the Total Environment* **386**(1-3): 134-144.
- Howard, G. J., J. J. Schlezinger, M. E. Hahn and T. F. Webster ((2010). "Generalized Concentration Addition Predicts Joint Effects of Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists with Partial Agonists and Competitive Antagonists." *Environmental Health Perspectives* **118**(5): 666-672.
- Huang, Q., Y. Yu, C. Tang and X. Peng ((2010). "Determination of commonly used azole antifungals in various waters and sewage sludge using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1217**(21): 3481-3488.
- Jeannot, R., H. Sabik, E. Sauvard, T. Dagnac and K. Dohrendorf (2002). "Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **974**(1-2): 143-159.

- Jelic, A., M. Petrovic and D. Barcelo (2009). "Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry." *Talanta* **80**(1): 363-371.
- Kiguchi, O., T. Kobayashi, K. Saitoh and N. Ogawa (2006). "Pressurized liquid extraction of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls from contaminated soil." *Journal of Chromatography A* **1108**(2): 176-182.
- Kinani, S., S. Bouchonnet, S. Bourcier, N. Creusot, J. M. Porcher and S. Ait-Aissa (2008). "Extraction and purification procedures for simultaneous quantification of phenolic xenoestrogens and steroid estrogens in river sediment by gas chromatography/ion trap mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**(22): 3651-3661.
- Kinani, S., S. Bouchonnet, N. Creusot, S. Bourcier, P. Balaguer, J. M. Porcher and S. Ait-Aissa (2010). "Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers." *Environmental Pollution* **158**(1): 74-83.
- Kishida, M., T. Maekawa and H. Bandow (2010). "Effect of extraction temperature on pressurized liquid extraction of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and dioxin-like polychlorinated biphenyls from a sediment sample using polar and non-polar solvents." *Analytica Chimica Acta* **659**(1-2): 186-193.
- Kunz, P. Y. and K. Fent (2006). "Estrogenic activity of UV filter mixtures." *Toxicology and Applied Pharmacology* **217**(1): 86-99.
- Kunz, P. Y. and K. Fent (2009). "Estrogenic activity of ternary UV filter mixtures in fish (Pimephales promelas) - An analysis with nonlinear isobolograms." *Toxicology and Applied Pharmacology* **234**(1): 77-88.
- Labadie, P. and E. M. Hill (2007). "Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry - Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1141**(2): 174-181.
- Lemaire, G., W. Mnif, J. M. Pascussi, A. Pillon, F. Rabenoelina, H. Fenet, E. Gomez, C. Casellas, J. C. Nicolas, V. Cavailles, M. J. Duchesne and P. Balaguer (2006). "Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system." *Toxicological Sciences* **91**(2): 501-509.
- Loewe, S. and H. Muischnek (1926). "Über Kombinationswirkungen." *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **114**: 313-326.
- Louiz, I., S. Kinani, M. E. Gouze, M. Ben-Attia, D. Menif, S. Bouchonnet, J. M. Porcher, O. K. Ben-Hassine and S. Ait-Aissa (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)." *Science of the Total Environment* **402**(2-3): 318-329.
- Lye, C. M., C. L. J. Frid, M. E. Gill, D. W. Cooper and D. M. Jones (1999). "Estrogenic alkylphenols in fish tissues, sediments, and waters from the UK Tyne and Tees estuaries." *Environmental Science & Technology* **33**(7): 1009-1014.
- McCant, D. D., L. S. Inouye and V. A. McFarland (1999). "A One-Step ASE™ Extraction Method for TCDD TEQ Determination." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **63**(3): 282-288.
- Mnif, W., J. M. Pascussi, A. Pillon, A. Escande, A. Bartegi, J. C. Nicolas, V. Cavailles, M. J. Duchesne and P. Balaguer (2007). "Estrogens and antiestrogens activate hPXR." *Toxicology Letters* **170**(1): 19-29.
- Moore, L. B., J. M. Maglich, D. D. McKee, B. Wisely, T. M. Willson, S. A. Kliewer, M. H. Lambert and J. T. Moore (2002). "Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors." *Molecular Endocrinology* **16**(5): 977-986.
- Nieto, A., F. Borrull, E. Pocurull and R. M. Marce (2008). "Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1213**(2): 224-230.
- OECD-218 (2004). Test No. 218: Sediment-Water Chironomid Toxicity Using Spiked Sediment OECD Publishing.
- Ohtake, F., K. Takeyama, T. Matsumoto, H. Kitagawa, Y. Yamamoto, K. Nohara, C. Tohyama, A. Krust, J. Mimura, P. Chambon, J. Yanagisawa, Y. Fujii-Kuriyama and S. Kato (2003). "Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor." *Nature* **423**(6939): 545-550.
- Olivella, M. A. (2005). "Trace analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in suspended particulate matter by accelerated solvent extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **383**(1): 107-114.
- Oluseyi, T., K. Olayinka, B. Alo and R. M. Smith (2011). "Improved Analytical Extraction and Clean-up Techniques for the Determination of PAHs in Contaminated Soil Samples." *International Journal of Environmental Research* **5**(3): 681-690.
- Payne (2000). "Prediction and Assessment of the Effects of Mixtures of Four Xenoestrogens." *Environmental Health Perspectives*.
- Peschka, M., P. H. Roberts and T. P. Knepper (2007). "Analysis, fate studies and monitoring of the antifungal agent clotrimazole in the aquatic environment." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**: 959-968.
- Petersen, K. and K. E. Tollefsen (2010). "Assessing combined toxicity of estrogen receptor agonists in a primary culture of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes." *Aquatic Toxicology In Press, Accepted Manuscript*.
- Petrovic, M., S. Lacorte, P. Viana and D. Barcelo (2002). "Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment." *Journal of Chromatography A* **959**(1-2): 15-23.

- Radjenovic, J., A. Jelic, M. Petrovic and D. Barcelo (2009). "Determination of pharmaceuticals in sewage sludge by pressurized liquid extraction (PLE) coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**(6-7): 1685-1695.
- Schafer, R. B., R. Mueller, W. Brack, K. D. Wenzel, G. Streck, W. Ruck and M. Liess (2008). "Determination of 10 particle-associated multiclass polar and semi-polar pesticides from small streams using accelerated solvent extraction." *Chemosphere* **70**(11): 1952-1960.
- Seiler, T. B., T. Schulze and H. Hollert (2008). "The risk of altering soil and sediment samples upon extract preparation for analytical and bio-analytical investigations - a review." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**(8): 1975-1985.
- Silva, E., N. Rajapakse and A. Kortenkamp (2002). "Something from "nothing" - Eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects." *Environmental Science & Technology* **36**(8): 1751-1756.
- Van den Berg, M., L. S. Birnbaum, M. Denison, M. De Vito, W. Farland, M. Feeley, H. Fiedler, H. Hakansson, A. Hanberg, L. Haws, M. Rose, S. Safe, D. Schrenk, C. Tohyama, A. Tritscher, J. Tuomisto, M. Tysklind, N. Walker and R. E. Peterson (2006). "The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds." *Toxicological Sciences* **93**(2): 223-241.
- Van der Linden, S. C., M. B. Heringa, H. Y. Man, E. Sonneveld, L. M. Puijker, A. Brouwer and B. Van der Burg (2008). "Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays." *Environmental Science & Technology* **42**(15): 5814-5820.
- Wang (2009). "Development of a sample preparation method for the analysis of current-use pesticides in sediment using GC." *Arch Environ Contam Toxicol*.
- Wang, P., Q. Zhang, Y. Wang, T. Wang, X. Li, L. Ding and G. Jiang (2010). "Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples." *Analytica Chimica Acta* **663**(1): 43-48.
- Xue, N., F. Li, H. Hou and B. Li (2008). "Occurrence of endocrine-disrupting pesticide residues in wetland sediments from Beijing, China." *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**(5): 1055-1062.

Synthèse de l'article 5

Les résultats de cette étude confirment que l'ASE, de manière générale, est une méthode drastique. Par conséquent, quelque soit le solvant utilisé, l'efficacité d'extraction ne varie pas énormément aussi bien pour le sédiment dopé avec notre mélange de 12 PE que pour le sédiment naturel. Néanmoins les mélanges de solvants polaires et apolaires de type méthanol/dichlorométhane (50/50, v:v) ou méthanol/heptane (50/50, v:v) semblent permettre une extraction plus efficace alors que l'heptane est clairement moins efficace.

Par ailleurs, la démarche proposée ici est particulièrement innovante à travers l'utilisation d'outils biologiques pour la mesure du rendement d'extraction sur le sédiment dopé, en comparaison des outils chimiques classiquement employés. Les résultats des rendements diffèrent quelque peu selon les outils employés. Notamment les rendements « biologiques » semblent meilleurs et suggèrent que les composés ciblés par les analyses chimiques et associés à une activité donnée contribuent potentiellement aux autres activités comme le suggère nos investigations pour la préparation du mélange de 12 PE.

En effet, cette étude a également été l'occasion d'explorer les effets de mélange sur les récepteurs ER, PXR et AhR à travers notamment le modèle d'additivité CA (*concentration addition*). En accord avec la littérature, nos résultats expérimentaux montrent une relative bonne concordance avec le modèle CA pour le ER et le AhR, malgré une très légère sous-estimation de l'effet expérimental par ce modèle. Pour le PXR, cette sous-estimation est plus marquée suggérant que des interactions de type synergique pourraient intervenir.

2.1.3.2 Purification par GPC

La littérature rapporte fréquemment l'emploi de méthode de purification pour l'élimination de composés matriciels (e.g. substances humiques, lipides, pigments) présents dans l'extrait brut (voir section 3.1.1.3 de la synthèse bibliographique, p 44). Généralement ce *clean-up* est réalisé en amont des analyses chimiques de manière à limiter les interférences potentielles avec les composés d'intérêts ou pour limiter l'endommagement des colonnes analytiques (e.g. élimination du soufre). Dans le cas des analyses biologiques, certaines études rapportent de possibles interférences avec les réponses mesurées. Notamment les acides humiques en plus de réduire la biodisponibilité de certains contaminants seraient capable d'interagir avec certains récepteurs, notamment le AhR (Janocek *et al.* 2007).

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux composés matriciels de haut poids moléculaires de type lipides ou acides humiques. Parmi les méthodes de purification employées, nous avons choisi la chromatographie par perméation de gel décrite comme étant la moins destructive.

La calibration de la colonne a été réalisée selon les recommandations du protocole EPA 3640A en utilisant un mélange d'huile de maïs, de méthoxychlore, de DEHP, de pérylène et de soufre. Ces composés ont été injectés seuls puis en mélange (**Figure 39**) de manière à établir leur temps de rétention (**Tableau 29**).

Tableau 29. Temps de rétention des standards employés pour la calibration de la GPC
(En gras : composés du mélange étalon EPA 3640A)

Composés	Concentration (mg/L)	Détection UV (nm)	Temps de rétention (min)
huile de maïs	37000	254	11,5
4-t-OP	80	280	14,5
BPA	80	254	14,5
DEHP	1300	254	14,5
E2	80	280	15,5
fénofibrate	80	280	15,75
méthoxychlor	300	254	16,5
o,p' DDT	80	280	17,5
TPP	80	254	17,5
slotrimazole	80	280	18,5
DaA	80	254	28
BkF	80	254	29,5
soufre	200	254	31,5
pérylène	40	254	32

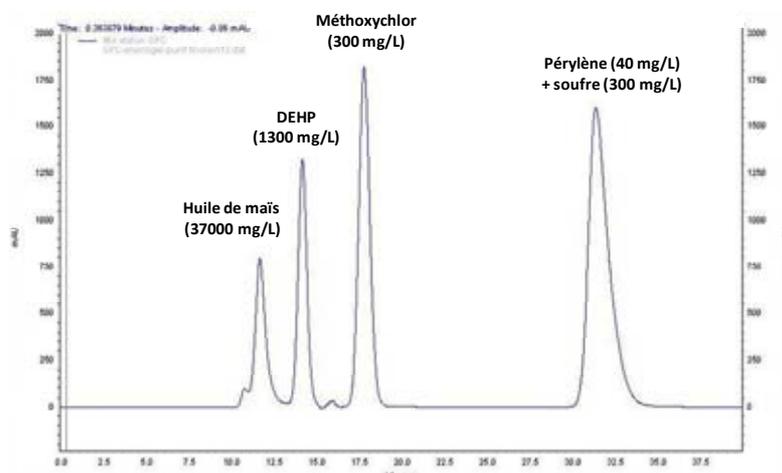


Figure 39 : Profil d'élution du mélange étalon utilisé pour la calibration de la GPC

Par la suite les profils d'éluion de différents standards analytiques (E1, E2, 4tOP, BPA, o,p'DDT, fénofibrate, TPP, clotrimazole, PCB126, BkF and DaA) ont été établis avec une détection UV à 254 ou 280 nm (**Tableau 29**). Globalement les résultats montrent que les composés d'intérêt sont élués après 13 minutes alors que l'huile de maïs représentative des macromolécules est élue avant 13 minutes. En revanche la méthode utilisée ne semble pas permettre l'élimination du soufre comme en témoigne la co-élution de cet élément avec le pérylène.

La procédure de purification de l'extrait de sédiment était la suivante. Une quantité équivalente à 1 g de sédiment en masse sèche a d'abord été filtrée sur une seringue Acrodisc 0.45 µm (Waters®) comme préconisé par le fabricant de la colonne (Waters®). L'extrait filtré a ensuite été repris dans un mélange cyclohexane/AE (50/50, v:v). Sur la base des résultats de la calibration, deux fractions ont été collectées : F1 de 0 à 13 min (65 mL) et F2 de 13 à 40 min (135 mL). Ces fractions ont ensuite été évaporées jusqu'à 1 mL au Rotavap (Heidolph, Schwabach, Allemagne) puis évaporées à sec sous flux d'azote avant d'être reprise dans du DMSO pour les tests *in vitro*. Des blancs de manipulations ont été réalisés pour mettre en évidence toute contamination potentielle durant la procédure. Les analyses biologiques ont ainsi été réalisées sur l'extrait brut, sur l'extrait filtré sur Acrodisc, sur les fractions F1 et F2, sur le pool des fractions et sur les blancs de manipulations.

Tableau 30. Activités détectées au sein de l'extrait de sédiment avant et après purification (résultats exprimés en TEQ-bio (interval de confiance, p < 0,05)

	ER (ngE2-EQ/g sed)	Anti-AR (µgFlu-EQ/g sed)	PXR (µgSR-EQ/g sed)	AhR 24h (ngTCDD-EQ/g sed)	AhR 4h (µgBaP-EQ/g sed)
Brut	6,8 (5,3-7,6)	61,3 (43,5-77,7)	44,4 (34,1-49,2)	64,1 (58,2-65,0)	40,5 (38,4-45,5)
Pool	7,2 (4,7-10,1)	62,5 (53,3-67,5)	32,1 (28,3-39,2)	58,7 (52,2-60,5)	68,3 (57,7-73,0)
F1	n.d	n.d	2,6 (2,2-3,3)	n.d	n.d
F2	5,2 (4,9-5,6)	52,1 (42,8-70,8)	31,2 (27,6-38,6)	57,9 (52,3-58,2)	128,0 (117,2-129,6)
Blancs	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d

Les résultats présentés dans le **tableau 30** montrent tout d'abord qu'aucune activité n'a été détectée dans les blancs de procédure excepté pour l'activité *dioxin-like* à 4h supposant une légère contamination par des composés de types HAP. Néanmoins cette activité reste inférieure à la limite de quantification. Par la suite aucune différence n'a été observée dans l'activité mesurée dans l'extrait brut et dans l'extrait purifié sur seringue Acrodisc (données non montrées).

Par ailleurs, les activités œstrogénique et anti-androgénique présentent des profils similaires : (1) activité identique dans le brut et le pool suggérant que la purification ne conduit pas à la perte de composés actifs, (2) aucune activité en F1 et une activité très légèrement réduite en F2 en comparaison du pool suggérant la présence de faibles quantités de composés actifs dans la F1 (i.e. non détectable seul) qui pourraient potentialiser l'effet des composés présent dans la F2.

Concernant l'activité *PXR-like*, on constate une réduction de l'activité détectée entre le brut et le pool démontrant que la purification a entraîné une perte de composés actifs dans le système. Par ailleurs, une activité similaire à celle du pool est détectée dans la F2 alors qu'une faible activité était détectable dans la F1 suggérant que certains interférant matriciels pouvaient provoquer l'activation du récepteur. La poche de fixation du ligand du hPXR est décrite comme particulièrement large et flexible (Di-Masi et al., 2010), pouvant accueillir des molécules dont la masse est comprise entre 272 Da (E2) à 823 Da (rifampicine) (di Masi *et al.*

2009, Le Maire *et al.* 2010). Dans le cas présent, le(s) composé(s) responsable(s) de l'activation du hPXR dans la F1 reste(nt) à être identifié(s).

Enfin, en ce qui concerne l'activité *dioxin-like*, les profils diffèrent selon la durée de l'exposition. Après une exposition de 24h correspondant à l'activité liée majoritairement aux composés persistants (PCB, PCDD/DF), l'activité dans le pool et la F2 est légèrement inférieure à celle du brut suggérant la perte de composés actifs durant la procédure. Après une exposition de 4h correspondant à l'activité globale mais reflétant principalement la contamination par les activateurs du AhR non persistants, l'activité est plus élevée dans le pool et elle augmente encore dans la F2. Ensemble, ces résultats semblent démontrer (1) la perte de composés interférants avec la voie de signalisation du AhR durant la procédure (2) l'occurrence de tels composés dans la F1.

Ensemble ces résultats témoignent de la présence potentielle de composés matriciels de haut poids moléculaires pouvant interférer avec la biodétection de contaminants actifs au sein de matrices environnementales. Suite à ces observations, une première série de tests réalisés sur nos modèles *in vitro* a permis de montrer que les acides humiques pouvaient avoir un effet anti-œstrogénique mais pouvaient également intervenir dans la voie de signalisation du AhR et induire l'activité EROD (données non montrées). Dans le cas de notre sédiment, si les acides humiques participaient à la réponse globale, leur élimination dans la F1 auraient vraisemblablement conduit à (1) une augmentation de l'activité œstrogénique dans la F2 en comparaison du pool, (2) une réduction de l'activité dioxin-like dans la F2. Ainsi à ce jour l'identité des interférants présents dans notre extrait de sédiment reste inconnue et des investigations supplémentaires seront nécessaires pour confirmer l'implication réelle de composés matriciels.

De manière générale, à l'exception de l'activité *dioxin-like*, l'effet des composés matriciels reste relativement réduit sur les réponses mesurées. Par ailleurs, la purification par GPC reste une méthode coûteuse en temps et en argent. Dans le cas présent, au regard de la différence entre les activités de l'extrait purifié et non purifié, la purification ne semble pas indispensable pour une caractérisation amont de la contamination. Notamment dans le cadre d'une démarche EDA, impliquant plusieurs étapes de fractionnement, il est vraisemblable que ces interférants soient progressivement isolés des contaminants actifs recherchés. Ainsi, dans le cadre de notre démarche, nous avons décidé de ne pas réaliser de purification par GPC en amont du fractionnement.

2.2 Application 1 : Le Réveillon : contamination agricole et urbaine

Au regard des précédentes investigations sur ce site (**Articles 2 et 5**), il était question ici (1) d'identifier les composés actifs au sein du sédiment à travers la mise en place de notre stratégie de type EDA, (2) d'étudier la distribution de la contamination entre le sédiment et la colonne d'eau.

2.2.1 Identification de ligands du hPXR et du ER dans le sédiment

Dans l'**article 2**, nous avons mis en place une approche multi-récepteurs pour la caractérisation de la contamination dans les sédiments de cinq rivières françaises. Parmi elles, le Réveillon était fortement contaminé par des composés de type œstrogénique, anti-androgénique, *PXR-like* et *dioxin-like*. Pour ce site en particulier, les analyses chimiques n'expliquaient qu'une infime partie des activités *PXR-like* et anti-androgénique (<0,1 %) alors qu'elles expliquaient environ 30 % des activités œstrogénique et *dioxin-like*.

Fort de ce constat nous avons entrepris la mise en œuvre d'une approche EDA pour l'identification des composés responsables des activités mesurées dans le sédiment. Pour cela nous avons développé et calibré une stratégie de fractionnement en plusieurs étapes incluant un préfractionnement par NP-SPE, un hyperfractionnement par RP-HPLC et un fractionnement sur colonne d'affinité au récepteur des œstrogènes. Cette stratégie et les résultats qui en découlent sont présentés dans l'**article 6**.

Article 6 : Creusot *et al.* (en préparation)

Effect directed analysis (EDA) of multiple endocrine disrupting activities: identification of ER and PXR ligands in a multi-contaminated river sediment

Effect directed analysis (EDA) of multiple endocrine disrupting activities: identification of ER and PXR ligands in a multi-contaminated river sediment

Nicolas Creusot^{1,2}, Hélène Budzinski², Patrick Balaguer³, Jean-Marc Porcher¹, Selim Aït-Aïssa^{1,*}.

¹ INERIS, Unité Écotoxicologie in vitro et in vivo, Parc ALATTA, BP2, f-60550 Verneuil-en-Halatte, France

² EPOC/ LPTC – UMR 5805 CNRS Université Bordeaux I, f-33405 Talence, France

³ INSERM U896, IRCM - UMI-CRLC Val d'Aurelle, Montpellier, France

* Corresponding author: E-mail: selim.ait-aissa@ineris.fr, fax +33 344 556 767

Abstract :

Sediment is the sink for thousand of chemical pollutants including endocrine disrupting chemicals (EDCs) that may trigger adverse effect for wildlife. In order to link adverse eco-toxic effect to chemical identity, effect directed analysis (EDA) approach is increasingly used. In the present study, we proposed the use of such approach to identify active chemicals in a river sediment where strong impacts in fish and multiple endocrine disrupting activities have been previously reported (estrogenic, (anti)androgenic, dioxin-like and hPXR-like activities). In particular, we calibrated and evaluated the use of multi-step fractionation for the isolation of chemicals that were biotested using *in vitro* multi-receptors approach. First, screening of EDC activities in the crude extract confirmed the multi-endocrine potency of this sediment. Then, we developed a fractionation strategy based on the combination of (1) NP-SPE-prefractionation, successfully validated for the isolation of a mixture of 12 non polar, semi polar and polar EDCs; (2) RP-HPLC-hyperfractionation, calibrated for the isolation of 35 EDCs with log Kow comprise between -1 and 7-; (3) recombinant estrogen receptor (ER) affinity column. This allowed the isolation and identification of PXR ligands (di-isooctylphthalate) and estrogenic chemicals (e.g. 2,4 di-tert-Butylphenol and 2,6-di-tert-butyl- α -methoxy-p-

resol) using GC-MS with full scan mode acquisition. Finally, biological activities of these chemicals were confirmed in *in vitro* models. No pic could be detected using GC-MS in polar fraction, where unknowns active polar compounds occurring in sediment were isolated.

Keywords : EDA, PXR, emerging pollutants, multi-contaminated sediment; multi-step fractionation

1. Introduction

Aquatic systems are the sink for natural and anthropogenic pollutants, including endocrine disrupting chemicals (EDCs), that may trigger adverse effects on wildlife and human (Tyler *et al.* 1998, Hotchkiss *et al.* 2008). With respect to the implementation of the European Water Framework Directive (WFD), which demands a good ecological status by 2015, the last decade has dealt with increasing attempts to analyze and monitor hazardous chemicals. However, environmental monitoring based on chemical analysis of priority pollutants often fails to identify adverse chemicals due to the multiplicity of environmental pollutants. This impedes accurate risk assessment, highlighting the need to develop strategies for the identification of occurring pollutants that indeed trigger adverse effects.

Effect directed analysis (EDA) (Brack 2003) aims at identifying biologically active chemicals by using fractionation procedures that reduce the complexity of environmental matrices and allow the progressive isolation of active chemicals detected by bioassays. EDA is a useful strategy to unravel complex mixtures of multiple EDC-mediated activity through the fractionation step, often consisting on multiple-step approach using solid phase extraction (SPE) and high pressure liquid chromatography (HPLC) (Thomas *et al.* 2001, Brack *et al.* 2005). However, up to date, fractionations of sediment extract have mainly dedicated to only single classes of compounds (i.e. non polar or polar compounds - Brack *et al.* 2008, Houtman *et al.* 2006). In addition, only few studies have dealt with multiple biological endpoints and have often reported the co-occurrence of several biological activities in the final fractions (Schmitt *et al.* 2010, Luebecke-von Varel *et al.* 2011). Hence, there is still a need to develop fractionation strategies allowing both (1) the separation of chemicals exerting wide range of polarities (i.e. polar, semi-polar and non polar chemicals) (2) the isolation of active compounds in the final fractions. Up to date, EDA has been successfully used for the identification of EDCs able to interfere with

hormonal and xenobiotic receptors such as estrogenic (Houtman *et al.* 2004, Houtman *et al.* 2007), androgenic (Hill *et al.* 2010), anti-androgenic (Weiss *et al.* 2009) and dioxin-like chemicals (Brack and Schirmer 2003, Brack *et al.*, 2005). A part from these EDCs families, other active compounds can bind other nuclear receptors that may ultimately serve as xenobiotic sensors to enhance environmental diagnostic in EDA studies. For instance, recent studies have shown the occurrence of human pregnane X receptor (hPXR) ligands in river sediment, surface water river and sewage treatment plant effluents (Kinani *et al.* 2010, Creusot *et al.* 2010, Mnif *et al.* 2010, Mahjoub *et al.* 2009). This receptor is known to be activated by a diversity of environmental pollutants including pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) (Lemaire *et al.* 2006, Mnif *et al.* 2007, Creusot *et al.* 2010, Kretschmer and Baldwin 2005) and has been proposed as a xenosensor for the detection of a broad range of environmental chemicals presenting different physico-chemical properties (e.g. polarity, solubility...). In addition, because hPXR plays a crucial role in the xenobiotic detoxification and the clearance of endogenous hormones (Orans *et al.* 2005), abnormal modulation of its activity could lead to adverse effect. Hence,

Table 1. Chemicals and analytical methods used in this study

Classes (providers)	Compounds	Analytical method (reference)
PAHs (LGC standard)	Naphtalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, anthracene, fluoranthene, dibenzothiophene, pyrene, benzo[a]anthracene, triphenylen, chrysene, benzo[b/j/f]fluoranthene (Bb/j/kF), benzo[c]pyrene, benzo[a]pyrene, indenopyrene, dibenzo [a,h]anthracene (DaA), benzoperlyen, triphenyl-phosphate (TPP)	GC-MS (SIM) (Cailleaud <i>et al.</i> 2007)
PCB (LGC standard)	PCB 08 / 18 / 29 / 50+ 28 / 52 / 44 / 104 / 66 / 101 / 87 / 154 + 77 / 188 / 153 / 105 / 138 / 126 / 187 / 128 / 200 / 180 / 170 / 195 206 / 209 ;	GC-μECD (Cailleaud <i>et al.</i> 2007)
BDE (LGC standard)	BDE47 / 119 / 99 / 153	GC-μECD
OCP (Cluzeau)	Hexachloro-benzene, lindane, heptachlor, heptachlore epoxide, 2,4'DDE, cis-chlordane, trans-nonachlore, 4,4'DDE, dieldrin, 2,4'DDD, 4,4'DDD, 2,4'DDT, 4,4'DDT, mirex	GC-μECD
Steroides (Sigma)	Estriol, norethindrone, testosterone, ethinyloestradiol, estrone (E1), 17α-estradiol, 17β-estradiol (17β-E2), levonorgestrel, progesterone, mestranol	UPLC-MS/MS
Pharmaceutials (Sigma)	Cafein, carbamazepine, diazepam, nordiazepam, amitryptiline, doxepine, imipramine, ibuprofene, paracetamol, ketoprofene, naproxene, aspirine, diclofenac, gemfibrozil, clenbuterol, salbutamol, terbutaline, theophylline, alprazolam, bromazepam, fluoxetine, clotrimazole (Clotri), fenofibrate (Feno)	RRLC-MS/MS
Alkylphenols (Cluzeau)	NP2EO, NP1EO, NP1EC, 4-nonylphenol (NP), bisphenol A (BPA), 4-tert-octylphenol (4tOP)	UPLC-MS/MS

identification of environmental pollutants that can activate this receptor may enhance knowledge on environmental risk.

By using a battery of complementary *in vitro* bioassays, we previously reported the occurrence of complex toxicity profiles, including PXR-like activity, in a multi-impacted French river (Kinani *et al.* 2010), where ecotoxicological impacts on fish were reported (Sanchez *et al.* 2007). In that study, we showed that bio-analytical characterization based on mass balance analysis derived from targeted chemical analysis provided only partial information on identity of chemicals detected by the bioassays. The aim of the present study was to implement an EDA approach based on multi-steps fractionation in order to isolate and identify active chemicals occurring in this sediment. First, we characterized the biological activity of the crude extract in order to confirm this multi-activity pattern previously observed. Then, isolation of the different biological activities was carried out using a two-step fractionation protocol validated in the present study. This protocol is based on a first fractionation on solid phase extraction based on normal phase (NP-SPE) followed by an hyperfractionation step using reverse phase-based high pressure liquid chromatography (RP-HPLC). Finally, we focused on the chemical identification of hPXR and human estrogen receptor (hER) ligands. For this latter purpose, affinity column based on immobilized recombinant hER α (Pillon *et al.* 2005) was used.

2. Material & method

2.1. Chemicals and reagents

Chemicals used as standards for analytical methods (Table 1) were purchased from Sigma-aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France), LGC-standard (Molsheim, France) and Cluzeau (Sainte Foy La Grande, France). Acetonitrile (ACN), dichloromethane (DCM), isooctane and methanol (MeOH) (HPLC reagent grade, Scharlau, Spain) were purchased from ICS (Belin Beliet, France). Luciferin and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

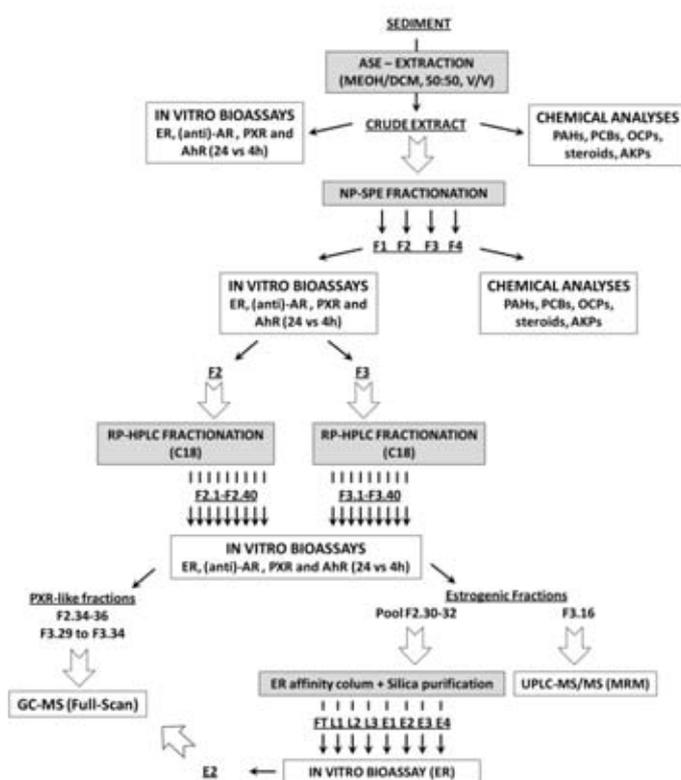


Figure 1. Fractionation strategy for the isolation and the identification of PXR and ER ligands.

2.2. Study site and sample preparation

The study site is located alongside the Réveillon River, a small French stream subjected to mixed anthropogenic pressure (i.e. agricultural, and urban) (GPS coordinates: N48°34'00''; E2°32'09''). Previous studies showed that fish are impacted (i.e. vitellogenin and EROD induction) (Sanchez *et al.* 2007) and revealed the occurrence of estrogenic, anti-androgenic, dioxin-like and PXR-like activities in sediments (Kinani *et al.* 2010). Sediment was sampled in April 2009 with a grab, sieved (mesh size, 1 mm), freeze dried, homogenized and stored in amber glass bottle at -20°C before analysis. Sediment was extracted using an ASE 350, accelerated solvent extraction systems (Dionex, France) equipped with 10 ml stainless extraction cell vessel. Five grams of freeze-dried sediment was placed in extraction cell and thoroughly mixed with sand in order to complete extraction cell. A mixture of MeOH/DCM (50:50, v:v) was used for the extraction. The operating conditions were the

following: extraction temperature, 75°C; extraction pressure, 1500 PSI; preheating period, 5 min; static extraction, 5 min; number of extraction cycles, 3; final extraction volume 25 mL; flush volume, 60% of the cell volume; nitrogen purge, 60 s. These extraction conditions were determined as suitable for the extraction of broad range of chemicals in terms of physico-chemical properties and biological activities (Creusot *et al.* in prep.). Extracts were then evaporated to residues using an EZ-2 evaporator system (Genevac, UK) and dissolved in MeOH/DCM for storage. For *in vitro* bioassays, aliquots of MeOH/DCM extract were drying until few μ L and redissolved in DMSO. For fractionation experiments, sediment extract were redissolved in heptane.

2.3. Fractionation strategy

Fractionation of sediment extracts were performed using sequential procedure based on normal phase-SPE (NP-SPE), reverse phase-HPLC (RP-HPLC) and nuclear receptor (NR) purified column (Figure 1). NP-SPE and RP-HPLC calibration have been calibrated for the isolation of chemicals exerting broad range of polarity. This calibration is detailed in the results and discussion section.

2.3.1. Polarity based fractionation

NP-SPE fractionation (prefractionation) was assessed on sediment extract redissolved in 1 mL of heptane, using silica cartridges (500 mg - 6 cc, Supelco, St-quentin Fallavier, France) previously conditioned with 5 ml of heptane. Sequential elution was performed using heptane (10 ml),

heptane/DCM (50:50, v:v) (10ml), ethyl-acetate (10mL) and MeOH/H₂O (10 mL) leading to 4 fractions (F1-F4) with increasing polarity. The obtained fractions were then evaporated to dryness under N₂ (F1, F2 and F3) or using EZ-2 evaporator (F4) and then redissolved in 1.5 mL of ACN. For all these prefractions, the effect on biological activities of a purification using alumina-silica column dedicated to the elimination of polar to semi-polar compounds for the analysis non polar chemicals such as PAHs, PCBs and OCPs, were also assessed (Cailleaud *et al.* 2007).

The second fractionation step (hyperfractionation) was performed using a RP-HPLC system equipped with a C18 column (Poursuit C18, 5 μ m, 250 x 4.6 I.D, Varian, Les Ulis, France), by using a water:acetonitrile gradient at a starting ratio of 80:20. The run was performed at 25°C at a flow rate of 1 mL/min with the following gradient program: 0-10 min (80:20), 60 min (55:45), 100-120 min (0:100), 120.01-125 min (80:20). In the present study, F2 and F3 prefractions were hyperfractionated, leading to 40 fractions of 3 mL each (F2.1-F2.40 and F3.1 to F3.40). The collected fractions (3 ml) were evaporated to dryness using EZ-2 evaporator system and then redissolved in 200 μ l of ACN for storage. Aliquots of this ACN extract were then redissolved in DMSO for biological analysis.

2.3.2. ER binding affinity based fractionation

An ER α affinity column was used to selectively isolate ER α ligands in hyperfractions exerting estrogenic activity (Figure 1), as previously described (Pillon *et al.* 2005). Recombinant ER α production for biological fractionation was described in Riu *et al.* 2008. All the experiments were then carried out at 4°C. The recombinant histidine-ER α was first immobilized on Ni-NTA agarose phase (purchased from Qiagen, France) in polytetrafluoroethylene (PTFE) column. In order to eliminate impurities, immobilized receptors were then washed three times with 500 μ l of washing buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1 mg/ml BSA, 10 mM imidazole). Then, test sample was diluted (d1/100) in washing buffer and loaded on the column. After three washes, ER α ligands were eluted in 4 fractions

Table 2. Recoveries of the prefractionation procedure on silica cartridges. (% , n=3, means \pm S.D)

		F1 (Heptane)		F2 (Heptane/DCM)		F3 (EA)	
Spiked solvent	2,4'DDT	99 \pm 1	4tOP	91 \pm 7	E1	88 \pm 17	
	DaA	98 \pm 4	Feno	98 \pm 8	17 β -E2	108 \pm 14	
	BkF	99 \pm 2	TPP	94 \pm 9	BPA	97 \pm 5	
	PCB126	98 \pm 4			Clotri	118 \pm 6	
Spiked blank sediment extract	2,4'DDT	76 \pm 13	4tOP	83 \pm 15	E1	87 \pm 20	
	DaA	83 \pm 17	Feno	82 \pm 9	17 β -E2	99 \pm 19	
	BkF	74 \pm 10	TPP	88 \pm 16	BPA	85 \pm 5	
	PCB126	80 \pm 15			Clotri	63 \pm 15	

No compound was detected in the F4.

Table 3. Log kow and retention time (Rt) of the chemicals used for the RP-HPLC fractionation calibration.

Chemicals	Log Kow ^a	Rt
Stavudine	-0.72	3.4
Cafein	0	4.2
Bisphenol S	1.65	16.9
Resveratrol	3.08	19.1
Acetophenone	1.58	21.4
Prednisolone + BP2	2.78	25.1
Carbamazepin	1.62	31.4
Dexamethasone	2.25	35.2
Isoproturon	1.83	39.9
Propylparaben	2.87	41.0
17β-E ₂ + BPA	3.04	45.4
a Zearalanol	3.64	46.5
BP1	3.94	48.5
Androstenedione	3.18	52.2
Butylparaben	3.36	53.5
Benzylparaben	4.2	55.6
Spironolactone	2.75	57.7
DES	3.57	60.7
BP3	3.56	69.9
TPP	2.78	75.5
Clotrimazole	5.07	76.6
4tOP	5.28	79.8
Fenofibrate	4.7	84.7
Chrysen	6.26	87.6
Cypermethryn	4.12	90.1
o,p'-DDT + Fenvalerate	5.19	91.5
BkF	5.81	92.9
DaA	6.33	94.8
PCB 126	6.79	97.3
TCDD	6.2	98.9

^adata from Environmental science database SRC physical properties database <http://www.syrres.com/esc/physprop.htm>

(E1-E4) using elution buffer (EB: 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0.1 mg/ml, BSA, and 200 mM imidazole) and remaining material was eluted using ethanol. Flow-through (FT) and then three washes (L1-L3) fractions were also collected. The resulting fractions were then concentrated and purified in order to suppress potential matrix effect on *in vitro* bioassays associated to the buffer components. For this purpose, fractions were first concentrated to 10 µL, redissolved in heptane and then purified on silica cartridges using prefractionation procedure, as described above).

2.4. Biological analysis and bio-TEQ calculation

Procedures for routine cell culture and sample *in vitro* testing have been previously described (Creusot et al., 2010). In brief, MELN (Balaguer et al. 1999), MDA-kb2 (Wilson et al. 2002), HG5LN-HPXR (Lemaire et al. 2006) and PLHC-1 (Louiz et al. 2008) cell lines were used to assess estrogenic, (anti)-androgenic, PXR-like and dioxin-like

activities, respectively. For the luciferase assay in MELN, MDA-kb2 and HG5LN-hPXR bioassays, cells were seeded in opaque 96 well plates at 1.105 cells/well density. After 24h, cells were exposed in triplicates to serial dilution of crude extract or fractions and incubated for 16h. The solvent (DMSO) final concentration was always 0.5 % v/v in cultured medium. Luciferase activity was assessed by addition of D-luciferin (0.3 mM) and measurement on a microtiterplate luminometer (MicroBeta, Wallac, Perkin-Elmer). For the EROD assay, PLHC-1 cell were seeded in transparent 96 well plate at 5.104 cell/well density and. After 24h, cells were exposed for 24 and 4h in order to discriminate between persistent and readily metabolized chemicals. After addition of 5 µM of 7-ethoxyresorufin, EROD activity was assessed on spectrofluorimeter at excitation/emission wavelengths of 400/460 nm (Saphire2, Tecan, Lyon, France).

Dose-response curves from bioassays were modeled using the free available Microsoft ExcelTM macro RegTox-7.0.3 (http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html). This allowed calculating biological toxic equivalent (bio-TEQ) which was defined as the ratio of the EC20 of the reference compound to that of the sample extract. In case of incomplete dose responses curves, the maximum effect was fixed at 100%, which correspond to the maximal response of the reference compound.

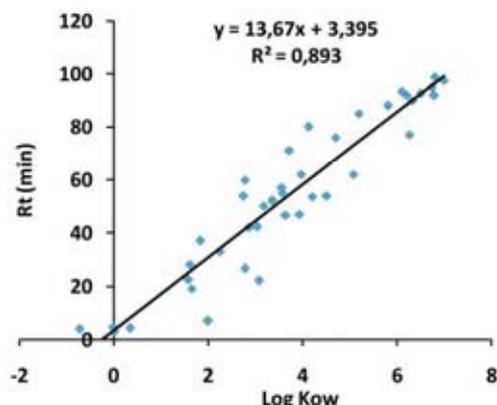


Figure 2. Log Kow for HPLC column calibration standards as function of their retention time (Rt).

2.5. Chemical analyses and chem-TEQ calculation

2.5.1. Targeted analysis in sediment for mass balance analysis

Chemicals analyses of steroids, alkylphenols, bisphenol A, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorobipenyls (PCBs) and organochlorides pesticides (OCPs) are detailed in **Table 1**. Chemical toxic equivalents (chem-TEQ) were then determinate according to the following equation: $\text{chem-TEQ} = \sum C_i \times \text{TEF}_i$ where C_i is the concentration of the compound i in the extract or fraction and TEF_i is the toxic equivalent factor defined as the ratio of EC20 of reference compound to EC20 of compound i .

2.5.2. Identification of the unknowns compounds isolated in the hyperfractions

Gas chromatography coupled with mass selective detection (GC-MS) was used to identify the unknown compounds in active fractions. Analyses were assessed using a gas chromatograph (GC, Agilent 6890, France) equipped with a HP-5MS fused silica capillary column, coupled to a mass selective detector (MS, Agilent 5973) and an autosampler-injector (Agilent 7683). Helium was used as carrier gas at a constant flow rate of 1.3 mL/min. Sample aliquots of 1 μl were injected in splitless mode at 250°C injector temperature. The oven temperature was increased from 50°C to 300°C with a rate of 4°C/min and held for 6.5 min. The mass range scanned was 50-500 m/z using electron impact ionization at 70 eV..

3. Results and Discussion

3.1. Calibration of the NP-SPE and RP-HPLC fractionations

NP-SPE fractionation procedure has been first calibrated for the isolation of organic compounds by using a mixture of 12 active EDCs (E1, E3, 4tOP, BPA, 2,4'DDT, fenofibrate, triphenyl phosphate, clotrimazole, dibenzo[a,h]anthracen, benzo[k]fluranthen, PCB126 and TCDD) covering a large range of polarity ($2 < \log K_{ow} < 7$). Several different cartridges (silica, alumina, Oasis HLB) were first tested for the isolation of active chemicals and silica cartridges were identified as allowing the

Table 4. Elution profile of 35 analytical standards.

Fractions (min)	SPE fractions		
	F1	F2	F3
F1- F8 (1-24)			
F9 (25-27)			BP2
F10 (28-30)			Prednisolone
F11 (31-33)			Carbamazepin
F12 (34-36)			
F13 (37-39)			Dexamethasone
F14 (40-42)			Isoproturon
F15 (43-45)			n-Propylparaben
F16 (46-48)			BPA, β E2
F17 (49-51)			BP1
F18 (52-54)			EE2, n-butylparaben
F19 (55-57)			n-Benzylparaben
F20 (58-60)			Spironolactone
F21 (61-63)			Ibuprofen, DES
F22-23 (64-69)			
F24 (70-72)		BP3	
F25 (73-75)			
F26 (76-78)		TPP, Clotri	
F27 (79-81)		4tOP	
F28 (82-84)			
F29 (85-87)		Fenofibrate	
F30 (88-90)	Chrysen	Cypermethryn	
F31 (91-93)	2,4'DDT	Fenvalerate	
F32 (94-96)	Bkf, DaA		
F33 (97-99)	PCB 126, TCDD		
F34-(100-120)			

best isolation (data not shown). The elution conditions were then optimized and matrix effects were assessed by using blank sediment extract spiked with the mixture of 12 EDCs. Established calibration procedure showed good recoveries (higher than 70 %) for all the tested chemicals. and weak matrix effect except for clotrimazole (63% in the spiked blank sediment extract) (**Table 2**).

The elution gradient used for the RP-HPLC hyperfractionation was calibrated through the determination of the retention time of 35 EDCs belonging to different organic contaminant families exerting a broad range of polarity ($0 < \log K_{ow} < 7$) (**Table 3**). The compounds were eluted from 3 (caffeine) to 99 (TCDD) min. Retention time of standard chemicals was well correlated to their log Kow (**Figure 2**). The elution profile of these 35 EDCs after prefractionation by NP-SPE and subsequent RP-HPLC hyperfractionation is reported in the **Table 4**. These data allowed validating overall fractionation protocol prior to its application to environmental samples.

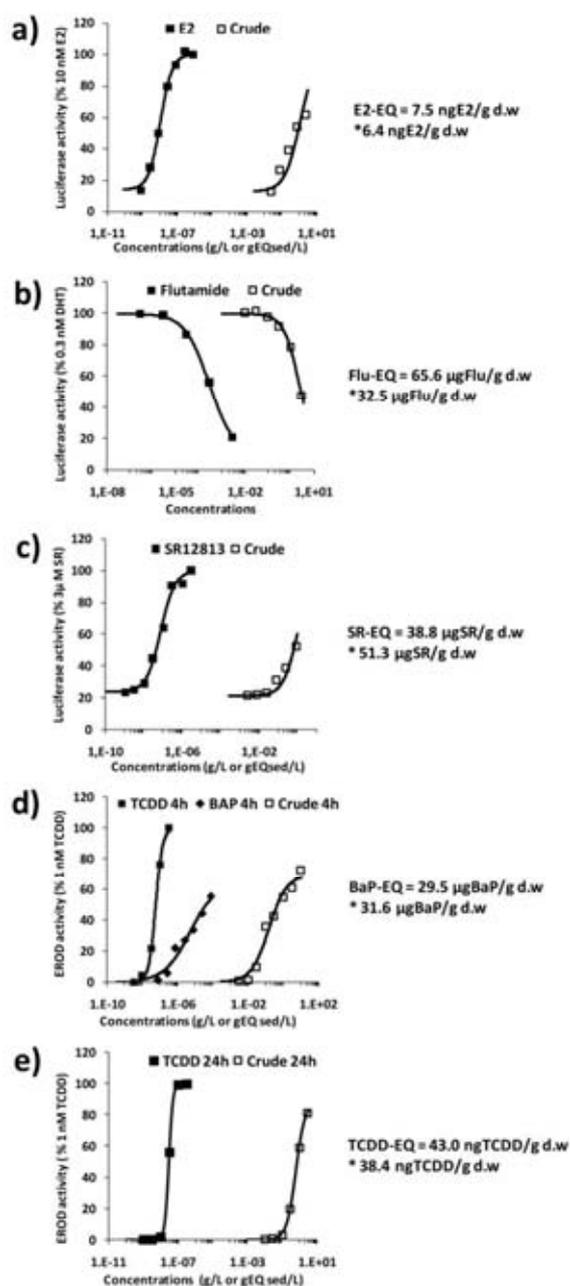


Figure 3. Dose responses curves of crude extract of Réveillon sediment for (a) estrogenic, (b) anti-androgenic, (c) PXR-like, (d) BaP-like and (e) TCDD-like activities. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induced by 10 nM 17β-estradiol (a), 0.1 nM DHT (b), 3 μM SR12813 (c) and 1 nM TCDD (d and e). *, values from Kinani et al. (2010) obtained in sediment sampled in 2005.

3.2. Biological activities and chemical analysis of sediment crude extracts

Estrogenic, anti-androgenic, PXR like and dioxin-like (24 h and 4 h) activities were detected in the

crude extracts of the Réveillon sediment. Dose responses curves allowed establishing bio-TEQ values for each of these activities (Figure 3). Overall the bio-TEQ values were quite similar to those reported by Kinani *et al.* (2010) at the same site in sediment sampled in 2005 (data in Figure 3), suggesting that this river is under constant high contamination level.

Chemical analyses revealed the presence of natural hormones (E2, testosterone, progesterone), but not synthetic steroids, as well as detected levels of miscellaneous contaminants such OCPs, PAHs, PCBs, PBDEs, alkylphenols and bisphenol A. However, based on mass balance calculation, the chemical analyses explained only a small part of the detected activities using bioassays (Table S1). These observations are overall in line with those previously reported for the same site (Kinani *et al.* 2010). Therefore, fractionation of the crude extract was implemented in order to isolate and identify the active chemicals responsible for the biological activities.

3.3. Biological and chemical analysis of the prefractions

A first reduced fractionation step was performed in order to provide first characterization on physico-chemical properties of active ligands. The figure 4 shows that *in vitro* activities were differently distributed between the four fractions, with anti-androgenic and dioxin-like activities mainly detected in F1 and F2, the less polar fractions, while ER and PXR ligands were essentially in mid-polar to polar fractions (F2-F3).

Overall, there were no marked differences between activities in crude and F1-F4 pool suggesting negligible loss of actives chemicals associated to this prefractionation procedure (Figure 4). Nevertheless, a significant difference was noted for anti-androgenic activity, likely due to a loss of active chemicals at this stage. In addition, except for estrogenic activity, the sum of the individual fractions activities was equal to those of crude and pool extracts suggesting an additive effect of active chemicals. For estrogenic activity, both F2 and F3 individual prefractions exerted similar activity as crude and F1-F4 pool extracts, thus highlighting potential mixture effect in these extracts (Figure 4).

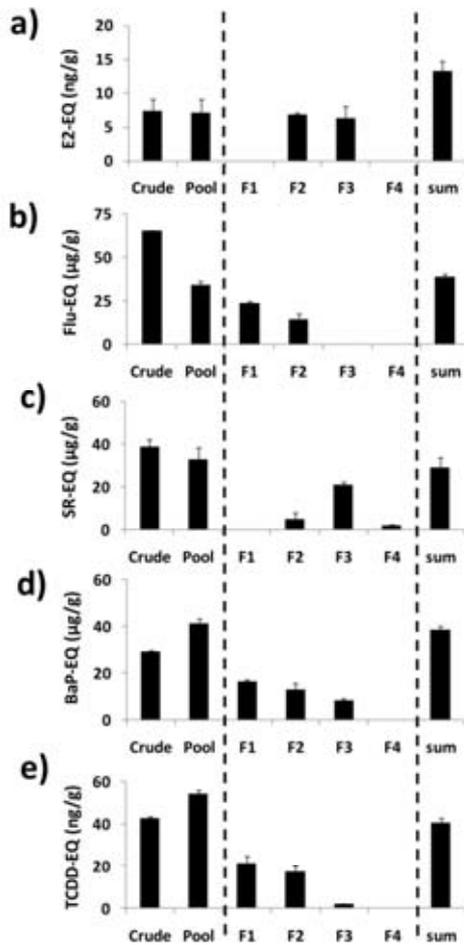


Figure 4. Comparison of estrogenic (a), anti-androgenic (b), PXR-like (c) and dioxin-like (d and e) activities in crude, pool, prefraction and sum of prefraction extracts. Results are expressed as biological toxic equivalent (means of three replicates).

Matrix interference might explain such anti-estrogenic effect through the elimination or isolation of matrix component from the active chemicals during the fractionation process, hence revealing higher E2-EQ in fractions than in crude extracts. Notably, humic acids are suspected to possess anti-estrogenic capability by trapping organic contaminants and reducing their bioavailability (Janosek *et al.* 2007, Steinberg *et al.* 2003).

The use of purification on alumina-silica micro-column allowed elimination of polar organic contaminants and provided further characterization of activities separated at this step. This purification step led to the loss of estrogenic and PXR-like

activities while anti-androgenic and dioxin-like activities persisted (**Figure 5**). This confirmed that ER and PXR activators were polar compounds whereas AR antagonist and dioxin-like chemicals were mainly non polar chemicals. OCPs and PAHs, known as anti-androgenic chemicals (Kojima *et al.* 2010, Aït-Aïssa *et al.* 2010, Weiss *et al.* 2009) and dioxin-like compounds (Louiz *et al.* 2008), respectively, may have contributed to such responses in F1 and F2. Interestingly, elimination of dioxin-like activity in F3 revealed the occurrence of

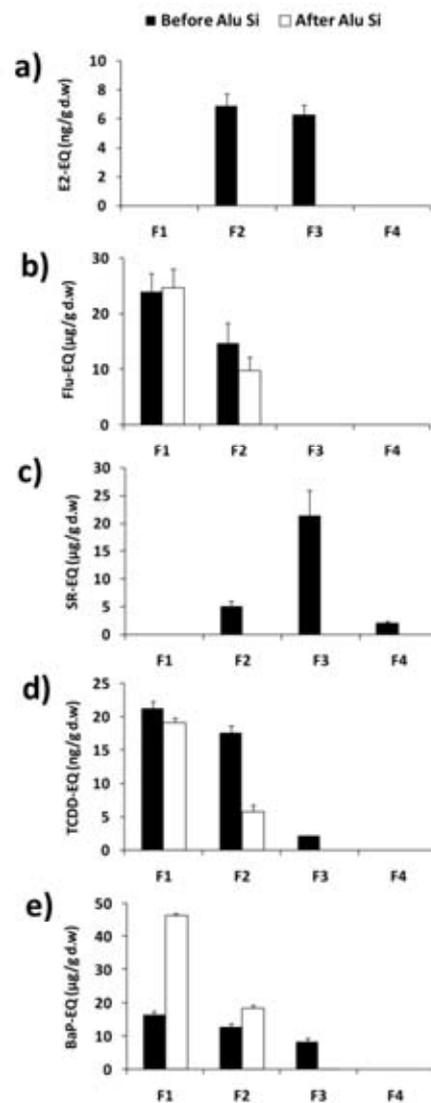


Figure 5. Comparison of estrogenic (a), anti-androgenic (b), PXR-like (c) and dioxin-like (d and e) activities before and after purification on alumina/silica micro-column. Results are expressed as bio-TEQ.

polar AhR ligands in the sediment extract other than classical dioxin-like chemicals such as PCBs, PAHs, PCDD/Fs. These results were in accordance with recent studies that have reported the occurrence of such polar AhR ligands in sediment (Koh *et al.* 2005, Song *et al.* 2006, Lubke von Varrel *et al.* 2011).

Finally, prefractionation calibration (**Table 2**) and further chemical analysis on these fractions confirmed the distribution of these activities as

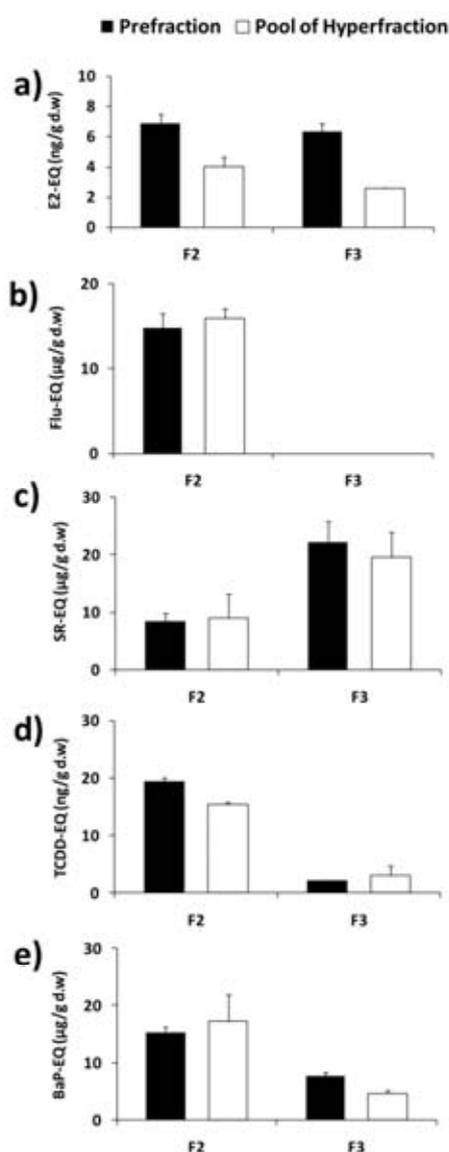


Figure 6. Comparison of estrogenic (a), anti-androgenic (b), PXR-like (c) and dioxin-like (d and e) activities between the prefractionation F2 or F3 and the pool of the 40 hyperfractions of each of these prefractions. Results are expressed as bio-TEQ.

regard to their chemical composition (i.e. PAHs, PCBs and OCPs in the F1, nonylphenol in the F2, BPA and E2 in the F3) (data not shown). These results tend to confirm that targeted chemicals contributed in part to the detected activities although the major contributors remain to be identified especially in the F2 and F3 where estrogenic and PXR-like activities remain poorly explained.

3.4. Hyperfractionation of the F2 and the F3 prefractions

To further isolate mid-polar to polar compounds responsible for estrogenic and PXR-like in the F2 and F3, RP-HPLC was used to fractionate these SPE-fractions.

In order to check potential loss of active compounds, all 40 fractions were pooled and tested in each bioassay. As seen in **figure 6**, comparison between activities in F2/F3 and pool of F2/F3 hyperfractions showed no alteration of PXR-like, anti-androgenic and dioxin-like activities. Regarding estrogenic activity, the pool of the F3 hyperfractions led to a two fold lower induction than the initial prefraction F3 while the activity of the pool of F2 hyperfraction was equivalent to 60 % of the activity of F2 (**Figure 6a**). These results suggested a loss of active chemicals associated to the hyperfractionation procedure. Such losses have been previously observed in other studies. For instance, Brack *et al.* (2005) noted a strong decrease of EROD activity after fractionation by RP-HPLC whereas calibration of the procedure showed recovery higher than 70 %. These authors attributed this loss to irreversible bound of organic matter to the stationary phase of HPLC column or to solvent exchange to polar solvent such as ACN.

The RP-HPLC profiles of F2 and F3 fractions (**Table 5**) highlighted significant dioxin-like activities in both F2.24-34 and F3.22-30, which was mediated by readily metabolizable compounds, such as PAH, since it was undetectable after 24h. Another main result is the relatively good isolation of ER and PXR ligands. Isolated active fractions for these latter bioactivities were then further investigated to identify the responsible compounds as described below.

Table 5. Biological activities in RP-HPLC fractions after injection of F2 and F3 SPE-fractions. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induction by 10 nM of 17 β -estradiol (ER), 3 μ M of SR12813 (hPXR) and 1 nM of TCDD (AhR).

	SPE-F2				SPE-F3			
	ER	hPXR	AhR 24h	AhR 4h	ER	hPXR	AhR 24h	AhR 4h
f1		3						
f2								
f3								
f4								
f5								
f6							11	
f7							10	
f8							8	
f9		6						
f10								
f11								
f12								
f13								5
f14							6	
f15							16	
f16							47	
f17				5				
f18				42	13			
f19								
f20		5						34
f21								
f22		8						39
f23								47
f24	10			38	7			51
f25				27	5			58
f26				67	7			55
f27				58				49
f28			4	74	13			57
f29			6	74	21			42
f30	36		9	76	22			17
f31	9		7	78	23			
f32	9		4	80	5	31		
f33				72		16		
f34		6		47		13		
f35		14		6				29
f36		8						
f37								
f38				16				
f39								
f40	15							

No or weak effect ($\leq 10\%$ *)
 Moderate effect (10-50%*)
 Strong effect ($>50\%$ *)

* percentage of luciferase transactivation relative to maximal induction by the reference compound

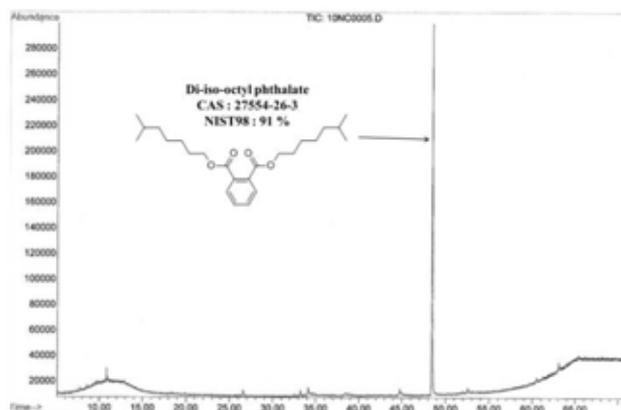


Figure 7. Total ion chromatogram of the F2.35

3.4.1. Isolation and identification of PXR ligands

The prefraction F2 exerted weak PXR-like. In order to identify PXR activators, the fractions F2.34, F2.35 and F2.36 were injected on GC-MS in full-scan mode acquisition. Only one pic was detected in F2.35 while no pic was detected in both F2.34 and F2.36. A comparison with the NIST98 mass spectra bank allowed the identification of di-iso-octylphthalate (DIOP) as a potential PXR ligand (91%, **Figure 7**). Several phthalates have been described as PXR ligands. By using the same cell line as in the present study, Mnif *et al.* (2007) showed that the bis-2ethylhexyl-phthalate, dibutyl-phthalate and benzyl butyl phthalate were able to activate this receptor. Milnes *et al.* (2008) showed also that diethyl-, benzylbutyl-, bis(2-ethylhexyl)-, dicyclo-hexyl-, dibutyl-, n-dipentyl-, n-dipropyl-, di-n-hexyl-phthalate were PXR activators using transfected COS-7 cell lines. To our knowledge, the activation of the hPXR by the DIOP is reported here for the first time. To confirm its PXR potency, we exposed the HG5LN-hPXR and the HG5LN cell lines to range of concentration of this chemical. A full dose-response curve was obtained in the HG5LN-hPXR while no modulation of luciferase activity was detected in the HG5LN cells that does not express hPXR (**Figure 8**), which confirmed DIOP as a specific activator of the hPXR. On the basis of its SR-EF (SR12813 equivalent factor) value of 0.03, DIOP was amongst strong activators of hPXR as compared to the 60 chemicals previously tested in the same cell line (Creusot *et al.* 2010).

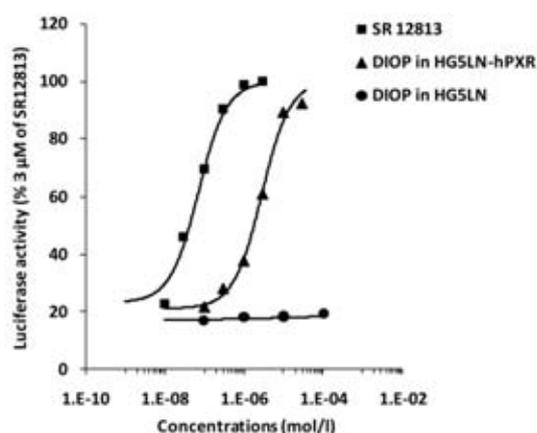


Figure 8. Dose response curves of DIOP in HG5LN-hPXR and HG5LN cells. Results are expressed as percentage of maximal luciferase induction by 3 μ M of SR12813, the hPXR reference compound.

RP-HPLC hyperfractionation of the F3 prefraction allowed isolation of PXR-like activity in F3.28 to F3.34 (**Table 5**). None of the chemicals used for SPE-HPLC calibration was eluted in these fractions (**Table 4**), thus no assumption could be advanced about the identity of the detected hPXR ligands. These hyperfractions were thus injected in GC-MS in full-scan mode but no pic has been detected. Prefraction calibration showed that the F3 prefraction was polar and may contain chemicals with log-Kow values under 3, such as steroids, BPA and parabens (**Tables 2 and 4**). Hence, GC-MS was likely not suitable to identify such compounds due to their potential high polarity and/or low volatility properties. Several studies have reported that GC-MS offers an interesting first approach for chemical identification due to the reproducibility of the mass spectra in electronic ionization and the existence of mass spectra bank (Schymanski *et al.* 2009). However, the same authors highlighted that such tool remains limited to the assessment of non polar and volatile chemicals. Hence, HR-LC-MS (LC-TOF; LC-LIT-MS) or hybrid techniques (Q-TOF, LTQ-FT-Orbitrap) will be required to identify hPXR activators in F3. The use of these techniques have been recently increasing for the identification of polar compounds (Petrovic and Barceló 2007, Krauss *et al.* 2010).

3.4.2. Identification of ER ligands using ER α affinity column

In the hyperfractionation of the prefraction F2, the strongest estrogenic activity was detected in the F2.30, which exerted 36 % of the maximal response, but also in a lesser extent in the F2.31 and the F2.32 (**Table 5**). All of these fractions possessed also dioxin-like activity. In order to isolate ER ligands from AhR ligands, we used an hER α affinity column, which has been successfully used for the isolation of estrogenic activity in environmental matrices (Pillon *et al.* 2005), or to identify estrogenic compounds in infant formulas (Riu *et al.* 2008). The three active fractions (F2.30-2.32) were pooled, deposited on hER α affinity column and, flowthrough, washing and elution fractions were then purified on silica cartridges. Analysis on bioassays showed that estrogenic activity was only detected in the elution fraction 2 while AhR activity was not retained by the column (data not shown). This elution fraction was then injected on GC-MS in full scan mode, allowing the identification of 2,4 di-tert-butylphenol (2,4-t-BP) and 2,6-di-tert-butyl- α -methoxy-para-cresol (DTB) as major compounds (**Figure 9**). Alkylphenols are widely described as endocrine disruptors through their capacity to activate the ER (Tyler *et al.* 1998). Tollefsen and Nilsen (2008) have recently described the capacity of the 2,4-t-BP to bind to the rainbow trout ER while Sun *et al.* (2008) demonstrated that 4t-butylphenol activates rat and human ER. To our knowledge, the estrogenic effect of DTB has not

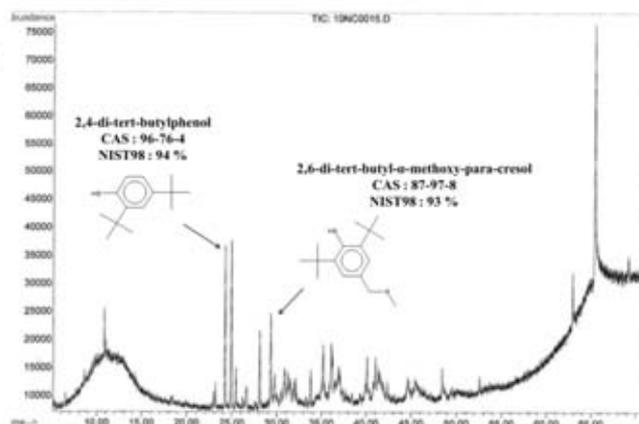


Figure 9. Total ion chromatogram of the active elution fraction from hER α column.

been described previously. Nevertheless, butylhydroxy-toluene (i.e. BHT or 2,6-di-tert-butyl-paracresol) and p-cresol, which are degradation products from DTB, were described as human ER activators (Wada *et al.* 2004, Nishihara *et al.* 2000). The potency of 2,4-t-BP and DTB to induce luciferase activity in MELN cells, has been further confirmed (**Figure 10**).

Estrogenic activity was also detected in F3.6-8, F3.15-16, and F3.18 (**Table 5**). SPE-HPLC calibration showed the elution of n-propylparaben in the F3.15, the elution of n-butylparaben in the F3.18 and the elution of BPA and β E2 standards in the F3.16 (**Table 4**). Kinani *et al.* (2010) showed the occurrence of n-propyl, n-butylparaben, BPA and β E2 in this river sediment. In the present study, targeted chemical analyses confirmed the occurrence of BPA and 17 β -E2 in the F3.16 (data not shown). As observed in crude extract, BPA weakly contributed to the estrogenic response in the F3.16 whereas 17 β -E2 explained 50% of the estrogenic activity in this fraction (data not shown). The occurrence of parabens in F3.15 and F3.18 remained to be confirmed by targeted chemical analysis.

3.4.3. Other biological activities

Surprisingly, no anti-androgenic could be detected in any of the RP-HPLC fractions (data not shown). Nevertheless, the pool of the 40 fractions exerted

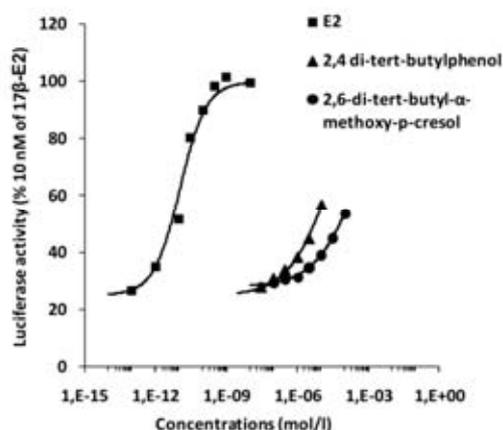


Figure 10. Dose response curves of 2,4-di-tert-butylphenol and of DTB in MELN cells. Results are expressed as percentage of maximal luciferase induction by 10 nM of 17 β -E2 the hPXR reference compound.

significant anti-androgenic activity that was similar to that of the F2 (**Figure 6b**). This suggested that anti-androgenic chemicals were not lost during the hyperfractionation procedure but were rather subjected to a too drastic dilution factor which did not allow their detection in the hyperfractions. This demonstrated that fractionation remains a difficult task when several biological activities have to be considered. Up to date, few studies have dealt with EDA approach using more than two biological endpoints (Schmitt *et al.* 2010, Lubke von varrel *et al.* 2011, Smital *et al.* (2010)). Altogether these studies showed that a reduced number of fractions (3 to 20) often led to the co-occurrence of several biological activities in the same fraction, hence rendering difficult the specific identification of the active chemicals. Therefore, a compromise should be found between the isolation resolution of the biological activity and the acceptable detectable levels of biological response in the fraction. In the present case study, further investigations using intermediate fractionation step will be necessary in order to identify anti-androgenic chemicals. Further NP-HPLC fractionation could be assessed.

Concerning the dioxin-like activity, it was distributed between many successive fractions yielding a cloudy signal rather than clear isolated peaks. Such pattern could be explained by (1) the occurrence of many AhR activators that were isolated in different numerous fraction or (2) the occurrence of few AhR ligands with an overlapping elution in these fractions. This may revealed that our RP-HPLC was not adapted to the isolation of AhR ligands. Nevertheless, Lubke von varrel (2011) using calibrated NP-HPLC observed a similar displaying of active fractions.

4. Conclusion

Our study demonstrated the usefulness of the combined use of a multi-receptors and multi-step fractionation approach to reveal a diversity of EDCs in complex environmental sample. Here, such approach allowed the isolation and the identification of hPXR and ER ligands. In addition, the NR affinity column is a useful tool for the final purification of active estrogenic chemicals in case of multiple biological activities. One novel result

was the identification of di-iso-octyl-phthalate as strong inducer of the hPXR.

Nevertheless our results demonstrated also that fractionation has some limitations as observed with the loss of anti-androgenic or the spreading of the dioxin-like activities in the hyperfractions. This highlights that fractionation strategy should be considered as a dynamic strategy that can be modulated for the isolation of active chemicals. For instance, in the present case, less drastic hyperfractionation after a first prefractionation would be probably necessary for the identification of anti-androgenic chemicals. Use of an AR affinity column on the prefractions could be also investigated. Overall, we proposed here several fractionation tools that can be use alone or in combination for the isolation of a broad range of active chemicals in order to enhance risk knowledge on endocrine disruption in situ.

Acknowledgements

This study was supported by the French Ministry of Ecology (grant P190-ECOPI) and by a doctoral fellowship to N.C (contract no. CIFRE703/2008). The authors wish to thank Marina Grimaldi for excellent technical assistance with the purification on hER α column and Benjamin Piccini with field sampling.

References

- Ait-Aïssa, S., S. Laskowski, N. Laville, J. M. Porcher and F. Brion (2010). "Anti-androgenic activities of environmental pesticides in the MDA-kb2 reporter cell line." *Toxicology in Vitro* **24**(7): 1979-1985.
- Balaguer, P., F. Francois, F. Comunale, H. Fenet, A. M. Boussioux, M. Pons, J. C. Nicolas and C. Casellas (1999). "Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens." *Science of the Total Environment* **233**(1-3): 47-56.
- Brack, W. (2003). "Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures?" *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377**(3): 397-407.
- Brack, W., L. Blaha, J. P. Giesy, M. Grote, M. Moeder, S. Schrader and M. Hecker (2008). "Polychlorinated naphthalenes and other dioxin-like compounds in Elbe River sediments." *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**(3): 519-528.
- Brack, W. and K. Schirmer (2003). "Effect-directed identification of oxygen and sulfur heterocycles as major polycyclic aromatic cytochrome P4501A-Inducers in a contaminated sediment." *Environmental Science & Technology* **37**(14): 3062-3070.
- Brack, W., K. Schirmer, L. Erdinger and H. Hollert (2005). "Effect-directed analysis of mutagens and ethoxyresorufin-O-deethylase inducers in aquatic sediments." *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**(10): 2445-2458.
- Cailleaud, K., J. Forget-Leray, S. Souissi, D. Hilde, K. LeMenach and H. Budzinski (2007). "Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoida, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs." *Chemosphere* **70**(2): 270-280.
- Creusot, N., S. Kinani, P. Balaguer, N. Tapie, K. LeMenach, E. Maillot-Marechal, J. M. Porcher, H. Budzinski and S. Ait-Aïssa (2010). "Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396**(2): 569-583.
- Hill, E. M., K. L. Evans, J. Horwood, P. Rostkowski, F. O. Oladapo, R. Gibson, J. A. Shears and C. R. Tyler (2010). "Profiles and some initial identification of (anti)androgenic compounds in fish exposed to wastewater treatment works effluents." *Environmental Science & Technology* **44**(3): 1137-1143.
- Hotchkiss, A. K., C. V. Rider, C. R. Blystone, V. S. Wilson, P. C. Hartig, G. T. Ankley, P. M. Foster, C. L. Gray and L. E. Gray (2008). "Fifteen years after "Wingspread" - Environmental endocrine disruptors and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go." *Toxicological Sciences* **105**(2): 235-259.
- Houtman, C. J., P. Booij, E. Jover, D. P. del Rio, K. Swart, M. van Velzen, R. Vreuls, J. Legler, A. Brouwer and M. H. Lamoree (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**(11): 2244-2252.
- Houtman, C. J., P. H. Cenijn, T. Hamers, M. H. Lamoree, J. Legler, A. J. Murk and A. Brouwer (2004). "Toxicological profiling of sediments using in vitro bioassays, with emphasis on endocrine disruption." *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(1): 32-40.
- Houtman, C. J., P. E. G. Leonards, W. Kapiteijn, J. F. Bakker, A. Brouwer, M. H. Lamoree, J. Legler and H. J. C. Klamer (2007). "Sample preparation method for the ER-CALUX bioassay screening of (xeno-)estrogenic activity in sediment extracts." *Science of the Total Environment* **386**(1-3): 134-144.
- Janosek, J., M. Bittner, K. Hilscherová, L. Bláha, J. P. Giesy and I. Holoubek (2007). "AhR-mediated and antiestrogenic activity of humic substances." *Chemosphere* **67**(6): 1096-1101.
- Kinani, S., S. Bouchonnet, N. Creusot, S. Bourcier, P. Balaguer, J. M. Porcher and S. Ait-Aïssa (2010). "Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers." *Environmental Pollution* **158**(1): 74-83.

- Koh, C. H., J. S. Khim, D. L. Villeneuve, K. Kannan, B. G. Johnson and J. P. Giesy (2005). "Instrumental and bioanalytical measures of dioxin-like and estrogenic compounds and activities associated with sediment from the Korean coast." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **61**(3): 366-379.
- Kojima, H., S. Takeuchi and T. Nagai (2010). "Endocrine-disrupting Potential of Pesticides via Nuclear Receptors and Aryl Hydrocarbon Receptor." *Journal of Health Science* **56**(4): 374-386.
- Krauss, M., H. Singer and J. Hollender (2010). "LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **397**(3).
- Kretschmer, X. C. and W. S. Baldwin (2005). "CAR and PXR: Xenosensors of endocrine disruptors?" *Chemico-Biological Interactions* **155**(3): 111-128.
- Lemaire, G., W. Mnif, J. M. Pascussi, A. Pillon, F. Rabenoelina, H. Fenet, E. Gomez, C. Casellas, J. C. Nicolas, V. Cavailles, M. J. Duchesne and P. Balaguer (2006). "Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system." *Toxicological Sciences* **91**(2): 501-509.
- Louiz, I., S. Kinani, M. E. Gouze, M. Ben-Attia, D. Menif, S. Bouchonnet, J. M. Porcher, O. K. Ben-Hassine and S. Ait-Aissa (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)." *Science of the Total Environment* **402**(2-3): 318-329.
- Luebecke-von Varel, U., M. Machala, M. Ciganek, J. Neca, K. Pencikova, L. Palkova, J. Vondracek, I. Loeffler, G. Streck, G. Reifferscheid, S. Flueckiger-Isler, J. M. Weiss, M. Lamoree and W. Brack (2011). "Polar Compounds Dominate in Vitro Effects of Sediment Extracts." *Environmental Science & Technology* **45**(6): 2384-2390.
- Mahjoub, O., M. Leclercq, M. Bachelot, C. Casellas, A. Escande, P. Balaguer, A. Bahri, E. Gomez and H. Fenet (2009). "Estrogen, aryl hydrocarbon and pregnane X receptors activities in reclaimed water and irrigated soils in Oued Souhil area (Nabeul, Tunisia)." *Desalination* **246**(1-3): 425-434.
- Milnes, M. R., A. Garcia, E. Grossman, F. Grun, J. Shiotsugu, M. M. Tabb, Y. Kawashima, Y. Katsu, H. Watanabe, T. Iguchi and B. Blumberg (2008). "Activation of steroid and xenobiotic receptor (SXR, NR1I2) and its orthologs in laboratory, toxicologic, and genome model species." *Environmental Health Perspectives* **116**(7): 880-885.
- Mnif, W., S. Dagnino, A. Escande, A. Pillon, H. Fenet, E. Gomez, C. Casellas, M. J. Duchesne, G. Hernandez-Raquet, V. Cavailles, P. Balaguer and A. Bartegi (2010). "Biological Analysis of Endocrine-Disrupting Compounds in Tunisian Sewage Treatment Plants." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **59**(1): 1-12.
- Mnif, W., J. M. Pascussi, A. Pillon, A. Escande, A. Bartegi, J. C. Nicolas, V. Cavailles, M. J. Duchesne and P. Balaguer (2007). "Estrogens and antiestrogens activate hPXR." *Toxicology Letters* **170**(1): 19-29.
- Nishihara, T., J. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S. Hori and H. Utsumi (2000). "Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay." *Journal of Health Science* **46**(4): 282-298.
- Orans, J., D. G. Teotico and M. R. Redinbo (2005). "The nuclear xenobiotic receptor pregnane X receptor: Recent insights and new challenges." *Molecular Endocrinology* **19**(12): 2891-2900.
- Petrovic, M. and D. Barceló (2007). "LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **26**(6): 486-493.
- Pillon, A., A. M. Boussioux, A. Escande, S. Ait-Aissa, E. Gomez, H. Fenet, M. Ruff, D. Moras, F. Vignon, M. J. Duchesne, C. Casellas, J. C. Nicolas and P. Balaguer (2005). "Binding of Estrogenic Compounds to Recombinant Estrogen Receptor- α : Application to Environmental Analysis." *Environmental Health Perspectives* **113**(3): 278-284.
- Riu, A., P. Balaguer, E. Perdu, M. Pandelova, R. Piccinelli, J. A. Gustafsson, C. Leclercq, K. W. Schramm, S. Dagnino, L. Debrauwer, J. P. Cravedi and D. Zalko (2008). "Characterisation of bioactive compounds in infant formulas using immobilised recombinant estrogen receptor-[α] affinity columns." *Food and Chemical Toxicology* **46**(10): 3268-3278.
- Sanchez, W., S. Ait-Aissa, O. Palluel, J.-M. Ditché and J.-M. Porcher (2007). "Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams." *Ecotoxicology* **16**(2): 279-287.
- Schmitt, C., G. Streck, M. Lamoree, P. Leonards, W. Brack and E. de Deckere (2010). "Effect Directed Analysis of riverine sediments-the usefulness of *Potamopyrgus antipodarum* for in vivo effect confirmation of endocrine disruption." *Aquatic Toxicology* **101**(1): 237-243.
- Schymanski, E. L., M. Bataineh, K. U. Goss and W. Brack (2009). "Integrated analytical and computer tools for structure elucidation in effect-directed analysis." *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **28**(5): 550-561.
- Smital, T., S. Terzic, R. Zaja, I. Senta, B. Pivecic, M. Popovic, I. Mikac, K. E. Tollefsen, K. V. Thomas and M. Ahel (2010). "Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**(4): 844-851.
- Song, M. Y., Q. T. Jiang, Y. Xu, H. X. Liu, P. K. S. Lam, D. K. O'Toole, Q. H. Zhang, J. P. Giesy and G. B. Jiang (2006). "AhR-active compounds in sediments of the Haihe and Dagu Rivers, China." *Chemosphere* **63**(7): 1222-1230.
- Steinberg, C. E. W., A. Paul, S. Pflugmacher, T. Meinelt, R. Klocking and C. Wiegand (2003). "Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals - A review." *Fresenius Environmental Bulletin* **12**(5): 391-401.
- Sun, H., X.-L. Xu, J.-H. Qu, X. Hong, Y.-B. Wang, L.-C. Xu and X.-R. Wang (2008). "4-Alkylphenols and related chemicals show similar effect on the function of human and rat estrogen receptor [α] in reporter gene assay." *Chemosphere* **71**(3): 582-588.
- Thomas, K. V., M. R. Hurst, P. Matthiessen and M. J. Waldock (2001). "Characterization of estrogenic compounds in water samples collected from United Kingdom estuaries." *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(10): 2165-2170.

- Tollefsen, K.-E. and J.-A. Nilsen (2008). "Binding of alkylphenols and alkylated non-phenolics to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatic estrogen receptors." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **69**(2): 163-172.
- Tyler, C. R., S. Jobling and J. P. Sumpter (1998). "Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence." *Critical Reviews in Toxicology* **28**(4): 319-361.
- Wada, H., H. Tarumi, S. Imazato, M. Narimatsu and S. Ebisu (2004). "In vitro estrogenicity of resin composites." *Journal of Dental Research* **83**(3): 222-226.
- Weiss, J. M., T. Hamers, K. V. Thomas, S. van der Linden, P. E. G. Leonards and M. H. Lamoree (2009). "Masking effect of anti-androgens on androgenic activity in European river sediment unveiled by effect-directed analysis." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **394**(5): 1385-1397.
- Wilson, V. S., K. Bobseine, C. R. Lambright and L. E. Gray (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." *Toxicological Sciences* **66**(1): 69-81.

Supporting information

Effect directed analysis (EDA) of multiple endocrine disrupting activities: identification of ER and PXR ligands in a multi-contaminated river sediment

Nicolas Creusot^{1,2}, Hélène Budzinski², Patrick Balaguer³, Jean-Marc Porcher¹, Selim Aït-Aïssa^{1,*}.

¹ *INERIS, Unité Écotoxicologie in vitro et in vivo, Parc ALATA, BP2, f-60550 Verneuil-en-Halatte, France*

² *EPOC/ LPTC – UMR 5805 CNRS Université Bordeaux 1, f-33405 Talence, France*

³ *INSERM U896, IRCM - UM1-CRLC Val d'Aurelle, Montpellier, France*

* Corresponding author: E-mail: selim.ait-aissa@ineris.fr, fax +33 344 556 767

Table S1. Summary of compounds measured in the crude extract of Réveillon sediment: concentrations and mass balance analysis of their potential contribution to estrogenic (E2-EQ), anti-androgenic (Flu-EQ), PXR-like (SR-EQ), PAH-like (BaP-EQ) and dioxin-like (TCDD-EQ) activities detected by *in vitro* bioassays (Bio-TEQs).

Compounds	LOD (ng/g)	Conc. (ng/g)	E2-EF	E2-EQ	Flu-EF	Flu-EQ	SR-EF	SR-EQ	BaP-EF	BaP-EQ	TCDD-EF	TCDD-EQ
Steroids												
Estriol	n.e	n.d	0.17	-	n.a	-	n.a.	-	n.a	-	n.a	-
Norethindrone	n.e	n.d	n.a	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
Testosterone	0.1	0.5	n.a	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
Ethinylestradiol	n.e	n.d	0.93	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
Estrone	6	n.d	0.02	-	n.a	-	0.004	-	n.a	-	n.a	-
17-alpha-estradiol	n.e	n.d	0.02	-	n.a	-	n.a.	-	n.a	-	n.a	-
17-beta-estradiol	0.2	0.5	1	0.5	n.a	-	0.13	0.065	n.a	-	n.a	-
Levonorgestrel	n.e	n.d	3.1E-05	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
Progesterone	0.6	4.6	7.5E-07	3.5E-06	n.a	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
Mestranol	n.e	n.d	0.02	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
Pesticides												
HCB	0.4	0.4	n.a	-	n.e	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
gamma-HCH	0.3	0.3	n.a	-	n.e	-	0.02	0.01	n.a	-	n.a	-
Heptachlor	n.e	-	n.a	-	n.e	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
Heptachlor-Hepox.	0.2	0.2	n.a	-	0.08	0.02	-	-	n.a	-	n.a	-
2,4'DDE	0.4	0.4	n.e	-	n.e	-	-	-	n.a	-	n.a	-
Cis Chlordane	n.e	-	n.e	-	0.04	0.00	0.02	-	n.a	-	n.a	-
Trans Nonachlor	0.4	0.4	n.e	-	n.e	-	0.02	0.01	n.a	-	n.a	-
4,4'DDE+Dieldrin	10.1	10.1	2.4E-07	2.5E-06	0.56	5.67	0.03	0.30	n.a	-	n.a	-
2,4'DDD	n.e.	0.0	n.e	-	n.e	-	-	-	n.a	-	n.a	-
4,4'DDD	3.6	3.6	6.8E-07	2.4E-06	0.27	0.97	0.04	0.15	n.a	-	n.a	-
2,4'DDT	0.8	0.8	1.7E-05	1.4E-05	0.15	0.12	0.03	0.03	n.a	-	n.a	-
4,4'DDT	1.3	1.3	1.3E-06	1.7E-06	0.72	0.93	0.03	0.04	n.a	-	n.a	-
Alkylphenols												
NP1EO	20	105.4	n.a	-	n.a	-	n.a	0.00	n.a	-	n.a	-
NP2EO	0.3	26.9	n.a	-	n.a	-	n.a	0.00	n.a	-	n.a	-
4-NP	19	757.9	3.3E-06	2.5E-03	0.02	12.13	0.03	23.19	n.a	-	n.a	-
OP	n.e.	< lod	1.1E-04	-	0.34	-	0.06	-	n.a	-	n.a	-
BPA	8	294.9	4.5E-05	1.3E-02	0.39	116.21	0.03	7.37	n.a	-	n.a	-
NP1EC	0.3	4.1	4.1E-04	1.7E-03	0.06	0.25	0.02	0.07	n.a	-	n.a	-
PAHs												
Naphtalene	0.4	0	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
Acenaphthylene	0.9	19.0	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	5.6E-03	1.06E-01	n.a	-
Acenaphthene	n.e.	0.0	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
Fluorene	0.4	64.1	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	0.0144	9.24E-01	n.a	-
phenanthren	4.3	496.7	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
Anthracen	3.4	84.6	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
Dibenzothiophene	n.e.	n.d	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
Fluoranthene	6.7	781	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
Pyrene	8.1	726	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	3.6E-03	2.6	3.9E-05	0.028
Benzo[a]anthracen	6.6	999	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	0.258	257.7	9.8E-05	0.098
Triphenylen+chrysen	4.9	877.8	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	0.292	256.3	3.8E-04	0.330
Benzo[b]fluoranthen	2.2	1109.9	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	0.694	770.3	4.6E-04	0.514
Benzo[k]fluoranthen	2.2	550.9	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	2.9	1597.5	4.2E-03	2.330
Benzo[e]pyren	8.4	599.9	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	n.a	-	n.a.	-
Benzo[a]Pyren	2.9	720.4	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	1	720.4	5.1E-04	0.370
Perylen	1.8	223.3	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	n.a	-	n.a.	-

Résultats- Approche EDA – Applications in situ

Indenopyren	3.2	563.1	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	0.843	474.7	1.6E-03	0.924
Dibenzo[a]anthracen	4.9	118.8	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	3.66	435.0	6.1E-03	0.726
Benzopyrylen	3.1	506.1	n.a	-	n.e.	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
PCBs									n.a			
CB 50+28	0.4	0.4	n.a	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
CB 52	0.4	1.0	n.a	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
CB 101	0.4	1.9	n.a	-	n.a	-	0.003	0.01	n.a	-	n.a	-
CB 118	0.5	4.3	n.a	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-	n.a	-
CB 153	0.4	5.4	n.a	-	n.a	-	0.01	0.03	n.a	-	n.a	-
CB 138	0.4	6.8	n.a	-	n.a	-	0.01	0.04	n.a	-	n.a	-
CB 180	0.4	5.0	n.a	-	n.a	-	0.01	0.03	n.a	-	n.a	-
PBDEs												
BDE 47	0.5	2.9	n.e	-	n.e	-	n.e	-	n.e	-	n.e	-
BDE 119	1.3	3.5	n.e	-	n.e	-	n.e	-	n.e	-	n.e	-
BDE 99	n.e.	n.d	n.e	-	n.e	-	n.e	-	n.e	-	n.e	-
BDE 153	n.e.	n.d	n.e	-	n.e	-	n.e	-	n.e	-	n.e	-
Σ Chem-EQ (ng/g)				0.517		136		31		4516		7
Bio-EQ (ng/g)				7		70000		37000		30000		40
% chem/bio				7.4		0.19		0.1		15.1		17.4

LOD: limit of detection; n.d. : not detected ; n.a. : compound non active ; n.e. : not evaluated in the specified assay

Synthèse de l'article 6

Les résultats de cette étude confirment tout d'abord que l'utilisation de la MBA en première approche est généralement insuffisante pour l'identification des PE. Dans le cas présent, malgré des investigations chimiques plus poussées que celle de la précédente étude (**Article 2**), nous n'avons pas pu expliquer la majorité des différentes réponses biologiques mesurées. C'est pourquoi nous avons entrepris un fractionnement de l'extrait brut.

La stratégie de fractionnement proposée et validée dans cette étude a permis d'isoler de manière efficace les composés actifs dans le cadre de l'approche multi-récepteur mise en œuvre. Tout d'abord, le *pré-fractionnement* s'est avéré utile pour fournir des informations sur la polarité des composés ainsi que l'identité potentielle des classes de composés sur la base de la calibration de la méthode. Néanmoins ce seul préfractionnement s'est révélé être insuffisant pour isoler complètement les activités les unes des autres. L'*hyper-fractionnement* entrepris par la suite sur les préfractions a permis de mieux séparer les activités voir pour certaines de les isoler totalement les unes des autres. Ainsi les ligands du hPXR ont pu être séparés des activités œstrogénique et *dioxin-like* confirmant que les composés responsables de ces activités étaient différents. Enfin, l'utilisation de la *colonne d'affinité* basée sur le récepteur des œstrogènes s'est révélée particulièrement efficace pour l'isolement final des ligands du ER au sein d'hyper-fractions dans lesquelles subsistaient plusieurs activités. Pour finir, une partie des composés isolés (i.e. ligands hPXR et ER) a pu être identifiés par CPG-SM. Dans l'ensemble, ces résultats démontrent l'intérêt et valident l'approche EDA développée pour l'identification de composés inconnus au sein de matrices environnementales.

Néanmoins, nos investigations montrent également que l'étape de fractionnement qui joue un rôle clef dans cette approche, reste une procédure complexe, en particulier lorsque l'on considère plusieurs activités. En effet, dans le cas présent, l'hyperfractionnement a conduit à la perte de l'activité anti-androgénique liée à une simplification trop poussée des fractions (i.e. activité totale retrouvée en poolant les fractions) mais également à un étalement de l'activité *dioxin-like* sur une quinzaine de fractions successives. Ces résultats témoignent des limites liées à l'utilisation d'une stratégie de fractionnement calibrée en routine. Ainsi, la stratégie de fractionnement doit rester une démarche dynamique qui doit s'adapter et être modulée selon la spécificité des réponses biologiques mesurées. À ce titre, l'utilisation d'un fractionnement en plusieurs étapes semble particulièrement pertinente.

Concernant, l'identification *sensu-stricto*, nos résultats confirment que la CPG-SM reste une technique limitée par la volatilité et la polarité des composés. Dans le cas présent, aucun composé n'a pu être identifié au sein des hyperfractions polaires. Ainsi, comme rapportée dans la littérature, l'utilisation de la chromatographie liquide est aujourd'hui indispensable dans ce type d'approche mais reste particulièrement difficile à mettre en œuvre (e.g. inexistence de banque spectrale en SM...) (Shymanski *et al.* 2009). Dans le cadre de cette étude, des investigations devraient prochainement être initiées sur des appareils hydrides de types Q-TOF et LTQ-Orbitrap® au travers d'une stratégie d'identification qui reste à définir.

2.2.2 Etude de la compartimentation de la contamination

Nous avons vu dans la première partie des résultats que des PE étaient détectés dans l'ensemble des compartiments. Dans le cas du Réveillon, nous avons montré que le sédiment était fortement contaminé sans toutefois considérer les autres compartiments. Dans ce chapitre, nous nous intéressons à l'étude de la distribution spatio-temporelle de la contamination entre le sédiment et la colonne d'eau sur le site du Réveillon

Concernant le sédiment nous avons comparé les activités obtenues sur des échantillons de 2004 (**Article 2**), 2009 (**Article 6**) et 2010 (**Article ci-après**). Concernant la colonne d'eau, nous avons employé des capteurs passifs de type POCIS et SPMD de manière à permettre l'échantillonnage des composés polaires et des composés apolaires.

Par la suite, de façon à établir si les composés responsables des activités mesurées dans les différents compartiments étaient comparables, nous avons entrepris un notre stratégie de fractionnement des différents extraits selon la méthodologie décrite dans l'**article 6**. Ce travail est en cours d'investigation. Les résultats obtenus jusqu'à présent sont présentés dans l'**article 7**.

Article 7 : Creusot *et al.* (en préparation)

Distribution of multiple endocrine disrupting activities between sediment and surface water using passive sampling in a French river under mixed anthropogenic pressures

Distribution of multiple endocrine disrupting activities between sediment and surface water using passive sampling in a French river under mixed anthropogenic pressures

Nicolas Creusot^{1,2}, Tapie Nathalie², Benjamin Piccini¹, Jean-Marc Porcher¹, Hélène Budzinski², Selim Aït-Aïssa^{1,*}

¹ INERIS, Unité Écotoxicologie in vitro et in vivo, Parc ALATA, BP2, f-60550 Verneuil-en-Halatte, France

² EPOC/LPTC – UMR 5805 CNRS Université Bordeaux 1, f-33405 Talence, France

* Corresponding author: E-mail: selim.ait-aissa@ineris.fr, fax +33 344 556 767

Abstract :

The contamination of aquatic systems by endocrine disrupting chemical (EDCs) is now widely established. Nevertheless, there is still a scarcity of knowledge concerning source, transport, fate and bioavailability of such active compounds. In the present study we assessed the distribution of multiple endocrine (estrogenic, (anti-)androgenic, pregnane X receptor-like (PXR)) and dioxin-like activities between sediment and water compartments using polar organic compounds integrative sampler (POCIS) and semi-permeable membrane device (SPMD) in a river where sediment has been previously described as highly contaminated. We first confirmed the multi-contamination pattern of this river sediment between 2004, 2009 and 2010, suggesting that this river is under constant high contamination level. Then, the results showed a different distribution pattern of these activities between compartment: estrogenic activity was mainly detected in POCIS and in a lesser extent in sediment and SPMD ; anti-androgenic were mainly detected in SPMD and in sediment while no activity was detected in POCIS ; PXR-like activity was detected in sediment all three investigated compartments, with POCIS > SPMD > sediment ; dioxin-like activity was mainly found in the sediment and the SPMD. Overall, partitioning of the biological activities were in accordance with physico-chemical properties (e.g. log Kow) of typical known active chemicals in each bioassay.

Finally, in order to establish if the chemicals involved in these activities were similar between the compartments, we fractionated sediment, POCIS and SPMD extracts using multi-step fractionation procedure. This highlighted differences in the identity of active chemicals between compartments. Altogether our results tend to demonstrate the need to consider different compartments in order to enhance exposure assessment.

Keywords : Partitioning, EDC, sediment, POCIS, SPMD

1. Introduction

It is now well established that aquatic systems are widely contaminated by chemicals, named endocrine disrupting chemicals (EDCs), that interfere with endocrine systems (Hotchkiss *et al.* 2008) and cause adverse effect on wildlife (Sumpter 2005). However informations at the temporal and spatial resolution remain scarce and investigations are still needed in order to characterize source, transport, fate and bioavailability of such active compounds.

EDCs are ubiquitous in the environment, occurring at measurable concentrations in wastewater, surface water, sediment, groundwater, estuaries, aquatic organisms and even drinking water (Kolpin *et al.* 2002, Liu *et al.* 2004, Terasaki *et al.* 2008, Xue *et al.* 2005, Ahn *et al.* 2007, Lagana *et al.* 2004, Pojana *et al.* 2007). They are released into the

environment through wastewater treatment discharges, surface non-point source run-off, and atmospheric deposition of particulates and aerosols. Wastewater treatment facilities have been identified as the major sources for EDCs while agricultural sources, livestock excretion of hormones and chemicals in pesticide and fertilizer formulations, could contribute to the non-point source runoff component of EDCs. The distribution of such chemicals depends on their physico-chemical properties (e.g. molecular weight, log Kow, log Koc, solubility, volatility...). For instance, a compound with a low volatility would be expected to partition primarily to soils and waters rather than to the air while EDCs having moderate to high log Koc values will be mainly sorbed to sediments or suspended organic material. This partitioning in the environment will ultimately determine the conditions under which transport occurs, the fate of these compounds (aerobic and anaerobic degradation, photolysis) and consequently their final bioavailability for aquatic organisms (Campbell *et al.* 2006). This underscores the need to assess distribution of EDCs in aquatic systems for a better risk assessment.

For EDCs detection purpose, chemical analysis provides sensitive and selective tools. Recent analytical method development, dealing with the increasing interest for EDCs during the last decade, include especially GC-MS/MS (Mottaleb *et al.* 2009), UHPLC-MS/MS (López-Roldán *et al.* 2010) techniques to optimize quantitative environmental analysis through pushing detection limits lower and enhancing of resolution (Richardson 2008). However, these techniques are limited to known active chemicals and do not account for mixture effect. Bio-analytical tools provide alternative detection methods to traditional chemical analysis. They are defined as methods that utilize quantifiable and specified detection principles based on chemical–biological interaction (Eggen and Segner 2003). Among them *in vitro* reporter gene assays provide specific, rapid, sensitive and integrative detection methods that are widely used for the quantitative detection (i.e. biological toxic equivalent, Bio-TEQ) of EDCs in environmental matrices (Michallet-Ferrier *et al.* 2004, Kinani *et al.* 2010).

In order to obtain a time-integrated evaluation of the bioavailability of different types of chemicals in surface water and to assess realistic exposures of aquatic organisms, passive samplers have been recently developed (Vrana 2005). Among them, semi-permeable membranes devices (SPMD) are widely used for monitoring for lipophilic organic contaminants in water (Petty *et al.* 2004, Huckins 2006) while polar organic compound integrative sampler (POCIS) was developed to sample and concentrate bioavailable water-borne polar-organic contaminants (Alvarez *et al.* 2004, Jones-Lepp *et al.* 2004). Using together these samplers provides a means to get an environmentally relevant picture of chemical contaminants from the water phase to be analysed by chemical and biological testing (Alvarez *et al.* 2008, Harman *et al.* 2010). In particular such devices have been combined to specific *in vitro* bioassays for an integrative characterization of the contamination (Vermeirssen *et al.* 2005, Kolok *et al.* 2007, Creusot *et al.* 2010, David *et al.* 2010).

The aim of this study was to assess spatial and temporal distribution of EDCs activities (estrogenic, anti-androgenic, PXR-like and dioxin-like) between sediment and surface water in order to highlight source and fate of active chemicals. For this purpose we investigated a French river where high levels of these activities have been previously described in the sediment (Creusot *et al.*, *in prep*, Kinani *et al.*, 2010). Three sampling campaigns were assessed in 2010 in sediment and surface water using passive sampling and biological activities were quantified using *in vitro* bioassays. Inter-annual variation of sediment contamination was evaluated by a comparison of the biological activities between 2004 (Kinani *et al.*, 2010), 2009 (Creusot *et al.*, *in prep*) and 2010 (the present study). Finally, in order to assess how comparable were the biological activities in sediment, POCIS and SPMD, these extracts were fractionated in order to isolate the active chemicals.

2. Material and methods

2.1. Chemicals and reagents

17 β -estradiol, di-hydroxy-testosterone (DHT), flutamide, SR-12813, 2,3,7,8-TCDD and

benzo[a]anthracene were all purchased from Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). Dimethylsulfoxide (DMSO), 7-ethoxy-resorufin (7-ERF) and luciferin were also purchased from Sigma-Aldrich. Dichloromethane (DCM) and methanol (MeOH) (HPLC reagent grade, Merck) were purchased from VWR (France).

2.2. Study site and sampling procedure

The Réveillon is a small French river subject to urban and agricultural anthropogenic pressures (**Figure 1**). Previous studies on this river have revealed that fish were impacted (i.e. EROD and vitellogenin induction) (Sanchez *et al.* 2007) as well as estrogenic, anti-androgenic, PXR-like and dioxin-like compounds occurred in the sediment (Kinani *et al.* 2010).

In the present study, we investigated both sediment and surface water by using passive sampling. Two stations, located upstream and downstream from a municipal effluents outlet, were sampled between September and November 2010. Sediments were sampled (3 campaigns : September, October and November) with a grab, sieved at 1 mm, freeze-dried, homogenized and finally stored in amber glass at -20°C before extraction and analysis. POCIS (pharmaceutical design) were prepared at the laboratory by trapping 200 mg of Oasis-HLB (Waters) between two PES (polyester-sulfone) membranes enclosed between two stainless disks. SPMD were purchased from Exposmeter (Sweden). In this study we used both full sized (91.4 x 2.5 cm, 70–95 mm wall thickness, additive free LDPE tubing, containing 1 mL extra pure triolein) and mini sized (15.5 x 2.5 cm, cm, 70–95 mm wall thickness, additive free LDPE tubing, containing 0.17 mL extra pure triolein). No marked differences were observed between the activities detected in 91.2 cm membrane and 15.2 cm membrane (data not shown). POCIS and SPMD were deployed for two campaigns of 3 weeks each. After sampling POCIS and SPMD were cleaned with ultrapure water, SPMD membranes were stored in sealed metal cans while POCIS were packaged in aluminium paper. Both were stored at -20°C before extraction and analysis.

2.3. Extractions

Sediments were extracted using ASE 350 (Dionex, France) with a mixture of MeOH:DCM (50/50, v:v). Extraction conditions have been previously optimized for the extraction of a broad range of active chemicals (Creusot *et al.*, *in prep*). Briefly, 5 g of sediment were extracted with 10 ml stainless cells filled with a mixture of sediment and sand (50/50, v:v). The protocol parameters were: extraction temperature, 75°C ; extraction pressure, 1500 PSI; preheating period, 5 min; static extraction, 5 min; number of extraction cycles, 3; final extraction volume 25 mL; flush volume, 60% of the cell volume; nitrogen purge, 60 s. After the extraction, the mixture of MeOH/DCM (approximately 25mL) was evaporated using rotary evaporator (EZ-2, Genevac, UK) until dryness. Residues were redissolved in MeOH/DCM for storage. For *in vitro* bioassays, 100 μL were evaporated and redissolved in DMSO. TOC was calculated in accordance to international organization of standardization recommendation (ISO-8245 1999).

POCIS were extracted as described in Creusot *et al.* (2010). Briefly, the sorbent was transferred in 6 mL empty clear glass SPE tube (Supelco, St-quantin Fallavier, France) by rinsing membrane with ultrapure water, and then dried under vacuum for 1 h. Adsorbent compounds were sequentially eluted with 10 mL of DCM, 10 mL of MeOH/DCM (50/50, v:v) and 10 mL of MeOH. The eluted extract were finally evaporated to dryness under N_2 and redissolved in 200 μL of MeOH for biological and chemical analysis.



Figure 1. Site sampling near Villecresnes (France) under urban and agricultural pressure

Before extraction, SPMD membranes were rinsed with ultrapure water, then acetone, and finally cyclohexane in order to remove all biofouling. Membranes were inserted into glass recipient with 125 ml of cyclohexane and dialysed for 24 h. Dialysates were then collected and membranes were dialysed for another 24h with 125 ml of cyclohexane. The final 250 ml dialysates were evaporated to approximately 1 ml using Rotavapor (Heidolph, Schwabach, Germany) and then evaporated to dryness using N₂. Residues were redissolved in mixture of cyclohexane and ethyl-acetate (50/50, v:v) for GPC purification described below.

2.4. GPC purification of SPMD

Several studies have reported the clean-up of SPMD extracts using GPC for the elimination of triolein and others polyethylene waxes (Esteve-Turrillas *et al.* 2007). Here, we used the Envirogel GPC Clean Up columns (19 x 150 mm and 19 x 300 mm) supplemented with a guard column (4.6 x 30 mm) with 5 mL/min Cyclohexane/ethyl-acetate (50/50, v:v) as elution solvent. Before runs, GPC was calibrated by establishing an elution profile with a calibration solution (corn oil, bis-(2-ethylhexyl) phthalate, methoxychlor, perylene and sulfur) as described in EPA recommendation (EPA, 3640A). Two fractions were collected, the F1 (0-13 min) containing triolein and other weighty lipids and the F2 (13-40 min) containing the compounds of interest. These fractions were evaporated to 1 ml using Rotavapor (Heidolph, Schwabach, Germany) and then evaporated to dryness using N₂. Residues were redissolved in DMSO for *in vitro* bioassays. Procedural blank was assessed in order to highlight potential contamination during the procedure.

2.5. Biological analysis

Estrogenic, (anti)-androgenic, PXR-like (pregnane X receptor) and dioxin-like activities (Aryl hydrocarbon receptor) were assessed on environmental extracts using: MELN (Balaguer *et al.* 1999), MDA-kb2 (Wilson *et al.* 2002), HG5LN-hPXR (Lemaire *et al.* 2006) and PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*, hepatoma derived cells, Louiz *et al.* 2008) *in vitro* bioassays cell lines, respectively. Descriptions of cell lines and

conditions for routine culture and exposure have been previously described in Creusot *et al.* (2010). Briefly, MELN, MDA-kb2 and HG5LN-hPXR cells were exposed to serial dilution of sediment, POCIS or SPMD extract, carrier solvent (negative control) and reference compound (positive control) for 16h and finally processed for luciferase activity assay. To assess AhR activators, 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity was assessed in intact PLHC-1 cells that were exposed for 24h and 4h to discriminate between persistent and readily metabolized compounds.

2.6. Fractionations of environmental extracts

In order to isolate the active chemicals responsible for the biological activities detected in sediment, SPMD and POCIS extracts, we used multi-step fractionation procedure previously described and calibrated in Creusot *et al.* (in prep). This was based on normal phase-solid phase extraction (NP-SPE) using silica cartridges and reverse phase high pressure liquid chromatography using C18 column (RP-HPLC).

2.7. Data analysis

Exposure of cells allowed establishing dose response curves for both environmental extracts and reference compounds. These curves were modeled using the freely available Excel Macro RegTox 7.0.5 (http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html) allowing to calculate effective concentrations (i.e. EC₂₀, EC₅₀...) and to quantify Biological toxic equivalent (Bio-TEQ) which were determined as the ratio of the EC₂₀ of the reference compounds to the EC₂₀ of sample extracts.

3. Results & discussion

3.1. *In vitro* characterization of sediment contamination: multi-activities profiles and temporal trends

The **Table 1** presents *in vitro* toxicity profile of Réveillon sediment sampled in 2010 and compared with that of sediment sampled in 2004 and 2009 at the same site.

First, co-occurrence of estrogenic, anti-androgenic, PXR-like and dioxin-like activities in the sediment confirms the multi-contamination of this river, as

Table 1. Biological Toxic Equivalent in sediment sampled at station 2. ^a, from Kinani *et al.*, 2010; ^b, Limit of detection based on EC5.

	ER (ngE2- EQ/g)	Anti-AR (µgFlu- EQ/g)	PXR (µgSR- EQ/g)	AhR 24h (ngTCDD- EQ/g)	TOC (%)
2004^a	6.4	32.5	51.3	38.4	n.a
2009	7.4	65.6	38.8	43.6	4.9
Sept. 10	1.6	43.0	12.9	78.0	2.0
Oct. 10	2.1	30.9	10.6	70.7	1.6
Nov. 10	1.4	21.2	10.2	138.9	1.4
LOD	<i>0.017</i>	<i>0.388</i>	<i>0.185</i>	<i>1.5</i>	

already described previously (Kinani *et al.* 2010; Creusot *et al.* in prep). Such significant activity levels were similar to those commonly found in highly polluted sites. For instance, estrogenic activities were equivalent to those measured in hotspot sediment (0.7 ng E2-EQ/g d.w) (Schmitt *et al.* 2010) or in harbour sediment (0.5 ng E2-EQ/g d.w) (Houtman *et al.* 2006). Also, anti-androgenic activity was quite similar to that reported in a highly polluted site (55 µg Flu-EQ/g d.w) (Weiss *et al.* 2009) or in river under domestic, industrial and agriculture pressures (140 µg Flu/g d.w) (Urbatzka *et al.* 2007). There is a scarcity of data concerning contamination by PXR ligands in solid matrices. Nevertheless, the PXR activity contamination level in the present study was slightly under that in sludge and particulate matter from sewage treatment plants (50-300 µg SR-EQ/g d.w) (Mnif *et al.*, 2010). Finally, dioxin-like activity was equivalent to those observed in contaminated European river sediment (Keiter *et al.* 2008, Vondracek *et al.* 2001).

Overall, few temporal fluctuations were noted, as all investigated biological activities were found as being in the same order between 2004, 2009 and 2010, suggesting that this river is under continuous high contamination level. Minor variations were however observed. As observed in the **table 1**, fluctuations of estrogenic, anti-androgenic and PXR-like paralleled with those of TOC %. The sedimentary organic carbon is an important factor in the sorption of EDCs and several studies have previously reported a positive correlation between

EDCs (steroid, BPA and Alkylphenols) and TOC (Zhang *et al.* 2009). This can be explained by hydrophobic interaction between chemicals and organic-rich sediment (Gong *et al.* 2011) although other interactions must be involved such as ion-exchange due to the higher polarity of several ER and PXR activators in this sediment river reported in other study (Creusot *et al.* in prep). In addition, campaigns in 2004 and 2009 took place in the dry season (April) while campaigns in 2010 were done in wet season. Hence, lower contamination level observed in 2010 could be caused by dilution (higher river flow) and temperature change. Finally, most of these chemicals are readily degraded or transformed in aquatic systems (Ying *et al.* 2002) and their relative persistent behavior in the present study suggested a non-point source of contamination and permanent release of active chemicals. Dioxin-like activity is mainly due to hydrophobic chemicals including persistent (PCBs, PCDD/Fs) and mid-persistent (PAHs) chemicals. Adsorption of a hydrophobic compound onto sediment is mainly related to sediment properties such as TOC and clay contents in addition to its own physicochemical properties (Wang *et al.* 2011). In the present study, dioxin-like activity seemed not to be associated to TOC since DL increase whereas TOC decrease. Here, increasing release of dioxin-like chemicals in 2010 may have explained such high contamination level.

3.2. Partitioning of endocrine and dioxin-like activities between water and sediment

The distribution of biological activities between sediment, POCIS and SPMD at the two stations of the Réveillon River are provided in **figures 2 to 5**. Overall, different distributions were observed depending on the studied activity.

Estrogenic activity was mainly detected in POCIS and in a lesser extent in sediment and SPMD (**Figure 2**). In POCIS, the results expressed as ng E2-EQ per g of HLB phase were comprised between 12.1 and 28.1. Many studies have reported the detection of estrogenic activity using POCIS (Grover *et al.* 2011, Liscio *et al.* 2009, Harman *et al.* 2010, Creusot *et al.* 2010, Matthiessen *et al.* 2006, Alvarez *et al.* 2004, Petty *et al.* 2004).

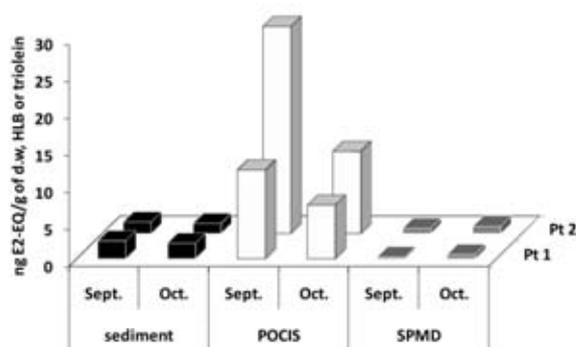


Figure 2. Spatial and temporal distributions of estrogenic activity between sediment, POCIS and SPMD. Results are expressed as Bio-TEQ in ng E2-EQ per g of d.w sediment or g of HLB phase or g of triolein.

Our results were in accordance with those previously reported in the literature in moderate impacted sites (Vermeissen *et al.* 2005, Alvarez *et al.* 2008). Concerning SPMD, only few studies have dealt with investigation of estrogenic activity using such devices. Harman *et al.* (2010) reported the detection of both estrogenic and anti-androgenic in SPMD extract near oil production platforms in the Statfjord Norway area while Rastall *et al.* 2006 detected estrogenic activities in several European river. Conversely David *et al.* (2010) detected no estrogenic activity in SPMD deployed in small French coastal lagoons. The partitioning of estrogenic activity suggested that mainly hydrosoluble polar ER ligands occurred in this river. ER ligands include diversity of chemical classes such as steroids, pharmaceuticals and personal care products, alkylphenols, phthalates and pesticides (Sumpter *et al.* 2005, WHO *et al.* 2002). Most of these chemicals were polar to mid-polar compounds ($1 < \log K_{ow} < 5$) and are known to be sampled by POCIS (Alvarez *et al.* 2004, Arditoglou. and Voutsas 2008, Togola and Budzinski 2007, Harman *et al.* 2008).

Contrary to estrogenic activity, anti-androgenic were mainly detected in SPMD (54.1-169.5 ng Flu-EQ/g of triolein) and in sediment while no activity was detected in POCIS (Figure 3). There is a scarcity data concerning detection of (anti)-androgenic compounds using passive samplers.

Grover *et al.* (2011) reported anti-androgenic activity in POCIS deployed near wastewater sewage treatment plant. Creusot *et al.* (in prep) showed the occurrence of androgenic compounds in POCIS downstream from pharmaceutical industry and urban effluents. Creusot *et al.* (2010) did not detected any (anti)androgenic in POCIS deployed in a low impacted river site. To our knowledge, this study is the first one to report anti-androgenic activity in SPMD extract. Such devices are designed to sample hydrophobic compounds ($\log K_{ow} > 3$) such as PCB, PAHs, or OCPs (Huckins *et al.* 2002, Alvarez *et al.* 2008). OCPs are described as anti-androgenic compounds (Aït-Aïssa *et al.* 2010, Kojima *et al.* 2010). In addition, Kinani *et al.* (2010) and Creusot *et al.* (in prep) have showed the occurrence of such chemicals in sediment of this river. Our results suggested that anti-androgenic activity was mainly due to hydrophobic chemicals. PXR-like activity was detected in all three investigated compartments, with POCIS (30.7-90.6 $\mu\text{gSR-Eq/g}$ of HLB) > SPMD (10.9-35.6 $\mu\text{gSR-Eq/g}$ of triolein) > sediment (Figure 4). This wide distribution was in accordance with the broad diversity of chemical classes described as PXR activators including pesticides, plasticizers, surfactants, PCBs, pharmaceuticals and personal care product (Mnif *et al.* 2007, Lemaire *et al.* 2006, Creusot *et al.* 2010, Sinz *et al.* 2006, Cui *et al.* 2008, Ekins *et al.* 2008). However, few studies

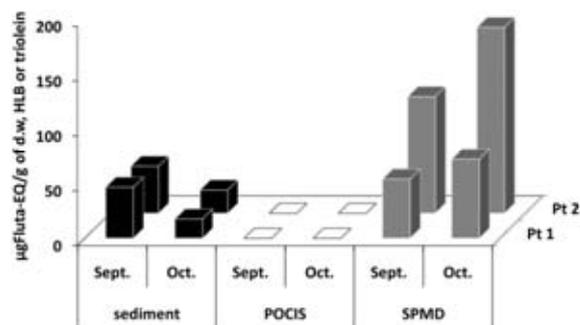


Figure 3. Spatial and temporal distributions of anti-androgenic activity between sediment, POCIS and SPMD.

have dealt with the detection of PXR-like activity in environmental matrices, especially in passive samplers extracts (Creusot *et al.* 2010). Here, the levels of detected of PXR activity were in accordance with that observed downstream from both pharmaceutical industry and urban effluents, at a site where fish were highly impacted (Creusot *et al.* in prep). In the Réveillon River, our results suggested the occurrence of high quantity of hydrosoluble and mainly polar PXR ligands in POCIS, but also of less polar PXR ligands in sediment (Creusot *et al.* in prep).

As expected the dioxin-like activity was mainly found in the sediment (78-138.9 ng TCDD-EQ/g d.w) and the SPMD (14-35.2 ng TCDD/g of triolein), confirming the involvement of non-polar chemicals as responsible for this activity (Figure 5). Several studies reported the detection of dioxin-like chemicals in passive samplers. For instance, Harman *et al.* (2010) reported the occurrence of EROD modulators in POCIS and SPMD extracts near from oil production platform. The occurrence of DL activity was also shown in SPMD deployed in French lagoon (David *et al.* 2010) and in a Czech Republic river (Janošek *et al.* 2003). In our study, we measured stronger DL activity in sediment than in SPMD suggesting that the sediment is the main source of DL chemicals, as already reported by David *et al.* (2010). In the present study, we observed both persistent (24h) and non persistent (4h) DL activity in SPMD while only non persistent activity was detected in POCIS

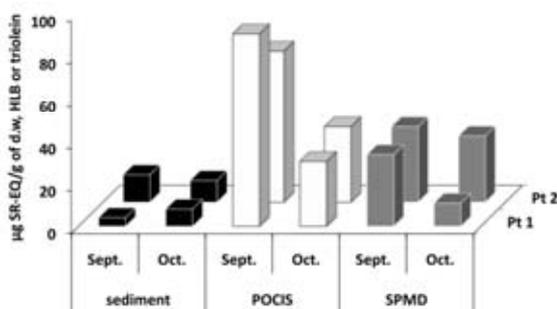


Figure 4. Spatial and temporal distributions of PXR-like activity between sediment, POCIS and SPMD.

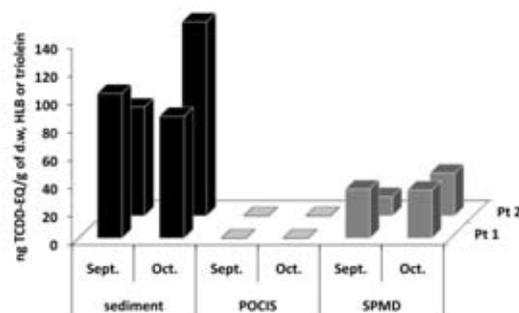


Figure 5. Spatial and temporal distributions of persistent dioxin-like activity between sediment, POCIS and SPMD.

(<1µg BaP-EQ/g of HLB) (Data not shown) suggesting that chemicals sampled by POCIS and SPMD were partly different. POCIS have been described to catch metabolizable PAHs (Tapie *et al.* 2011) while SPMD are able to sample more non polar and persistent chemicals (i.e. TCDD, PCDD/Fs...) (Alvarez *et al.* 2008). This could explain the difference between SPMD and POCIS dioxin-like profile.

Finally, for all the detected activity, we observed spatial and temporal variations of the contamination level. Notably estrogenic and anti-androgenic activities were higher at the station 2 than the station 1 in both POCIS and SPMD suggesting the release of active chemicals downstream the station 1. The occurrence of a municipal effluent outlet between the two stations could be the source of such variations. Since PXR and dioxin-like activities were constant between the two stations, their origins seemed to be located upstream the station 1. Also, there were some variations of the contamination level between September and October mainly observed in POCIS and SPMD rather than sediment. This could be explained by increasing/decreasing release of active chemicals or fluctuation of environmental conditions (temperature, water flow rate/turbulence, dissolved organic matter, pH and biofouling) that are known to affect the sampling rate of both POCIS (Alvarez *et al.* 2004, Togola and Budzinski 2007, Li *et al.* 2010, Li *et al.* 2011, Macleod *et al.* 2007, Harman *et al.* 2008) and SPMD (Vrana and Schuurmann 2002).

Table 2. Biological activities in the prefraction of sediment, POCIS and SPMD extracts of the Réveillon river in 2010.

		F1	F2	F3	F4
ER	Sed	n.d.			n.d.
	SPMD			n.d.	n.d.
	POCIS	n.d.	n.d.		
anti-AR	Sed			n.d.	n.d.
	SPMD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	POCIS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PXR	Sed	n.d.			n.d.
	SPMD	n.d.			n.d.
	POCIS	n.d.	n.d.		n.d.
AhR-24h	Sed				n.d.
	SPMD			n.d.	n.d.
	POCIS	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AhR-4h	Sed				
	SPMD				n.d.
	POCIS	n.d.	n.d.		n.d.

n.d.	No detected (n.d)
	Weak activity
	Moderate activity
	Strong activity

3.3. Isolation of active chemicals in POCIS, SPMD and sediment extracts

Altogether our results showed that all the compartments of this river were contaminated by various EDCs and dioxin-like chemicals. Distribution of the biological activities was overall in accordance with physico-chemical properties (e.g. log Kow) of typical known active chemicals in each bioassay. Nevertheless, for a given activity, it remains to establish if the chemicals involved in these activities were similar between the compartments. For this purpose, sediment, POCIS and SPMD extracts were fractionated using NP-SPE (prefraction) and RP-HPLC (hyperfractionation) in order to isolate active chemicals in each compartment and to compare fractionation profiles.

3.3.1. SPE prefractionation profiles

The NP-SPE toxicity profile of all compartments is given in the **table 2**. First, it is noteworthy that the distribution of the activities in the sediment SPE fractions was globally similar to that reported at the same site in sediment sampled in 2009 (Creusot *et al.* in prep): estrogenic and PXR-like activities were

mainly detected in F2 and F3 while anti-androgenic and dioxin-like activities were mainly detected in less polar fractions F1 and F2. This confirmed that this river is under constant high anthropogenic contamination and suitable as a case-study site to assess such multi-contaminated aquatic context.

Profiles in SPMD and POCIS were in accordance with the expected polarity range of compounds targeted by the samplers. In POCIS, only F3 fraction exerted ER, PXR and transient AhR-4h activities, suggesting the involvement of polar active compounds. SPMDs were characterized by strong AhR activities in non polar fractions (F1 and F2), which strongly paralleled activities in sediment fractions. Interestingly, weak estrogenic activity was detected in SPMD F1, suggesting the occurrence of non polar estrogenic compounds. Finally, the SPE fractionation procedure led to the loss of anti-androgenic activity in SPMD fraction. The origins of this loss remain unknown although such result has been previously reported for non polar compounds (Brack *et al.* 2005) and could be associated to irreversible bound of chemicals to the silica sorbent.

3.3.2. RP-HPLC fractionation profiles

To further isolate the active chemicals, we then processed RP-HPLC fractionation of SPE fractions in order to compare profiles for sediment (F2 and F3) and POCIS (F3). The profiles provided in **Figure 6** showed different activity patterns in sediment and POCIS.

Concerning estrogenic activity, comparison of sediment and POCIS hyperfractionation patterns revealed that both compartments shared similar estrogenic fractions (i.e. F.6, F.8, F.30, F.31 and F.32). Interestingly, several of estrogenic active fractions of POCIS extracts, including the most active one (F23), were not active in sediment. Conversely, F16 was active in sediment but not in POCIS. Hence, although prefraction profile suggested that estrogenic activity in sediment and POCIS extracts could be attributed to similar active chemicals, the hyperfractionation revealed that the compounds responsible for this activity were different. This highlights the usefulness of fractionation to reduce complex mixture and isolate active chemicals. Finally, the fractionation of the

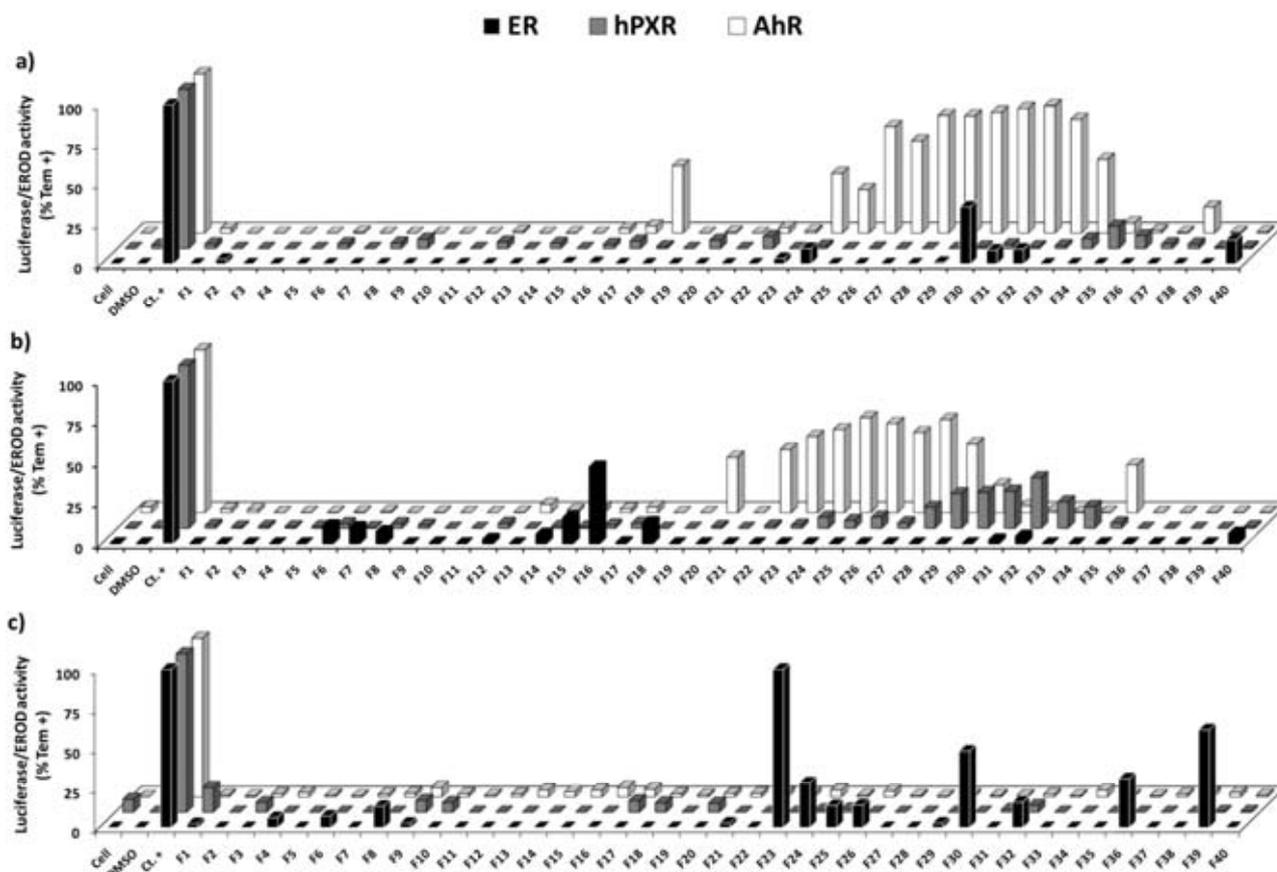


Figure 6. Biological activities in RP-HPLC fractions issued from (a) prefraction 2 of sediment-2009, (b) prefraction 3 of sediment-2009 and (c) prefraction 3 of POCIS-2010. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induction by 10 nM of 17 β -estradiol (ER), 3 μ M of SR12813 (hPXR) and 1 nM of TCDD (AhR-4h).

prefraction F3 led to the loss of PXR-like activity. Nevertheless, initial activity was recovered when the 40 fractions were pooled suggesting a mixture effect of active chemicals (data not shown).

4. Conclusion

This study successfully used fractionation procedures to unravel complex mixture effect and isolate active chemicals responsible for the detected activities. In the present case, the use of RP-HPLC profiles for biological activities highlighted different chemicals in the different river compartments. Altogether our results tend to

demonstrate the need to consider different compartments in order to enhance exposure assessment. For this purpose, *in vitro* bioassays coupled to passive sampling provide useful tools to be used in integrated strategy to trace holistic contamination in aquatic systems.

References :

Ahn, Y. G., J. H. Shin, H. Y. Kim, J. Kim, M. K. Lee and J. Hong (2007). "Application of solid-phase extraction coupled with freezing-lipid filtration clean-up for the determination of endocrine-disrupting phenols in fish." *Analytica Chimica Acta* **603**: 67-75.

- Ait-Aïssa, S., S. Laskowski, N. Laville, J. M. Porcher and F. Brion (2010). "Anti-androgenic activities of environmental pesticides in the MDA-kb2 reporter cell line." *Toxicology in Vitro* **24**(7): 1979-1985.
- Alvarez, D. A., W. L. Cranor, S. D. Perkins, R. C. Clark and S. B. Smith (2008). "Chemical and toxicologic assessment of organic contaminants in surface water using passive samplers." *Journal of Environmental Quality* **37**(3): 1024-1033.
- Alvarez, D. A., J. D. Petty, J. N. Huckins, T. L. Jones-Lepp, D. T. Getting, J. P. Goddard and S. E. Manahan (2004). "Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments." *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(7): 1640-1648.
- Arditsoglou, A. and a. D. Voutsas (2008). "Passive sampling of selected endocrine disrupting compounds using polar organic chemical integrative samplers."
- Balaguer, P., F. Francois, F. Comunale, H. Fenet, A. M. Boussioux, M. Pons, J. C. Nicolas and C. Casellas (1999). "Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens." *Science of the Total Environment* **233**(1-3): 47-56.
- Campbell, C. G., S. E. Borglin, F. B. Green, A. Grayson, E. Wozel and W. T. Stringfellow (2006). "Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review." *Chemosphere* **65**(8): 1265-1280.
- Creusot, N., S. Kinani, P. Balaguer, N. Tapie, K. LeMenach, E. Maillot-Marechal, J. M. Porcher, H. Budzinski and S. Ait-Aïssa (2010). "Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396**(2): 569-583.
- Cui, X. M., A. Thomas, V. Gerlach, R. E. White, R. A. Morrison and K. C. Cheng (2008). "Application and interpretation of hPXR screening data: Validation of reporter signal requirements for prediction of clinically relevant CYP3A4 inducers." *Biochemical Pharmacology* **76**(5): 680-689.
- David, A., E. Gomez, S. Ait-Aïssa, M. Bachelot, D. Rosain, C. Casellas and H. Fenet (2010). "Monitoring organic contaminants in small French coastal lagoons: comparison of levels in mussel, passive sampler and sediment." *Journal of Environmental Monitoring* **12**(7): 1471-1481.
- Eggen, R. I. L. and H. Segner (2003). "The potential of mechanism-based bioanalytical tools in ecotoxicological exposure and effect assessment." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377**(3): 386-396.
- Ekins, S., E. J. Reschly, L. R. Hagey and M. D. Krasowski (2008). "Evolution of pharmacologic specificity in the pregnane X receptor." *Bmc Evolutionary Biology* **8**.
- Esteve-Turrillas, F. A., A. Pastor, V. Yusa and M. de la Guardia (2007). "Using semi-permeable membrane devices as passive samplers." *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **26**(7): 703-712.
- Gong, J., Y. Ran, D.-Y. Chen and Y. Yang (2011). "Occurrence of endocrine-disrupting chemicals in riverine sediments from the Pearl River Delta, China." *Marine Pollution Bulletin In Press, Corrected Proof*.
- Grover, D. P., J. Balaam, S. Pacitto, J. W. Readman, S. White and J. L. Zhou (2011). "Endocrine disrupting activities in sewage effluent and river water determined by chemical analysis and in vitro assay in the context of granular activated carbon upgrade." *Chemosphere In Press, Corrected Proof*.
- Harman, C., E. Farmen and K. E. Tollefsen (2010). "Monitoring North Sea oil production discharges using passive sampling devices coupled with in vitro bioassay techniques." *Journal of Environmental Monitoring* **12**(9): 1699-1708.
- Harman, C., K. E. Tollefsen, O. Boyum, K. Thomas and M. Grung (2008). "Uptake rates of alkylphenols, PAHs and carbazoles in semipermeable membrane devices (SPMDs) and polar organic chemical integrative samplers (POCIS)." *Chemosphere* **72**(10): 1510-1516.
- Hotchkiss, A. K., C. V. Rider, C. R. Blystone, V. S. Wilson, P. C. Hartig, G. T. Ankley, P. M. Foster, C. L. Gray and L. E. Gray (2008). "Fifteen years after "Wingspread" - Environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go." *Toxicological Sciences* **105**(2): 235-259.
- Houtman, C. J., P. Booij, E. Jover, D. P. del Rio, K. Swart, M. van Velzen, R. Vreuls, J. Legler, A. Brouwer and M. H. Lamoree (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**(11): 2244-2252.
- Huckins, J. N. (2006). "Fundamentals of SPMDs." Chapter 2. ISO-8245 (1999). "ISO 8245:1999: Water quality -- Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC)." *international organization of standardization*.
- Janošek, J., L. Bláha, V. Kočí, L. Kochánková, T. Ocelka, J. Giesy and I. Holoubek (2003). "Assessment of dioxin-like toxicities of water-exposed SPMDs by in vitro reporter gene assay." *Persistent Toxic Substances Contamination of the European Region, RECETOX EU-Center of Excellence 1st Workshop*: 63-65.
- Jones-Lepp, T. L., D. A. Alvarez, J. D. Petty and J. N. Huckins (2004). "Polar organic chemical integrative sampling and liquid chromatography-electrospray/ion-trap mass spectrometry for assessing selected prescription and illicit drugs in treated sewage effluents." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **47**(4): 427-439.
- Keiter, S., S. Grund, B. van Bavel, J. Hagberg, M. Engwall, U. Kammann, M. Klempt, W. Manz, H. Olsman, T. Braunbeck and H. Hollert (2008). "Activities and identification of aryl hydrocarbon receptor agonists in sediments from the Danube river." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**(8): 2009-2019.
- Kinani, S., S. Bouchonnet, N. Creusot, S. Bourcier, P. Balaguer, J. M. Porcher and S. Ait-Aïssa (2010). "Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers." *Environmental Pollution* **158**(1): 74-83.
- Kolok, A. S., D. D. Snow, S. Kohno, M. K. Sellin and L. J. Guillet (2007). "Occurrence and biological effect of

- exogenous steroids in the Elkhorn River, Nebraska, USA." *Science of the Total Environment* **388**(1-3): 104-115.
- Kolpin, D. W., E. T. Furlong, M. T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber and H. T. Buxton (2002). "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance." *Environmental Science & Technology* **36**(6): 1202-1211.
- Lagana, A., A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago and A. Marino (2004). "Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters." *Analytica Chimica Acta* **501**(1): 79-88.
- Lemaire, G., W. Mnif, J. M. Pascussi, A. Pillon, F. Rabenoelina, H. Fenet, E. Gomez, C. Casellas, J. C. Nicolas, V. Cavailles, M. J. Duchesne and P. Balaguer (2006). "Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system." *Toxicological Sciences* **91**(2): 501-509.
- Li, H., P. A. Helm and C. D. Metcalfe (2010). "Sampling in the Great Lakes for Pharmaceuticals, Personal Care Products, and Endocrine-Disrupting Substances Using the Passive Polar Organic Chemical Integrative Sampler." *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**(4): 751-762.
- Li, H., P. A. Helm, G. Paterson and C. D. Metcalfe (2011). "The effects of dissolved organic matter and pH on sampling rates for polar organic chemical integrative samplers (POCIS)." *Chemosphere* **83**(3): 271-280.
- Liscio, C., E. Magi, M. Di Carro, M. J. F. Suter and E. L. M. Vermeirssen (2009). "Combining passive samplers and biomonitors to evaluate endocrine disrupting compounds in a wastewater treatment plant by LC/MS/MS and bioassay analyses." *Environmental Pollution* **157**(10): 2716-2721.
- Liu, R., J. L. Zhou and A. Wilding (2004). "Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1022**(1-2): 179-189.
- López-Roldán, R., M. L. de Alda, M. Gros, M. Petrovic, J. Martín-Alonso and D. Barceló (2010). "Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry." *Chemosphere* **80**(11): 1337-1344.
- Louiz, I., S. Kinani, M. E. Gouze, M. Ben-Attia, D. Menif, S. Bouchonnet, J. M. Porcher, O. K. Ben-Hassine and S. Ait-Aissa (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)." *Science of the Total Environment* **402**(2-3): 318-329.
- Macleod, S. L., E. L. McClure and C. S. Wong (2007). "Laboratory calibration and field deployment of the polar organic chemical integrative sampler for pharmaceuticals and personal care products in wastewater and surface water." *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**(12): 2517-2529.
- Matthiessen, P., D. Arnold, A. C. Johnson, T. J. Pepper, T. G. Pottinger and K. G. T. Pulman (2006). "Contamination of headwater streams in the United Kingdom by oestrogenic hormones from livestock farms." *Science of the Total Environment* **367**(2-3): 616-630.
- Michallet-Ferrier, P., S. Ait-Aissa, P. Balaguer, J. Dominik, G. D. Haffner and M. Pardos (2004). "Assessment of estrogen (ER) and aryl hydrocarbon receptor (AhR) mediated activities in organic sediment extracts of the Detroit River, using in vitro bioassays based on human MELN and teleost PLHC-1 cell lines." *Journal of Great Lakes Research* **30**(1): 82-92.
- Mnif, W., J. M. Pascussi, A. Pillon, A. Escande, A. Bartegi, J. C. Nicolas, V. Cavailles, M. J. Duchesne and P. Balaguer (2007). "Estrogens and antiestrogens activate hPXR." *Toxicology Letters* **170**(1): 19-29.
- Mottaleb, M. A., S. Usenko, J. G. O'Donnell, A. J. Ramirez, B. W. Brooks and C. K. Chambliss (2009). "Gas chromatography-mass spectrometry screening methods for select UV filters, synthetic musks, alkylphenols, an antimicrobial agent, and an insect repellent in fish." *Journal of Chromatography A* **1216**(5): 815-823.
- Petty, J. D., J. N. Huckins, D. A. Alvarez, W. G. Brumbaugh, W. L. Cranor, R. W. Gale, A. C. Rastall, T. L. Jones-Lepp, T. J. Leiker, C. E. Rostad and E. T. Furlong (2004). "A holistic passive integrative sampling approach for assessing the presence and potential impacts of waterborne environmental contaminants." *Chemosphere* **54**(6): 695-705.
- Pojana, G., A. Gomiero, N. Jonkers and A. Marcomini (2007). "Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon." *Environment International* **33**(7): 929-936.
- Rastall, A. C., D. Getting, J. Goddard, D. R. Roberts and L. Erdinger (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." *Environmental Science and Pollution Research* **13**(4): 256-267.
- Richardson, S. D. (2008). "Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues." *Analytical Chemistry* **80**(12): 4373-4402.
- Sanchez, W., S. Ait-Aissa, O. Palluel, J.-M. Ditché and J.-M. Porcher (2007). "Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams." *Ecotoxicology* **16**(2): 279-287.
- Schmitt, C., J. Balaam, P. Leonards, R. Brix, G. Streck, A. Tuikka, L. Bervoets, W. Brack, B. van Hattum, P. Meire and E. de Deckere (2010). "Characterizing field sediments from three European river basins with special emphasis on endocrine effects - A recommendation for *Potamopyrgus antipodarum* as test organism." *Chemosphere* **80**(1): 13-19.
- Sinz, M., S. Kim, Z. R. Zhu, T. S. Chen, M. Anthony, K. Dickinson and A. D. Rodrigues (2006). "Evaluation of 170 xenobiotics as transactivators of human pregnane X receptor (hPXR) and correlation to known CYP3A4 drug interactions." *Current Drug Metabolism* **7**(4): 375-388.

- Sumpster, J. P. (2005). "Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview." *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* **33**(1): 9-16.
- Tapie, N., M. H. Devier, C. Soulier, N. Creusot, K. Le Menach, S. Ait-Aissa, B. Vrana and H. Budzinski (2011). "Passive samplers for chemical substance monitoring and associated toxicity assessment in water." *Water Science and Technology* **63**(10): 2418-2426.
- Terasaki, M., H. Fukazawa, Y. Tani and M. Makino (2008). "Organic pollutants in paper-recycling process water discharge areas: First detection and emission in aquatic environment." *Environmental Pollution* **151**(1): 53-59.
- Togola, A. and H. Budzinski (2007). "Development of polar organic integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems." *Analytical Chemistry* **79**(17): 6734-6741.
- Urbatzka, R., A. van Cauwenberge, S. Maggioni, L. Viganò, A. Mandich, E. Benfenati, I. Lutz and W. Kloas (2007). "Androgenic and antiandrogenic activities in water and sediment samples from the river Lambro, Italy, detected by yeast androgen screen and chemical analyses." *Chemosphere* **67**(6): 1080-1087.
- Vermeirssen, E. L. M., O. Korner, R. Schonenberger, M. J. F. Suter and P. Burkhardt-Holm (2005). "Characterization of environmental estrogens in river water using a three pronged approach: Active and passive water sampling and the analysis of accumulated estrogens in the bile of caged fish." *Environmental Science & Technology* **39**(21): 8191-8198.
- Vondracek, J., M. Machala, K. Minksova, L. Blaha, A. J. Murk, A. Kozubik, J. Hofmanova, K. Hilscherova, R. Ulrich, M. Ciganek, J. Neca, D. Svrckova and I. Holoubek (2001). "Monitoring river sediments contaminated predominantly with polyaromatic hydrocarbons by chemical and in vitro bioassay techniques." *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(7): 1499-1506.
- Vrana, B. (2005). "Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water." *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **24**(10): 845-868.
- Vrana, B. and G. Schuurmann (2002). "Calibrating the uptake kinetics of semipermeable membrane devices in water: Impact of hydrodynamics." *Environmental Science & Technology* **36**(2): 290-296.
- Wang, L., G.-G. Ying, J.-L. Zhao, S. Liu, B. Yang, L.-J. Zhou, R. Tao and H.-C. Su (2011). "Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological tools." *Environmental Pollution* **159**(1): 148-156.
- Weiss, J. M., T. Hamers, K. V. Thomas, S. van der Linden, P. E. G. Leonards and M. H. Lamoree (2009). "Masking effect of anti-androgens on androgenic activity in European river sediment unveiled by effect-directed analysis." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **394**(5): 1385-1397.
- Wilson, V. S., K. Bobseine, C. R. Lambright and L. E. Gray (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." *Toxicological Sciences* **66**(1): 69-81.
- Xue, N. D., X. B. Xu and Z. L. Jin (2005). "Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir." *Chemosphere* **61**(11): 1594-1606.
- Ying, G. G., B. Williams and R. Kookana (2002). "Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - a review." *Environment International* **28**(3): 215-226.
- Zhang, X., Q. Li, G. Li, Z. Wang and C. Yan (2009). "Levels of estrogenic compounds in Xiamen Bay sediment, China." *Marine Pollution Bulletin* **58**(8): 1210-1216.

Synthèse de l'article 7

Les résultats de cette étude montrent, sur le Réveillon, une contamination de l'ensemble des compartiments étudiés par des composés de type PE. À l'image de la forte contamination du sédiment précédemment décrite (**Articles 2 et 6**), de très fortes activités ont également été détectées dans la colonne d'eau aussi bien dans les POCIS que les SPMD. Par ailleurs, il est intéressant de noter que la distribution des activités diffère selon les compartiments (**Tableau 31**).

Tableau 31. Distribution des activités entre le sédiment et la colonne d'eau

	ER	AR	Anti-AR	PXR	AhR 24h	AhR 4h
sédiment	+	n.d	+++	++	+++	+++
POCIS	+++	n.d	n.d	+++	n.d	+
SPMD	n.d	n.d	+++	++	++	++

De manière plus générale, cette étude montre qu'une telle caractérisation permet d'émettre plusieurs hypothèses concernant la nature des composés actifs (persistance, polarité) Dans le cas présent, des différences ont été observées pour certaines activités entre les deux points de prélèvement suggérant la présence d'une source potentielle de contamination entre les deux stations. Ces résultats témoignent de l'intérêt des outils de bio-analyse pour tracer la contamination.

Concernant la nature des composés détectés, la forte activité *PXR-like* présente dans les POCIS montre la présence de ligand(s) polaire(s) de ce récepteur. Dans le cadre de nos précédentes investigations, nous avons mis en évidence la présence de composés activateurs du PXR polaires dans le sédiment (**Article 6**).

Dans ces circonstances, il semblait intéressant d'établir si les composés à l'origine de cette activité étaient les mêmes quelque soit le compartiment considéré. Pour répondre à cette question, nous avons entrepris le fractionnement des extraits de sédiment, de POCIS et de SPMD selon la méthodologie décrite dans l'**article 6**. Globalement, le fractionnement met en évidence (1) une continuité dans les profils d'activité des fractions SPE (préfractions) dans le sédiment entre l'année 2009 et 2010 confirmant l'intérêt de ce site comme site atelier ; (2) que les composés à l'origine des activités dans le sédiment (2009) et dans les POCIS (2010) diffèrent au moins en partie (i.e. fractions CLHP actives différentes selon le compartiment). Jusqu'à présent seul un extrait de POCIS de la campagne de prélèvement 2010 a pu être hyperfractionné. Le fractionnement secondaire par CLHP des préfractions de SPMD et de sédiment reste à être réalisé.

2.3 Application 2 : La Dore : contamination pharmaceutique

Dans l'**article 6** nous avons utilisé avec succès notre démarche EDA pour l'identification de ligands environnementaux du hPXR et du ER dans le sédiment. Il nous a paru important de confirmer l'applicabilité d'une telle stratégie sur un site soumis à une contamination de nature différente.

Récemment, plusieurs études ont mis en évidence la présence de fortes teneurs en résidus médicamenteux dans des effluents d'usines pharmaceutiques rejetés dans les rivières (Gilbert 2011) soulevant ainsi la question des effets de telles émissions sur les organismes aquatiques. En 2008, une étude menée par notre laboratoire a mis en évidence la présence de fortes altérations de la reproduction chez le goujon (i.e. hypertrophie des gonades, incapacité de ponte) en parallèle d'une intersexualité très marquée en aval d'une usine pharmaceutique et d'une STEP urbaine (Sanchez *et al.* 2011). Dans ce contexte, il nous a paru pertinent de mettre en œuvre notre stratégie bio-analytique de manière à caractériser la qualité du milieu en aval et à identifier les composés responsables des effets relevés chez le goujon.

Dans ce but, en complément de la batterie précédemment évaluée (ER, PXR, AR, AhR), nous nous sommes intéressés à de nouvelles cibles adaptées au contexte de l'étude (GR, MR et PR) permettant la détection d'une diversité plus large de stéroïdes.

Nous avons évalué la contamination dans le sédiment et la colonne d'eau au sein de trois stations localisées respectivement en amont de l'industrie pharmaceutique ; entre cette usine et la STEP urbaine ; en aval de la STEP urbaine. La contribution potentielle de résidus pharmaceutiques, généralement hydrosolubles et présents à l'état de trace, nous a amené à employer des capteurs passifs de type POCIS permettant l'échantillonnage de telles substances dans la colonne d'eau (**Article 4**). Concernant le déploiement de ces dispositifs, six campagnes d'échantillonnage de 1 mois chacune ont été réalisées. Ensuite sur la base des activités détectées, des analyses chimiques ciblées ont été entreprises et les composés détectés testés individuellement sur l'ensemble de nos modèles cellulaires de manière à réaliser une MBA. Finalement, notre stratégie de fractionnement a été utilisée pour permettre l'isolement et l'identification finale des composés responsables des activités mesurées. Les résultats de ces investigations sont présentés dans l'**article 8**.

Article 8: Creusot *et al.*, (en préparation)

Multiple in vitro steroid-like and xenobiotic activities and chemical identification of active synthetic steroid compounds in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges

Multiple *in vitro* steroid-like and xenobiotic activities and chemical identification of active synthetic steroid compounds in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges

Nicolas Creusot^{1,2}, Tapie Nathalie², Jean-Marc Porcher¹, Hélène Budzinski² and Selim Aït-Aïssa^{1,*}

¹ INERIS, Unité Écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, Parc ALATA, BP2, f-60550 Verneuil-en-Halatte, France

² EPOC/LPTC – UMR 5805 CNRS Université Bordeaux 1, f-33405 Talence, France

* Corresponding author: E-mail: selim.ait-aissa@ineris.fr, fax +33 344 556 767

Abstract :

Recent evidences have suggested that effluents from pharmaceutical industry release drugs into rivers and trigger adverse effect on wildlife. In the present study, we report the use of a bioanalytical approach to identify organic chemical contaminants at a site located downstream from a pharmaceutical factory and where strong reproductive alterations in wild fish were previously observed (Sanchez et al, 2011). Investigations were conducted in both sediment and surface water using polar organic compound integrative sampler (POCIS) within 6 sampling campaigns of one month each at one upstream and two downstream sites. Profiling of endocrine disrupting activities based on *in vitro* bioassays revealed the occurrence of unusual xenobiotic and steroid-like activities in POCIS extracts, including very high glucocorticoidic, anti-mineralocorticoidic and PXR-like activities (up to 100 µg-standard-EQ/g of sorbent), high androgenic and progestogenic activities (µg-standard-EQ/g of sorbent range), and weak estrogenic activity (ng-E2-EQ/g of sorbent range). Chemical analyses allowed the detection of up to 60 out of 118 targeted steroid and pharmaceutical compounds. Mass balance calculation identified dexamethasone, spironolactone, and 6-alpha-methylprednisolone as

major contributors to corticosteroidic activities and levonorgestrel as main contributor to androgenic and progestogenic activities, while the other activities were only weakly explained by targeted chemicals. RP-HPLC fractionation further revealed the occurrence of yet unknown corticosteroidic chemicals and allowed the isolation of estrogenic, progestogenic and PXR-active chemicals, which remain to be identified. This study is one of the first to report environmental contamination by such chemicals; the link with occurring *in situ* effects on fish at the same site is discussed.

Keywords: emerging pollutants; pharmaceuticals; POCIS; *in vitro* bioassays; effect-directed analysis.

1. Introduction

Occurrence of endocrine disruption in aquatic wildlife has been well documented in different environmental contexts over the world (Sumpter 2005). In most of cases, chemical contaminants have been often suspected, and sometimes proved, as the cause of such ecotoxicological impacts. Up to date, a majority of field investigations has focused on estrogenic compounds, such as steroid estrogens or surfactants, because these substances were of the first identified as endocrine disrupting

compounds (EDCs), potently active to aquatic organisms and widely released from urban wastewater treatment plant (WWTP) discharges (Desbrow *et al.* 1998).

Apart from (xeno)estrogens, there are now recent evidences on the occurrence of other natural and synthetic steroids released from WWTP effluents issued from urban, industrial or hospital activities (Chang *et al.* 2007, Van der Linden *et al.* 2008; Schriks *et al.* 2010). These emerging environmental contaminants include androgens, corticosteroids or progestogens (Runnalls *et al.* 2010). Such hormonal active compounds can interfere with the regulation of endocrine system, through the binding to steroid receptors, such as androgen (AR), glucocorticoid (GR), mineralocorticoid (MR) or progestagen receptors (PR), and subsequent modulation of target genes involved in various essential physiological functions, such as reproduction, differentiation or stress response. Recent reviews reported that aquatic organisms could be at risk when exposed to the predicted environmental concentrations of such compounds, i.e. in the ng/L range (Runnalls *et al.* 2010, Besse and Garric 2008). Hence, there is a major need to better characterize the occurrence and effects of these compounds to aquatic wildlife.

In a previous study, we reported the occurrence of reproductive adverse effects, such as vitellogenin induction, intersex and sex-ratio alteration, in wild fish population from a French river site located downstream from both pharmaceutical industry and urban WWTP discharges (Sanchez *et al.* 2011). Wastewater effluents from pharmaceutical factories have been recently pointed out as potential sources of pharmaceutical compounds release into the aquatic environment, by contaminating receiving water bodies at concentrations ranging from the ng/L up to mg/L range and generating adverse effects to wildlife (Carlsson *et al.* 2009, Gunnarsson *et al.* 2009, Phillips *et al.* 2010). In the present study, we aimed at determining whether chemical contamination released from WWTPs could be the cause for endocrine disruption in wild fish observed at the impacted site (Sanchez *et al.* 2011). For this purpose, a bio-analytical approach based on both *in vitro* bioassays and chemical analyses was implemented to establish toxicity profiles in both sediments and water phase sampled using polar

organic compound integrative samplers (POCIS), at one upstream and two downstream sites. Toxicity profiling based on activation of estrogen (ER), AR, GR, MR, PR, aryl hydrocarbon (AhR) and pregnane X receptors (PXR) revealed polar corticosteroids, but also androgen and progestogen compounds, as main chemical contaminants downstream from pharmaceutical industry. Major active compounds detected by the bioassays were partly identified on the basis of targeted chemical analyses and RP-HPLC fractionation coupled to bioassays. Their potential effects in fish are discussed in light of the effects observed at the same site.

2. Material and Methods

2.1. Chemicals and reagents

All chemicals used as standards for *in vitro* bioassays and analytical methods are described in *supporting information*. Biological reagent grade methanol and dimethylsulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France); heptane and acetone (HPLC reagent grade) were purchased from VWR (France).

2.2. Study sites, sampling and extraction procedures

Location and environmental pressures and impacts of the investigated French river were as previously detailed (Sanchez *et al.* 2011). In the present study, three sites were sampled alongside this river, located 2 km upstream (site A), less than 1 km downstream from a pharmaceutical industry effluent discharge (site B) and less than 1 km downstream an urban STP discharge (site C), respectively (**Figure S1**, *Supporting Information*). Sediments were sampled with a grab and sieved on 1 mm mesh. After freeze drying, 5 g were extracted on an Accelerated Solvent Extractor (ASE, Dionex, France) by heptane/acetone (50:50, v/v) at 100°C and 1500 PSI. Extracts were evaporated to 500 µL with a Turbovap II (Zymark) and then to dryness under N₂. Residues were dissolved in 1 mL of MeOH. TOC was calculated in accordance to international organization of standardization recommendation (ISO-8245 1999).

POCIS were deployed from June to November 2009 for 6 sampling campaigns of 1 month duration each. At each station, six POCIS were deployed per sampling date. POCIS preparation and extraction procedure were previously described in Tapie *et al.* (2011). Briefly, after collection, POCIS-sorbent was extracted on SPE system with sequential elution of 10 ml DCM, 10 ml DCM/methanol mixture (50:50 v/v) and 10 ml methanol. This mixture was evaporated under N₂ flux until dryness and residues were redissolved in 200 µL of MeOH for *in vitro* bioassays and chemical analyses.

2.3. Fractionation procedure

In order to isolate the active chemicals, we fractionated POCIS extracts using RP-HPLC fractionation calibrated for chemicals exerting broad range of polarity ($-1 < \log K_{ow} < 7$). Details on

calibration and fractionation procedure are given in *supporting information* section.

2.4. Biological and chemical analyses

Samples were tested for hormone and dioxin receptor agonists and antagonists by using a panel of seven *in vitro* assays based on the use of reporter cell lines, namely MELN, PALM, MDA-kb2, HG5LN-hPR, HG5LN-hMR and HG5LN-hPXR, as well as the fish PLHC-1 cell line, allowing the specific detection of ER, AR, GR, PR, MR, PXR and AhR activation, respectively. For details on cell lines, bioassay and data treatment procedures, see the *Supporting Information*. All the cell lines have been successfully used for the detection of EDCs in environmental extracts in previous studies (Louiz *et al.* 2008, Kinani *et al.* 2010, Creusot *et al.* 2010, Mnif *et al.* 2010).

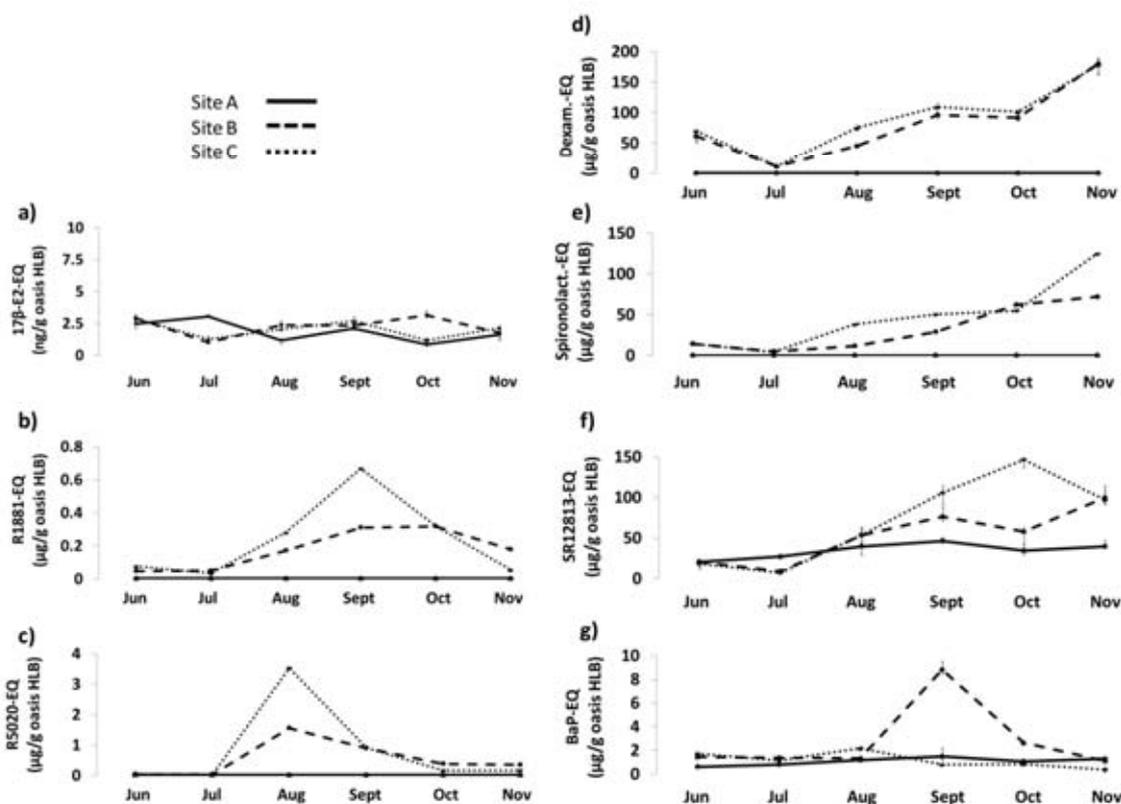


Figure 1. Biological activities detected in POCIS extracts deployed for 1 month upstream (station A), between (station B) and downstream (station C) the pharmaceutical and the urban STP between June and November 2009. a), estrogenic activity in MELN cells; b), Androgenic activity in PALM cells; c), Progestative activity in HELNPRB cells; d), Glucocorticoidic activity in MDA-kb2 cells; e), anti-mineralocorticoidic activity in HG5LN-hMR cells, f), PXR-like activity in HG5LN-hPXR cells; g), dioxin-like activity in PLHC-1 cells.

Targeted chemical analyses were assessed using RRLC-MS/MS (Agilent) and UPLC-MS/MS (Waters) in multi reaction monitoring (MRM) mode. Analyses were targeted to pharmaceuticals including synthetic steroids, antibiotic, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and other drug families. Identity of these chemicals was finally confirmed using LC-Q-TOF (Agilent). Details on analytical methods are given in the *supporting information*.

3. Results & Discussion

3.1. Biological activities in sediments and POCIS extracts

Multi-bioassay analyses revealed different contamination profiles in sediments and POCIS. In sediments, estrogenic and PAH-like activities were detected in all sites at similar levels (**Table S4**, *Supporting Information*), which were comparable to that reported in weakly to moderately contaminated sites in other field studies (Louiz *et al.* 2008; Kinani *et al.* 2010; Brack *et al.* 2008; Hurst *et al.* 2004). Moreover, no other *in vitro* activity could be detected, suggesting that, at these sites, potent EDCs did not accumulated in sediments where total organic carbon content was very low (**Table S4**). Because sediment contamination profiles were poorly explicative on fish alteration observed at downstream sites, the water column compartment was then assessed to get further information on fish exposure to EDCs.

POCIS-based bio-monitoring provided much more significant information on site contamination, as all investigated activities could be detected downstream from the industrial and urban discharges (**Figure 1**). Individual dose-response curves for each sample extract that enabled us to determine toxic-equivalents in each bioassay (bio-TEQ) are presented in the *supporting information* (**Figures S2 to S5**). The most remarkable finding was the high androgenic (0.03-0.67 µg R1881-EQ/g sorbent), glucocorticoid (11-180 dexamethasone-EQ/g sorbent), progestagenic (0.4-3.5 µg R5020-EQ/g sorbent) and anti-mineralocorticoid (5-125µg spironolactone-EQ/g sorbent) activities that were quantified downstream the pharmaceutical industry discharge (site B) and still persisted downstream

the urban STP (site C), while they all were undetectable at the upstream site (site A). PXR activity was also significantly increased at downstream sites suggesting that PXR active chemicals were released by the STPs.

The observation that detected activities followed almost parallel profiles at sites B and C suggested that most of the detected compounds were issued from the industrial discharge located upstream the site B, with minor influence of urban STP, expected for PXR activity. The *in vitro* profiles varied according to the period of sampling, with the highest levels in August for PR, September for AR, and from August to November for GR, anti-MR and PXR activities (**Figure 1**). Thus, the different patterns of contamination might reflect qualitative changes in industrial discharges throughout the period of sampling, the weakest levels measured in June and July being likely related to the slowdown in the factory during this period.

Finally, estrogenic and PAH-like activities were also detected but at similar levels at upstream and downstream sites. These data, which corroborated those observed in sediments, suggested that the STPs were not a major source of compounds responsible for these activities.

3.2. Chemical screening and mass balance analysis

Bioassays showed that polar steroid-like compounds, other than estrogenic ones, were present in high concentrations, downstream from the industrial discharges. To identify the nature of detected chemicals, chemical analyses were directed on natural and synthetic steroids (estrogens, androgens, progestagens and corticosteroids) and pharmaceutical compounds (antibiotics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, anti-depressors) (**Table S2**). Analyzed compounds were selected either as well-known activators of the detected *in vitro* activities and/or amongst the most commonly pharmaceuticals found in the environment. Out of the 118 target compounds, up to 60 were detected in POCIS from sites B and C (**Table S5**, *Supporting Information*). The contamination patterns revealed dexamethasone, spironolactone, 6- α -methyl-prednisolone, canrenone, hydrocortisone, prednisolone, predniso-

Table 1. Relative potencies (REP) of the 30 most abundant chemicals detected in POCIS and their range concentration in POCIS at the site B. (n.a : not active)

EC50 of reference compound (mol/l)	Min-Max detected concentration (ng/g HLB)	ER (MELN)	AR (PALM)	PR (HELN-PRB)	GR (MDA-kb2)	MR (HG5LN-MR)	Anti-MR (HG5LN-MR)	PXR (HG5LN-hPXR)
		E ₂ -EF	R1881-EF	R5020-EF	Dex-EF	Aldo-EF	Spiro-EF	SR-EF
		1.1E-11	1.3E-10	3.8E-10	6.1E-9	6.5E-10	2.2E-9	7.7E-8
Pregnenolone	0 - 305	1.1E-05	n.a	n.a	n.a	n.a	4.8E-02	2.4E-03
Progesterone	1 - 6	7.5E-07	n.a	2.9E-02	n.a	n.a	1.0E-01	n.a
Levonorgestrel	5 - 987	3.1E-05	0.11	0.9	n.a	n.a	1.7E-1	n.a
Spironolactone	402 - 14,681	n.a	n.a	1.9E-05	n.a	n.a	1	5.7E-03
Canrenone	226 - 7,336	n.a	n.a	6.8E-05	n.a	n.a	0.3	n.a
Dexamethasone	40 - 88,578	n.a	n.a	n.a	1	n.a	2.7E-01	2.1E-4
Prednisone	1124 - 3,605	n.a	n.a	n.a	1.6E-04	n.a	1.6E-01	n.a
Prednisolone	80 - 7,671	n.a	n.a	n.a	2.0E-01	1.3E-02	1.6E-01	n.a
6Mprednisolone	1422 - 37,720	n.a	n.a	n.a	6.0E-01	1.4E-05	4.5E-01	n.a
Cortisone	252 - 2,301	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	1.2E-01	n.a
OH-Cortisone	982 - 9,203	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	2.8E-04	n.a
Androstenedione	76 - 403	9.7E-07	1.3E-02	n.a	n.a	n.a	1.0E-02	n.a
Testosterone	0 - 126	n.a	2.8E-02	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
DHEA	70 - 498	2.9E-04	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a
Gemfibrozil	12 - 21	4.7E-08	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	2.5E-03
Carbamazepine	64 - 452	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	3.7E-05	6.0E-04
Inactive chemicals	Stavudine, sulfamethoxazole, propranolol, atenolol, sotalol, bisoprolol, clarythromycin, roxithromycin, caffen, theophyllin, paracetamol, bromazepam.							

-ne, as well as cortisol and cortisone, as the most abundant compounds, i.e. present in the $\mu\text{g} / \text{g}$ sorbent range. Recent field studies have described steroid hormones such as glucocorticoids and progestagens as being continuously released by different sources such as hospital, industrial or urban discharges (Chang *et al.* 2007, Van der Linden *et al.* 2008, Labadie and Budzinski 2005, Chang *et al.* 2009). We report here the potential contribution of pharmaceutical industry as a significant source for these compounds in the aquatic environment. Spironolactone is a mineralocorticosteroid antagonist drug that was the most prescribed in United Kingdom in 2006 (Runnalls *et al.* 2010) but no data is available on its environmental occurrence. To our knowledge, the present study is the first one that reports such contamination of surface water by this compound and its metabolite canrenone. Finally, it is noteworthy that the natural androgens testosterone and androstenedione were present just downstream from the industrial discharge, whereas natural and synthetic estrogens were not detected.

To establish a link between chemical data and biological activities in POCIS, a mass balance approach was used. For this purpose, the potency of individual compounds to induce a biological response in each bioassay was first determined through the establishment of dose-response curves (**Figure S6, Supporting Information**) and the calculation of their relative potencies (REPs). The **table 1** shows that several compounds were able to modulate activity of different receptors. For instance, spironolactone, a well-known MR antagonist, exerted also progestogenic, glucocorticoid, and PXR-like activities. All GR agonists were also MR agonists and/or antagonists in our bioassays, which is in accordance with the common evolution of these two receptors that are closely related and share overlapping physiological functions and several ligands (Arriza *et al.* 1987; Prunet *et al.* 2006; Rashid and Lewis 2005). The determination of REPs allowed deriving toxic equivalents values from chemical analyses (chem-TEQ) that were further compared to bioassay derived toxic equivalents (bio-TEQs) in POCIS

from site B. By using this approach, an overall adequacy is seen between analyzed target chemicals and glucocorticoid and anti-mineralocorticoid activities, the chem-TEQs explaining 25% to 90% (except for anti-MR in June, see discussion below) of bio-TEQs, depending on date of sampling (Table 2). Examination of the contribution of individual analytes (detailed in Supporting Information, Table S6) identified dexamethasone and 6 α -methylprednisolone as main contributors to GR activity. These two compounds, together with spironolactone and, to a lesser extent cortisone, prednisone and prednisolone, were also main contributors to anti-MR activity measured by the bioassay (Table S7). Our findings are in line with previous report on significant contribution of dexamethasone and prednisolone in the prediction of GR activity of industrial and hospital effluents (Schriks *et al.* 2010). However, some differences between bio- and chem-TEQs were noted, which may highlight the occurrence of active compounds that were not targeted by chemical analyses. For instance, an over-prediction of anti-MR activity was noted in June, which could be explained by the presence of a mixture of both MR agonists and antagonists leading to a reduced anti-MR activity. Such masking effect in mixture containing both receptor agonists and antagonists has been already reported for ligands of the androgen receptor detected in sediment samples (Weiss *et al.* 2009).

Conversely to GR and anti-MR activities, the other steroid-like and PXR activities were only weakly explained by target chemicals (Table 2, Tables S8-11). DHEA was found as the main estrogenic compound in October and November, although it explained at best 5 % of overall activity of the extract (Table S8). Also, levonorgestrel (0-987 ng/g of sorbent) was identified as the main androgenic and progestogenic compound, explaining up to 50 % in August sample but much less in other samples (Tables S9-S10). Spironolactone and progesterone contributed also weakly to the progestogenic activity as well as testosterone and androstenedione to androgenic activity (Tables S9-S10). Overall, lower consistency between chemical and biological analyses for these activities could rely on the fact that chemical analyses targeted a limited set of specific chemicals, while other active compounds including metabolites of identified steroids were likely present. Moreover, although mass balance analysis based on addition concentration has proven useful model to describe *in vitro* quantification of mixtures of steroid-like compounds such as (xeno)estrogen (Kinani *et al.* 2010) or GR agonist (Schriks *et al.* 2010), it cannot be excluded that mixture effects like synergy or antagonism could have contributed to deviancy between predicted and measured activity in the present case study.

Table 2. Comparison of chemical and bioassay derived TEQ measured in POCS at site B.

		June	July	August	September	October	November
ER (ng E2-EQ/g HLB)	Bio-TEQ	2.9	1.0	2.4	2.3	3.2	1.8
	Chem-TEQ	0.0001	0.0001	0.03	0.004	0.2	0.1
	% chem/bio	0.005	0.008	1.3	0.2	4.8	5.8
AR (ng R1881-EQ/g HLB)	Bio-TEQ	46.8	48.3	171.8	311.3	318.4	178.1
	Chem-TEQ	2.1	1.0	116.2	18.2	8.8	9.2
	% chem/bio	4.6	2.1	67.6	5.9	2.8	5.2
PR (ng R5020-EQ/g HLB)	Bio-TEQ	39.5	32.5	1556.0	892.8	381.5	346.3
	Chem-TEQ	0.6	0.1	888.7	121.0	0.7	51.9
	% chem/bio	1.4	0.4	57.1	13.6	0.2	15.0
GR (μ g Dex-EQ/g HLB)	Bio-TEQ	61.4	11.1	45.3	96.3	91.5	180.3
	Chem-TEQ	46.9	9.3	12.1	32.0	23.0	107.7
	% chem/bio	76.3	83.9	26.6	33.2	25.1	59.7
anti-MR (μ g Spiro-EQ/g HLB)	Bio-TEQ	14.4	5.0	11.7	29.1	62.4	72.2
	Chem-TEQ	34.2	3.9	12.4	14.9	25.5	41.6
	% chem/bio	237.1	78.2	106.1	51.3	40.9	57.6
PXR (μ g SR-EQ/g HLB)	Bio-TEQ	20.6	8.8	53.6	76.0	57.6	99.6
	Chem-TEQ	8.4E-02	5.1E-03	1.2E-02	2.4E-03	3.3E-02	1.0E-02
	% chem/bio	0.4	0.1	0.02	0.003	0.1	0.01

% chem/bio = ratio of Bio-TEQ to Chem-TEQ \times 100

3.3. Fractionation of POCIS extract

In attempt to unravel the complexity of the mixtures, a POCIS extract from site C has been fractionated using RP-HPLC to yield 40 subfractions that were further tested in the different bioassays. The fractionation protocol was calibrated using a mixture of standard chemicals including both the most abundant ones detected in samples and a panel of environmental EDCs with octanol-water partition coefficients (logKow) comprised between -1 and 7 (**Table S3**). The RP-HPLC profiles reported in the **table 3** confirmed that GR and anti-MR activities were predominant in POCIS and presented roughly similar elution patterns between F9 to F23. This result confirmed assumptions from mass balance analysis on close relationship or potential similar identity between GR and MR ligands. Four major peaks of GR activity were observed in F11-12, F15, F17-18 and F22. On the basis of the retention times of standard chemicals, 6 α -methylprednisolone (F11) and dexamethasone (F12), already identified as being present in the mixture, were very likely responsible for F11-12 peak; however other unidentified GR compounds were obviously present in F15, 17-18 and 22. Moreover, this fractionation step further supported the involvement of 6 α -methylprednisolone and dexamethasone (F11-12), spironolactone (F18) and androstenedione (F19) in the strong anti-MR activity detected the fractions. Nevertheless, as for GR activity, the strong anti-MR activities detected in F15-16 and F21-23 revealed the presence of unknown active compounds. Assessment of PR activity confirmed the possible involvement of spironolactone in F19 but also highlighted that other PR active compounds, yet unidentified, were also present in F15-16 and F20-21.

Interestingly, the fractionation step also revealed the occurrence of agonistic MR activity in F9 and F11, which was not detected in global mixture. Such similar masking effect of MR antagonists on MR agonists has been previously reported for (anti)androgenic compounds (Weiss *et al.* 2009) and stresses the importance of unraveling complex mixtures to reveal active chemicals that could not be detected initially due to matrix effect. This MR

Table 3. Biological activities in RP-HPLC fractions of POCIS extracts from the site C.

Fraction number	ER	PXR	GR	PR	anti-MR	MR
F1						
F2						
F3						
F4	20					
F5						
F6	7					
F7						
F8	13		5			
F9			10			45
F10			21		38	
F11			97		65	16
F12			131		73	7
F13			78	7	63	
F14			27		47	
F15			109	26	87	
F16	19		27	12	83	
F17			49		75	
F18	8		73	16	72	
F19			29	38	91	
F20			8	40	96	
F21		29	23	17	88	
F22			26		47	
F23				6	42	
F24						
F25	7	8				
F26		17		10		
F27		17				
F28		10				
F29		10				
F30						
F31	10					
F32	9					
F33						
F34						

No activity could be detected in F34 to F40

	No or weak effect ($\leq 10\%$ ^a)
	Moderate effect (10-50% ^a)
	Strong effect (>50% ^a)

^a percentage of luciferase transactivation relative to maximal induction by the reference compound

activity was mediated, at least partly, by prednisolone and 6 α -methylprednisolone that were co-eluted in these fractions.

The **Table 3** also showed that estrogenic and PXR were well separated from other activities, hence showing that responsible compounds differed from

those detected by the other bioassays. Further experiments using accurate mass spectrometry techniques will be however necessary to identify unknown compounds responsible for these activities.

3.4. Risks for aquatic organisms

Overall, this study showed important contamination of a river site by a mixture of steroids and steroid-like compounds and identified GR and PR agonists and MR antagonists as the most abundant compounds. The high concentrations measured just downstream industrial discharge may likely render the study site exceptional in the light of environmental levels that are mostly reported, i.e. in the ng/L to tens of ng/L range in surface waters and effluents (Runnalls *et al.* 2010, Tölgyesi *et al.* 2010). However this site may be not a unique case and could reflect an emerging environmental concern as ecotoxicological disorders have been recently reported in other river sites subjected to pharmaceutical industry release (Carlsson *et al.* 2009, Gunnarsson *et al.* 2009, Phillips *et al.* 2010) In our study site, major sexual differentiation and reproductive abnormalities were observed in wild fish living at the same site (Sanchez *et al.* 2011) which further raises the question of the toxicological effects of such compounds and the risk to aquatic species.

Unlike estrogens, and to lesser extent androgens, there is very limited information on the effects of corticosteroids and progestogens on freshwater fish (Runnalls *et al.* 2010). Yet, due to the ability of these molecules to interfere with multiple signaling pathways through their interaction with different steroid receptors, they can potentially alter physiological processes mediated by these receptors, such as reproductive or developmental functions (Leatherland *et al.* 2010). As a matter of fact, some recent studies reported that corticoids and progestogens could significantly affect reproduction and induce masculinization in fish as demonstrated for spironolactone (Howell *et al.* 1994), norethindrone (Paulos *et al.* 2011) or the cortisol metabolite 5 α -androstan-3,11,17-trione (Grillitsch *et al.* 2010). As an example, levonorgestrel, a synthetic progestin that interfered with multiple steroid receptors in our study (Table

1), has been shown to cause inhibition of fish reproduction at low ng/L range, as well androgenic effect at higher concentrations (Zeilinger *et al.* 2009). In our study, this compound was measured in all POCIS samples, hence suggesting a continuous exposure of wild fish inhabiting the river at concentrations that were shown to alter fish reproduction (Zeilinger *et al.* 2009). Altogether, it appears more than likely that the steroids and steroid-like compounds detected and identified in the present study significantly contributed to fish alterations observed in the river, although the occurrence as mixtures of such compounds able to interfere with multiple steroid receptor pathways makes further difficult the prediction of their impacts to fish health.

In summary, this study stresses the need to increase knowledge on the effects of corticosteroids and progestogens on aquatic organisms. Furthermore, it underscores the need to better characterize and identify such environmental contaminants that interfere with crucial signaling pathways involved in development and reproduction in different environmental contexts. As suggested by our study, multi-receptor bioassay-based monitoring coupled to effect-directed analysis can usefully serve this purpose.

References

- Arriza, J. L., C. Weinberger, G. Cerelli, T. M. Glaser, B. L. Handelin, D. E. Housman and R. M. Evans (1987). "Cloning of Human Mineralocorticoid Receptor Complementary-DNA - Structural and Functional Kinship with the Glucocorticoid Receptor." *Science* **237**(4812): 268-275.
- Besse, J. P. and J. Garric (2008). "Human pharmaceuticals in surface waters implementation of a prioritization methodology and application to the French situation." *Toxicology Letters* **176**(2): 104-123.
- Brack, W., L. Blaha, J. P. Giesy, M. Grote, M. Moeder, S. Schrader and M. Hecker (2008). "Polychlorinated naphthalenes and other dioxin-like compounds in Elbe River sediments." *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**(3): 519-528.
- Carlsson, G., S. Orn and D. G. J. Larsson (2009). "Effluent from Bulk Drug Production Is Toxic to Aquatic Vertebrates." *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**(12): 2656-2662.
- Chang, H., J. Y. Hu and B. Shao (2007). "Occurrence of natural and synthetic glucocorticoids in sewage treatment plants and receiving river waters." *Environmental Science & Technology* **41**(10): 3462-3468.

- Chang, H., Y. Wan and J. Y. Hu (2009). "Determination and Source Apportionment of Five Classes of Steroid Hormones in Urban Rivers." *Environmental Science & Technology* **43**(20): 7691-7698.
- Creusot, N., S. Kinani, P. Balaguer, N. Tapie, K. LeMenach, E. Maillot-Marechal, J. M. Porcher, H. Budzinski and S. Ait-Aissa (2010). "Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396**(2): 569-583.
- Desbrow, C., E. J. Routledge, G. C. Brighty, J. P. Sumpter and M. Waldock (1998). "Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening." *Environmental Science & Technology* **32**(11): 1549-1558.
- Grillitsch, B., D. Altmann, M. Schabuss, H. Zornig, I. Sommerfeld-Stur and E. Moestl (2010). "Mammalian Glucocorticoid Metabolites Act as Androgenic Endocrine Disruptors in the Medaka (*Oryzias Latipes*)." *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**(7): 1613-1620.
- Gunnarsson, L., E. Kristiansson, C. Rutgeresson, J. Sturve, J. Fick, L. Forlin and D. G. J. Larsson (2009). "Pharmaceutical Industry Effluent Diluted 1:500 Affects Global Gene Expression, Cytochrome P450 1a Activity, and Plasma Phosphate in Fish." *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**(12): 2639-2647.
- Howell, W. M., R. N. Hunsinger and P. D. Blanchard (1994). "Paradoxical Masculinization of Female Western Mosquitofish During Exposure to Spironolactone." *Progressive Fish-Culturist* **56**(1): 51-55.
- Hurst, M. R., J. Balaam, Y. L. Chan-Man, J. E. Thain and K. V. Thomas (2004). "Determination of dioxin and dioxin-like compounds in sediments from UK estuaries using a bio-analytical approach: chemical-activated luciferase expression (CALUX) assay." *Marine Pollution Bulletin* **49**(7-8): 648-658.
- ISO-8245 (1999). "ISO 8245:1999: Water quality -- Guidelines for the determination of total organic carbon (TOC) and dissolved organic carbon (DOC)." *international organization of standardization*.
- Kinani, S., S. Bouchonnet, N. Creusot, S. Bourcier, P. Balaguer, J. M. Porcher and S. Ait-Aissa (2010). "Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers." *Environmental Pollution* **158**(1): 74-83.
- Labadie, P. and H. Budzinski (2005). "Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **381**(6): 1199-1205.
- Leatherland, J. F., M. Li and S. Barkataki (2010). "Stressors, glucocorticoids and ovarian function in teleosts." *Journal of Fish Biology* **76**(1): 86-111.
- Louiz, I., S. Kinani, M. E. Gouze, M. Ben-Attia, D. Menif, S. Bouchonnet, J. M. Porcher, O. K. Ben-Hassine and S. Ait-Aissa (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)." *Science of the Total Environment* **402**(2-3): 318-329.
- Mnif, W., S. Dagnino, A. Escande, A. Pillon, H. Fenet, E. Gomez, C. Casellas, M. J. Duchesne, G. Hernandez-Raquet, V. Cavailles, P. Balaguer and A. Bartegi (2010). "Biological Analysis of Endocrine-Disrupting Compounds in Tunisian Sewage Treatment Plants." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **59**(1): 1-12.
- Paulos, P., T. J. Runnalls, G. Nallani, T. La Point, A. P. Scott, J. P. Sumpter and D. B. Huggett (2011). "Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, Norethindrone." *Aquatic Toxicology* **99**(2): 256-262.
- Phillips, P. J., S. G. Smith, D. W. Kolpin, S. D. Zaugg, H. T. Buxton, E. T. Furlong, K. Esposito and B. Stinson (2010). "Pharmaceutical Formulation Facilities as Sources of Opioids and Other Pharmaceuticals to Wastewater Treatment Plant Effluents." *Environmental Science & Technology* **44**(13): 4910-4916.
- Prunet, P., A. Sturm and S. Milla (2006). "Multiple corticosteroid receptors in fish: From old ideas to new concepts." *General and Comparative Endocrinology* **147**(1): 17-23.
- Rashid, S. and G. F. Lewis (2005). "The mechanisms of differential glucocorticoid and mineralocorticoid action in the brain and peripheral tissues." *Clinical Biochemistry* **38**(5): 401-409.
- Runnalls, T. J., L. Margiotta-Casaluci, S. Kugathas and J. P. Sumpter (2010). "Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: Steroids and Anti-Steroids as High Priorities for Research." *Human and Ecological Risk Assessment* **16**(6): 1318-1338.
- Sanchez, W., W. Sremski, B. Piccini, O. Palluel, E. Maillot-Marechal, S. Betoulle, A. Jaffal, S. Ait-Aissa, F. Brion, E. Thybaud, N. Hinfray and J.-M. Porcher (2011). "Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges." *Environment International* **37**(8): 1342-1348.
- Schriks, M., J. A. van Leerdam, S. C. van der Linden, B. van der Burg, A. P. van Wezel and P. de Voogt (2010). "High-Resolution Mass Spectrometric Identification and Quantification of Glucocorticoid Compounds in Various Wastewaters in The Netherlands." *Environmental Science & Technology* **44**(12): 4766-4774.
- Sumpter, J. P. (2005). "Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview." *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* **33**(1): 9-16.
- Tapie, N., M. H. Devier, C. Soulier, N. Creusot, K. Le Menach, S. Ait-Aissa, B. Vrana and H. Budzinski (2011). "Passive samplers for chemical substance monitoring and associated toxicity assessment in water." *Water Science and Technology* **63**(10): 2418-2426.
- Tölgyesi, Á., Z. Verebey, V. K. Sharma, L. Kovacsics and J. Fekete (2010). "Simultaneous determination of corticosteroids, androgens, and progesterone in river water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Chemosphere* **78**(8): 972-979.
- Van der Linden, S. C., M. B. Heringa, H. Y. Man, E. Sonneveld, L. M. Puijker, A. Brouwer and B. Van der Burg (2008). "Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays."

- Environmental Science & Technology* **42**(15): 5814-5820.
- Weiss, J. M., T. Hamers, K. V. Thomas, S. van der Linden, P. E. G. Leonards and M. H. Lamoree (2009). "Masking effect of anti-androgens on androgenic activity in European river sediment unveiled by effect-directed analysis." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **394**(5): 1385-1397.
- Zeilinger, J., T. Steger-Hartmann, E. Maser, S. Goller, R. Vonk and R. Länge (2009). "Effects of synthetic gestagens on fish reproduction." *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**(12): 2663-2670.

Supporting information

Multiple *in vitro* steroid-like and xenobiotic activities and chemical identification of active synthetic steroid compounds in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges

Nicolas Creusot^{1,2}, Tapie Nathalie², Jean-Marc Porcher¹, Hélène Budzinski² and Selim Aït-Aïssa^{1,*}

¹ *INERIS, Unité Écotoxicologie in vitro et in vivo, Parc ALATA, BP2, f-60550 Verneuil-en-Halatte, France*

² *EPOC/ LPTC – UMR 5805 CNRS Université Bordeaux 1, f-33405 Talence, France*

* Corresponding author: E-mail: selim.ait-aissa@ineris.fr, fax +33 344 556 767

I/ Experimental section

Sampling sites

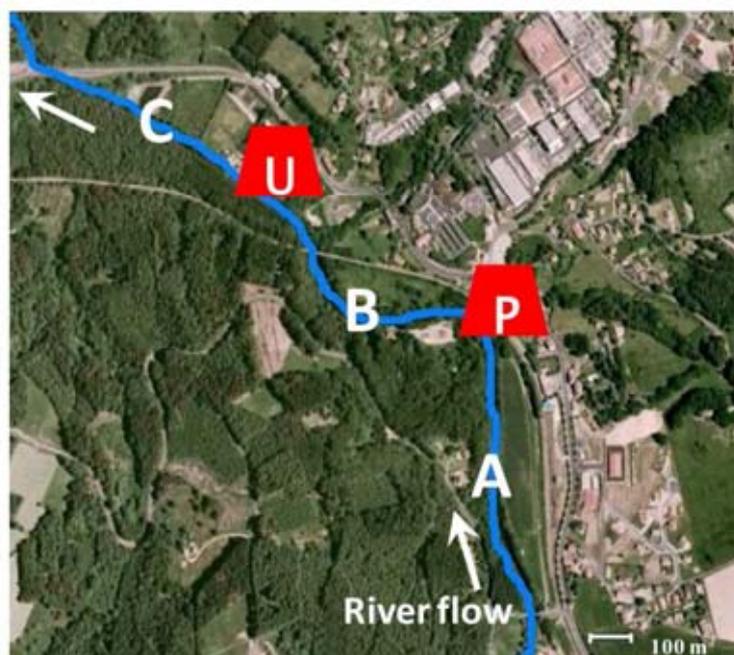


Figure S1. Map of the study site. The tree sampling sites were located upstream (site A), between (site B) and downstream (site C) from pharmaceutical industry (P) and urban (U) discharges, respectively. P: Pharmaceuticals STP; U: Urban STP. GPS coordinates of study sites were given by Sanchez et al. 2011.

In vitro bioassays

The different *in vitro* bioassays based on reporter gene activation mediated by nuclear receptors are listed in the **Table S1**. Description of cell lines, protocols for routine cell cultures and experimental conditions for environmental sample assessment has been reported in details previously (Creusot *et al.* 2010, Louiz *et al.* 2008, Molina Molina *et al.* 2006). Briefly, 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, cells were exposed to serial dilution of reference ligands or environmental extracts in triplicates and left to incubate for 16h.

At the end of exposure, the medium was removed and 50 μ l per well of medium containing 0.3 mM luciferin were added. Luminescence signal was monitored in living cells with a

microtiter plate luminometer (MicroBeta Wallac Luminometer). For antagonist activity measurement, cells were co-exposed with range concentration of environmental extracts and a concentration of reference compounds giving 80% of the maximal response. For MDA-kb2 assay, which expresses both GR and AR, the involvement of GR in the agonist response induced by samples was checked by co-exposure with RU-486, a GR antagonist (data not shown). In the PLHC-1 bioassay, cells were exposed during 4 h (PAH-like activity) and 24 h (dioxin-like activity) and were then processed for 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity assay in living cells.

Standard chemicals used as reference compounds for *in vitro* bioassays were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) for 17 β -Estradiol (E2), SR12813, spironolactone and dexamethasone, and from LGC-standard (Molhsheim, France) for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). R1881, aldosterone and R5020 were a kind gift from Dr Patrick Balaguer (INSERM, France).

TableS1. Receptor and reporter cell based assays used for the detection of EDCs in our study.

	Receptors	Cell lines (principle)	Reference ligands	Ref.
Hormonal activities	Estrogen (ER)	MELN (MCF-7, ERE-LUC)	E2	[1]
	Androgen (AR)	PALM (PC-3, hAR/MMTV-Luc)	R1881	[2]
	Glucocorticoid (GR)	MDA-kb2 (MDA-MD-453, MMTV-Luc)	Dexamethasone	[3]
	Mineralocorticoid (MR)	HG5LN-hMR (GAL4RE-Luc/GAL4-hMR)	Aldosterone	[4]
	Progesterone (PR)	HG5LN-hPR (GAL4RE-Luc/GAL4-hPR)	R5020	[4]
Xenobiotic activities	Dioxin (AhR)	PLHC-1 (EROD assay)	TCDD	[5]
	Pregnane (PXR)	HG5LN-hPXR (GAL4RE-Luc/GAL4-hPXR)	SR12813	[6]

[1] Balaguer *et al.* 2001; [2]Térouanne *et al.* 2000; [3] Wilson *et al.* 2002; [4] Molina-Molina *et al.* 2006; [5] Kinani *et al.* 2010; [6] Creusot *et al.*, 2010

Chemical analysis

Chemical screening was directed on natural and synthetic steroids (estrogens, androgens, progestogens and corticosteroids) and pharmaceutical compounds (antibiotics, non-steroidal anti-inflammatory drugs, anti-depressors). The complete list of analysed compounds and

dedicated analytical methods is provided in the Table S2. Analytical standards were purchased from either Sigma-Aldrich or LGC standard.

Table S2. List of compounds targeted by chemical analysis and analytical methods.

Compounds	Method
Thiolcolchicoside, dexamethasone, 6- α -methylprednisolone, hydrocortisone, prednisolone, cortisone, prednisone, 11-ketotestosterone, estriol, 11 α -hydroxy-progesterone, 17 α -OH-20 β -dihydroprogesterone, norethindrone, 17 α -OH-pregnenolone, testosterone, 4-androstene-3,17-dione, ethynylestradiol, oestrone, 17 α -estradiol, 17 β -estradiol, spironolactone, canrenone, 17 α -hydroxy-progesterone, levonorgestrel, dihydrotestosterone, DHEA, norgestimate, progesterone, pregnenolone, mestranol	UPLC/MS/MS Waters Acquity BEH C18 :10cm ; 2,1mm ; 1,7 μ m H ₂ O/ACN/0,1% formic acid ESI+
Abacavir, oxolinic acid, pipemidic acid, amoxicilline, ampicilline, atenolol, azithromycine, bacitracine, bisoprolol, cefotaxime, cefpodoxime, ceftiofur, chlortetracycline, ciprofloxacin, clarithromycine, clindamycine, cyclophosphamide, daunorubicine, docetaxel, doxorubicine, doxycycline, enrofloxacin, epirubicine, erythromycine, flumequine, gemcitabine, ifostamide, indinavir, josamycine, lamivudine, lincomycine, marbofloxacin, meonensine, methotrexate, metoprolol, metronidazole, nelfinavir, nevirapine, norfloxacin, ofloxacin, oxytetracycline, propanolol, rifampicine, ritonavir, roxithromycine, salinomycine, saquinavir, sildenafil, sotalol, spiramycine, stavudine, sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamethizole, sulfamethoxazole, sulfanilamide, sulfapyridine, sulfathiazole, tamoxifen, tetracycline, timolol, trimethoprim, tylosine, virginiamycine	RRLC-QQQ Agilent Zorbax SB C18 :5cm ; 2,1mm ; 1,8 μ m H ₂ O /ACN/0,3% formic acid ESI +
Alprazolam, amitriptiline, bromazepam, caffeine, carbamazepine, clenbuterol, diazepam, doxepine, fluoxetine, imipramine, nordiazepam, paracetamol, salbutamol, terbutaline, theophylline	RRLC-QQQ Agilent Zorbax SB C18 : 5cm ; 2,1mm ; 1,8 μ m H ₂ O /ACN/0,1% formic acid ESI +
Aspirine, diclofenac, gemfibrozil, ibuprofene, ketoprofene, naproxene	RRLC-QQQ Agilent Zorbax SB C18 : 5cm ; 2,1mm ; 1,8 μ m H ₂ O /ACN ESI -

Fractionation procedure

The fractionation step was performed using a RP-HPLC system (Prostar series, Varian[®]) equipped with a C18 column (Poursuit C18, 5 μ m, 250 x 4,6 I.D, Varian, Les Ullys, France). POCIS extract samples were separated at 25°C at a flow rate of 1 mL/min using the following

water:acetonitrile (v:v) gradient: 0-10 min (80:20), 60 min (55:45), 100-120 min (0:100), 120.01-125 min (80:20). This fractionation procedure has been calibrated using a mixture of 35 chemicals that represented a broad range of polarity ($0 < \log Kow < 7$) and included the most abundant compounds detected in POCIS extracts (**Table S3**).

Table S3. Calibration of RP-HPLC fractionation by using a mix of 35 chemicals.

Fraction number	Standard chemicals
F1	
F2	Stavudine, caffen, hydroxy-cortisone
F3	
F4	
F5	
F6	Bisphenol S
F7	Resveratrol
F8	Acetophenone
F9	Prednisolone, prednisone, cortisone, benzophenone 2
F10	
F11	Carbamazepin, 6-M-Prednisolone
F12	Dexamethasone
F13	
F14	Isoproturon, propylparaben
F15	
F16	Estradiol, bisphenol A, a-zearalanol
F17	Benzophenone 1, methyl-testosterone, DHEA
F18	Androstenedione, butylparaben
F19	Benzylparaben, spironolactone, canrenone, levonorgestrel
F20	
F21	DES
F22	
F23	
F24	Progesterone, benzophenone
F25	Triphenylphosphate, clotrimazole
F26	
F27	4-tert-octylphenol
F28	
F29	Fenofibrate
F30	Chrysen
F31	Cypermethryn, fenvalerate, o,p' DDT
F32	Benzo[k]fluoranthen, dibenzo[a,h]anthracen
F33	PCB126
F34	TCDD

Bioassays data modeling and Mass balance calculation

The sigmoid dose-response curves of standard and environmental extracts were modelled by using the Regtox 7.5 Microsoft Excel™ macro (available at http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html), based the Hill equation model (Vindimian et al., 1983). This allowed calculating efficient concentrations, i.e. EC₂₀,

corresponding to concentrations of chemical and samples that induced 20% of maximal luciferase or EROD activity. Calculation of the Chemical (Chem-TEQ) and Biological Toxic Equivalent activities (Bio-TEQ) in environmental samples were then done as described previously (Kinani et al, 2010, Creusot et al., 2010). Briefly, Chem-TEQ was determined according to the following equation: $TEQ = \sum (C_i \times REP_i)$, where, for a given chemical i , C_i is the measured concentration in a sample and REP_i is the inducing equivalent factor relative to the reference ligand ($REP_i = EC_{20}$ of reference compound / EC_{20} of test compound, on mass basis) and expressed as Toxic-equivalent quantities (TEQ). The Bio-TEQ was calculated as the ratio of EC_{20} of reference compound (expressed as g/L) to that of the sample expressed as g-EQ oasis HLB phase/L or L-EQ water/L. According to Khim et al., 1999, for sample that yielded incomplete dose response curves, we fixed the minimal and maximal activity and the slope as identical to that of reference compound for experimental data modelling.

II/ Results and discussion

Biological activities in sediments

The **Table S4** presents Bio-TEQ loads in sediment extracts derived from bioassays. Among all tested activities, none was detected in procedural blanks (data not shown).

Table S4. Bioassay-derived toxic equivalents in sediments extracts at the three sites. Results are expressed in ng or µg of reference compounds per gram of dry weigh sediment.

Sites	Estrogenic E2-EQ (ng/g)	Anti-androgenic Flu-EQ (µg/g)	Androgenic DHT-EQ (ng/g)	Dioxin like TCDD-EQ (ng/g)	HAP-like BaP-EQ (µg/g)	PXR-like SR12813 (µg/g)	% TOC ^b
Blanks	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	-
A	0.0508 (0.043- 0.054) ^a	n.d	n.d	0.996 (0.993- 0.996)	3.495 (3.486- 3.500)	n.d	0.423
B	0.0527 (0.045- 0.060)	n.d	n.d	1.293 (1.290- 1.296)	4.450 (4.442- 4.461)	n.d	0.495
C	0.1219 (0.102- 0.133)	n.d	n.d	2.688 (2.557- 2.726)	4.303 (4.191- 4.554)	n.d	0.825
LOD	0.017	0.39	0.50	8.4	1.5	0.19	

a: In brackets : confidential intervals (p<0.05); b: Total Organic Carbon.

Biological activities in POCIS extracts

Representative dose-response curves for all POCIS extracts in each bioassay are presented in the **Figures S2 to S4**. Among all tested activities, none was detected in procedural blanks (data not shown).

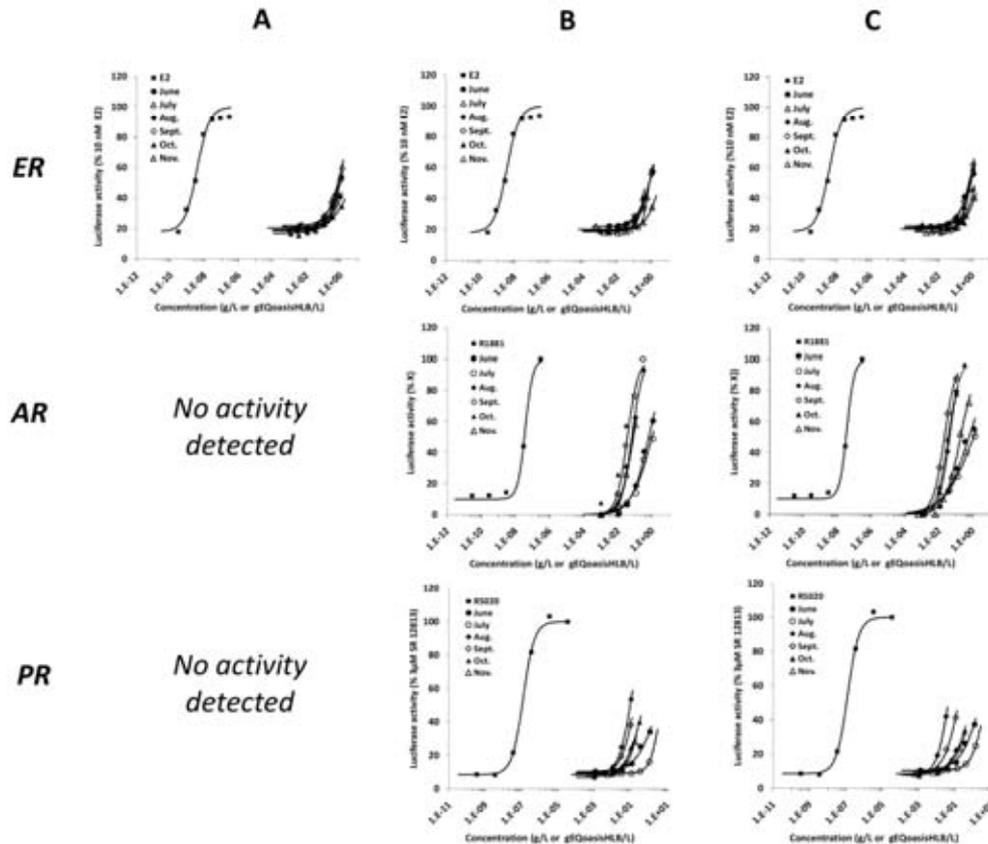


Figure S2. Estrogenic (ER), androgenic (AR) and progestogenic (PR) activities in POCIS from sites A, B and C. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induced by 10 µM of E2 (ER), 10 µM R1881 (AR), 0.1 µM of R5020 (PR).

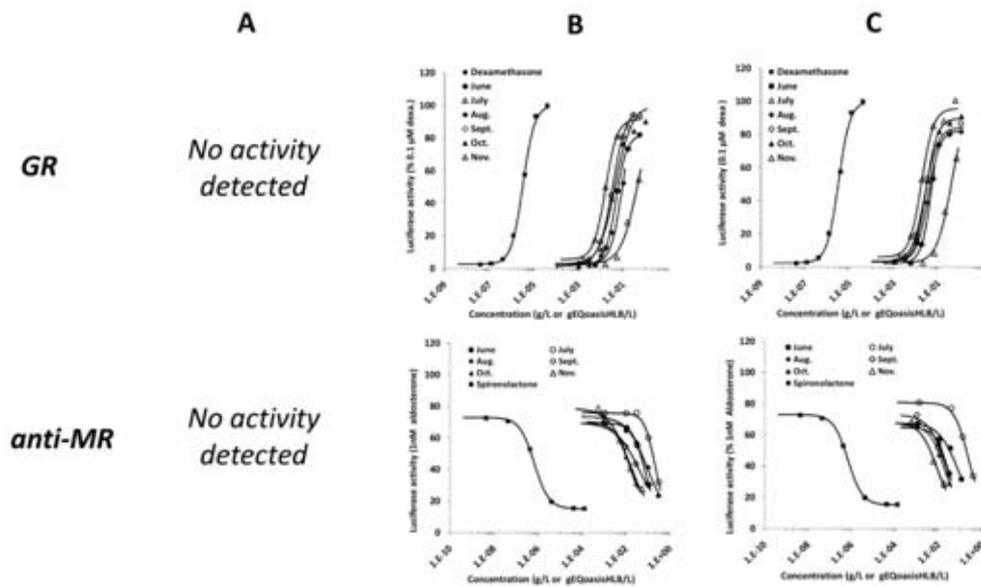


Figure S3. Glucocorticoidic (GR) and anti-mineralocorticoidic (anti-MR) activities in POCIS from sites A, B and C. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induced by 0.1 μM of dexamethasone (GR) and 0.1 μM of spironolactone (anti-MR).

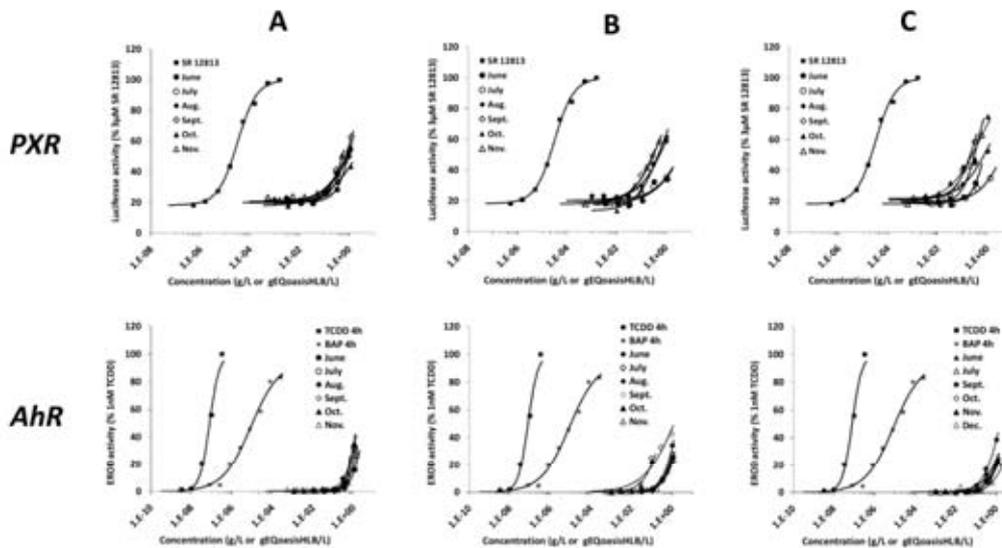


Figure S4. PXR-like (PXR) and PAHs-like (AhR) activities in POCIS from sites A, B and C. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induced by 3 μM of SR 12813 (PXR) and 1 nM of TCDD (AhR).

Chemical analyses in POCIS, REP determination and mass balance calculation

Chemical analysis showed the occurrence of multiple chemical classes in POCIS extracts (Table S5).

Table S5. Concentration of chemicals detected at the site B over the 6 month-sampling period.

	LOD	June	July	Aug.	Sept.	Oct.	Nov.
Dexamethasone	4.4	34718.9	8478.3	2356.8	23370.4	40.1	88578.0
6-a-méthylprednisolone	4.4	17686.3	1422.0	14640.8	12298.8	37719.6	30352.8
Hydrocortisone	10.0	9203.2	1044.6	1446.4	3740.4	982.3	1660.3
Prednisolone	13.4	7670.7	80.1	4650.6	6043.8	1499.2	4499.6
Cortisone	3.4	2300.5	251.8	551.9	1320.1	536.5	389.2
Prednisone	30.8	1633.5	0.0	0.0	3604.7	2351.2	1123.6
(DHP)	2.2	39.8	37.3	46.5	69.3	0.1	132.7
Testosterone (T)	1.4	14.3	0.0	13.8	43.7	126.3	12.6
Androstenedione	2.8	131.9	76.2	69.4	107.5	402.5	166.0
17 β oestradiol	23.4	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
Spironolactone	3.5	14680.8	837.9	2152.2	401.7	5635.4	1737.4
Canrenone	2.9	1432.4	225.8	6644.9	3089.2	7336.4	4394.7
Levonorgestrel	4.7	0.0	0.0	986.8	134.1	0.0	57.1
DHEA	70.3	0.0	0.0	0.0	0.0	497.9	335.7
Progesterone	1.4	6.2	3.5	2.4	5.7	4.1	5.8
Pregnenolone	268.5	0.0	0.0	0.0	0.0	305.4	0.0
Alprazolam		0.0	0.0	0.0	2.6	0.0	4.1
Amitriptiline		0.0	0.0	7.9	7.7	7.9	11.1
Aspirine		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Bromazepam		0.0	167.5	15.0	6.8	8.4	90.2
Cafeine		451.5	335.3	210.5	435.2	462.5	762.8
Carbamazépine		64.2	452.0	271.9	145.8	265.9	208.5
Clenbuterol		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Diazepam		3.1	8.8	14.6	6.6	10.4	14.2
Diclofenac		204.8	97.5	149.0	109.8	162.1	174.7
Doxepine		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Fluoxetine		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.4
Gemfibrozil		17.3	14.7	11.6	12.2	16.8	21.1
Ibuprofene		165.7	60.3	20.5	68.5	77.6	159.9
Imipramine		0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0
Ketoprofene		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	132.3
Naproxene		93.8	78.5	64.2	47.9	70.3	131.2
Nordiazepam		24.0	16.4	29.2	16.9	15.5	19.5
Paracetamol		57.0	29.6	37.6	38.4	100.7	189.2
Salbutamol		0.0	0.7	0.0	0.6	0.0	0.9
Terbutaline		2.7	6.4	4.6	2.5	4.7	6.1
Theophylline		125.2	227.3	69.0	54.0	114.6	289.6
Metronidazole		0.0	39.8	0.0	18.8	76.1	0.0
Sotalol		216.5	167.0	224.6	193.8	272.2	288.0
Atenolol		51.2	31.8	32.8	40.8	48.0	86.8
Sulfapyridine		10.3	10.3	9.1	17.7	22.7	32.3
Lincomycine		2.7	2.5	1.7	0.0	3.9	0.6
Pipemidic acid		14.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

Sulfamethazine	0.0	4.0	0.0	1.9	1.6	9.0
Norofloxacin	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	241.6
Timolol	2.7	0.0	2.1	1.7	3.3	2.9
Metoprolol	21.9	14.9	15.3	6.3	11.9	16.6
Sulfaméthoxazole	24.2	54.6	23.8	36.7	47.9	53.3
Nevirapine	47.1	0.0	0.0	133.8	119.7	62.5
Clindamycine	2.4	2.6	2.3	2.2	1.2	2.1
Spiramycine	8.3	3.0	0.0	0.0	0.0	23.4
Azithromycine	1.3	0.0	0.0	170.2	371.2	569.2
Bisoprolol	32.3	23.6	21.1	19.7	20.1	29.9
Sulfadiméthoxine	12.2	9.8	3.3	2.6	0.8	1.5
Ceftiofur	0.0	24.1	0.0	0.0	0.0	0.0
Propranolol	83.6	42.5	61.0	42.1	48.3	70.8
Indinavir	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	15.6
Virginiamycine	165.0	101.6	104.9	323.8	0.0	132.3
Clarithromycine	21.4	21.9	14.5	27.4	77.8	60.4
Roxithromycine	773.5	601.9	712.4	1902.4	122517.2	28379.8
Josamycine	6.4	0.0	0.0	0.0	3.0	5.4

Results are expressed as ng of chemicals per g of sorbent.

All the chemicals detected in POCIS extracts were then screened for their biological activity in each of the *in vitro* bioassays. Dose-response curves for the individual active chemicals are provided in **Figure S5**. These curves allowed to determine their effect potencies relative to the reference compounds (REP, see **Table 1** in Main manuscript) and to derive Chem-TEQs in POCIS extracts, as described in Experimental section. Chem-TEQ were then compared to Bio-TEQ in order to assess the individual and global contribution of the detected chemicals to the biological activities detected in POCIS extracts at the site B (**Table S6-S9**).

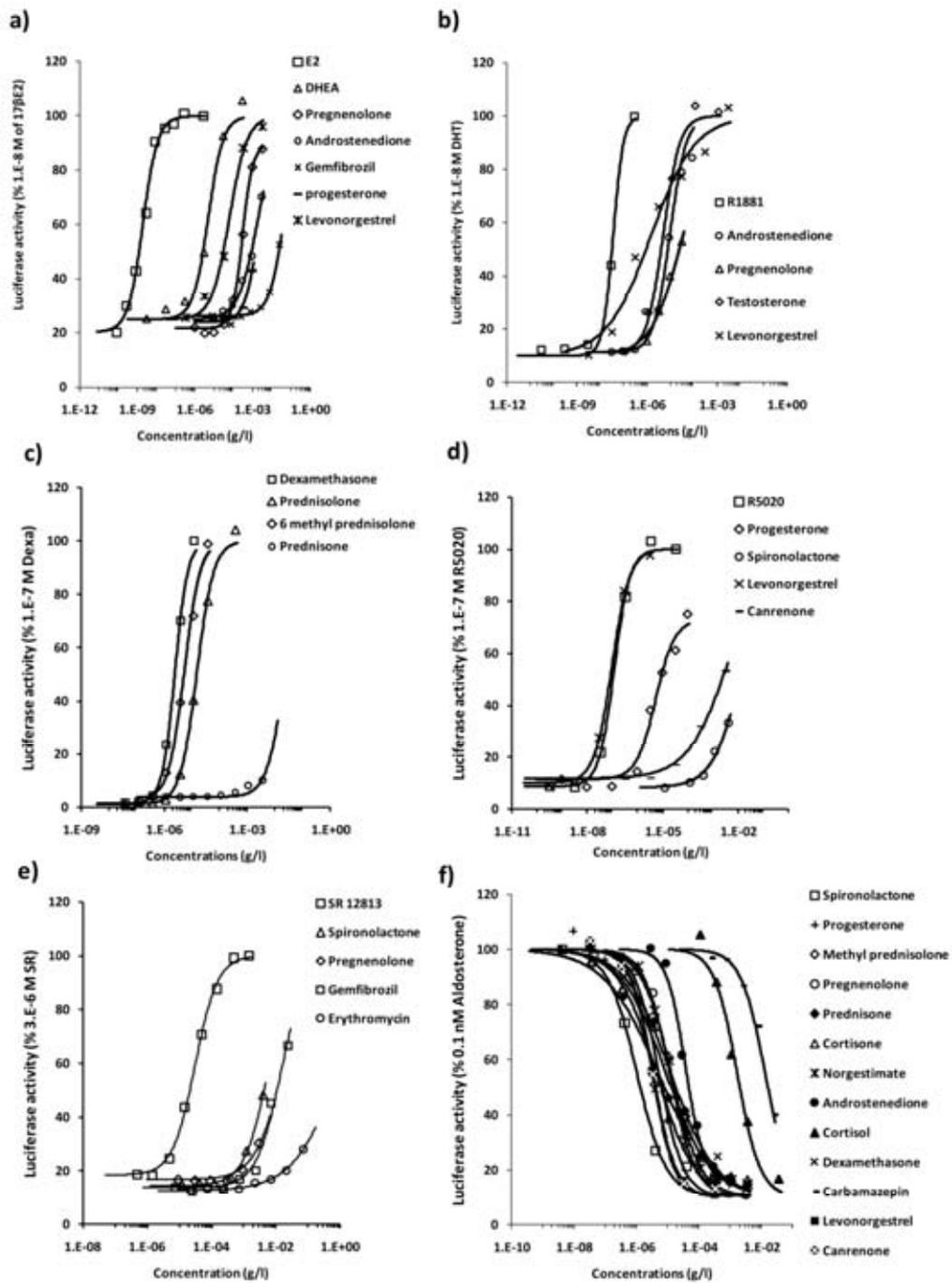


Figure S5. Dose-response curves of the active chemicals detected in POCIS extracts in each bioassays: (a) ER activity in MELN, (b) AR activity in MDA-kb2, (c) GR activity in MDA-kb2, (d) PR activity in HG5LN-PRB, (e) PXR activation in HG5LN-hPXR, (f) anti-MR activity in HG5LN-MR. Results are expressed as percentage of maximal luciferase activity induced by reference compounds.

Table S6. Contribution of detected target chemicals on glucocorticoidic activity in MDA-kb2 cells (POCIS extract from site B).

Sampling date		Conc (ng/g)	Dex-EF	Chem TEQ (ng/g)	% Chem/Bio
June	Dexamethasone	34719	1	34718.9	57%
	6-alpha-methylprednisolone	17686	0.6	10611.8	17%
	Prednisolone	7671	0.2	1534.1	2%
	Prednisone	1634	0.00016	0.3	0%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			46865.1	76%
	Bio-TEQ (ng/g)		61436.1		
July	Dexamethasone	8478.3	1	8478.3	76%
	6-alpha- methylprednisolone	1422.0	0.6	853.2	8%
	Prednisolone	80.1	0.2	16.0	0%
	Prednisone	n.d	0.00016	n.a	n.a
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			9347.5	84%
	Bio-TEQ (ng/g)		11136.7		
August	Dexamethasone	2356.8	1	2356.8	5%
	6-alpha- methylprednisolone	14640.8	0.6	8784.5	19%
	Prednisolone	4650.6	0.2	930.1	2%
	Prednisone	n.d	0.00016	n.a	n.a
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			12071.4	27%
	Bio-TEQ (ng/g)		45336.0		
September	Dexamethasone	23370.4	1	23370.4	24%
	6-alpha- methylprednisolone	12298.8	0.6	7379.3	8%
	Prednisolone	6043.8	0.2	1208.8	1%
	Prednisone	3604.7	0.00016	0.6	0%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			31959.0	33%
	Bio-TEQ (ng/g)		96284.0		
October	Dexamethasone	40.1	1	40.1	0%
	6-alpha- methylprednisolone	37719.6	0.6	22631.8	25%
	Prednisolone	1499.2	0.2	299.8	0%
	Prednisone	2351.2	0.00016	0.4	0%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			22972.1	25%
	Bio-TEQ (ng/g)		91484.4		
November	Dexamethasone	88578.0	1	88578.0	49%
	6-alpha- methylprednisolone	30352.8	0.6	18211.7	10%
	Prednisolone	4499.6	0.2	899.9	0%
	Prednisone	1123.6	0.00016	0.2	0%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			107689.8	60%
	Bio-TEQ (ng/g)		180280.9		

Table S7. Contribution of detected target chemicals on anti-mineralocorticoid activity in HG5LN-hMR cells (in POCIS extract from site B).

Sampling date		Conc (ng/g)	Spiro-EF	Chem TEQ (ng/g)	% chem/Bio
June	Dexamethasone	34718.9	0.27	9374.1	65%
	6-alpha- methylprednisolone	17686.3	0.45	7958.8	55%
	Hydrocortisone	9203.2	0.0003	2.6	0%
	Prednisolone	7670.7	0.16	1227.3	9%
	Cortisone	2300.5	0.12	276.1	2%
	Prednisone	1633.5	0.16	261.4	2%
	Androstenedione	131.9	0.01	1.3	0%
	Spirolactone	14680.8	1	14680.8	102%
	Canrenone	1432.4	0.3	429.7	3%
	Levonorgestrel	n.d	0.17	n.a	n.a
	Progesterone	6.2	0.1	0.6	0%
	Pregnenolone	n.d	0.05	n.a	n.a
	Carbamazepine	64.2	0.00004	0.0	0%
		Σ Chem-TEQ (ng/g)			34212.7
	Bio-TEQ (ng/g)			14428.8	
July	Dexamethasone	8478.3	0.27	2289.1	46%
	6-alpha- methylprednisolone	1422.0	0.45	639.9	13%
	Hydrocortisone	1044.6	0.0003	0.3	0%
	Prednisolone	80.1	0.16	12.8	0%
	Cortisone	251.8	0.12	30.2	1%
	Prednisone	0.0	0.16	0.0	0%
	Androstenedione	76.2	0.01	0.8	0%
	Spirolactone	837.9	1	837.9	17%
	Canrenone	225.8	0.3	67.7	1%
	Levonorgestrel	n.d	0.17	n.a	n.a
	Progesterone	3.5	0.1	0.4	0%
	Pregnenolone	n.d	0.05	n.a	n.a
	Carbamazepine	452.0	0.00004	0.0	0%
		Σ Chem-TEQ (ng/g)			3879.1
	Bio-TEQ (ng/g)			4960.7	
August	Dexamethasone	2356.8	0.27	636.3	5%
	6-alpha- methylprednisolone	14640.8	0.45	6588.3	57%
	Hydrocortisone	1446.4	0.0003	0.4	0%
	Prednisolone	4650.6	0.16	744.1	6%
	Cortisone	551.9	0.12	66.2	1%
	Prednisone	n.d	0.16	n.a	n.a
	Androstenedione	69.4	0.01	0.7	0%
	Spirolactone	2152.2	1	2152.2	18%
	Canrenone	6644.9	0.3	1993.5	17%
	Levonorgestrel	986.8	0.17	167.8	1%
	Progesterone	2.4	0.1	0.2	0%
	Pregnenolone	n.d	0.05	n.a	n.a
	Carbamazepine	271.9	0.00004	0.0	0%
		Σ Chem-TEQ (ng/g)			12349.7
	Bio-TEQ (ng/g)			11657.8	
September	Dexamethasone	23370.4	0.27	6310.0	22%
	6-alpha- methylprednisolone	12298.8	0.45	5534.5	19%
	Hydrocortisone	3740.4	0.0003	1.1	0%
	Prednisolone	6043.8	0.16	967.0	3%
	Cortisone	1320.1	0.12	158.4	1%

	Prednisone	3604.7	0.16	576.8	2%
	Androstenedione	107.5	0.01	1.1	0%
	Spirolactone	401.7	1	401.7	1%
	Canrenone	3089.2	0.3	926.7	3%
	Levonorgestrel	134.1	0.17	22.8	0%
	Progesterone	5.7	0.1	0.6	0%
	Pregnenolone	n.d	0.05	n.a	n.a
	Carbamazepine	145.8	0.00004	0.0	0%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			14900.6	51%
	Bio-TEQ (ng/g)			29072.6	
October	Dexamethasone	40.1	0.27	10.8	0%
	6-alpha- methylprednisolone	37719.6	0.45	16973.8	27%
	Hydrocortisone	982.3	0.0003	0.3	0%
	Prednisolone	1499.2	0.16	239.9	0%
	Cortisone	536.5	0.12	64.4	0%
	Prednisone	2351.2	0.16	376.2	1%
	Androstenedione	402.5	0.01	4.0	0%
	Spirolactone	5635.4	1	5635.4	9%
	Canrenone	7336.4	0.3	2200.9	4%
	Levonorgestrel	0.02	0.17	0.004	0%
	Progesterone	4.1	0.1	0.4	0%
	Pregnenolone	305.4	0.05	14.6	0%
	Carbamazepine	265.9	0.00004	0.0	0%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			25520.8	41%
	Bio-TEQ (ng/g)			62377.9	
November	Dexamethasone	88578.0	0.27	23916.1	33%
	6-alpha- methylprednisolone	30352.8	0.45	13658.8	19%
	Hydrocortisone	1660.3	0.0003	0.5	0%
	Prednisolone	4499.6	0.16	719.9	1%
	Cortisone	389.2	0.12	46.7	0%
	Prednisone	1123.6	0.16	179.8	0%
	Androstenedione	166.0	0.01	1.7	0%
	Spirolactone	1737.4	1	1737.4	2%
	Canrenone	4394.7	0.3	1318.4	2%
	Levonorgestrel	57.1	0.17	9.7	0%
	Progesterone	5.8	0.1	0.6	0%
	Pregnenolone	n.d	0.05	n.a	n.a
	Carbamazepine	208.5	0.00004	0.0	0%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			41589.5	58%
	Bio-TEQ (ng/g)			72158.9	

Table S8. Contribution of detected target chemicals on estrogenic activity in MELN cells (in POCIS extract from site B).

Sampling date		Conc (ng/g)	E2-EF	Chem TEQ (ng/g)	% chem/Bio
June	Androstenedione	132	9.7E-07	1.3E-04	0.004%
	Levonorgestrel	n.d	3.1E-05	n.a	n.a
	DHEA	n.d	3.0E-04	n.a	n.a
	Progesterone	6	7.5E-07	4.6E-06	0.0002%
	Pregnenolone	n.d	1.1E-05	n.a	n.a
	Gemfibrozil	17.3	4.7E-08	8.1E-07	0.0000%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			1.3E-04	0.005%
	Bio-TEQ (ng/g)		2.9		
July	Androstenedione	76	9.7E-07	7.4E-05	0.007%
	Levonorgestrel	n.d	3.1E-05	n.a	n.a
	DHEA	n.d	3.0E-04	n.a	n.a
	Progesterone	4	7.5E-07	2.6E-06	0.0003%
	Pregnenolone	n.d	1.1E-05	n.a	n.a
	Gemfibrozil	14.7	4.7E-08	6.9E-07	0.0001%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			7.7E-05	0.008%
	Bio-TEQ (ng/g)		1.0		
August	Androstenedione	69	9.7E-07	6.7E-05	0.003%
	Levonorgestrel	987	3.1E-05	3.1E-02	1.290%
	DHEA	n.d	3.0E-04	n.a	n.a
	Progesterone	2	7.5E-07	1.8E-06	0.0001%
	Pregnenolone	n.d	1.1E-05	n.a	n.a
	Gemfibrozil	11.6	4.7E-08	5.4E-07	0.00002%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			3.1E-02	1.3%
	Bio-TEQ (ng/g)		2.4		
September	Androstenedione	108	9.7E-07	1.0E-04	0.004%
	Levonorgestrel	134	3.1E-05	4.2E-03	0.178%
	DHEA	n.d	3.0E-04	n.a	n.a
	Progesterone	6	7.5E-07	4.3E-06	0.0002%
	Pregnenolone	n.d	1.1E-05	n.a	n.a
	Gemfibrozil	12.2	4.7E-08	5.7E-07	0.00002%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			4.2E-03	0.2%
	Bio-TEQ (ng/g)		2.3		
October	Androstenedione	403	9.7E-07	3.9E-04	0.012%
	Levonorgestrel	0.02	3.1E-05	7.5E-07	0%
	DHEA	498	3.0E-04	1.5E-01	4.675%
	Progesterone	4	7.5E-07	3.1E-06	0.0001%
	Pregnenolone	305	1.1E-05	3.4E-03	0.107%
	Gemfibrozil	16.8	4.7E-08	7.9E-07	0.00003%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			1.5E-01	4.8%
	Bio-TEQ (ng/g)		3.2		
November	Androstenedione	166	9.7E-07	1.6E-04	0.009%
	Levonorgestrel	57	3.1E-05	1.8E-03	0.101%
	DHEA	336	3.0E-04	9.9E-02	5.667%
	Progesterone	6	7.5E-07	4.4E-06	0.0002%
	Pregnenolone	n.d	1.1E-05	n.a	n.a
	Gemfibrozil	21.1	4.7E-08	9.9E-07	0.0001%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			1.0E-01	5.8%
	Bio-TEQ (ng/g)		1.8		

Table S9. Contribution of detected target chemicals on androgenic activity in PALM cells (in POCIS extract from site B).

Sampling date		Conc (ng/g)	R1881-EF	Chem TEQ (ng/g)	% chem/Bio
June	Testosterone	14	0.03	0.4	0.8%
	Androstenedione	132	0.01	1.7	3.7%
	Canrenone	1432		0.0	0.0%
	Levonorgestrel	n.d	0.12	n.a	n.a %
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			2.1	4.6%
	Bio-TEQ (ng/g)			46.8	
July	Testosterone	0	0.03	0.0	0.0%
	Androstenedione	76	0.01	1.0	2.1%
	Canrenone	226		0.0	0.0%
	Levonorgestrel	n.d	0.12	n.a	n.a
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			1.0	2.1%
	Bio-TEQ (ng/g)			48.3	
August	Testosterone	14	0.03	0.4	0.2%
	Androstenedione	69	0.01	0.9	0.5%
	Canrenone	6645		0.0	0.0%
	Levonorgestrel	987	0.12	114.9	66.9%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			116.2	67.6%
	Bio-TEQ (ng/g)			171.8	
September	Testosterone	44	0.03	1.2	0.4%
	Androstenedione	108	0.01	1.4	0.5%
	Canrenone	3089		0.0	0.0%
	Levonorgestrel	134	0.12	15.6	5.0%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			18.2	5.9%
	Bio-TEQ (ng/g)			311.3	
October	Testosterone	126	0.03	3.5	1.1%
	Androstenedione	403	0.01	5.3	1.7%
	Canrenone	7336		0.0	0.0%
	Levonorgestrel	0.02	0.12	0.0	0.001%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			8.8	2.8%
	Bio-TEQ (ng/g)			318.4	
November	Testosterone	13	0.03	0.3	0.2%
	Androstenedione	166	0.01	2.2	1.2%
	Canrenone	4395		0.0	0.0%
	Levonorgestrel	57	0.12	6.6	3.7%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			9.2	5.2%
	Bio-TEQ (ng/g)			178.1	

Table S10. Contribution of detected target chemicals on progestogenic activity in HG5LN-PRB cells (in POCIS extract from site B).

Sampling date		Conc (ng/g)	R5020-EF	Chem TEQ (ng/g)	% chem/Bio
June	Spirolactone	14681	1.9E-05	0.28	0.7%
	Canrenone	1432	6.8E-05	0.10	0.2%
	Levonorgestrel	n.d	9.0E-01	n.a	n.a
	Progesterone	6	2.9E-02	0.18	0.5%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			0.56	1.4%
	Bio-TEQ (ng/g)			39.47	
July	Spirolactone	838	1.9E-05	0.02	0.05%
	Canrenone	226	6.8E-05	0.02	0.05%
	Levonorgestrel	n.d	9.0E-01	n.a	n.a
	Progesterone	4	2.9E-02	0.10	0.3%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			0.13	0.4%
	Bio-TEQ (ng/g)			32.50	
August	Spirolactone	2152	1.9E-05	0.04	0.00%
	Canrenone	6645	6.8E-05	0.45	0.03%
	Levonorgestrel	987	9.0E-01	888.15	57.1%
	Progesterone	2	2.9E-02	0.07	0.004%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			888.71	57.1%
	Bio-TEQ (ng/g)			1555.97	
September	Spirolactone	402	1.9E-05	0.01	0.001%
	Canrenone	3089	6.8E-05	0.21	0.02%
	Levonorgestrel	134	9.0E-01	120.66	13.5%
	Progesterone	6	2.9E-02	0.16	0.02%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			121.04	13.6%
	Bio-TEQ (ng/g)			892.79	
October	Spirolactone	5635	1.9E-05	0.11	0.03%
	Canrenone	7336	6.8E-05	0.50	0.13%
	Levonorgestrel	0.02	9.0E-01	0.02	0.01%
	Progesterone	4	2.9E-02	0.12	0.03%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			0.75	0.2%
	Bio-TEQ (ng/g)			381.46	
November	Spirolactone	1737	1.9E-05	0.03	0.01%
	Canrenone	4395	6.8E-05	0.30	0.09%
	Levonorgestrel	57	9.0E-01	51.40	14.8%
	Progesterone	6	2.9E-02	0.17	0.05%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			51.90	15.0%
	Bio-TEQ (ng/g)			346.3	

Table S11. Contribution of detected target chemicals on PXR-like activity in HG5LN-hPXR cells (in POCIS extract from site B).

Sampling date		Conc (ng/g)	SR12913-EF	Chem TEQ (ng/g)	% chem/Bio
June	Spironolactone	14681	0.006	83.68	0.41%
	Pregnenolone	n.d	0.002	0.0	0%
	Gemfibrozil	17.3	0.003	0.04	0.0002%
	Carbamazepine	64.2	0.001	0.04	0.0002%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			83.76	0.41%
	Bio-TEQ (ng/g)			20639.00	
July	Spironolactone	838	0.006	4.78	0.05%
	Pregnenolone	n.d	0.002	0.00	0%
	Gemfibrozil	14.7	0.003	0.04	0.0004%
	Carbamazepine	452.0	0.001	0.27	0.003%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			5.08	0.06%
	Bio-TEQ (ng/g)			8770.98	
August	Spironolactone	2152	0.006	12.27	0.02%
	Pregnenolone	n.d	0.002	0.00	0%
	Gemfibrozil	11.6	0.003	0.03	0.0001%
	Carbamazepine	271.9	0.001	0.16	0.0003%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			12.5	0.02%
	Bio-TEQ (ng/g)			53567.8	
September	Spironolactone	402	0.006	2.29	0.003%
	Pregnenolone	n.d	0.002	0.00	0%
	Gemfibrozil	12.2	0.003	0.03	0.00004%
	Carbamazepine	145.8	0.001	0.09	0.0001%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			2.4	0.003%
	Bio-TEQ (ng/g)			76037.6	
October	Spironolactone	5635	0.006	32.12	0.06%
	Pregnenolone	305	0.002	0.73	0.001%
	Gemfibrozil	16.8	0.003	0.04	0.0001%
	Carbamazepine	265.9	0.001	0.16	0.0003%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			33.1	0.06%
	Bio-TEQ (ng/g)			57638.0	
November	Spironolactone	1737	0.006	9.90	0.01%
	Pregnenolone	n.d	0.002	0.00	0%
	Gemfibrozil	21.1	0.003	0.05	0.0001%
	Carbamazepine	208.5	0.001	0.13	0.0001%
	Σ Chem-TEQ (ng/g)			10.1	0.01%
	Bio-TEQ (ng/g)			99553.3	

References

- Balaguer, P., A. M. Boussioux, E. Demirpence and J. C. Nicolas (2001). "Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands." *Luminescence* **16**, : 153-158.
- Creusot, N., S. Kinani, P. Balaguer, N. Tapie, K. LeMenach, E. Maillot-Marechal, J. M. Porcher, H. Budzinski and S. Ait-Aissa (2010). "Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396**(2): 569-583.
- Kinani, S., S. Bouchonnet, N. Creusot, S. Bourcier, P. Balaguer, J. M. Porcher and S. Ait-Aissa (2010). "Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers." *Environmental Pollution* **158**(1): 74-83.
- Louiz, I., S. Kinani, M. E. Gouze, M. Ben-Attia, D. Menif, S. Bouchonnet, J. M. Porcher, O. K. Ben-Hassine and S. Ait-Aissa (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)." *Science of the Total Environment* **402**(2-3): 318-329.
- Molina-Molina, J. M., A. Hillenweck, I. Jouanin, D. Zalko, J. P. Cravedi, M. F. Fernandez, A. Pillon, J. C. Nicolas, N. Olea and P. Balaguer (2006). "Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites." *Toxicology and Applied Pharmacology* **216**(1): 44-54.
- Térouanne, B., B. Tahiri, V. Georget, C. Belon, N. Poujol, C. Avances, F. Orio Jr, P. Balaguer and C. Sultan (2000). "A stable prostatic bioluminescent cell line to investigate androgen and antiandrogen effects." *Molecular and Cellular Endocrinology* **160**(1-2): 39-49.
- Wilson, V. S., K. Bobseine, C. R. Lambright and L. E. Gray (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." *Toxicological Sciences* **66**(1): 69-81.

Synthèse de l'article 8

L'approche bio-analytique mise en œuvre a permis de mettre en évidence la présence de composés à l'origine d'un profil mixte de type xénobiotique et stéroïdiens (PXR/GR/anti-MR > PR > AR >> ER) dans la colonne d'eau. Certaines activités (GR, PR, anti-MR) n'étant détectées qu'en aval de l'usine pharmaceutique, ces résultats confirment en partie que les rejets de cette usine sont responsables de ces activités. À ce titre nos bioessais se sont révélés à nouveau être de bon traceurs de la contamination.

Ensuite, contrairement au Réveillon, la mise en œuvre d'une MBA s'est révélée particulièrement utile pour identifier certains des composés contribuant aux activités mesurées : dexaméthasone, spironolactone et 6 α -méthylprednisolone pour les activités corticostéroïdiennes, et la lévonorgestrel pour les activités AR et PR. En revanche, les autres activités (PXR et ER) restaient très faiblement expliquées par les composés ciblés (<1%).

Enfin, la mise en œuvre de l'hyperfractionnement sur un extrait de POCIS a permis d'isoler partiellement les activités. Pour le moment aucune analyse chimique n'a été réalisée sur ces fractions. Néanmoins sur la base de la calibration de cet hyperfractionnement (**Article 6**), les résultats semblent confirmer l'implication de certains des composés détectés dans l'extrait brut. Par ailleurs les profils d'activité au sein des fractions tendent à montrer que vraisemblablement une majeure partie des activités anti-MR et GR sont dû aux mêmes composés.

Toutefois, un important travail d'analyse sera prochainement entrepris sur l'ensemble des fractions actives pour confirmer la présence supposée de certains composés très actifs mais également identifier les composés inconnus pour lesquelles aucune correspondance n'a été observée avec les standards utilisés pour la calibration. Une fois ces composés identifiés, il conviendra de confirmer leur activité sur nos modèles *in vitro*.

De manière plus générale, même si un lien de causalité n'a pas pu être établi pour le moment, la présence de fortes altérations de la reproduction non associées à des ligands du ER mais plutôt à d'autres familles de stéroïdes (androgènes, progestagènes, corticostéroïdes) amène à s'interroger sur (1) l'occurrence environnementale de telles substances (corticostéroïdes, progestagènes, ligand du PXR) dans d'autres systèmes aquatiques, (2) l'effet de tels composés chez les poissons.

Discussion générale

Les systèmes aquatiques sont aujourd'hui contaminés par une diversité de polluants organiques qui peuvent altérer la structure et le fonctionnement des écosystèmes. Traditionnellement, le suivi de la qualité chimique des eaux est réalisé au travers d'analyses chimiques ciblées sur des composés définis comme prioritaires selon des critères écotoxicologiques qui définissent des valeurs de références individuelles à ne pas dépasser. Dans ces circonstances, un très faible nombre de composés sont considérés comme dangereux et/ou à risque et sont finalement intégrés aux programmes de surveillance. Cependant, les impacts écotoxicologiques rapportés dans l'environnement, notamment ceux des PE sont le fruit de mélanges complexes de polluants connus et inconnus, présents parfois à de très faibles concentrations. Ainsi les analyses chimiques ciblées ne donnent qu'une image partielle de la contamination et ne permettent généralement pas de rendre compte des effets écotoxiques observés *in situ* (Hollert *et al.* 2005). Dans ces circonstances, il semble nécessaire d'explorer et d'appliquer de nouvelles stratégies combinant les réponses biologiques aux analyses chimiques de manière à (1) caractériser et tracer la pollution (i.e. source et devenir), (2) identifier les composés potentiellement responsables d'effets biologiques néfastes et leur mécanisme d'action, (3) évaluer le risque éco-toxicologique des composés identifiés pour les organismes exposés.

Dans le cadre de ce travail, nous avons proposé la mise en œuvre et l'évaluation d'une approche EDA pour la caractérisation de la contamination des milieux aquatiques par des perturbateurs endocriniens et leur identification.

Contamination des rivières française par les PE

Si les analyses chimiques ciblées ne permettent pas à elles seules de rendre compte de la qualité chimique des systèmes aquatiques, les méthodes de bio-détection *in vitro* constituent aujourd'hui un outil de diagnostic environnemental efficace à travers la détection spécifique, sensible, rapide et intégrative de contaminants actifs - connus et inconnus - au sein de matrices complexes (Eggen et Segner 2003). L'utilisation de tels outils est ainsi fréquemment rapportée pour la caractérisation toxicologique d'extraits environnementaux (Louiz *et al.* 2008, Hollert *et al.* 2002) et la surveillance intégrée de la qualité chimique des eaux (i.e. indicateur précoce de risques potentiels) (Houtman 2007).

Actuellement, au regard d'autres pays industrialisés, il existe très peu de données concernant la contamination des écosystèmes aquatiques français par les PE. Néanmoins, certaines études rapportent l'occurrence de composés œstrogéniques dans les eaux de surface, le sédiment ou les effluents de STEP (Labadie et Budzinski 2005, Cargouet *et al.* 2004, Fenet *et al.* 2003, Muller *et al.* 2008) alors que d'autres mettent en évidence la présence de composés *dioxin-like* (David *et al.* 2010, Cailleaud *et al.* 2007, Budzinski *et al.* 1997). Dans le cas de cette étude nos investigations confirment la présence de tels composés d'une part dans le sédiment et d'autre part dans la colonne d'eau. En particulier, de fortes activités œstrogénique et *dioxin-like* ont pu être détectées sur des sites où des impacts avaient pu être observés sur les poissons (i.e. VTG, EROD) (**Articles 2, 6 et 7**), suggérant ainsi un lien potentiel entre la contamination chimique et les effets observés à un plus haut degré d'organisation biologique.

En parallèle des cibles classiquement étudiées (ER et AhR), de nouvelles cibles ont été explorées de manière à permettre une plus large caractérisation de la contamination. Un effort tout particulier a été porté sur les composés susceptibles d'interagir avec le hPXR, récepteur impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques et des hormones endogènes. D'autres cibles ont également été étudiées: le hAR et le hPR impliqués dans le développement et la reproduction ainsi que le hGR et le hMR jouant un rôle majeur dans la modulation de nombreuses fonctions physiologiques (e.g. développement, reproduction, immunité, réponse au stress...). Nos travaux sont parmi les premiers à rapporter l'occurrence de ligands du hPXR dans les milieux aquatiques (**Articles 1, 5 et 8**). D'autres équipes françaises ont

également rapporté la présence de tels composés dans des eaux d'irrigation, dans des sols de culture ainsi que dans des effluents de STEP en Tunisie (Majouhb *et al.* 2009, Mnif *et al.* 2010), confirmant la pertinence de cette cible pour la détection de la contamination. Concernant les autres cibles explorées, nos résultats montrent l'occurrence environnementale de ligands du hGR, du hMR, du hAR et du hPR (**Article 8**). De telles activités ont précédemment été rapportées dans d'autres pays (Schriks *et al.* 2010, Chang *et al.* 2007, Streck 2009). Dans le cas présent, ces fortes activités ont été détectées en aval d'une usine pharmaceutique ou d'importantes altérations de la reproduction avaient été observées chez les poissons.

Globalement, nos résultats démontrent la présence de composés PE agissant sur d'autres cibles que le ER et le AhR et confirment ainsi la nécessité de considérer d'autres voies de signalisation que celle médiées par ces récepteurs, comme le préconisait récemment Runnalls *et al.* (2010) concernant les progestagènes et les cortico-stéroïdes. Actuellement, la détection de tels composés pose la question de l'identité de telles substances et de leurs effets sur les organismes exposés.

Profils de toxicité in vitro pour la priorisation des sites

Dans une optique de diagnostic environnemental, l'approche multi-récepteurs mise en œuvre a permis d'établir des profils de contamination dans les différents extraits environnementaux via l'établissement de TEQ-bio et s'est révélé particulièrement efficace pour tracer les sources de pollutions et étudier la distribution de la contamination (**Article 7**).

En dehors des sources naturelles (e.g. phyto-œstrogènes), la présence de PE dans les milieux aquatiques est principalement associée aux activités humaines (industrie, agriculture, urbanisation). Dans le cas de cette étude nous avons considéré plusieurs types d'échantillons (sédiment, effluents, POCIS, SPMD) dans des contextes de contamination différents (urbain, agricole, pharmaceutique, industrielle). Nos résultats témoignent de la présence de composés actifs dans l'ensemble des échantillons analysés. Toutefois le profil de ces activités diffère selon le compartiment et le contexte de contamination. Ainsi, les activités œstrogénique, *dioxin-like* et *PXR-like* ont pu être détectées dans l'ensemble des échantillons alors que les autres activités mesurées n'ont pu être détectées que dans certains contextes : e.g. activité anti-androgénique dans le sédiment de site soumis à des pressions mixtes (Réveillon-**Articles 2, 6 et 7**) ; activité androgénique et glucocorticoïdique dans les eaux de surface en aval d'une usine pharmaceutique (La Dore-**Article 8**). Bien que nos investigations n'aient porté que sur une dizaine de sites, ces résultats confirment le caractère ubiquitaire de la contamination par les PE et la nécessité de considérer l'ensemble des compartiments pour caractériser la pollution et rendre compte de la possible exposition des organismes aux contaminants.

Dans ce type d'approche, chaque bio-essai est spécifique d'un mécanisme d'action de manière à ce que la batterie couvre la plus grande gamme d'effets et de composés possibles. Dans notre étude en particulier, nos résultats ont mis en évidence que l'utilisation du hPXR apportait un complément d'information au regard des activités généralement considérées (i.e. ER, AhR) (**Article 1 et 2**) c'est pourquoi nous avons décidé de l'intégrer à notre batterie en routine.

Sur la base des profils éco-toxiques, il semble envisageable de hiérarchiser les sites vis-à-vis d'un site de référence et ainsi dresser un profil du danger PE dans un contexte de contamination particulier (Hamers *et al.* 2010). Dans le cadre de nos travaux, nous avons entrepris une telle classification pour les échantillons de sédiment et de POCIS (**Figure 41**). Les sites de l'Aisne (**Article 2**) pour le sédiment et la Baïse pour les POCIS (**Article 1**) ont été choisis comme site de référence. Les profils de danger obtenus montrent logiquement que la qualité des sédiments et des eaux de surface est moins bonne sur les sites soumis à de fortes pressions anthropiques. Par ailleurs, la hiérarchisation des sites sur la base de leur profil d'activité PE selon la méthode des *clusters* permet de distinguer plusieurs groupes : un groupe

des sites faiblement contaminés (Vallon du Vivier, Aisne, Baïse, Rhonelle, Lézarde) et deux autres groupes plus fortement contaminés (**Figure 40**).

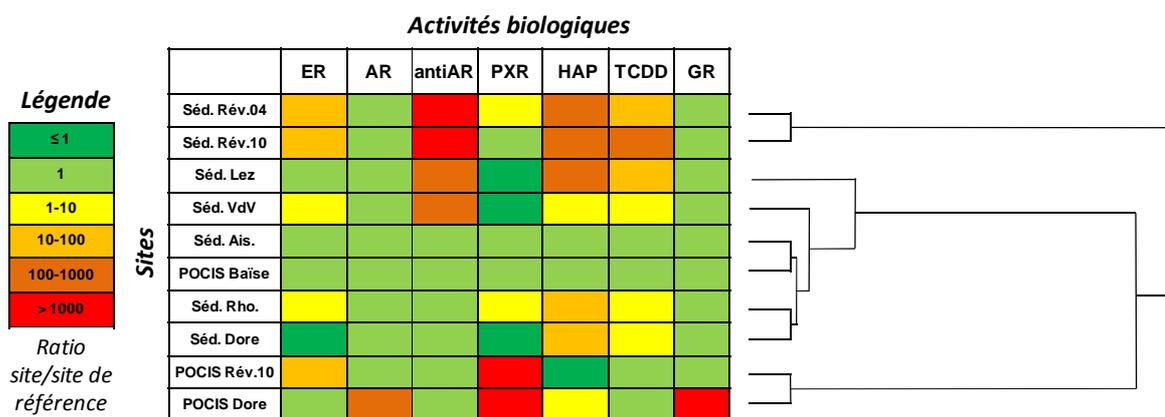


Figure 40. Classification des sites selon leur profil d'activités biologiques

Il est intéressant de noter que sur la base d'une telle analyse, les compartiments d'un même site sont fortement discriminés (e.g. sédiment et POCIS du Réveillon et de la Dore) démontrant une fois de plus la nécessité de considérer l'ensemble des compartiments pour une évaluation optimale de la contamination. Si le jeu de données utilisé ici reste relativement restreint, il semble envisageable à l'avenir d'entreprendre une telle procédure à une plus large échelle de manière à établir une cartographie de sites prioritaires en terme de potentiel écotoxique (i.e. priorisation de site) dans le cadre de programmes de surveillance.

Contribution de l'approche EDA à l'identification de PE

En complément à l'approche bioessais qui ne renseigne globalement que sur la qualité chimique des milieux aquatiques, il semble indispensable de déterminer l'identité des composés à l'origine des activités détectées de manière à ce qu'ils soient surveillés et que leurs émissions soient potentiellement réglementées (i.e. priorisation de substances). En particulier, l'application de la DCE requiert le couplage entre la surveillance de l'état chimique et celle de l'état écologique dans les milieux aquatiques. Dans ce contexte, la méthodologie EDA apparaît comme un outil de choix afin de déterminer le lien entre les effets (éco)toxiques et les composés qui en sont responsables (i.e. causalité) (Brack et al., 2005). Dans le cadre de ce travail, nous avons tenté de répondre aux défis méthodologiques (Hecker et Hollert 2009) posés par la mise en œuvre d'une telle approche tels que (1) la prise en considération de nouvelles cibles biologiques pour la détection de polluants émergents (i.e. PXR), (2) la mise en œuvre d'une stratégie de fractionnement permettant l'isolement simultané et l'identification de composés polaires, semi-polaires et apolaires (3) la prise en compte de la biodisponibilité.

De nouveaux outils biologiques

Les approches EDA ont généralement été restreintes à un nombre limité de bioessais plus ou moins spécifiques (voir section 3.4.2 de la synthèse bibliographique, p69). Concernant les PE, les composés oestrogénique et dioxin-like ont principalement été étudiés (Brack et al. 2008, Houtman et al. 2007). Toutefois la diversité des contaminants requiert l'emploi d'approche multi-bioessais (Smital et al. 2010, Schmitt et al. 2010b, Lübke von Varel et al. 2011) intégrant des bioessais pertinents pour faire face à l'augmentation du nombre et du type de polluants aquatiques émergents. Dans le cadre de notre stratégie EDA, la mise en place de nouveaux outils (i.e. hPXR, hAR, hPR, hGR, hPR) pour la détection de polluants émergents et leur intégration dans une batterie multi-récepteurs s'est révélée particulièrement intéressante dans une optique d'évaluation intégrée du risque des polluants

émergents en permettant de faire le lien entre l'exposition, l'effet et l'identité des composés (i.e. mesure de l'exposition basé sur l'effet) (**Articles 6 et 8**).

Néanmoins, comme l'illustre l'**article 8**, il semble particulièrement important à l'avenir de mettre en œuvre des outils de *profiling* adaptés au contexte aquatique permettant de faire le lien entre les réponses *in vitro* ou *in vivo* et les réponses à un plus haut degré d'organisation biologique pour une meilleure évaluation du risque écotoxicologique. Actuellement la majorité des outils de criblage employés sont des outils *in vitro* basés sur des modèles mammifères. Or, il existe des différences inter-espèces en terme de structures et de ligands des récepteurs (voir section 2.2.1 de la synthèse bibliographique, p12), de métabolisme cellulaire, de co-facteurs de transcription qui peuvent influencer la réponse cellulaires aux PE. Ainsi, il pourra être question à l'avenir d'utiliser des outils *in vitro* basés sur des récepteurs de poissons de manière à mieux prendre compte des spécificités inter-espèces existantes (Cosnefroy *et al.* 2009). Dans le cas présent, nous avons mis en place un bioessai basé sur le hPXR permettant la détection de nombreux contaminants organiques mais qui, du fait des différences très marquées dans l'activation de ce récepteur d'une espèce à l'autre (Moore *et al.*, 2002, Eckins *et al.* 2008), ne témoigne probablement pas fidèlement de l'activation potentielle du PXR de poisson *in situ*. La mesure de l'activité BFCOD sur cellules de poissons n'a pas permis de répondre à ce besoin (**Article 3**) et d'autres outils devront être développés (e.g. lignée cellulaire à gène rapporteur placé sous le contrôle du PXR de poisson zèbre).

Par ailleurs, de manière à tenir compte des aspects pharmaco-cinétiques non considérés par les outils *in vitro*, des modèles *in vivo* embryo-larvaires pourraient également être employés. En particulier, les outils permettant la mesure d'une réponse moléculaire à l'échelle de l'organisme et adaptés à un criblage haut débit pourraient s'avérer pertinents (voir section 2.3.1.3 de la synthèse bibliographique, p35). Dans le cadre de ce travail, des investigations ont été réalisées sur un modèle embryo-larvaire de poisson zèbre concernant la mesure de l'activité CYP3A et EROD ; les réponses obtenues avec un panel de substances chimiques et des extraits de sédiments étaient apparues relativement concordantes avec les réponses obtenues *in vitro* (**Article 4**). D'autres investigations, non présentées dans ce manuscrit, ont également porté sur des larves transgéniques exprimant la GFP (Tong *et al.* 2009) placée sous le contrôle du gène de l'aromatase B, gène œstrogène-régulé dans le cerveau. Ces expériences ont révélé certaines différences dans les réponses du modèle cellulaire MELN concernant l'activité œstrogénique de fractions de sédiment du Réveillon. Dans l'ensemble, ces premières investigations démontrent (1) la complémentarité des outils *vitro/vivo* pour décrypter les mécanismes sous jacents aux effets observés, en intégrant les barrières métaboliques et pharmacocinétiques chez l'organisme, (2) l'intérêt des outils *in vivo* pour confirmer chez un poisson modèle l'activité PE des molécules identifiées sur des modèles *in vitro* dans le cadre d'une démarche EDA. Ces résultats soulèvent aussi l'intérêt de développer des modèles *in vitro* de poisson et de les intégrer dans la démarche EDA, afin de prendre en compte d'éventuelles spécificités d'espèces et d'identifier des molécules actives sur les récepteurs de poisson.

De nouvelles stratégies de fractionnement et d'identification

Notre approche multi-récepteurs s'est révélée également intéressante pour l'orientation des analyses chimiques sur la base des profils toxicologiques croisés (**Article 8**). À partir des activités et des composés ciblés quantifiés, une MBA a été réalisée sur les différents sites investigués. À l'image de ce qui est décrit dans la littérature (Houtman *et al.* 2007, Snyder *et al.* 2001, Hollert *et al.* 2005), l'efficacité d'une telle approche varie fortement d'un échantillon à un autre et d'une activité à l'autre (**Articles 1, 2, 6 et 8**). De manière générale, si elle a permis de confirmer l'implication de certains ligands du ER (E2) et du AhR (HAP), cette approche s'est révélée insuffisante pour identifier l'ensemble des composés responsables des activités mesurées, plus particulièrement dans le cas des cibles émergentes tels que le

PXR, le AR ou le PR traduisant un manque de connaissance *a priori* concernant les ligands environnementaux de ces récepteurs. Ces résultats illustrent la limite principale de la MBA qui repose sur des composés dont l'activité biologique a déjà été caractérisée, et en cela ne permet pas l'identification de nouveaux polluants.

Le fractionnement, étape clef de l'EDA, permet d'isoler les composés actifs à l'origine des activités mesurées. Généralement, dans le sédiment, les protocoles validés concernent l'isolement de composés apolaires à activités *dioxin-like* et sont basés sur l'utilisation de phase normale (Brack et Schirmer 2003, Brack *et al.* 2005, Brack *et al.* 2008) alors que la phase inverse est préférée pour les matrices aqueuses (Thomas *et al.* 2002). Par ailleurs, il est également fréquent que, de manière à réduire suffisamment la complexité du mélange initiale, plusieurs étapes de fractionnement soient employées (Thomas *et al.* 2002, Lubke von Varel *et al.* 2008) mais peuvent s'avérer parfois insuffisantes pour l'isolement final des composés actifs, notamment lorsque plusieurs réponses biologiques sont considérées (Lubke-von-Varel *et al.* 2011).

Dans le cadre de cette thèse nous avons calibré puis évalué une stratégie de fractionnement à trois étapes pour l'isolement de composés présentant des activités biologiques (PXR, ER, AhR et (anti-)AR) et des propriétés physico-chimiques différentes (i.e. composés polaires, semi-polaires et apolaires). Si notre stratégie s'est révélée efficace pour l'isolement et l'identification de ligands du PXR (di-iso-octylphtalate) et du ER (2,4 di-tert-butylphenol et 2,6-di-tert-butyl- α -methoxy-p-cresol) dans le sédiment, elle s'est avérée partiellement inadaptée pour l'isolement des ligands du AR et du AhR dans le sédiment (**Article 6**), et pour l'isolement de ligand du PXR dans des POCIS dans un certain contexte de contamination (**Article 7**).

Au vu de nos résultats, il semble que le fractionnement doit être envisagé comme une étape dynamique qui puisse être modulable en fonction de la nature de la matrice, de la nature des composés (i.e. polarité) et des activités détectées. Les outils proposés dans le cadre de cette thèse constituent une première base pour l'isolement de composés actifs. Notamment, la mise en œuvre d'un fractionnement sur colonne d'affinité au hER α s'est révélée particulièrement efficace pour l'isolement final de composés au sein de fractions présentant plusieurs activités (**Article 6**). Des investigations similaires seront prochainement menées pour l'isolement de ligands du hPXR (i.e. colonne hPXR - Dagnino 2009). Il conviendra à l'avenir de développer de telles colonnes pour d'autres récepteurs nucléaires (e.g. AR, AhR...)

Une fois les composés isolés il convient de les identifier (i.e. confirmation analytique : élucidation de la structure). Incontestablement cette étape est celle sur laquelle les efforts de recherches méthodologiques devront être portés. Dans le cas de ce travail, la CPG-SM avec un mode d'acquisition en *full-scan* a été utilisée pour l'identification des composés inconnus. Si elle a permis l'identification de ligands du hPXR et du ER dans des fractions semi-polaires, cette méthode s'est révélée inefficace pour l'identification de composés présents dans les fractions plus polaires (**Article 6**) vraisemblablement du fait de la présence de composés non compatibles avec une analyse en CPG (i.e. thermolabiles et/ou polaires).

De manière générale, les techniques d'élucidation de structure basées sur la CPG-SM sont actuellement les mieux décrites au regard de celle des composés thermolabiles basés sur la chromatographie liquide couplée à des spectromètres de masse à haute résolution (Schymanski *et al.* 2008, Hill *et al.* 2008). L'utilisation de tels outils sera nécessaire pour l'identification des composés détectés dans nos fractions polaires qu'il s'agisse du Réveillon (**Article 6**) mais également de la rivière Dore (**Article 8**). De récentes études ont présenté des approches basées sur ces outils (Krauss *et al.* 2010; Hogenboom *et al.* 2009), toutefois ces premières investigations ont montré leurs limites. Actuellement l'absence de banque de données spectrales, associés à la mauvaise reproductibilité des spectres de masse, est le principal facteur limitant, nécessitant la mise en œuvre de vraie stratégie analytique pour

l'élucidation de la structure des composés. A l'avenir la mise en œuvre de stratégie informatisée intégrant de nouveaux logiciels pour la génération et l'élucidation de structure ainsi que la création de bases de données spectrales devraient permettre d'améliorer l'applicabilité de telles méthodes (Schymanski *et al.* 2009).

La confirmation de la structure du composé actif n'est pas la dernière étape de l'EDA. Il convient par la suite de confirmer l'activité du composé identifié. La confirmation est définie comme une approche hiérarchisée comprenant la confirmation analytique (décrite ci-dessus), la confirmation de l'effet *in vitro* et *in vivo* et enfin la confirmation du risque écologique à travers la mise en évidence d'un lien de causalité entre une exposition aux polluants et un effet à l'échelle des populations et des communautés (Brack *et al.* 2008b).

Dans le cadre de ce travail, notre approche a permis l'isolement puis l'identification de ligands du hPXR et du ER dont la capacité à activer ces récepteurs a pu ensuite être confirmée sur nos modèles *in vitro* (**Article 6**). Néanmoins, nous n'avons pas encore confirmé que ces composés, de part leur concentration dans les fractions, expliquaient la totalité de l'activité au sein de ces fractions. Par ailleurs, les fractions finales contiennent généralement plusieurs composés dont il convient d'évaluer les effets de mélange en fonction de leur concentration dans l'extrait. Dans le cas présent nous avons montré les limites de la prédiction des effets basée uniquement sur l'additivité, en particulier pour l'activité PXR-like (e.g. modèle CA dans l'**article 5** ; MBA dans les **articles 1, 2, 6 et 8**). Dans ce contexte, la démarche proposée par Grote *et al.* (2005) basée sur la détermination d'un indice de confirmation (ICQ), incluant le modèle d'additivité et d'action indépendante, semble particulièrement pertinente.

Si la confirmation de l'effet *in vitro* et *in vivo* est actuellement envisageable, la confirmation de l'effet à des niveaux supérieurs d'organisation biologique reste actuellement un réel challenge méthodologique mais qui sera néanmoins nécessaire à l'amélioration de la pertinence écologique de l'EDA pour une meilleure évaluation du risque (**Figure 41**).

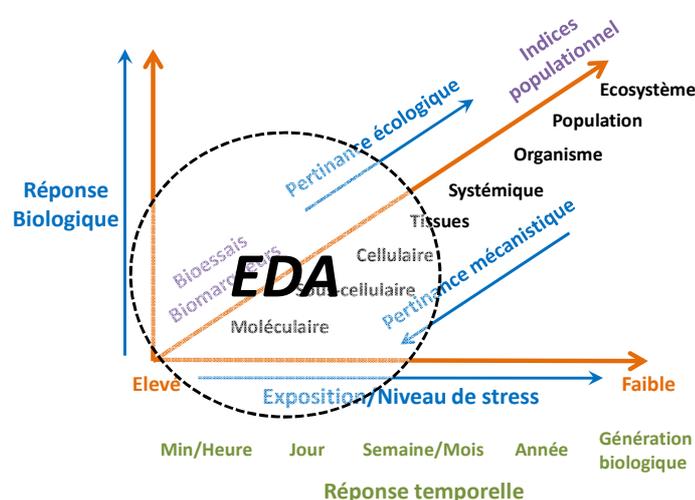


Figure 41. Position de l'EDA au regard de l'évaluation du risque écologique

En effet, s'il semble envisageable d'augmenter la pertinence écotoxicologique des outils de *profiling* (voir ci-dessus), ceux-ci devant restés compatibles avec un *screening* haut débit, l'étude de niveaux supérieurs d'organisation biologique (i.e. individus, population, communauté, écosystème) ne pourra être abordée qu'au stade de la confirmation. La réalisation d'exposition en mésocosme ou l'emploi d'outils de modélisation (e.g. *dynamic energy budget* (DEB)-Muller *et al.* 2010) pourraient, par exemple, être envisagés. Bien que

l'amélioration de la pertinence écologique de l'EDA, notamment au stade de la confirmation, reste un sujet de recherche important (e.g. programme européen FP6-MODELKEY), la confirmation des effets à l'échelle des populations, des communautés et des écosystèmes relève actuellement de l'utopie.

La prise en compte de la biodisponibilité

Par ailleurs, toujours dans une optique d'optimiser l'évaluation du risque, la prise en compte de la biodisponibilité est fortement recommandée afin d'améliorer la pertinence écologique de nos résultats (Hamers *et al.* 2010, Brack *et al.* 2009). L'échantillonnage passif permet de rendre compte de la biodisponibilité des contaminants environnementaux à travers le mimétisme du phénomène d'accumulation au sein des organismes. De plus, ils permettent une mesure intégrée de la contamination dans le temps. De nombreuses techniques d'échantillonnage passif ont vu le jour durant ces vingt dernières années pour l'échantillonnage et/ou l'extraction de contaminants organiques et inorganiques (Vrana *et al.* 2005) (e.g. SPMD, POCIS, ruban de silicone, TENAX®...). Pour la plupart elles ont concerné la colonne d'eau, bien que de récentes études rapportent l'application de telles techniques au sédiment (Schwab *et al.* 2009). Dans notre travail, nous avons combiné avec succès des capteurs passifs de type POCIS et SPMD à notre batterie de bioessais permettant ainsi une meilleure évaluation du potentiel éco-toxique de mélanges environnementaux complexes vis-à-vis des organismes exposés. En particulier, dans le cadre d'une approche EDA, nous avons pu isoler des composés biodisponibles (**Article 7 et 8**) qu'il reste toutefois à identifier.

Concernant le sédiment, nous avons évalué une méthode d'extraction à large spectre en correspondance avec notre approche multi-récepteurs (**Article 5**). Si notre méthode permet une extraction relativement exhaustive d'une diversité de contaminants organiques, il conviendra à l'avenir d'intégrer la notion de biodisponibilité à cette méthodologie de manière à appréhender notre approche multi-compartiments de manière cohérente selon les approches décrites dans la littérature (Brack *et al.* 2009). Dans ce contexte, il conviendra également de poursuivre nos investigations sur l'effet des composés matriciels sur les réponses biologiques mesurées et notamment de déterminer l'utilité d'une étape de purification dans le cas d'une extraction basée sur la biodisponibilité (i.e. extractabilité des composés matriciels).

Une autre manière d'aborder la biodisponibilité et d'évaluer directement le risque pour les organismes exposés serait de réaliser nos investigations (i.e. bioessais *in vitro*) sur des extraits animaux (e.g. bile, foie, muscle). Cela permettrait également de tenir compte des aspects de bioaccumulation et de métabolisation des polluants. Actuellement, seules quelques études rapportent la mise en œuvre d'un *screening* d'activité PE sur des extraits d'organismes dans le cadre d'approches EDA (Houtman *et al.* 2004, Gibson *et al.* 2005, Hill *et al.* 2010). Cela tient en partie au fait de fortes concentrations en lipides nécessitant d'importantes étapes de purification ou encore de la présence d'hormones endogènes. Simon *et al.* (2010) ont récemment décrit une méthodologie, applicable dans le cadre d'une approche EDA, permettant de s'affranchir de ces limites à travers une triple purification (i.e. dialyse, CLHP en phase normale, GPC). Le suivi de bio-TEQ, en parallèle à celui de la contamination dans le sédiment et la colonne d'eau permettrait de tracer la dynamique des polluants entre les différents compartiments mais également de mieux définir l'exposition réelle des organismes aux contaminants *in situ*.

Vers une évaluation intégrée du risque ?

Enfin, dans une optique d'évaluation du risque environnemental, certains équipes envisage la possibilité d'intégrer l'EDA dans une démarche globale basée sur le concept de poids de la preuve (*weigh of evidence* ou WOE) permettant d'évaluer la qualité de l'eau ou du sédiment selon différents groupes d'information ou *line of evidence* (LOE). Chapman et Hollert (2006) ont initialement proposé l'intégration de l'EDA en tant que LOE à une triade

définie pour évaluer la qualité du sédiment (SQT pour *sediment quality triad*). Cette triade fournit actuellement la base de l'évaluation du risque lié à la contamination du sédiment en tenant compte de l'exposition (chimie du sédiment), de l'effet (toxicité du sédiment, structure des communautés benthiques) et de la caractérisation du risque (concept WOE). L'intégration de l'EDA permettrait d'inclure la notion de causalité à cet ensemble et ainsi de faire le lien entre la contamination chimique et les effets observés.

Plus récemment, dans le cadre du programme Européen MODELKEY, une méthodologie d'évaluation intégrée du risque (IRA) basée également sur le concept WOE a été mise au point (Gottardo *et al.* 2011). En accord avec la DCE, qui préconise l'intégration d'indicateurs biologiques, chimiques, écotoxicologiques, physico-chimiques et hydromorphologiques (DCE, 2000/60/CE) pour l'évaluation de l'état écologique, cette méthodologie regroupe actuellement cinq LOE. En particulier, la LOE écotoxicologie prend en considération des effets chroniques et aigus mesurés à l'échelle de la cellule, de l'organisme et de la population. Concernant la LOA chimique, elle porte sur le sédiment, l'eau et les organismes. A terme, cette méthodologie est censée fournir un outil d'évaluation et de classification de l'état écologique aux gestionnaires de l'environnement. Ainsi, à l'avenir, il pourrait être envisagé d'intégrer l'EDA en tant que sixième LOE de manière à pouvoir faire la distinction entre ce qui est lié à la pollution chimique et ce qui est lié à des facteurs environnementaux (e.g. morphologie des habitats, espèces invasives...).

Néanmoins, si une telle méthodologie fournit un outil de classification particulièrement puissant, la mise en œuvre d'une telle démarche ne pourra être entreprise que sur le très long terme et passera notamment par une meilleure compréhension des réponses mesurées ainsi qu'une standardisation des procédures et des outils utilisés.

Conclusion générale

Il est désormais reconnu que l'effet des substances non-prioritaires est significatif dans les réponses mesurées dans l'environnement, à différents degrés d'organisation. Ainsi le développement d'outils et de stratégies utilisables en routine pour l'identification de polluants (i.e. priorisation de substance) et de sites très pollués (i.e. priorisation de site) reste un enjeu de recherche important dans le contexte de l'évaluation du risque environnemental. Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse s'inscrit dans ce contexte général à travers la mise en place d'une stratégie bio-analytique de type EDA basée sur l'utilisation combinée d'outils de biodétection (*in vitro* et *in vivo*) et d'outils physico-chimiques d'analyse pour la caractérisation de la contamination et l'identification de PE dans les milieux aquatiques.

Ce travail a permis :

- 1) De mettre en évidence l'**occurrence environnementale de polluants émergents** intéragissant avec d'autres récepteurs que le ER et le AhR à travers l'utilisation de nouveaux outils *in vitro*.
- 2) De démontrer l'intérêt de l'approche multi-récepteurs/multi-compartiments pour le **diagnostic environnemental de la qualité chimique des eaux**. Notamment l'intérêt du couplage entre les bioessais *in vitro* et les capteurs passifs pour la détection de composés hydrosolubles.
- 3) De confirmer l'intérêt de l'approche EDA pour **identifier des polluants émergents** dans des mélanges environnementaux complexes.

Dans l'ensemble, ces résultats militent pour l'utilisation des outils bio-analytiques et plus largement de l'EDA dans un cadre de surveillance environnementale de la pollution chimique (**Figure 42**). Actuellement, si l'utilisation de bioessais pour la surveillance écotoxicologique de l'environnement n'est pas explicitement recommandée par la DCE, certains pays tels que les Pays-Bas ont reconnu le rôle important de tels outils pour parvenir aux objectifs de la DCE. Ainsi, il pourrait être envisagé à l'échelle Française ou Européenne d'utiliser ces bioessais pour surveiller la présence d'activités biologiques dans l'environnement associées à la contamination chimique (i.e. diagnostic intégrée de la contamination chimique basé sur l'effet) et notamment tracer les sources de pollutions. Entre autre, la définition de NQE intégrée basée sur ces bioessais permettrait de répondre aux incertitudes de l'évaluation actuelle de la qualité chimique des eaux à travers la prise en considération des effets faibles doses et des effets de mélange caractéristiques des PE (Matthiessen et Johnson 2007). Par ailleurs, sur la base des profils d'écotoxicité, une classification ainsi qu'une priorisation de sites pourraient être envisagées (Hamers et al. 2010). Enfin, au vu de nos résultats, le développement et la mise en œuvre de bioessais *in vitro/in vivo* plus adaptés au contexte aquatique permettront également une meilleure évaluation du risque pour les organismes exposés.

Dans ce contexte, l'EDA pourrait être utilisée en seconde approche pour l'identification des composés actifs inconnus et de leurs effets combinés. Cette identification est une étape nécessaire pour discriminer les effets liés aux substances de ceux liés à d'autres facteurs environnementaux mais également pour la mise en œuvre de mesures permettant de restaurer la qualité environnementale des eaux et plus globalement des écosystèmes à travers, en particulier, l'établissement de nouvelles liste de substances prioritaires à surveiller (i.e. substances dangereuses et/ou à risque).

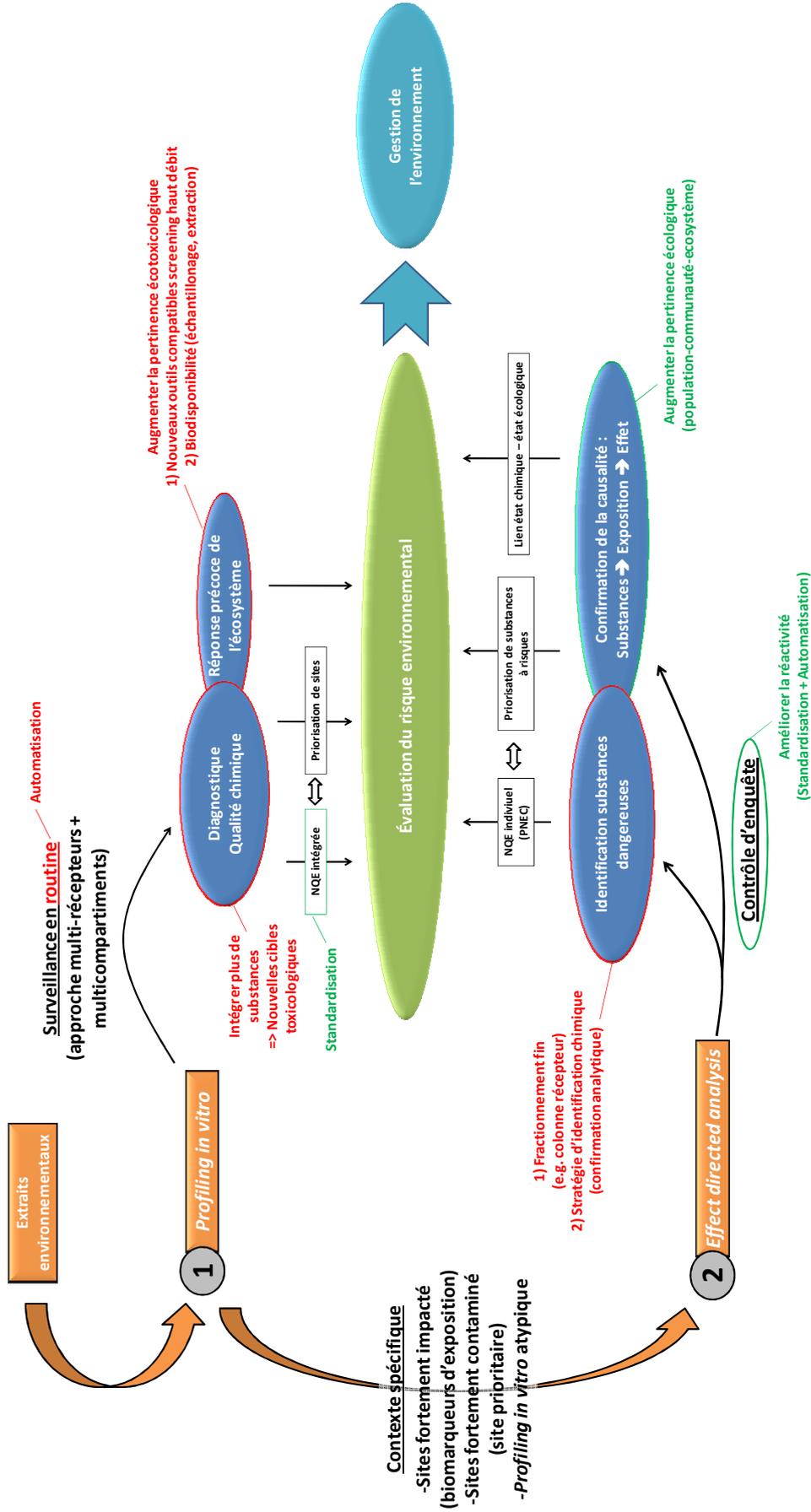


Figure 42. Perspectives stratégiques pour la surveillance bio-analytique des milieux aquatiques et leur gestion (en rouge : perspective à court terme ; en vert : perspective à long terme)

Néanmoins, si l'emploi de bioessais pour le diagnostic environnemental est aujourd'hui opérationnel en routine, à travers notamment l'automatisation du criblage, l'EDA reste une démarche lourde et coûteuse dont la mise en œuvre est lente. De ce fait, son emploi a principalement été rapporté dans le cadre d'étude de cas pour répondre à des questionnements spécifiques dans des contextes de contamination bien précis (Brack *et al.* 2005, Brack *et al.* 2007, Brack *et al.* 2008, Hill *et al.* 2010, Keiter *et al.* 2008, Weiss *et al.* 2009b). Ainsi, l'un des futurs enjeux sera de rendre cet outil accessible aux gestionnaires de l'environnement et notamment de développer des outils et des stratégies permettant l'intégration de l'EDA dans la surveillance des milieux aquatiques. Dans cette optique, les résultats obtenus dans le cadre de cette thèse amènent à un certain nombre de perspectives méthodologiques et pratiques. Ainsi, en complément de nouveaux outils de criblage, il s'agira de proposer des méthodes de fractionnement adaptées à l'utilisation d'approches multi-récepteurs limitant la co-occurrence de plusieurs activités dans les fractions finales. Par exemple, la colonne d'affinité au ER utilisée dans ce travail est un outil très prometteur dans cette optique. Des stratégies d'identification de composés polaires en chromatographie liquide seront également indispensables (e.g. utilisation combinée de spectre de masse hydride avec des logiciels d'interprétation des sous-structures). La prise en compte de la biodisponibilité apparaît également importante pour mieux rendre compte de l'exposition réelle des organismes aux contaminants. À terme, sur la base de ces nouveaux outils, l'établissement de protocoles simplifiés et de procédures standardisées ainsi que leur automatisation (e.g. criblage, criblage-fractionnement...) devraient permettre une utilisation plus réactive de l'EDA dans le cadre de contrôle d'enquête.

L'atteinte de ces objectifs passera notamment par le développement de plateformes bio-analytiques regroupant les différentes compétences nécessaires à l'EDA et à l'accomplissement de programme/réseaux de recherche nationaux (e.g. ECOPI) et internationaux (e.g. MODELKEY, EDA-EMERGE) dont un des objectifs est de mettre en œuvre des outils fonctionnels et opérationnels pour la surveillance des milieux aquatiques.

Références bibliographiques

- Ackermann, G. E., E. Brombacher et K. Fent (2002). "Development of a fish reporter gene system for the assessment of estrogenic compounds and sewage treatment plant effluents." *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(9): 1864-1875.
- Aerni, H. R., B. Kobler, B. V. Rutishauser, F. E. Wettstein, R. Fischer, W. Giger, A. Hungerbühler, M. D. Marazuela, A. Peter, R. Schönenberger, A. C. Vogeli, M. J. F. Suter et R. I. L. Eggen (2004). "Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **378**(7): 1873-1873.
- Aguilar-Martínez, R., M. A. Palacios-Corvillo, R. Greenwood, G. A. Mills, B. Vrana et M. M. Gómez-Gómez (2008). "Calibration and use of the Chemcatcher® passive sampler for monitoring organotin compounds in water." *Analytica Chimica Acta* **618**(2): 157-167.
- Aït-Aïssa, S., S. Laskowski, N. Laville, J. M. Porcher et F. Brion (2010). "Anti-androgenic activities of environmental pesticides in the MDA-kb2 reporter cell line." *Toxicology in Vitro* **24**(7): 1979-1985.
- Altenburger, R., H. Walter et M. Grote (2004). "What contributes to the combined effect of a complex mixture?" *Environmental Science & Technology* **38**(23): 6353-6362.
- Aluru, N. et M. M. Vijayan (2004). "[beta]-Naphthoflavone disrupts cortisol production and liver glucocorticoid responsiveness in rainbow trout." *Aquatic Toxicology* **67**(3): 273-285.
- Alvarez, D. A., W. L. Cranor, S. D. Perkins, R. C. Clark et S. B. Smith (2008). "Chemical and toxicologic assessment of organic contaminants in surface water using passive samplers." *Journal of Environmental Quality* **37**(3): 1024-1033.
- Alvarez, D. A., J. D. Petty, J. N. Huckins, T. L. Jones-Lepp, D. T. Getting, J. P. Goddard et S. E. Manahan (2004). "Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments." *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(7): 1640-1648.
- Andersson, P. L., A. Blom, A. Johannisson, M. Pesonen, M. Tysklind, A. H. Berg, P. E. Olsson et L. Norrgren (1999). "Assessment of PCBs and hydroxylated PCBs as potential xenoestrogens: In vitro studies based on MCF-7 cell proliferation and induction of vitellogenin in primary culture of rainbow trout hepatocytes." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **37**(2): 145-150.
- Ankley, G. T., D. L. Defoe, M. D. Kahl, K. M. Jensen, A. Miracle, P. Hartig, L. E. Gray, M. Cardon et V. Wilson (2004). "Evaluation of the model anti-androgen flutamide for assessing the mechanistic basis of responses to an androgen in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)." *Environmental Science & Technology* **38**(23): 6322-6327.
- Arditsoglou, A. et D. Voutsas (2008). "Determination of phenolic and steroid endocrine disrupting compounds in environmental matrices." *Environmental Science and Pollution Research* **15**(3): 228-236.
- Arditsoglou, A. et a. D. Voutsas (2008). "Passive sampling of selected endocrine disrupting compounds using polar organic chemical integrative samplers."
- Arnold, S. F. et J. A. McLachlan (1996). "Synergistic signals in the environment." *Environmental Health Perspectives* **104**(10): 1020-1023.
- Arukwe, A., T. Celius, B. T. Walther et A. Goksøyr (2000). "Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*)." *Aquatic Toxicology* **49**(3): 159-170.
- Asakawa, A., M. Toyoshima, K. H. Harada, M. Fujimiya, K. Inoue et A. Koizumi (2008). "The ubiquitous environmental pollutant perfluorooctanoic acid inhibits feeding behavior via peroxisome proliferator-activated receptor-alpha." *International Journal of Molecular Medicine* **21**(4): 439-445.
- Baker, V. A. (2001). "Endocrine disrupters -- testing strategies to assess human hazard." *Toxicology in Vitro* **15**(4-5): 413-419.
- Bakker, J. F., M. J. Belzunce-Segarra, R. Castro, M. van de Heuvel-Greve, H. J. C. Klamer, W. Brack, R. Altenburger, V. Poulsen, K. V. Thomas et P. E. G. Leonards (2007). Effect Directed Analysis and Toxicity Identification Evaluation. *Sustainable Management of Sediment Resources*. D. Barcelo and M. Petrovic, Elsevier. **Volume 1**: 163-214.
- Balaam, J. L., Y. Chan-Man, P. H. Roberts et K. V. Thomas (2009). "Identification of Nonregulated Pollutants in North Sea-Produced Water Discharges." *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**(6): 1159-1167.
- Balaguer, P., H. Fenet, V. Georget, F. Comunale, B. Terouanne, R. Gilbin, E. Gomez, A. M. Boussioux, C. Sultan, M. Pons, J. C. Nicolas et C. Casellas (2000). "Reporter cell lines to monitor steroid and antisteroid potential of environmental samples." *Ecotoxicology* **9**(1-2): 105-114.
- Balaguer, P., F. Francois, F. Comunale, H. Fenet, A. M. Boussioux, M. Pons, J. C. Nicolas et C. Casellas (1999). "Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens." *Science of the Total Environment* **233**(1-3): 47-56.
- Bandow, N., R. Altenburger, U. Lubcke-von Varel, A. Paschke, G. Streck et W. Brack (2009). "Partitioning-Based Dosing: An Approach To Include Bioavailability in the Effect-Directed Analysis of Contaminated Sediment Samples." *Environmental Science & Technology* **43**(10): 3891-3896.
- Barcelo, D. et M. Petrovic (2008). "Emerging contaminants from industrial and municipal waste." *The handbook of environmental chemistry*.

- Barron, L., J. Tobin et B. Paull (2008). "Multi-residue determination of pharmaceuticals in sludge and sludge enriched soils using pressurized liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry." *Journal of Environmental Monitoring* **10**(3): 353-361.
- Batista-Pinto, C., P. Rodrigues, E. Rocha et A. Lobo-da-Cunha (2005). "Identification and organ expression of peroxisome proliferator activated receptors in brown trout (*Salmo trutta* f. *fariorum*)." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1731**(2): 88-94.
- Battaglin (2010). "Occurrence of Azoxystrobin, Propiconazole, and Selected Other Fungicides in US Streams, 2005–2006."
- Behnisch, P. A., K. Hosoe et S. Sakai (2001). "Bioanalytical screening methods for dioxins and dioxin-like compounds - a review of bioassay/biomarker technology." *Environment International* **27**(5): 413-439.
- Behrens, A., K. Schirmer, N. C. Bols et H. Segner (2001). "Polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of cytochrome P4501A enzyme activity in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1, and in primary cultures of rainbow trout hepatocytes." *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(3): 632-643.
- Bemanian (2004). "The aryl hydrocarbon receptor-mediated disruption of vitellogenin synthesis in the fish liver: Cross-talk between AHR- and ER α -signalling pathways."
- Benotti, M. J., R. A. Trenholm, B. J. Vanderford, J. C. Holady, B. D. Stanford et S. A. Snyder (2009). "Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in US Drinking Water." *Environmental Science & Technology* **43**(3): 597-603.
- Berenbaum, M. C. (1985). "The Expected Effect of a Combination of Agents - the General-Solution." *Journal of Theoretical Biology* **114**(3): 413-431.
- Bielefeld, K. A., C. Lee et D. S. Riddick (2008). "Regulation of aryl hydrocarbon receptor expression and function by glucocorticoids in mouse hepatoma cells." *Drug Metabolism and Disposition* **36**(3): 543-551.
- Billiard, S. M., N. C. Bols et P. V. Hodson (2004). "In vitro and in vivo comparisons of fish-specific CYP1A induction relative potency factors for selected polycyclic aromatic hydrocarbons." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **59**(3): 292-299.
- Bliss, C. (1939). "The toxicity of poisons applied jointly." *Annals of Applied Biology* **26**: 585-615
- Boron, W. F. et E. L. Boulpaep (2009). *Medical Physiology : a cellular and molecular approach*.
- Brack, W. (2003). "Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures?" *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377**(3): 397-407.
- Brack, W., R. Altenburger, U. Ensenbach, M. Moder, H. Segner et G. Schuurmann (1999). "Bioassay-directed identification of organic toxicants in river sediment in the industrial region of Bitterfeld (Germany) - A contribution to hazard assessment." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **37**(2): 164-174.
- Brack, W., N. Bandow, K. Schwab, T. Schulze et G. Streck (2009). "Bioavailability in effect-directed analysis of organic toxicants in sediments." *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **28**(5): 543-549.
- Brack, W., L. Blaha, J. P. Giesy, M. Grote, M. Moeder, S. Schrader et M. Hecker (2008a). "Polychlorinated naphthalenes and other dioxin-like compounds in Elbe River sediments." *Environmental Toxicology and Chemistry* **27**(3): 519-528.
- Brack, W., T. Kind, H. Hollert, S. Schrader et A. Moder (2003). "Sequential fractionation procedure for the identification of potentially cytochrome P4501A-inducing compounds (vol 986, pg 55, 2003)." *Journal of Chromatography A* **993**(1-2): 223-223.
- Brack, W., H. J. C. Klammer, M. Lopez de Alda et D. Barcelo (2007). "Effect-directed analysis of key toxicants in European river basins a review." *Environ Sci Pollut Res Int* **14**(1).
- Brack, W. et K. Schirmer (2003). "Effect-directed identification of oxygen and sulfur heterocycles as major polycyclic aromatic cytochrome P4501A-Inducers in a contaminated sediment." *Environmental Science & Technology* **37**(14): 3062-3070.
- Brack, W., K. Schirmer, L. Erdinger et H. Hollert (2005). "Effect-directed analysis of mutagens and ethoxyresorufin-O-deethylase inducers in aquatic sediments." *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**(10): 2445-2458.
- Brack, W., K. Schirmer, T. Kind, S. Schrader et G. Schuurmann (2002). "Effect-directed fractionation and identification of cytochrome P4501A-inducing halogenated aromatic hydrocarbons in a contaminated sediment." *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(12): 2654-2662.
- Brack, W., M. Schmitt-Jansen, M. Machala, R. Brix, D. Barcelo, E. Schymanski, G. Streck et T. Schulze (2008b). "How to confirm identified toxicants in effect-directed analysis." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**(8): 1959-1973.
- Brack, W., H. Segner, M. Moder et G. Schuurmann (2000). "Fixed-effect-level toxicity equivalents - A suitable parameter for assessing ethoxyresorufin-O-deethylase induction potency in complex environmental samples." *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**(10): 2493-2501.
- Braun, A. M. et P. Thomas (2004). "Biochemical characterization of a membrane androgen receptor in the ovary of the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*)." *Biology of Reproduction* **71**(1): 146-155.

- Brausch, J. M. et G. M. Rand (2010). "A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity." *Chemosphere* **82**(11): 1518-1532.
- Buckingham, J. C. (2006). "Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking." *British Journal of Pharmacology* **147**: S258-S268.
- Budzinski, H., M. H. Devier, P. Labadie et A. Togola (2006). "Analysis of hormonal steroids in fish plasma and bile by coupling solid-phase extraction to GC/MS." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386**(5): 1429-1439.
- Burk, O. et L. Wojnowski (2004). "Cytochrome P450 3A and their regulation." *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **369**(1): 105-124.
- Bury, N. R., A. Sturm, P. Le Rouzic, C. Lethimonier, B. Ducouret, Y. Guiguen, M. Robinson-Rechavi, V. Laudet, M. E. Rafestin-Oblin et P. Prunet (2003). "Evidence for two distinct functional glucocorticoid receptors in teleost fish." *Journal of Molecular Endocrinology* **31**(1): 141-156.
- Buzitis, J., G. M. Ylitalo et M. M. Krahn (2006). "Rapid method for determination of dioxin-like polychlorinated biphenyls and other congeners in marine sediments using sonic extraction and photodiode array detection." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **51**(3): 337-346.
- Cailleaud, K., J. Forget-Leray, S. Souissi, D. Hilde, K. LeMenach et H. Budzinski (2007a). "Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoida, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs." *Chemosphere* **70**(2): 270-280.
- Cailleaud, K., J. Forget-Leray, S. Souissi, S. Lardy, S. Augagneur et H. Budzinski (2007b). "Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoid, copepod). Part 2: Alkylphenol-polyethoxylates." *Chemosphere* **70**(2): 281-287.
- Cali, J. J., D. P. Ma, M. Sobol, D. J. Simpson, S. Frackman, T. I. Good, W. J. Daily et D. Liu (2006). "Luminogenic cytochrome P450 assays." *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **2**(4): 629-645.
- Carballa, M., F. Omil, J. M. Lema, M. Llompert, C. Garcia-Jares, I. Rodriguez, M. Gomez et T. Ternes (2004). "Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant." *Water Research* **38**(12): 2918-2926.
- Cargouet, M., D. Perdiz, A. Mouatassim-Souali, S. Tamisier-Karolak et Y. Levi (2004). "Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France)." *Science of the Total Environment* **324**(1-3): 55-66.
- Carvan, M. J., 3rd, T. P. Dalton, G. W. Stuart et D. W. Nebert (2000). "Transgenic zebrafish as sentinels for aquatic pollution." *Annals of the New York Academy of Sciences* **919**: 133-47.
- Castiglioni, S., R. Bagnati, D. Calamari, R. Fanelli et E. Zuccato (2005). "A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters." *Journal of Chromatography A* **1092**(2): 206-215.
- Celander, M., M. E. Hahn et J. J. Stegeman (1996). "Cytochromes P450 (CYP) in the *Poeciliopsis lucida* hepatocellular carcinoma cell line (PLHC-1): Dose- and time-dependent glucocorticoid potentiation of CYP1A induction without induction of CYP3A." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **329**(1): 113-122.
- Chang, H., Y. Wan, S. Wu, Z. Fan et J. Hu (2010). "Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens." *Water Research* **45**(2): 732-740.
- Chapman, P. M. et H. Hollert (2006). "Should the sediment quality triad become a tetrad, a pentad, or possibly even a hexad?" *Journal of Soils and Sediments* **6**(1): 4-8.
- Chatterjee (2008). "Screening of some anti-progestin endocrine disruptors using a recombinant yeast based in vitro bioassay."
- Cheek, A. O., K. Kow, J. Chen et J. A. McLachlan (1999). "Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: Interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin." *Environmental Health Perspectives* **107**(4): 273-278.
- Cheshenko, K., F. Brion, Y. Le Page, N. Hinfray, F. Pakdel, O. Kah, H. Segner et R. I. L. Eggen (2007). "Expression of zebra fish aromatase *cyp19a* and *cyp19b* genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor." *Toxicological Sciences* **96**(2): 255-267.
- Christen, V., D. Caminada et K. Fent (2010). "Identification of a CYP3A form (CYP3A126) in fathead minnow (*Pimephales promelas*) and characterisation of putative CYP3A enzyme activity." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
- Christen, V., D. M. Oggier et K. Fent (2009). "A Microtiter-Plate-Based Cytochrome P450 3a Activity Assay in Fish Cell Lines." *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**(12): 2632-2638.
- Coe, K. J., S. D. Nelson, R. G. Ulrich, Y. D. He, X. D. Dai, O. Cheng, M. Caguyong, C. J. Roberts et J. G. Slatter (2006). "Profiling the hepatic effects of flutamide in rats: A microarray comparison with

- classical aryl hydrocarbon receptor ligands and atypical CYP1A inducers." *Drug Metabolism and Disposition* **34**(7): 1266-1275.
- Colborn, T., F. S. V. Saal et A. M. Soto (1993). "Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans." *Environmental Health Perspectives* **101**(5): 378-384.
- Colombe, L., A. Fostier, N. Bury, F. Pakdel et Y. Guiguen (2000). "A mineralocorticoid-like receptor in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: cloning and characterization of its steroid binding domain." *Steroids* **65**(6): 319-328.
- Conneely, O. M., B. Mulac-Jericevic, F. DeMayo, J. P. Lydon et B. W. O'Malley (2002). "Reproductive functions of progesterone receptors." *Recent Progress in Hormone Research, Vol 57* **57**: 339-355.
- Cooke (2004). "thyroid hormone, glucorticoids, and prolactin at the nexus of physiology, reproduction, and toxicology." *toxicology and Applied Pharmacology* **194**: 309-335.
- Cooper, B. W., T. M. Cho, P. M. Thompson et A. D. Wallace (2008). "Phthalate induction of CYP3A4 is dependent on glucocorticoid regulation of PXR expression." *Toxicological Sciences* **103**(2): 268-277.
- Cosnefroy, A. (2010). Evaluation intégrée in vitro et in vivo des effets oestrogénique de substances environnementales chez le poisson zèbre. *Museum national d'histoire naturelle*: 157p.
- Cosnefroy, A., F. Brion, B. Guillet, N. Laville, J. M. Porcher, P. Balaguer et S. Ait-Aissa (2009). "A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens." *Toxicology in Vitro* **23**(8): 1450-1454.
- Cosnefroy, A., F. Brion, E. Maillot-Maréchal, J. Porcher, F. Pakdel, P. Balaguer et S. Ait-Aissa. "Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line (ZFL) " *Toxicological Sciences*. Soumis
- Coumoul, X. (2007). "Dioxine et oestradiol L'amour vache ou une histoire de « complexes »." *medecines et sciences*.
- Coumoul, X., M. Diry et R. Barouki (2002). "PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides." *Biochemical Pharmacology* **64**(10): 1513-1519.
- Cuderman, P. et E. Heath (2007). "Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **387**(4): 1343-1350.
- Cui, X. M., A. Thomas, V. Gerlach, R. E. White, R. A. Morrison et K. C. Cheng (2008). "Application and interpretation of hPXR screening data: Validation of reporter signal requirements for prediction of clinically relevant CYP3A4 inducers." *Biochemical Pharmacology* **76**(5): 680-689.
- Dagnino, S. (2009). Caractérisation de perturbateurs endocriniens au cours du traitement des eaux usées à l'aide d'outil bioanalytiques. *Science de l'eau dans l'environnement continental* Université de Montpellier: 230.
- Dang, Z., S. Ru, W. Wang, E. Rorije, B. Hakkert et T. Vermeire (2011). "Comparison of chemical-induced transcriptional activation of fish and human estrogen receptors: Regulatory implications." *Toxicology Letters* **201**(2): 152-175.
- David, A., E. Gomez, S. Ait-Aissa, M. Bachelot, D. Rosain, C. Casellas et H. Fenet (2010). "Monitoring organic contaminants in small French coastal lagoons: comparison of levels in mussel, passive sampler and sediment." *Journal of Environmental Monitoring* **12**(7): 1471-1481.
- Daxenberger, A. (2002). "Pollutants with androgen-disrupting potency." *European Journal of Lipid Science and Technology* **104**(2): 124-130.
- DCE "Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy." *Official journal L* 327.
- de Hoffman, E. et V. Stroobant (2007). *Mass spectrometry - Principles and Applications*, Wiley.
- De Lange, H. J., W. Noordoven, A. J. Murk, M. Lurling et E. Peeters (2006). "Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals." *Aquatic Toxicology* **78**(3): 209-216.
- Death, A. K., K. C. Y. McGrath, R. Kazlauskas et D. J. Handelsman (2004). "Tetrahydrogestrinone is a potent androgen and progestin." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**(5): 2498-2500.
- Denison, M. S., A. Pandini, S. R. Nagy, E. P. Baldwin et L. Bonati (2002). "Ligand binding and activation of the Ah receptor." *Chemico-Biological Interactions* **141**(1-2): 3-24.
- Desbrow, C., E. J. Routledge, G. C. Brighty, J. P. Sumpter et M. Waldock (1998). "Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in vitro biological screening." *Environmental Science & Technology* **32**(11): 1549-1558.
- di Masi, A., E. D. Marinis, P. Ascenzi et M. Marino (2009). "Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects." *Mol Aspects Med* **30**(5): 297-343.
- Donato, M. T., N. Jimenez, J. V. Castell et M. J. Gomez-Lechon (2004). "Fluorescence-based assays for screening nine cytochrome P450 (P450) activities in intact cells expressing individual human P450 enzymes." *Drug Metabolism and Disposition* **32**(7): 699-706.
- Dvorak (2008). "An evidence for regulatory cross-talk between aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor in HepG2 cells."

- ECHA. (2011). "Candidate List of Substances of Very High Concern for authorisation." from http://echa.europa.eu/chem_data/authorisation_process/candidate_list_table_en.asp.
- Eggen, R. I. L. et H. Segner (2003). "The potential of mechanism-based bioanalytical tools in ecotoxicological exposure and effect assessment." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **377**(3): 386-396.
- Ekins, S., C. Chang, S. Mani, M. D. Krasowski, E. J. Reschly, M. Iyer, V. Kholodovych, N. Ai, W. J. Welsh, M. Sinz, P. W. Swaan, R. Patel et K. Bachmann (2007). "Human pregnane X receptor antagonists and Agonists define molecular requirements for different binding sites." *Molecular Pharmacology* **72**(3): 592-603.
- Ekins, S., E. J. Reschly, L. R. Hagey et M. D. Krasowski (2008). "Evolution of pharmacologic specificity in the pregnane X receptor." *Bmc Evolutionary Biology* **8**.
- EPA-3604A ((1994). "Method 3640A : Gel-permeation clean-up."
- Escande, A., A. Pillon, N. Servant, J. P. Cravedi, F. Larrea, P. Muhn, J. C. Nicolas, V. Cavailles et P. Balaguer (2006). "Evaluation of ligand selectivity using reporter cell lines stably expressing estrogen receptor alpha or beta." *Biochemical Pharmacology* **71**(10): 1459-1469.
- Esteve-Turrillas, F. A., A. Pastor, V. Yusa et M. de la Guardia (2007). "Using semi-permeable membrane devices as passive samplers." *Trac-Trends in Analytical Chemistry* **26**(7): 703-712.
- Farré, L., Marinela et L. K. a. D. B. Sandra Péreza (2008). "Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment."
- Fechner, P., G. Gauglitz et J.-A. Gustafsson (2010). "Nuclear receptors in analytics - a fruitful joint venture or a wasteful futility?" *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **29**(4): 297-305.
- Feige, J. N., L. Gelman, L. Michalik, B. Desvergne et W. Wahli (2006). "From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions." *Progress in Lipid Research* **45**(2): 120-159.
- Fenet, H., E. Gomez, A. Pillon, D. Rosain, J. C. Nicolas, C. Casellas et P. Balaguer (2003). "Estrogenic activity in water and sediments of a French river: Contribution of alkylphenols." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **44**(1): 1-6.
- Fent, K. (1996). "Ecotoxicology of organotin compounds." *Critical reviews in toxicology* **26**(1): 1-117.
- Fent, K., A. A. Weston et D. Caminada (2006). "Ecotoxicology of human pharmaceuticals " *Aquatic Toxicology* **78**(2): 207-207.
- Ferguson, P. L. et L. K. Shaw (2009). "Activity-directed analytical tools based on hormone receptor-affinity extraction for isolating endocrine disruptors from complex mixtures." *Abstract book - PRIMO 15*
- Fernandez, M. P., M. G. Ikonou et I. Buchanan (2007). "An assessment of estrogenic organic contaminants in Canadian wastewaters." *Science of the Total Environment* **373**(1): 250-269.
- Ferrari, B., N. Paxeus, R. Lo Giudice, A. Pollio et J. Garric (2003). "Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac (vol 55, pg 359, 2003)." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56**(3): 450-450.
- Filby, A. L. et C. R. Tyler (2005). "Molecular characterization of estrogen receptors 1, 2a, and 2b and their tissue and ontogenic expression profiles in fathead minnow (*Pimephales promelas*)." *Biology of Reproduction* **73**(4): 648-662.
- Flammarion, P., F. Brion, M. Babut, J. Garric, B. Migeon, P. Noury, E. Thybaud, C. R. Tyler, X. Palazzi et C. R. Tyler (2000). "Induction of fish vitellogenin and alterations in testicular structure: Preliminary results of estrogenic effects in chub (*Leuciscus cephalus*)." *Ecotoxicology* **9**(1-2): 127-135.
- Fuller, P. J. et M. J. Young (2005). "Mechanisms of Mineralocorticoid Action." *Hypertension* **46**(6): 1227-1235.
- Galigniana, M. D., G. Piwien Pilipuk, K. C. Kanelakis, G. Burton et C. P. Lantos (2004). "Molecular mechanism of activation and nuclear translocation of the mineralocorticoid receptor upon binding of pregnanosteroids." *Molecular and Cellular Endocrinology* **217**(1-2): 167-179.
- Garcia-Reyero, N., J. O. Grimalt, I. Vives, P. Fernandez et B. Pina (2007). "Estrogenic activity associated with organochlorine compounds in fish extracts from European mountain lakes." *Environmental Pollution* **145**(3): 745-752.
- Gerbal-Chaloin, S., L. Pichard-Garcia, J. M. Fabre, A. Sa-Cunha, L. Poellinger, P. Maurel et M. Daujat-Chavanieu (2006). "Role of CYP3A4 in the regulation of the aryl hydrocarbon receptor by omeprazole sulphide." *Cellular Signalling* **18**(5): 740-750.
- Germain, P., B. Staels, C. Dacquet, M. Spedding et V. Laudet (2006). "Overview of nomenclature of nuclear receptors." *Pharmacological Reviews* **58**(4): 685-704.
- Gibson, G. G. et N. J. Plant (2002). "Receptor-dependant transcriptional activation of cytochrome P4503A genes: induction mechanisms, species differences and interindividual variation in man " *xenobiotica* **32**(3): 165-206.
- Gibson, R., M. D. Smith, C. J. Spary, C. R. Tyler et E. M. Hill (2005). "Mixtures of estrogenic contaminants in bile of fish exposed to wastewater treatment works effluents." *Environmental Science & Technology* **39**(8): 2461-2471.
- Gilbert, N. (2011). "Drug waste harms fish." *Nature* **476**(7360): 265-265.

- Goodwin, B., L. B. Moore, C. M. Stoltz, D. D. McKee et S. A. Kliewer (2001). "Regulation of the human CYP2B6 gene by the nuclear pregnane X receptor." *Molecular Pharmacology* **60**(3): 427-431.
- Gottardo, S., E. Semenzin, S. Giove, A. Zabeo, A. Critto, D. de Zwart, A. Ginebreda, P. C. von der Ohe et A. Marcomini (2011). "Integrated Risk Assessment for WFD Ecological Status classification applied to Llobregat river basin (Spain). Part II : Evaluation process applied to five environmental Lines of Evidence." *Science of The Total Environment* **409**(22): 4681-92.
- Grans, J., B. Wassmur et M. C. Celander (2010). "One-way inhibiting cross-talk between arylhydrocarbon receptor (AhR) and estrogen receptor (ER) signaling in primary cultures of rainbow trout hepatocytes." *Aquatic Toxicology* **100**(3): 263-270.
- Gross, T. S., B. S. Arnold, M. S. Sepulveda et K. McDonald (2001). Endocrine disrupting chemicals and endocrine active agents. Relations of environmental contaminants, algam toxins, and diet with the reproductive success of americal alligators florida lakes. C. o. V. USGS-Florida Caribbean Science Center and The Department of Physiological Sciences and U. o. F. Medicine, Gainesville, Florida.
- Grote, M., W. Brack, H. A. Walter et R. Altenburger (2005). "Confirmation of cause-effect relationships using effect-directed analysis for complex environmental samples." *Environmental Toxicology and Chemistry* **24**(6): 1420-1427.
- Grun, F. et B. Blumberg (2009). "Endocrine disrupters as obesogens." *Molecular and Cellular Endocrinology* **304**(1-2): 19-29.
- Grung, M., R. Lichtenthaler, M. Ahel, K. E. Tollefsen, K. Langford et K. V. Thomas (2007). "Effects-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia." *Chemosphere* **67**(1): 108-120.
- Guillette, L. J., T. S. Gross, G. R. Masson, J. M. Matter, H. F. Percival et A. R. Woodward (1994). "Developmental Abnormalities of the Gonad and Abnormal Sex-Hormone Concentrations in Juvenile Alligators from Contaminated and Control Lakes in Florida." *Environmental Health Perspectives* **102**(8): 680-688.
- Guo, Y. L. L., G. H. Lambert et C. C. Hsu (1995). "Growth Abnormalities in the Population Exposed in-Utero and Early Postnatally to Polychlorinated-Biphenyls and Dibenzofurans." *Environmental Health Perspectives* **103**: 117-122.
- Hackenberg, R., K. Hannig, S. Beck, P. SchmidtRhode, A. Scholz et K. D. Schulz (1996). "Androgen-like and anti-androgen-like effects of antiprogestins in human mammary cancer cells." *European Journal of Cancer* **32A**(4): 696-701.
- Hahn, M. E. (2002). "Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution." *Chemico-Biological Interactions* **141**(1-2): 131-160.
- Hahn, M. E., L. L. Allan et D. H. Sherr (2009). "Regulation of constitutive and inducible AHR signaling: Complex interactions involving the AHR repressor." *Biochemical Pharmacology* **77**(4): 485-497.
- Hahn, M. E. et E. V. Hestermann (2008). Receptor-Mediated Mechanisms of Toxicity. The toxicology of fishes R. T. Di Giulio and D. E. Hinton, CRC Press - Taylor & Francis Group: 235-272.
- Hahn, M. E., S. I. Karchner, B. R. Evans, D. G. Franks, R. R. Merson et J. M. Lapersitis (2006). "Unexpected diversity of aryl hydrocarbon receptors in non-mammalian vertebrates: insights from comparative genomics." *Journal of Experimental Zoology Part a-Ecological Genetics and Physiology* **305A**(9): 693-706.
- Hamers, T., J. H. Kamstra, E. Sonneveld, A. J. Murk, M. H. A. Kester, P. L. Andersson, J. Legler et A. Brouwer (2006). "In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants." *Toxicological Sciences* **92**(1): 157-173.
- Hamers, T., P. E. G. Leonards, J. Legler, A. D. Vethaak et C. A. Schipper (2010). "Toxicity profiling: An integrated effect-based tool for site-specific sediment quality assessment." *Integrated environmental assessment and management* **6**(4): 761-73.
- Harman, C., K. E. Tollefsen, O. Boyum, K. Thomas et M. Grung (2008). "Uptake rates of alkylphenols, PAHs and carbazoles in semipermeable membrane devices (SPMDs) and polar organic chemical integrative samplers (POCIS)." *Chemosphere* **72**(10): 1510-1516.
- Harris, R. M., D. M. Wood, L. Bottomley, S. Blagg, K. Owen, P. J. Hughes, R. H. Waring et C. J. Kirk (2004). "Phytoestrogens are potent inhibitors of estrogen sulfation: Implications for breast cancer risk and treatment." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **89**(4): 1779-1787.
- Hasselberg, L., S. Meier, A. Svardal, T. Hegelund et M. C. Celander (2004). "Effects of alkylphenols on CYP1A and CYP3A expression in first spawning Atlantic cod (*Gadus morhua*)." *Aquatic Toxicology* **67**(4): 303-313.
- Hasselberg, L., S. Westerberg, B. Wassmur et M. C. Celander (2008). "Ketoconazole, an antifungal imidazole, increases the sensitivity of rainbow trout to 17 alpha-ethynylestradiol exposure." *Aquatic Toxicology* **86**(2): 256-264.
- Hawkins, M. B., J. W. Thornton, D. Crews, J. K. Skipper, A. Dotte et P. Thomas (2000). "Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**(20): 10751-10756.

- Heberer, T. (2002). "Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data." *Toxicology Letters* **131**(1-2): 5-17.
- Hecker, M. et J. P. Giesy (2008). "Novel trends in endocrine disruptor testing: the H295R Steroidogenesis Assay for identification of inducers and inhibitors of hormone production." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**(1): 287-291.
- Hecker, M. et H. Hollert (2009). "Effect-directed analysis (EDA) in aquatic ecotoxicology: state of the art and future challenges." *Environmental Science and Pollution Research* **16**(6): 607-613.
- Hegelund, T., K. Ottosson, M. Radinger, P. Tomberg et M. C. Celander (2004). "Effects of the antifungal imidazole ketoconazole on CYP1A and CYP3A in rainbow trout and killifish." *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**(5): 1326-1334.
- Hill, D. W., T. M. Kertesz, D. Fontaine, R. Friedman et D. F. Grant (2008). "Mass spectral metabonomics beyond elemental formula: Chemical database querying by matching experimental with computational fragmentation spectra." *Analytical Chemistry* **80**(14): 5574-5582.
- Hill, E. M., K. L. Evans, J. Horwood, P. Rostkowski, F. O. Oladapo, R. Gibson, J. A. Shears et C. R. Tyler (2010). "Profiles and some initial identification of (anti)androgenic compounds in fish exposed to wastewater treatment works effluents." *Environmental Science & Technology* **44**(3): 1137-1143.
- Hilton, M. J. et K. V. Thomas (2003). "Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1015**(1-2): 129-141.
- Hinfray, N., J. M. Porcher et F. Brion (2006). "Inhibition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) P450 aromatase activities in brain and ovarian microsomes by various environmental substances." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **144**(3): 252-262.
- Ho, K. T., R. M. Burgess, D. R. Mount, T. J. Norbert-King et J. R. Hockett (2007). Sediment Toxicity Identification Evaluation (TIE) Phases I, II, and III Guidance Document. Washington, DC EPA.
- Hogenboom, A. C., J. A. van Leerdam et P. de Voogt (2009). "Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography-hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1216**(3): 510-519.
- Hollert, H., M. Durr, H. Holtey-Weber, M. Islinger, W. Brack, H. Farber, L. Erdinger et T. Braunbeck (2005). "Endocrine disruption of water and sediment extracts in a non-radioactive dot blot/RNase protection-assay using isolated hepatocytes of rainbow trout - Deficiencies between bioanalytical effectiveness and chemically determined concentrations and how to explain them." *Environmental Science and Pollution Research* **12**(6): 347-360.
- Hollert, H., M. Durr, H. Olsman, K. Halldin, B. Van Bavel, W. Brack, M. Tysklind, M. Engwall et T. Braunbeck (2002). "Biological and chemical determination of dioxin-like compounds in sediments by means of a sediment triad approach in the catchment area of the River Neckar." *Ecotoxicology* **11**(5): 323-336.
- Honkakoski, P., J. J. Palvimo, L. Penttila, J. Vepsalainen et S. Auriola (2004). "Effects of triaryl phosphate's on mouse and human nuclear receptors." *Biochemical Pharmacology* **67**(1): 97-106.
- Hostetler, H. A., A. D. Petrescu, A. B. Kier et F. Schroeder (2005). "Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Interacts with High Affinity and Is Conformationally Responsive to Endogenous Ligands." *Journal of Biological Chemistry* **280**(19): 18667-18682.
- Hotchkiss, A. K., C. V. Rider, C. R. Blystone, V. S. Wilson, P. C. Hartig, G. T. Ankley, P. M. Foster, C. L. Gray et L. E. Gray (2008). "Fifteen years after "Wingspread" - Environmental endocrine disruptors and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go." *Toxicological Sciences* **105**(2): 235-259.
- Houtman, C. J. (2007). Tracing endocrine disruptors Identification and effects of endocrine disrupting compounds in the aquatic environment. Amsterdam, vrije universiteit.
- Houtman, C. J., P. Booij, E. Jover, D. P. del Rio, K. Swart, M. van Velzen, R. Vreuls, J. Legler, A. Brouwer et M. H. Lamoree (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**(11): 2244-2252.
- Houtman, C. J., P. E. G. Leonard, W. Kapiteijn, J. F. Bakker, A. Brouwer, M. H. Lamoree, J. Legler et H. J. C. Klamer (2007). "Sample preparation method for the ER-CALUX bioassay screening of (xeno-)estrogenic activity in sediment extracts." *Science of the Total Environment* **386**(1-3): 134-144.
- Houtman, C. J., C. P. Swart, M. H. Lamoree, J. Legler et A. Brouwer (2002). "DR- and ER-CALUX assays as tools to direct toxicity identification and evaluation of endocrine disrupting chemicals " *Organohalogen compounds* **58**.
- Houtman, C. J., A. M. Van Oostveen, A. Brouwer, M. H. Lamoree et J. Legler (2004). "Identification of estrogenic compounds in fish bile using bioassay-directed fractionation." *Environmental Science & Technology* **38**(23): 6415-6423.
- Huckins, J. M., J. D. Petty et K. Booij (2006). Monitors of Organic Chemicals in the Environment Semipermeable Membrane Devices, Springer.

- Huckins, J. N., J. D. Petty, J. A. Lebo, F. V. Almeida, K. Booij, D. A. Alvarez, R. C. Clark et B. B. Mogensen (2002). "Development of the permeability/performance reference compound approach for in situ calibration of semipermeable membrane devices." *Environmental Science & Technology* **36**(1): 85-91.
- Hurst, M. R., J. Balaam, Y. L. Chan-Man, J. E. Thain et K. V. Thomas (2004). "Determination of dioxin and dioxin-like compounds in sediments from UK estuaries using a bio-analytical approach: chemical-activated luciferase expression (CALUX) assay." *Marine Pollution Bulletin* **49**(7-8): 648-658.
- Ihunnah, C. A., M. Jiang et W. Xie (2011). "Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1812**(8): 956-963.
- Ikeuchi, T., T. Todo, T. Kobayashi et Y. Nagahama (2001). "Two subtypes of androgen and progesterone receptors in fish testes." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **129**(2-3): 449-455.
- Isidori, M., M. Bellotta, M. Cangiano et A. Parrella (2009). "Estrogenic activity of pharmaceuticals in the aquatic environment." *Environment International* **35**(5): 826-829.
- Isobe, T., S. Serizawa, T. Horiguchi, Y. Shibata, S. Managaki, H. Takada, M. Morita et H. Shiraishi (2006). "Horizontal distribution of steroid estrogens in surface sediments in Tokyo Bay." *Environmental Pollution* **144**(2): 632-638.
- Isobe, T., H. Takada, M. Kanai, S. Tsutsumi, K. O. Isobe, R. Boonyatumanond et M. P. Zakaria (2007). "Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and phenolic endocrine disrupting chemicals in south and southeast Asian mussels." *Environmental Monitoring and Assessment* **135**(1-3): 423-440.
- Jacobs, M. N., G. T. Nolan et S. R. Hood (2005). "Lignans, bacteriocides and organochlorine compounds activate the human pregnane X receptor (PXR)." *Toxicology and Applied Pharmacology* **209**(2): 123-133.
- Janosek, J., M. Bittner, K. Hilscherová, L. Bláha, J. P. Giesy et I. Holoubek (2007). "AhR-mediated and antiestrogenic activity of humic substances." *Chemosphere* **67**(6): 1096-1101.
- Janosek, J., K. Hilscherová, L. Bláha et I. Holoubek (2006). "Environmental xenobiotics and nuclear receptors--Interactions, effects and in vitro assessment." *Toxicology in Vitro* **20**(1): 18-37.
- Jeanneau, L., P. Faure et E. Jardé (2007). "Influence of natural organic matter on the solid-phase extraction of organic micropollutants: Application to the water-extract from highly contaminated river sediment." *Journal of Chromatography A* **1173**(1-2): 1-9.
- Jeannot, R., H. Sabik, E. Sauvard, T. Dagnac et K. Dohrendorf (2002). "Determination of endocrine-disrupting compounds in environmental samples using gas and liquid chromatography with mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **974**(1-2): 143-159.
- Jelic, A., M. Petrovic et D. Barcelo (2009). "Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry." *Talanta* **80**(1): 363-371.
- Jobling, S., R. W. Burn, K. Thorpe, R. Williams et C. Tyler (2009). "Statistical Modeling Suggests that Antiandrogens in Effluents from Wastewater Treatment Works Contribute to Widespread Sexual Disruption in Fish Living in English Rivers." *Environmental Health Perspectives* **117**(5): 797-802.
- Jobling, S., M. Nolan, C. R. Tyler, G. Brighty et J. P. Sumpter (1998). "Widespread sexual disruption in wild fish." *Environmental Science & Technology* **32**(17): 2498-2506.
- Johansson, M. K., J. T. Sanderson et B. O. Lund (2002). "Effects of 3-MeSO₂-DDE and some CYP inhibitors on glucocorticoid steroidogenesis in the H295R human adrenocortical carcinoma cell line." *Toxicology in Vitro* **16**(2): 113-121.
- Jones, D. G., X. Liang, E. L. Stewart, R. A. Noe, L. S. Kallander, K. P. Madauss, S. P. Williams, S. K. Thompson, D. W. Gray et W. J. Hoekstra (2005). "Discovery of non-steroidal mifepristone mimetics: Pyrazoline-based PR antagonists." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **15**(13): 3203-3206.
- Jones, S. A., L. B. Moore, J. L. Shenk, G. B. Wisely, G. A. Hamilton, D. D. McKee, N. C. O. Tomkinson, E. L. LeCluyse, M. H. Lambert, T. M. Willson, S. A. Kliewer et J. T. Moore (2000). "The pregnane x receptor: A promiscuous xenobiotic receptor that has diverged during evolution." *Molecular Endocrinology* **14**(1): 27-39.
- Jugan, M. L., M. Lévy-Bimbot, M. Pomérance, S. Tamisier-Karolak, J. P. Blondeau et Y. Lévi (2007). "A new bioluminescent cellular assay to measure the transcriptional effects of chemicals that modulate the alpha-I thyroid hormone receptor." *Toxicology in Vitro* **21**(6): 1197-1205.
- Jugan, M. L., L. Oziol, M. Bimbot, V. Huteau, S. Tamisier-Karolak, J. P. Blondeau et Y. Lévi (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)." *Science of the Total Environment* **407**(11): 3579-3587.
- Kaisarevic, S., U. L.-v. Varel, D. Orcic, G. Streck, T. Schulze, K. Pogrmic, I. Teodorovic, W. Brack et R. Kovacevic (2009). "Effect-directed analysis of contaminated sediment from the wastewater canal in Pancevo industrial area, Serbia." *Chemosphere* **77**(7): 907-13.

- Kashiwada, S., D. E. Hinton et S. W. Kullman (2005). "Functional characterization of medaka CYP3A38 and CYP3A40: Kinetics and catalysis by expression in a recombinant baculovirus system." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **141**(4): 338-348.
- Kavlock, R. J., G. P. Daston, C. DeRosa, P. FennerCrisp, L. E. Gray, S. Kaattari, G. Lucier, M. Luster, M. J. Mac, C. Maczka, R. Miller, J. Moore, R. Rolland, G. Scott, D. M. Sheehan, T. Sinks et H. A. Tilson (1996). "Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the US EPA-sponsored workshop." *Environmental Health Perspectives* **104**: 715-740.
- Keiter, S., S. Grund, B. van Bavel, J. Hagberg, M. Engwall, U. Kammann, M. Klempt, W. Manz, H. Olsman, T. Braunbeck et H. Hollert (2008). "Activities and identification of aryl hydrocarbon receptor agonists in sediments from the Danube river." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**(8): 2009-2019.
- Khim, J. S., K. Kannan, D. L. Villeneuve, C. H. Koh et J. P. Giesy (1999). "Characterization and distribution of trace organic contaminants in sediment from Masan Bay, Korea. 1. Instrumental analysis." *Environmental Science & Technology* **33**(23): 4199-4205.
- Khim, J. S., K. T. Lee, D. L. Villeneuve, K. Kannan, J. P. Giesy et C. H. Koh (2001). "In vitro bioassay determination of dioxin-like and estrogenic activity in sediment and water from Ulsan Bay and its vicinity, Korea." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **40**(2): 151-160.
- Khim, J. S., D. L. Villeneuve, K. Kannan, W. Y. Hu, J. P. Giesy, S. G. Kang, K. J. Song et C. H. Koh (2000). "Instrumental and bioanalytical measures of persistent organochlorines in blue mussel (*Mytilus edulis*) from Korean coastal waters." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **39**(3): 360-368.
- Kim, S. D., J. Cho, I. S. Kim, B. J. Vanderford et S. A. Snyder (2007). "Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters." *Water Research* **41**(5): 1013-1021.
- Kinani, S., S. Bouchonnet, S. Bourcier, N. Creusot, J. M. Porcher et S. Ait-Aissa (2008). "Extraction and purification procedures for simultaneous quantification of phenolic xenoestrogens and steroid estrogens in river sediment by gas chromatography/ion trap mass spectrometry." *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **22**(22): 3651-3661.
- Kinani, S., S. Bouchonnet, N. Creusot, S. Bourcier, P. Balaguer, J. M. Porcher et S. Ait-Aissa (2010). "Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers." *Environmental Pollution* **158**(1): 74-83.
- Kitamura, S., T. Suzuki, S. Sanoh, R. Kohta, N. Jinno, K. Sugihara, S. Yoshihara, N. Fujimoto, H. Watanabe et S. Ohta (2005). "Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds." *Toxicological Sciences* **84**(2): 249-259.
- Kliwer, S. A., B. Goodwin et T. M. Willson (2002). "The nuclear pregnane X receptor: A key regulator of xenobiotic metabolism." *Endocrine Reviews* **23**(5): 687-702.
- Kliwer, S. A., J. M. Lehmann et T. M. Willson (1999). "Orphan nuclear receptors: Shifting endocrinology into reverse." *Science* **284**(5415): 757-760.
- Kliwer, S. A., J. T. Moore, L. Wade, J. L. Staudinger, M. A. Watson, S. A. Jones, D. D. McKee, B. B. Oliver, T. M. Willson, R. H. Zetterstrom, T. Perlmann et J. M. Lehmann (1998). "An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway." *Cell* **92**(1): 73-82.
- Köhle, C. et K. W. Bock (2007). "Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2." *Biochemical Pharmacology* **73**(12): 1853-1862.
- Kojima, H., F. Sata, S. Takeuchi, T. Sueyoshi et T. Nagai (2010a). "Comparative study of human and mouse pregnane X receptor agonistic activity in 200 pesticides using in vitro reporter gene assays." *Toxicology* **280**(3): 77-87.
- Kojima, H., S. Takeuchi et T. Nagai (2010b). "Endocrine-disrupting Potential of Pesticides via Nuclear Receptors and Aryl Hydrocarbon Receptor." *Journal of Health Science* **56**(4): 374-386.
- Krauss, M. et J. Hollender (2008). "Analysis of nitrosamines in wastewater: Exploring the trace level quantification capabilities of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer." *Analytical Chemistry* **80**(3): 834-842.
- Krauss, M., H. Singer et J. Hollender (2010). "LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **397**(3).
- Kretschmer, X. C. et W. S. Baldwin (2005). "CAR and PXR: Xenosensors of endocrine disruptors?" *Chemico-Biological Interactions* **155**(3): 111-128.
- Kruger, T., M. Long et E. C. Bonefeld-Jorgensen (2008). "Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor." *Toxicology* **246**(2-3): 112-123.
- Kugathas, S. (2011). "Synthetic glucocorticoids in the environment: first results on their potential impacts on fish." *Environmental Science & Technology*.
- Kuiper, G., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Haggblad, S. Nilsson et J. A. Gustafsson (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." *Endocrinology* **138**(3): 863-870.

- Kunz, P. Y. et K. Fent (2009). "Estrogenic activity of ternary UV filter mixtures in fish (*Pimephales promelas*) - An analysis with nonlinear isobolograms." *Toxicology and Applied Pharmacology* **234**(1): 77-88.
- Labadie, P. et H. Budzinski (2005). "Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France)." *Environmental Science & Technology* **39**(14): 5113-5120.
- Labadie, P. et E. M. Hill (2007). "Analysis of estrogens in river sediments by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry - Comparison of tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1141**(2): 174-181.
- Lagana, A., A. Bacaloni, I. De Leva, A. Faberi, G. Fago et A. Marino (2004). "Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters." *Analytica Chimica Acta* **501**(1): 79-88.
- Laudet, V. (1997). "Evolution of the nuclear receptor superfamily: early diversification from an ancestral orphan receptor." *Journal of Molecular Endocrinology* **19**(3): 207-226.
- Laville, N., S. Ait-Aissa, E. Gomez, C. Casellas et J. M. Porcher (2004). "Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes." *Toxicology* **196**(1-2): 41-55.
- Laws, S. C., S. A. Carey, J. M. Ferrell, G. J. Bodman et R. L. Cooper (2000). "Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats." *Toxicological Sciences* **54**(1): 154-167.
- Le Maire, A., W. Bourguet et P. Balaguer (2010). "A structural view of nuclear hormone receptor: endocrine disruptor interactions." *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**(8): 1219-1237.
- le Maire, A., M. Grimaldi, D. Roecklin, S. Dagnino, V. Vivat-Hannah, P. Balaguer et W. Bourguet (2009). "Activation of RXR-PPAR heterodimers by organotin environmental endocrine disruptors." *Embo Reports* **10**(4): 367-373.
- Legler, J., C. E. van den Brink, A. Brouwer, A. J. Murk, P. T. van der Saag, A. D. Vethaak et P. van der Burg (1999). "Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line." *Toxicological Sciences* **48**(1): 55-66.
- Lemaire, G., G. de Sousa et R. Rahmani (2004). "A PXR reporter gene assay in a stable cell culture system: CYP3A4 and CYP2B6 induction by pesticides." *Biochemical Pharmacology* **68**(12): 2347-2358.
- Lemaire, G., W. Mnif, J. M. Pascussi, A. Pillon, F. Rabenoelina, H. Fenet, E. Gomez, C. Casellas, J. C. Nicolas, V. Cavaillès, M. J. Duchesne et P. Balaguer (2006). "Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system." *Toxicological Sciences* **91**(2): 501-509.
- Leonards, P. et M. Lamoree (2008). "Network of reference laboratories and related organisations for monitoring and bio-monitoring of emerging environmental pollutants." *Norman Framework*
- Leppänen, M. T. et J. V. K. Kukkonen (2006). "Evaluating the role of desorption in bioavailability of sediment-associated contaminants using oligochaetes, semipermeable membrane devices and Tenax extraction." *Environmental Pollution* **140**(1): 150-163.
- Lethimonier, C., G. Flouriot, Y. Valotaire, O. Kah et B. Ducouret (2000). "Transcriptional interference between glucocorticoid receptor and estradiol receptor mediates the inhibitory effect of cortisol on fish vitellogenesis." *Biology of Reproduction* **62**(6): 1763-1771.
- Li, D., X. L. Yang, S. J. Zhang, M. Lin, W. J. Yu et K. Hu (2008). "Effects of mammalian CYP3A inducers on CYP3A-related enzyme activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): Possible implications for the establishment of a fish CYP3A induction model." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **147**(1): 17-29.
- Li, J. et F. Al-Azzawi (2009). "Mechanism of androgen receptor action." *Maturitas* **63**(2): 142-148.
- Liu, H. X., Q. H. Zhang, M. Y. Song, G. B. Jiang et Z. W. Cai (2006). Method development for the analysis of polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzo-furans in single extract of sediment samples. China/Japan/Korea Environmental Analytical Chemistry Symposium, Chiba, JAPAN, Elsevier Science Bv.
- Loomis, A. K. et P. Thomas (2000). "Effects of estrogens and xenoestrogens on androgen production by Atlantic croaker testes in vitro: Evidence for a nongenomic action mediated by an estrogen membrane receptor." *Biology of Reproduction* **62**(4): 995-1004.
- López-Roldán, R., M. L. de Alda, M. Gros, M. Petrovic, J. Martín-Alonso et D. Barceló (2010). "Advanced monitoring of pharmaceuticals and estrogens in the Llobregat River basin (Spain) by liquid chromatography-triple quadrupole-tandem mass spectrometry in combination with ultra performance liquid chromatography-time of flight-mass spectrometry." *Chemosphere* **80**(11): 1337-1344.
- Louiz, I., S. Kinani, M. E. Gouze, M. Ben-Attia, D. Menif, S. Bouchonnet, J. M. Porcher, O. K. Ben-Hassine et S. Ait-Aissa (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)." *Science of the Total Environment* **402**(2-3): 318-329.
- Lovekamp, T. N. et B. J. Davis (2001). "Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* **172**(3): 217-224.

- Lubcke-von Varel, U., G. Streck et W. Brack (2008). "Automated fractionation procedure for polycyclic aromatic compounds in sediment extracts on three coupled normal-phase high-performance liquid chromatography columns." *Journal of Chromatography A* **1185**(1): 31-42.
- Luebecke-von Varel, U., M. Machala, M. Ciganek, J. Neca, K. Pencikova, L. Palkova, J. Vondracek, I. Loeffler, G. Streck, G. Reifferscheid, S. Flueckiger-Isler, J. M. Weiss, M. Lamoree et W. Brack (2011). "Polar Compounds Dominate in Vitro Effects of Sediment Extracts." *Environmental Science & Technology* **45**(6): 2384-2390.
- Machala, M., J. Vondracek, L. Blaha, M. Ciganek et J. Neca (2001). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay." *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **497**(1-2): 49-62.
- Mangelsdorf, D. J., C. Thummel, M. Beato, P. Herrlich, G. Schütz, K. Umesono, B. Blumberg, P. Kastner, M. Mark, P. Chambon et R. M. Evans (1995). "The nuclear receptor superfamily: The second decade." *Cell* **83**(6): 835-839.
- Marty, M. S., E. W. Carney et J. C. Rowlands (2010). "Endocrine Disruption: Historical Perspectives and its Impact on the Future of Toxicology Testing." *Toxicological Sciences*: S93-S108.
- Matthews, J. et J.-A. Gustafsson (2006). "Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways." *Nuclear Receptor Signaling* **4**: e016.
- Matthiessen, P. et P. E. Gibbs (1998). "Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks." *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**(1): 37-43.
- Matthiessen, P. et I. Johnson (2007). "Implications of research on endocrine disruption for the environmental risk assessment, regulation and monitoring of chemicals in the European Union." *Environmental Pollution* **146**(1): 9-18.
- Mazzella, N., T. Debenest et F. Delmas (2008). "Comparison between the polar organic chemical integrative sampler and the solid-phase extraction for estimating herbicide time-weighted average concentrations during a microcosm experiment." *Chemosphere* **73**(4).
- McArthur, A. G., T. Hegelund, R. L. Cox, J. J. Stegeman, M. Liljenberg, U. Olsson, P. Sundberg et M. C. Celander (2003). "Phylogenetic analysis of the cytochrome P450 3 (CYP3) gene family." *Journal of Molecular Evolution* **57**(2): 200-211.
- McArthur, M. L. B., G. A. Fox, D. B. Peakall et B. J. R. Philogene (1983). "Ecological Significance of Behavioral and Hormonal Abnormalities in Breeding Ring Doves Fed an Organochlorine Chemical-Mixture." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **12**(3): 343-353.
- McKinlay, R., J. A. Plant, J. N. B. Bell et N. Voulvoulis (2008). "Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment." *Environment International* **34**(2): 168-183.
- Mensah-Osman, E. J., D. G. Thomas, M. M. Tabb, J. M. Larios, D. R. Hughes, T. J. Giordano, M. L. Lizyness, J. M. Rae, B. Blumberg, P. F. Hollenberg et L. H. Baker (2007). "Expression levels and activation of a PXR variant are directly related to drug resistance in osteosarcoma cell lines." *Cancer* **109**(5): 957-965.
- Menuet, A., E. Pellegrini, I. Anglade, O. Blaise, V. Laudet, O. Kah et F. Pakdel (2002). "Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: Binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions." *Biology of Reproduction* **66**(6): 1881-1892.
- Mesiano, S., S. L. Katz, J. Y. Lee et R. B. Jaffe (1999). "Phytoestrogens alter adrenocortical function: Genistein and daidzein suppress glucocorticoid and stimulate androgen production by cultured adrenal cortical cells." *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **84**(7): 2443-2448.
- Meucci, V. et A. Arukwe (2006). "The xenoestrogen 4-nonylphenol modulates hepatic gene expression of pregnane X receptor, aryl hydrocarbon receptor, CYP3A and CYP1A1 in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*)." *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* **142**(1-2): 142-150.
- Michalik, L., J. Auwerx, J. P. Berger, V. K. Chatterjee, C. K. Glass, F. J. Gonzalez, P. A. Grimaldi, T. Kadowaki, M. A. Lazar, S. O'Rahilly, C. N. A. Palmer, J. Plutzky, J. K. Reddy, B. M. Spiegelman, B. Staels et W. Wahli (2006). "International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors." *Pharmacological Reviews* **58**(4): 726-741.
- Milnes, M. R., A. Garcia, E. Grossman, F. Grun, J. Shiotsugu, M. M. Tabb, Y. Kawashima, Y. Katsu, H. Watanabe, T. Iguchi et B. Blumberg (2008). "Activation of steroid and xenobiotic receptor (SXR, NR1I2) and its orthologs in laboratory, toxicologic, and genome model species." *Environmental Health Perspectives* **116**(7): 880-885.
- Miranda, C. L., M. C. Henderson et D. R. Buhler (1998). "Evaluation of chemicals as inhibitors of trout cytochrome P450s." *Toxicology and Applied Pharmacology* **148**(2): 237-244.
- Mnif, W., S. Dagnino, A. Escande, A. Pillon, H. Fenet, E. Gomez, C. Casellas, M. J. Duchesne, G. Hernandez-Raquet, V. Cavailles, P. Balaguer et A. Bartegi (2010). "Biological Analysis of Endocrine-Disrupting Compounds in Tunisian Sewage Treatment Plants." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **59**(1): 1-12.
- Mnif, W., J. M. Pascussi, A. Pillon, A. Escande, A. Bartegi, J. C. Nicolas, V. Cavailles, M. J. Duchesne et P. Balaguer (2007). "Estrogens and antiestrogens activate hPXR." *Toxicology Letters* **170**(1): 19-29.

- Molina-Molina, J.-M., A. Escande, A. Pillon, E. Gomez, F. Pakdel, V. Cavaillès, N. Olea, S. Aït-Aïssa et P. Balaguer (2008). "Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific in vitro bioassays." *Toxicology and Applied Pharmacology* **232**(3): 384-395.
- Molina-Molina, J. M., A. Hillenweck, I. Jouanin, D. Zalko, J. P. Cravedi, M. F. Fernandez, A. Pillon, J. C. Nicolas, N. Olea et P. Balaguer (2006). "Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites." *Toxicology and Applied Pharmacology* **216**(1): 44-54.
- Moore, J. T. et S. A. Kliewer (2000). "Use of the nuclear receptor PXR to predict drug interactions." *Toxicology* **153**(1-3): 1-10.
- Moore, L. B., J. M. Maglich, D. D. McKee, B. Wisely, T. M. Willson, S. A. Kliewer, M. H. Lambert et J. T. Moore (2002). "Pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), and benzoate X receptor (BXR) define three pharmacologically distinct classes of nuclear receptors." *Molecular Endocrinology* **16**(5): 977-986.
- Mortensen, A. S. et A. Arukwe (2006). "The persistent DDT metabolite, 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene, alters thyroid hormone-dependent genes, hepatic cytochrome P4503A, and pregnane X receptor gene expressions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr." *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**(6): 1607-1615.
- Mortensen, A. S. et A. Arukwe (2007). "Effects of 17 alpha-ethynylestradiol on hormonal responses and xenobiotic biotransformation system of Atlantic salmon (*Salmo salar*)." *Aquatic Toxicology* **85**: 113-123.
- Mortensen, A. S., R. J. Letcher, M. V. Cangialosi, S. Chu et A. Arukwe (2011). "Tissue bioaccumulation patterns, xenobiotic biotransformation and steroid hormone levels in Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed a diet containing perfluoroactane sulfonic or perfluorooctane carboxylic acids." *Chemosphere* **83**(8): 1035-1044.
- Mortensen, A. S., C. C. Tolfen et A. Arukwe (2006). "Gene expression patterns in estrogen (nonylphenol) and aryl hydrocarbon receptor agonists (PCB-77) interaction using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) primary hepatocyte culture." *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* **69**(1-2): 1-19.
- Mottaleb, M. A., S. Usenko, J. G. O'Donnell, A. J. Ramirez, B. W. Brooks et C. K. Chambliss (2009). "Gas chromatography-mass spectrometry screening methods for select UV filters, synthetic musks, alkylphenols, an antimicrobial agent, and an insect repellent in fish." *Journal of Chromatography A* **1216**(5): 815-823.
- Mueller, S. O. (2002). "Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens." *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **777**(1-2): 155-165.
- Muller, E., C. Osenberg, R. Schmitt, S. Holbrook et R. Nisbet (2010). "Sublethal toxicant effects with dynamic energy budget theory: application to mussel outplants." *Ecotoxicology* **19**(1): 38-47.
- Murk, A. J., J. Legler, M. S. Denison, J. P. Giesy, C. vandeGuchte et A. Brouwer (1996). "Chemical-activated luciferase gene expression (CALUX): A novel in vitro bioassay for Ah receptor active compounds in sediments and pore water." *Fundamental and Applied Toxicology* **33**(1): 149-160.
- Nagahama, Y. (1994). "Endocrine Regulation of Gametogenesis in Fish." *International Journal of Developmental Biology* **38**(2): 217-229.
- Nagy, S. R., J. R. Sanborn, B. D. Hammock et M. S. Denison (2002). "Development of a green fluorescent protein-based cell Bioassay for the rapid and inexpensive detection and characterization of Ah receptor agonists." *Toxicological Sciences* **65**(2): 200-210.
- Nash, J. P., D. E. Kime, L. T. M. Van der Ven, P. W. Wester, F. Brion, G. Maack, P. Stahlschmidt-Allner et C. R. Tyler (2004). "Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish." *Environmental Health Perspectives* **112**(17): 1725-1733.
- Nashev, L. G., D. Schuster, C. Laggner, S. Sodha, T. Langer, G. Wolber et A. Odermatt (2010). "The UV-filter benzophenone-1 inhibits 17[beta]-hydroxysteroid dehydrogenase type 3: Virtual screening as a strategy to identify potential endocrine disrupting chemicals." *Biochemical Pharmacology* **79**(8): 1189-1199.
- Navarro-Ortega, A., R. Tauler, S. Lacorte et D. Barceló (2010). "Occurrence and transport of PAHs, pesticides and alkylphenols in sediment samples along the Ebro River Basin." *Journal of Hydrology* **383**(1-2): 5-17.
- Nelson, E. R. et H. R. Habibi (2009). "Thyroid receptor subtypes: Structure and function in fish." *General and Comparative Endocrinology* **161**(1): 90-96.
- Neubig (2003). "International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology." *Pharmacological Reviews* **55**(4).
- Nieto, A., F. Borrull, E. Pocurull et R. M. Marc (2007). "Pressurized liquid extraction of pharmaceuticals from sewage-sludge." *Journal of Separation Science* **30**(7): 979-984.

- Nieto, A., F. Borrull, E. Pocurull et R. M. Marce (2008). "Determination of natural and synthetic estrogens and their conjugates in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1213**(2): 224-230.
- Nishikawa, J., S. Mamiya, T. Kanayama, T. Nishikawa, F. Shiraishi et T. Horiguchi (2004). "Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods." *Environmental Science & Technology* **38**(23): 6271-6276.
- Nishizaki, Y., Y. Ishimoto, Y. Hotta, A. Hosoda, H. Yoshikawa, M. Akamatsu et H. Tamura (2009). "Effect of flavonoids on androgen and glucocorticoid receptors based on in vitro reporter gene assay." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **19**(16): 4706-4710.
- Niwa, T., Y. Maekawa, M. Fujimoto, K. Kishimoto, Y. Yabusaki, F. Ishibashi et M. Katagiri (2002). "Inhibition of human hepatic cytochrome P450s and steroidogenic CYP17 by nonylphenol." *Biological & Pharmaceutical Bulletin* **25**(2235): 235-238.
- Noury, P., O. Geffard, R. Tutundjian et J. Garric (2006). "Non destructive in vivo measurement of ethoxyresorufin biotransformation by zebrafish prolarva: Development and application." *Environmental Toxicology* **21**(4): 324-331.
- Odermatt, A. et C. Gumy (2008). "Glucocorticoid and mineralocorticoid action: Why should we consider influences by environmental chemicals?" *Biochemical Pharmacology* **76**(10): 1184-1193.
- Odermatt, A., C. Gumy, A. G. Atanasov et A. A. Dzyakanchuk (2006). "Disruption of glucocorticoid action by environmental chemicals: Potential mechanisms and relevance." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **102**(1-5): 222-231.
- Ohno, S., S. Shinoda, S. Toyoshima, H. Nakazawa, T. Makino et S. Nakajin (2002). "Effects of flavonoid phytochemicals on cortisol production and on activities of steroidogenic enzymes in human adrenocortical H295R cells." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **80**(3): 355-363.
- Ohtake, F., A. Baba, I. Takada, M. Okada, K. Iwasaki, H. Miki, S. Takahashi, A. Kouzmenko, K. Nohara, T. Chiba, Y. Fujii-Kuriyama et S. Kato (2007). "Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase." *Nature* **446**(7135): 562-566.
- Ohtake, F., K. Takeyama, T. Matsumoto, H. Kitagawa, Y. Yamamoto, K. Nohara, C. Tohyama, A. Krust, J. Mimura, P. Chambon, J. Yanagisawa, Y. Fujii-Kuriyama et S. Kato (2003). "Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor." *Nature* **423**(6939): 545-550.
- Pacyniak, E. K., X. G. Cheng, M. L. Cunningham, K. Crofton, C. D. Klaassen et G. L. Guo (2007). "The flame retardants, polybrominated diphenyl ethers, are pregnane X receptor activators." *Toxicological Sciences* **97**(1): 94-102.
- Paris, F., N. Servant, B. Terouanne et C. Sultan (2002). "Evaluation of androgenic bioactivity in human serum by recombinant cell line: preliminary results." *Molecular and Cellular Endocrinology* **198**(1-2): 123-129.
- Parks, L. G., C. S. Lambright, E. F. Orlando, L. J. Guillette, G. T. Ankley et L. E. Gray (2001). "Masculinization of female mosquitofish in kraft mill effluent-contaminated Fenholloway River water is associated with androgen receptor agonist activity." *Toxicological Sciences* **62**(2): 257-267.
- Pascussi, J. M., L. Drocourt, J. M. Fabre, P. Maurel et M. J. Vilarem (2000). "Dexamethasone induces pregnane X receptor and retinoid X receptor-alpha expression in human hepatocytes: Synergistic increase of CYP3A4 induction by pregnane X receptor activators." *Molecular Pharmacology* **58**(2): 361-372.
- Pascussi, J. M., S. Gerbal-Chaloin, L. Drocourt, P. Maurel et W. Vilarem (2003). The expression of CYP2B6, CYP2C9 and CYP3A4 genes: a tangle of networks of nuclear and steroid receptors. 12th International Symposium on Cellular Biology of Cytochrome P450 Regulation, La Grande Motte, France, Elsevier Science Bv.
- Pascussi, J. M., S. Gerbal-Chaloin, C. Duret, M. Daujot-Chavanieu, M. J. Vilarem et P. Maurel (2008). "The tangle of nuclear receptors that controls xenobiotic metabolism and transport: Crosstalk and consequences." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **48**: 1-32.
- Paulos, P., T. J. Runnalls, G. Nallani, T. La Point, A. P. Scott, J. P. Sumpter et D. B. Huggett (2011). "Reproductive responses in fathead minnow and Japanese medaka following exposure to a synthetic progestin, Norethindrone." *Aquatic Toxicology* **99**(2): 256-262.
- Pavlikova, N., T. M. Kortner et A. Arukwe (2010). "Modulation of acute steroidogenesis, peroxisome proliferator-activated receptors and CYP3A/PXR in salmon interrenal tissues by tributyltin and the second messenger activator, forskolin." *Chemico-Biological Interactions* **185**(2): 119-127.
- Pelkonen, O., M. Turpeinen, J. Hakkola, P. Honkakoski, J. Hukkanen et H. Raunio (2008). "Inhibition and induction of human cytochrome P450 enzymes: current status." *Archives of Toxicology* **82**(10): 667-715.
- Petrovic, M. et D. Barcelo (2006). "Application of liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QqTOF-MS) in the environmental analysis." *Journal of Mass Spectrometry* **41**(10): 1259-1267.
- Petrovic, M. et D. Barceló (2007). "LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment." *Trends in Analytical Chemistry* **26**(6): 486-493.

- Petrovic, M., S. Lacorte, P. Viana et D. Barcelo (2002). "Pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenolic compounds in river sediment." *Journal of Chromatography A* **959**(1-2): 15-23.
- Pillon, A., A. M. Boussioux, A. Escande, S. Ait-Aissa, E. Gomez, H. Fenet, M. Ruff, D. Moras, F. Vignon, M. J. Duchesne, C. Casellas, J. C. Nicolas et P. Balaguer (2005). "Binding of Estrogenic Compounds to Recombinant Estrogen Receptor- α : Application to Environmental Analysis." *Environmental Health Perspectives* **113**(3): 278-284.
- Pinter, J. et P. Thomas (1999). "Induction of ovulation of mature oocytes by the maturation-inducing steroid 17,20 beta,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in the spotted seatrout." *General and Comparative Endocrinology* **115**(2): 200-209.
- Poland, A., E. Glover et A. Kende (1976). "Stereospecific high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase." *Journal of Biological Chemistry* **251**: 4936-4946.
- Pollack, S. J., M. A. Ottinger, C. V. Sullivan et L. C. Woods ((2003). "The effects of the soy isoflavone genistein on the reproductive development of striped bass." *North American Journal of Aquaculture* **65**(3): 226-234.
- Pollenz, R. S., B. Necela et K. Marks-Sojka (2002). "Analysis of rainbow trout Ah receptor protein isoforms in cell culture reveals conservation of function in Ah receptor-mediated signal transduction." *Biochemical Pharmacology* **64**(1): 49-60.
- Pomati, F., C. J. Cotsapas, S. Castiglioni, E. Zuccato et D. Calamari (2007). "Gene expression profiles in zebrafish (*Danio rerio*) liver cells exposed to a mixture of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations." *Chemosphere* **70**(1): 65-73.
- Pons, M., D. Gagne, J. C. Nicolas et M. Mehtali (1990). "A New Cellular-Model of Response to Estrogens - a Bioluminescent Test to Characterize (Anti)Estrogen Molecules." *Biotechniques* **9**(4): 450-&.
- Prunet, P., A. Sturm et S. Milla (2006). "Multiple corticosteroid receptors in fish: From old ideas to new concepts." *General and Comparative Endocrinology* **147**(1): 17-23.
- Radjenovic, J., A. Jelic, M. Petrovic et D. Barcelo (2009). "Determination of pharmaceuticals in sewage sludge by pressurized liquid extraction (PLE) coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**(6-7): 1685-1695.
- Raftogianis, R., C. Creveling, R. Weinsilboum et J. Weisz (2000). "Estrogen metabolism by conjugation." *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*(27): 113-24.
- Rashid, S. et G. F. Lewis (2005). "The mechanisms of differential glucocorticoid and mineralocorticoid action in the brain and peripheral tissues." *Clinical Biochemistry* **38**(5): 401-409.
- Rastall, A. C., D. Getting, J. Goddard, D. R. Roberts et L. Erdinger (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." *Environmental Science and Pollution Research* **13**(4): 256-267.
- Raucy, J., L. Warfe, M. F. Yueh et S. W. Allen (2002). "A cell-based reporter gene assay for determining induction of CYP3A4 in a high-volume system." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **303**(1): 412-423.
- Reddy, S., C. R. Iden et B. J. Brownawell (2005). "Analysis of steroid conjugates in sewage influent and effluent by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Analytical Chemistry* **77**(21): 7032-7038.
- Reijnders, P. J. H. (1986). "Reproductive Failure in Common Seals Feeding on Fish from Polluted Coastal Waters." *Nature* **324**(6096): 456-&.
- Reschly, E. J., A. C. D. Bairy, J. J. Mattos, L. R. Hagey, N. Bahary, S. R. Mada, J. Ou, R. Venkataramanan et M. D. Krasowski (2007). "Functional evolution of the vitamin D and pregnane X receptors." *BMC Evolutionary Biology* **7**.
- Reschly, E. J. et M. D. Krasowski (2006). "Evolution and function of the NR1I nuclear hormone receptor subfamily (VDR, PXR, and CAR) with respect to metabolism of xenobiotics and endogenous compounds." *Current Drug Metabolism* **7**(4): 349-365.
- Rice, S. L. et S. Mitra (2007). "Microwave-assisted solvent extraction of solid matrices and subsequent detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) using gas chromatography-mass spectrometry." *Analytica Chimica Acta* **589**(1): 125-132.
- Richardson, S. D. (2008). "Environmental Mass Spectrometry: Emerging Contaminants and Current Issues." *Analytical Chemistry* **80**(12): 4373-4402.
- Riu, A., P. Balaguer, E. Perdu, M. Pandelova, R. Piccinelli, J. A. Gustafsson, C. Leclercq, K. W. Schramm, S. Dagnino, L. Debrauwer, J. P. Cravedi et D. Zalko (2008). "Characterisation of bioactive compounds in infant formulas using immobilised recombinant estrogen receptor-[α] affinity columns." *Food and Chemical Toxicology* **46**(10): 3268-3278.
- Rodil, R. et M. Moeder (2008). "Development of a simultaneous pressurised-liquid extraction and clean-up procedure for the determination of UV filters in sediments." *Analytica Chimica Acta* **612**(2): 152-159.

- Rogers, J. M. et M. S. Denison (2000). "Recombinant cell bioassays for endocrine disruptors: Development of a stably transfected human ovarian cell line for the detection of estrogenic and anti-estrogenic chemicals." *In Vitro & Molecular Toxicology-a Journal of Basic and Applied Research* **13**(1): 67-82.
- Routledge, E. J. et J. P. Sumpter (1996). "Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen." *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**(3): 241-248.
- Roy, P., H. Salminen, P. Koskimies, J. Simola, A. Smeds, P. Saukko et I. T. Huhtaniemi (2004). "Screening of some anti-androgenic endocrine disruptors using a recombinant cell-based in vitro bioassay." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **88**(2): 157-166.
- Runnalls, T. J., L. Margiotta-Casaluci, S. Kugathas et J. P. Sumpter (2010). "Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: Steroids and Anti-Steroids as High Priorities for Research." *Human and Ecological Risk Assessment* **16**(6): 1318-1338.
- Safe, S. (2001). "Molecular biology of the Ah receptor and its role in carcinogenesis." *Toxicology Letters* **120**: 1-7.
- Safe, S., M. Wormke et I. Samudio (2000). "Mechanisms of Inhibitory Aryl Hydrocarbon Receptor-Estrogen Receptor Crosstalk in Human Breast Cancer Cells." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* **5**(3): 295-306.
- Sanchez, W., S. Ait-Aissa, O. Palluel, J.-M. Ditche et J.-M. Porcher (2007). "Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams." *Ecotoxicology* **16**(2): 279-287.
- Sanchez, W., W. Sremski, B. Piccini, O. Palluel, E. Maillot-Marechal, S. Betoulle, A. Jaffal, S. Ait-Aissa, F. Brion, E. Thybaud, N. Hinfray et J.-M. Porcher (2011). "Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges." *Environment International* **37**(8): 1342-1348.
- Sanctorum, H., I. Windal, V. Hanot, L. Goeyens et W. Baeyens (2007). "Dioxin and dioxin-like activity in sediments of the belgian coastal area (Southern north sea)." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **52**(3): 317-325.
- Sanderson, J. T., J. Boerma, G. W. A. Lansbergen et M. van den Berg (2002). "Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* **182**(1): 44-54.
- Sanderson, J. T., W. Seinen, J. P. Giesy et M. van den Berg (2000). "2-chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: A novel mechanism for estrogenicity?" *Toxicological Sciences* **54**(1): 121-127.
- Sanderson, T. et M. van den Berg (2003). "Interactions of xenobiotics with the steroid hormone biosynthesis pathway." *Pure and Applied Chemistry* **75**(11-12): 1957-1971.
- Sanseverino, J., M. L. Eldridge, A. C. Layton, J. P. Easter, J. Yarbrough, T. W. Schultz et G. S. Sayler (2009). "Screening of Potentially Hormonally Active Chemicals using Bioluminescent Yeast Bioreporters." *Toxicological Sciences* **107**(1): 122-134.
- Satoh, K., R. Nonaka, K. Ohyama et F. Nagai (2005). "Androgenic and antiandrogenic effects of alkylphenols and parabens assessed using the reporter gene assay with stably transfected CHO-K1 cells (AR-EcoScreen System)." *Journal of Health Science* **51**(5): 557-568.
- Schaaf, M. J. M., A. Chatzopoulou et H. P. Spaink (2009). "The zebrafish as a model system for glucocorticoid receptor research." *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* **153**(1): 75-82.
- Schlenk, D. (2008). "Are steroids really the cause for fish feminization? A mini-review of in vitro and in vivo guided TIEs." *Marine Pollution Bulletin* **57**(6-12): 250-254.
- Schlenk, D., M. Celander, E. P. Gallagher, S. George, M. James, S. W. Kullman, P. van den Hurk et K. Willett (2008). Biotransformation in Fishes. *The toxicology of fishes* R. T. Di Giulio and D. E. Hinton, CRC Press - Taylor & Francis Group: 153-234.
- Schmitt, C., J. Balaam, P. Leonards, R. Brix, G. Streck, A. Tuikka, L. Bervoets, W. Brack, B. van Hattum, P. Meire et E. de Deckere (2010a). "Characterizing field sediments from three European river basins with special emphasis on endocrine effects - A recommendation for Potamopyrgus antipodarum as test organism." *Chemosphere* **80**(1): 13-19.
- Schmitt, C., G. Streck, M. Lamoree, P. Leonards, W. Brack et E. de Deckere (2010b). "Effect Directed Analysis of riverine sediments-the usefulness of Potamopyrgus antipodarum for in vivo effect confirmation of endocrine disruption." *Aquatic Toxicology* **101**(1): 237-243.
- Scholz, S. et I. Mayer (2008). "Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish." *Molecular and Cellular Endocrinology* **293**(1-2): 57-70.
- Schoonen, W., R. J. H. de Ries, J. W. H. Joosten, G. J. W. Mathijssen-Mommers et H. J. Kloosterboer (1998). "Development of a high-throughput in vitro bioassay to assess potencies of progestagenic compounds using Chinese hamster ovary cells stably transfected with the human progesterone receptor and a luciferase reporter system." *Analytical Biochemistry* **261**(2): 222-224.

- Schriks, M. (2006). Novel in vitro, ex vitro, in vivo assays elucidating the effect of endocrine disrupting compounds (EDCs) on thyroid hormones action. *Department of Toxicology*, Wageningen University.
- Schriks, M., J. A. van Leerdam, S. C. van der Linden, B. van der Burg, A. P. van Wezel et P. de Voogt (2010). "High-Resolution Mass Spectrometric Identification and Quantification of Glucocorticoid Compounds in Various Wastewaters in The Netherlands." *Environmental Science & Technology* **44**(12): 4766-4774.
- Schulze, T., S. Weiss, E. Schymanski, P. C. von der Ohe, M. Schmitt-Jansen, R. Altenburger, G. Streck et W. Brack (2010). "Identification of a phytotoxic photo-transformation product of diclofenac using effect-directed analysis." *Environmental Pollution* **158**(5): 1461-1466.
- Schwab, K., R. Altenburger, U. Lubcke-von Varel, G. Streck et W. Brack (2009). "Effect-Directed Analysis of Sediment-Associated Algal Toxicants at Selected Hot Spots in the River Elbe Basin with a Special Focus on Bioaccessibility." *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**(7): 1506-1517.
- Schymanski, E. L., M. Bataineh, K. U. Goss et W. Brack (2009). "Integrated analytical and computer tools for structure elucidation in effect-directed analysis." *Trends in Analytical Chemistry* **28**(5): 550-561.
- Schymanski, E. L., C. Meinert, M. Meringer et W. Brack (2008). "The use of MS classifiers and structure generation to assist in the identification of unknowns in effect-directed analysis." *Analytica Chimica Acta* **615**(2): 136-147.
- Schymanski, E. L., M. Meringer et W. Brack (2011). "Automated Strategies To Identify Compounds on the Basis of GC/EL-MS and Calculated Properties." *Analytical Chemistry* **83**(3): 903-912.
- Scippo, M. L., C. Argiris, C. Van de Weerd, M. Muller, P. Willemsen, J. Martial et G. Maghuin-Rogister (2004). "Recombinant human estrogen, androgen and progesterone receptors for detection of potential endocrine disruptors." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **378**(3): 664-669.
- Seiler, T. B., A. C. Rastall, E. Leist, L. Erdinger, T. Braunbeck et H. Hollert (2006). "Membrane dialysis extraction (MDE): A novel approach for extracting toxicologically relevant hydrophobic organic compounds from soils and sediments for assessment in biotests." *Journal of Soils and Sediments* **6**(1): 20-29.
- Seiler, T. B., T. Schulze et H. Hollert (2008). "The risk of altering soil and sediment samples upon extract preparation for analytical and bio-analytical investigations - a review." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **390**(8): 1975-1985.
- Seimandi, M., G. Lemaire, A. Pillon, A. Perrin, I. Carlvann, J. J. Voegel, F. Vignon, J. C. Nicolas et P. Balaguer (2005). "Differential responses of PPAR alpha, PPAR delta, and PPAR gamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands." *Analytical Biochemistry* **344**(1): 8-15.
- Sendak, R. A., F. Wang, L. B. Geagan, L. A. Armstrong, C. D. Thyne, E. S. Cole et R. J. Mattaliano (2002). "Comparison of two in vitro methods for the measurement of recombinant human TSH bioactivity." *Biologicals* **30**(3): 245-254.
- Shen, C. F., S. B. Huang, Z. J. Wang, M. Qiao, X. J. Tang, C. N. Yu, D. Z. Shi, Y. F. Zhu, J. Y. Shi, X. C. Chen, K. Setty et Y. X. Chen (2008). "Identification of Ah receptor agonists in soil of E-waste recycling sites from Taizhou area in China." *Environmental Science & Technology* **42**(1): 49-55.
- Shipley, J. M. et D. J. Waxman (2006). "Aryl hydrocarbon receptor-independent activation of estrogen receptor-dependent transcription by 3-methylcholanthrene." *Toxicology and Applied Pharmacology* **213**(2): 87-97.
- Simon, E., M. H. Lamoree, T. Hamers, J. M. Weiss, J. Balaam, J. de Boer et P. E. G. Leonards (2011). "Testing Endocrine Disruption in Biota Samples: A Method to Remove Interfering Lipids and Natural Hormones." *Environmental Science & Technology* **44**(21): 8322-8329.
- Sinz, M., S. Kim, Z. R. Zhu, T. S. Chen, M. Anthony, K. Dickinson et A. D. Rodrigues (2006). "Evaluation of 170 xenobiotics as transactivators of human pregnane X receptor (hPXR) and correlation to known CYP3A4 drug interactions." *Current Drug Metabolism* **7**(4): 375-388.
- Sitruk-Ware, R. (2004). "Reprint of Pharmacological profile of progestins." *Maturitas* **61**(1-2): 151-157.
- Smalling, K. L. et K. M. Kuivila (2008). "Multi-residue method for the analysis of 85 current-use and legacy pesticides in bed and suspended sediments." *Journal of Chromatography A* **1210**(1): 8-18.
- Smital, T., S. Terzic, R. Zaja, I. Senta, B. Pivcevic, M. Popovic, I. Mikac, K. E. Tollefsen, K. V. Thomas et M. Ahel (2010). "Assessment of toxicological profiles of the municipal wastewater effluents using chemical analyses and bioassays." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**(4): 844-851.
- Smith, E. M. et J. Y. Wilson (2010). "Assessment of cytochrome P450 fluorometric substrates with rainbow trout and killifish exposed to dexamethasone, pregnenolone-16 alpha-carbonitrile, rifampicin, and beta-naphthoflavone." *Aquatic Toxicology* **97**(4): 324-333.
- Snyder, S. A., T. L. Keith, D. A. Verbrugge, E. M. Snyder, T. S. Gross, K. Kannan et J. P. Giesy (1999). "Analytical methods for detection of selected estrogenic compounds in aqueous mixtures." *Environmental Science & Technology* **33**(16): 2814-2820.
- Snyder, S. A., D. L. Villeneuve, E. M. Snyder et J. P. Giesy (2001). "Identification and quantification of estrogen receptor agonists in wastewater effluents." *Environmental Science & Technology* **35**(18): 3620-3625.
- Sohoni, P. et J. P. Sumpter (1998). "Several environmental oestrogens are also anti-androgens." *Journal of Endocrinology* **158**(3): 327-339.

- Soliman, M. A., J. A. Pedersen et I. H. Suffet (2004). "Rapid gas chromatography-mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water." *Journal of Chromatography A* **1029**(1-2): 223-237.
- Song, M. Y., Q. T. Jiang, Y. Xu, H. X. Liu, P. K. S. Lam, D. K. O'Toole, Q. H. Zhang, J. P. Giesy et G. B. Jiang (2006). "AhR-active compounds in sediments of the Haihe and Dagu Rivers, China." *Chemosphere* **63**(7): 1222-1230.
- Song, M. Y., Y. Xu, Q. T. Jiang, P. K. S. Lam, D. K. O'Toole, J. P. Giesy et G. B. Jiang (2007). "Determinations of dioxinlike activity in selected mollusks from the coast of the Bohai Sea, China, using the H4IIE-luc bioassay." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **67**(1): 157-162.
- Song, W. C. (2001). "Biochemistry and reproductive endocrinology of estrogen sulfotransferase." *Environmental Hormones: the Scientific Basis of Endocrine Disruption* **948**: 43-50.
- Sonneveld, E., H. Jansen, A. Jonas, A. Brouwer et B. Van der Burg (2006). "Glucocorticoid mediated expression of dioxin target genes in rat H4IIE cells but not in human HepG2 and T47D cells." *Organohalogen compounds* **68**: 564-567.
- Sonneveld, E., H. J. Jansen, J. A. C. Riteco, A. Brouwer et B. van der Burg (2005). "Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays." *Toxicological Sciences* **83**(1): 136-148.
- Sonneveld, E., A. Jonas, O. C. Meijer, A. Brouwer et B. van der Burg (2007). "Glucocorticoid-enhanced expression of dioxin target genes through regulation of the rat aryl hydrocarbon receptor." *Toxicological Sciences* **99**: 455-469.
- Sonneveld, E., B. Pieterse, W. G. Schoonen et B. van der Burg (2011). "Validation of in vitro screening models for progestagenic activities: Inter-assay comparison and correlation with in vivo activity in rabbits." *Toxicology in Vitro* **25**(2): 545-554.
- Soto, A. M., J. M. Calabro, N. V. Precht, A. Y. Yau, E. F. Orlando, A. Daxenberger, A. S. Kolok, L. J. Guillette, B. le Bizec, I. G. Lange et C. Sonnenschein (2004). "Androgenic and estrogenic activity in water bodies receiving cattle feedlot effluent in eastern Nebraska, USA." *Environmental Health Perspectives* **112**(3): 346-352.
- Staudinger, J., Y. P. Liu, A. Madan, S. Habeebu et C. D. Klaassen (2001). "Coordinate regulation of xenobiotic and bile acid homeostasis by pregnane X receptor." *Drug Metabolism and Disposition* **29**(11): 1467-1472.
- Steinberg, C. E. W., A. Paul, S. Pflugmacher, T. Meinelt, R. Klocking et C. Wiegand (2003). "Pure humic substances have the potential to act as xenobiotic chemicals - A review." *Fresenius Environmental Bulletin* **12**(5): 391-401.
- Stolte, E. H., B. M. L. V. van Kemenade, H. F. J. Savelkoul et G. Flik (2006). "Evolution of glucocorticoid receptors with different glucocorticoid sensitivity." *Journal of Endocrinology* **190**(1): 17-28.
- Streck, G. (2009). "Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment." *Trends in Analytical Chemistry* **28**(6): 635-652.
- Streck, H. G., T. Schulze et W. Brack (2008). "Accelerated membrane-assisted clean-up as a tool for the clean-up of extracts from biological tissues." *Journal of Chromatography A* **1196**: 33-40.
- Sumpter, J. P. (2005). "Endocrine disrupters in the aquatic environment: An overview." *Acta Hydrochimica Et Hydrobiologica* **33**(1): 9-16.
- Tabb, M. M., V. Kholodovych, F. Grun, C. C. Zhou, W. J. Welsh et B. Blumberg (2004). "Highly chlorinated PCBs inhibit the human xenobiotic response mediated by the steroid and xenobiotic receptor (SXR)." *Environmental Health Perspectives* **112**(2): 163-169.
- Ternes, T. A., H. Andersen, D. Gilberg et M. Bonerz (2002). "Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS." *Analytical Chemistry* **74**(14): 3498-3504.
- Térouanne, B., B. Tahiri, V. Georget, C. Belon, N. Pujol, C. Avances, F. Orio Jr, P. Balaguer et C. Sultan (2000). "A stable prostatic bioluminescent cell line to investigate androgen and antiandrogen effects." *Molecular and Cellular Endocrinology* **160**(1-2): 39-49.
- Thibaut, R. et C. Porte (2004). "Effects of endocrine disrupters on sex steroid synthesis and metabolism pathways in fish." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **92**(5): 485-494.
- Thibaut, R., S. Schnell et C. Porte (2009). "Assessment of metabolic capabilities of PLHC-1 and RTL-W1 fish liver cell lines." *Cell Biology and Toxicology* **25**(6): 611-622.
- Thomas, K. V., M. R. Hurst, P. Matthiessen, M. McHugh, A. Smith et M. J. Waldock (2002). "An assessment of in vitro androgenic activity and the identification of environmental androgens in United Kingdom estuaries." *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**(7): 1456-1461.
- Thomas, K. V., M. R. Hurst, P. Matthiessen, D. Sheahan et R. J. Williams (2001). "Toxicity characterisation of organic contaminants in stormwaters from an agricultural headwater stream in South East England." *Water Research* **35**(10): 2411-2416.
- Thomas, P. (2000). "Chemical interference with genomic and nongenomic actions of steroids in fishes: role of receptor binding." *Marine Environmental Research* **50**(1-5): 127-134.

- Thomas, P. (2008). The Endocrine System. The toxicology of fishes R. T. Di Giulio and D. E. Hinton, CRC Press - Taylor & Francis Group: 457-488.
- Thomas, P. et K. Doughty (2004). "Disruption of rapid, nongenomic steroid actions by environmental chemicals: Interference with progesterin stimulation of sperm motility in Atlantic croaker." *Environmental Science & Technology* **38**(23): 6328-6332.
- Thomas, P., G. Dressing, Y. Pang, H. Berg, C. Tubbs, A. Benninghoff et K. Doughty (2006). "Progesterin, estrogen and androgen G-protein coupled receptors in fish gonads." *Steroids* **71**(4): 310-316.
- Thomas, P., Y. Pang, E. J. Filardo et J. Dong (2005). "Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells." *Endocrinology* **146**(2): 624-632.
- Timsit, Y. E. et M. Negishi (2007). "CAR and PXR: The xenobiotic-sensing receptors." *Steroids* **72**(3): 231-246.
- Togola, A. et H. Budzinski (2007a). "Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **388**(3): 627-635.
- Togola, A. et H. Budzinski (2007b). "Development of polar organic integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems." *Analytical Chemistry* **79**(17): 6734-6741.
- Togola, A. et H. Budzinski (2008). "Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples." *Journal of Chromatography A* **1177**(1): 150-158.
- Tollefsen, K. E. ((2002). "Interaction of estrogen mimics, singly and in combination, with plasma sex steroid-binding proteins in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Aquatic Toxicology* **56**(3): 215-225.
- Tong, S. K., K. Mouriec, M. W. Kuo, E. Pellegrini, M. M. Gueguen, F. Brion, O. Kah et B. C. Chung (2009). "A cyp19a1b-GFP (Aromatase B) Transgenic Zebrafish Line That Expresses GFP in Radial Glial Cells." *Genesis* **47**(2): 67-73.
- Tseng, H. P., T. H. Hseu, D. R. Buhler, W. D. Wang et C. H. Hu (2005). "Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva." *Toxicology and Applied Pharmacology* **205**(3): 247-258.
- Tyler, C. R., S. Jobling et J. P. Sumpter (1998). "Endocrine disruption in wildlife: A critical review of the evidence." *Critical Reviews in Toxicology* **28**(4): 319-361.
- Tyler, C. R., E. J. Routledge et R. van Aerle (2008). Estrogenic Effect of Treated Sewage Effluents on Fish: Steroids and Surfactant in English Rivers. The toxicology of fishes R. T. Di Giulio and D. E. Hinton, CRC Press - Taylor & Francis Group: 971-1002.
- Urbatzka, R., A. van Cauwenberge, S. Maggioni, L. Viganò, A. Mandich, E. Benfenati, I. Lutz et W. Kloas (2007). "Androgenic and antiandrogenic activities in water and sediment samples from the river Lambro, Italy, detected by yeast androgen screen and chemical analyses." *Chemosphere* **67**(6): 1080-1087.
- Vaccaro, E., M. Giorgi, V. Longo, G. Mengozzi et P. G. Gervasi (2003). "Inhibition of cytochrome P450 enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*)." *Aquatic Toxicology* **62**(1): 27-33.
- Van den Berg, M., L. S. Birnbaum, M. Denison, M. De Vito, W. Farland, M. Feeley, H. Fiedler, H. Hakansson, A. Hanberg, L. Haws, M. Rose, S. Safe, D. Schrenk, C. Tohyama, A. Tritscher, J. Tuomisto, M. Tysklind, N. Walker et R. E. Peterson (2006). "The 2005 World Health Organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for dioxins and dioxin-like compounds." *Toxicological Sciences* **93**(2): 223-241.
- Van der Heiden, E., N. Bechoux, M. Muller, T. Sergent, Y.-J. Schneider, Y. Larondelle, G. Maghuin-Rogister et M.-L. Scippo (2009). "Food flavonoid aryl hydrocarbon receptor-mediated agonistic/antagonistic/synergic activities in human and rat reporter gene assays." *Analytica Chimica Acta* **637**(1-2): 337-345.
- Van der Linden, S. C., M. B. Heringa, H. Y. Man, E. Sonneveld, L. M. Puijker, A. Brouwer et B. Van der Burg (2008). "Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays." *Environmental Science & Technology* **42**(15): 5814-5820.
- Vanderford, B. J., R. A. Pearson, D. J. Rexing et S. A. Snyder (2003). "Analysis of endocrine disruptors, pharmaceuticals, and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry." *Analytical Chemistry* **75**(22): 6265-6274.
- Venkatesh, M., H. Wang, J. Cayer, M. Leroux, D. Salvail, B. Das, J. E. Wrobel et S. Mani (2011). "In Vivo and In Vitro Characterization of a First-in-Class Novel Azole Analog That Targets Pregnane X Receptor Activation." *Molecular Pharmacology* **80**(1): 124-135.
- Vermeirssen, E. L. M., N. Bramaz, J. Hollender, H. Singer et B. I. Escher (2009). "Passive sampling combined with ecotoxicological and chemical analysis of pharmaceuticals and biocides - evaluation of three Chemcatcher (TM) configurations." *Water Research* **43**(4): 903-914.
- Vermeirssen, E. L. M., O. Korner, R. Schonenberger, M. J. F. Suter et P. Burkhardt-Holm (2005). "Characterization of environmental estrogens in river water using a three pronged approach: Active and passive water sampling and the analysis of accumulated estrogens in the bile of caged fish." *Environmental Science & Technology* **39**(21): 8191-8198.

- Vignati, L. A., A. Bogni, P. Grossi et M. Monshouwer (2004). "A human and mouse pregnane X receptor reporter gene assay in combination with cytotoxicity measurements as a tool to evaluate species-specific CYP3A induction." *Toxicology* **199**(1): 23-33.
- Villaverde, J., A. Hildebrandt, E. Martínez, S. Lacorte, E. Morillo, C. Maqueda, P. Viana et D. Barceló (2008). "Priority pesticides and their degradation products in river sediments from Portugal." *Science of The Total Environment* **390**(2-3): 507-513.
- Villeneuve, D. L., L. S. Blake, J. D. Brodin, K. J. Greene, I. Knoebel, A. L. Miracle, D. Martinovic et G. T. Ankley (2007). "Transcription of key genes regulating gonadal steroidogenesis in control and ketoconazole- or vinclozolin-exposed fathead minnows." *Toxicological Sciences* **98**(2): 395-407.
- Viswanath, G., S. Halder, G. Divya, C. B. Majumder et P. Roy (2008). "Detection of potential (anti)progestagenic endocrine disruptors using a recombinant human progesterone receptor binding and transactivation assay." *Molecular and Cellular Endocrinology* **295**(1-2): 1-9.
- Vondracek, J., M. Machala, K. Minksova, L. Blaha, A. J. Murk, A. Kozubik, J. Hofmanova, K. Hilscherova, R. Ulrich, M. Ciganek, J. Neca, D. Svrckova et I. Holoubek (2001). "Monitoring river sediments contaminated predominantly with polyaromatic hydrocarbons by chemical and in vitro bioassay techniques." *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(7): 1499-1506.
- Vrana, B. (2005). "Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water." *Trends in Analytical Chemistry* **24**(10): 845-868.
- Vrana, B., G. A. Mills, E. Dominiak et R. Greenwood (2006). "Calibration of the Chemcatcher passive sampler for the monitoring of priority organic pollutants in water." *Environmental Pollution* **142**(2): 333-343.
- Walsh, L. P., C. N. Kuratko et D. M. Stocco (2000). "Econazole and miconazole inhibit steroidogenesis and disrupt steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression post-transcriptionally." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **75**(4-5): 229-236.
- Wang, H., H. Li, L. B. Moore, M. D. L. Johnson, J. M. Maglich, B. Goodwin, O. R. R. Ittoop, B. Wisely, K. Creech, D. J. Parks, J. L. Collins, T. M. Willson, G. V. Kalpana, M. Venkatesh, W. Xie, S. Y. Cho, J. Roboz, M. Redinbo, J. T. Moore et S. Mani (2008). "The phytoestrogen Coumestrol is a naturally occurring antagonist of the human pregnane x receptor." *Molecular Endocrinology* **22**(4): 838-857.
- Wang, J., M. H. Dong, W. J. Shim, N. Kannan et D. H. Li (2007). "Improved cleanup technique for gas chromatographic-mass spectrometric determination of alkylphenols from iota extract." *Journal of Chromatography A* **1171**(1-2): 15-21.
- Wang, L., G.-G. Ying, J.-L. Zhao, S. Liu, B. Yang, L.-J. Zhou, R. Tao et H.-C. Su (2011). "Assessing estrogenic activity in surface water and sediment of the Liao River system in northeast China using combined chemical and biological tools." *Environmental Pollution* **159**(1): 148-156.
- Wang, P., Q. Zhang, Y. Wang, T. Wang, X. Li, L. Ding et G. Jiang (2010). "Evaluation of Soxhlet extraction, accelerated solvent extraction and microwave-assisted extraction for the determination of polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in soil and fish samples." *Analytica Chimica Acta* **663**(1): 43-48.
- Wang, S.-H., C.-T. Liang, Y.-W. Liu, M.-C. Huang, S.-C. Huang, W.-F. Hong et J.-G. J. Su (2009). "Crosstalk between activated forms of the aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor." *Toxicology* **262**(2): 87-97.
- Waring, R. H., S. Ayers, A. J. Gescher, H. R. Glatt, W. Meinel, P. Jarratt, C. J. Kirk, T. Pettitt, D. Rea et R. M. Harris (2008). "Phytoestrogens and xenoestrogens: The contribution of diet and environment to endocrine disruption." *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **108**(3-5): 213-220.
- Wassmur, B., J. Grans, P. Kling et M. C. Celander (2010). "Interactions of pharmaceuticals and other xenobiotics on hepatic pregnane X receptor and cytochrome P450 3A signaling pathway in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Aquatic Toxicology* **100**(1): 91-100.
- Weiss, J. M., P. L. Andersson, M. H. Lamoree, P. E. G. Leonards, S. P. J. van Leeuwen et T. Hamers (2009a). "Competitive Binding of Poly- and Perfluorinated Compounds to the Thyroid Hormone Transport Protein Transthyretin." *Toxicological Sciences* **109**(2): 206-216.
- Weiss, J. M., T. Hamers, K. V. Thomas, S. van der Linden, P. E. G. Leonards et M. H. Lamoree (2009b). "Masking effect of anti-androgens on androgenic activity in European river sediment unveiled by effect-directed analysis." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **394**(5): 1385-1397.
- Westerink, W. M. A. et W. Schoonen (2007). "Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells." *Toxicology in Vitro* **21**(8): 1581-1591.
- Westerink, W. M. A., J. C. R. Stevenson et W. Schoonen (2007). "CYP1A induction and species differences between human HepG2 and rat H4IIE cells." *Toxicology Letters* **172**: S98-S98.
- WHO (2002). Global assessment of the state of the science of Endocrine disruptors. T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock and G. van Der Kraak. Geneva Switzerland, World Health Organization - International Programme on chemical safety.

- Wilson, J. (2004). "Development and Characterization of a Cell Line That Stably Expresses an Estrogen-Responsive Luciferase Reporter for the Detection of Estrogen Receptor Agonist and Antagonists." *Toxicological Sciences* **81**(1): 69-77.
- Wilson, V. S., K. Bobseine, C. R. Lambright et L. E. Gray (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." *Toxicological Sciences* **66**(1): 69-81.
- Wilson, V. S., M. C. Cardon, L. E. Gray et P. C. Hartig (2007). "Competitive binding comparison of endocrine-disrupting compounds to recombinant androgen receptor from fathead minnow, rainbow trout, and human." *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**(9): 1793-1802.
- Yasuda, K., A. Ranade, R. Venkataramanan, S. Strom, J. Chupka, S. Ekins, E. Schuetz et K. Bachmann (2008). "A Comprehensive in vitro and in silico Analysis of Antibiotics that Activate PXR and Induce CYP3A4 in Liver and Intestine." *Drug Metabolism and Disposition* **36**(8): 1689-1697.
- Zeilinger, J., T. Steger-Hartmann, E. Maser, S. Goller, R. Vonk et R. Länge (2009). "Effects of synthetic gestagens on fish reproduction." *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**(12): 2663-2670.
- Zhang, J. L., Z. H. Zuo, C. Y. He, J. L. Cai, Y. Q. Wang, Y. X. Chen et C. G. Wang (2009). "Effect of Tributyltin on Testicular Development in *Sebastes marmoratus* and the Mechanism Involved." *Environmental Toxicology and Chemistry* **28**(7): 1528-1535.
- Zhang, J. S. et M. A. Lazar (2000). "The mechanism of action of thyroid hormones." *Annual Review of Physiology* **62**: 439-466.
- Zhang, Z. L., A. Hibberd et J. L. Zhou (2006). "Optimisation of derivatisation for the analysis of estrogenic compounds in water by solid-phase extraction gas chromatography-mass spectrometry." *Analytica Chimica Acta* **577**(1): 52-61.
- Zhang, Z. L. et J. L. Zhou (2007). "Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A* **1154**(1-2): 205-213.
- Zhou, C., E.-J. Poulton, F. Grun, T. K. Bammler, B. Blumberg, K. E. Thummel et D. L. Eaton (2007). "The dietary isothiocyanate sulforaphane is an antagonist of the human steroid and xenobiotic nuclear receptor." *Molecular Pharmacology* **71**(1): 220-229.
- Zhou, J. et J. A. Cidlowski (2005). "The human glucocorticoid receptor: One gene, multiple proteins and diverse responses." *Steroids* **70**(5-7): 407-417.
- Zuccato, E., S. Castiglioni et R. Fanelli (2005). "Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment." *Journal of Hazardous Materials* **122**(3): 205-209.

Résumé

L'objectif général de cette thèse concerne la mise en place et l'évaluation d'une approche de type *effect directed analysis* (EDA), couplant bioessais *in vitro* et analyses physico-chimiques, pour la caractérisation de la contamination des milieux aquatiques par les perturbateurs endocriniens (PE) et leur identification. De nouveaux outils *in vitro* ont été développés et intégrés à une approche multi-bioessais pour la détection de polluants émergents afin de permettre un large diagnostic de la contamination par les PE. Parmi eux, le bioessai basé sur le *pregnane X receptor* humain s'est avéré complémentaire des cibles classiquement étudiées (e.g. récepteurs des œstrogènes (ER), des androgènes (AR) ou des hydrocarbures aromatiques (AhR)). Combinés, ces bioessais ont permis de déterminer des profils intégrés de la contamination inédits dans le sédiment et les eaux de surface, mettant en lumière la nécessité de considérer d'autres cibles biologiques que ER et AhR et de s'intéresser à l'ensemble des compartiments du milieu aquatique pour une meilleure évaluation de la contamination. En particulier, l'utilisation combinée de ces nouveaux outils à des capteurs passifs de type POCIS (*polar organic compound integrative sampler*) s'est révélée pertinente pour évaluer la contamination de la colonne d'eau par des composés hydrosolubles. Enfin, une démarche EDA, intégrant ces bioessais et des méthodes physico-chimiques d'extraction et de fractionnement adaptées, a été validée pour l'identification des composés détectés. Son application sur deux sites soumis à des contaminations chimiques différentes (mixte urbaine/agricole et pharmaceutique) a permis d'évaluer la contribution des polluants cibles, dont les prioritaires, dans les réponses des bioessais et d'identifier de nouveaux PE.

Mots clefs : EDA ; outils bioanalytiques *in vitro*; perturbateurs endocriniens ; capteurs passifs

Abstract

The aim of this thesis was to develop and to evaluate an effect directed analysis (EDA) approach, combining *in vitro* bioassays and chemical analysis for the characterization of aquatic systems contamination by endocrine disrupting chemicals (EDCs) and their identification. For integrative contamination assessment, new *in vitro* tools have been developed and evaluated for the detection of emerging pollutants, and then integrated in a multi-bioassays approach. In particular, the human pregnane X receptor (PXR) based bioassay provided further information on bioactive contaminants and thereby enhanced the environmental diagnostic as regard to classical biological target (e.g. estrogen (ER), androgen (AR) or aryl hydrocarbon receptors (AhR)). Such multi-receptors approach allowed determining novel integrative toxicity profiles in sediment and surface water. Overall, our results demonstrated the need to integrate other biological target than ER and AhR, and to assess contamination partitioning for a better hazard/risk assessment. For such purpose, combined use of polar organic compound integrative sampler and *in vitro* bioassays provided suitable tools to assess active hydrosoluble chemicals in surface water. Finally, in order to identify the compounds responsible for the detected activities, the multi-receptors approach has been integrated in EDA strategy applied to two river sites under different chemical pressures (urban/agricultural and pharmaceutical). To tackle this challenge, extraction and fractionation methods were developed and evaluated in order to encompass a diversity of active chemicals that are detected by *in vitro* bioassays. The EDA approach allowed determining partial contribution of priority pollutants in biological responses as well as the identification of new EDCs.

Keywords : EDA, *in vitro* bioanalytical tools ; endocrine disrupting chemicals, integrative sampler