

(ID Modèle = 454913)

Ineris - 220530 - 2788046 - v2.0

06/09/2024

**Recherche d'activités endocriniennes dans
des rejets de sites industriels
pharmaceutiques par une approche
bioanalytique *in vitro***

PRÉAMBULE

Le présent document a été réalisé au titre de la mission d'appui aux pouvoirs publics confiée à l'Ineris, en vertu des dispositions de l'article R131-36 du Code de l'environnement.

La responsabilité de l'Ineris ne peut pas être engagée, directement ou indirectement, du fait d'inexactitudes, d'omissions ou d'erreurs ou tous faits équivalents relatifs aux informations utilisées.

L'exactitude de ce document doit être appréciée en fonction des connaissances disponibles et objectives et, le cas échéant, de la réglementation en vigueur à la date d'établissement du document. Par conséquent, l'Ineris ne peut pas être tenu responsable en raison de l'évolution de ces éléments postérieurement à cette date. La mission ne comporte aucune obligation pour l'Ineris d'actualiser ce document après cette date.

Au vu de ses missions qui lui incombent, l'Ineris, n'est pas décideur. Les avis, recommandations, préconisations ou équivalent qui seraient proposés par l'Ineris dans le cadre des missions qui lui sont confiées, ont uniquement pour objectif de conseiller le décideur dans sa prise de décision. Par conséquent, la responsabilité de l'Ineris ne peut pas se substituer à celle du décideur qui est donc notamment seul responsable des interprétations qu'il pourrait réaliser sur la base de ce document. Tout destinataire du document utilisera les résultats qui y sont inclus intégralement ou sinon de manière objective. L'utilisation du document sous forme d'extraits ou de notes de synthèse s'effectuera également sous la seule et entière responsabilité de ce destinataire. Il en est de même pour toute autre modification qui y serait apportée. L'Ineris dégage également toute responsabilité pour chaque utilisation du document en dehors de l'objet de la mission.

Nom de la Direction en charge du rapport : DIRECTION MILIEUX ET IMPACTS SUR LE VIVANT

Rédaction : AIT-AISSA Selim – CHATILLON Elise

Vérification : BOUDET-DEVIDAL CELINE

Approbation : MORIN ANNE

Liste des personnes ayant participé à l'étude :

Patrick BALAGUER (Inserm) ; Marina GRIMALDI-DILILLO (Inserm), Emmanuelle MAILLOT-MARECHAL

Table des matières

1	Contexte et objectifs	5
1.1	Bioanalyse des perturbateurs endocriniens dans l'environnement : acquis et besoins	5
1.2	Contexte réglementaire et objectifs de l'étude	6
2	Description de l'étude et méthodologie	8
2.1	Déroulé général de l'étude	8
2.2	Campagne de prélèvements	8
2.3	Bio-analyses	9
2.3.1	Principe de l'approche bioanalytique	9
2.3.2	Préparation des extraits organiques et détermination du facteur d'enrichissement (REF)	10
2.3.3	Bioessais <i>in vitro</i>	11
2.3.4	Stratégie de test : prise en compte des effets de matrice	13
2.3.5	Contrôles de la qualité	14
3	Résultats	15
3.1	Contrôles de la qualité	15
3.1.1	Réponses des bioessais <i>in vitro</i> aux composés de référence	15
3.1.2	Blancs terrain et blancs procédure	15
3.2	Bioanalyse des extraits d'effluents	16
3.2.1	Bioessai contrôle : occurrence d'interférences matricielles	16
3.2.2	Mesures d'activités endocriniennes	17
4	Conclusions	20
5	Références	22
	Annexe 1. Fiche de prélèvement terrain	25
	Annexe 2. Lignées cellulaires et conditions de culture	26
	Annexe 3. Réponse des bioessais aux ligands de référence	29
	Annexe 4. Absence d'effet des blancs terrain et laboratoire	31
	Annexe 5. Courbes concentration-réponse dans les différents bioessais	33

Résumé

La présente étude s'inscrit dans le cadre de l'action 20 de la deuxième stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens (SNPE2) relative à la surveillance des rejets de certains secteurs d'activités industrielles et dans le contexte d'une action nationale d'inspection des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE), pilotée par la Direction Générale de la Prévention des Risques (DGPR) du Ministère de la Transition Ecologique et de la Cohésion des Territoires (MTECT). Son objectif est de rechercher la présence d'activités endocriniennes dans des effluents de sites industriels pharmaceutiques.

Des travaux scientifiques récents ont montré que certains rejets d'industries pharmaceutiques pouvaient contenir des substances pharmaceutiques à activité endocrinienne susceptibles d'être émises dans les milieux aquatiques. Afin de dresser un premier état des connaissances à l'échelle nationale quant à la présence d'activités endocriniennes dans ce type de rejets, 21 sites anonymisés et représentatifs de différents types de production pharmaceutique ont été sélectionnés. Une approche bioanalytique fondée sur une batterie de 9 bioessais cellulaires *in vitro* basés sur le mode d'action de substances à activité endocrinienne (capacité à activer/inhiber des récepteurs impliqués dans les régulations endocriniennes) a été mise en œuvre et appliquée à la phase organique dissoute des effluents prélevés en aval direct des sites industriels. Différents contrôles qualité (blancs de terrain, blancs de laboratoire, bioessai contrôle) ont été inclus dans l'étude pour s'assurer de la spécificité des réponses obtenues.

L'analyse des profils d'activités endocriniennes a montré, pour 17 des 22 échantillons investigués, la présence de multiples activités endocriniennes, à des niveaux variables entre les sites. La quantification de ces activités en équivalents-bioanalytiques (BEQ) a permis de classer et hiérarchiser les échantillons. Cette étude a par ailleurs révélé l'importance d'effets de matrices associés à ces échantillons, ne permettant parfois pas de conclure sur l'absence/présence d'activités.

Au bilan, cette étude a démontré la présence d'activités endocriniennes multiples associées à la phase organique dissoute de certains des effluents d'industries pharmaceutiques investigués. Dans quelques cas, des hypothèses sur la nature de substances détectées par les bioessais ont été formulées. Ces travaux ouvrent des perspectives pour tenter d'identifier la nature des substances responsables des activités endocriniennes détectées et ainsi mieux comprendre la pertinence des activités mesurées vis-à-vis des substances produites sur chaque site.

Pour citer ce document, utilisez le lien ci-après :

Institut national de l'environnement industriel et des risques, Recherche d'activités endocriniennes dans des rejets de sites industriels pharmaceutiques par une approche bio-analytique *in vitro*. Action nationale 2022-2023, Verneuil-en-Halatte : Ineris - 220530 - v2.0, 06/09/2024.

Mots-clés :

Bioessais cellulaires *in vitro* ; Récepteurs nucléaires ; Effluents pharmaceutiques ; Activités endocriniennes

1 Contexte et objectifs

1.1 Bioanalyse des perturbateurs endocriniens dans l'environnement : acquis et besoins

Une démarche bioanalytique pour la surveillance de la qualité chimique des milieux

Les milieux aquatiques sont le réceptacle d'une multitude de contaminants chimiques issus des activités humaines, lesquels peuvent subir des transformations biotiques ou abiotiques et générer des produits de transformation parfois plus actifs que les composés parents. Actuellement, la surveillance réglementaire de la qualité chimique des milieux est basée sur l'analyse chimique d'une liste finie de substances individuelles et ne prend pas en compte la complexité des contaminations, ni leurs effets de mélange potentiels. Un des défis actuels dans l'évaluation de la qualité chimique des milieux et du danger associé à ces matrices complexes implique donc de disposer de méthodes de détection qui soient suffisamment intégratrices des contaminants en présence, qu'ils soient connus ou inconnus, et qui renseignent de leurs effets (Altenburger et al. 2019).

Dans ce contexte, de nouvelles approches dites bioanalytiques, i.e. basées sur l'utilisation de bioessais spécifiques du mode d'action des polluants, se sont imposées ces dernières années comme des méthodes pertinentes et complémentaires de l'approche chimie analytique (Brack et al. 2019; Carere et al. 2021). C'est particulièrement le cas dans la bioanalyse environnementale des substances perturbateurs endocriniens (PE) qui sont définies non pas par une classe chimique mais par leur capacité à déréguler le système endocrinien via un mode d'action déterminé et à induire un effet néfaste sur la santé d'un organisme et/ou sa descendance (WHO 2002). En effet, un des mécanismes d'action majeur, bien caractérisé et commun à de nombreuses substances PE réside dans leur capacité à **interagir avec des récepteurs nucléaires** impliqués dans les régulations endocriniennes et à perturber l'activité transcriptionnelle de ces récepteurs. Des bioessais cellulaires *in vitro* qui mesurent une interaction spécifique entre substances chimiques et récepteurs ont ainsi été développés et sont utilisés pour la détection et la quantification (en équivalents-bioanalytiques ou BEQ) d'activités endocriniennes au sein de matrices environnementales (Escher et al. 2021; Aït-Aïssa et al. 2020). Ces outils sensibles, utilisés comme biodétecteurs au sein d'une démarche d'analyse environnementale, fournissent un **premier diagnostic sur la présence de substances à activité endocrinienne vis-à-vis d'un mode d'action donné. En revanche, ils n'informent pas sur l'effet de ces interactions à l'échelle de l'organisme ni sur la nature chimique des substances organiques portant les activités endocriniennes détectées. Ils peuvent cependant guider les investigations supplémentaires à mener pour identifier les substances actives.**

Les bioessais *in vitro* sont des outils de recherche dont certains trouvent leur application dans le cadre de programmes de surveillance environnementale tant au niveau national, comme par exemples dans le réseau de Surveillance Prospective et d'AQUAREF¹ (Staub et al. 2019; Aït-Aïssa et al. 2014; Aït-Aïssa et Creusot 2015; Aït-Aïssa et al. 2020), qu'au niveau européen (réseau NORMAN², projets européens FP7-SOLUTIONS³, H2020-PARC⁴). De manière générale, la communauté scientifique ainsi que l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) reconnaissent et encouragent l'utilisation des bioessais basés sur le mode d'action des PE dans un contexte de surveillance de la qualité de l'eau (OECD 2023). Des travaux sont actuellement menés par le groupe de travail « Effect-Based Methods » (WG-EBM) sous l'égide de la direction générale de l'Environnement de la Commission européenne en charge de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE, Directive 2000/60/EC) pour définir et harmoniser les stratégies d'application de ces outils dans un cadre réglementaire en vue de leur introduction dans la DCE (Carere et al. 2021). Ces travaux visent notamment à établir des documents guides d'utilisation de ces outils, incluant la définition de grilles d'interprétations (définition de valeurs seuils).

¹ AQUAREF - Laboratoire national de référence pour la surveillance des milieux aquatiques (www.aquaref.fr)

² NORMAN - Réseau de laboratoires de référence, centres de recherches et organisations pour la surveillance des substances environnementales émergentes (www.norman-network.net)

³ Solutions Project (www.solutions-project.eu)

⁴ PARC - Partnership for the Assessment of Risks from Chemicals (www.eu-parc.eu)

Besoins de connaissances sur les sources de contamination

En marge de ces avancées réglementaires importantes et dans une optique de gestion et de réduction de la pollution, il demeure un besoin de connaissances sur l'occurrence environnementale des activités endocriniennes, leurs sources et la nature des substances détectées par les bioessais.

Aujourd'hui, s'il existe beaucoup d'information sur l'occurrence d'activités endocriniennes dans les milieux aquatiques, cela a surtout été démontré pour les activités associées aux récepteurs des œstrogènes ou des androgènes (Kase et al. 2018). Néanmoins, nombre d'autres substances retrouvées dans l'environnement sont capables d'interférer avec d'autres récepteurs nucléaires impliqués dans les régulations endocriniennes. C'est le cas de certaines substances pharmaceutiques comme les progestagènes de synthèse ou les corticoïdes qui sont développées pour leur capacité à se lier avec une forte affinité aux récepteurs de la progestérone (PR), des glucocorticoïdes (GR) ou des minéralocorticoïdes (MR).

Un grand nombre de ces substances actives sont aujourd'hui retrouvées dans les eaux usées et les eaux de surface (Finckh et al. 2022; Weizel et al. 2018; Wilkinson et al. 2022). Leur présence dans les milieux s'explique par l'existence de rejets directs vers les eaux de surface ou par une élimination partielle des médicaments dans les eaux traitées par les stations d'épuration conventionnelles. Elles proviennent de l'excrétion de médicaments et/ou l'élimination inadéquate des médicaments inutilisés ou expirés dans les sites hospitaliers et autres établissements de santé, lors de l'usage domestique ou encore dans les élevages. Plusieurs études ont également montré que les sites industriels de production pharmaceutique pouvaient être une source de contamination des milieux par des substances pharmaceutiques, dont des substances à activité endocrinienne (Gadipelly et al. 2014; Phillips et al. 2010; Wilkinson et al. 2022; Cardoso et al. 2014).

En France, l'utilisation d'une approche bioanalytique, couplant bioessais *in vitro* et analyses chimiques, a ainsi permis d'identifier un rejet industriel comme une source importante de substances pharmaceutiques à activités hormonales (Creusot et al. 2014) probablement responsables des effets observés sur la faune piscicole en aval du rejet (Sanchez et al. 2011). Plus récemment, la même démarche bioanalytique a permis de détecter, d'identifier et de caractériser une pollution dans une rivière française par des glucocorticoïdes et mettre en évidence la contribution d'un site pharmaceutique comme une source majeure de la pollution (Aït-Aïssa 2024). Dans les deux cas, des mesures de réduction de rejet ont été mises en place sur demande des autorités compétentes.

S'il a été démontré que certains sites de l'industrie de la pharmacie représentent des sources d'émission de molécules pharmaceutiques dont certaines présentent des activités endocriniennes, il est difficile d'étendre ce constat à l'ensemble des sites de l'industrie pharmaceutique susceptibles de produire ce type de substances. Actuellement, la surveillance réglementaire des rejets n'intègre pas la présence éventuelle de substances pharmaceutiques à activité endocrinienne. A notre connaissance, il n'existe aucune étude publiée qui rapporte l'état de contamination de rejets d'industries pharmaceutiques par des activités endocriniennes à une échelle nationale.

1.2 Contexte réglementaire et objectifs de l'étude

La France s'est dotée en 2014 d'une stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens (SNPE) qui vise à réduire l'exposition des populations et de l'environnement aux perturbateurs endocriniens. La présente étude est rattachée à l'action 20 de la deuxième stratégie nationale sur les PE (SNPE2) relative à la surveillance des rejets de certains secteurs d'activités. Elle s'inscrit également dans le cadre d'une action nationale d'inspection des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE), pilotée par la Direction Générale de la Prévention des Risques (DGPR) du Ministère de la Transition Ecologique et de la Cohésion des Territoires (MTECT) que l'Ineris a pris en charge dans le cadre de ses activités d'appui aux politiques publiques.

L'étude avait pour objectif de renseigner la présence potentielle d'activités endocriniennes au sein d'effluents d'industries pharmaceutiques. Vingt-et-un sites ICPE, représentatifs de différents types de production pharmaceutique et localisées sur le territoire français, ont ainsi été sélectionnés. Une approche bioanalytique basée sur une batterie de 9 bioessais cellulaires couvrant 13 modes d'actions a été mise en œuvre, permettant ainsi la détection d'un spectre relativement large d'activités endocriniennes et de dresser un premier diagnostic quant à la présence de substances à activité endocrinienne dans la phase organique dissoute des effluents. L'Ineris a mené ces travaux sans connaître l'identité des sites ICPE ciblés dans le contexte de cette action. L'Ineris s'est appuyé sur les

services de la plateforme de criblage en cancérologie de Montpellier (Dr Patrick Balaguer, IRCM-INserm, U1194-ICM-UM Montpellier) pour la réalisation d'une partie des essais.

Sur le plan méthodologique, l'application de l'approche bioanalytique à ces matrices spécifiques a permis d'affiner la méthodologie vis-à-vis d'un panel d'échantillons représentatif de différents contextes de production. Un effort particulier a notamment été mené afin de prendre en compte les effets de matrices ou de toxicité associés à ce type d'échantillon et s'assurer de la qualité et de la spécificité des résultats fournis.

Il est attendu que les profils d'activités endocriniennes établis sur chaque site permettent 1) de fournir des premiers éléments qualitatifs sur le type de substances en présence au regard des éventuelles activités endocriniennes détectées, 2) de quantifier des activités en équivalents-bioanalytiques (BEQ) afin de hiérarchiser les échantillons analysés ; 3) et, *in fine*, de proposer des actions prioritaires à mener pour comprendre et caractériser plus avant la contamination associée à ces rejets.

2 Description de l'étude et méthodologie

2.1 Déroulé général de l'étude

L'étude s'est déroulée en différentes étapes séquentielles et impliquant différents acteurs (Figure 1).

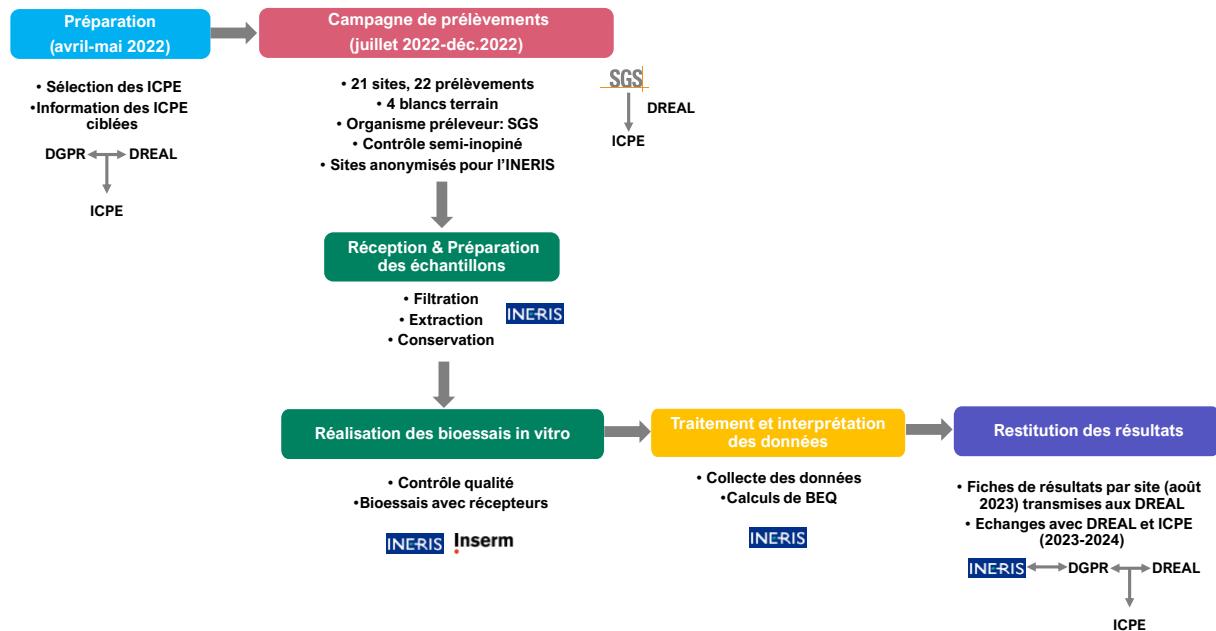


Figure 1. Déroulé de l'étude et acteurs impliqués

Au cours de la phase préparatoire, la sélection des sites à investiguer a été réalisée par la DGPR qui s'est appuyée sur les Directions Régionales de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement (DREAL). Les exploitants concernés ont été informés de cette étude en amont des campagnes d'échantillonnage mais pas des dates des prélèvements. L'Ineris n'a pas participé à la sélection des sites et n'a pas été informé de l'identité des industries concernées. Toute l'étude a donc été réalisée sur des **échantillons anonymisés pour l'Ineris**.

La campagne de prélèvements s'est déroulée de juin à décembre 2022. Les prélèvements ont été effectués par un organisme préteur agréé (SGS), dans le cadre d'un contrôle semi-inopiné, en présence d'un représentant de la DREAL, et de manière coordonnée avec l'Ineris concernant les aspects logistiques (envoi des flacons et réception des échantillons). Les échantillons ont été réceptionnés sous 24 h à l'Ineris où ils ont été pris en charge pour leur préparation et la coordination des analyses par bioessais, réalisés pour partie à l'Ineris et pour partie à l'INSERM de Montpellier. Les données des bioessais ont ensuite été collectées, traitées et interprétées par l'Ineris, en concertation avec les experts de l'INSERM.

Les résultats ont été communiqués à la DGPR sous la forme de fiches de résultats simplifiées établies par site en août 2023, qui les a ensuite transmises aux DREAL et aux exploitants.

Le présent rapport décrit la méthodologie mise en œuvre et rend compte des résultats de manière détaillée.

2.2 Campagne de prélèvements

La campagne de prélèvements a eu lieu en France du 5 juillet au 9 décembre 2022.

Les effluents de 21 sites de production d'industries pharmaceutiques ont été prélevés au cours de visites de contrôle semi-inopiné en présence d'un inspecteur de la DREAL du territoire concerné, par un organisme préteur agréé SGS. Les 21 sites ont été identifiés par des lettres i.e. A, B, C, D, E, F, G, H, I, J1, J2, K, L, M, N, O, P, Q, R, T, U et V, les rendant anonymes pour l'Ineris. Initialement, 22 sites de production d'industries pharmaceutiques ont été sélectionnés par la DGPR. Toutefois, aucun effluent du site S n'a été prélevé car les déchets générés sont solides et évacués de manière spécifique par un organisme de retraitement (d'après les informations fournies par SGS et la DREAL concernée).

Concernant le site J, deux prélèvements (J1 et J2) ont été réalisés à deux endroits différents du site, en accord avec la DREAL et l'industriel, portant le nombre d'échantillons à 22. Enfin, de l'eau d'entrée (eau de réseau) a également été échantillonnée pour le site A, à la demande de l'industriel.

Le protocole de prélèvement mis en œuvre par SGS a permis de constituer un échantillon moyen sur 24 h et asservi au débit (8 L environ par site), conformément à la norme FD T90-523-2 2019. A l'issue des 24 h de prélèvement, l'échantillon a été réparti dans des bouteilles 1 L en polyéthylène haute densité (PEHD, Nalgene™) et stocké à 4°C dans une glacière contenant des blocs eutectiques pour son acheminement vers l'Ineris sous 24h. Une fiche terrain anonymisée (Annexe 1) a été remplie par SGS et la DREAL afin d'assurer la traçabilité des échantillons et de renseigner l'Ineris sur les conditions de prélèvements et certains paramètres globaux lorsque disponibles (e.g. pH, conductivité, matières en suspension...). Les échantillons de tous les sites ont été transférés sous 24 h à l'Ineris, à l'exception de l'échantillon V qui a été reçu 48 h après son envoi (délai transporteur).

Il est à noter qu'en plus des prélèvements d'effluents, quatre blancs terrains ont été réalisés sur quatre sites différents et par quatre agences SGS régionales différentes. Les blancs terrains consistent en 4 L d'eau non contaminée (eau d'Evian en bouteilles en verre du commerce) acheminée sur le site et qui aura subit exactement toutes les étapes de manipulation (système de collecte, transport et analyse) que les échantillons (cf. §2.3.5).

2.3 Bio-analyses

2.3.1 Principe de l'approche bioanalytique

Les principales étapes de la méthodologie bioanalytique mise en œuvre sont résumées dans la Figure 2 et détaillées dans les sections suivantes.

Dans son principe général, l'approche se base sur l'extraction des composés organiques de la phase dissoute des effluents et l'évaluation de l'activité endocrinienne d'une gamme de dilutions des extraits organiques. Dans le cas d'échantillons présentant une réponse significative dans les bioessais, l'analyse des courbes concentration-réponse permet de déterminer les concentrations actives de l'échantillon et, *in fine*, de quantifier l'activité en quantité d'équivalents-bioanalytiques (BEQ) par quantité d'échantillon (e.g. pour l'activité estrogenique, en ng d'estradiol-équivalents par litre). A chaque étape clé de la bioanalyse, différents contrôles sont mis en œuvre pour s'assurer de la qualité et de la spécificité des données qui sont rapportées.

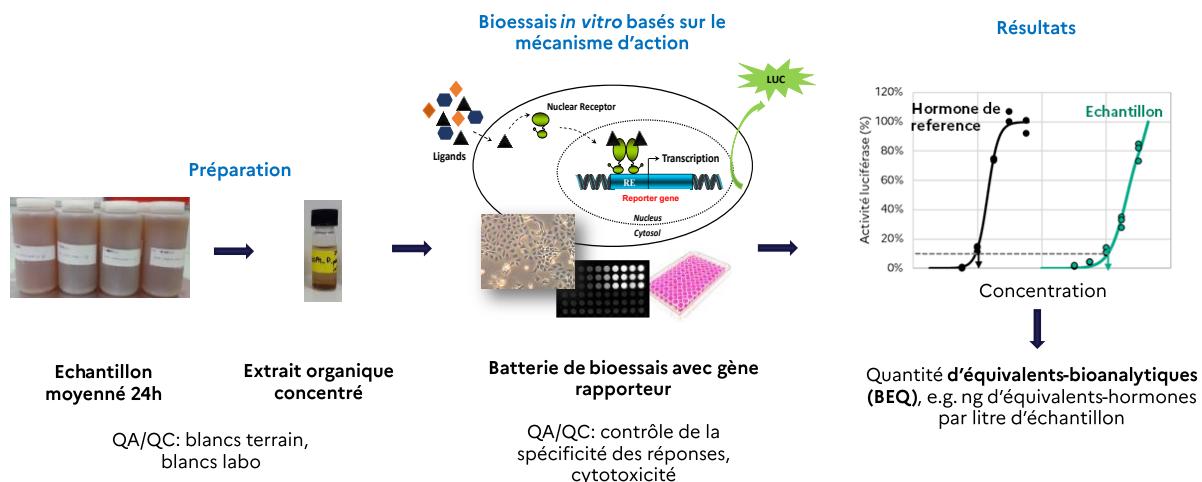


Figure 2. Principe général de la bioanalyse d'effluents pharmaceutiques par les bioessais *in vitro*

2.3.2 Préparation des extraits organiques et détermination du facteur d'enrichissement (REF)

2.3.2.1 Filtration et extraction en phase solide (SPE)

La préparation des échantillons (Figure 3) consiste à filtrer les effluents puis extraire les substances organiques présentes dans la phase dissoute en vue de leur bioanalyse *in vitro*.

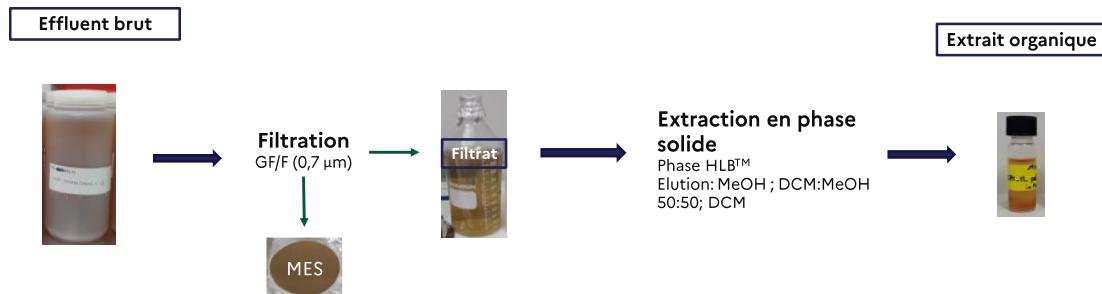


Figure 3. Préparation des extraits organiques concentrés à partir de la phase dissoute (filtration à 0,7 µm) des rejets industriels. MES : matières en suspension ; GF/F : filtre en fibre de verre de grade F ; MeOH : méthanol ; DCM : dichlorométhane

A leur réception à l'Ineris, les échantillons ont été filtrés sur des filtres en fibre de verre de taille de pores de 0,7 µm (grade GF/F, Whatman) à l'aide d'un dispositif en inox de filtration sous poussée d'azote. La filtration permet d'éliminer les matières en suspension (MES) de grosse taille qui pourraient diminuer la qualité de l'extraction qui suit (e.g. colmatage des cartouches d'extraction). Les filtrats obtenus correspondent à la phase dissoute des effluents. L'extraction organique du filtrat a été réalisée dans la mesure du possible le lendemain de la filtration (conservation une nuit à 4°C). Dans le cas contraire, le filtrat a été conservé à -20°C jusqu'à extraction réalisée au plus tard 4 jours après.

Le protocole d'extraction décrit ci-après permet l'extraction de composés organiques présentant une large gamme de polarité. Il a été largement éprouvé pour la bioanalyse d'eaux de surface et d'eaux usées urbaines (e.g. Aït-Aïssa et al 2020, Gardia-Parège 2015).

L'extraction en phase solide (SPE) du filtrat a été réalisée sur phase HLB (cartouches Oasis-HLB™, 200 mg, 6 cc, Waters) à l'aide d'un système de type manifold sous vide. Les cartouches sont préalablement conditionnées avec 5 mL de dichlorométhane (DCM), 5 mL d'un mélange DCM/méthanol (MeOH), 5 mL de MeOH et enfin 5 mL d'eau ultrapure. Les échantillons sont ensuite passés sur les cartouches au goutte à goutte, à raison de 1 L par cartouche. Après séchage (2 h), chaque cartouche est élueée séquentiellement par 10 mL de MeOH, 10 mL de DCM/MeOH et 10 mL de DCM. L'extrait final (30 mL) est évaporé à sec à l'aide d'un système d'évaporation EZ-2 (Genevac, UK) et le résidu repris dans un petit volume de MeOH (~1 mL), constituant l'extrait stock conservé à -20°C. Un aliquote de cet extrait est évaporé à sec puis repris par du diméthylsulfoxyde (DMSO), qui est un solvant organique compatible avec les bioessais. Tous les extraits organiques sont conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

2.3.2.2 Détermination du facteur d'enrichissement relatif (REF) dans les extraits

Afin de pouvoir remonter à une concentration dans l'échantillon initial, il est important de déterminer le facteur de concentration ou **facteur d'enrichissement relatif (REF)** dans l'extrait final obtenu.

Avec le protocole de préparation utilisé, la phase organique dissoute est concentrée environ 2500 fois de l'effluent brut (REF = 1) vers l'extrait organique (REF = 2500). Ces extraits organiques sont ensuite testés après dilution dans le milieu de culture des bioessais (cf. §2.3.3) en utilisant un facteur de dilution minimum de 200 (soit 0,5 % vol/vol de DMSO), conduisant à une concentration maximale testée de 12,5 REF (soit 12,5 litres-équivalent de l'effluent initial par litre de milieu de culture) dans les bioessais.

A chaque étape de la préparation des extraits, un suivi gravimétrique des volumes ajoutés est réalisé afin de mesurer les volumes exacts utilisés pour chaque échantillon (en prenant en compte la masse volumique des différents solvants) et ainsi déterminer les valeurs de REF propres à chaque échantillon.

2.3.3 Bioessais *in vitro*

2.3.3.1 Description et conditions d'utilisation des lignées cellulaires

Le Tableau 1 présente les différents bioessais *in vitro* mis en œuvre dans l'étude.

Les bioessais *in vitro* utilisés dans cette étude sont basés sur **des lignées cellulaires humaines** qui expriment de façon stable le **gène rapporteur** de la luciférase dont l'expression est spécifiquement régulée par un récepteur également exprimé dans les cellules (Figure 2). L'intérêt de ces outils *in vitro* pour la biodétection de substances actives au sein de matrices environnementales réside dans leur capacité à fournir une réponse qui est spécifique de la cible endocrinienne (récepteur) étudiée, de façon sensible et quantitative (l'induction de l'activité luciférase est directement proportionnelle à la concentration en substances actives en présence).

Tableau 1 : Description des différentes lignées cellulaires utilisées dans l'étude

Récepteur ciblé (abbrév.)	Bioessai*	Composés de référence	Référence	Exemples de composés pharmaceutiques actifs sur ces récepteurs
Récepteur des œstrogènes (ER)	MELN	Agoniste : 17b-œstradiol (E2)	Joyeux et al. 1997	Œstrogènes synthétiques : éthynil-œstradiol, mestranol, lévonorgestrel
Récepteur des androgènes (AR)	UALH-hAR**	Agoniste : R1881; DHT Antagoniste : hydroxyflutamide	Dellal et al. 2020; Grimaldi et al. 2019	Androgènes synthétiques : trenbolone, methyltestosterone
Récepteur des glucocorticoïdes (GR)	HMLN-hGR**	Agoniste : dexamethasone Antagoniste : RU486	Molina-Molina et al. 2006; Grimaldi et al. 2019	Glucocorticoïdes synthétiques : hydrocortisone, fluticasone, béclometasone, clobetasol, prednisolone...
Récepteur des progestagènes (PR)	HELN-hPR**	Agoniste : R5020 Antagoniste : RU486	Molina-Molina et al. 2006; Grimaldi et al. 2019	Progestagènes synthétiques : gestodène, levonorgestrel, norethindrone, megestrol
Récepteur des minéralocorticoïdes (MR)	HG5LN-hMR**	Agoniste : aldostéronne Antagoniste : spironolactone	Toso et al. 2023	Corticostéroïdes : canrénone, hydrocortisone, spironolactone, prednisolone, progestérone
Récepteur des rétinoïdes (RAR α /RXR)	HELN-RAR α **	Agoniste : TTNPB	Balaguer et al. 2001	Réactifs organostanniques
Récepteur des pregnanes (PXR)	HG5LN-hPXR	Agoniste : SR12813	Seimandi et al. 2005	Divers pharmaceutiques dont des antibiotiques, stéroïdes, antifongiques
Récepteur des proliférateurs du péroxyxomes γ (PPAR γ)	HG5LN-hPPAR γ **	Agoniste : rosiglitazone Antagoniste : T009007	Seimandi et al. 2005	Fibrates, indométhacine, ibuprofène
Sans récepteur (bioessai contrôle)	HG5LN**	-	Seimandi et al. 2005	-

* Une description des constructions génétiques propres à chaque lignée est présentée en Annexe 2. ** Bioessais réalisés par la plateforme de criblage de l'INSERM.

Cette batterie de bioessais permet de renseigner l'activité endocrinienne des échantillons vis-à-vis d'un panel large de récepteurs nucléaires humains : récepteurs des œstrogènes (ER), des androgènes (AR), de la progestérone (PR), des glucocorticoïdes (GR), des minéralo-corticoïdes (MR), des rétinoïdes

(RAR α /RXR), des proliférateurs des peroxysomes (PPAR γ), et des prégnanes (PXR). Ces différents récepteurs, qui ont un rôle dans la régulation endocrinienne de différentes fonctions physiologiques, comme la reproduction ou le développement (ER, AR, PR, GR, MR, RAR α /RXR) ou le métabolisme des xénobiotiques et de molécules endogènes comme les hormones ou les lipides (PXR, PPAR γ), sont les cibles moléculaires de nombreuses substances chimiques, dont des substances pharmaceutiques (cf. exemples dans le Tableau 1). Il est attendu qu'une telle combinaison de bioessais complémentaires favorise la détection d'un spectre relativement large de substances actives au sein des échantillons.

Les conditions de culture, d'exposition des cellules aux extraits et de mesure de l'activité luciférase et de la viabilité cellulaire sont détaillées en **Annexe 2**. Pour chaque échantillon, une gamme de dilutions des extraits réalisée dans le DMSO est testée dans au moins deux expériences indépendantes. Après 24 h d'exposition, l'activité de la luciférase est mesurée à l'aide d'un luminomètre après ajout d'une solution de luciférine, substrat de la luciférase. La viabilité cellulaire est mesurée par le test au MTT (Laville et al. 2004).

Les données de luciférase sont exprimées en pourcentage (%) de la luminescence maximale induite par la molécule de référence pour les bioessais avec récepteur ou de celle mesurée dans les cellules exposées au solvant DMSO seul pour le bioessai contrôle. Concernant la mesure de viabilité cellulaire, le résultat est exprimé en % du signal mesuré dans les cellules exposées au solvant DMSO seul.

2.3.3.2 Analyse des données : quantification d'équivalents-bioanalytiques (BEQ)

Les données de luminescence collectées (exprimées en RLU ou *relative light unit*) sont normalisées entre 0% (niveau de luminescence mesuré pour le témoin négatif) et 100% (niveau de luminescence mesuré pour le témoin positif), selon l'équation 1 suivante :

$$\text{Equation 1} \quad \% \text{ Luciferase} = \frac{\text{RLU échantillon} - \text{RLU témoin DMSO}}{\text{RLU témoin positif} - \text{RLU témoin DMSO}}$$

Un échantillon est considéré actif lorsqu'il génère une réponse (activation ou inhibition de luminescence) de plus de 20 % comparativement au contrôle négatif (solvant DMSO). Dans ce cas, la courbe concentration-réponse (pourcentage de luminescence en fonction de la concentration) est modélisée selon l'équation de Hill à l'aide de la macro Excel™ RegTox (Vindimian 2020). Cette étape de modélisation permet de dériver la concentration induisant 10 % d'effet (EC₁₀), exprimée en REF pour les échantillons ou en ng/L ou µg/L pour les composés de référence.

Le ratio entre l'EC₁₀ de la substance de référence (en g/L) et l'EC₁₀ de l'échantillon (en REF) permet alors de quantifier l'activité de l'échantillon en **concentrations d'équivalents-bioanalytiques (BEQ)**, **exprimées en quantité (g) d'équivalent-composé de référence par quantité (L) d'échantillon initial** (Equation 2).

$$\text{Equation 2} \quad [\text{BEQ}] = \frac{\text{EC10 composé de référence (en g/L)}}{\text{EC10 échantillon (en REF)}}$$

Par exemple, dans le cas de l'activité estrogénique, le résultat sera exprimé en quantité d'équivalents-17beta-estradiol par litre d'échantillon (e.g. ng E2-Eq/L), le 17beta-estradiol (E2) étant la molécule de référence dans ce test. Dans son principe, la valeur de BEQ intègre donc l'effet de l'ensemble des substances présentant le même mode d'action au sein d'un échantillon. Dans le cas du bioessai contrôle n'exprimant pas de récepteur (HG5LN), les concentrations d'échantillon (en REF) induisant 10 % d'effet (induction ou inhibition) par rapport au témoin solvant DMSO sont déterminées. Par convention, cette EC₁₀ définit la concentration minimale au-delà de laquelle on considère qu'il existe une interférence dans les essais avec récepteur dans le mode agoniste ou antagoniste.

2.3.3.3 Détermination des limites de détection dans chaque bioessai

Pour un bioessai donné, la limite de détection (LD) théorique dans un échantillon est définie comme le ratio entre la concentration du composé de référence induisant 10 % d'effet (EC₁₀) et la valeur de REF de l'échantillon à la concentration maximale testée sans effet matriciel. Les LD pour un échantillon théorique sans effet matriciel (i.e. concentration maximale testée = environ 12,5 REF) sont présentées en Annexe 3.

Ces valeurs de LD varient selon les échantillons et, dans le cas d'interférences matricielles, elles sont définies comme le ratio entre la concentration du composé de référence induisant 10 % d'effet (EC₁₀) et la concentration en échantillon (EC₁₀ en REF) active dans le bioessai HG5LN. Elles sont alors renseignées dans les tableaux de résultats.

2.3.4 Stratégie de test : prise en compte des effets de matrice

Pour prendre en compte les potentiels effets de matrice et *in fine* rendre compte de la présence d'activités endocriniennes qui soient spécifiques des récepteurs ciblés, une stratégie de tests en deux étapes a été employée (Figure 4).

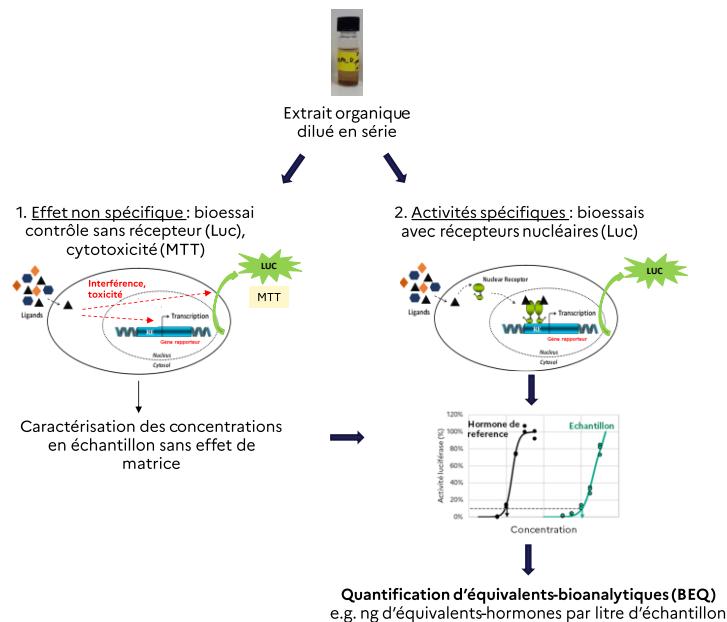


Figure 4. Stratégie de test prenant en compte les effets non spécifiques dans l'évaluation des activités endocriniennes des échantillons

1. Caractérisation d'effets non spécifiques sur la luciférase (effets de matrice)

Les échantillons analysés étant des matrices complexes, des éléments matriciels peuvent interférer avec le signal et se manifester par une augmentation ou une réduction de la luminescence de façon indépendante d'une action sur un récepteur nucléaire. Elles peuvent résulter par exemple d'interactions directes des composants de l'échantillon avec l'activité enzymatique luciférase ou encore de phénomènes de cytotoxicité conduisant à une inhibition du signal luminescent qui soit non spécifique d'un mode d'action endocrinien. Dans un premier temps, il est donc important d'évaluer l'occurrence de telles interférences et les concentrations en échantillons auxquelles elles interviennent.

Deux types de bioessais contrôles ont été mis en œuvre, l'un évaluant un effet sur la luciférase (HG5LN), l'autre sur la viabilité cellulaire (cytotoxicité).

Bioessai HG5LN. L'utilisation d'une **lignée cellulaire contrôle** (HG5LN) qui exprime le gène rapporteur luciférase mais dont l'expression n'est pas régulée par un récepteur permet de détecter des réponses non spécifiques liées à la présence d'interférents matriciels dans les extraits et de les quantifier. Trois cas de figures ont ainsi été observés après exposition des cellules HG5LN aux extraits organiques dans l'étude :

- Absence d'effet : pas d'interférence non spécifique sur l'activité luciférase
- Inhibition du signal luciférase > 20% : détermination des concentrations sans effet inhibiteur non spécifique à considérer en mode antagoniste dans les essais avec récepteur
- Augmentation du signal luciférase > 20% : détermination des concentrations sans effet induiteur non spécifique à considérer en mode agoniste dans les essais avec récepteur.

Cytotoxicité. Une mesure de la viabilité cellulaire (test au MTT) dans les cellules MELN et HG5LN-hPXR a été réalisés à l'Ineris. Deux cas de figures ont été observés :

- Viabilité cellulaire > 80% : pas d'effet cytotoxique significatif
- Viabilité cellulaire < 80% : action cytotoxique, détermination des concentrations sans effet cytotoxique à considérer dans les essais MELN et HG5LN-hPXR.

2. Mesures d'activités endocriniennes spécifiques

Les bioessais avec récepteurs ont été mis en œuvre :

- **en mode « agoniste »** (évaluation de la capacité de l'échantillon à activer le récepteur). Ces tests sont mis en œuvre pour tous les bioessais avec récepteur décrits dans le Tableau 1, en considérant les concentrations en échantillons qui n'induisent pas d'effet activateur non spécifique sur la luciférase dans le bioessai HG5LN ou non cytotoxiques pour les bioessais MELN et HG5LN-hPXR.

- **en mode « antagoniste »** (évaluation de la capacité de l'échantillon à bloquer l'activation du récepteur par son ligand de référence). Ces tests sont mis en œuvre uniquement pour les récepteurs pour lesquels des activités antagonistes dans les eaux usées ont été rapportées dans la littérature. Cela concerne en particulier les récepteurs AR, GR, MR, PPARy et PR. Dans ces essais, les concentrations en échantillon considérées sont celles établies comme sans effet inhibiteur non spécifique sur la luciférase dans le bioessai HG5LN.

2.3.5 Contrôles de la qualité

Le processus expérimental depuis le prélèvement jusqu'à l'analyse implique de nombreuses manipulations susceptibles d'introduire une contamination non intentionnelle des échantillons. Pour s'en prémunir au plus possible, des précautions d'usage ainsi que différents blancs et contrôles sont mis en œuvre, afin de s'assurer de la qualité et de la spécificité des résultats reportés.

2.3.5.1 Précautions d'usages

D'une manière générale, la mise en contact des échantillons avec des matières plastiques a été évitée le plus possible par l'usage d'un matériel de laboratoire en verre et en inox afin d'éviter les contaminations par relargage de substances actives telles que les plastifiants. Toute la verrerie a été soigneusement nettoyée (rinçage au solvant et calcination à 450°C pendant >5 h) avant toute utilisation. Les solvants utilisés étaient tous de qualité HPLC au minimum.

2.3.5.2 Blancs terrain et blancs de laboratoire

2.3.5.2.1 Blancs terrain

Des blancs terrain sont réalisés afin d'évaluer les contaminations des échantillons au cours des prélèvements et de leur transfert. Un blanc terrain est un échantillon d'eau non contaminée qui a subi exactement les mêmes manipulations (systèmes de collecte sur le terrain, transport, conservation, extraction et analyse) que les effluents prélevés.

Dans notre étude, les 4 agences SGS régionales impliquées dans la campagne de prélèvements ont réalisé un blanc terrain au niveau d'un des sites industriels qu'elles ont échantillonnés. Ces blancs sont constitués chacun de 4 L d'eau d'Evian (provenant de bouteilles en verre de 1 L du commerce) qui ont été mis en contact avec les dispositifs de prélèvement de SGS et ont subi toutes les étapes de collecte, de transport et d'analyses qui ont suivi.

2.3.5.2.2 Blancs de laboratoire

Pour évaluer l'influence du système de filtration et d'extraction lors de la préparation des extraits, des blancs procédure ont été générés cours de chaque série d'extraction.

Un **blanc de filtration** a été réalisé en filtrant 1 L d'eau ultrapure avec le dispositif de filtration et en préparant un extrait depuis le filtrat obtenu.

Pour chaque série d'extraction, des **blancs d'extraction** ont été générés par l'extraction d'une cartouche HLB vierge qui a été conditionnée, séchée et éluee pour générer un extrait de la même manière qu'une cartouche ayant été au contact d'un effluent. Ce type de blanc peut notamment mettre en évidence des contaminations éventuelles liées aux solvants ou au matériel d'extraction utilisés.

2.3.5.3 Contrôles associés aux bioessais

Différents contrôles associés aux bioessais (i.e. témoins positifs et négatifs, vérification de la sensibilité aux composés de référence, caractérisation des effets non spécifiques) sont mis en œuvre afin de s'assurer de la réponse correcte intra- et inter-essais (cf conditions de test en Annexe 2) et de la spécificité des activités endocriniennes détectées (cf. évaluation des effets matriciels en §2.3.4).

3 Résultats

3.1 Contrôles de la qualité

3.1.1 Réponses des bioessais *in vitro* aux composés de référence

La sensibilité des bioessais aux composés de référence au cours des analyses est documentée par les courbes concentration-réponse et les valeurs d'EC₅₀ et d'EC₁₀ présentées en Annexe 3.

Ces données montrent que les facteurs d'induction et les concentrations effectrices des composés de référence sont conformes avec celles obtenues habituellement dans les laboratoires Ineris et INSERM et en accord avec l'affinité connue de ces composés pour les récepteurs considérés (Balaguer et al. 2001; Grimaldi et al. 2019). Tous les résultats présentés par la suite se basent donc sur des essais valides en termes de sensibilité de réponse des bioessais.

Les valeurs d'EC₁₀ des composés de référence (en g/L) ont permis de déterminer les limites de détection théoriques (LD, exprimée en BEQ) des activités endocrinianes dans l'échantillon initial en considérant un facteur d'enrichissement maximal testé (REFmax), soit 12,5 en l'absence d'interférences. Ces valeurs de LD sont reportées en Annexe 3.

3.1.2 Blancs terrain et blancs procédure

L'activité des blancs terrain et des blancs laboratoire a été testée sur l'ensemble des bioessais. Les résultats des blancs terrain sont présentés dans le Tableau 2. Le détail des résultats pour l'ensemble des blancs (terrain et laboratoire) dans les différents bioessais est présenté en Annexe 4 ci-dessous.

Dans notre étude, aucune activité endocrinienne n'a été détectée dans aucun échantillon de blancs (blancs terrain et laboratoire) démontrant que les procédures d'échantillonnage et de préparation des extraits organiques **n'ont pas introduit de contaminations susceptibles de générer des faux positifs**.

Tableau 2 : Absence d'activités endocrinianes dans les blancs terrain

Les valeurs sont exprimées en concentrations en échantillon maximales testées (exprimées en facteurs d'enrichissement ou REF) et en BEQ (équivalents-bioanalytiques en ng/L). na : non applicable ; nd : non déterminé.

	Blancs terrain (BLC)							
	unité: REF				unité: BEQ (ng/L)			
	BLC-36	BLC-69	BLC-76	BLC-91	BLC-36	BLC-69	BLC-76	BLC-91
1. Bioessai contrôle (sans récepteur)	>10	>10	>12	>10	na	na	na	na
2. Bioessais avec récepteurs								
Activité agoniste								
ER	>16	>16	>18	>16	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
AR	>10	>10	>12	>10	<2,2	<2,2	<2,0	<2,3
GR	>10	>10	>12	>10	<39	<38	<34	<39
MR	>10	>10	>12	>10	<8	<8	<7	<8
PR	>10	>10	>12	>10	<6	<6	<5	<6
RAR α	>10	>10	>12	>10	<11	<11	<10	<11
PPAR γ	>10	>10	>12	>10	<56	<56	<49	<57
PXR	>16	>16	>18	>16	<255	<252	<225	<260
Activité antagoniste								
anti-AR	>10	>10	>12	>10	<240	<236	<211	<244
anti-GR	>10	>10	>12	>10	<62	<61	<55	<63
anti-MR	>10	>10	>12	>10	<29	<29	<26	<30
anti-PPAR γ	>10	>10	>12	>10	nd	nd	nd	ng BRL-Eq/L
anti-PR	>10	>10	>12	>10	<18	<18	<16	<18

En plus de ces analyses de blancs, un échantillon d'eau d'entrée (réseau d'eau potable) fourni par le site A a été analysé pour les activités ER, AR, GR et PXR. Aucune activité endocrinienne n'a été détectée dans cet échantillon.

3.2 Bioanalyse des extraits d'effluents

3.2.1 Bioessai contrôle : occurrence d'interférences matricielles

L'occurrence d'interférences matricielles susceptibles de perturber le signal luciférase de façon indépendante d'une action sur un récepteur nucléaire a été évaluée 1) par le bioessai contrôle HG5LN sans récepteur et 2) par la mesure viabilité cellulaire dans les lignées MELN et HG5LN-hPXR par le test au MTT. Dans chaque essai, une gamme de dilution de chaque extrait a été testée et les concentrations actives déterminées. Les résultats sont reportés dans le Tableau 3; les courbes individuelles de chaque extract sont présentées dans les planches de résultats en Annexe 5.

Tableau 3. Effets non spécifiques des échantillons sur l'activité luciférase et sur la viabilité cellulaire générés par les extraits organiques

*Les concentrations actives (exprimées en REF) sont déterminées d'après les courbes concentration-réponse présentés en Annexe 5 ; na : non applicable ; nd : non déterminé ; * inhibition partielle de la viabilité cellulaire ; ** : PCC = première concentration testée induisant une réduction de la viabilité cellulaire supérieure à 20%.*

Site	Effet non spécifique sur l'activité luciférase		Effet sur la viabilité cellulaire	
	HG5LN		MELN	HG5LN-hPXR
	EC10_inhibition (REF)	EC10_induction (REF)	PCC_MTT (REF)	PCC_MTT (REF)
A	na	0,2	1,2*	1,2*
B	5,2	na	12,8*	>12,8
C	0,78	na	>14	>14
D	0,05	na	0,06	0,06
E	0,10	na	0,09	0,09
F	>10	>10	nd	>14,6
G	>8	>8	>11,7	>11,7
H	>8	>8	>11,7	>11,7
I	0,02	na	0,29	0,29
J1	3,9	na	>11,4	>11,4
J2	0,11	na	1,2	0,35
K	0,07	na	0,34	1,2
L	0,14	na	3,8	1,2
M	>11	>11	>16,5	>16,5
N	>6	>6	>9,9	>9,9
O	>8	>8	>12,2	>12,2
P	>8	>8	12,5*	>12,5
Q	0,15	na	1,11	1,11
R	1,4	na	>5,4	>5,4
T	0,47	na	2,7	0,9
U	>4	>4	2,0	2,0
V	2	na	1,1	3,4

Globalement, des effets non spécifiques sont observés pour plusieurs échantillons, avec une bonne concordance entre effet non spécifique sur la luciférase et cytotoxicité.

Avec le bioessai HG5LN, des effets non spécifiques sur la luciférase sont mis en évidence pour 14 des 22 extraits organiques testés : A, B, C, D, E, I, J1, J2, K, L, Q, R, T et V. Ces interférences se manifestent aux plus fortes concentrations testées par une inhibition de l'activité luciférase par rapport au témoin négatif (solvant DMSO), à l'exception de l'échantillon A qui lui génère une augmentation non spécifique de l'activité luciférase. Les valeurs d'EC₁₀ interférences varient de 0,02 REF (échantillon I) à 5,2 REF (échantillon B), avec 10 valeurs inférieures à 1 REF (A, C, D, E, I, J2, K, L, Q et T). Ce résultat indique que, pour certains échantillons, les interférences sont relativement importantes puisqu'elles apparaissent en conditions diluées (REF < 1) par rapport à la concentration dans l'effluent initial.

Pour les échantillons D, E, I, J2, K, L, Q et T, l'inhibition du signal luciférase peut s'expliquer par des phénomènes de cytotoxicité observée dans les cellules MELN et HG5LN-hPXR et conduisant aux plus fortes concentrations à 100% de mortalité cellulaire (cf courbes en Annexe 5). Toutefois, il est important de souligner que, dans la majorité des cas, cette cytotoxicité est observée à des concentrations supérieures à celles induisant une inhibition de luminescence dans le bioessai HG5LN (Tableau 3).

Comme attendu, ce dernier test est donc plus sensible pour détecter une interférence non spécifique sur l'activité luciférase. Cette meilleure sensibilité s'observe notamment pour les échantillons C, J1 et R qui ne présentent pas de cytotoxicité.

Une exception est toutefois notée pour l'extrait U qui n'a pas présenté d'effet dans le bioessai HG5LN (tests réalisés à l'Inserm) alors qu'il présentait une cytotoxicité aux plus fortes concentrations (REF>1) dans les cellules MELN et HG5LN-hPXR (tests MTT réalisés à l'Ineris). Cette apparente divergence de résultats, non expliquée à ce stade, n'est cependant pas problématique pour la suite de l'étude.

Au bilan, ces essais ont permis de déterminer les concentrations d'échantillons auxquelles des interférences non spécifiques d'un récepteur sont présentes, afin de les prendre en compte par la suite dans l'interprétation des résultats des bioessais avec récepteurs.

3.2.2 Mesures d'activités endocrinien

Le Tableau 4présente les profils d'activités endocrinien dans les échantillons exprimées en concentrations d'équivalents-bioanalytiques (BEQ) déterminées par le ratio entre l'EC₁₀ (en g/L) de la molécule de référence et l'EC₁₀ (en REF) de l'échantillon. Les courbes concentration-réponse à partir desquelles ont été dérivées ces valeurs sont présentées en Annexe 5, sous forme de planches de résultats par prélèvements. Dans le présent chapitre, nous nous attacherons à décrire les résultats dans leur globalité et au regard des informations disponibles sur la présence d'eaux sanitaires dans les effluents et de station de traitement sur site en amont du rejet (informations présentées dans le Tableau 4).

Les bioessais avec récepteurs ont révélé différents profils de réponse selon les sites :

- pour 5 prélèvements, aucune activité spécifique n'a été détectée, pour certains du fait de fortes interférences matricielles ;
- 17 prélèvements présentent des activités endocrinien multiples.

3.2.2.1 Absence de détection d'activité endocrinien spécifique

Aucune activité endocrinien spécifique n'a pu être mise en évidence pour les prélèvements A, D, E, K et J2 (Tableau 4).

L'absence de détection d'activité endocrinien sur ces sites s'explique, pour partie au moins, par des interférences importantes associées à ces échantillons, ce qui se traduit par des limites de détection parfois très hautes pour ces échantillons. Il est possible que ces interférences aient pu, le cas échéant, masquer la présence de substances actives présentes à de faibles concentrations.

3.2.2.2 Détection d'activités endocrinien spéci

Des activités endocrinien spéci ont été détectées et quantifiées dans 17 échantillons (B, C, F, G, H, I, J1, L, M, N, O, P, Q, R, T, U et V), indiquant la présence dans ces échantillons de substances capables d'activer (activité agoniste) ou de bloquer (activité antagoniste) les récepteurs étudiés (Tableau 4).

D'une manière générale, les profils d'activités varient selon les sites, tant en termes de récepteurs activés/inhibés que des niveaux de concentrations mesurées (en BEQ). Ces différents profils multi-activités suggèrent que les substances actives responsables des activités détectées sont différentes d'un site à l'autre. En l'absence d'information sur les molécules présentes dans les extraits, il est toutefois impossible d'identifier la nature des substances responsables des activités observées. Néanmoins, des hypothèses peuvent être formulées sur la base des profils de réponse pour certains récepteurs.

Activités GR, PR et MR. Les prélèvements I et L présentent de fortes activités GR (respectivement 44,1 et 5,3 µg Dex-Eq/L) associées à de fortes activités PR et anti-MR (prélèvement I) ou MR (prélèvement L). Il est connu que les glucocorticoïdes, naturels ou synthétiques, sont capables d'activer avec une forte affinité le récepteur GR, et certains présentent également une forte affinité pour les récepteurs MR et PR. D'autre part, les récepteurs GR et MR sont très spéci des corticoïdes et à notre connaissance peu d'autres familles de substances sont connues pour les activer avec une bonne affinité. La présence de (gluco)corticoïdes dans ces prélèvements semble donc une explication tout à fait plausible aux très fortes activités GR détectées. La détection d'une activité GR dans les prélèvements O, Q, R et U serait également très probablement liée de la présence de ce type de substances, bien qu'elle le soit à des concentrations d'un ordre de grandeur inférieur aux sites I et L.

La littérature scientifique mentionne la présence d'activité GR dans différents types d'eaux usées (principalement d'origine domestique, hospitalière ou industrielle). D'une manière générale, les niveaux d'activité rapportés dans plusieurs études varient de 10 à 200 ng Dex-Eq/L (van der Linden et al. 2008;

Suzuki et al. 2015; Cavallin et al. 2021; Macikova et al. 2014; Houtman, ten Broek, et Brouwer 2018; Daniels et al. 2018; Chen et al. 2016; Schriks et al. 2010). Ces niveaux restent nettement en deçà de ceux quantifiés dans notre étude, ce qui pourrait suggérer que, au moins pour les prélèvements I et L, les activités mesurées soient liées à la production du site plutôt qu'à une source humaine. C'est particulièrement notable pour l'échantillon I qui ne contient pas d'eaux sanitaires.

Activités ER et (anti)AR. Des activités estrogéniques (ER) sont quantifiées dans 14 échantillons à des concentrations comprises entre 0,2 et 29 ng E2-Eq/L. La présence de cette activité dans les eaux résiduaires urbaines a été largement documentée dans la littérature scientifique et est expliquée, pour majeure partie, par les œstrogènes humains excrétés via les urines et les fèces. Les niveaux d'activité ER dans des eaux usées urbaines varient entre 0,04 et 25 ng E2-Eq/L (Escher et al. 2021), ce qui est du même ordre de grandeur que les activités mesurées dans notre étude. Dans celle-ci, tous les sites présentant une activité ER correspondent à des effluents qui collectent à la fois les eaux sanitaires et les eaux issues des process industriels ; il apparaît donc raisonnable d'attribuer les activités ER détectées à la présence des personnels sur site et pas aux activités de production des sites.

Un constat similaire peut être fait concernant l'activité androgénique (AR) même si l'on a actuellement moins de recul sur les niveaux de DHT-Eq usuellement retrouvés en entrée de stations d'épuration urbaines (Escher et al. 2021). Bellet et al. (2012) ont rapporté des niveaux d'activité androgénique de 44 à 469 ng DHT-Eq/L en entrée de 6 stations d'épuration urbaines, niveaux qui sont du même ordre de grandeur que ceux que l'on mesure dans 5 prélèvements dans notre étude. Les activités androgéniques, lorsqu'elles sont détectées, sont donc très probablement le reflet de la présence d'eaux sanitaires dans les effluents.

Des activités anti-androgéniques (anti-AR) sont détectées sur 4 sites, à des niveaux relativement importants (188-4000 µg Flutamide-Eq/L) au regard de ceux rapportés dans des effluents urbains ou dans le milieu en aval d'effluents urbains (0,02-71 µg Flutamide-Eq/L) (Zhou et al. 2022; Shi et al. 2009; Rao et al. 2014; Muschket et al. 2018; Escher et al. 2021). Il existe par ailleurs très peu de données sur la quantification d'activités anti-androgénique dans eaux usées urbaines non traitées, l'activité rapportée en lien avec le récepteur AR étant le plus souvent dominée par la présence d'activités agonistes. Dans les eaux urbaines, ces activités agonistes sont médiées principalement par des substances dérivées des hormones d'origine humaine, lesquelles sont très largement abattues par les stations de traitements (Bellet et al. 2012; Gardia-Parège 2015; Escher et al. 2021). La nature des substances actives responsables d'activités anti-androgéniques dans les effluents urbains est très peu documentée et il est difficile d'émettre des hypothèses quant à la nature des substances responsables des activités anti-AR détectées. Néanmoins, Šauer et al. (2018) ont montré que les progestagènes synthétiques étaient de forts contributeurs de cette activité dans des effluents urbains. C'est également le cas de certains glucocorticoïdes, comme la dexaméthasone, qui possède une activité anti-androgénique (Garoche et al. 2023). Il est de ce fait intéressant de noter la co-occurrence de fortes activités anti-AR, GR et PR sur le site I, ce qui pourrait révéler la présence de ce type de substances dans l'échantillon analysé.

Activité PXR. Le bioessai PXR a répondu positivement sur 13 des échantillons testés, avec des niveaux d'activités modérés à forts qui s'échelonnent entre 2 et 104 µg SR12813-Eq/L. Ce récepteur, qui joue un rôle clé dans le métabolisme des hormones stéroïdiennes endogènes et des xénobiotiques, est connu pour être activé par une grande diversité de composés organiques dont de nombreux composés pharmaceutiques (Lemaire et al. 2006; Creusot et al. 2010). Il n'est donc pas surprenant de constater que dans notre étude plusieurs sites induisent une activité agoniste sur le récepteur PXR. Lorsqu'elles sont recherchées, des activités PXR sont fréquemment, mais pas systématiquement, détectées dans des rejets urbains à des niveaux de l'ordre de 0.8-23 µg SR12813-Eq/L (Creusot et al. 2010; De Baat et al. 2020; Escher et al. 2021). Cet ordre de grandeur est similaire à celui mesuré dans 9 (2-29 µg SR12813-Eq/L) des 13 échantillons actifs, des activités plus fortes étant détectées sur les sites L, R et U (69-104 µg SR12813-Eq/L). Toutefois, à ce stade, il n'est pas possible d'émettre des hypothèses quant à la nature et à l'origine des composés responsables de ces activités.

Activités RAR α et PPAR γ . Des activités endocriniennes impliquant les récepteurs des rétinoïdes (RAR α) et PPAR γ sont détectées dans certains échantillons. Actuellement, il existe peu de connaissances quant à l'occurrence environnementale de ces activités et les connaissances sur les substances environnementales responsables de ces activités sont également très fragmentaires. Dans la présente étude, elles ont été mises en œuvre de façon exploratoire du fait de leur rôle dans la régulation endocrinienne et de leur implication comme cible moléculaire de certains principes actifs. A ce titre, la détection d'activités RAR α sur les sites U, V, M et J (pour lequel une activité partielle est détectée mais non quantifiée) et PPAR γ sur les sites L, Q, U et V est novatrice et mériterait d'être explorée plus avant.

Tableau 4. Activités endocriniennes en équivalents-bioanalytiques (BEQ) dans les extraits organiques et caractéristiques des rejets

Les valeurs surlignées en rouge correspondent aux concentrations en BEQ quantifiées lorsqu'une activité endocrinienne spécifique est présente. En l'absence d'activité détectée, la limite de détection (LD) précédée du signe « < » est alors indiquée. Les valeurs de LD sont spécifiques pour chaque échantillon et prennent en compte l'occurrence d'interférence mesurée le bioassay contrôle HG5LN sans récepteur (cf. §3.2.1). * activité partielle détectée (effet<20%) mais non quantifiée. E2 : 17 β -estradiol ; DHT : dihydrotestotérone ; DEX : dexaméthasone ; Aldo : aldostérone ; Rosi : rosiglitazone ; Flu : flutamide ; spiro : spironolactone.

Lorsqu'elles sont connues, des informations complémentaires sur la nature des rejets et les sites de prélèvements sont mentionnées

Unité	Blancs terrain (moy.)	Sites																						
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J1	J2	K	L	M	N	O	P	Q	R	T	U	V	
Activités agonistes																								
ER	ng E2-Eq/L	<0,03	<2,3	4,8	0,3	<10,2	<5,3	3,6	0,8	1,0	<23,5	0,3	<5,0	<8,1	0,5	<0,03	0,5	0,3	0,2	<3,7	0,9	5,7	8,2	28,8
AR	ng DHT-Eq/L	<2	<95	78	<29	<425	<219	8	<2	<3	<978	<6	<209	<336	183	<2	<4	<3	<3	<153	<16	72	<48	284
GR	ng DEX-Eq/L	<38	<1643	76	<509	<7342	<3784	<42	<53	<53	44078	<102	<3607	<5802	5294	<38	<62	209	<49	459	305	<835	856	<55
MR	ng Aldo-Eq/L	<8	<342	<16	<106	<1528	<787	16	<11	<11	<3512	<21	<751	<7207	11473	<8	<13	34	<10	<548	<59	<174	<19	60
PR	ng R5020-Eq/L	<6	<262	<12	<81	<1170	<603	<7	<8	<8	8849	<16	<575	<925	<451	<6	<10	21	<8	<420	<45	<133	<15	<7*
RAR α	ng TTNP-Eq/L	<11	<458	<21*	<142	<2046	<2055	<12	<15	<15	<4705	<28*	<1005*	<1617	<15	<10*	<17	<14	<14	<734	<79	<233	107	44
PPAR γ	μ g Rosi-Eq/L	<0,06	<2,4	<0,1*	<0,7	<10,7	<5,5	<0,06	<0,08	<0,08	<24,5	<0,2	<5,2	<8,4	2,2	<0,06	<0,09*	<0,07	<0,07	0,7	<0,4	<1,2	1,4	0,4
PXR	μ g SR12813-Eq/L	<0,2	<17	9	29	<76	<40	<0,3	<0,3	20	<175	13	<37	<60	94	2	5	14	8	<27	104	17	69	43
Activités antagonistes																								
anti-AR	μ g Flu-Eq/L	<6	<285	<13	227	<1275	<657**	<7	<9	<9	4023	<17	<626	<1007	<490	<6	<11	<9	<9	899	<49	<145	188	<95
anti-GR	μ g RU486-Eq/L	<0,06	<2,6	<0,1	<0,8	<11,8	<6,1	<0,07	<0,09	<0,08	<27,1	<0,17	<5,8	<9,3	<4,5	<0,06	<0,1	<0,08	<0,08	<4,2	<0,5	<1,3	0,5	<0,1
anti-MR	μ g Spiro-Eq/L	<0,03	<1,2	<0,06	<0,4	<5,5	<2,8	<0,03	<0,04	<0,04	94	<0,08	<2,7	<4,4	<2,1	<0,03	<0,05	0,06	<0,04	<1,9	0,4	1,5	0,5	0,9
anti-PPAR γ	μ g T0070907-Eq/L	<0,01	<0,6	<0,03	<0,2	<2,6	<1,3	<0,02	<0,02	<0,02	<5,9	<0,04	<1,3	<2,0	<1,0	<0,01	<0,02	<0,02	<0,02	<0,9	<0,1	<0,3	0,1	<0,02
anti-PR	μ g RU486-Eq/L	<0,02	<0,76	<0,04	<0,2	<3,4	<1,8	<0,02	<0,03	<0,03	<7,8	<0,05	<1,7	<2,7	<1,3	<0,02	<0,03	<0,02	<0,02	<1,2	<0,1	1,8	<0,04	<0,1
Présence d'eaux sanitaires dans le rejet																								
Présence d'une station de traitement (biologique :bio; physico-chimique: PC; lagune :lag) en amont du rejet																								
Exutoire (mil nat: milieu naturel; STEU: station d'épuration urbaine)																								
Mil nat	STEU	Mil nat	STEU	STEU	Mil nat	Mil nat	Eaux pluv. urb.	STEU	STEU	STEU	STEU	STEU	STEU	STEU	Mil nat	STEU	STEU	STEU	STEU	STEU	STEU	STEU		

4 Conclusions

A notre connaissance, cette étude est la première à investiguer, à une échelle nationale, la présence d'activités endocriniennes associées à la phase organique dissoute de rejets de sites industriels pharmaceutiques. Elle a été entreprise dans une démarche de criblage, sur un panel de 21 sites ICPE, afin de dresser un premier état des connaissances sur la mesure d'activités endocriniennes associées à ces matrices et d'apporter des premiers éléments de réponse relatifs aux rejets de l'industrie pharmaceutique comme source de substances à activité endocrinienne, qui pourraient être émises dans le milieu aquatique.

Sans prétendre à l'exhaustivité, la batterie de bioessais basés sur le mode d'action de substances à activité endocrinienne (i.e. interaction avec des récepteurs nucléaires impliqués dans les régulations du système endocrinien) a permis de couvrir un spectre de détection de substances relativement conséquent qui inclut potentiellement différentes familles de composés pharmaceutiques.

Dix-sept des 22 effluents analysés ont montré des profils d'activités endocriniennes multiples dans la phase organique dissoute. Ces réponses indiquent la présence de substances capables d'interagir avec les récepteurs nucléaires ciblés et l'analyse des profils de réponses permet d'élaborer des hypothèses sur la nature des échantillons pour certains sites. C'est le cas des prélèvements I et L qui se caractérisent par des profils spécifiques caractéristiques des corticoïdes (forte activité sur les bioessais GR et MR/anti-MR). D'autres activités à l'inverse sont détectées sur de nombreux sites et pourraient être médiées par des substances qui ne sont pas spécifiques de l'activité de production des sites. C'est le cas des activités oestrogéniques et androgéniques qui, aux niveaux détectés, seraient probablement le reflet de la présence d'eaux résiduaires dans les rejets.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que certains échantillons présentaient des effets cytotoxiques marqués. Si ces effets sont à découpler des activités endocriniennes qui sont le cœur de cette étude, ils pourraient être considérés dans le cadre d'une caractérisation (éco)toxicologique plus large de ce type de matrices.

L'approche mise en œuvre reste une démarche expérimentale de recherche, appliquée dans cette étude pour la première fois à ce type d'échantillons. Certaines limites sont donc à considérer.

Sur le plan méthodologique, l'utilisation du bioessai contrôle a montré que ces matrices complexes pouvaient induire des effets non spécifiques sur la luciférase, interférant avec la lecture des bioessais aux fortes concentrations en échantillons. Dans certains cas, ces effets de matrices, dus pour certains à une cytotoxicité de l'effluent, n'ont pas permis de tirer des conclusions opérationnelles quant à la présence/absence d'activités endocriniennes.

Par ailleurs, l'approche expérimentale utilisée ici ne permet pas d'identifier la nature des molécules détectées par les bioessais. Nous rappelons ici que la démarche bioanalytique est une démarche par étapes, dont la première mise en œuvre ici sert à révéler la présence de substances actives au sein de mélanges complexes. Pour identifier la nature des substances révélées par les bioessais, différentes actions complémentaires peuvent être envisagées.

Plusieurs éléments propres à chaque site seraient à considérer, comme la connaissance de la typologie du réseau de collecte des eaux usées en amont du point de prélèvement (mixité entre eaux résiduaires et rejets des unités de production, existence d'une unité de traitement en aval...). Sur la base de ces informations, des prélèvements complémentaires pourraient être réalisés sur les sites priorisés pour vérifier si l'activité est toujours présente et identifier l'origine des activités sur le site.

Il s'agirait également d'identifier des substances candidates, par recouplement avec la production du site au moment du prélèvement. Une analyse des concentrations de ces substances candidates dans les échantillons permettrait alors d'évaluer leur contribution à l'activité endocrinienne du mélange. Cependant, il n'est pas à exclure qu'*in fine* on ne puisse pas expliquer toutes les activités détectées par les bioessais, par manque d'information sur les substances présentes ou par méconnaissance de l'activité endocrinienne intrinsèque des substances produites sur les sites.

Les effluents sont des mélanges complexes, contenant des milliers de substances, qui une fois dans le milieu peuvent évoluer et générer des produits de transformation. L'identification de molécules responsables d'un effet généré par un mélange aussi complexe qu'un rejet industriel reste un défi. En l'absence d'a priori fort sur l'identité des molécules que l'on suspecte être responsables des activités mesurées, la mise en œuvre d'analyses chimiques classiques (i.e. ciblées sur des molécules présélectionnées) est souvent vouée à l'échec. Pour caractériser plus avant les activités endocriniennes

détectées, il est possible d'utiliser une approche EDA (*effect-directed analysis*) qui vise à fractionner le mélange pour identifier les fractions dans lesquelles se trouve l'activité endocrinienne, guidant ainsi leur identification chimique par spectrométrie de masse en haute résolution (Brack et al. 2016). Cette démarche de recherche par EDA a montré tout son intérêt et sa performance pour identifier des molécules à activité endocrinienne dans différents contextes/matrices comme de l'eau de rivière en aval d'un rejet d'industrie pharmaceutique (Gardia-Parège 2015; Creusot et al. 2014), des eaux usées urbaines (Penru et al. 2017) ou des sédiments contaminés (Creusot et al. 2013).

Au bilan, cette étude a permis de montrer, pour certains des sites investigués, la présence d'activités endocriniennes associées à la phase organique dissoute d'effluents d'industries pharmaceutiques. Des investigations complémentaires seraient nécessaires afin de mieux comprendre la portée de ces résultats en termes de nature des substances détectées par les bioessais, de leur pertinence vis-à-vis des substances produites par site et de leurs impacts potentiels sur le milieu récepteur.

5 Références

- Aït-Aïssa S. 2024. Projet GLUCO – Caractérisation, identification et devenir d'une contamination par des glucocorticoïdes dans l'Iton et l'Eure. Rapport INERIS 183506.
- Aït-Aïssa S, Brion F, Creusot N, and Sanchez W. 2014. Etude prospective 2012 sur les contaminants émergents : Apport des outils biologiques (bioessais et biomarqueurs) pour le diagnostic de la contamination des milieux aquatiques. Rapport INERIS-ONEMA DRC-14-127339-06620A.
- Aït-Aïssa S and Creusot N. 2015. Validation de la mesure de l'activité oestrogénique dans les matrices environnementales - Revue bibliographique - Thème G - Méthodes et technologies innovantes. Rapport AQUAREF-INERIS. DRC-15-136927-12327A.
- Aït-Aïssa S, Chardon C, and Brion F. 2020. Surveillance prospective - Apport des bioessais pour l'évaluation de la qualité chimique des milieux aquatiques. Rapport AQUAREF-INERIS DRC-20-172902-02808A.
- Altenburger R, Brack W, Burgess RM, et al. 2019. Future water quality monitoring: improving the balance between exposure and toxicity assessments of real-world pollutant mixtures. Environ Sci Eur 31: 12.
- Balaguer P, Boussioux A-M, Demirpence E, and Nicolas J-C. 2001. Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands. Luminescence 16: 153–8.
- Bellet V, Hernandez-Raquet G, Dagnino S, et al. 2012. Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. Water Res 46: 1912–22.
- Brack W, Aissa SA, Backhaus T, et al. 2019. Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. Environ Sci Eur 31: 10.
- Brack W, Ait-Aïssa S, Burgess RM, et al. 2016. Effect-directed analysis supporting monitoring of aquatic environments — An in-depth overview. Sci Total Environ 544: 1073–118.
- Cardoso O, Porcher J-M, and Sanchez W. 2014. Factory-discharged pharmaceuticals could be a relevant source of aquatic environment contamination: Review of evidence and need for knowledge. Chemosphere 115: 20–30.
- Carere M, Lettieri T, Wernersson A-S, and Hanson N. 2021. Technical Proposal for Effect-Based Monitoring and Assessment under the Water Framework Directive. Report to the Common Implementation Strategy (CIS) Working Group Chemicals on the outcome of the work performed in the subgroup on Effect-Based Methods (EBM). Mandate 2016-2018.
- Cavallin JE, Beihoffer J, Blackwell BR, et al. 2021. Effects-based monitoring of bioactive compounds associated with municipal wastewater treatment plant effluent discharge to the South Platte River, Colorado, USA. Environ Pollut 289: 117928.
- Chen Q, Jia A, Snyder SA, et al. 2016. Glucocorticoid activity detected by in vivo zebrafish assay and in vitro glucocorticoid receptor bioassay at environmental relevant concentrations. Chemosphere 144: 1162–9.
- Creusot N, Aït-Aïssa S, Tapie N, et al. 2014. Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling. Environ Sci Technol 48: 3649–57.
- Creusot N, Budzinski H, Balaguer P, et al. 2013. Effect-directed analysis of endocrine-disrupting compounds in multi-contaminated sediment: identification of novel ligands of estrogen and pregnane X receptors. Anal Bioanal Chem 405: 2553–66.
- Creusot N, Kinani S, Balaguer P, et al. 2010. Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples. Anal Bioanal Chem 396: 569–83.
- Daniels KD, VanDervort D, Wu S, et al. 2018. Downstream trends of in vitro bioassay responses in a wastewater effluent-dominated river. Chemosphere 212: 182–92.
- De Baat ML, Van der Oost R, Van der Lee GH, et al. 2020. Advancements in effect-based surface water quality assessment. Water Res 183: 116017.

- Dellal H, Boudahtouf A, Alaterre E, et al. 2020. High Content Screening Using New U2OS Reporter Cell Models Identifies Harmol Hydrochloride as a Selective and Competitive Antagonist of the Androgen Receptor. *Cells* 9: 1469.
- Escher BI, Neale PA and Leusch F. 2021. Bioanalytical tools in water quality assessment. IWA Publishing. doi.org/10.2166/9781789061987
- Finckh S, Buchinger S, Escher BI, et al. 2022. Endocrine disrupting chemicals entering European rivers: Occurrence and adverse mixture effects in treated wastewater. *Environ Int* 170: 107608.
- Gadipelly C, Pérez-González A, Yadav GD, et al. 2014. Pharmaceutical Industry Wastewater: Review of the Technologies for Water Treatment and Reuse. *Ind Eng Chem Res* 53: 11571–92.
- Gardia-Parège C. 2015. Développement et applications de l'analyse dirigée par l'effet pour la recherche et l'identification de contaminants à risque pour les écosystèmes aquatiques (PhD Thesis).
- Garoche C, Grimaldi M, Michelin E, et al. 2023. Interlaboratory prevalidation of a new in vitro transcriptional activation assay for the screening of (anti-)androgenic activity of chemicals using the UALH-hAR cell line. *Toxicol In Vitro* 88: 105554.
- Grimaldi M, Boudahtouf A, Toporova L, and Balaguer P. 2019. Functional profiling of bisphenols for nuclear receptors. *Toxicology* 420: 39–45.
- Houtman CJ, Broek R ten, and Brouwer A. 2018. Steroid hormonal bioactivities, culprit natural and synthetic hormones and other emerging contaminants in waste water measured using bioassays and UPLC-tQ-MS. *Sci Total Environ* 630: 1492–501.
- Kase R, Javurkova B, Simon E, et al. 2018. Screening and risk management solutions for steroid estrogens in surface and wastewater. *TrAC Trends Anal Chem* 102: 343–58.
- Laville, N., S. Aït-Aïssa, E. Gomez, et al. 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196(1-2): 41-55.
- Lemaire G, Mnif W, Pascussi J-M, et al. 2006. Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system. *Toxicol Sci* 91: 501–9.
- Linden SC van der, Heringa MB, Man H-Y, et al. 2008. Detection of Multiple Hormonal Activities in Wastewater Effluents and Surface Water, Using a Panel of Steroid Receptor CALUX Bioassays. *Environ Sci Technol* 42: 5814–20.
- Macikova P, Groh KJ, Ammann AA, et al. 2014. Endocrine Disrupting Compounds Affecting Corticosteroid Signaling Pathways in Czech and Swiss Waters: Potential Impact on Fish. *Environ Sci Technol* 48: 12902–11.
- Molina-Molina J-M, Hillenweck A, Jouanin I, et al. 2006. Steroid receptor profiling of vinclozolin and its primary metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 216: 44–54.
- Muschket M, Di Paolo C, Tindall AJ, et al. 2018. Identification of Unknown Antiandrogenic Compounds in Surface Waters by Effect-Directed Analysis (EDA) Using a Parallel Fractionation Approach. *Environ Sci Technol* 52: 288–97.
- OECD. 2023. Endocrine Disrupting Chemicals in Freshwater: Monitoring and Regulating Water Quality. OECD Studies on Water. OECD publishing, Paris.
- Penru Y, Guillon A, Aït-Aïssa S, and Couteau J. 2017. Caractérisation de la toxicité des eaux usées à Sophia Antipolis. Projet MICROPOLIS Indicateurs. Livrable 1.
- Phillips PJ, Smith SG, Kolpin DW, et al. 2010. Pharmaceutical Formulation Facilities as Sources of Opioids and Other Pharmaceuticals to Wastewater Treatment Plant Effluents. *Environ Sci Technol* 44: 4910–6.
- Rao K, Li N, Ma M, and Wang Z. 2014. In vitro agonistic and antagonistic endocrine disrupting effects of organic extracts from waste water of different treatment processes. *Front Environ Sci Eng* 8: 69–78.
- Sanchez W, Sremski W, Piccini B, et al. 2011. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environ Int* 37: 1342–8.
- Šauer P, Bořík A, Golovko O, et al. 2018. Do progestins contribute to (anti-)androgenic activities in aquatic environments? *Environ Pollut* 242: 417–25.
- Schriks M, Leerdam JA van, Linden SC van der, et al. 2010. High-Resolution Mass Spectrometric Identification and Quantification of Glucocorticoid Compounds in Various Wastewaters in The Netherlands. *Environ Sci Technol* 44: 4766–74.
- Seimandi M, Lemaire G, Pillon A, et al. 2005. Differential responses of PPARalpha, PPARdelta, and PPARgamma reporter cell lines to selective PPAR synthetic ligands. *Anal Biochem* 344.

- Shi W, Wang X, Hu W, et al. 2009. Endocrine-disrupting equivalents in industrial effluents discharged into Yangtze River. *Ecotoxicology* 18: 685–92.
- Staub P-F, Dulio V, Gras O, et al. 2019. A Prospective Surveillance Network for improved identification of contaminants of emerging concern (CECs) and testing of innovative monitoring tools in France. *Norman Bull* 21–4.
- Suzuki G, Sato K, Isobe T, et al. 2015. Detection of glucocorticoid receptor agonists in effluents from sewage treatment plants in Japan. *Sci Total Environ* 527–528: 328–34.
- Toso A, Boulahtouf A, Escande A, et al. 2023. A comparative study of human and zebrafish glucocorticoid receptor activities of natural and pharmaceutical steroids. *Front Endocrinol* 14: 1235501.
- Vindimian E. 2020. REGTOX : macro Excel™ pour dose-réponse. https://normalesup.org/~vindimian/fr_index.html

Annexe 1. Fiche de prélèvement terrain



minimiser le risque
pour un développement durable

DGPR INERIS Industries Pharmaceutiques : Identification de l'échantillonnage

Code Site:		
S'agit-il d'un blanc terrain?	oui	non
Nature du système de traitement des effluents (si présent) :		
Débit journalier (m ³ /jr) :		
DCO mg/L (données de l'industriel) :		
MES mg/L (données de l'industriel) :		
pH:		
conductivité ($\mu\text{S}/\text{cm}$) :		
Identité du préleveur (SGS) :		
Accréditation prélèvement :	oui	non
Identité du commandeur (DREAL) :		
Date de prélèvement :		
Moment du prélèvement :	matin	après-midi
Durée prélèvement :		
Date et heure (approx.) d'envoi à l'Ineris:		
Commentaires et/ou difficultés rencontrées :		
Échantillonnage composite automatique EAU		
Type d'échantilleur :		
Référence :	Monoflacon	Multiflacon
Type de pompage :	Péristaltique	A Vide
Nettoyage du matériel avant utilisation:	Oui	Non
Purge des tuyaux avant utilisation:	Oui	Non
Positionnement prise d'eau :	Profondeur prise d'eau :	
Flacon collecteur :	bouteille Nalgene 8 x 1 L en polyéthylène haute densité	
Nettoyage des tubes collecteur (rinçage) :	oui	non
Vitesse d'aspiration (m/s) :		
Type de programmation :		
Type et référence du débitmètre :	Date du dernier contrôle :	
Fonctionnement (date et heure) :	Début :	Fin :
Tuyau d'aspiration :	Diamètre mm :	Longueur m :
Volume unitaire prélevé en ml :	Volume échantillon composite total :	
Fidélité du volume à 5% :	oui	non
Justesse du volume à 5% :	oui	non
Utilisation d'une crêpine :	oui	non
Échantilleur réfrigéré :	oui	non
Température de l'échantilleur :	Début :	Fin :
Commentaires :		

Annexe 2. Lignées cellulaires et conditions de culture

Descriptions des lignées cellulaires

Tableau 5. Description des lignées cellulaires : cellules d'origine et constructions génétiques ayant servi à établir les lignées avec rapporteur

Récepteur ciblé	Bioessai	Lignée cellulaire d'origine	Construction portant le gène du récepteur	Construction portant le gène rapporteur	Référence
Récepteur des œstrogènes (ER)	MELN	MCF-7	ER α endogène	ERE- β Globine-Luciférase-SV40-Néomycine	Balaguer et al. 2001
Récepteur des androgènes (AR)	UALH-hAR	U2OS	pSG5-hAR-Puromycine	ARE(RAD9)6-Collagénase-Luciférase-Hygomycine	Dellal et al. 2020; Grimaldi et al. 2019
Récepteur des glucocorticoïdes (GR)	HMLN-hGR	HeLa	pSG5-hGR-Puromycine	MMTV-Luciférase-Néomycine	Molina-Molina et al. 2006; Grimaldi et al. 2019
Récepteur des progestagènes (PR)	HELN-hPR	HeLa	pSG5-hPR (hER α DBD)-Puromycine	ERE- β Globine-Luciférase-Néomycine	Molina-Molina et al. 2006; Grimaldi et al. 2019
Récepteur des minéralocorticoïdes (MR)	HG5LN-hMR	U2OS	pSG5-GAL4(DBD)-hMR (LBD)-Puromycine	GAL4RE5- β Globine-Luciférase-Néomycine	Toso et al. 2023
Récepteur des rétinoïdes (RAR α /RXR)	HELN-RAR α	HeLa	pSG5-hRAR α (ER α DBD)-Puromycine	ERE- β Globine-Luciférase-SV40-Néomycine	Balaguer et al. 2001
Récepteur des pregnanes (PXR)	HG5LN-hPXR	HeLa	pSG5-GAL4(DBD)-hPXR (LBD)-Puromycine	GAL4RE5- β Globine-Luciférase-Néomycine	Seimandi et al. 2005
Récepteur des proliférateurs du péroxyxsomes γ (PPAR γ)	HG5LN-hPPAR γ	HeLa	pSG5-GAL4(DBD)-hPPAR γ (LBD)-Puromycine	GAL4RE5- β Globine-Luciférase-Néomycine	Lemaire et al. 2006
Sans récepteur (bioessai contrôle)	HG5LN	HeLa	-	GAL4RE5- β Globine-Luciférase-SV40-Néomycine	Seimandi et al. 2005

Conditions de culture et d'exposition aux échantillons

Toutes les lignées sont maintenues en incubateurs à 37°C sous atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Les conditions de culture pour les cultures d'entretiens et les tests sont décrites dans le tableau suivant. Le matériel de culture cellulaire provient de Life Technologies (Cergy Pontoise, France).

Lignées cellulaires	Milieu de culture (entretien)	Antibiotiques de sélection	Milieu d'exposition (tests)	Nombre de cellules par puits
HG5LN	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant 1 g/l glucose, rouge de phénol, 5 % de sérum de veau foetal (SVF), 1 % d'antibiotiques (pénicilline / streptomycine)	G418, 1 mg/mL	DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant 1 g/l glucose, sans rouge de phénol, 5 % de SVF déstéroidé (SVF-DCC), 1 % d'antibiotiques (pénicilline / streptomycine)	20 000
HELN-hPR		G418, 1 mg/mL Puromycine, 0,5 µg/mL		
HMLN-hGR				
G5LN-Gal4-hMR				50 000
HG5LN-hPPARg		G418, 1 mg/mL Puromycine, 0,5 µg/mL		
HELN-RAR α		Hygromycine 0,25 mg/mL		
UALH-hAR		G418, 1 mg/mL Puromycine, 0,5 µg/mL		
HG5LN-hPXR		G418, 1 mg/mL		
MELN				

Conditions de test :

Les cellules sont ensemencées un jour avant exposition dans des plaques de culture blanches 96-puits (Greiner CellStar) à raison de 20000 cellules/puits dans 200 µL de milieu test (INSERM) ou 50000 cellules/puits dans 100 µL de milieu test (Ineris). Le lendemain, les cellules seront traitées avec les échantillons à tester.

A l'Inserm, les cellules sont exposées par ajout de 50 µL de milieu test contenant l'extrait 4 fois concentré dans les puits de culture contenant 150 microlitres de milieu de culture. Le premier point de la gamme contient 0,3162 % vol/vol d'extrait dans le puits. Les points suivants sont des dilutions successives faites au 1/3,162^{ème}.

A l'Ineris, les cellules sont exposées par ajout de 50 µL de milieu test contenant l'extrait 3 fois concentré dans les puits de culture contenant 100 microlitres de milieu de culture. Le premier point de la gamme contient 0,5 % vol/vol d'extrait dans le puits. Les points suivants sont des dilutions successives faites au 1/3.

A la fin de l'incubation (24 h), le milieu test contenant les échantillons est remplacé par du milieu test contenant de la luciférine (0,3 mM). La luciférine diffuse dans les cellules et produit un signal stable 10 minutes plus tard. La plaque 96-puits est ensuite placée dans un luminomètre lecteur de plaque (Microbeta Wallac Luminometer ou BioTEK) et la luminescence mesurée au rythme de deux secondes par puits. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire de luminescence (RLU) et en pourcentage d'activité luciférase, la valeur 100 % étant donnée par l'activité induite par le ligand de référence. Les échantillons sont testés en quadruplets et les expériences sont réalisées au moins deux fois.

Chaque microplaquette d'exposition des cellules inclut :

- Témoin milieu : exposition au milieu de culture uniquement
- Témoin DMSO : exposition au solvant qui a servi à solubiliser l'extrait (concentration maximale de 0.5 % vol/vol dans nos tests)
- Témoin positif : exposition à la molécule de référence du bioessai considéré, administrée à la concentration induisant une réponse luciférase maximale
- Echantillon : gamme de 6 à 8 dilutions de chaque extrait. La concentration en solvant DMSO est constante.

Quatre répliques techniques sont testés par condition. Chaque test est réalisé dans au moins deux expériences indépendantes.

Une gamme concentration-réponse du contrôle positif est réalisée en parallèle afin de vérifier la réponse correcte des cellules au composé de référence (EC_{50}). Ce contrôle a été réalisé de manière systématique dans les essais réalisés à l'Ineris et au début et à la fin des expérimentations à l'INSERM.

Pour les essais en mode antagoniste, les cellules sont co-exposées aux extraits organiques et au composé de référence introduit à une concentration induisant 60-80 % de son effet agoniste maximal.

Annexe 3. Réponse des bioessais aux ligands de référence

Tableau 6. Valeurs d'EC₅₀ et EC₁₀ (en mol/L) des composés agonistes et antagonistes des composés de référence dans les différents bioessais

La valeur d'EC₁₀ (en g/L) permet de dériver une limite de détection (LD) de l'activité (exprimée en BEQ) dans l'échantillon initial en considérant un facteur d'enrichissement maximal testé (REFmax), soit 12,5 en l'absence d'interférences. En présence d'interférents dans l'extrait, le REFmax diminue et la LD augmente.

Bioessai	Substance de référence	Activité	Concentrations effectrices dans le milieu de culture				Limite de détection dans l'effluent = concentration en BEQ minimale détectée en absence d'interférence (REFmax = 12,5)
			EC ₁₀		EC ₅₀		LD = EC ₁₀ mol ref/12,5 REF
			mol/L	ng/L	mol/L	ng/L	
MELN	17b-estradiol (E2)	Agoniste	2,0E-12	0,6	1,7E-11	4,6	0,04 ng/L E2-Eq
UALH-AR	Dihydrotestotérone	Agoniste	7,9E-11	23	2,5E-10	74	1,8 ng/L DHT-Eq
	Flutamide	Antagoniste	2,5E-07	68748	2,6E-06	717771	5500 ng/L Flu-Eq
HELN-PR	R5020	Agoniste	1,9E-10	63	5,9E-10	192	5 ng/L R5020-Eq
	RU486	Antagoniste	4,3E-10	184	1,3E-09	567	15 ng/L RU486-Eq
UG5LN-MR	Aldostérone	Agoniste	2,3E-10	82	6,9E-10	248	7 ng/L Aldo-Eq
	Spirolactone	Antagoniste	7,1E-10	296	4,5E-09	1891	24 ng/L Spiro-Eq
HMLN-GR	Dexamétasone	Agoniste	1,0E-09	396	4,1E-09	1609	32 ng/L DEX-Eq
	RU486	Antagoniste	1,5E-09	635	9,2E-09	3952	51 ng/L RU486-Eq
HELN-RAR α	TTNPB	Agoniste	3,2E-10	110	1,2E-09	404	9 ng/L TTNPB-Eq
HG5LN-PPAR γ	Rosiglitazone	Agoniste	1,6E-09	574	1,1E-08	3753	46 ng/L Rosi-Eq
HG5LN-PXR	SR12813	Agoniste	8,2E-09	4116	7,3E-08	36831	329 ng/L SR12813-Eq

Les valeurs d'EC₁₀ et EC₅₀ du tableau sont dérivées des courbes concentration-réponse présentées ci-après.

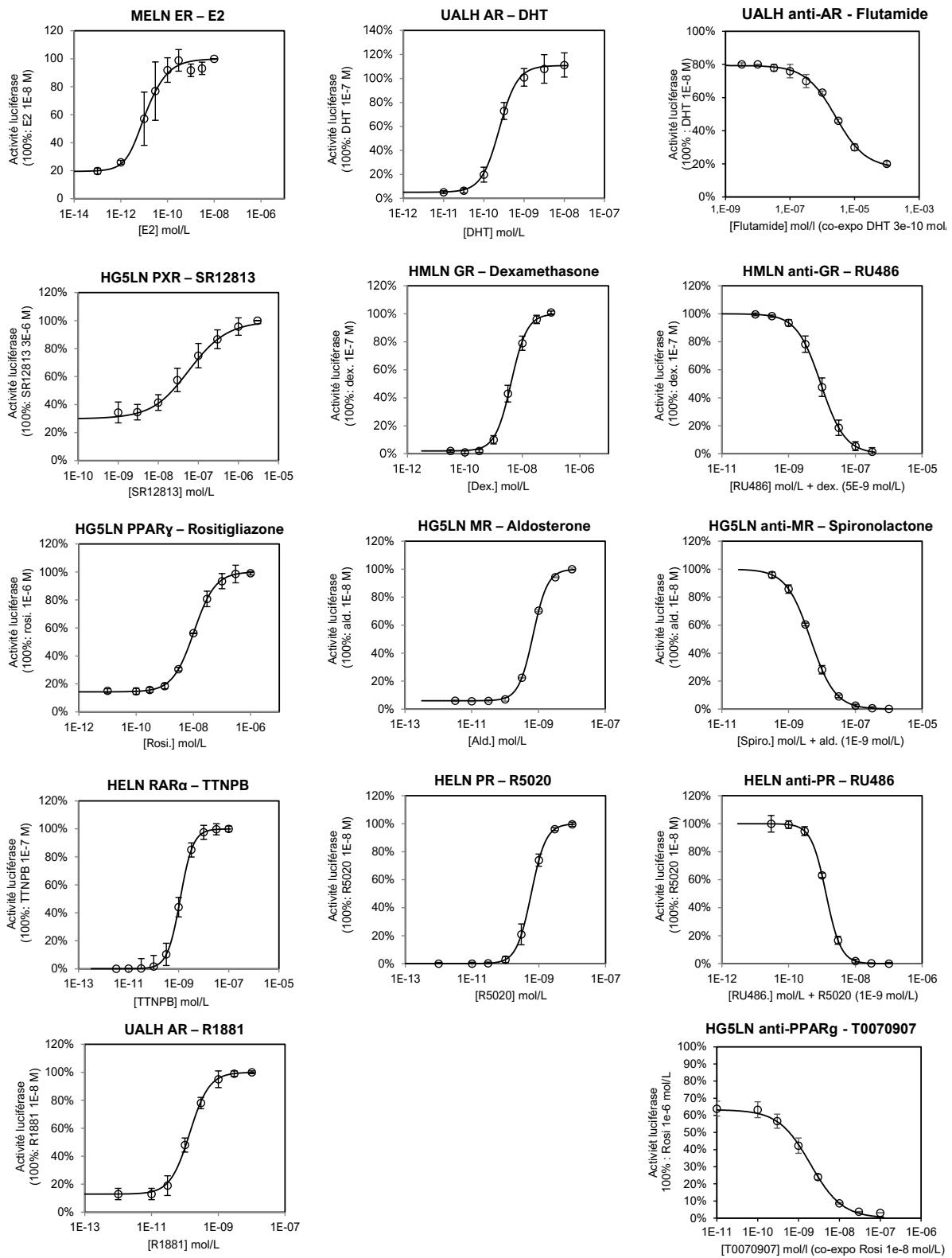


Figure 5. Réponse des différents bioessais aux substances de référence agonistes (induction de la luciférase dépendante de la concentration) et antagonistes (inhibition de la luciférase dépendante de la concentration)

Les valeurs sont des moyennes +/- écart-types de 5 (MELN, PXR) et 2 (autres bioessais) déterminations indépendantes, chacune incluant quatre répliques techniques.

Annexe 4. Absence d'effet des blancs terrain et laboratoire

Les Figure 6 et Figure 7 présentent la réponse des différents bioessais après exposition :

- aux blancs terrains : BLC-36, BLC-69, BLC-76, BLC-91 ;
- au blanc filtration : BLC-Filt ;
- aux blancs d'extraction : BLC-SPE1 à BLC-SPE8.

Chaque blanc correspond à un extrait organique préparé dans les mêmes conditions que les échantillons réels. Les résultats présentés correspondent aux deux plus fortes concentrations testées, soit 0,3 et 0,1 % v/v d'extrait dans le milieu de culture. Pour les blancs terrain, la transcription en REF et en BEQ est indiquée dans le Tableau 2 page 15.

Aucun effet n'est observé pour tous les blancs et pour tous les bioessais.

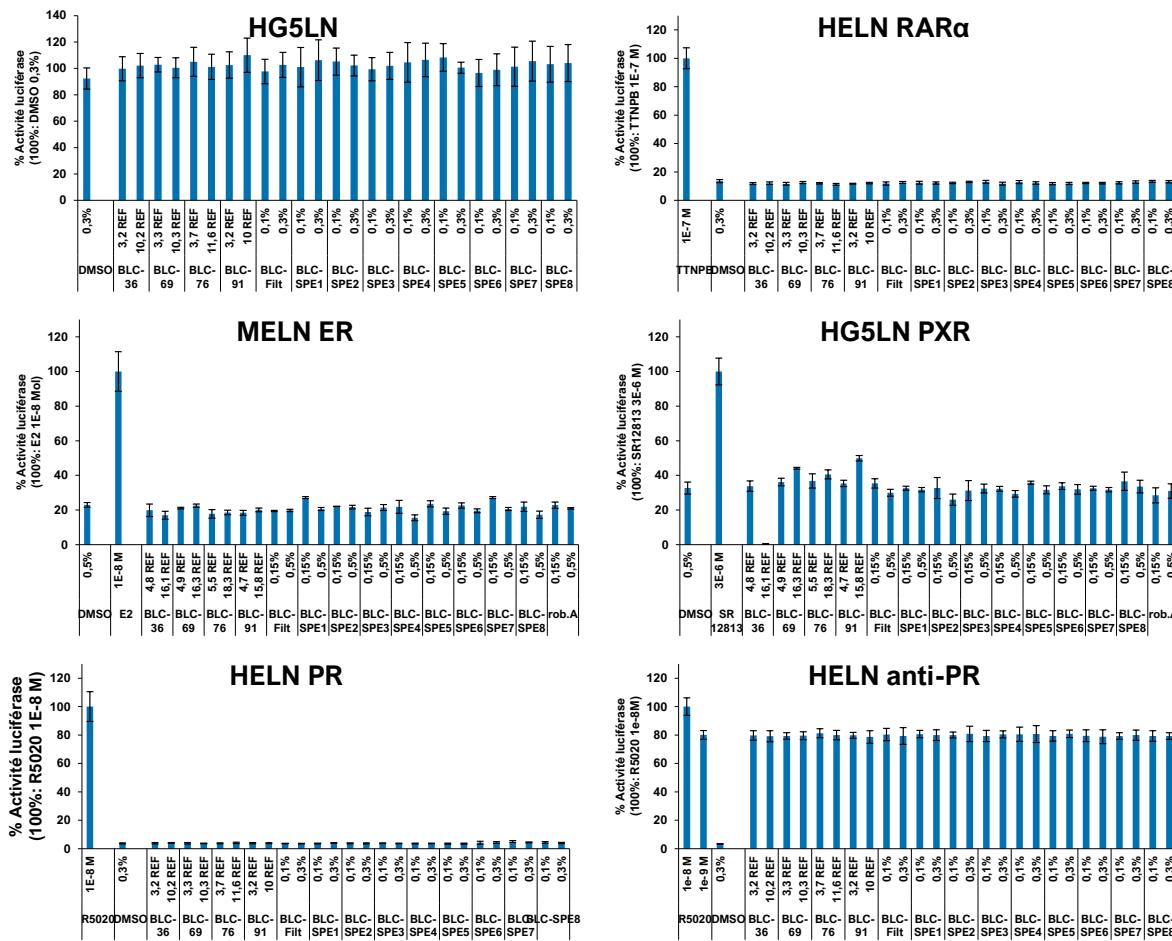


Figure 6. Activité luciférase dans les bioessais HG5LN (contrôle), HELN-RAR α , MELN, HG5LN-PXR et HELN-PR après exposition au témoin solvant (DMSO), à leur ligand de référence (respectivement TTNPB, E2, SR12813, R5020) et aux différents blancs terrain et laboratoires générés dans l'étude

Les données sont représentatives de deux essais indépendants (quatre répliques techniques par essai).

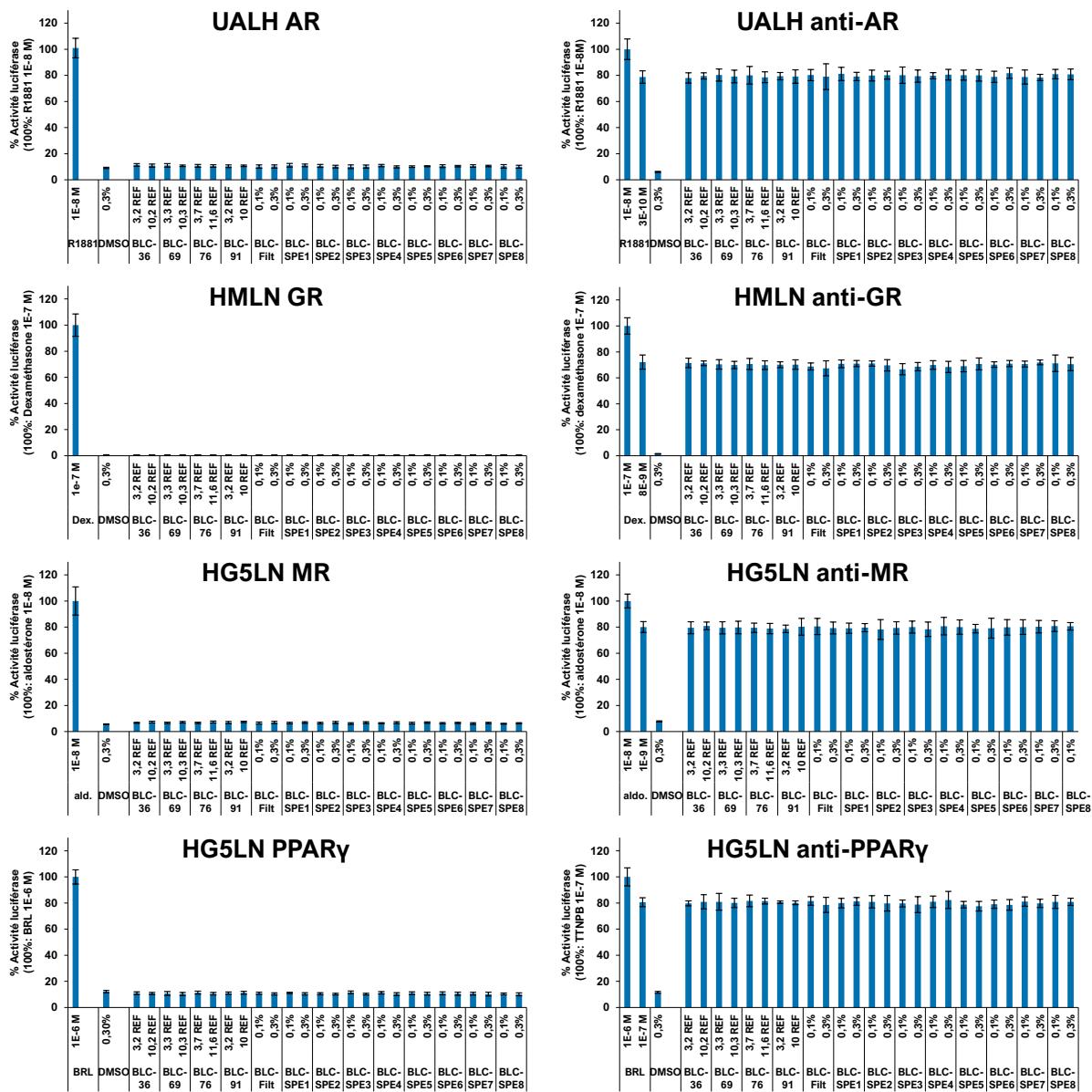


Figure 7. Activité luciférase dans les bioessais UALH-AR, HMLN-GR, HG5LN-MR et HG5LN-PPAR_y après exposition au témoin solvant (DMSO), à leur ligand de référence (respectivement R1881, dexamethasone, aldostérone, BRL) et aux différents blancs terrain et laboratoires générés dans l'étude

Les données sont représentatives de deux essais indépendants (quatre répliques techniques par essai).

Annexe 5. Courbes concentration-réponse dans les différents bioessais

Effet sur la viabilité cellulaire dans les cellules MELN et HG5LN-hPXR

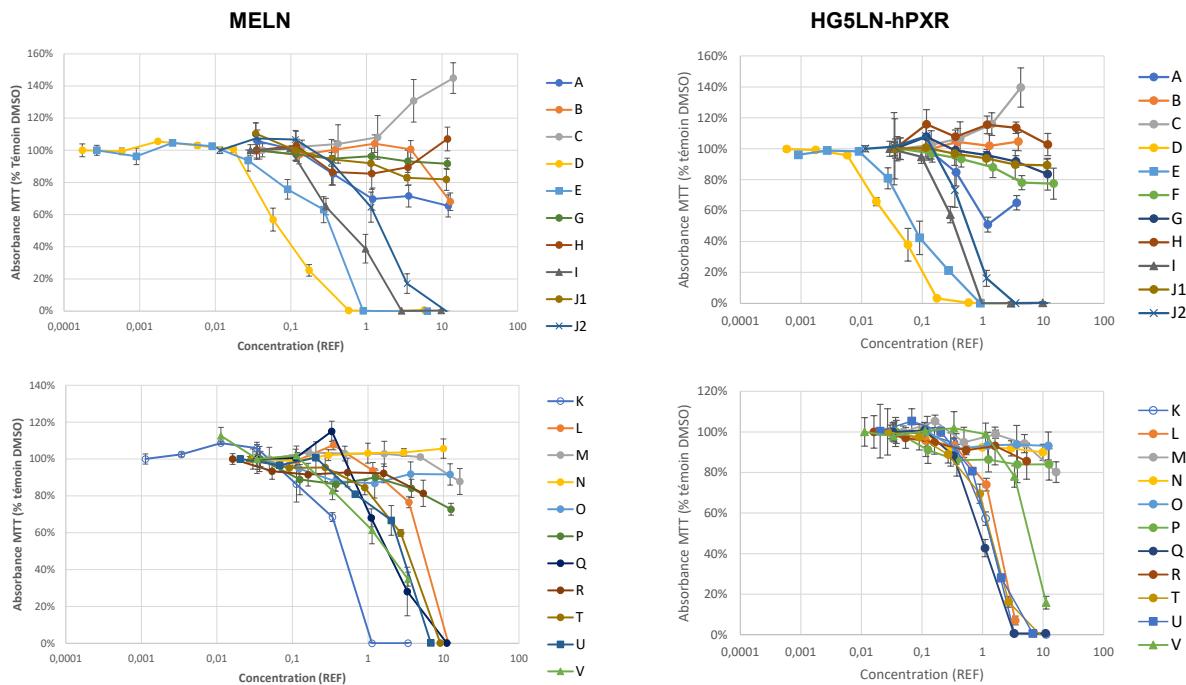


Figure 8. Effets des extraits organiques des effluents sur la viabilité cellulaire dans les bioessais MELN et HG5LN-hPXR (test au MTT)

Résultat représentatif de deux essais indépendants (valeurs = moyenne +/- écart-type, n=4 réplicas techniques).

Site A

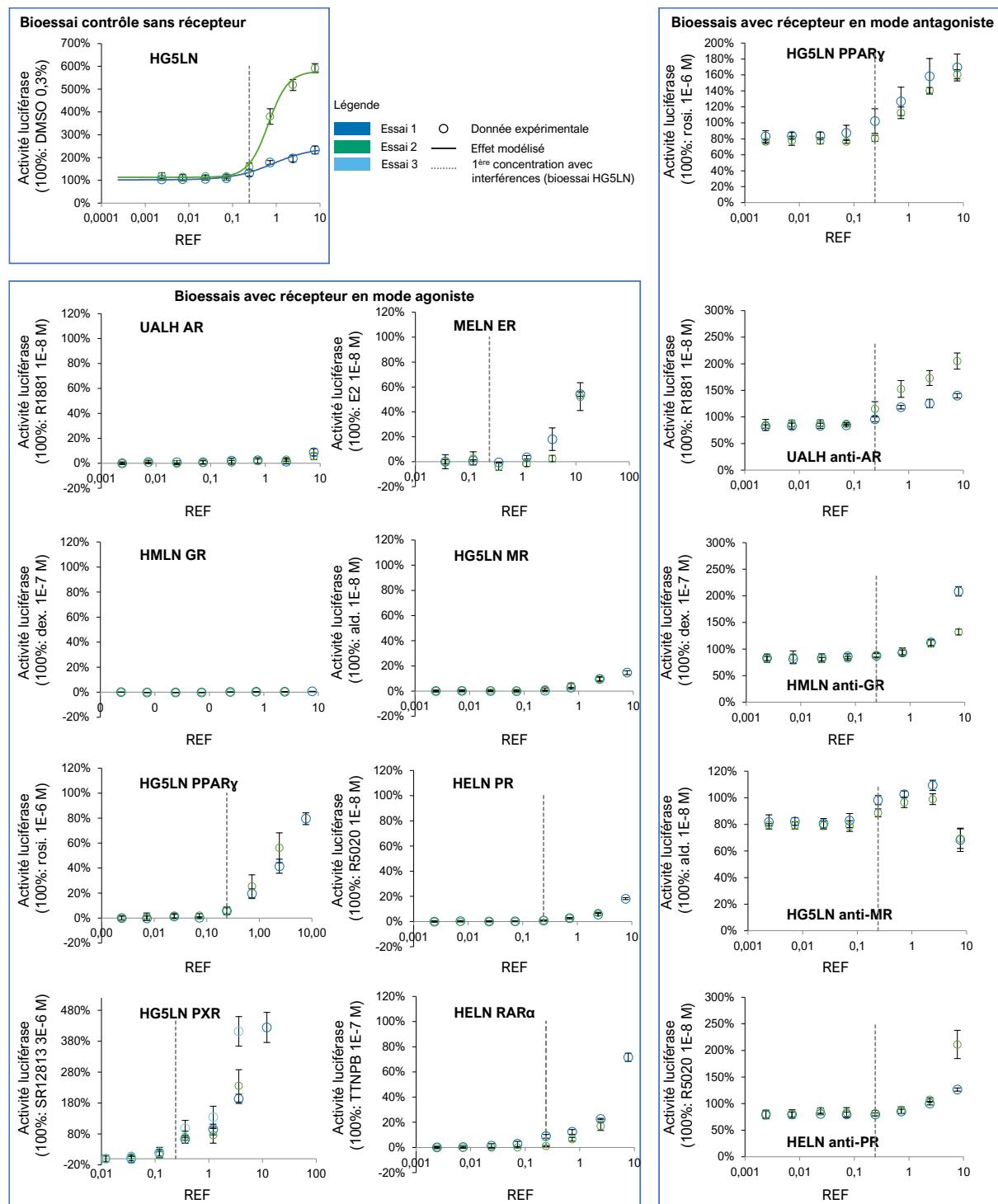


Figure 9. Effet de l'échantillon A dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 réplicas.

Site B

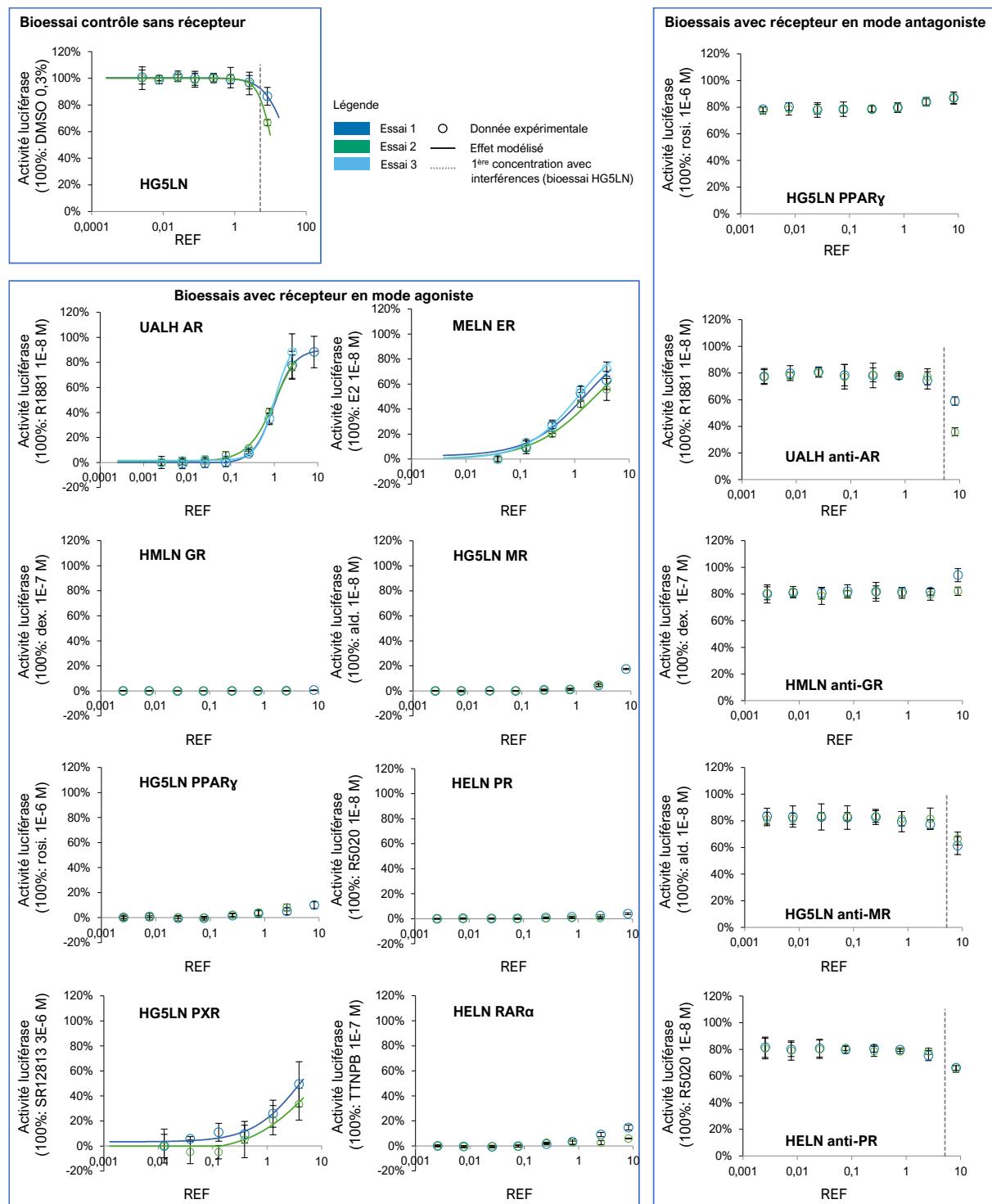


Figure 10. Effet de l'échantillon B dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. De faibles inductions, non quantifiées, sont observées sur les récepteurs MR, PPAR γ et RAR α aux plus fortes concentrations. La ligne en pointillés indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site C

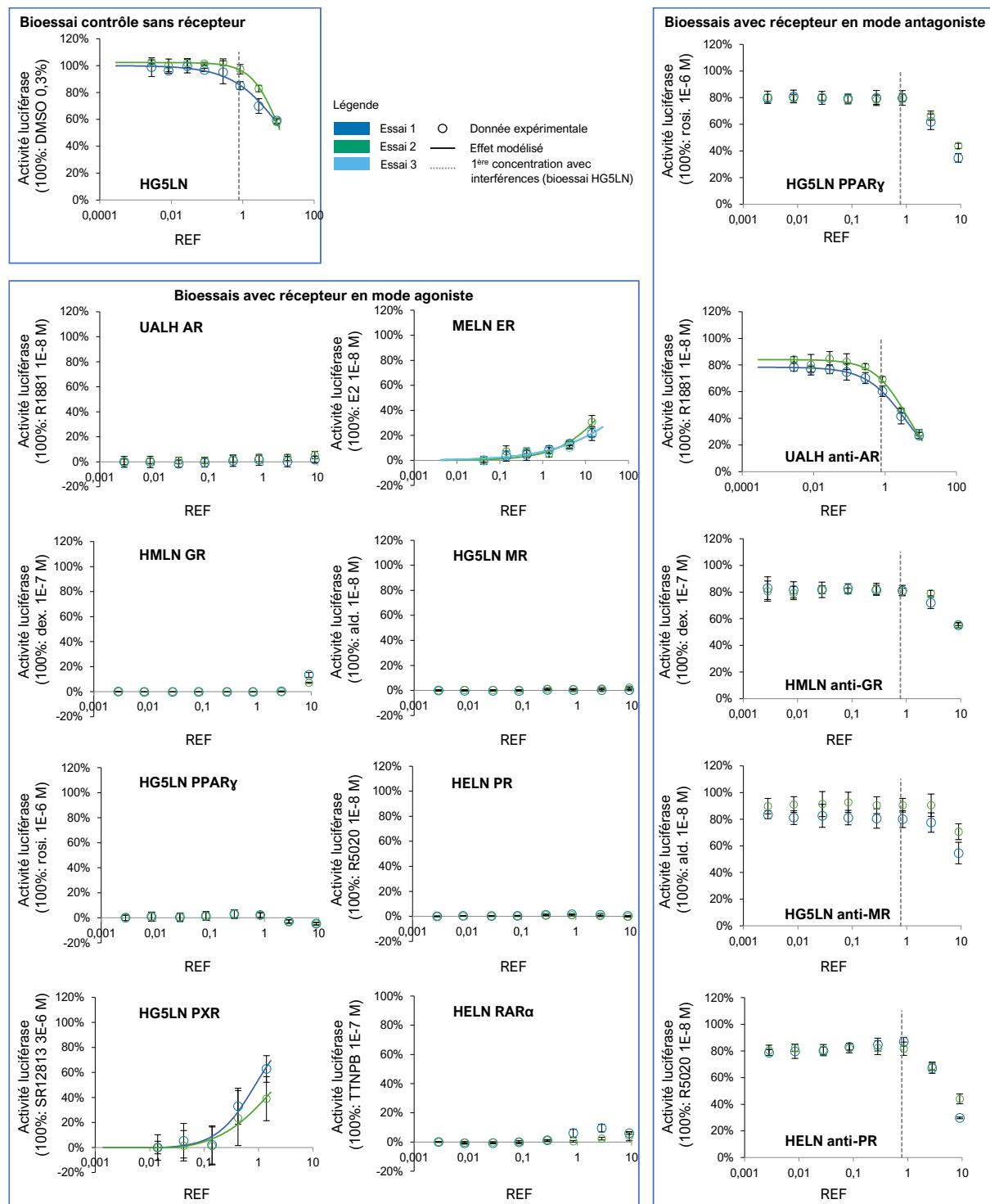


Figure 11. Effet de l'échantillon C dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques. Pour les bioessais GR et RAR, une très légère induction est notée aux fortes concentrations, certainement sous-estimée par l'interférence négative et empêchant leur quantification.

Site D

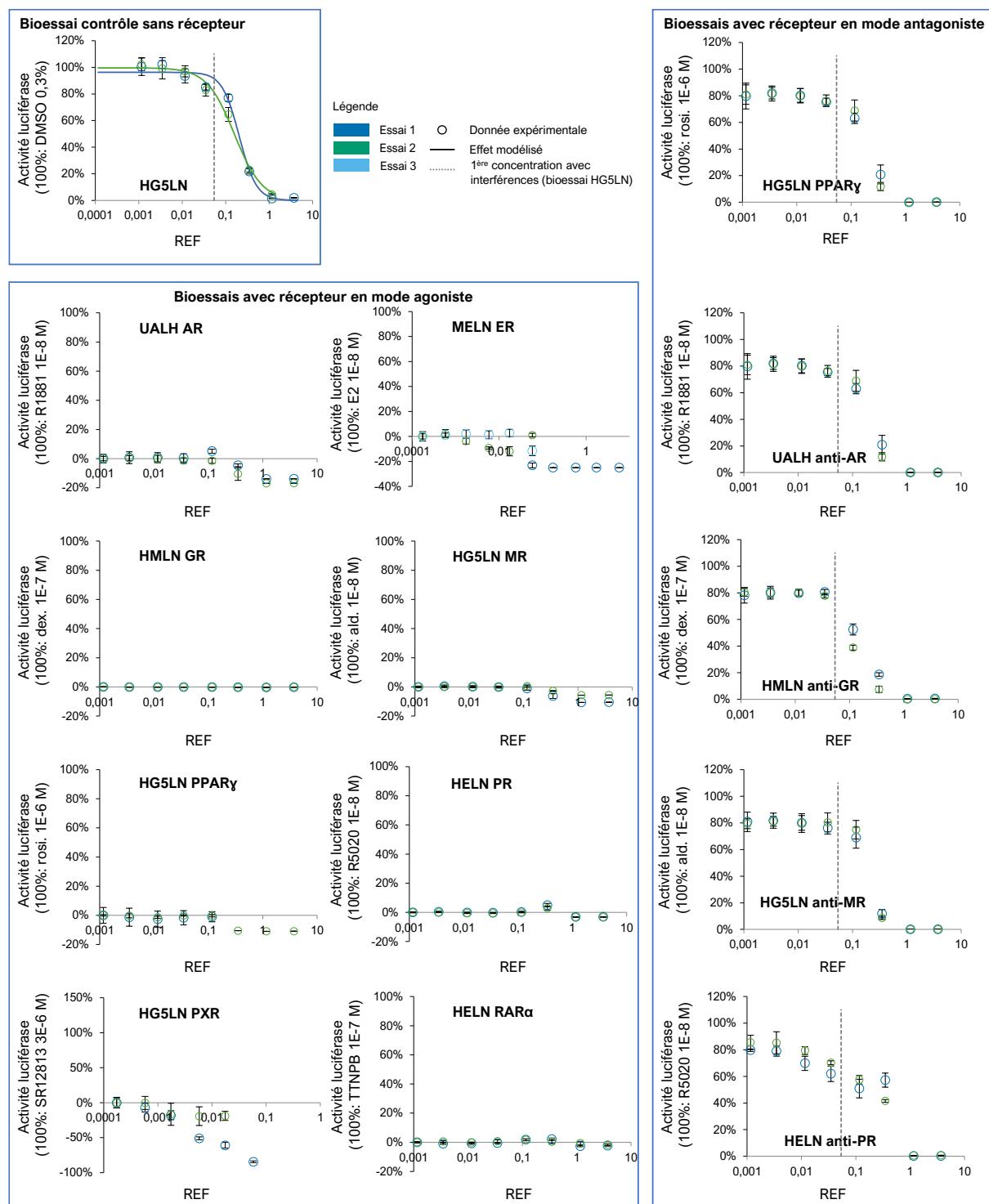


Figure 12. Effet de l'échantillon D dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site E

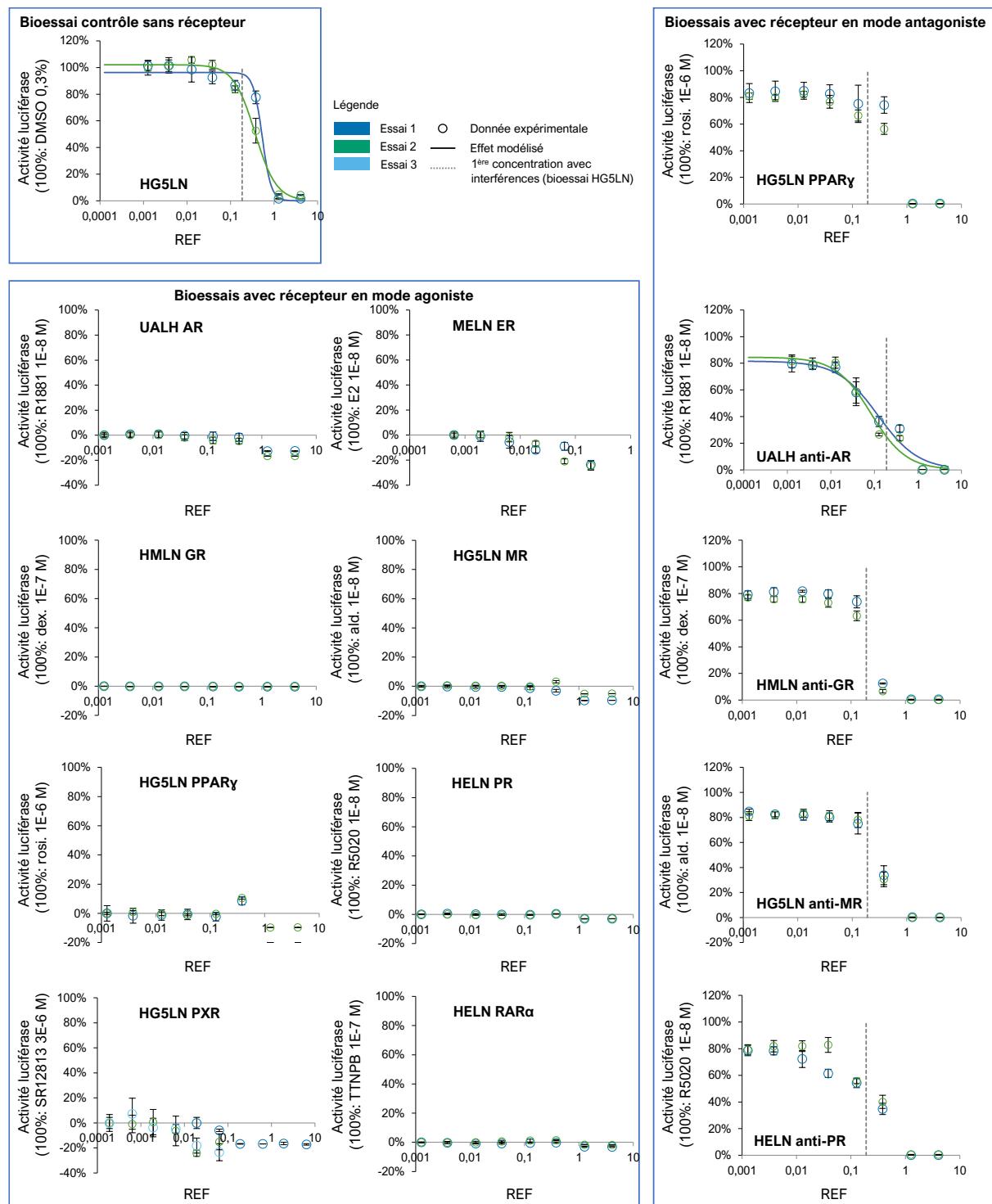


Figure 13. Effet de l'échantillon E dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site F

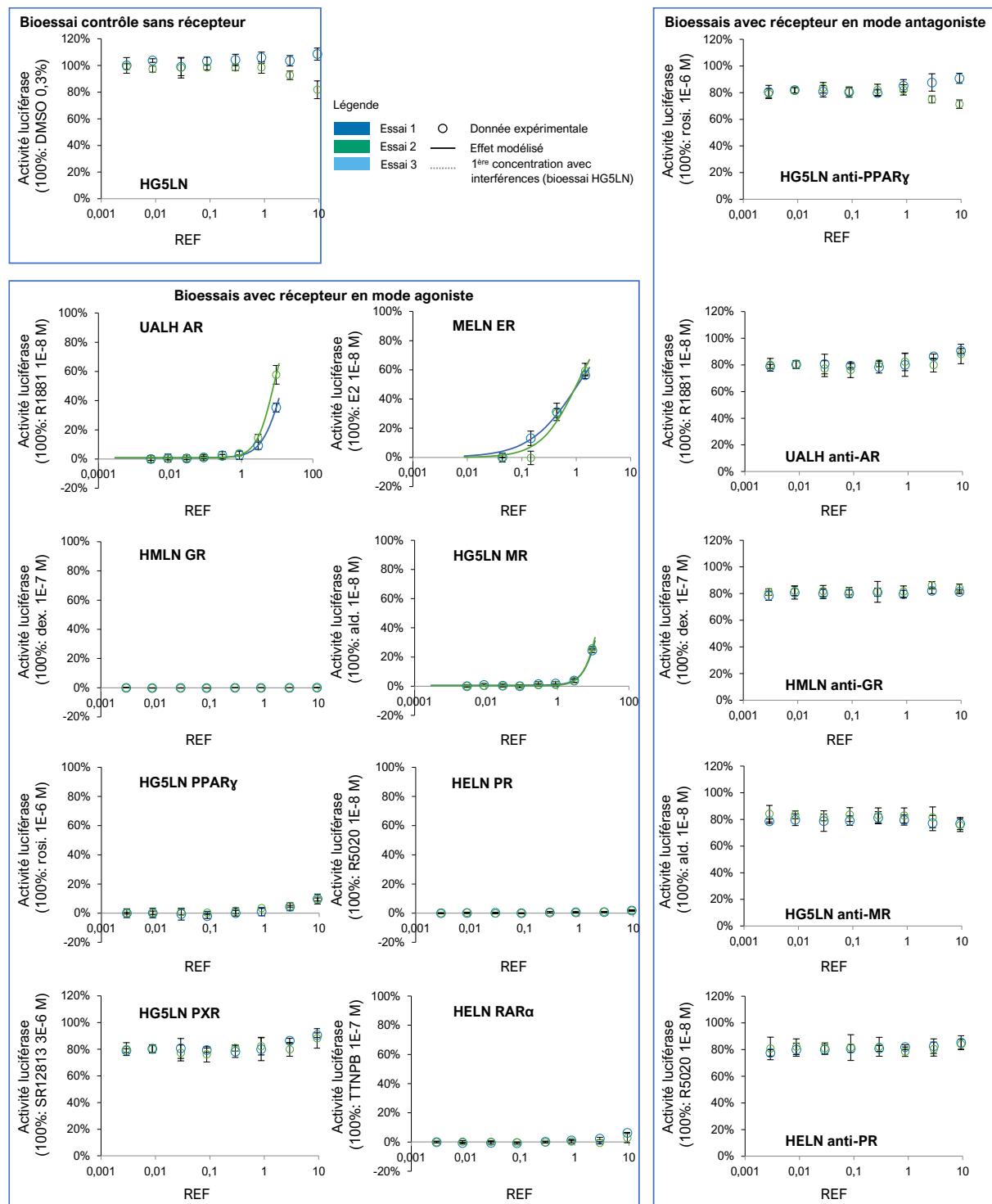


Figure 14. Effet de l'échantillon F dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site G

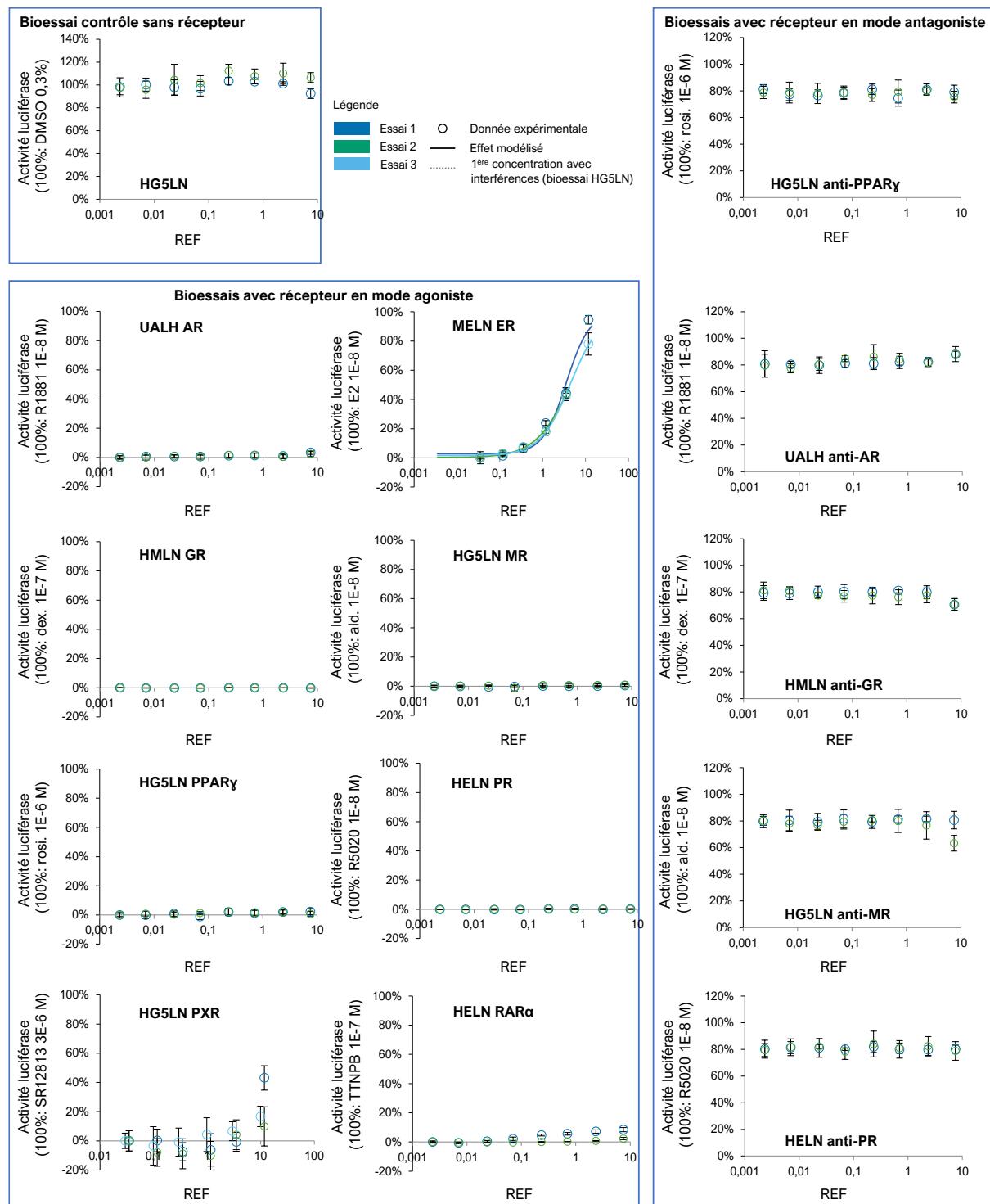


Figure 15. Effet de l'échantillon G dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site H

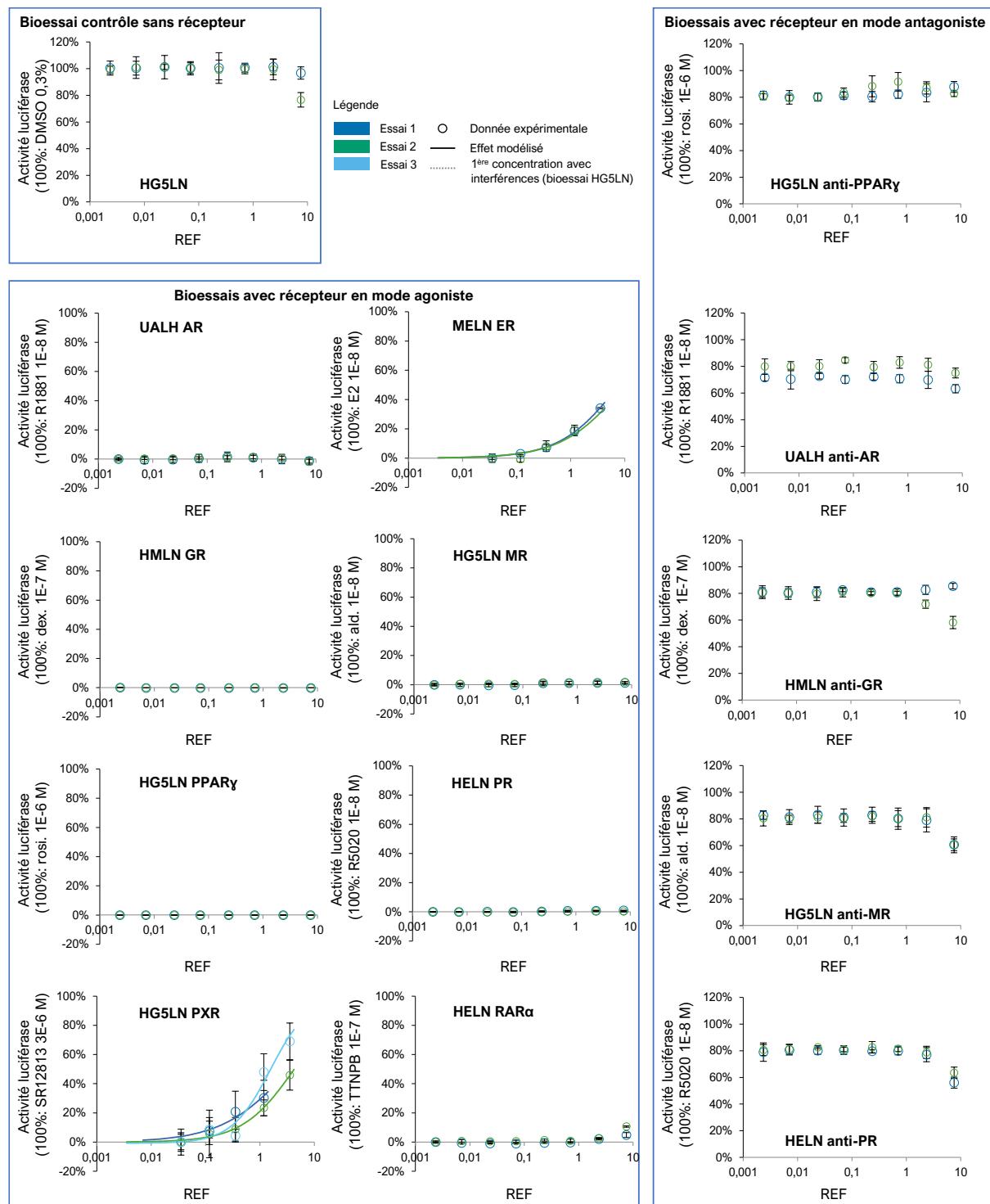


Figure 16. Effet de l'échantillon H dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site I

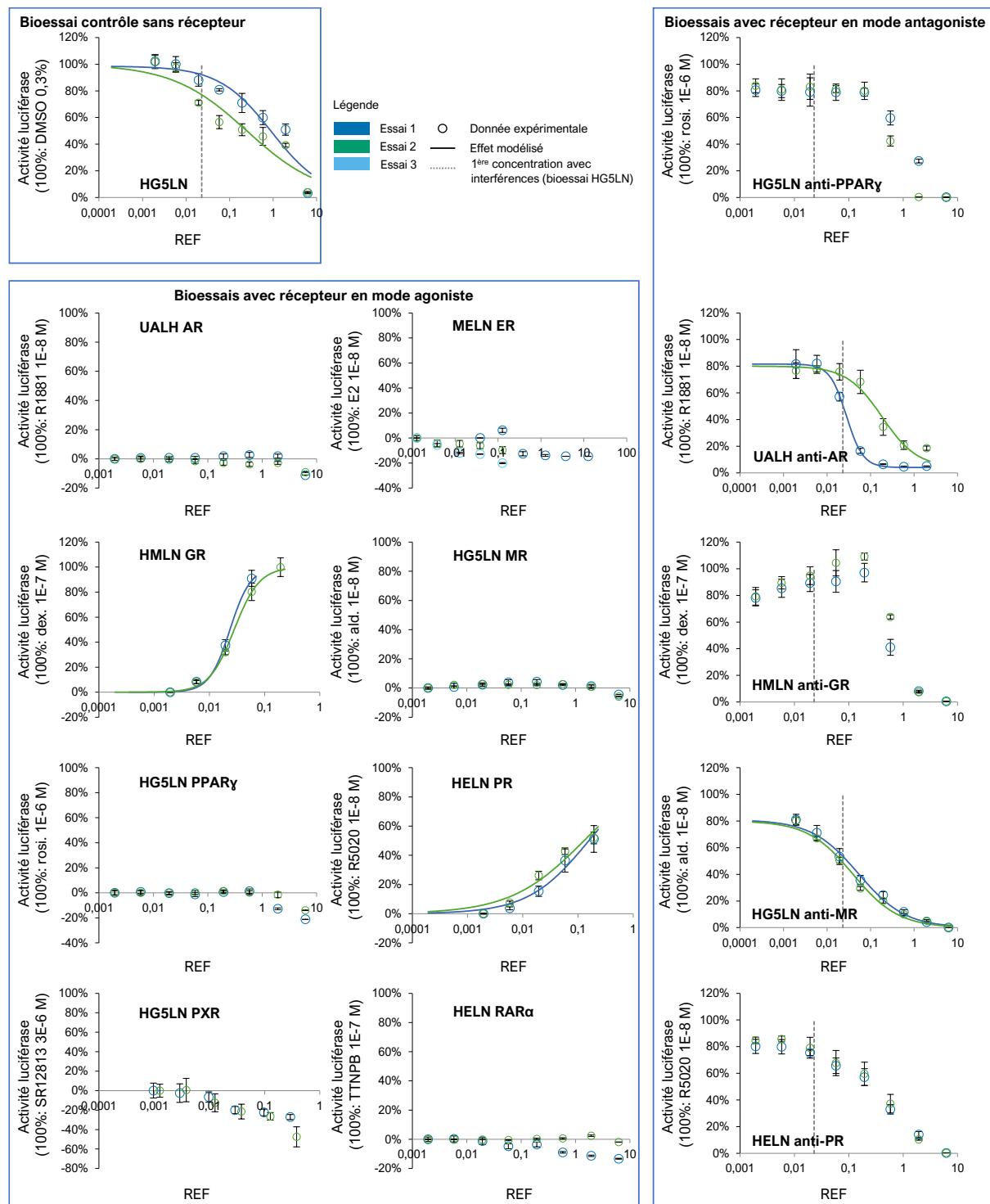


Figure 17. Effet de l'échantillon I dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site J1

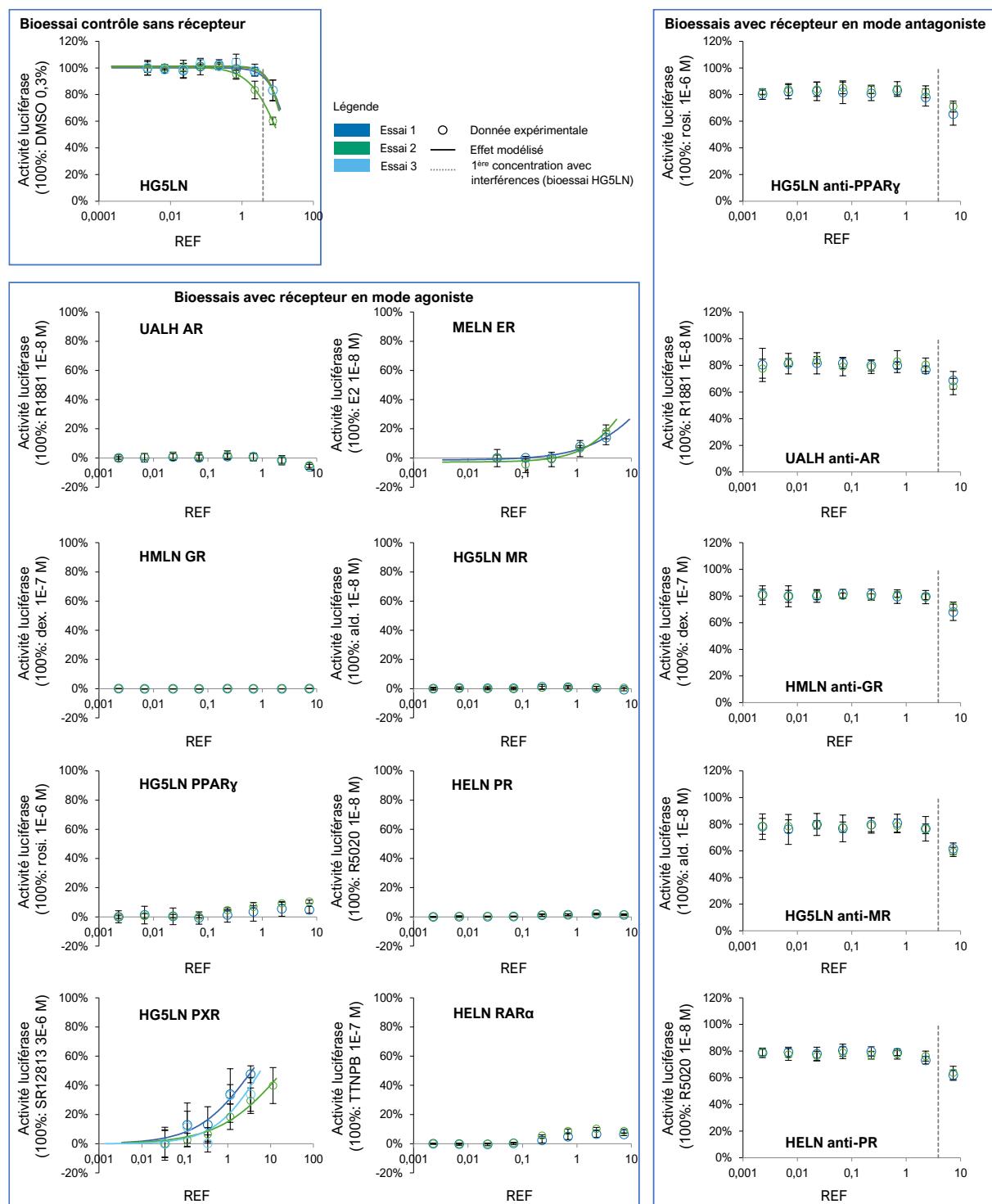


Figure 18. Effet de l'échantillon J1 dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site J2

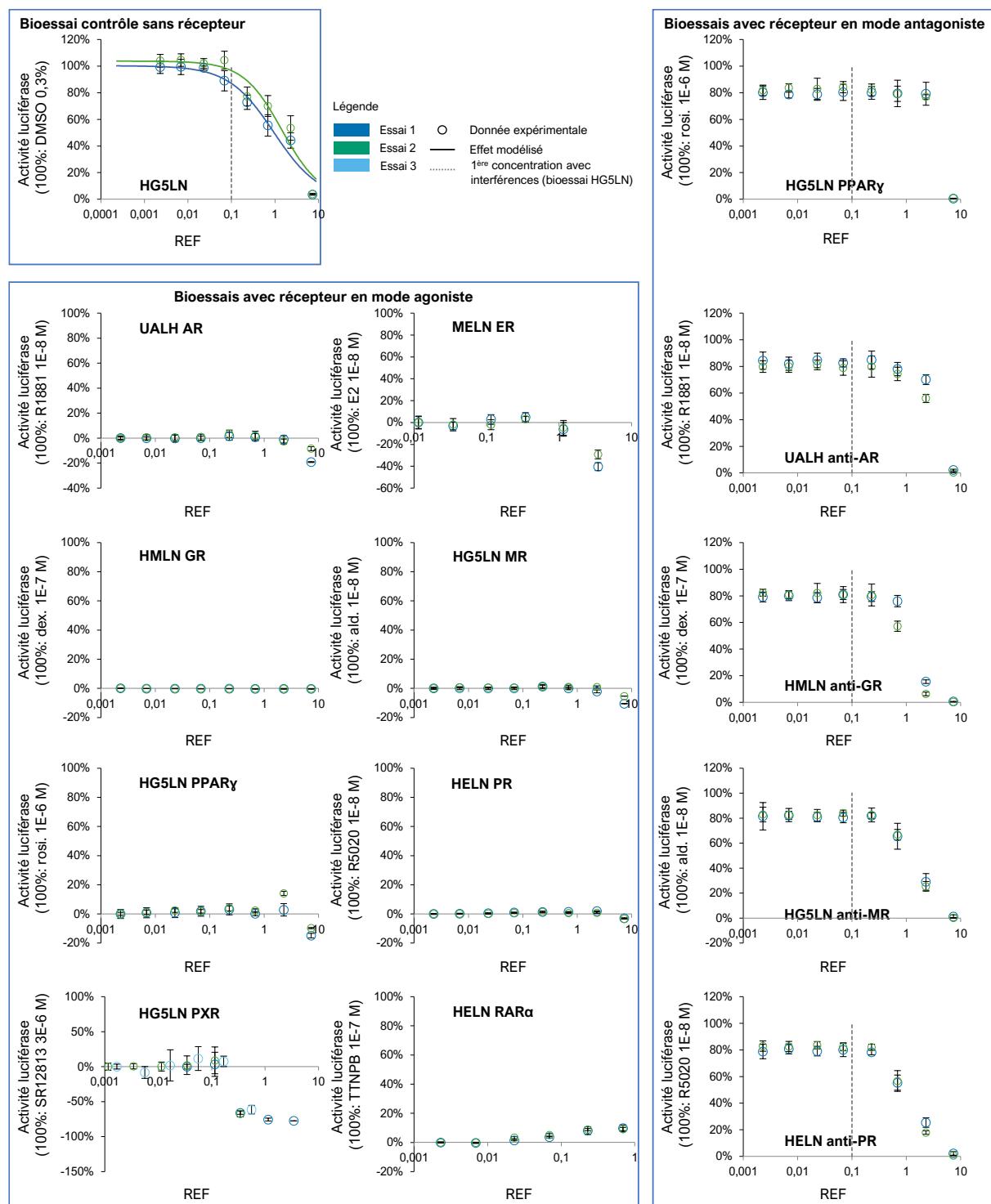


Figure 19. Effet de l'échantillon J2 dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site K

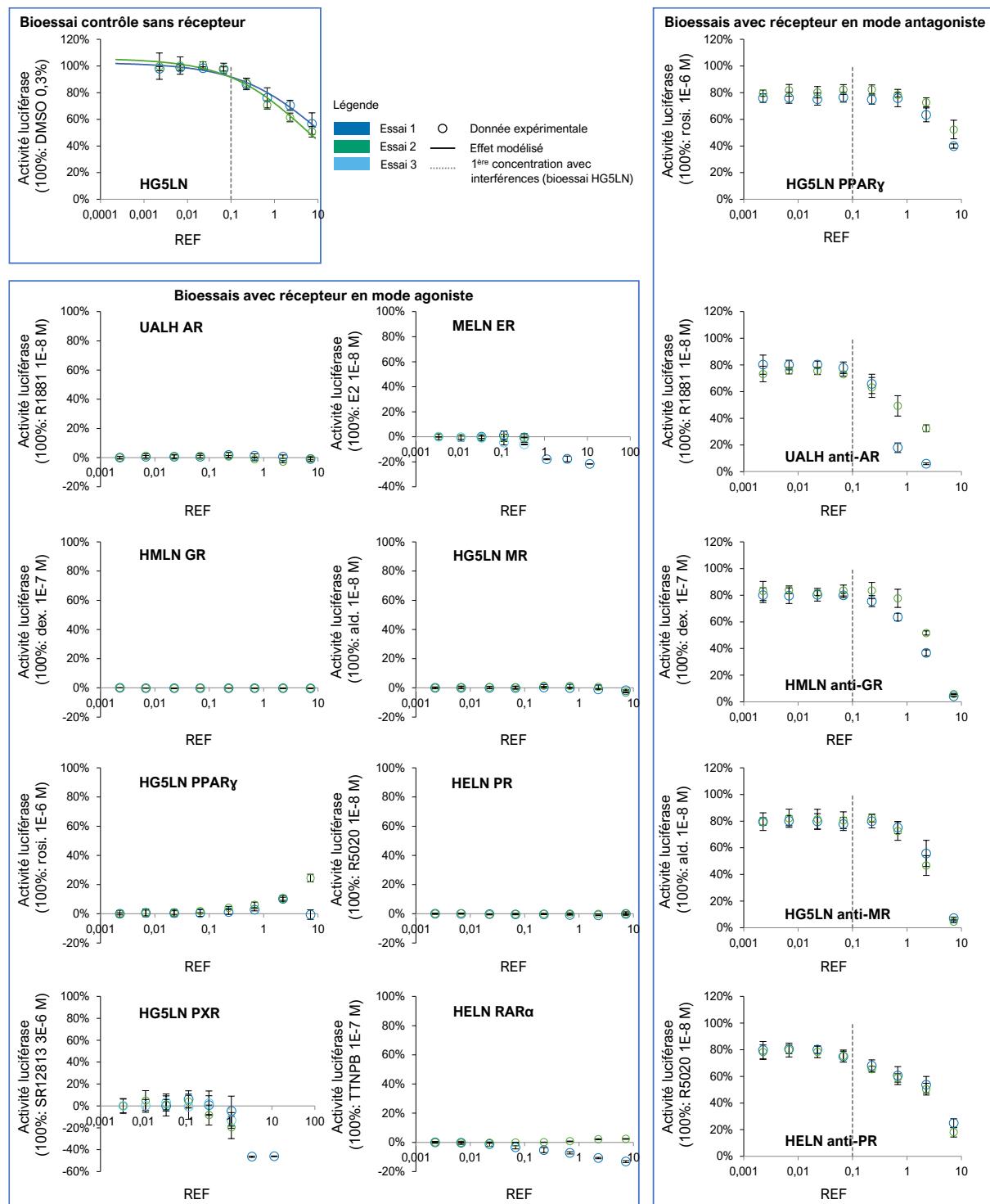


Figure 20. Effet de l'échantillon K dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site L

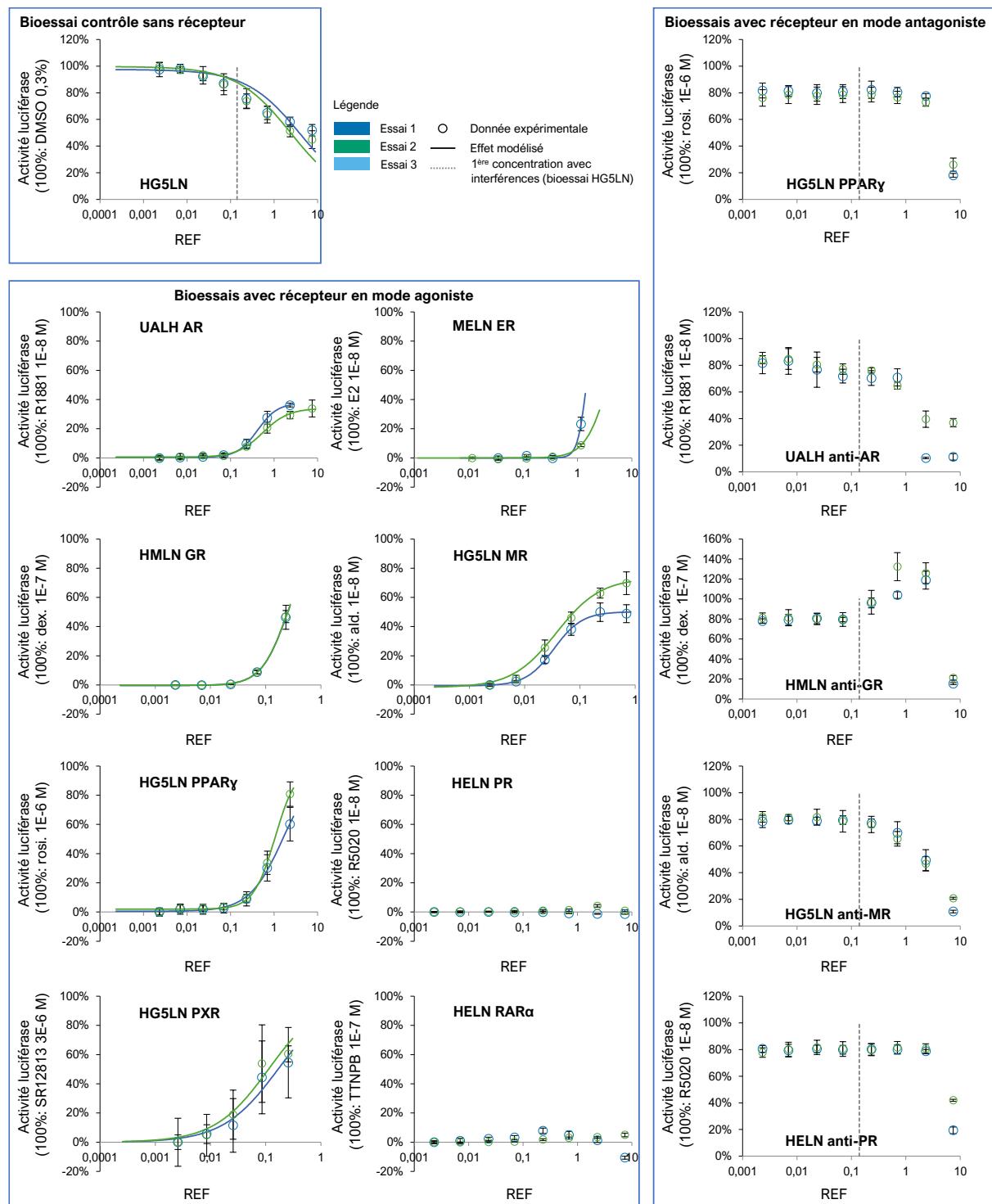


Figure 21. Effet de l'échantillon L dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site M

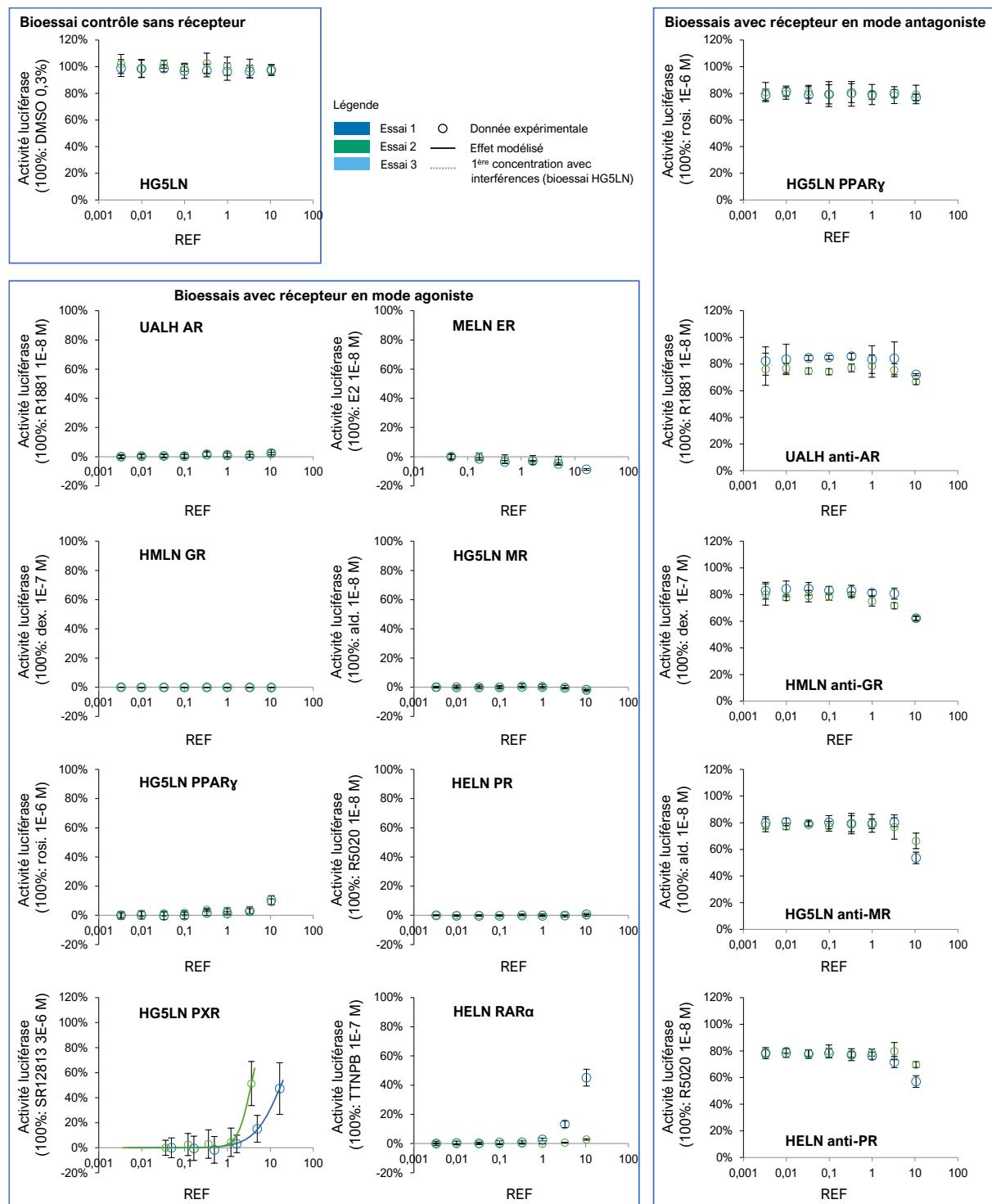


Figure 22. Effet de l'échantillon M dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques. Une activité RAR est détectée mais non quantifiée.

Site N

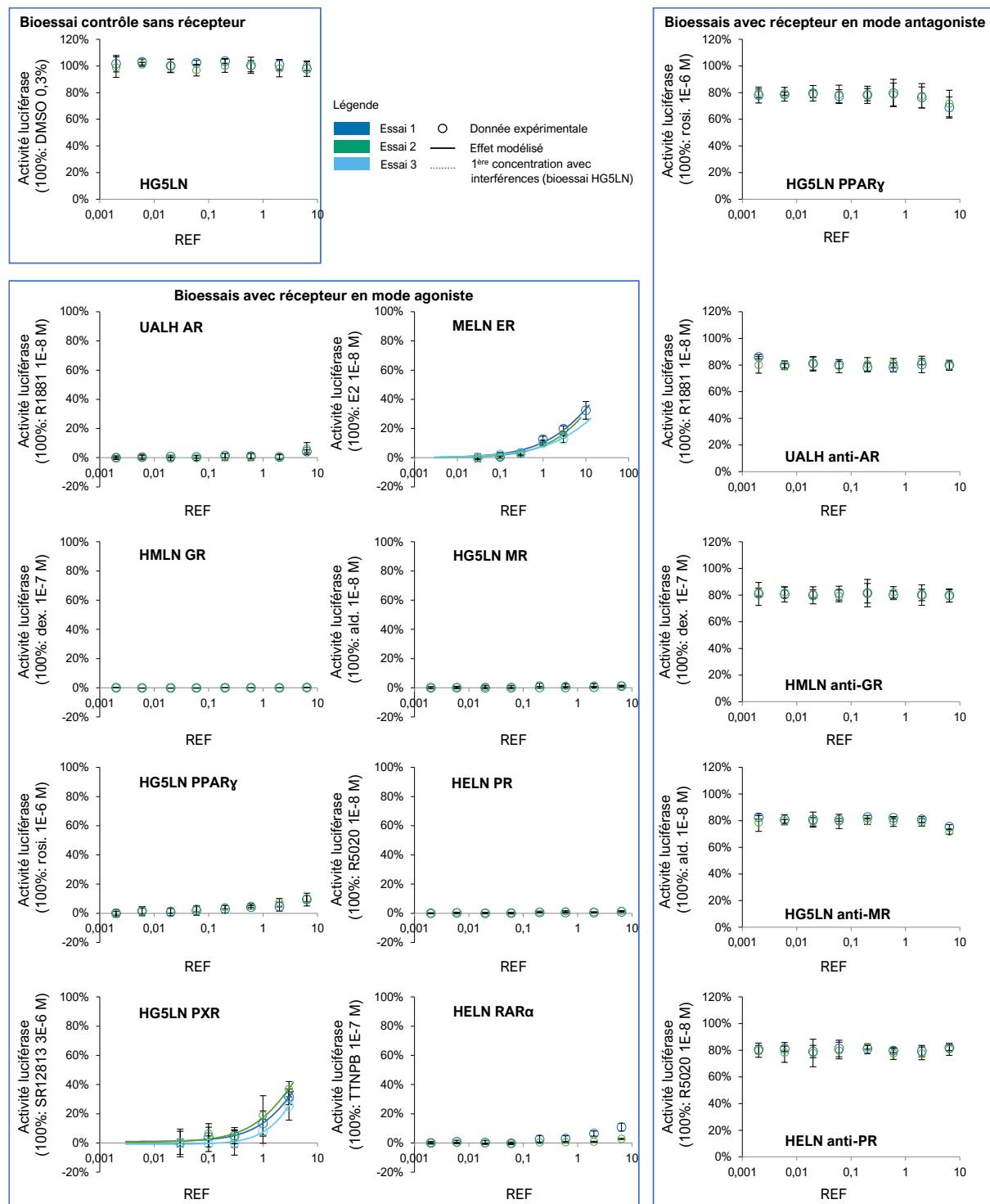


Figure 23. Effet de l'échantillon N dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site O

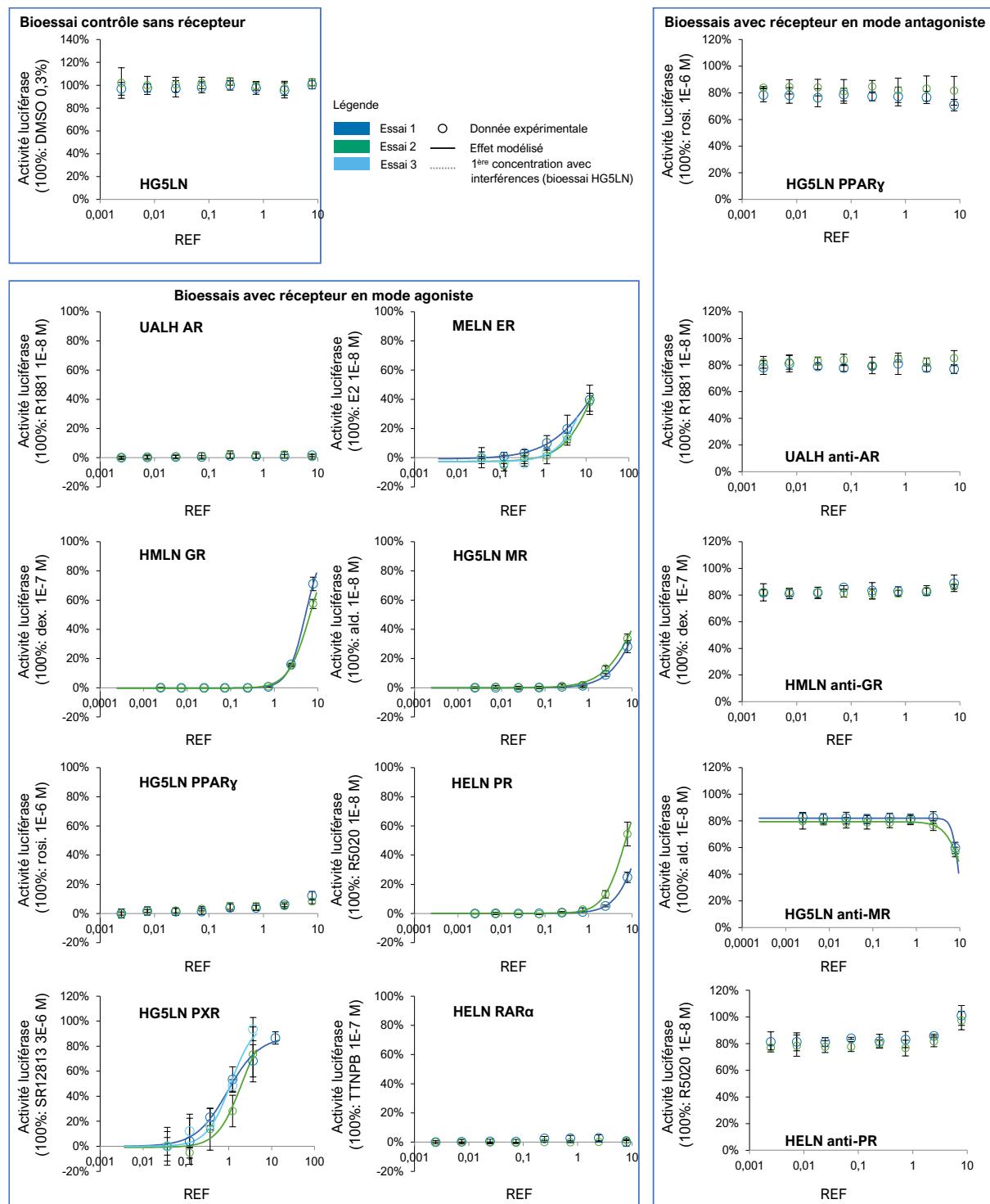


Figure 24. Effet de l'échantillon O dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site P

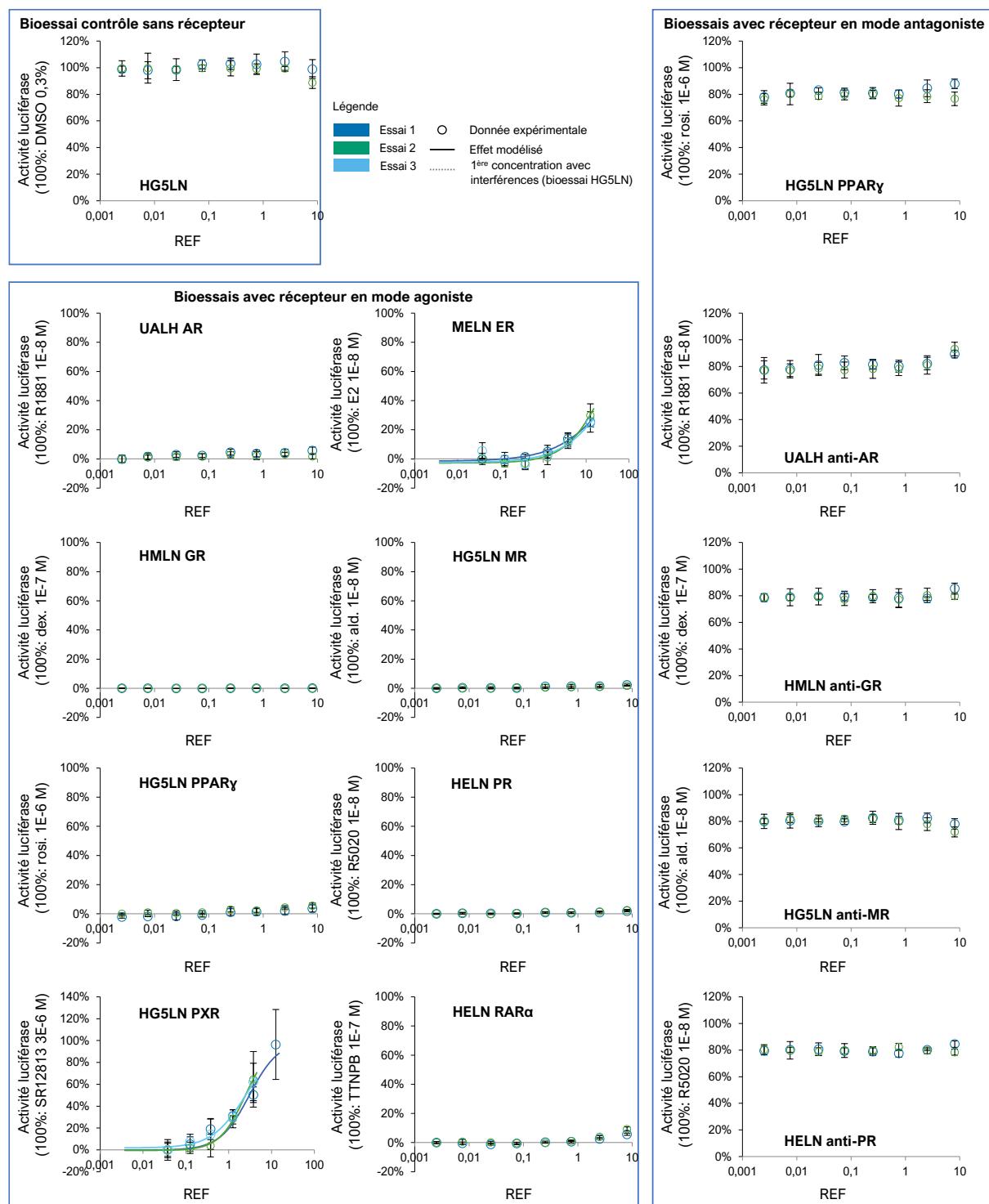


Figure 25. Effet de l'échantillon P dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site Q

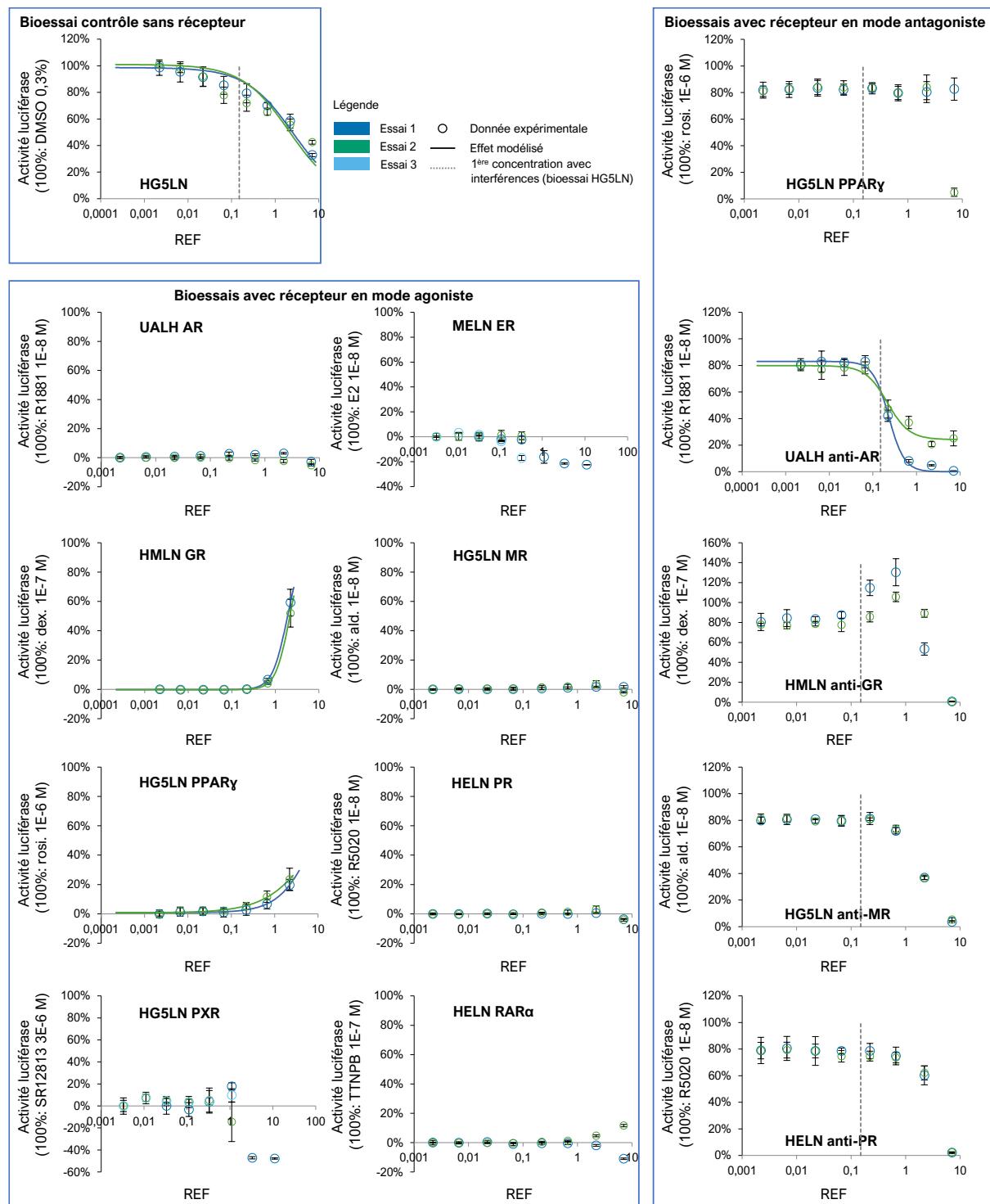


Figure 26. Effet de l'échantillon Q dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site R

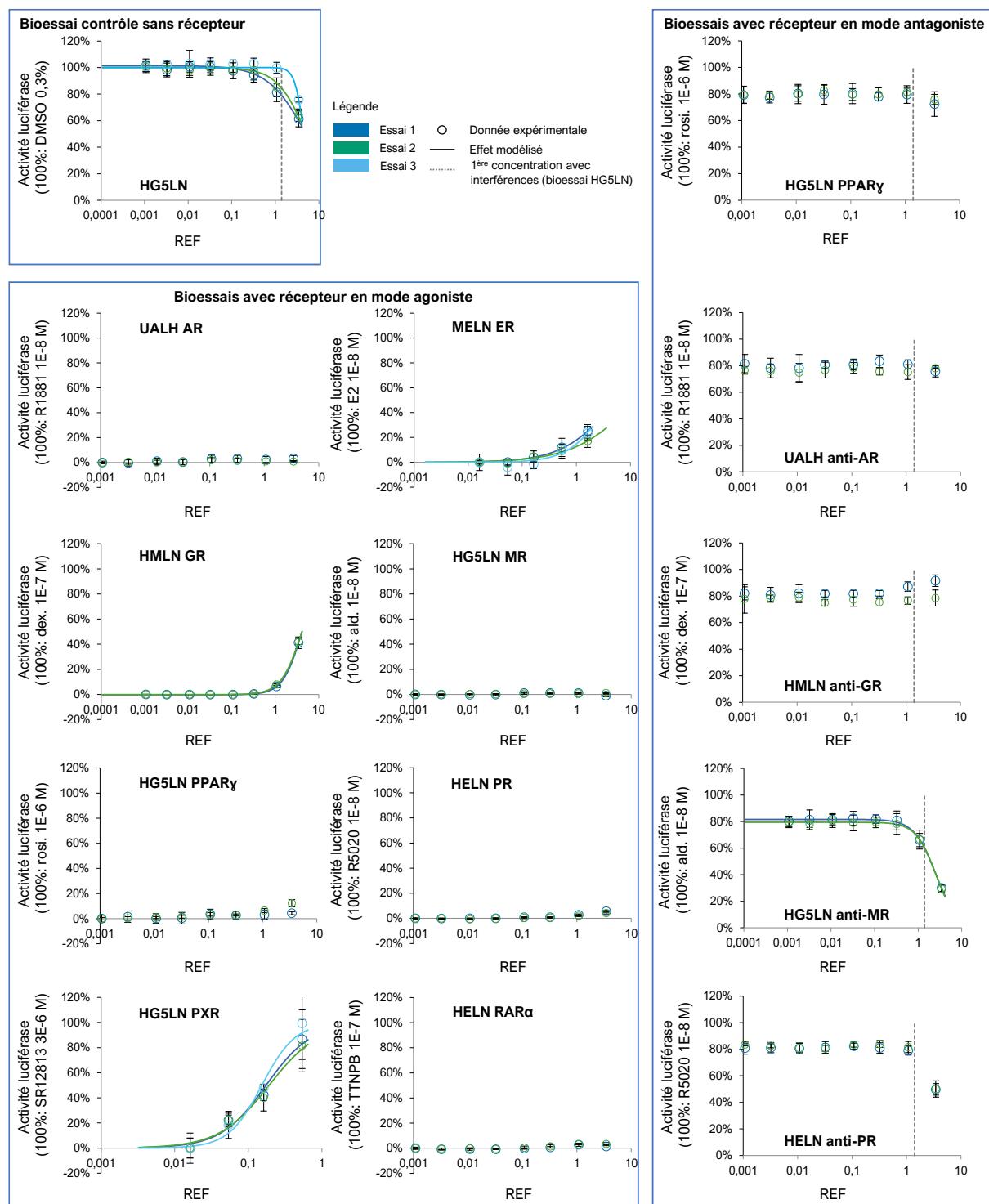


Figure 27. Effet de l'échantillon R dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillé indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site T

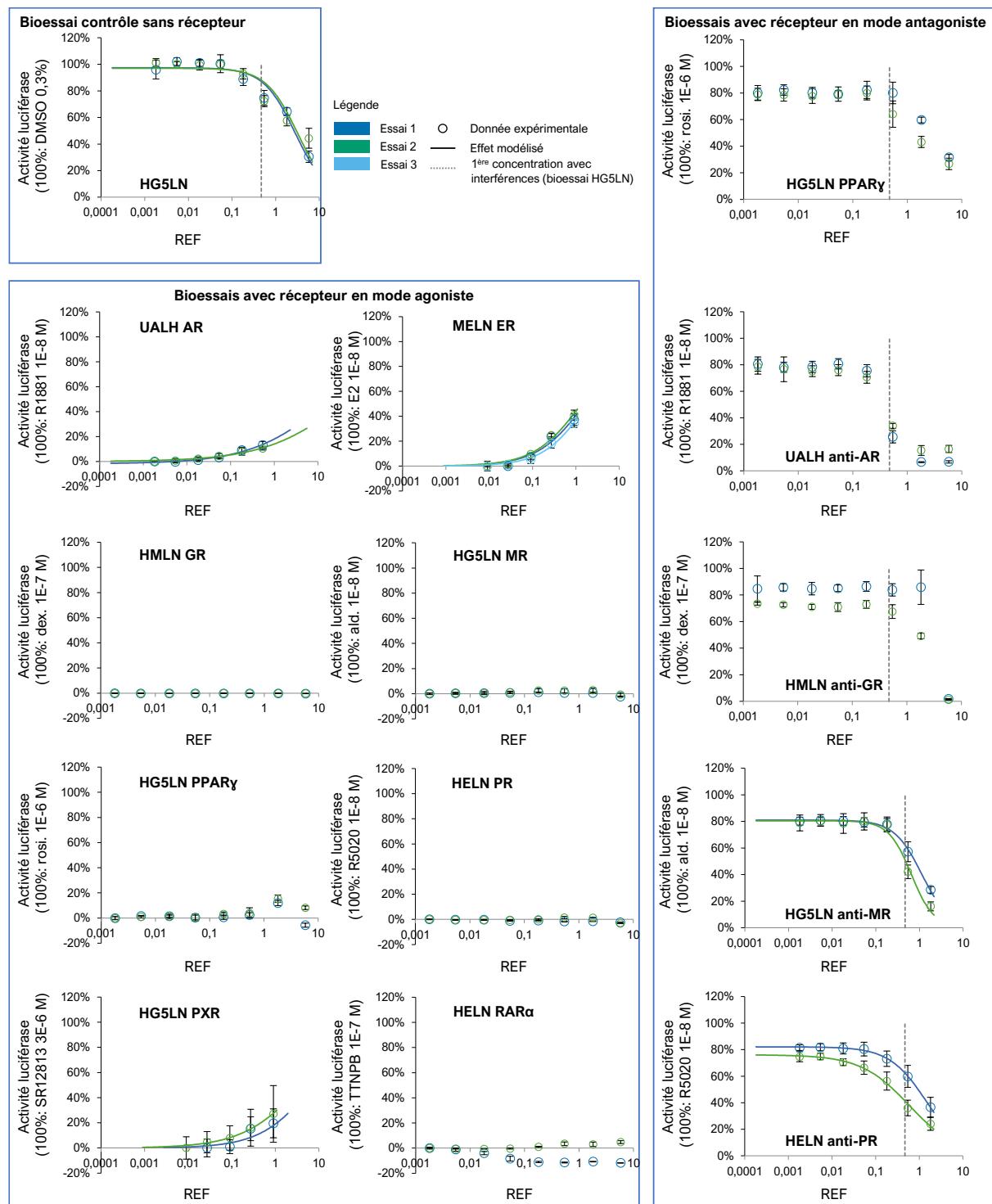


Figure 28. Effet de l'échantillon T dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site U

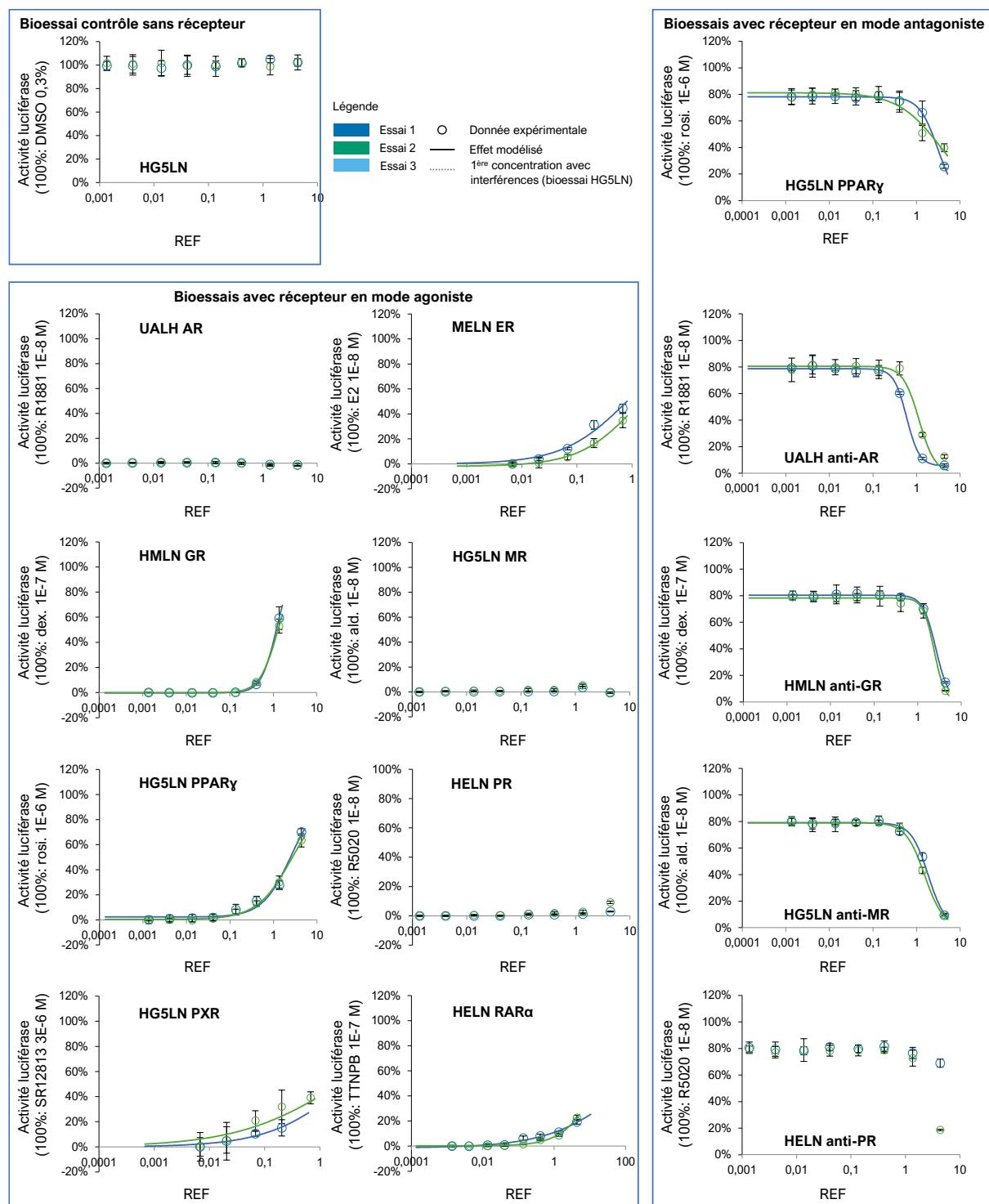


Figure 29. Effet de l'échantillon U dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillée indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques.

Site V

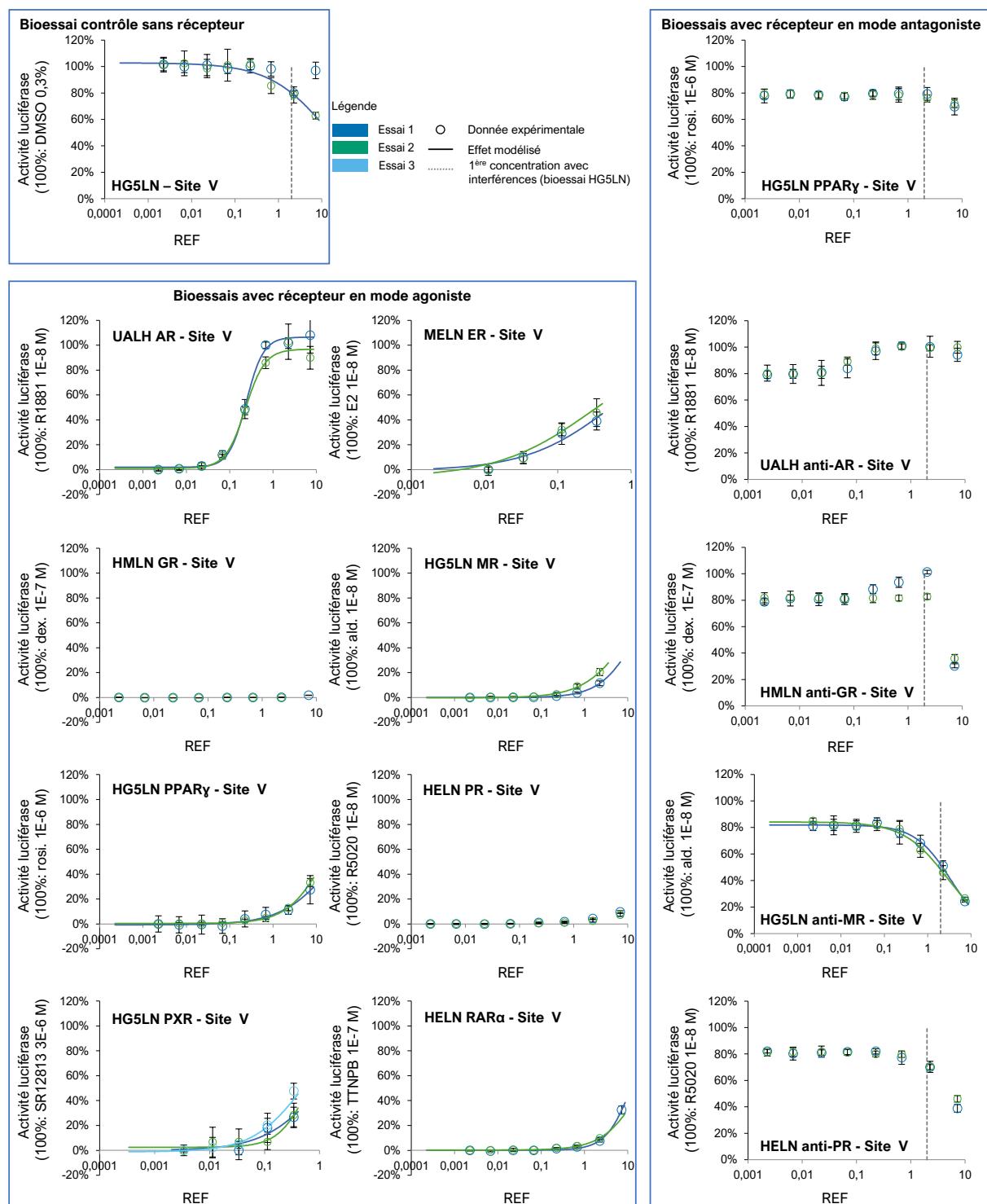


Figure 30. Effet de l'échantillon V dans le bioessai contrôle sans récepteurs et les bioessais avec récepteurs en mode agoniste et antagoniste

Les courbes concentration-réponse sont modélisées lorsqu'un effet significatif est observé. La ligne en pointillés indique la concentration en échantillon à partir de laquelle un effet non spécifique est noté dans le bioessai contrôle. Pour chaque essai, les données expérimentales correspondent à la moyenne +/- écart-type de 4 répliques. Une activité RAR est détectée (effet <20%) mais non quantifiée.

