

# - Séminaire OPUR 2022 -

---

Evaluation écotoxicologique d'un polluant pharmaceutique (le furosémide) et de ses produits de dégradation et étude de leur transfert vers l'environnement.

---

*Ecotoxicological evaluation of a pharmaceutical pollutant (furosemide) and its degradation products and study of their transfer to the environment.*

Fidji SANDRÉ

Directeurs de thèse :

*PhD supervisors*

Laure GARRIGUE-ANTAR  
Christophe MORIN



# OPUR “Observatoire des Polluants Urbains”



Phase 5 : 2019-2023

Thème R1

*Thème R2*

Thème R3

Thème R4

## Thème R2 :

Diagnostic et optimisation des systèmes d'assainissement vis-à-vis des polluants/micropolluants

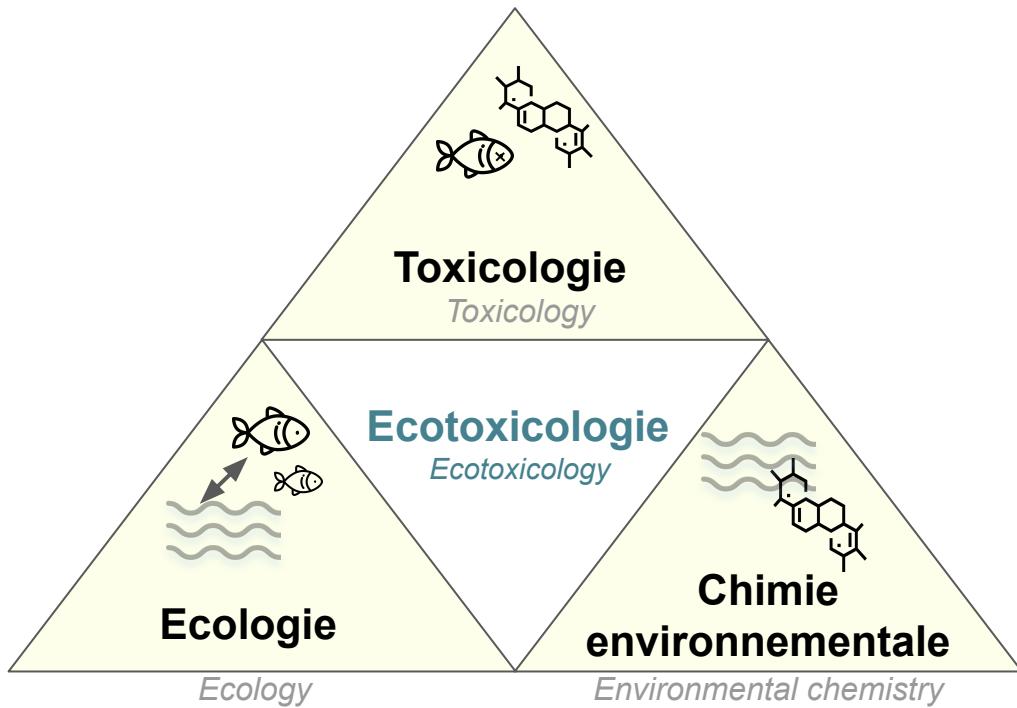
*Diagnosis and optimization of wastewater sanitation systems regarding pollutants and micropollutants*

### Action R2.6 :

Nouvelles méthodes de caractérisation: Analyse par screening qualitatif et écotoxicologie

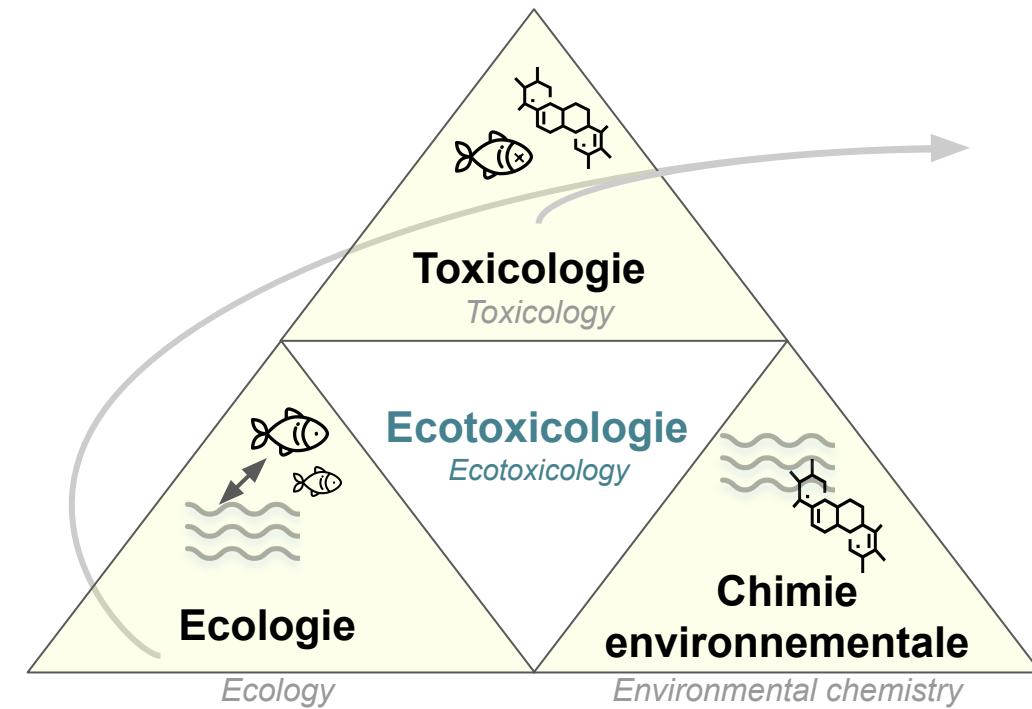
*New methods for the characterization : Analysis by qualitative screening and ecotoxicology*

## Définition et objectifs d'une étude écotoxicologique : *Definition and purpose of an ecotoxicological study*



## Définition et objectifs d'une étude écotoxicologique :

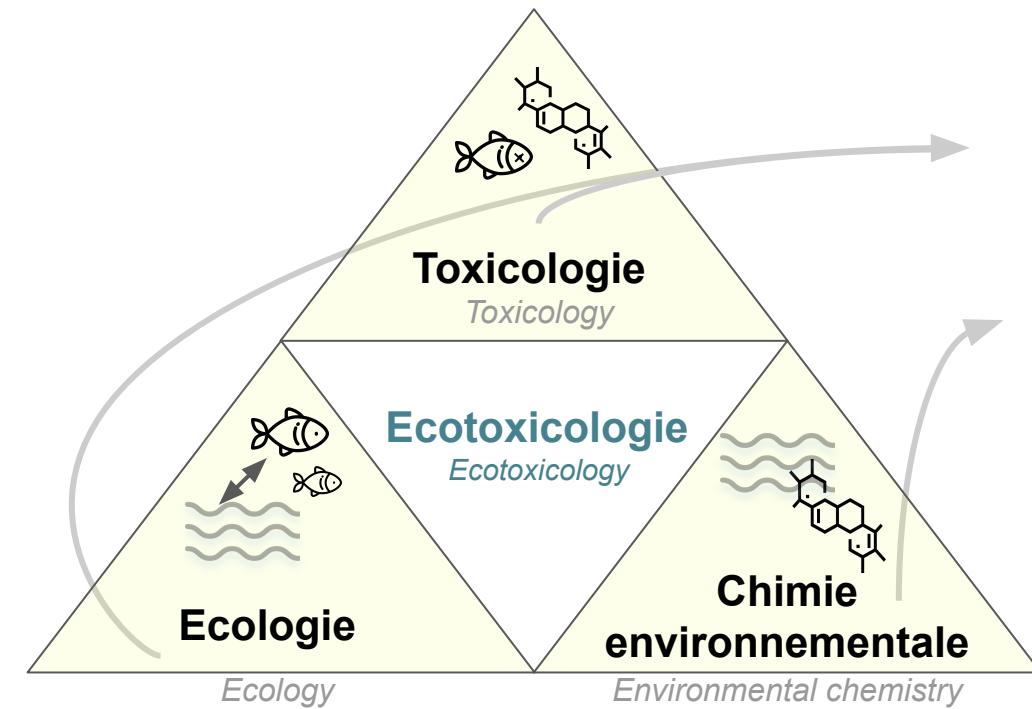
*Definition and purpose of an ecotoxicological study*



Concentrations toxiques  
*Toxic concentrations*

## Définition et objectifs d'une étude écotoxicologique :

*Definition and purpose of an ecotoxicological study*

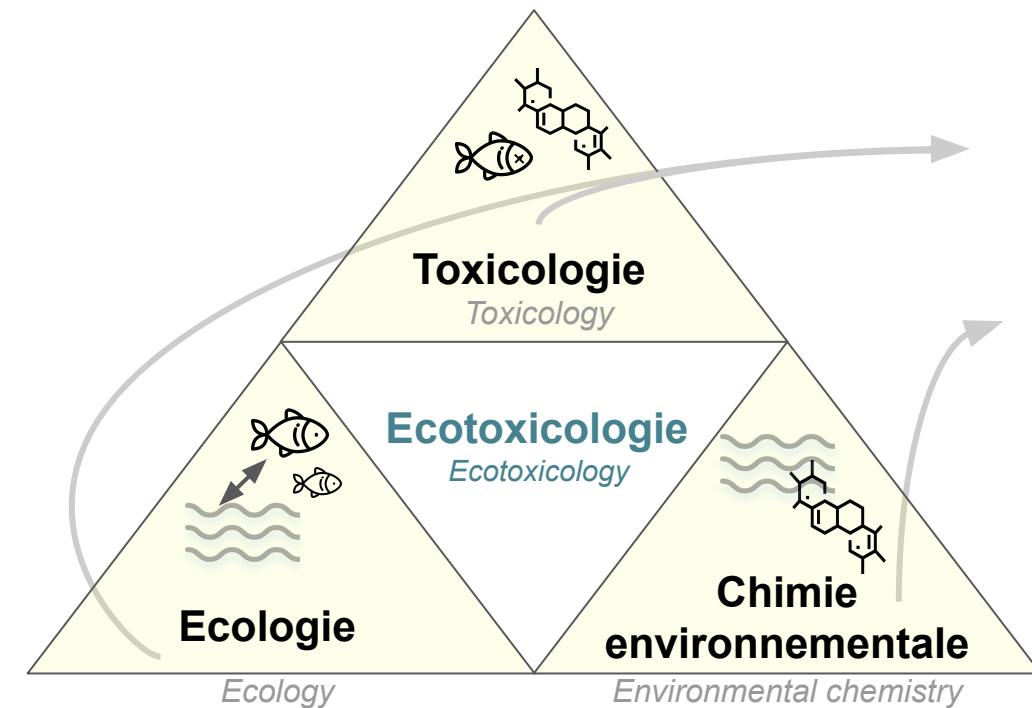


Concentrations toxiques  
*Toxic concentrations*

Concentrations dans l'environnement  
*Environmental concentrations*

## Définition et objectifs d'une étude écotoxicologique :

*Definition and purpose of an ecotoxicological study*



Concentrations toxiques  
*Toxic concentrations*

Concentrations dans l'environnement  
*Environmental concentrations*

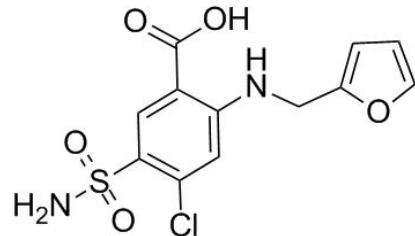
=

Détermination du risque  
*Risk assessment*

## Quelles molécules ?

*Which molecules ?*

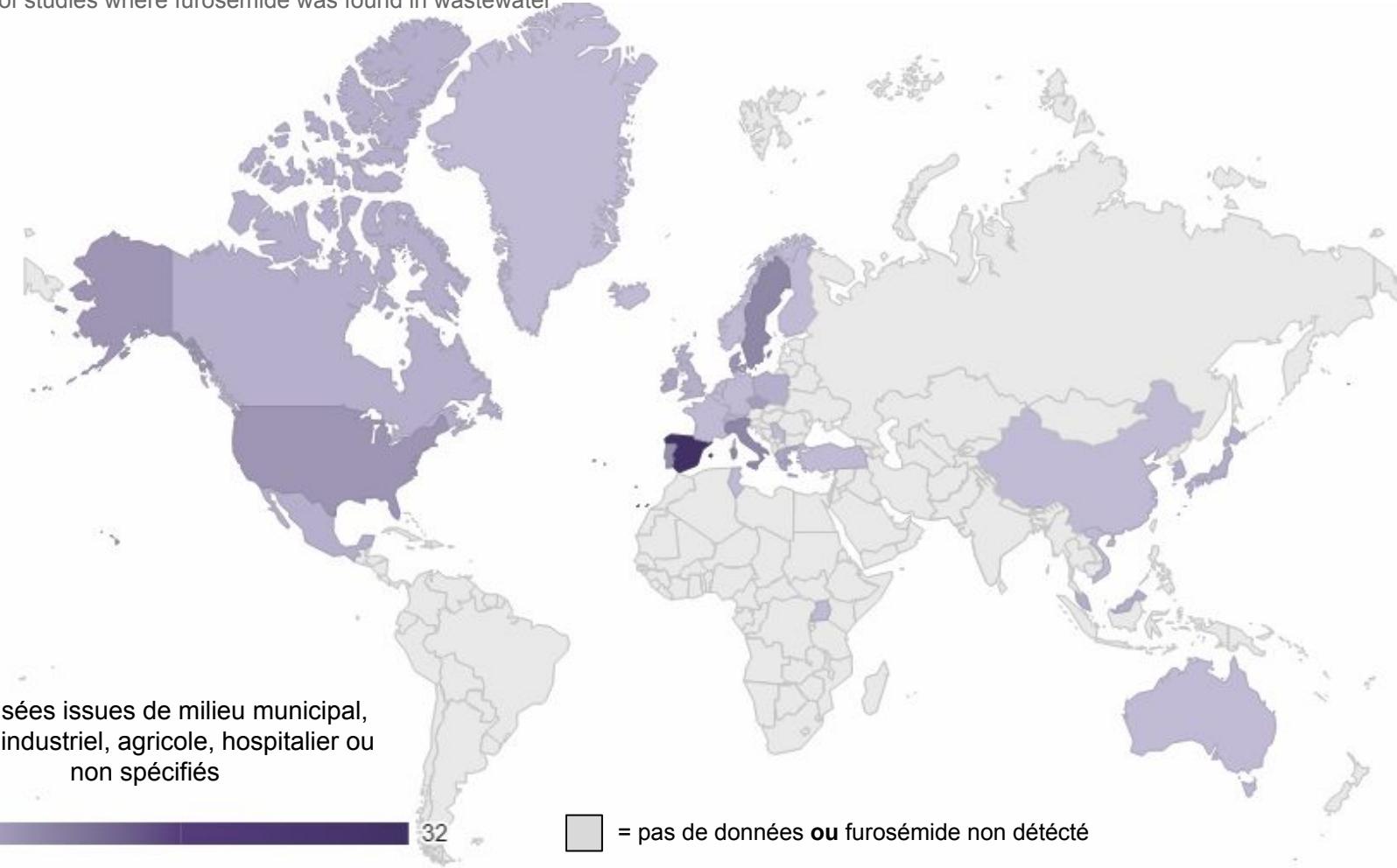
### Furosemide



- Diurétique largement utilisé depuis 1964 <sup>1</sup>  
*Widely used diuretic since 1964*
- Parmi les médicaments les plus prescrits <sup>2</sup>  
*Among the most prescribed drugs worldwide*
- DéTECTé sans ambiguïté dans le milieu aquatique  
*Unambiguously detected in the aquatic environment*

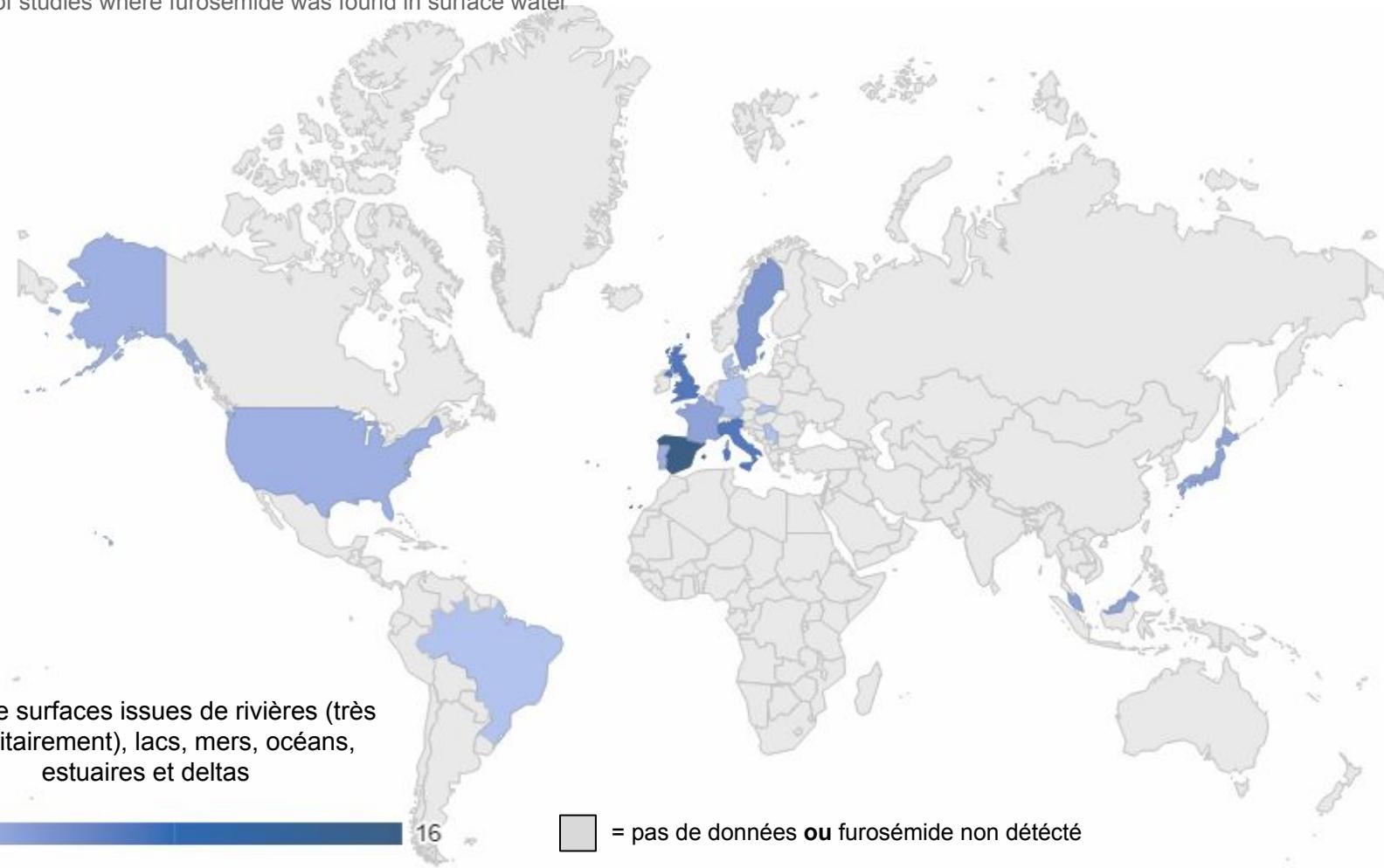
## Nombre d'étude où le furosémide est retrouvé dans les eaux usées

Number of studies where furosemide was found in wastewater



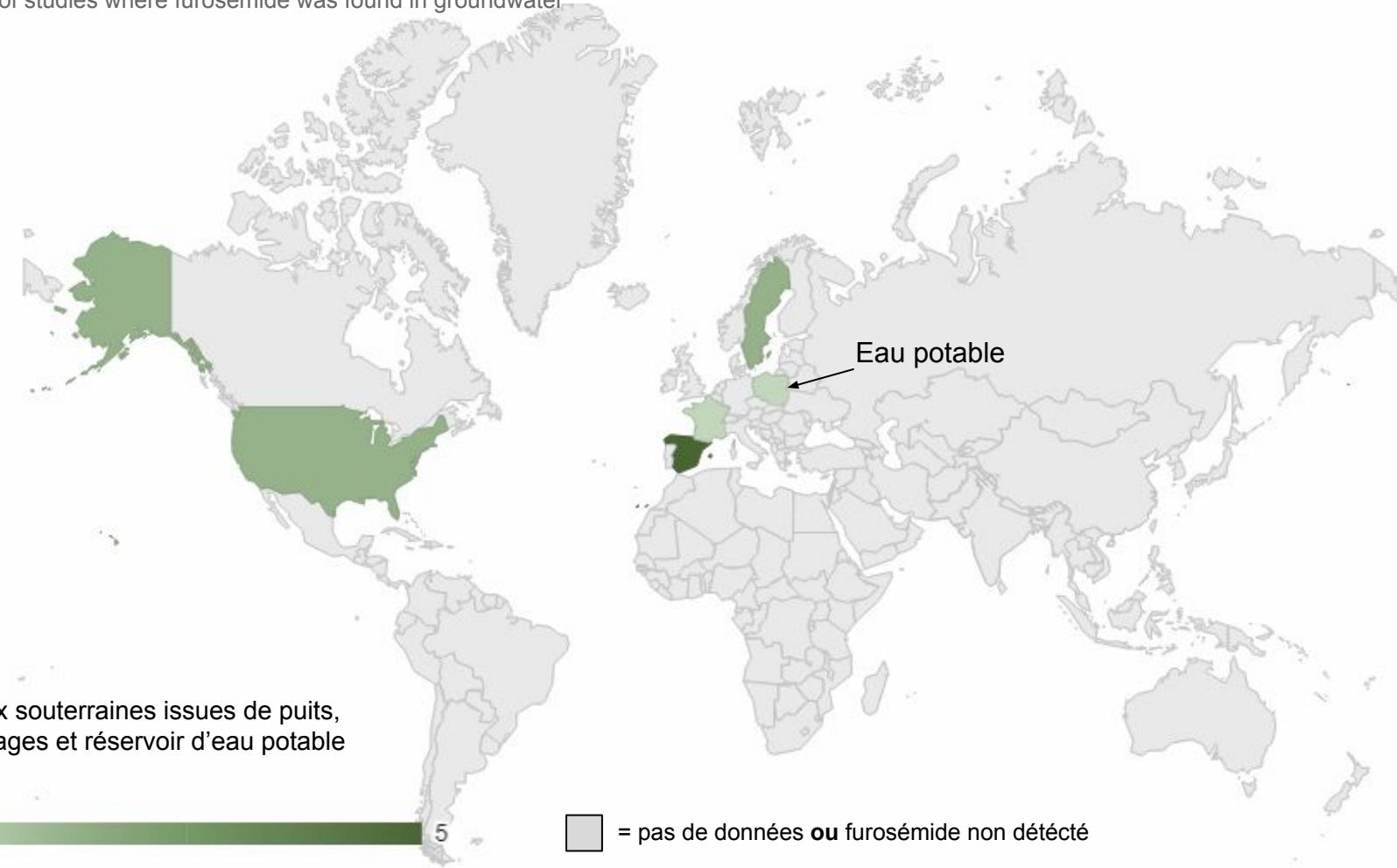
# Nombre d'étude où le furosémide est retrouvé dans les eaux de surface

Number of studies where furosemide was found in surface water



# Nombre d'étude où le furosémide est retrouvé dans les eaux souterraines

Number of studies where furosemide was found in groundwater

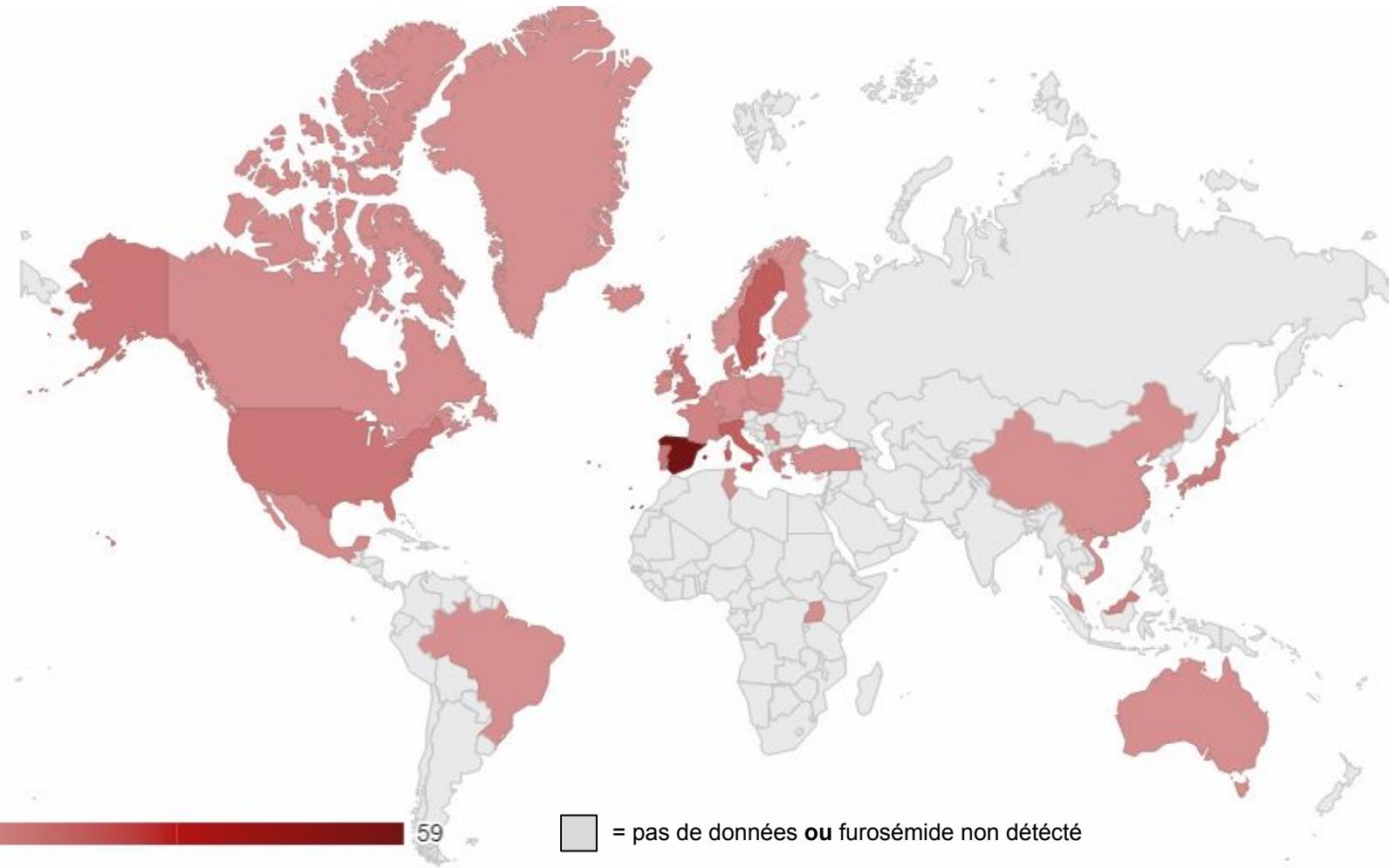


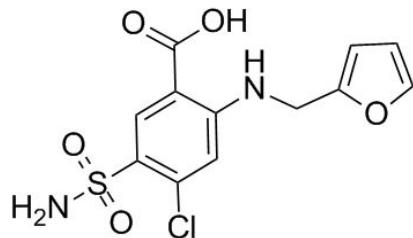
# Nombre d'étude où le furosémide est retrouvé dans les sédiments et boues

Number of studies where furosemide was found in sludge and sediment



## Nombre d'étude où le furosémide est retrouvé, tous milieux confondus

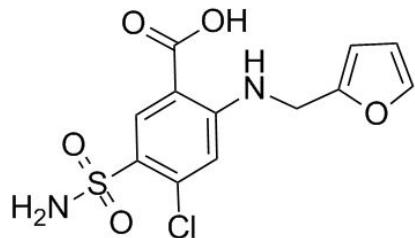


**Furosemide**

- Diurétique largement utilisé depuis 1964 <sup>1</sup>  
*Widely used diuretic since 1964*
- Parmi les médicaments les plus prescrits <sup>2</sup>  
*Among the most prescribed drugs worldwide*
- DéTECTé sans ambiguïté dans le milieu aquatique  
*Unambiguously detected in the aquatic environment*

Quelles molécules ?  
Which molecules ?

	[C]moyenne/mean	[C]max.	Ref
<b>Eaux de surface</b> <i>Surface water</i>	<b>248 ng.L<sup>-1</sup></b>	<b>6 894 ng.L<sup>-1</sup></b>	42
<b>Influents de STEU</b> <i>WWTP Influent</i>	<b>3 926 ng.L<sup>-1</sup></b>	<b>71 500 ng.L<sup>-1</sup></b>	52
<b>Effluents de STEU</b> <i>WWTP Effluent</i>	<b>1 876 ng.L<sup>-1</sup></b>	<b>26 000 ng.L<sup>-1</sup></b>	73
<b>Effluents d'hôpitaux</b> <i>Hospital effluents</i>	<b>18 495 ng.L<sup>-1</sup></b>	<b>392 000 ng.L<sup>-1</sup></b>	26
<b>Installations pharmaceutiques</b> <i>Pharmaceutical facilities</i>	<b>1 250 000 ng.L<sup>-1</sup></b>	<b>1 300 000 ng.L<sup>-1</sup></b>	2
<b>Boues de STEU</b> <i>WWTP sludge</i>	<b>127 µg/kg</b>	<b>686 µg/kg</b>	17
<b>Sédiments</b> <i>Sediments</i>	<b>68 µg/kg</b>	<b>350 µg/kg</b>	7

**Furosemide**

- Diurétique largement utilisé depuis 1964<sup>1</sup>  
*Widely used diuretic since 1964*
- Parmi les médicaments les plus prescrits<sup>2</sup>  
*Among the most prescribed drugs worldwide*
- DéTECTé sans ambiguïté dans le milieu aquatique  
*Unambiguously detected in the aquatic environment*

Quelles molécules ?  
Which molecules ?

	[C]moyenne/mean	[C]max.	Ref
<b>Eaux de surface</b> <i>Surface water</i>	248 ng.L <sup>-1</sup>	6 894 ng.L <sup>-1</sup>	
<b>Influents de STEU</b> <i>WWTP Influent</i>	3 926 ng.L <sup>-1</sup>	71 500 ng.L <sup>-1</sup>	
<b>Effluents de STEU</b> <i>WWTP Effluent</i>	1 876 ng.L <sup>-1</sup>	26 000 ng.L <sup>-1</sup>	
<b>Effluents d'hôpitaux</b> <i>Hospital effluents</i>	18 495 ng.L <sup>-1</sup>	392 000 ng.L <sup>-1</sup>	
<b>Installations pharmaceutiques</b> <i>Pharmaceutical facilities</i>	1 250 000 ng.L <sup>-1</sup>	1 300 000 ng.L <sup>-1</sup>	
<b>Boues de STEU</b> <i>WWTP sludge</i>	127 µg/kg	686 µg/kg	17
<b>Sédiments</b> <i>Sediments</i>	68 µg/kg	350 µg/kg	7

+

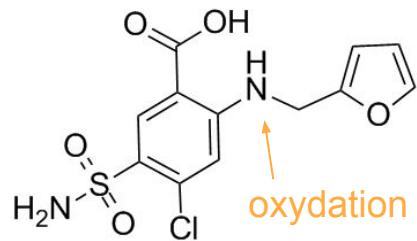
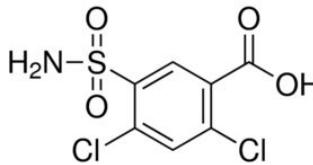
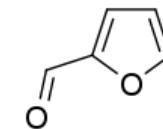
# → Le Furosémide est considéré comme polluant prioritaire

*Furosemide is considered as a priority pollutant*

	zuccato 2004	Zuccato et al 2005	Besse & Gamic 2008	Munoz et al. 2008	De Voogt et al. 2009	Christensen et al. 2009	Roos et al. 2012	Dong et al. 2013	Kostich et al. 2014	Riva et al. 2014	Daouk et al. 2015	Guo et al. 2016	Mansour et al. 2016	Chinnaiyan et al. 2018	Li et al. 2019	Ahmed 2020
Production, sale or consumption (kg/year)			x			x	x		x		x	x	x		x	
Removal in WWTP								x		x		x	x	x		
Persistance/ stability in freshwater	x	x	x	x	x	x			x		x					
Occurence in environment	x			x	x	x		x	x	x			x			
PEC		x						x		x						
Toxicity			x	x		x		x		x		x	x			
Ecotoxicity			x	x	x	x	x			x	x	x	x			
MEC/PNEC ratio or equivalent					x	x										
Other			x								x		x		x	
Bioconcentration factor (BCF)									x		x					
Excretion rate								x								

Quelles molécules ?

Which molecules ?

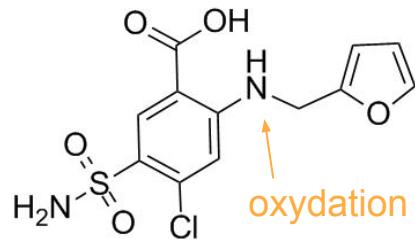
**Furosemide****Saluamine****Furfural**

(1)

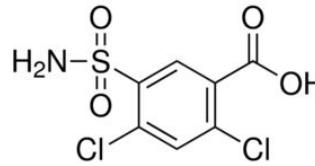
- Deux métabolites connus depuis 1981<sup>1</sup> mais très peu étudiés  
*Both known as a Furosemide metabolite since 1981 but very little studied*

Quelles molécules ?  
Which molecules ?

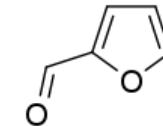
Furosemide



Saluamine



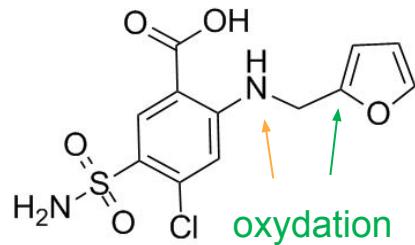
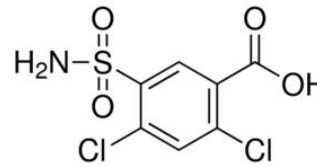
Furfural



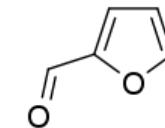
(1)

- Deux métabolites connus depuis 1981<sup>1</sup> mais très peu étudiés  
*Both known as a Furosemide metabolite since 1981 but very little studied*
- Furfural : Possiblement cancérogène, reprotoxique et hépatotoxique<sup>2</sup>  
*Possibly carcinogenic, reprotoxic and hepatotoxic*
- Saluamine : Fort irritant<sup>3</sup>, possible génotoxique, cytotoxique et perturbateur endocrinien<sup>4</sup>  
*Highly irritating, possible genotoxic, cytotoxic & Endocrine disruptor*

Quelles molécules ?

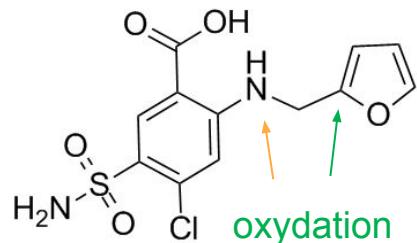
*Which molecules ?***Furosemide****Saluamine**

+

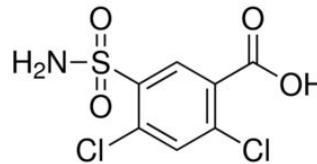
**Furfural**

Quelles molécules ?  
Which molecules ?

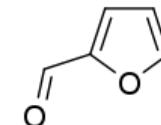
### Furosemide



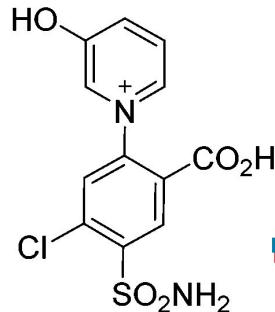
### Saluamine



### Furfural



### Pyridinium of Furosemide (PoF)



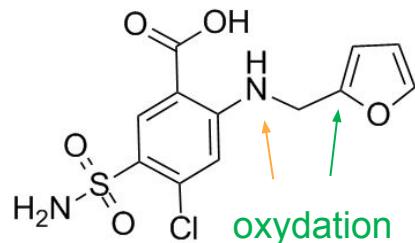
- Produit par électrochimie<sup>1</sup>  
*Produced by electrochemistry*

(1)

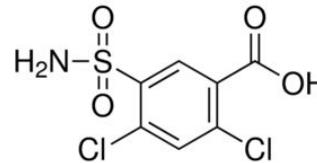
(2)

Quelles molécules ?  
Which molecules ?

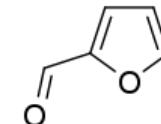
### Furosemide



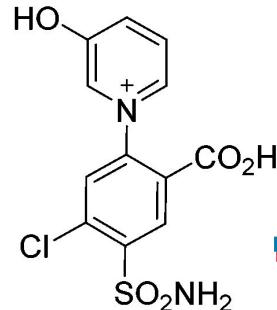
### Saluamine



### Furfural



### Pyridinium of Furosemide (PoF)



- Produit par électrochimie<sup>1</sup>  
*Produced by electrochemistry*
- Obtenu par bioconversion<sup>2,3</sup>  
*Obtained by bioconversion*

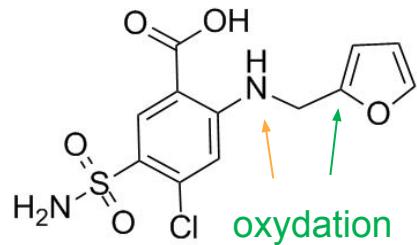
Aspergillus  
candidus



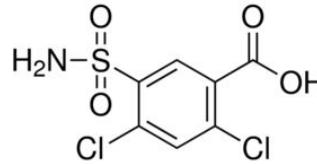
Cunninghamella  
echinulata

Quelles molécules ?  
Which molecules ?

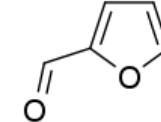
### Furosemide



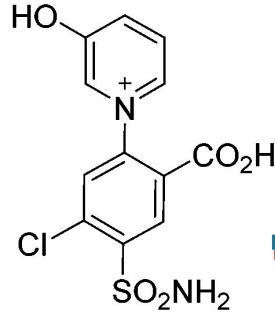
### Saluamine



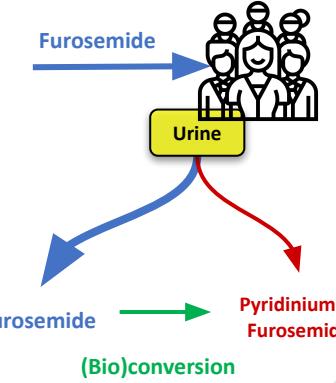
### Furfural



### Pyridinium of Furosemide (PoF)



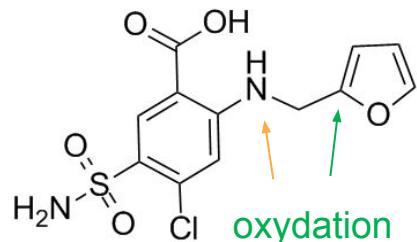
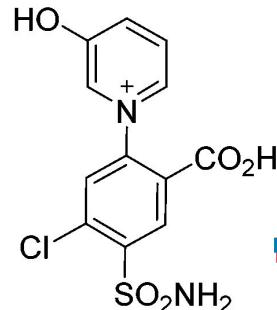
- Produit par électrochimie<sup>1</sup>  
*Produced by electrochemistry*
- Obtenu par bioconversion<sup>2,3</sup>  
*Obtained by bioconversion*
- Métabolite humain<sup>4</sup>  
*Human metabolite*



## Quelles molécules ?

*Which molecules ?*

## Furosemide

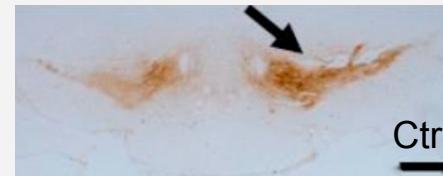
Pyridinium of  
Furosemide  
(PoF)

(2)

## Quelles molécules ?

*Which molecules ?*Toxicité chez le rat<sup>1</sup>

- Mort des neurones dopaminergiques  
*Death of dopaminergic neurons*

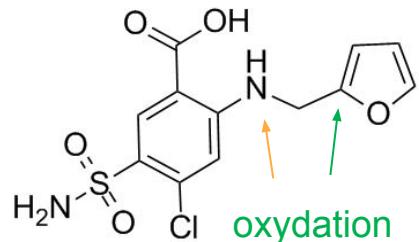


- Accumulation d' $\alpha$ -synucléine dans les neurones  
*Accumulation of alpha synuclein in neurons*
- Altération du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale  
*Alteration of the complex I of the mitochondrial respiratory chain*

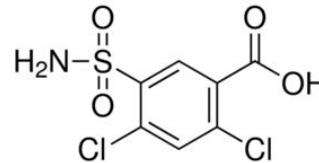
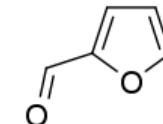
**Inducteur possible de neurodégénérescence**  
**Possible inducer of neurodegeneration**

Quelles molécules ?

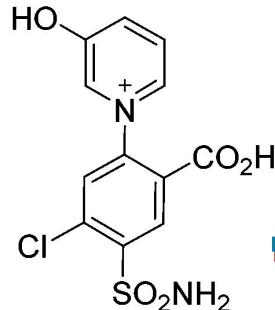
Which molecules ?

**Furosemide**

(1)

**Saluamine****Furfural**

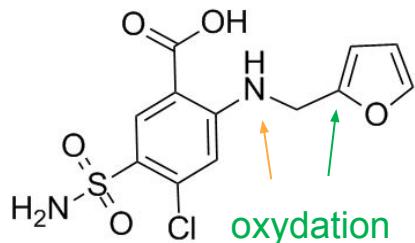
+

**Pyridinium of  
Furosemide  
(PoF)**

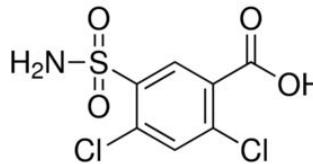
(2)

Quelles molécules ?  
Which molecules ?

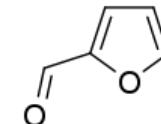
### Furosemide



### Saluamine

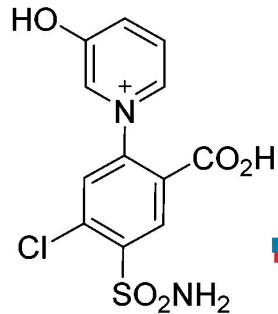


### Furfural



(1)

### Pyridinium of Furosemide (PoF)



(2)

Présentent-ils un risque à des concentrations pertinentes dans l'environnement ?

*Do they present a risk at environmentally relevant concentrations?*

## Concentrations environnementales

*Environmental concentrations*

Développement de méthodes d'analyse pour la quantification des composés dans l'eau et dans les boues de STEU :

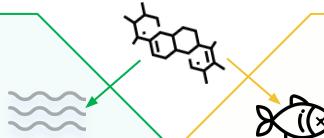
*Development of analytical methods for the quantification of the 4 compounds in water and WWTP sludge*

Détermination des concentrations environnementales par l'analyse d'échantillons (ex: rejets de STEU ou d'hôpitaux)

*Determination of environmental concentrations through sample analysis (e.g. WWTPs or hospitals wastewater)*

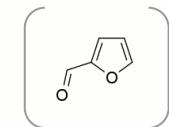
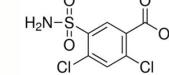
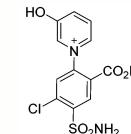
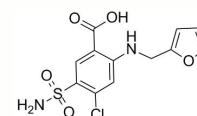
Etude sur la dégradation des molécules (UV, O<sub>3</sub>,...)

*Study on the degradation of the molecules (UV, O<sub>3</sub>,...)*



## Concentrations toxiques

*Toxic concentrations*



## Concentrations environnementales

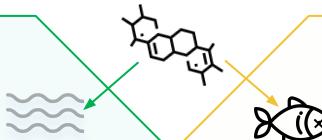
*Environmental concentrations*

Développement de méthodes d'analyse pour la quantification des composés dans l'eau et dans les boues de STEU :  
*Development of analytical methods for the quantification of the 4 compounds in water and WWTP sludge*

**Détermination des concentrations environnementales** par l'analyse d'échantillons (ex: rejets de STEU ou d'hôpitaux)

*Determination of environmental concentrations through sample analysis (e.g. WWTPs or hospitals wastewater)*

Etude sur la dégradation des molécules (UV, O<sub>3</sub>,...)  
*Study on the degradation of the molecules (UV, O<sub>3</sub>,...)*



## Concentrations toxiques

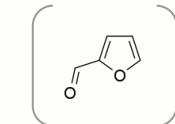
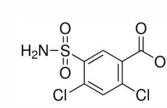
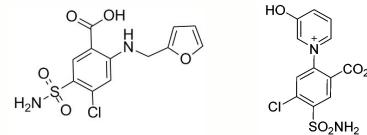
*Toxic concentrations*

Développement d'un panel de bioessais *in vitro* et *in vivo*  
*Development of multiple bioassays in vitro and in vivo*

**Application à des concentrations environnementales**  
*Application to environmental concentrations*

◆ Sur les composés seuls  
*On the compounds alone*

◆ En mélanges  
*in combination*



## Concentrations environnementales

*Environmental concentrations*

Développement de méthodes d'analyse pour la quantification des composés dans l'eau et dans les boues de STEU :  
*Development of analytical methods for the quantification of the 4 compounds in water and WWTP sludge*

**Détermination des concentrations environnementales** par l'analyse d'échantillons (ex: rejets de STEU ou d'hôpitaux)

*Determination of environmental concentrations through sample analysis (e.g. WWTPs or hospitals wastewater)*

Etude sur la dégradation des molécules (UV, O<sub>3</sub>,...)  
*Study on the degradation of the molecules (UV, O<sub>3</sub>,...)*



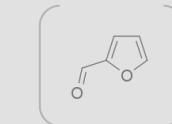
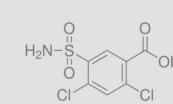
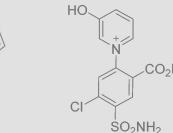
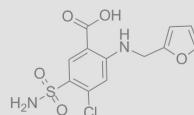
## Concentrations toxiques

*Toxic concentrations*

Développement d'un panel de bioessais *in vitro* et *in vivo*  
*Development of multiple bioassay in vitro and in vivo*

**Application à des concentrations environnementales**  
*Application to environmental concentrations*

- ◆ Sur les composés seuls  
*On the compounds alone*
- ◆ En mélanges  
*in combination*



Détermination des concentrations de **Furosémide, Pyridinium, Saluamine et Furfural** dans différentes eaux

*Determination of Furosemide, Pyridinium, Saluamine and Furfural concentrations in different types of water*

### Choix des sites de prélèvements ?

## Détermination des concentrations de **Furosémide, Pyridinium, Saluamine et Furfural** dans différentes eaux

*Determination of Furosemide, Pyridinium, Saluamine and Furfural concentrations in different types of water*

### EHPAD



- Concentrations très importantes
- Etude des produits de dégradation
- Contribution importante

## Détermination des concentrations de **Furosémide, Pyridinium, Saluamine et Furfural** dans différentes eaux

*Determination of Furosemide, Pyridinium, Saluamine and Furfural concentrations in different types of water*

### EHPAD



- Concentrations très importantes
- Etude des produits de dégradation
- Contribution importante



Étude sur l'oxydation du furosémide

O<sub>3</sub>

Chloration

UV-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

## Détermination des concentrations de **Furosémide, Pyridinium, Saluamine et Furfural** dans différentes eaux

*Determination of Furosemide, Pyridinium, Saluamine and Furfural concentrations in different types of water*

### EHPAD



- Concentrations très importantes
- Etude des produits de dégradation
- Contribution importante



Étude sur l'oxydation du furosémide

O<sub>3</sub>

Chloration

UV-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### STEU



- Concentrations importantes
- Etude des traitements "classiques"
- Apports vers l'environnement

## Détermination des concentrations de **Furosémide, Pyridinium, Saluamine et Furfural** dans différentes eaux

*Determination of Furosemide, Pyridinium, Saluamine and Furfural concentrations in different types of water*

EHPAD



- Concentrations très importantes
- Etude des produits de dégradation
- Contribution importante



Étude sur l'oxydation du furosémide

O<sub>3</sub>

Chloration

UV-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

STEU



- Concentrations importantes
- Etude des traitements "classiques"
- Apports vers l'environnement

Rivière



- Concentrations environnementales
- Avant et après agglomération

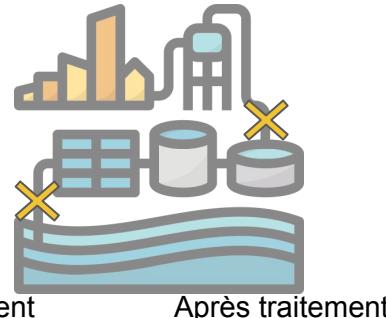
## Détermination des concentrations de **Furosémide, Pyridinium, Saluamine et Furfural** dans différentes eaux

*Determination of Furosemide, Pyridinium, Saluamine and Furfural concentrations in different types of water*

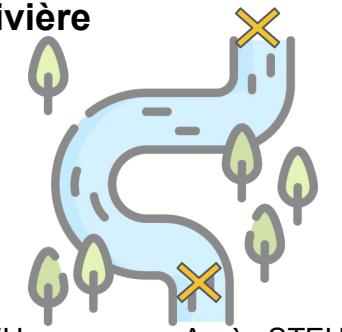
EHPAD



STEU

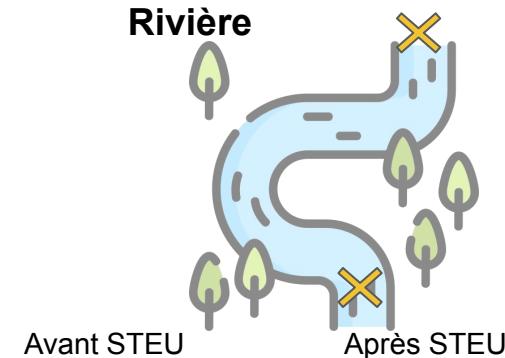
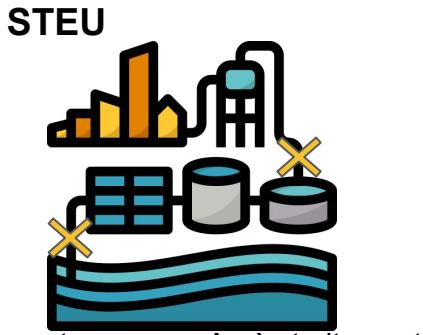
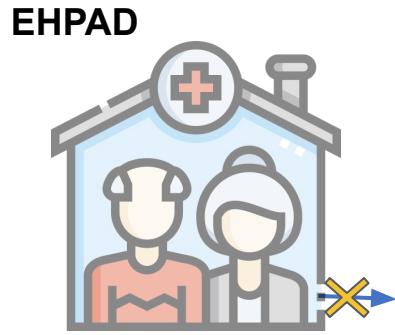


Rivière



- Furosémide +++
- Pyridinium ✓
- Saluamine ✓
- Furfural ?

# Détermination des concentrations de **Furosémide, Pyridinium, Saluamine et Furfural** dans différentes eaux *Determination of Furosemide, Pyridinium, Saluamine and Furfural concentrations in different types of water*



- Furosémide +++
  - Pyridinium ✓
  - Saluamine ✓
  - Furfural ?  
  - Peu d'abattement pour le furosémide
  - Pyridinium très réduit
  - Saluamine très réduit
  - Furfural ?

## Détermination des concentrations de **Furosémide, Pyridinium, Saluamine et Furfural** dans différentes eaux

*Determination of Furosemide, Pyridinium, Saluamine and Furfural concentrations in different types of water*

EHPAD



- Furosémide +++
- Pyridinium ✓
- Saluamine ✓
- Furfural ?

STEU



Avant traitement

Après traitement

Rivière



Avant STEU

Après STEU

- Furosémide ✓
- Pyridinium ✓
- Saluamine ✓
- Furfural ?

### Concentrations environnementales

*Environmental concentrations*

Développement de méthodes d'analyse pour la quantification des composés dans l'eau et dans les boues de STEU :  
*Development of analytical methods for the quantification of the 4 compounds in water and WWTP sludge*

Détermination des concentrations environnementales par l'analyse d'échantillons (ex: rejets de STEU ou d'hôpitaux)

*Determination of environmental concentrations through sample analysis (e.g. WWTPs or hospitals wastewater)*

Etude sur la dégradation des molécules (UV, O<sub>3</sub>,...)  
*Study on the degradation of the molecules (UV, O<sub>3</sub>,...)*



### Concentrations toxiques

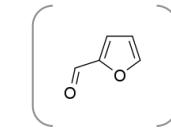
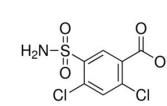
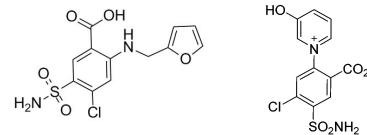
*Toxic concentrations*

Développement d'un panel de bioessais *in vitro* et *in vivo*  
*Development of multiple bioassays in vitro and in vivo*

**Application à des concentrations environnementales**  
*Application to environmental concentrations*

◆ Sur les composés seuls  
*On the compounds alone*

◆ En mélanges  
*in combination*



# Introduction

# Occurrence & degradation

# Ecotoxicological assessment

# Conclusion

Modèles  
*in vitro*

Lignée cellulaire

*Cell line*

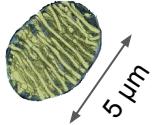


(neurones) (foie) (reins)

SH-SY5Y Hep-G2 HEK 296

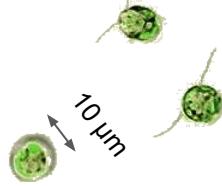
Mitochondrie

*Mitochondria*



Algue verte

*Green algae*



*Chlamydomonas sp.*

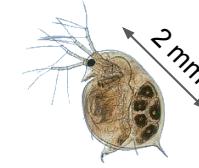
Artemia

*Artemia salina*



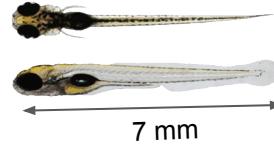
Daphnia

*Daphnia magna*



Poisson zèbre

*Zebrafish*



*Danio rerio*

Quels organismes et bioessais ?

Which organisms and bioassays ?

Modèles  
*in vivo*

# Introduction

# Occurrence & degradation

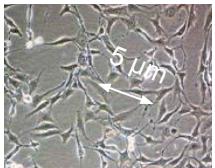
# Ecotoxicological assessment

# Conclusion

Modèles  
*in vitro*

Lignée cellulaire

*Cell line*

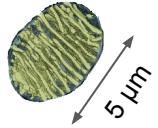


(neurones) (foie) (reins)

SH-SY5Y Hep-G2 HEK 296

Mitochondrie

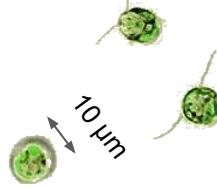
*Mitochondria*



Mitochondrie de foie

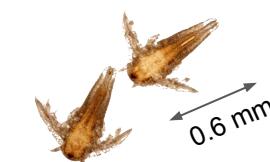
Algue verte

*Green algae*



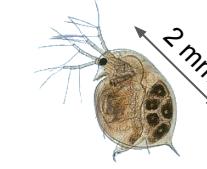
*Chlamydomonas sp.*

Artemia



*Artemia salina*

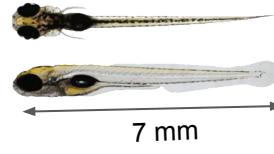
Daphnia



*Daphnia magna*

Poisson zèbre

*Zebrafish*



*Danio rerio*

**Mécanismes de toxicité**

**Toxicité sur le milieu**

Modèles  
*in vivo*

# Introduction

# Occurrence & degradation

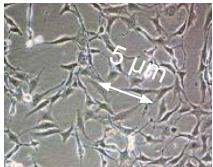
# Ecotoxicological assessment

# Conclusion

Modèles  
*in vitro*

Lignée cellulaire

*Cell line*

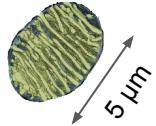


(neurones) (foie) (reins)

SH-SY5Y Hep-G2 HEK 296

Mitochondrie

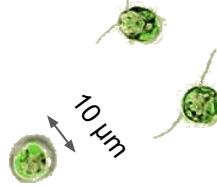
*Mitochondria*



Mitochondrie de foie

Algue verte

*Green algae*



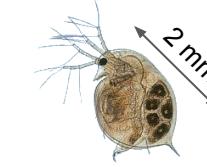
*Chlamydomonas sp.*

Artemia



*Artemia salina*

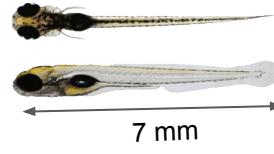
Daphnia



*Daphnia magna*

Poisson zèbre

*Zebrafish*



*Danio rerio*

Mécanismes de toxicité

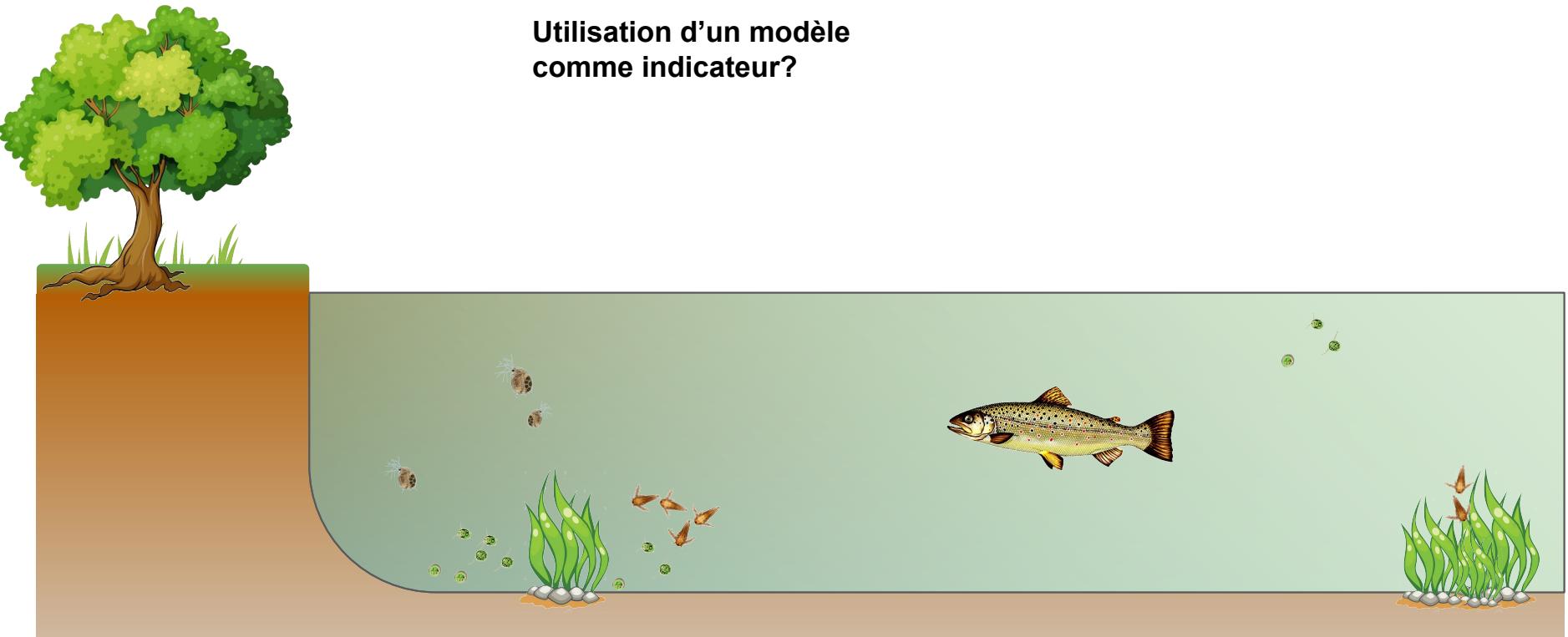
Quels organismes et bioessais ?

*Which organisms and bioassays ?*

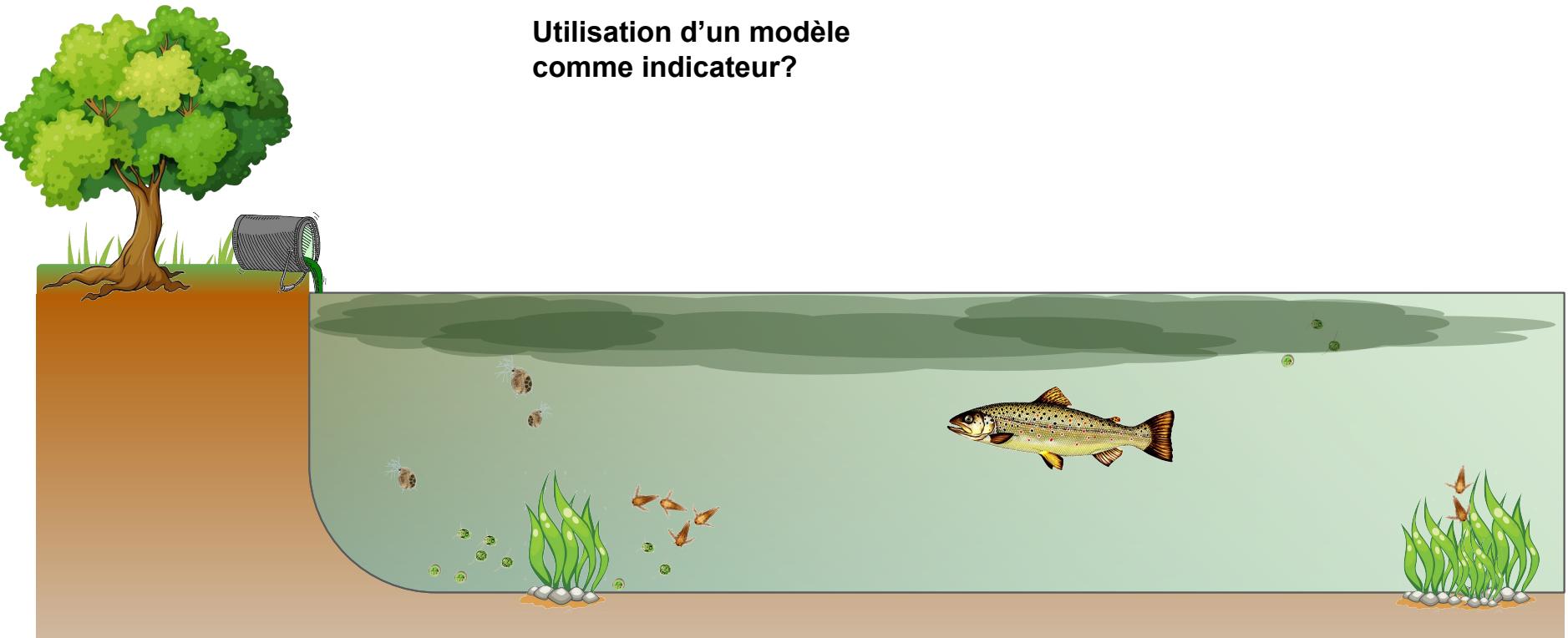
Modèles  
*in vivo*

Toxicité sur le milieu

## Utilisation d'un modèle comme indicateur?

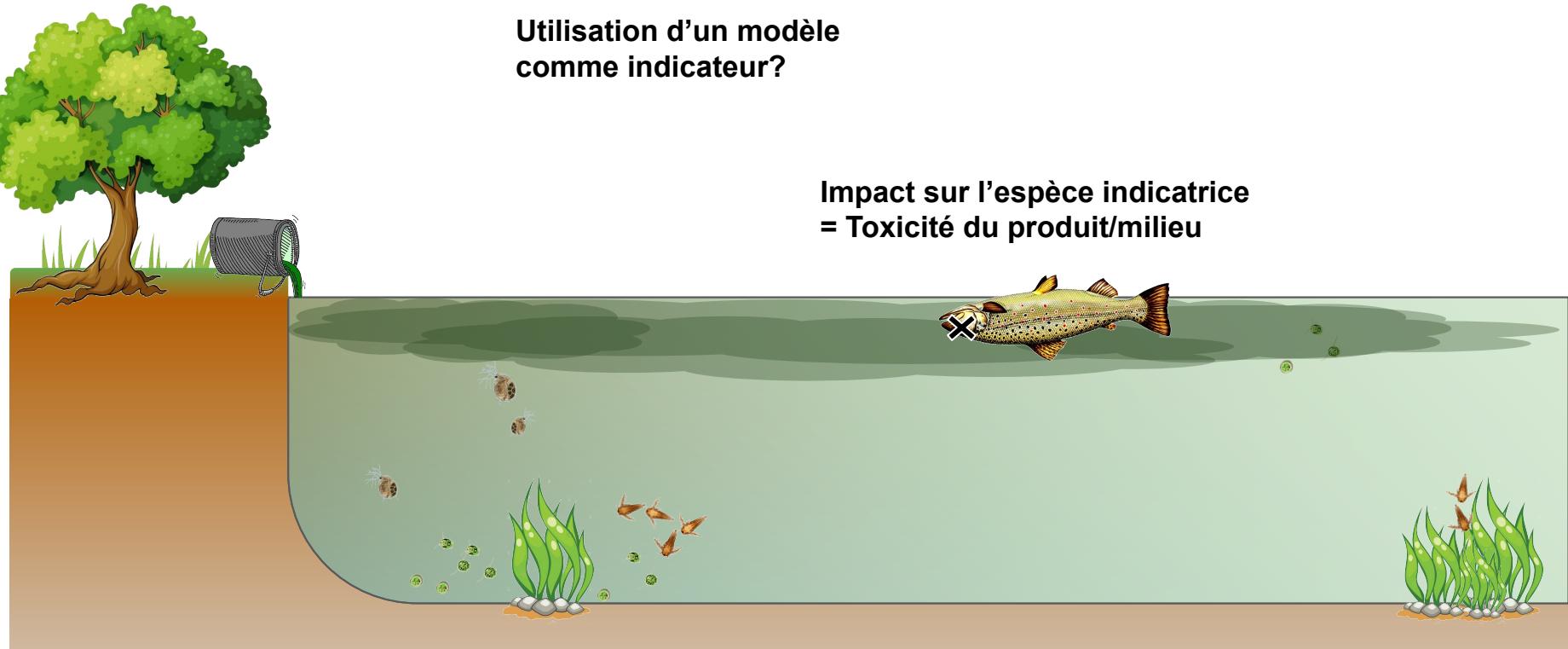


### Utilisation d'un modèle comme indicateur?



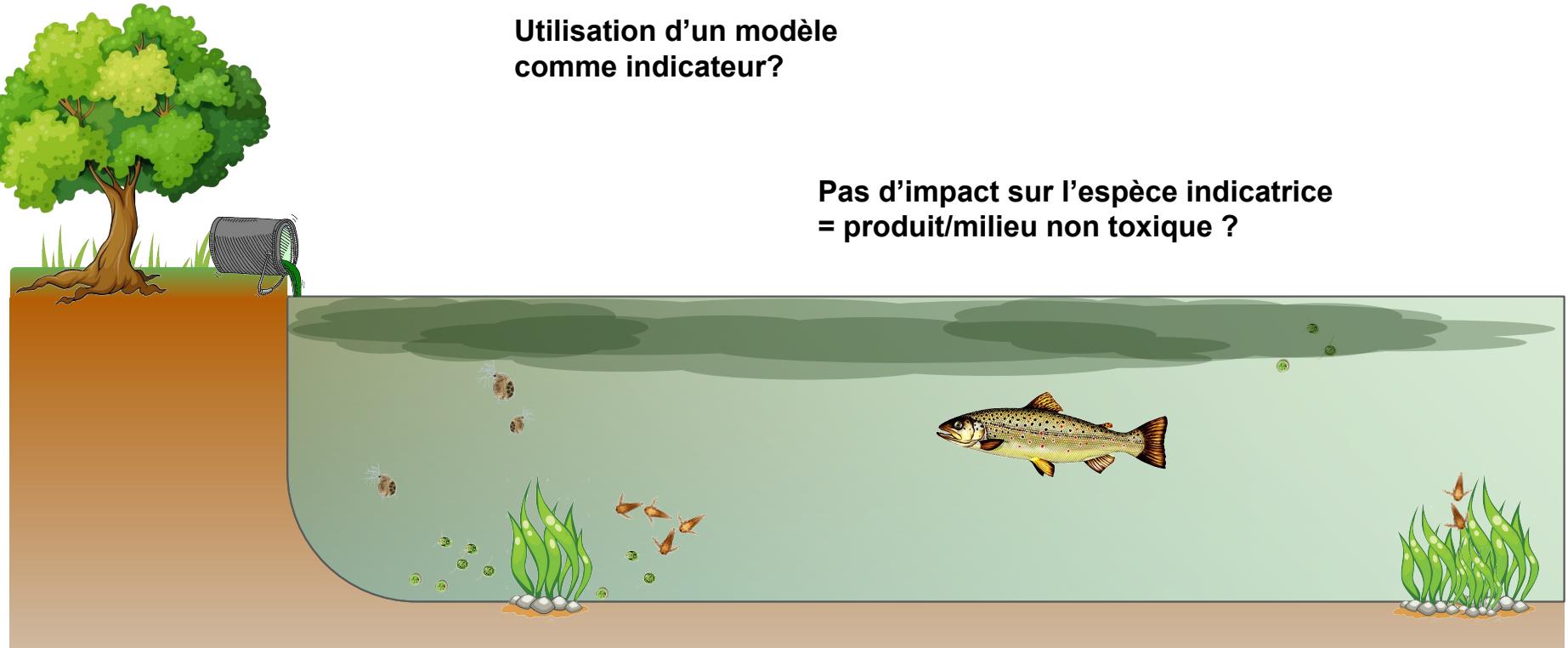
**Utilisation d'un modèle  
comme indicateur?**

**Impact sur l'espèce indicatrice  
= Toxicité du produit/milieu**



**Utilisation d'un modèle  
comme indicateur?**

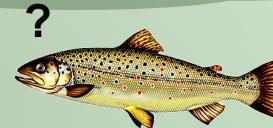
**Pas d'impact sur l'espèce indicatrice  
= produit/milieu non toxique ?**



## Utilisation d'un modèle comme indicateur?

Pas d'impact sur l'espèce indicatrice  
~~= produit/milieu non toxique ?~~

Impact sur des espèces plus sensibles



Déséquilibre des écosystèmes





# Introduction

# Occurrence & degradation

# Ecotoxicological assessment

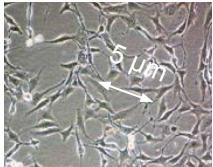
# Conclusion

Modèles  
*in vitro*

Modèles  
*in vivo*

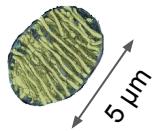
Quels organismes et bioessais ?  
Which organisms and bioassays ?

## Lignée cellulaire



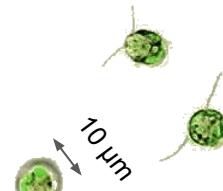
(neurones) (foie) (reins)  
SH-SY5Y Hep-G2 HEK 296

## Mitochondrie



Mitochondrie de foie

## Algues vertes



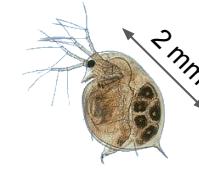
*Chlamydomonas* sp.

## Artémie



*Artemia salina*

## Daphnie



*Daphnia magna*

## Poisson zèbre



*Danio rerio*

Cytotoxicité  
24h 48h 72h 96h

Inhibition des complexes I et II

Mortalité/croissance

Mortalité  
24h

Mortalité  
24h 48h

Mortalité

Mobilité / Perte flagelle

Mobilité / test de stress

Mobilité / test de stress

Déformations

Déformations

Cardiotoxicité

Cardiotoxicité

Eclosion

Protéomique

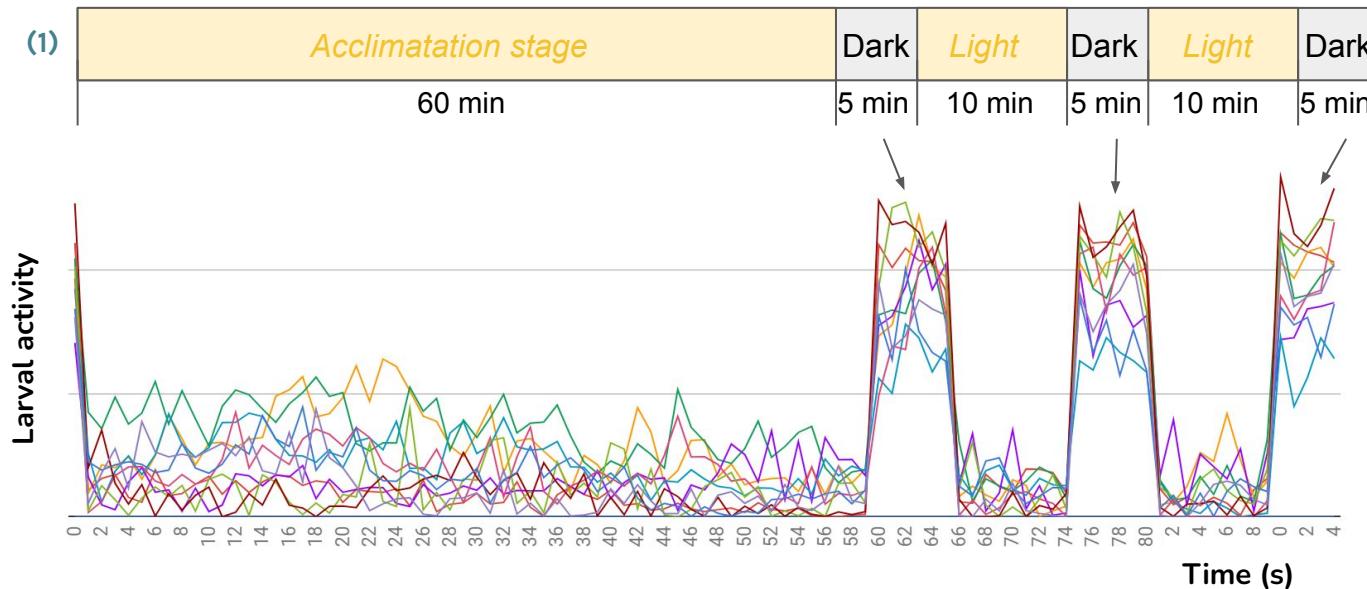
Protéomique

Génomique

## Test de transition lumière/obscurité

Dark/light transition test

- Zebrabox : Chambre d'analyse automatisée pour la quantification de l'activité locomotrice des larves de poisson zèbre  
*Zebrabox : Automated analysis chamber for the quantification of the locomotor activity of zebrafish larvae*

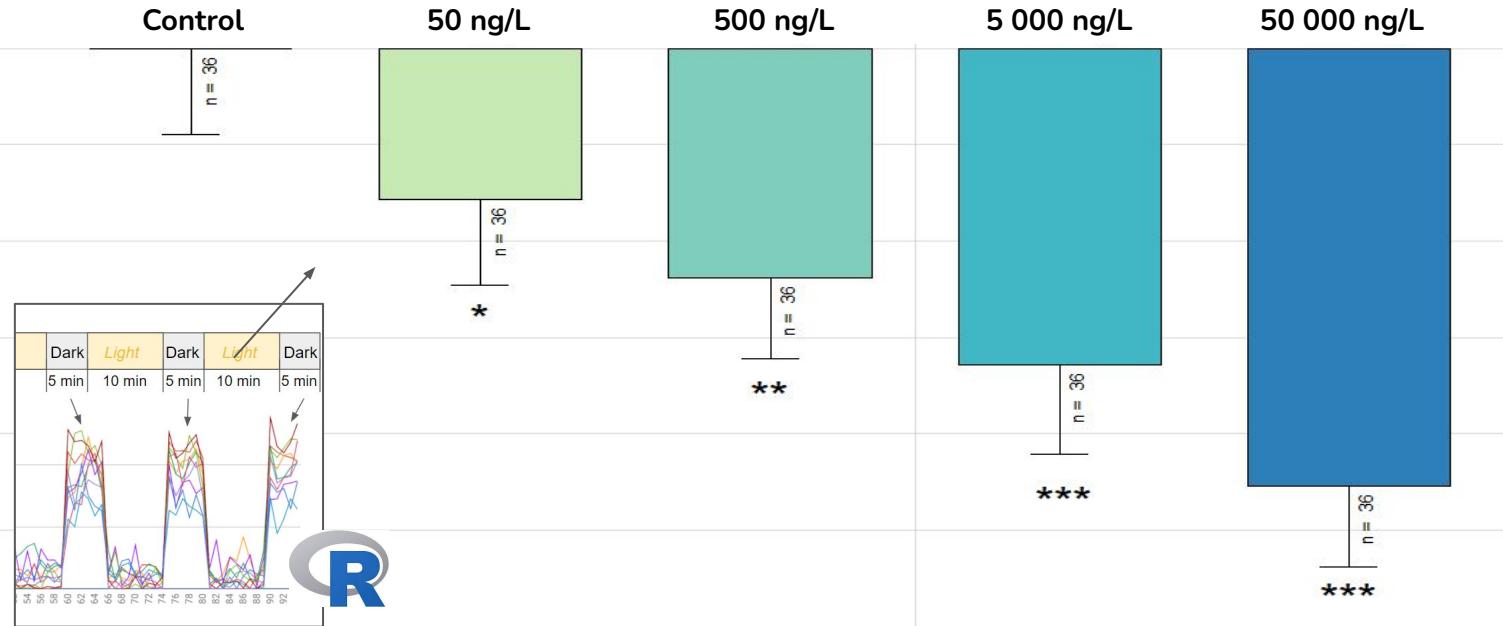


## Test de stress (lumière/obscurité) aux concentrations environnementales de furosémide

Dark/light transition test at environmental concentrations of furosemide

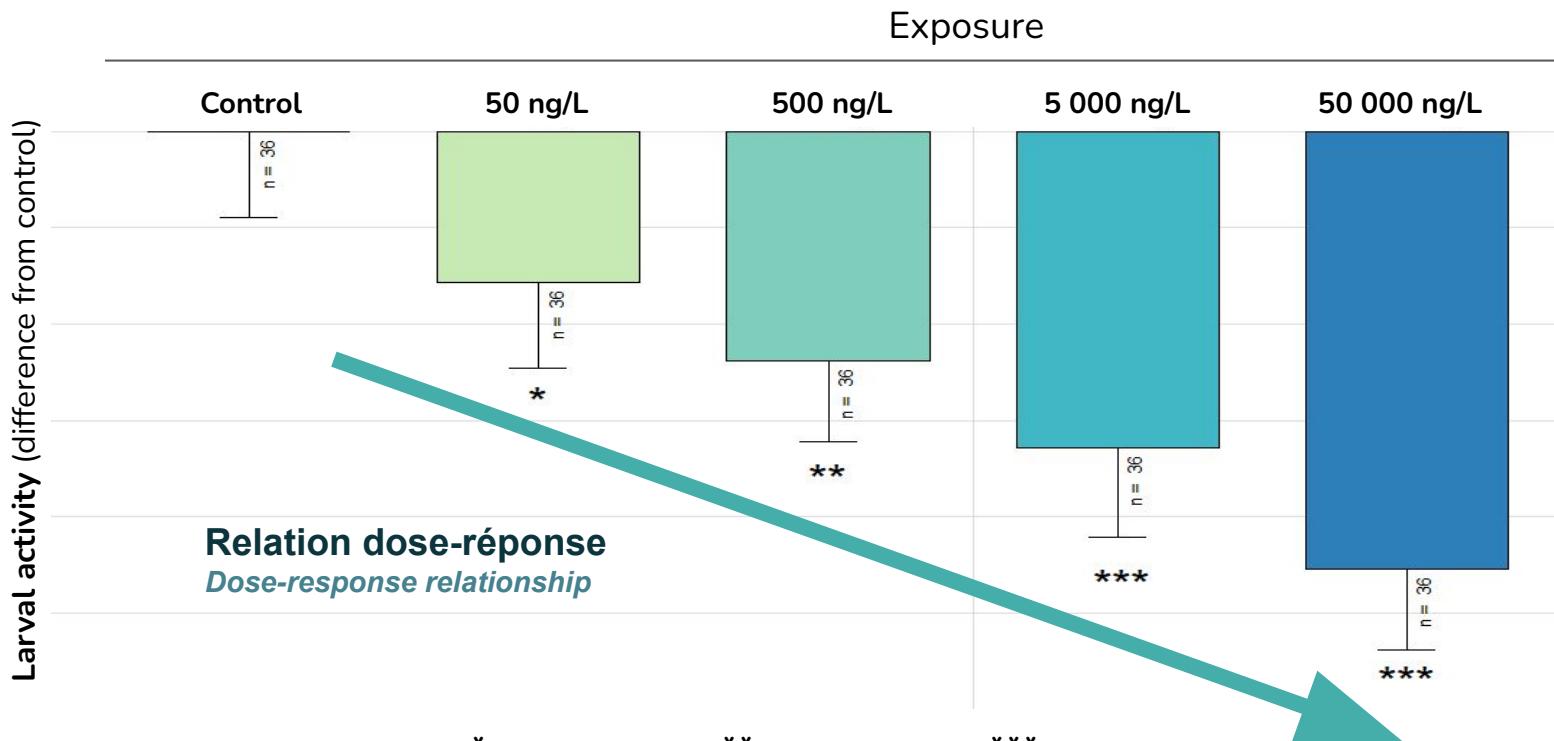
## Exposure

Larval activity (difference from control)



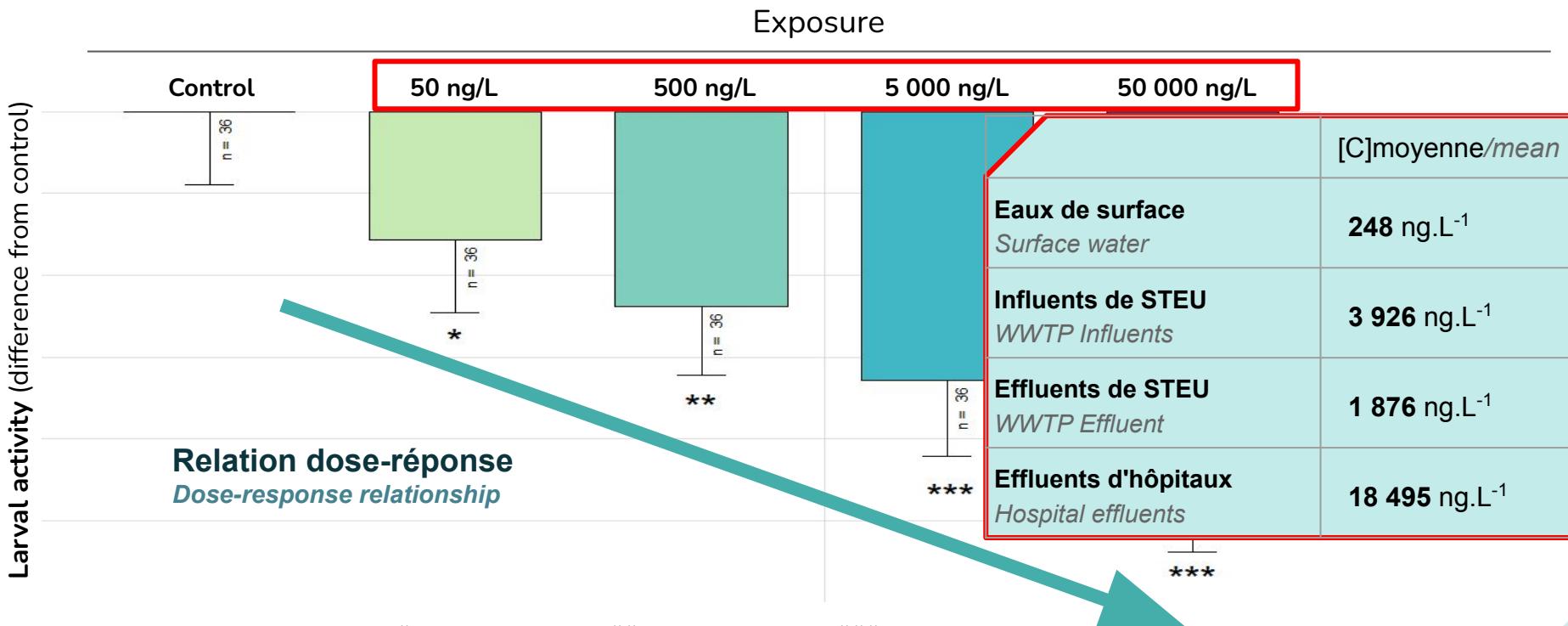
Significant difference from control : \* (p-value&lt;0.05) \*\* (p-value&lt;0.01) \*\*\* (p-value&lt;0.001)

## Test de stress (lumière/obscurité) aux concentrations environnementales de furosémide

*Dark/light transition test at environmental concentrations of furosemide*

## Test de stress (lumière/obscurité) aux concentrations environnementales de furosémide

Dark/light transition test at environmental concentrations of furosemide

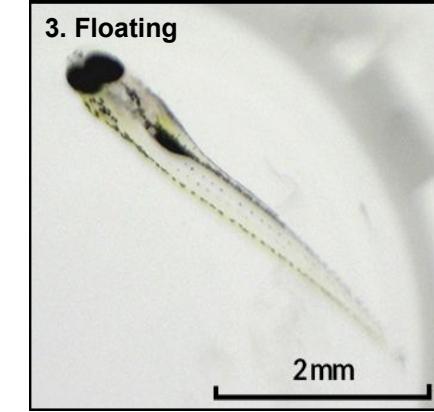


# Introduction

# Occurrence & degradation

# Ecotoxicological assessment

# Conclusion



# Introduction

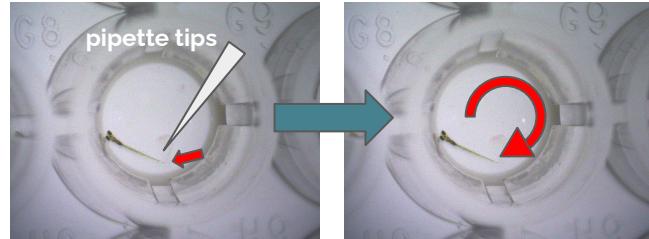
# Occurrence & degradation

# Ecotoxicological assessment

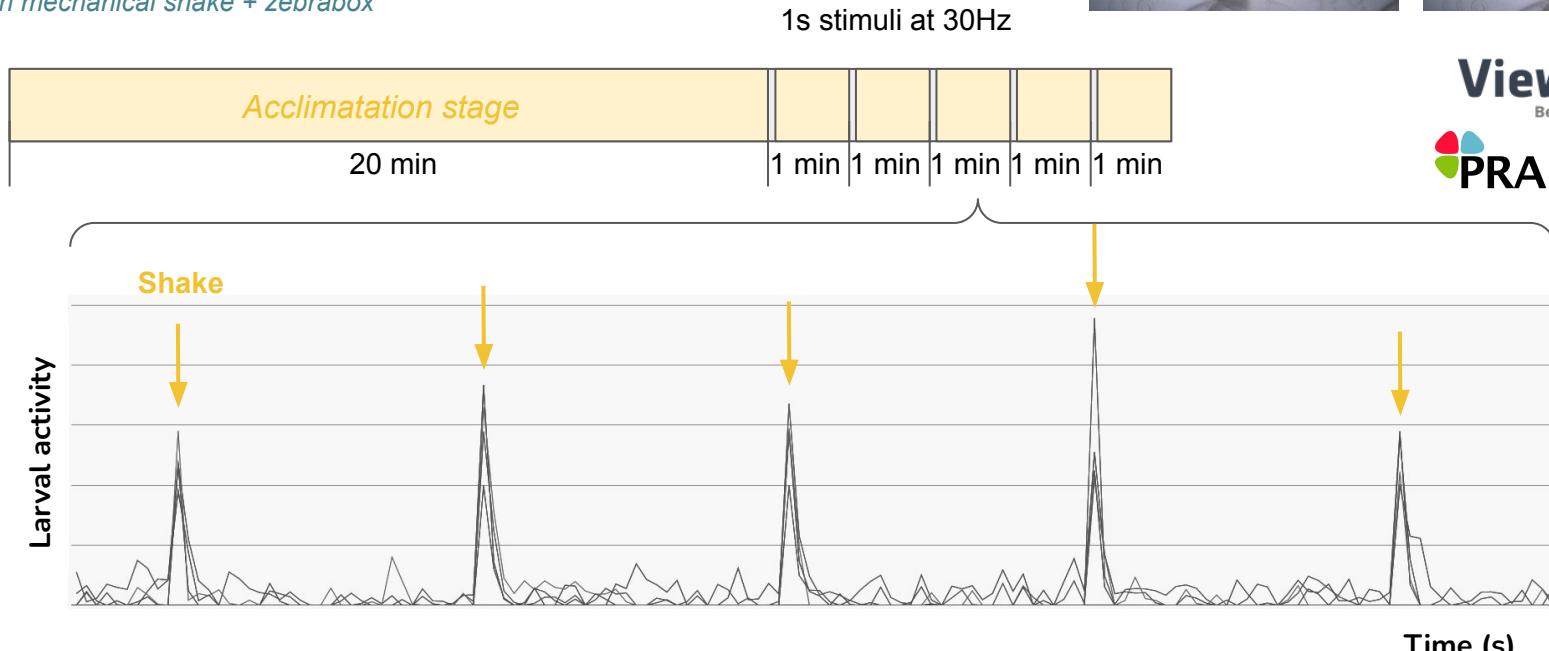
# Conclusion

- Par contact manuel  
*Escape test with manual contact*
- Par secousse mécanique + zebrabox  
*With mechanical shake + zebrabox*

Test de fuite  
*Escape test*



1s stimuli at 30Hz



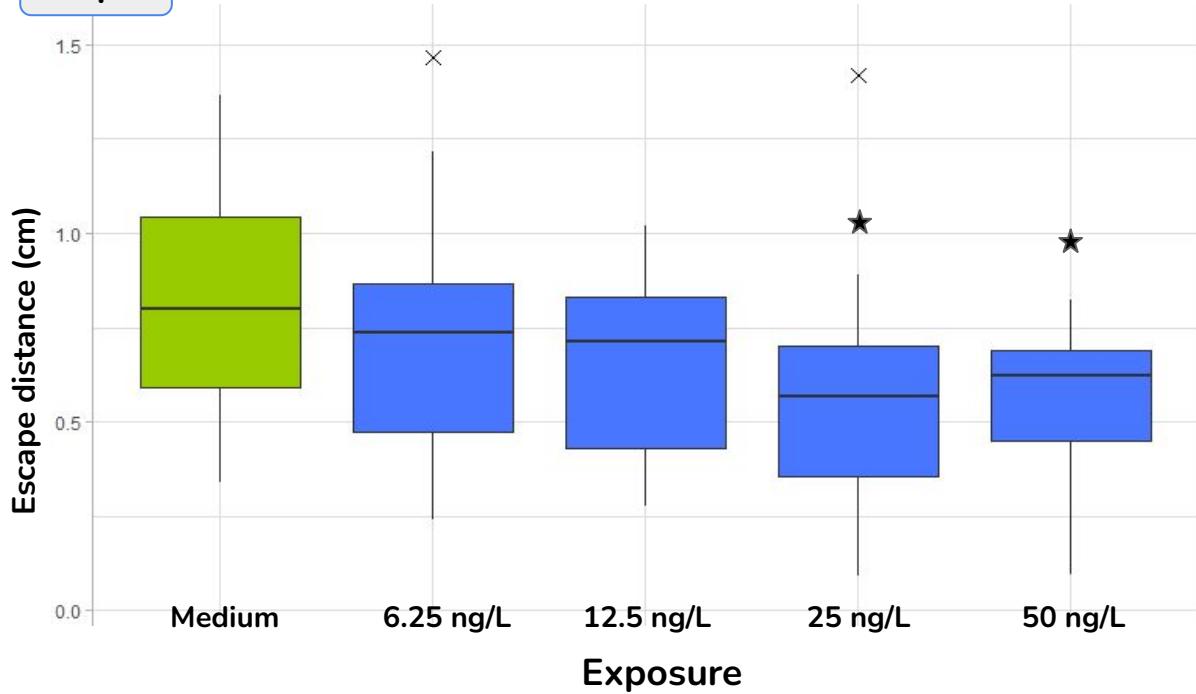
**ViewPoint**  
Behavior Technology

**PRAMMICS**

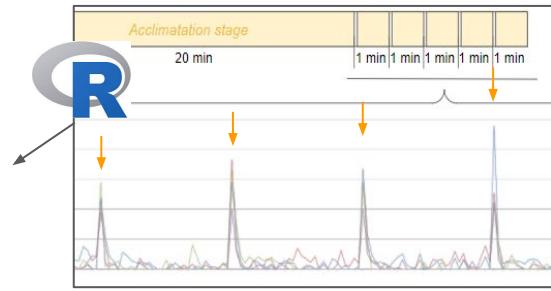
## Test de fuite à de faibles concentrations de Pyridinium du furosémide (50 ng/L à 6,25 ng/L)

Escape test at low concentrations of PoF (50 ng/L to 6,25 ng/L)

6 dpf



Significant difference from control : \* (p-value&lt;0.05) \*\* (p-value&lt;0.01) \*\*\* (p-value&lt;0.001)

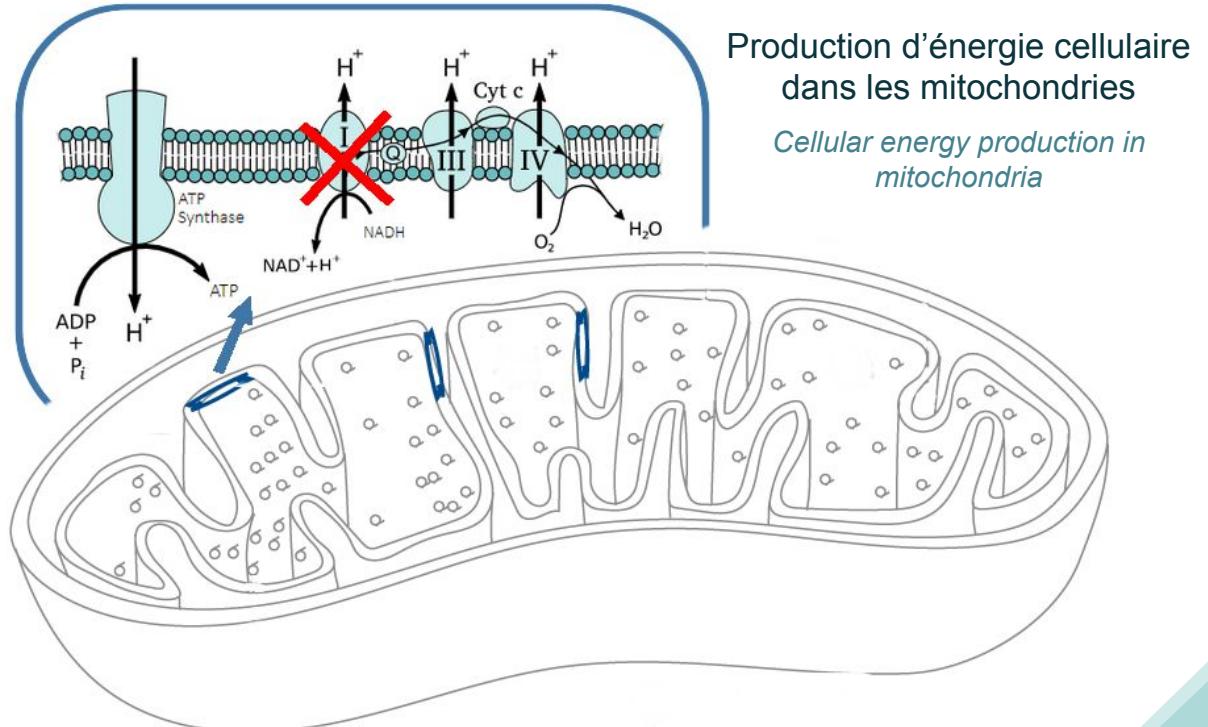


## Évaluation de l'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale

*Evaluation of the inhibition of the mitochondrial respiratory chain*

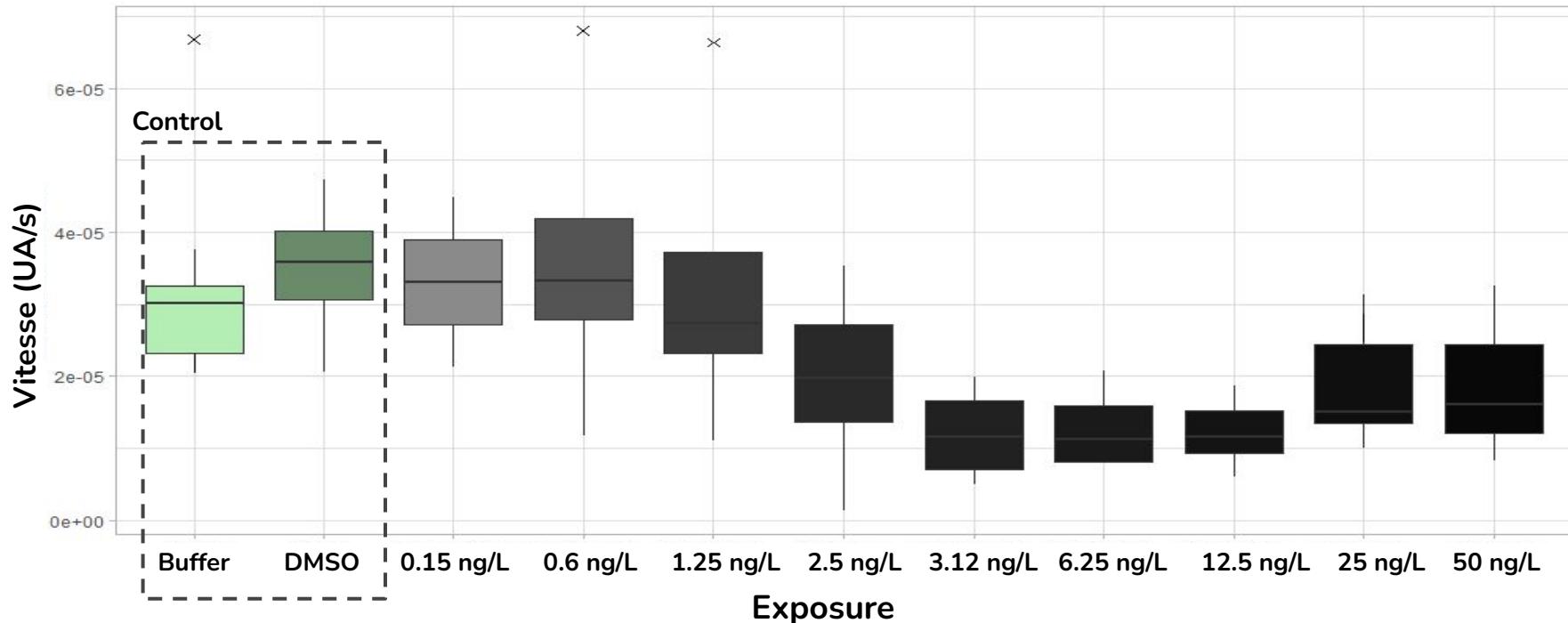
- Test d'inhibition du complexe I avec un spectromètre UV-Visible<sup>1</sup>

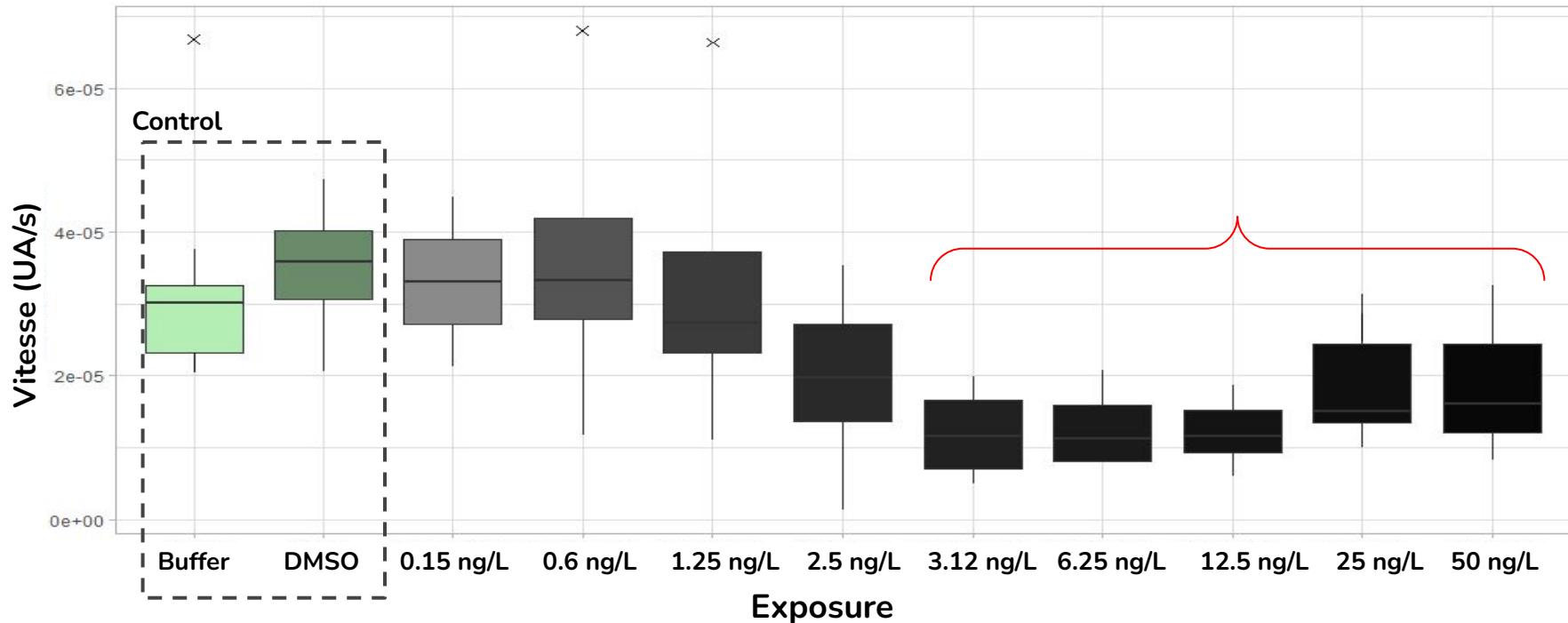
*Complex I inhibition test with a UV-Visible spectrometer*



Production d'énergie cellulaire dans les mitochondries

*Cellular energy production in mitochondria*

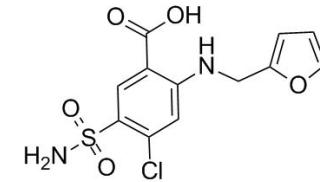
Inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I) par le **Pyridinium du furosémide***Inhibition of the mitochondrial respiratory chain (complex I)*

Inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I) par le **Pyridinium du furosémide***Inhibition of the mitochondrial respiratory chain (complex I)*

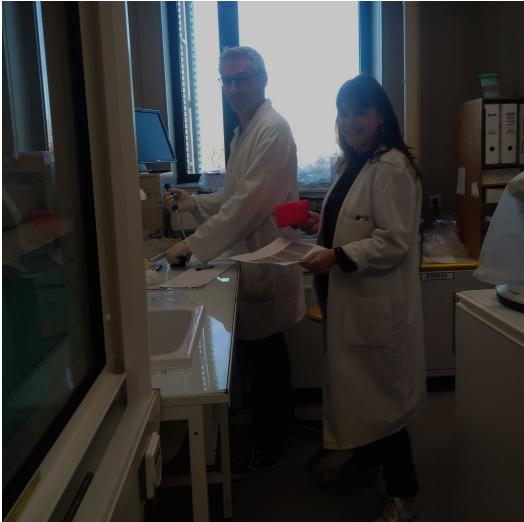
## Messages clés

Key messages

- Le Furosémide est un modèle prometteur pour l'étude des composés pharmaceutiques et des produits de dégradation dans l'eau
- La présence de produits de dégradation du furosémide est avérée et ces derniers ont un impact sur certains organismes à des concentrations environnementales
- Une étude écotoxicologique permet de mieux caractériser le milieu en complétant les analyses chimiques



# Remerciements



Laure GARRIGUE-ANTAR  
Christophe MORIN



This work is supported by the OPUR 5 program  
(phase 5: 2019-2023) piloted by Leesu

The Zebrabox® and Acquity Ultraperformance LC system were financed by the Prammics platform  
(OSU-Efluve)

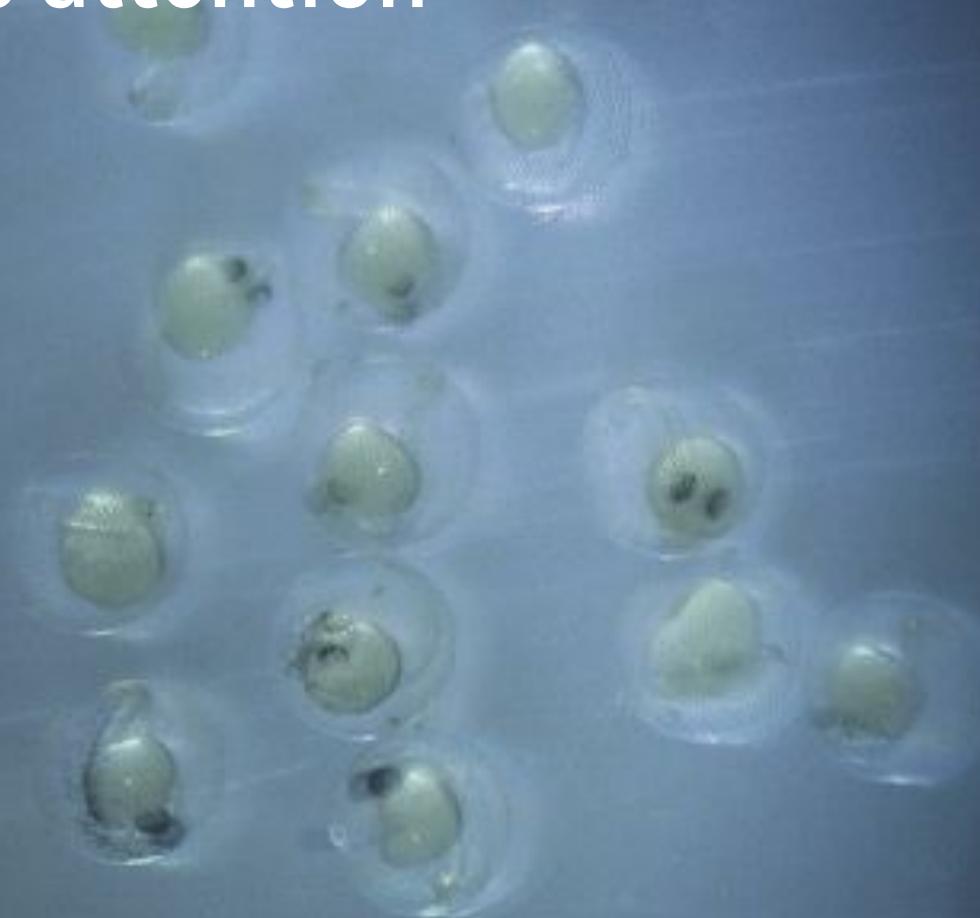
Thanks to Michael Rivard for the synthesis of the PoF and Isabelle Lachaise for PoF analysis (ICMPE).

Thanks to Julien Le Roux, Nina Huynh, Emilie Caupos and Régis Moilleron for their implication and expertise

*Fidji SANDRE benefits from a ministerial thesis grant*

# Merci pour votre attention

Thank you for your attention



# Bibliographie



- Andreasen, F., C. Kjeldahl Christensen, F. Kjaer Jakobsen, et C. E. Mogensen. 2009. « The Use of HPLC to Elucidate the Metabolism and Urinary Excretion of Furosemide and Its Metabolic Products ». *Acta Pharmacologica et Toxicologica* 49 (3): 223-29. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1981.tb00897.x>.
- Cormier, A., C. Morin, R. Zini, J.P. Tillement, G. Lagrue, « Nicotine protects rat brain mitochondria against experimental injuries », *Neuropharmacology* 44 (5) (2003) 642–652.
- Leroy, Michael Rivard, Nihal Oturan, Mehmet Oturan, et Didier Buisson. 2016. « Microbial Biotransformation of Furosemide for Environmental Risk Assessment: Identification of Metabolites and Toxicological Evaluation ». *Environmental Science and Pollution Research* 23 (22): 22691-700. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7398-2>.
- Laurencé, Céline, Michael Rivard, Isabelle Lachaise, Julia Bensemhoun, et Thierry Martens. 2011. « Preparative Access to Transformation Products (TPs) of Furosemide: A Versatile Application of Anodic Oxidation ». *Tetrahedron* 67 (49): 9518-21. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2011.10.006>.
- Laurencé, Céline, Michael Rivard, Thierry Martens, Christophe Morin, Didier Buisson, Sophie Bourcier, Michel Sablier, et Mehmet A. Oturan. 2014. « Anticipating the Fate and Impact of Organic Environmental Contaminants: A New Approach Applied to the Pharmaceutical Furosemide ». *Chemosphere* 113 (octobre): 193-99. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.05.036>.
- Laurencé, Céline, Narimane Zeghbib, Michael Rivard, Sonia Lehri-Boufala, Isabelle Lachaise, Caroline Barau, Philippe Le Corvoisier, Thierry Martens, Laure Garrigue-Antar, et Christophe Morin. 2019. « A New Human Pyridinium Metabolite of Furosemide, Inhibitor of Mitochondrial Complex I, Is a Candidate Inducer of Neurodegeneration ». *Biochemical Pharmacology* 160 (février): 14-23. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.12.007>.
- Olvera-Vargas, Hugo, Sébastien Leroy, Michael Rivard, Nihal Oturan, Mehmet Oturan, et Didier Buisson. 2016. « Microbial Biotransformation of Furosemide for Environmental Risk Assessment: Identification of Metabolites and Toxicological Evaluation ». *Environmental Science and Pollution Research* 23 (22): 22691-700. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7398-2>.
- Peng, Peng, Xiaolan, Jia Lin, Yingdong Zhu, Xiuyun Liu, Yinglan Zhang, Yongxia Ji, Xue Yang, Yan Zhang, Ning Guo, et Qiang Li. 2016. « Anxiety-Related Behavioral Responses of Pentylenetetrazole-Treated Zebrafish Larvae to Light-Dark Transitions ». *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 145 (juin): 55-65. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.03.010>.
- Stokes Wilfred, C.A. Nunn, 1964. « A New Effective Diuretic -Lasix ». *British Medical Journal*, 2, (4) 910-914