Approche bio-analytique pour le diagnostic de la qualité chimique et l'identification de perturbateurs endocriniens (PE) dans les systèmes aquatiques

Selim Aït-Aïssa et Nicolas Creusot

Unité d'écotoxicologie in vitro et in vivo

INERIS

ONEMA

INERIS

Contexte général

➢ Contamination des milieux aquatiques

- **Evaluation du risque → Réglementation**

  DCE (2000) : Milieu récepteur → « Bon état » d'ici 2015

  REACH (2006) : Traitement à la « source » (enregistrement …)

➢ Directive cadre sur l'eau / État chimique

- **Substances prioritaires et/ou dangereuses : 33 + 8 (NQE)**

  Image partielle (nombre limité, effet de mélange …)

  Peu informatif sur certaines familles (e.g. perturbateurs endocriniens)

- **Enjeu de gestion → réduction pollution et ses impacts (SDAGE)**

  Sources et devenir de polluants ?

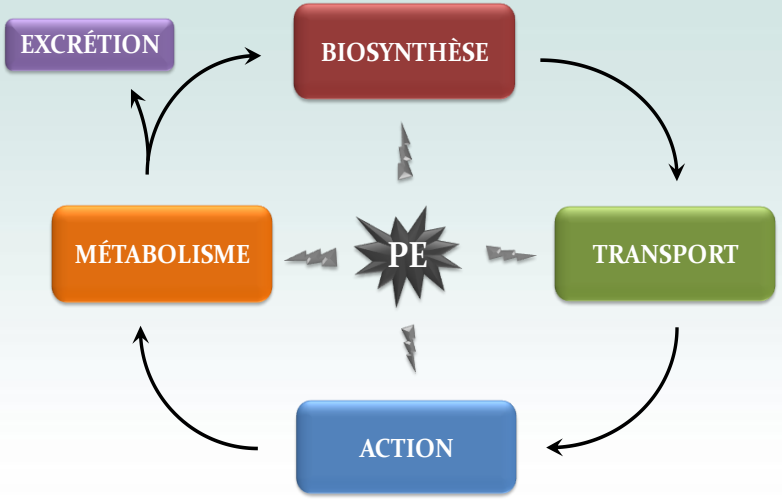
  Comment intégrer diversité des polluants → Quelles substances ?

  Quelle stratégie pour les surveiller et les identifier ? → Coût ?

  Comment faire le lien avec les effets biologiques et l'état écologique ?

  Quels seuils/risque ?

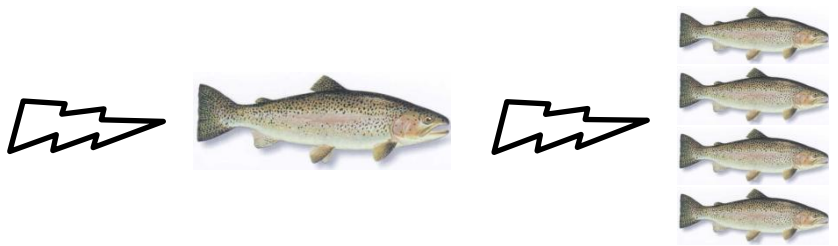
Contamination des milieux aquatiques par les PE



Diversité classes chimiques et origines

Multiples modes d'action

Milieu aquatique



Effets individuels et/ou populationnels

→ reproduction, développement, homéostasie
(e.g. féminisation, extinction)

Contamination des milieux aquatiques par les PE

Milieu aquatique

PE

Mélange complexe, faibles doses
Structure et activités variées

L'évaluation de la contamination par les PE reste un enjeu de recherche important…

Développement de stratégie

→ Niveaux de contamination ? Identité ? Effets biologiques *in situ ?*

Contamination des milieux aquatiques par les PE

Milieu aquatique

PE

Mélange complexe, faibles doses
Structure et activités variées

CONTAMINATION ?

Approche chimique

(+) Sensible et sélective
(-) Coûteuse en temps et argent
(-) Ciblées vers composé actifs connus
(-) Substance individuelle

Contamination des milieux aquatiques par les PE

Milieu aquatique

PE

Mélange complexe, faibles doses
Structure et activités variées

CONTAMINATION ?

Approche biologique

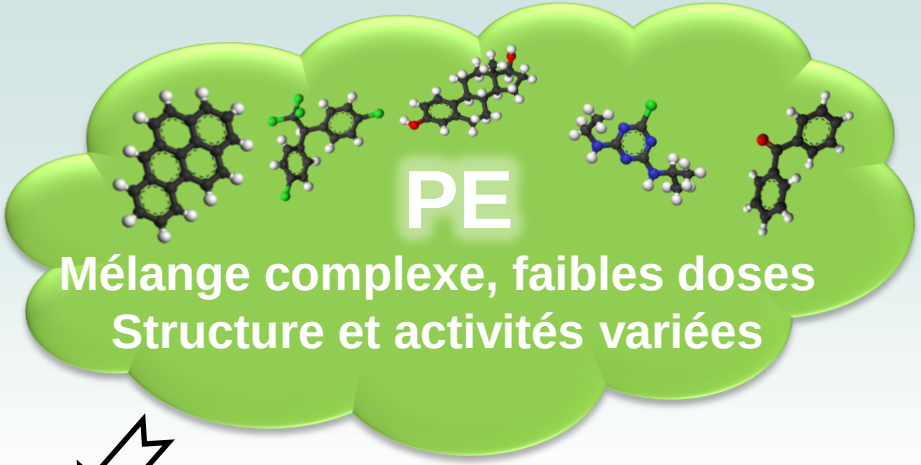
(+) Sensible et quantitatif
(+) Spécifique d'un mode d'action
(+) Intégratif - Ensemble des composés actifs (effet de mélange)
(-) identité des composés ?

Bio-essais

Approche Bio-Analytique

Contamination des milieux aquatiques par les PE

Milieu aquatique

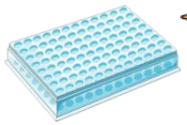


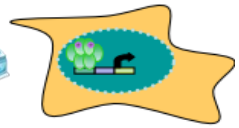
CONTAMINATION ?

Approche chimique

Approche biologique

Bio-essais





Approche Bio-Analytique

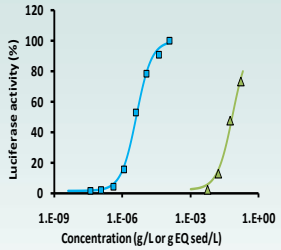
Approche bio-analytique (EDA- *effect directed analysis*)

Milieu aquatique

1

Échantillonnage + Traitement de l'échantillon

Bioessais



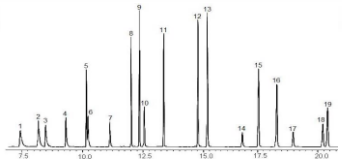
Profilage toxicologique
(quantification bio. Bio-TEQ)

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

Identité des polluants actifs ?

2

Analyses chimiques ciblées



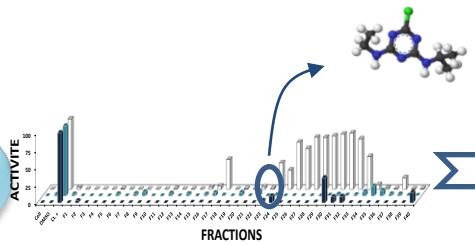
Quantification chimique
(Chem-TEQ)

Contribution des polluants actifs connus

Si polluants recherchés faiblement explicatifs

3

Fractionnement dirigé par les bioessais



Analyses non ciblées
(HR-MS)

Identification de polluants inconnus

Domaines d'applications

➢ *Pollution du milieu naturel*

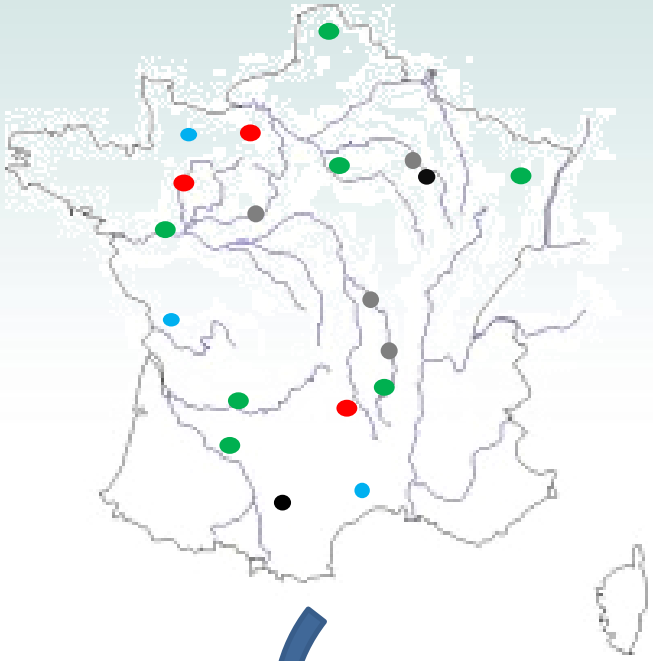
- ✓ *Source et devenir de la contamination*
- ✓ *Identification de sites fortement contaminés*
- ✓ *Identification de nouveaux polluants*

➢ *Traitement de l'eau*

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

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

Exemple 1 : Etude prospective 2012
Criblage de sites



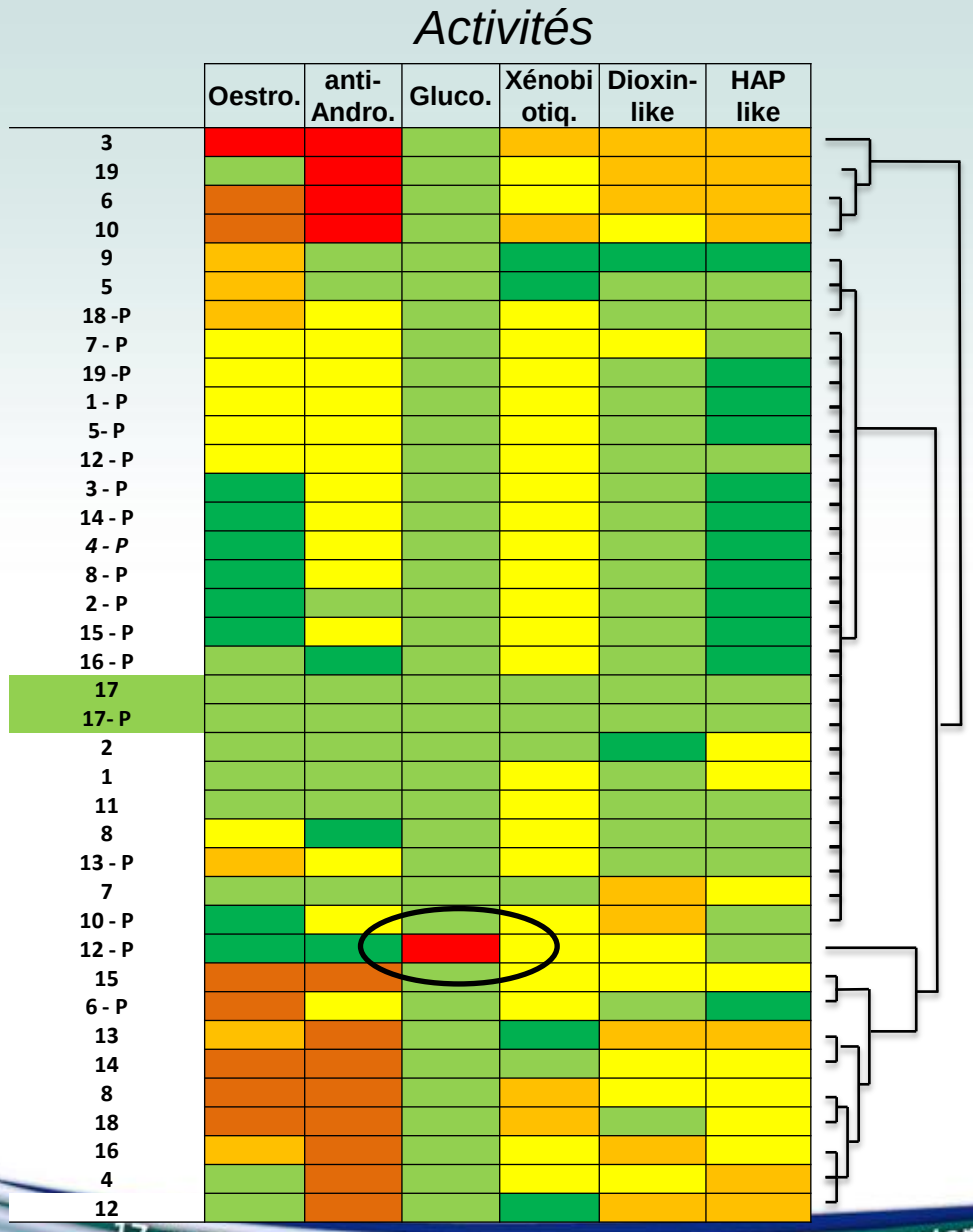
19 sites de surveillance (agence) sur l'ensemble des districts hydrographiques métropolitains *(Présentation Botta et al.)*

Pressions :
- Agricole
- Urbaine
- Industrielle
- Référence
- Mauvais état écologique

Sédiment
+
Eau de surface (POCIS)

Criblage in vitro haut débit (automate)

Profil toxicologique et « priorisation » de sites



Profilage toxicologique (Bio-TEQ)

Hiérarchisation des sites (site de référence = 17)

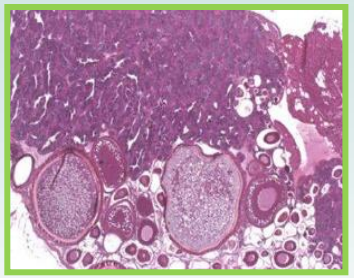
Identification de sites fortement contaminés

site /site réf.

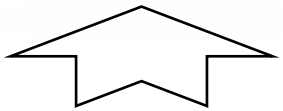
> 500
100-500
10-100
1-10
1
<1

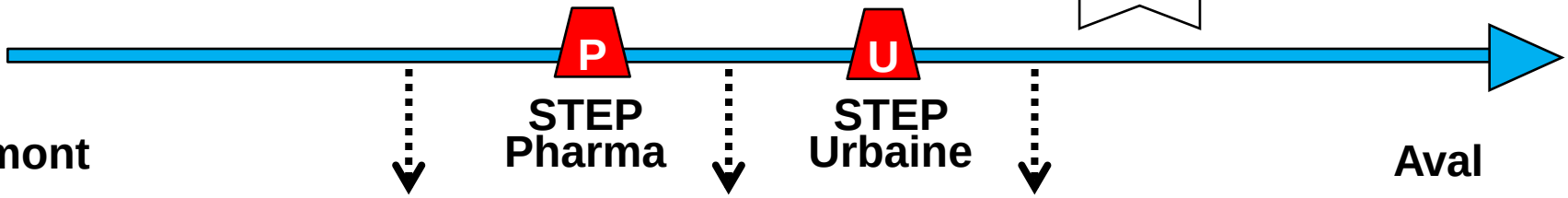
Exemple 2 : Approche EDA complète

Hypertrophie gonades
+
Incapacité de ponte



Intersexualité + VTG
(Sanchez et al. 2011)





Quels composés sont responsables de ces impacts ?

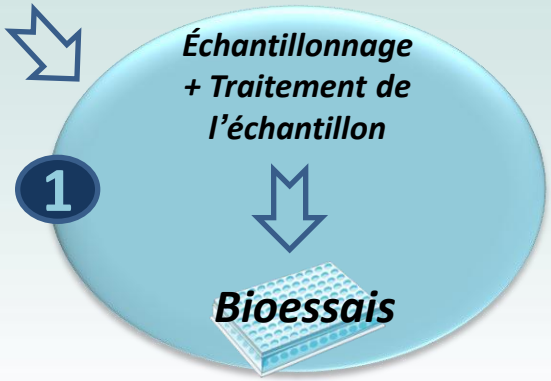
Sédiment

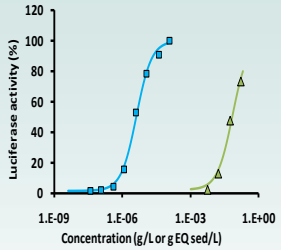
EDA

EDAIS

Approche bio-analytique (EDA- *effect directed analysis*)

Milieu aquatique





Profilage toxicologique
**(quantification bio.
Bio-TEQ)**

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

Profil toxicologique

		Activités					
		ER E_2-EQ	PR R5020-EQ	GR Dex-EQ	Anti-MR Spiro-EQ	PAH-like BaP-EQ	PXR SR-EQ
SEDIMENT (ng/g of d.w sed)	Amont	0.05	n.e	b.d.l.	n.e	3 495	b.d.l.
	Entre	0.05	n.e	b.d.l.	n.e	4 450	b.d.l.
	Aval	0.1	n.e	b.d.l.	n.e	4 303	b.d.l.
POCIS (µg/g of HLB)	Amont	0.001	b.d.l.	b.d.l.	b.d.l.	1.1	34.3
	Entre	0.003	0.4	91.5	62.4	2.6	57.6
	Aval	0.001	0.2	100.4	55.2	0.8	146.9

Profil mixte : xénobiotiques + stéroïdes

→ Composés pharmaceutiques ?

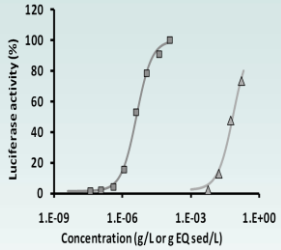
Approche bio-analytique (EDA- *effect directed analysis*)

Milieu aquatique

Échantillonnage + Traitement de l'échantillon

1

Bioessais

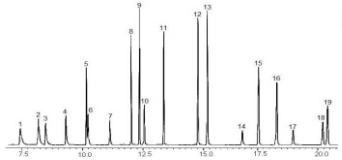


Profilage toxicologique
(Bio-TEQ)

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

Identité des polluants actifs ?

2 ***Analyses chimiques ciblées***



Quantification chimique
(Chem-TEQ)

Contribution des polluants actifs connus

Contribution de polluants actifs connus ?

113 composés ciblés

58 détectés

14 STEROÏDES

Ex : Dexamethasone
6-methyl-prednisolone
Prednisolone
Prednisone
Spironolactone
Canrenone
Levonogestrel
Progesterone
Pregnenolone
Testosterone
Androstenedione

47 ANTIBIOTIQUES

Ex : Erythromycin
Roxithromycin
Clarithromycin

E1, E2 & EE2 non détectés

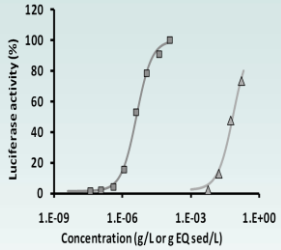
Activités partiellement expliquées

Approche bio-analytique (EDA- *effect directed analysis*)

Milieu aquatique

1 *Échantillonnage + Traitement de l'échantillon*

Bioessais

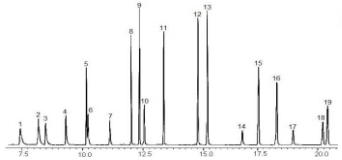


Profilage toxicologique
(Bio-TEQ)

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

Identité des polluants actifs ?

2 *Analyses chimiques ciblées*

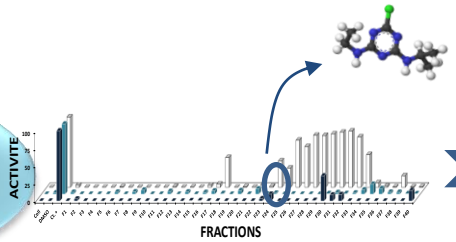


Quantification chimique
(Chem-TEQ)

Contribution des polluants actifs connus

Si polluants recherchés faiblement explicatifs

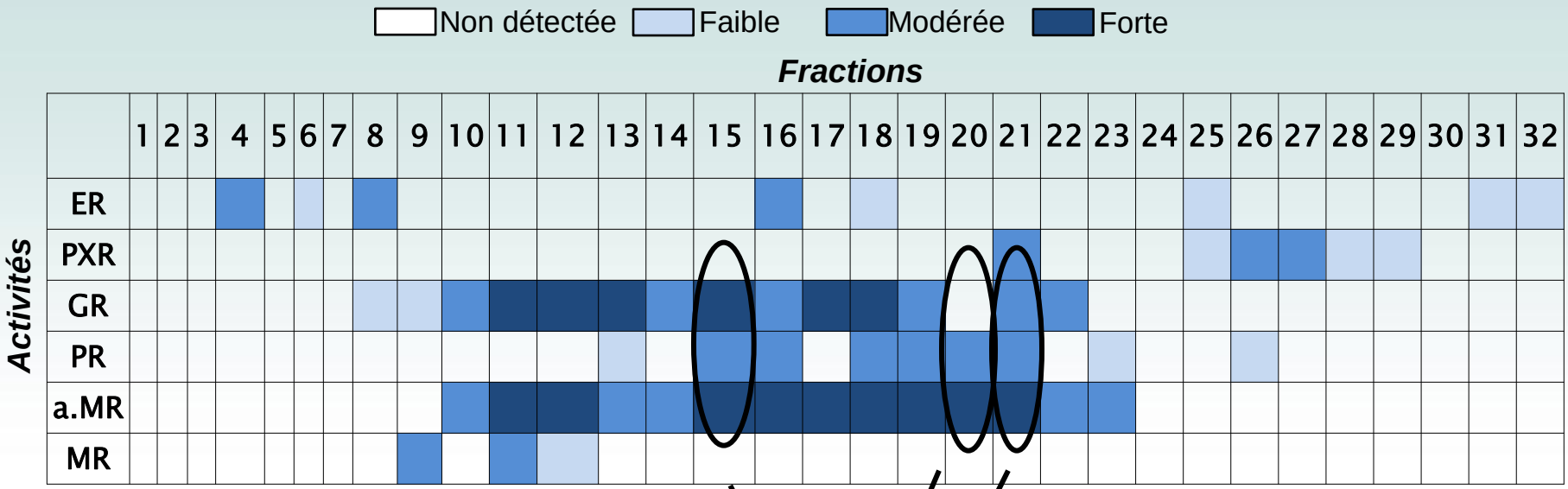
3 ***Fractionnement dirigé par les bioessais***

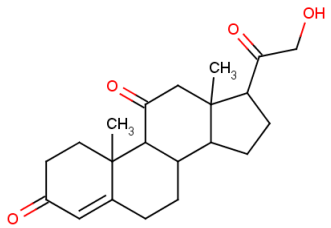


Analyses non ciblées

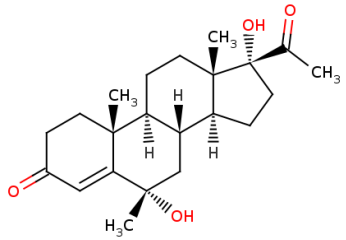
Identification de polluants inconnus

Isolement et identification de composés actifs

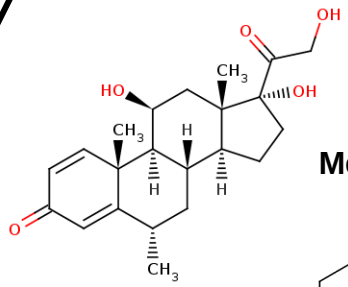




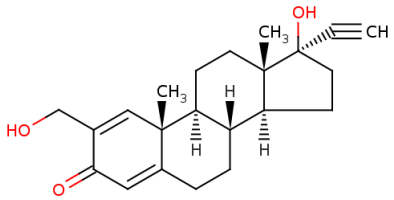
11-Dehydrocorticosterone



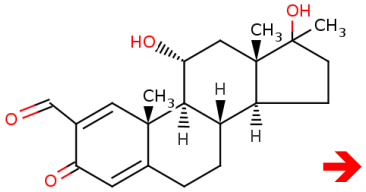
Pregn-4-ene-3,20-dione, 6a,17-dihydroxy-6-methyl-



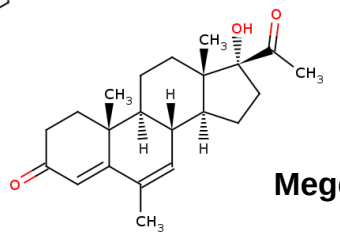
Methyl-prednisolone



D1-2-Hydroxymethylethisterone



Formyldienolone



Megestrol

➔ **Identification de nouveaux polluants non ciblés !**

Réponses aux enjeux

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

Perspectives

➢ Amélioration de l'approche

- ✓ **Intégration de nouvelles cibles biologiques**
  e.g. PR → Progestagènes (ANR-PROOF)
- ✓ **Bioessais *in vitro* et *in vivo* basés sur le poisson zèbre**
  (FP7-EDA-EMERGE)
- ✓ **Application différents contextes**
  e.g. Traitement tertiaire (ANR-ECHIBIOTEB),
  Boue de STEP (convention ADEME-Syprea)

➢ Validation pour la surveillance et le diagnostic environnemental

- ✓ **Standardisation des outils**
  AQUAREF 2013-2015, EIL européen (en cours)
- ✓ **Application nationale** (suite étude prospective 2012)
- ✓ **Application européenne**
  European demonstration program (FP7-EDA-EMERGE)
  Joint Danube Survey 3 (FP7-SOLUTIONS)
- ✓ **Groupes d'experts EDA + bioessais** (NORMAN)

Remerciements

INERIS

ONEMA
Office national de l'eau
et des milieux aquatiques

LPTC
EPOC

Hélène Budzinski (CNRS EPOC-LPTC)

Inserm
Institut national
de la santé et de la recherche médicale

Patrick Balaguer (U896)

Merci de votre attention !

selim.ait-aissa@ineris.fr
nicolas.creusot@ineris.fr