



Actions R&D menées dans le cadre des partenariats de l'OFB en lien avec la problématique des perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques

Depuis 2008, l'OFB (Onema) apporte son soutien à des opérateurs de la recherche finalisée travaillant sur la problématique de la contamination de l'eau et des milieux aquatiques par des substances chimiques ayant des propriétés de perturbation endocrinienne (PE). Les projets issus de ces partenariats s'inscrivent, d'une part, dans le contexte de la mise en œuvre de la DCE, dans une démarche d'amélioration des méthodes et critères utilisés pour l'évaluation de l'état des eaux de surface, mais contribuent également à différents plans et stratégies ministérielles (par ex. actions 29, 34 et 37 du plan micropolluants 2016-2021, axe « Recherche, Valorisation et Surveillance » de la SNPE). Plus précisément, ces projets visent à :

- mieux connaître les perturbateurs endocriniens (avérés ou suspectés) présents dans les différents compartiments de l'environnement aquatique (eau, sédiment, biote), et évaluer leurs niveaux de concentration ;
- développer, valider et éprouver des bioessais, biomarqueurs et autres méthodes bio-analytiques permettant de détecter des activités de type PE dans des matrices environnementales ou des rejets, et d'évaluer un risque lié à la présence de PE dans le milieu pour les communautés aquatiques et l'Homme ;
- évaluer les effets de la combinaison des PE sur la faune sauvage aquatique ;
- contribuer au renforcement de la surveillance environnementale des PE.

Les finalités opérationnelles et un bilan des livrables/résultats de ces actions sont présentés ci-dessous, selon trois axes :

1. Imprégnation des milieux aquatiques à des PE avérés ou suspectés

L'étude prospective 2012 de recherche de contaminants émergents dans les eaux de surface de métropole et des DOM, qui s'intègre dans le cadre du premier plan micropolluants qui prévoit, dans son action 16, la mise à jour des listes de substances devant faire l'objet d'une surveillance « réglementaire », a permis d'acquérir des données originales sur l'occurrence et les niveaux de concentration de certains PE (avérés ou suspectés) dans les eaux de surface de plus de 100 sites présentant des situations contrastées en termes de pressions (type et intensité). Parmi la centaine de substances recherchée dans le cadre de cette étude, figurent les substances prioritaires de la feuille de route pour la transition écologique, (BPA, esters de phthalates, parabènes), mais également des hormones synthétiques et naturelles reconnues pour leur potentiel œstrogénique élevé (éthinyloestradiol, estradiol, estrone). Ces données viennent compléter les données acquises dans le cadre des réseaux de surveillance des agences de l'eau pour des contaminants chimiques déjà réglementés (dans le cadre de la DCE), dont certains perturbateurs endocriniens (PCB, PBDE, dioxines



et furanes, benzo[a]pyrène, anthracène, cadmium, plomb, TBT, DDT et ses métabolites, lindane, endosulfan, atrazine, 2,4-D, etc.).

Dans le cadre de cette étude, des outils biologiques développés par l'INERIS (bioessais *in vitro* et *in vivo*, cf. paragraphe 2) ont été testés sur des échantillons d'eau (extraits de POCIS) et de sédiments, notamment pour en éprouver le caractère opérationnel, mais également pour établir le « profil toxicologique » de ces échantillons (*toxicity profiling*) à partir de la détection de différentes activités biologiques de type PE (activités œstrogénique, androgénique et anti-androgénique, glucocorticoïde). Le criblage des sédiments des sites de l'étude prospective révèle notamment une contamination généralisée des cours d'eau de métropole par des composés chimiques de type PE, avec des niveaux moyens observés généralement comparables à ceux rapportés pour d'autres cours d'eau en Europe.

Des poissons ont également été prélevés sur un sous-ensemble de sites pour la mesure de deux biomarqueurs (i.e. vitellogénine circulante et intersexualité) indiquant les effets sur la santé des organismes d'une exposition à des perturbateurs endocriniens. Les résultats de cette étude préliminaire sont amenés à être complétés par une étude en cours, à plus grande échelle, visant à établir une cartographie nationale de l'intersexualité des poissons des cours d'eau français (cf. paragraphe 3).

Il est à noter également une initiative récente du Ministère de l'Écologie, de l'OFB et des Agences de l'eau pour structurer en 2016 le concept de Réseau de Surveillance chimique Prospective (RSP). Il s'agit d'un sous-ensemble du réseau de sites de surveillance mis en place dans le cadre de la DCE, répartis de façon représentative sur les 6 grands bassins hydrographiques de métropole, et en outre-mer. Sur ces sites seront désormais concentrés des efforts de R&D relatifs à la connaissance des nouveaux polluants et des nouveaux outils de surveillance, prolongeant ainsi de façon optimisée les actions d'acquisition de connaissances de l'Onema et des Agences de l'eau menées ces dernières années dans ce domaine. Cette concentration des actions en mode « réseau » permettra une meilleure coordination des programmations et développements, une stabilisation des processus de financement et de mobilisation des acteurs. Ce dispositif à vocation pérenne favorisera en outre une capitalisation dans le temps des connaissances acquises, et offrira des opportunités de synergie entre les diverses études s'y déroulant.

Principaux livrables, résultats :

Fabrizio Botta et Valeria Dulio (2014). Résultats de l'étude prospective 2012 sur les contaminants émergents dans les eaux de surface continentales de la métropole et des DOM. Rapport Final, DRC-13-136939-12927A, 139 pp.

Selim Aït-Aïssa, François Brion, Nicolas Creusot et Wilfried Sanchez (2014). Etude prospective 2012 : Apports des outils biologiques (bioessais et biomarqueurs) pour le diagnostic de la contamination des milieux aquatiques. Rapport INERIS DRC-14-127339-06620A.

Selim Aït-Aïssa, Nicolas Creusot, et al. (2015). Démarche bio-analytique pour l'identification de polluants émergents dans les milieux aquatiques – Application aux sédiments de l'étude prospective. Rapport INERIS DRC-15-136859-12228A.

2. Développement et validation d'outils biologiques pour la caractérisation d'effets PE

Les méthodes et critères actuellement utilisés pour évaluer l'état chimique ne rendent que partiellement compte du « risque chimique », dû au fait que seule une fraction des contaminants présents dans l'environnement sont recherchés et mesurés (i.e. liste finie de substances prioritaires), et que les effets de la combinaison de ces substances et de leurs produits de dégradation au sein de mélanges ne sont pas pris en compte.

Parallèlement aux approches « classiques » d'évaluation, des outils biologiques innovants ont été développés pour pallier aux limites inhérentes à la chimie analytique. L'utilisation d'outils biologiques basés sur le mécanisme d'action des toxiques peut fournir des informations nouvelles dans l'évaluation de la qualité chimique des milieux aquatiques, tant du point de vue de la connaissance et de la caractérisation des contaminants d'intérêt (éco)toxicologique (par ex. criblage à haut débit d'activités PE dans des échantillons environnementaux à l'aide de bioessais *in vitro*), que de leurs impacts à l'échelle de l'organisme au laboratoire (bioessais *in vivo*), ou dans le milieu naturel (biomarqueurs sur espèces autochtones).

Dans le cas plus particulier des PE œstrogéno-mimétiques, différents outils biologiques *in vitro* sont actuellement disponibles pour répondre aux enjeux de mise en œuvre de la liste de vigilance, introduite dans la Directive 2013/39/UE, dans laquelle figurent trois hormones (éthynylestradiol EE2, estradiol E2, et estrone E1). Toutefois, si les différents tests existants sont valides du point de vue biologique et sont *a priori* équivalents en termes de spécificité (mais pas de sensibilité), il existe aujourd'hui un besoin d'harmonisation des méthodes employées pour leur application à la détection de EE2, E2 et E1 dans des échantillons environnementaux. Dans ce contexte, l'OFB soutient depuis 2014 une action menée par AQUAREF (INERIS), dont l'ambition est de contribuer à la validation d'une méthodologie d'évaluation d'œstrogènes-équivalents au sein de matrices environnementales complexes à l'aide de bioessais *in vitro*. Un état de l'art des méthodes actuellement utilisées pour mesurer le potentiel œstrogénique de matrices environnementales de type sédiment, effluent, et eau de surface est disponible. Il présente les grands principes de la méthodologie et identifie les étapes techniques clés qui peuvent être sources de variabilité entre laboratoires, dans la perspective d'un futur développement normatif.

Les performances relatives de ces bioessais *in vitro*, en termes de sensibilité, de précision et de robustesse sont également comparées dans le cadre d'un essai inter-laboratoire impliquant plusieurs partenaires européens, à partir d'échantillons d'eau de surface et de rejets provenant de 7 Etats membres de l'UE (cf. Norman Network Bulletin). La participation de l'INERIS à cette activité est assurée, pour partie, par un financement de l'OFB.

Une conséquence possible de l'exposition des poissons à certains PE est l'apparition d'individus intersexués. L'intersexualité consiste en la présence à la fois de tissu gonadique mâle et femelle chez



des espèces gonochoriques (c'est-à-dire pour lesquelles les individus sont soit des mâles, soit des femelles et ne changent pas de sexe durant leur vie). L'intersexualité peut mener à une diminution du succès reproducteur et (ultimement) à l'effondrement local de populations de poissons. Les observations sur le terrain, en particulier chez le gardon, suggèrent fortement une implication de substances œstrogéniques et anti-androgéniques dans l'apparition de l'intersexualité, conséquence d'une « féminisation » des mâles. De façon à pouvoir interpréter correctement les résultats des études d'intersexualité, AQUAREF a proposé un cadre conceptuel pour la validation de ce biomarqueur, première étape nécessaire avant le développement d'une norme.

Principaux livrables, résultats :

S. Aït-Aïssa, N. Creusot (2015). Validation de la mesure de l'activité oestrogénique dans les matrices environnementales : revue bibliographique. Rapport INERIS (AQUAREF) DRC-15-136927-12327A.

Issue no. 5 of the NORMAN Network Bulletin (Sept 2016). *New developments in oestrogen and Endocrine Disrupting Compound (EDC) monitoring: towards regulatory options for water quality management.*

J.-M. Porcher (2015). Méthodologie pour la validation des biomarqueurs dans un objectif d'utilisation en biosurveillance. Mesure de l'intersexualité chez le poisson. Méthodes et technologies innovantes. Rapport AQUAREF DRC-15-136927-12494A.

3. Impacts des PE sur la faune sauvage

Depuis 2013, l'INERIS travaille à la réalisation d'une cartographie nationale de l'intersexualité des poissons de rivière avec l'appui des services territoriaux de l'OFB. Sur chacun des 250 sites sélectionnés, 30 poissons d'une même espèce sont prélevés et acheminés à l'INERIS pour la préparation de coupes histologiques fines des gonades, permettant la mesure de l'intersexualité (occurrence et sévérité). Ce jeu de données, qui sera complété d'ici la fin de l'année 2017, permettra d'identifier des « hot-spots » favorisant l'apparition d'individus intersexués au sein de populations de cyprinidés, et sera mis en relation avec des données d'occupation de sol du bassin versant de ces sites pour identifier les pressions et sources de pollution contribuant significativement au phénomène (échéance : fin 2018).

Enfin, en marge de ces actions, à signaler une étude exploratoire en cours menée dans le cadre du partenariat INERIS-OFB, sur la prise en compte des effets PE dans la construction des normes de qualité environnementale (NQE) et des valeurs guides environnementales (VGE) (contexte DCE). Un examen de plus de 240 dossiers NQE/VGE montre que pour plus de 76 substances chimiques présentant des propriétés de perturbation endocrinienne, cet effet n'est pas pris en compte dans le processus d'élaboration de la norme (*via* la sélection de réponses biologiques caractéristiques d'un effet PE dans le jeu de données (éco)toxicologiques servant au calcul de la NQE, ou le recours à un facteur de sureté supplémentaire abaissant la NQE en application du principe de précaution).