



Surveillance prospective : Apport des bioessais pour l'évaluation de la qualité chimique des milieux aquatiques

S. Aït-Aïssa, C. Chardon, F. Brion

Juin 2020

Rapport final

En partenariat avec













Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du Contrat de recherche et développement relatif au programme de travail 2018-2020 du Réseau national de Surveillance Prospective de la qualité chimique des milieux aquatiques entre l'OFB / Ifremer / BRGM / Ineris / INRAE / LNE / CNRS / ISA / Université de Bordeaux.

Il s'inscrit également dans le contexte du programme scientifique et technique AQUAREF pour l'année 2018, au titre de l'action « Surveillance prospective – Application de nouveaux outils pour préparer la surveillance future ».

Auteurs:

Sélim Aït-Aïssa, INERIS, <u>selim.ait-aissa@ineris.fr</u> Clémence Chardon, INERIS, <u>clemence.chardon@ineris.fr</u> François Brion, INERIS, <u>francois.brion@ineris.fr</u>

Avec la participation des personnes suivantes sur les campagnes d'échantillonnage et d'analyses :

Emmanuelle Maillot-Maréchal, INERIS, emmanuelle.maillot-marechal@ineris.fr

Benjamin Piccini, INERIS, benjamin.piccini@ineris.fr

François Lestremau, INERIS, françois.lestremau@ineris.fr

Cécile Miège, Inrae Lyon, cecile.miege@inrae.fr

Baptiste Mathon, Inrae Lyon, baptiste.mathon@inrae.fr

Amandine Daval, Inrae Lyon, amandine.daval@inrae.fr

Nicolas Mazzella, Inrae Bordeaux, nicolas.mazzella@inrae.fr

Céline Tixier, IFREMER, celine.tixier@ifremer.fr

Ian Allan, IFREMER, ian.allan@ifremer.fr

Jean-Louis Gonzalez, IFREMER, Jean.Louis.Gonzalez@ifremer.fr

Anne togola, BRGM, anna.togola@brgm.fr

Sophie Lardy-Fontan, LNE, sophie.lardy-fontan@Ine.fr

Vérification du document :

Sophie Lardy-Fontan, LNE Lauriane Gréaud, INERIS Olivier Perceval, OFB

Les correspondants

AFB: Olivier Perceval, olivier.perceval@ofb.gouv.fr

INERIS: Selim Aït-Aïssa

<u>Référence du document</u>: Sélim Aït-Aïssa, Clémence Chardon, François Brion – Surveillance prospective : Apport des bioessais pour l'évaluation de la qualité chimique des milieux aquatiques – Rapport AQUAREF 2020 – DRC-20-172902-02808A – 41 p.

Droits d'usage : Restreint

Couverture géographique : National Niveau géographique : National

Niveau de lecture : Professionnels, experts

Nature de la ressource : Document

SOMMAIRE

1.	CONTEXTE ET OBJECTIFS	7
2.	DESCRIPTION DE L'ETUDE ET METHODOLOGIE	9
2.1	1 Stratégie générale	9
2.2	2 Sites d'étude	9
2.3	1 0 1	
2.4	,,	
2.5	5 Contrôles qualité	13
3.	RESULTATS	14
3.1	1 Activités dans les blancs	14
3.2	2 Extraits d'eaux ponctuels : comparaison des deux temps de prélèvement	15
3.3		
3.4	Hiérarchisation des sites en fonction des bioessais et des matrices échantillonnées	19
3.5		
3.6		
3.7	7 Activité oestrogénique in vitro : comparaison avec un impact in vivo	25
4.	APPLICABILITE POUR LA SURVEILLANCE CHIMIQUE DES MILIEUX :	
	RECOMMANDATIONS	
4.1	3	
4.2	,	
4.3	3 Stratégie de bioessais	29
5.	CONCLUSIONS	30
6.	VALORISATION	30
7.	REFERENCES	24
7.	REFERENCES	31
List	te des annexes :	
Δnn	nexe 1. Protocoles d'extraction des eaux, des membranes SR et des POCIS	3/1
	nexe 2. Activités ER et HAPL dans les blancs procédure et les blancs terrain	
Ann	nexe 3. Extraits d'eaux ponctuels : variabilité entre les deux temps de prélèvement	39
	nexe 4. Activité HAPL dans les deux membranes SR déployées sur chaque site nexe 5. Influence de la valeur seuil sur le RQ calculé pour l'activité HAPL dans les extraits c	
AHH)	ieke 3. Tillidelide de la valedi sedil sui le NQ calcule podi l'activite l'IAPL dalis les extialis c	16 OL

SURVEILLANCE PROSPECTIVE: APPORT DES BIOESSAIS POUR L'EVALUATION DE LA QUALITE

CHIMIQUE DES MILIEUX AQUATIQUES

Auteur(s): S Aït-Aïssa, C. Chardon, F. Brion

RESUME

La présente étude s'inscrit dans le cadre du réseau de surveillance prospective de la qualité chimique des milieux aquatiques (RSP), dont l'un des objectifs est de démontrer l'applicabilité de nouveaux outils, tels que les outils biologiques, en soutien à la surveillance future. Menée en synergie avec l'étude nationale de démonstration des performances opérationnelles des échantillonneurs intégratifs passifs (EIP) pour évaluer les substances réglementaires (action 4 du RSP), cette étude vise à démontrer l'applicabilité et les performances d'outils bio-analytiques (i.e. bioessais basés sur le mode d'action des substances) dans un contexte opérationnel de surveillance de la qualité chimique.

Dans ce but, une démarche bio-analytique basée sur une batterie de bioessais *in vitro* et *in vivo* a été mise en œuvre pour caractériser la contamination organique d'eaux de surface par des substances à activité hormonale et/ou dioxin-like. Les activités sont quantifiées en concentrations d'équivalents-toxiques (TEQ) biologiques dans l'eau. Cette démarche est appliquée à l'échelle nationale sur 20 sites d'eaux de surface continentales (18) et littorales (2), représentatifs de différents contextes de contamination et pressions anthropiques. Sur chaque site, une comparaison systématique de l'échantillonnage ponctuel (eaux brutes) et de l'échantillonnage intégratif (POCIS et membranes de silicone SR) au regard des réponses des bioessais a été réalisée.

Sur la base de cette étude, des résultats majeurs ont été obtenus et différentes recommandations ont été formulées pour une utilisation optimale de ces nouveaux outils de surveillance. Plus spécifiquement, cette étude a permis :

- i) de renseigner de l'état de contamination d'eaux de surface par des activités associées à ces composés perturbateurs endocriniens (PE), HAP- et dioxin-like. Les activités les plus fréquemment retrouvées sont les activités estrogéniques (ER) et HAP-like (HAPL) ; d'autres activités (glucocorticoïdes (GR), androgénique (AR), et dioxin-like) sont également présentes mais de façon beaucoup plus spécifique, en fonction des sites et/ou du type d'échantillonnage.
- ii) d'éprouver les stratégies d'échantillonnage pour la bio-analyse. Les EIP confirment, dans une majorité de cas, le diagnostic établi sur la base des analyses des prélèvements ponctuels d'eau de surface. Cependant, ils apportent une information complémentaire aux échantillons ponctuels pour des activités mesurées sur certains sites, e.g. mise en évidence d'activités ER et AR non révélées dans le cas de prélèvement d'eau ponctuel. Les POCIS sont pertinents pour la mise en évidence d'activités endocriniennes de type ER, AR et GR; les SR constituent un mode d'échantillonnage à privilégier pour détecter et quantifier les activités HAPL et DL.
- iii) de prioriser les sites en fonction des profils d'activités in vitro. Une hiérarchisation par méthode des clusters montre une bonne discrimination des sites les plus contaminés des autres sites et identifie les couples bioessais/type d'échantillonnage les plus discriminants.

- iv) de prioriser les sites en fonction du risque. Une interprétation des valeurs de TEQ-Bio *in vitro* au regard de valeurs seuils (établies ou proposées), sur la base d'un calcul de quotient de risque (RQ), a permis d'identifier 9 (eaux) et 10 sites (EIP), parmi les plus contaminés, présentant un dépassement du risque. La nécessité d'éprouver et d'affiner les valeurs seuils pour certaines activités *in vitro* comme l'activité HAP-like est notée.
- v) de confirmer un impact des activités oestrogéniques in vitro à l'échelle de l'organisme pour un ensemble de sites présentant un RQ>1 et une absence d'effet pour les sites ayant un RQ<1. La confrontation des données in vivo et in vitro montre une excellente cohérence entre les deux bioessais et renforcent la pertinence de la valeur seuil d'activité oestrogénique établie précédemment. Ces résultats soulignent la pertinence du diagnostic in vitro au regard d'un impact à l'échelle de l'organisme et l'intérêt du couplage entre bioessais in vitro et in vivo dans la caractérisation du danger associé aux matrices environnementales.
- vi) de montrer la contribution majeure des hormones oestrogéniques (estrone et 17b-estradiol) dans les activités oestrogéniques mesurées *in vitro*, confortant ainsi l'utilisation des bioessais cellulaires sensibles aux œstrogènes comme une alternative fiable à la chimie analytique ciblée pour la surveillance de ces hormones dans les eaux.

Enfin, un ensemble de recommandations et de points d'améliorations sur les procédures à mettre en œuvre pour une utilisation optimale de ces outils et de leur interprétation dans un contexte de surveillance opérationnelle a été formulé. Ces recommandations soulignent notamment l'importance des contrôles qualité à inclure dans ce type d'étude, des stratégies d'échantillonnage à mettre œuvre en fonction des objectifs de surveillance et, enfin, du développement des stratégies de bioessais pour permettre une évaluation plus exhaustive des contaminants des milieux et de leurs effets sur les organismes.

Mots clés: bioessais, perturbateurs endocriniens, dioxin-like, valeurs seuils, échantillonneurs intégratifs passifs, eaux de surface, contrôles qualité.

1. CONTEXTE ET OBJECTIFS

Les milieux aquatiques sont contaminés par une multitude de micropolluants, de classes chimiques et d'origines très diverses, lesquels peuvent subir des transformations biotiques ou abiotiques et générer des métabolites et produits de dégradation parfois plus toxiques que les composés parents. Une évaluation pertinente de la qualité chimique des eaux implique donc de pouvoir disposer de méthodes de détection qui soient suffisamment intégratrices de l'ensemble des contaminants, connus et inconnus, au sein d'un échantillon complexe et qui renseignent de leur toxicité potentielle (Dévier et al 2011; Altenburger et al 2015).

Dans la surveillance réglementaire telle que décrite par la Directive Cadre européenne sur l'Eau (DCE 2000/60/CE), l'évaluation de la qualité chimique des masses d'eau repose sur l'analyse d'une liste finie de substances prioritaires. Si ces approches sont indispensables pour détecter et quantifier les polluants prioritaires, elles ne fournissent qu'une vision très partielle de la contamination environnementale et du danger (éco)toxique associé puisqu'elles ne prennent pas en compte les effets de nombreuses substances non réglementées, ni les effets de mélange. Par ailleurs, pour certains composés tels que les hormones stéroïdiennes, les normes de qualité environnementale (NQE) proposées sont très basses (i.e. 35 et 400 pg/L pour l'éthinyl estradiol et l'estradiol), ce qui constitue un défi analytique important pour leur surveillance en routine.

Dans ce contexte, l'utilisation des méthodes de détection des contaminants basées sur une réponse biologique sont identifiées comme des méthodes complémentaires pour caractériser les contaminations chimiques des milieux. Contrairement à l'approche analytique conventionnelle qui cible des substances individuelles, les outils biologiques intègrent l'ensemble des substances actives présentes au sein d'un échantillon tout en informant sur la toxicité potentielle (Brack et al 2019). L'utilisation de tels outils dans la surveillance de l'état chimique s'inscrit dans les perspectives de la DCE tel qu'inscrit dans sa directive fille qui introduit la "future application d'outils pour la surveillance autre que substance par substance" (récital 18, 2013/39/EU).

Parmi les outils biologiques qui s'avèrent pertinents pour la surveillance de la contamination chimique figurent les bioessais *in vitro* et *in vivo* basés sur le mécanisme d'action des substances de type perturbateurs endocriniens (PE) à activité hormonale et de composés dioxin-like (DL) (cf. rapports d'études Aït-Aïssa et al 2015a, 2015b, 2018). Ces outils permettent la détection et la quantification (en équivalents-toxiques ou TEQ) d'activités biologiques associées à la présence de substances ayant un même mode d'action dans des échantillons complexes. Ils fournissent un diagnostic sur les contaminations par des substances organiques dans différentes matrices comme les rejets urbains, les eaux de surface ou les sédiments, et complètent ainsi les analyses chimiques ciblant des substances inscrites dans les listes de surveillance (Creusot et al 2014, Neale et al 2015, Sonavane et al 2018, Serra et al 2020) et ce à des niveaux de sensibilité pertinents (Könneman et al 2018). Certains de ces outils sont désormais suffisamment matures du point de vue scientifique et technique pour envisager une mise œuvre plus large pour répondre aux besoins identifiés d'évolution de la surveillance de la qualité chimique des milieux.

La présente étude, portée par le programme scientifique d'AQUAREF, s'inscrit dans le cadre du réseau de surveillance prospective de la qualité chimique des milieux aquatiques (RSP). L'un des objectifs du RSP est de démontrer l'applicabilité de nouveaux outils, tels que les outils biologiques, les échantillonneurs intégratifs passifs (EIP), ou les nouvelles techniques d'analyse chimique à large spectre, en soutien à la surveillance future (Staub et al 2019). Dans le cadre du RSP, cet objectif est appréhendé à travers l'action RSP#4 visant à faire la démonstration des performances opérationnelles des EIP pour déterminer les concentrations moyennes de substances réglementaires en comparaison aux approches classiques de surveillance telles que définies par la DCE (Mathon et al. 2019) et l'action RSP#5 qui vise à démontrer l'applicabilité et les performances des outils biologiques dans un contexte opérationnel de surveillance.

Dans ce contexte, une stratégie bio-analytique basée sur une batterie de bioessais complémentaires pour caractériser la contamination chimique d'eaux de surface a été mise en œuvre sur 20 sites répartis à l'échelle nationale (Figure 1). Elle vise à :

- renseigner l'état de la contamination d'eaux de surface continentales et littorales par les composés de type PE et DL à l'aide d'une batterie de bioessais *in vitro* (i.e. établissement de profils multi-récepteurs incluant les récepteurs des estrogènes, des (anti)androgènes, des glucocorticoïdes et de la dioxine);
- comparer les profils d'activités biologiques PE et DL obtenus par différentes stratégies d'échantillonnage : l'échantillonnage ponctuel (eaux brutes) et l'échantillonnage intégratif passif (POCIS et membranes de silicone SR);
- proposer un classement des sites sur la base de ces profils ;
- fournir une interprétation des profils d'activité in vitro au regard de valeurs seuils existantes;
- fournir une interprétation de l'activité estrogénique *in vitro* au regard 1) de données de chimie analytique ciblant des polluants réglementaires, 2) d'un impact à l'échelle de l'organisme entier mesuré par un bioessai *in vivo* chez le poisson.

2. DESCRIPTION DE L'ETUDE ET METHODOLOGIE

2.1 STRATEGIE GENERALE

La stratégie générale de l'étude est décrite dans la Figure 1.

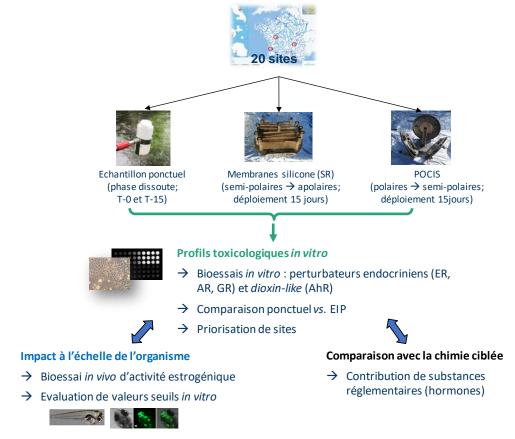


Figure 1. Démarche générale décrivant la stratégie bio-analytique mise en œuvre pour dresser un diagnostic de la contamination des eaux de surface par des substances chimiques organiques de type perturbateurs endocriniens et dioxin-like.

2.2 SITES D'ETUDE

Vingt sites localisés en France métropolitaine et dans les départements et régions d'outremer (DROM) (Figure 2 et Tableau 1) ont été investigués dans le cadre de l'étude nationale de démonstration des performances opérationnelles des échantillonneurs intégratifs passifs (EIP) lancée en 2017 (activité 4 du RSP). Ces sites sont différemment impactés en termes de contamination et de types de pression anthropique. Parmi les sites, il y a 3 sites de référence, 2 sites marins et 3 sites localisés dans les DROM. Certains de ces sites sont également des stations de la campagne Watch List (liste de vigilance réalisée dans le cadre de la surveillance DCE, activité 1 du RSP).

Une description détaillée de chaque site incluant la typologie, les pressions supposées, les états chimique et écologique, est fournie dans le rapport de l'activité RSP4 (Mathon et al. 2019).

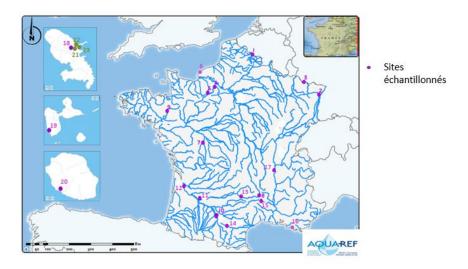


Figure 2. Localisation des sites (en violet, identifiés de 1 à 20) échantillonnés en France métropolitaine et dans les DROM (sites du volet « étude spatiale » de l'action RSP4).

Tableau 1. Description des sites de l'étude.

Site	Station de prélèvement	Bassin	Code national	Caractéristique	Pression anthropique
1	L'Escaut canalisé à Fresnes sur Escaut	AP	1016000	Site watchlist	U, I, A
2	La Souffel à Mundolsheim	RM	2037500	Site watchlist	U, I, A
3	La Rosselle à Petite- Rosselle	RM	2103800	Site watchlist	U, I, A
4	L'Iton à Normanville	SN	3199200	Site watchlist	U, A
5	La Risle à Ambenay	SN	3219780	Site watchlist	U, A
6	Antifer	SN	/	Site littoral	U, P
7	Le Clain en aval de Poitiers	LB	4085500	/	U, I, A
8	L'allier lieu-dit de Chabalier	LB	4026500	Site référence	-
9	La Vilaine à Guichen	LB	4209990	Site watchlist	U, I, A
10	L'Hers mort à St- Sauveur	AG	5156950	/	U, I, A
11	Le Tolzac à Varès	AG	5083585	Site watchlist	Α
12	La Jalle de Blanquefort	AG	5073800	/	А
13	La Boralde en amont d'Espalion	AG	5099170	Site référence	-
14	Tréboul à Castelnaudary	RMC	6177910	Site watchlist	I, A
15	Le Luech à Génolhac	RMC	6118550	Site référence	-
16	Le Gier à Givors	RMC	6097000	Site watchlist	U, I
17	La Baie du Lazaret	RMC	/	Site littoral	U, P
18	Grand Galion	Martinique	8225101	/	Faible
19	Pérou-pères	Guadeloupe	/	/	Faible
20	L'étang du Gol	La Réunion	10520050	/	Faible

AP : Artois-Picardie ; RM : Rhin-Meuse ; SN : Seine-Normandie ; LB : Loire-Bretagne ; AG : Adour-Garonne ; RMC : Rhône méditerranée Corse. Pressions : U : urbain ; I : industriel ; A : agriculture ; P : portuaire

2.3 CAMPAGNES DE PRELEVEMENTS

Les campagnes de prélèvements se sont déroulées du 21/11/2017 au 20/06/2018. L'échantillonnage sur sites a été réalisé par les personnels de l'Inrae de Lyon (équipe de Cécile Miège), de l'Inrae de Bordeaux (équipe de Nicolas Mazella), du BRGM (équipe d'Anne Togola) et de l'Ifremer (équipe de Jean-Louis Gonzalez).

Sur chaque site, des prélèvements d'eau ponctuels (4 L) ont été effectués à T0 et à T0+15 jours (T15) dans des flacons en polyéthylène à haute densité (HDPE). Chaque flacon est rincé trois fois avec l'eau du site avant prélèvement. Des POCIS et des membranes de silicone (SR, pour *Silicone Rubber*) ont été placés en immersion en même temps que le prélèvement d'eau et collectés 15 jours plus tard. Tous les échantillons collectés (eaux, POCIS, SR) sont maintenus à $5\pm3^{\circ}$ C (glacières avec blocs eutectiques) et transférés aux laboratoires sous 24 à 48 h. A la réception au laboratoire, les échantillons sont stockés à -20°C.

Sur les 20 sites, 100% des prélèvements d'eaux brutes (à 0 et à 15 jours) et des POCIS ont pu être réalisés. Concernant les SR, tous les sites ont été échantillonnés hormis le site de la Risle, du fait de la perte de deux cages due aux forts débits du cours d'eau ou à un acte de vandalisme.

2.4 BIO-ANALYSES

Le principe de l'approche bioanalytique utilisée dans cette étude est présenté dans la Figure 3. Elle se base sur l'extraction organique de la phase dissoute et l'analyse en courbes concentration-réponse des extraits par les bioessais. Chaque étape est détaillée ci-après.

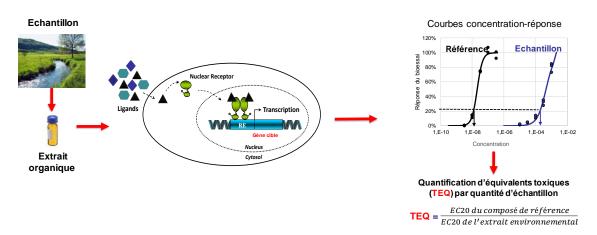


Figure 3. Principe de la bio-analyse d'échantillons d'eaux de surface et EIP par les bioessais in vitro et in vivo.

Préparation des extraits organiques

Les échantillons d'eaux, de POCIS et de SR ont été extraits par un solvant organique selon les méthodes décrites en Annexe 1. Les extraits organiques ainsi obtenus sont repris dans le DMSO et conservés à -20°C avant d'être testés dans les différents bioessais.

Les extractions des POCIS et des SR ont été réalisés respectivement à l'Inrae de Lyon (Cécile Miège, Amandine Daval) et à l'Ifremer (Ian Allan, Céline Tixier). Les extractions d'eaux brutes ont été réalisées à l'INERIS. L'ensemble des extraits a été envoyé à l'INERIS où sont réalisés les bioessais.

Bioessais

Le Tableau 2 décrit l'ensemble des bioessais in vitro et in vivo qui ont été appliqués dans cette étude.

Tableau 2. Bio-essais in vitro et in vivo utilisés pour la détection de substances actives dans les extraits d'échantillons d'eaux et d'EIP.

Nom du bioessai	•		Composés de référence	Unité (TEQ)
Bioessa	is in vitro			
MELN	Estrogénique (ER)	Gène rapporteur luciférase couplé au récepteur des œstrogènes (ER)	17β-estradiol (E2)	ng E2-Eq/L
	Androgénique (AR)	Gène rapporteur luciférase couplé aux	Dihydrotestostérone (DHT)	ng DHT-Eq/L
MDA-kb2	Anti- androgénique (aAR)	récepteurs des androgènes (AR) et des glucocorticoïdes	Flutamide (FLU)	μg FLU-Eq/L
	Glucocorticoïde	(GR), co-exprimés dans la cellule	Dexaméthasone (DEX)	ng DEX-Eq/L
PLHC-1	HAP-like (HAPL)	Mesure d'activité EROD après 4 h d'exposition	Benzo(a)pyrène (BaP)	ng BaP-Eq/L
	Dioxin-like (DL)	Mesure d'activité EROD après 24 h d'exposition	2,3,7,8- tetrachlorodibenzo- p-dioxin (TCDD)	ng TCDD-Eq/L
Bioessa	i in vivo			
EASZY	Estrogénique (ER)	Induction de fluorescence dans des embryons de poisson zèbre transgéniques (cyp19a1b-GFP)	17β-estradiol (E2)	ng E2-Eq / L

EROD = éthoxyrésorufine-O-déethylase, activité enzymatique du cytochrome P450 1A

Les bioessais *in vitro* sont basés sur l'utilisation de cultures cellulaires exprimant un gène rapporteur (i.e. luciférase) ou naturel (i.e. mesure de l'activité EROD) dont l'induction de la transcription est dépendante de l'activation de récepteurs spécifiques (Figure 3). L'induction de cette réponse est dépendante de la concentration en ligand actif. La sensibilité et spécificité de ces bioessais permettent la détection d'activité de type œstrogénique (ER), androgénique (AR), anti-androgénique (aAR), glucocorticoïdes (GR), HAP-like (HAPL) et dioxin-like (DL) au sein d'échantillons complexes.

Le bioessai *in vivo* EASZY, non soumis à la réglementation sur l'expérimentation animale, est basé sur l'utilisation d'embryons de poissons zèbres transgéniques qui expriment de façon stable le gène rapporteur de la GFP (*green fluorescent protein*) couplé au promoteur du gène de l'aromatase cérébrale (cyp19a1b), lequel est spécifiquement et fortement induit par le récepteur des œstrogènes activé (Brion et al. 2012). De manière complémentaire aux essais *in vitro*, le bioessai EASZY présente l'intérêt majeur de replacer les mécanismes d'action étudiés dans le contexte de l'organisme en tenant compte des propriétés toxicocinétiques des substances (adsorption, distribution, métabolisme et élimination) et d'évaluer les effets à un stade critique du développement : l'embryogenèse.

Quantification d'équivalents-toxiques biologiques (TEQ-Bio)

Dans chaque bioessai et pour chaque échantillon, une gamme de dilutions des extraits est testée dans au moins deux expériences indépendantes. Dans le cas d'échantillons positifs, les courbes concentration-réponse sont modélisées selon l'équation de Hill à l'aide de la macro ExcelTM RegTox (Vindiman 2020), afin de déterminer les concentrations effectrices (e.g. EC20) pour les échantillons et les molécules de référence. Le ratio EC20 de la référence sur l'EC20 de l'échantillon permet alors de quantifier l'activité de l'échantillon en concentrations d'équivalents-toxiques (TEQ), e.g. équivalents-17beta-estradiol (E2-EQ) dans le cas de l'activité oestrogénique. Dans son principe, la valeur de TEQ-bio intègre donc l'ensemble des substances actives au sein d'un échantillon.

Les valeurs de TEQ-bio sont exprimées en quantité de TEQ par litre d'échantillon (e.g. ng E2-Eq/L) pour les extraits d'eaux. Pour les EIP, les valeurs obtenues sont exprimées en quantité de TEQ par gramme de matrice (e.g. ng E2-Eq/g). Pour permettre une comparaison des résultats entre les différents procédés d'échantillonnage, les valeurs obtenues dans les EIP sont transformées en quantité d'équivalents-toxiques par litre (ng/L ou µg/L) en prenant en compte le volume d'eau échantillonné au cours des deux semaines de déploiement sur site. Pour les POCIS, les résultats en ng/g de phase HLB ont été converties en ng/L en appliquant un taux d'échantillonnage de 0,2 L par jour. Cette valeur correspond à une valeur moyenne déterminée à partir de l'évaluation d'un très large panel de composés organiques pharmaceutiques et pesticides (Harman et al 2012, Moschet et al 2015). Pour les membranes de silicone (SR), des taux d'échantillonnage spécifiques à chaque site ont été déterminés par l'Ifremer (Allan, communication personnelle) à l'aide de SR dopés par des composés de référence (PRC).

2.5 CONTROLES QUALITE

Blancs procédure et blancs terrains

Afin d'évaluer les contaminations des échantillons au cours des prélèvements, du transfert ou de la préparation des extraits destinés aux bioessais, deux types de blancs sont réalisés :

 des blancs d'extraction (ou blancs procédure, BP) : ces extraits sont obtenus à partir d'eau ultrapure mise en contact avec les flacons HDPE (eaux ponctuelles) ou de phase non exposée (EIP) et qui ont subi l'ensemble du processus de préparation d'échantillon (extraction et re-concentration). Un BP a été réalisé pour chaque série d'extraction des échantillons. des blancs terrain (BT) pour les EIP: il s'agit de membranes qui ont subi toutes les étapes de transport sur site, collecte et préparation des extraits mais n'ont pas été exposées dans le milieu aquatique. Il n'a pas été réalisé de BT pour les échantillons ponctuels.

Bioessais

Pour la réalisation des bioessais, une gamme de dilutions (6 niveaux de concentrations) de chaque extrait a été testée dans au moins deux expériences indépendantes. Chaque plaque de cellules inclut un témoin négatif (DMSO) et positif (composé de référence). Une gamme dose-réponse du témoin positif est réalisée pour chaque série de tests. La sensibilité et réactivité attendue des bioessais est alors vérifiée par la détermination de la concentration active du composé de référence (EC50, EC20) et par le facteur d'induction par rapport au contrôle.

Pour un bioessai donné, la limite de quantification (LQ) est calculée à partir de la concentration en composé de référence induisant 20% d'effet (EC20) multipliée par le facteur d'enrichissement de l'échantillon à la plus forte concentration testée (0,5 % v/v d'extrait).

3. RESULTATS

3.1 ACTIVITES DANS LES BLANCS

Dans notre étude, aucune activité glucocorticoïde, (anti)androgénique, ou DL n'a été détectée dans les blancs procédure (BP) et les blancs terrain (BT).

De faibles activités oestrogéniques ont été mesurées dans 3 BP (sur 8 générés) eaux et dans le BT correspondant au SR du site Tolzac (les détail des analyses des blancs est reporté en Annexe 2). Ces faibles contaminations ont été prises en compte dans le résultat final reporté, en soustrayant à la valeur d'activité ER mesurée dans l'échantillon celle correspondant à la valeur mesurée dans le blanc associé lorsqu'il est actif. Les blancs des POCIS étaient inactifs pour cette activité.

A l'inverse des autres activités, des activités HAPL sont fréquemment détectées dans les BP et BT correspondants aux eaux et aux POCIS, alors que les BP et BT des SR sont beaucoup moins actifs (détail des résultats en Annexe 2). Dans le cas des eaux et des SR, ces activités restent inférieures à celles mesurées dans les échantillons et n'empêchent pas leur quantification (l'activité mesurée dans le BP est soustraite à celle mesurée dans l'échantillon). En revanche, les niveaux d'activités mesurés dans les BT des POCIS se sont avérés proches de celles mesurées dans les POCIS déployés sur site (Figure en Annexe 2). Bien que certains échantillons de POCIS présentaient une activité HAPL supérieure à celle des blancs, il existe une forte incertitude sur leur quantification. Face à ce constat, nous avons choisi de ne pas présenter de valeurs quantitatives pour cette activité dans les POCIS.

La contamination des blancs par une activité HAPL a parfois été reportée dans la littérature (Tousova et al, 2019), même si peu d'études publiées renseignent ce point. Cette contamination peut intervenir au cours de la manipulation des EIP (e.g. via l'air ambiant sur le terrain ou au laboratoire) ou au cours de la préparation des extraits. Elle

n'aura pas d'incidence sur l'analyse de matrices très contaminées (e.g. sédiments, eaux usées) mais peut être problématique pour la quantification d'échantillons peu contaminés, comme c'est le cas des eaux de surface peu chargées de notre étude.

Il faut enfin noter que les blancs EIP réalisés dans notre étude ne sont pas parfaitement représentatifs des échantillons dans la mesure ils n'ont pas été déployés dans l'eau et n'ont donc pas subi une phase de rinçage/nettoyage dans les premiers moments de leur déploiement dans l'eau. En conséquence, il n'est pas exclu que les activités mesurées dans les blancs surestiment quelque peu le niveau de contamination non spécifique dans les échantillons.

En conclusion, l'analyse des blancs procédure et des blancs terrain montre que la procédure d'échantillonnage et de préparation des extraits ne génère pas d'interférence pour la majorité des bioessais, excepté pour d'activité HAPL et DL dans les extraits de POCIS, qui n'a pas été prise en compte dans la suite de l'étude.

3.2 EXTRAITS D'EAUX PONCTUELS : COMPARAISON DES DEUX TEMPS DE PRELEVEMENT

La comparaison des prélèvements ponctuels d'eaux réalisés à 15 jours d'intervalle pour les activités ER, GR et HAPL est illustrée en Annexe 3.

Pour les activités ER et GR, on note relativement peu de différence entre le diagnostic à T0 et celui à T15, excepté sur deux stations spécifiques très actives. C'est le cas du Gier et de la Vilaine qui présentent des activités plus importantes à T0 qu'à T15 jours. Cette différence serait le reflet d'une augmentation importante du débit entre les temps de prélèvement (épisode de crue hivernale entre les deux prélèvements) qui a contribué à diluer les concentrations en polluants détectés par les bioessais. D'autres stations actives ont au contraire des niveaux d'activité similaires entre les deux temps de prélèvement (e.g. Jalle, Souffel, Rosselle).

Concernant l'activité HAPL, les résultats entre les deux temps de prélèvement apparaissent plus variables et pour de plus nombreuses stations mais restent toutefois du même ordre de grandeur (échelle linéaire sur le graphique). La variabilité temporelle renforce la nécessité de disposer d'échantillons qui soient plus représentatifs de la contamination du milieu dans le temps.

Dans la suite du rapport, pour qualifier l'activité *in vitro* dans les extraits d'eaux, nous utilisons la moyenne des mesures effectuées à ces deux temps de prélèvements.

3.3 Profils d'activites in vitro et hierarchisation des sites

Le Tableau 3 présente une vue générale des résultats d'activités biologiques *in vitro* dans les extraits d'eaux (prélèvements ponctuels), de POCIS et de SR.

Tableau 3. Activités in vitro quantifiées dans les extraits d'eaux (prélèvements ponctuels), de POCIS et de membranes de silicones (SR) sur les 20 sites de l'étude.

	EAUX						
	ER	GR	AR	aAR	HAPL	DL	
Allier (ref)		<17,6	<0,8	<1,3	16	<0,4	
Boralde (ref)	<0,06	<14,2	<0,2	<1,3	50	<0,6	
Luech (ref)		<16,2	<0,7	<1,5	11	<0,4	
Antifer	0,22	<13,2	<0,2	<1,2	<11	<0,4	
Clain	1,28	<10,0	<0,3	<1,4	84	<0,2	
Escaut	<0,04	<10,6	<0,2	<1,0	27	<0,3	
Gier	8,78	115	n.c.	n.c.	73	<0,2	
Hers mort	<0,04	<8,6	<0,1	<0,7	30	<0,2	
Iton	0,38	870	n.c.	n.c.	105	<0,2	
Jalle	1,63	43	n.c.	n.c.	140	0,29	
Lazaret	0,65	<12,9	<0,2	<1,0	13	<0,5	
Risle	0,04	<13,9	<0,3	<1,3	41	<0,2	
Rosselle	2,92	24	n.c.	n.c.	205	0,26	
Souffel	1,25	59	n.c.	n.c.	99	<0,2	
Tolzac	<0,06	<16,3	<0,2	<1,5	46	<0,7	
Tréboul	0,60	<12,0	<0,2	<1,1	26	<0,3	
Vilaine	3,20	98	n.c.	n.c.	298	<0,3	
Etang du Gol	<0,05	<10,9	<0,2	<0,8	54	<0,3	
Grand Galion	<0,01	<13,3	<0,2	<0,5	57	<0,2	
Pérou-pères	<0,01	<14,2	<0,3	<0,5	49	<0,2	

POCIS									
ER	GR	AR	aAR	HAPL	DL				
0,01	<0,7	<0,03	<0,1	n.c.	n.c.				
0,13	<1,0	<0,04	<0,1	n.c.	n.c.				
0,06	<0,9	<0,04	<0,1	n.c.	n.c.				
0,29	3	<0,03	n.c.	n.c.	n.c.				
0,04	<0,9	<0,11	<0,2	n.c.	n.c.				
3,36	<0,6	<0,03	<0,1	n.c.	n.c.				
0,85	<1,1	0,64	n.c.	n.c.	n.c.				
0,69	<2,8	<0,09	<0,1	n.c.	n.c.				
0,05	224	n.c.	n.c.	n.c.	n.c.				
0,16	<0,5	<0,07	<0,1	n.c.	n.c.				
0,19	<0,4	<0,06	<0,1	n.c.	n.c.				
0,21	<0,9	<0,04	<0,1	n.c.	n.c.				
10,56	n.c.	1,57	n.c.	n.c.	n.c.				
4,05	n.c.	1,03	n.c.	n.c.	n.c.				
0,25	<1,4	<0,07	<0,2	n.c.	n.c.				
0,33	n.c.	0,09	n.c.	n.c.	n.c.				
0,77	n.c.	0,29	n.c.	n.c.	n.c.				
<0,05	<3,2	<0,15	<0,4	n.c.	n.c.				
<0,01	<0,9	<0,04	<0,1	n.c.	n.c.				
0,12	<1,7	<0,18	<0,5	n.c.	n.c.				

SR								
ER	GR	AR	aAR	HAPL	DL			
<0,002	<0,19	<0,01	<0,03	28	<0,009			
<0,001	<0,08	<0,004	<0,01	65	0,02			
<0,009	<1,10	<0,04	<0,2	263	<0,034			
0,04	<0,64	<0,02	<0,03	29	<0,015			
0,005	<0,17	<0,01	0,17	19	<0,009			
0,01	<0,26	<0,01	<0,01	57	0,06			
<0,002	<0,31	<0,01	<0,01	124	<0,024			
<0,000	<0,02	<0,001	<0,002	4	0,01			
<0,001	6,87	n.c.	n.c.	14	0,02			
<0,001	n.c.	0,08	n.c.	111	0,02			
<0,001	<0,26	<0,01	<0,02	27	<0,009			
0,04	n.c.	0,85	n.c.	309	0,15			
0,03	n.c.	0,48	n.c.	48	0,05			
<0,002	<0,12	<0,01	<0,01	12	<0,009			
<0,004	<0,41	<0,02	<0,04	39	<0,021			
<0,010	n.c.	0,56	n.c.	1182	0,24			
<0,001	<0,31	<0,01	<0,01	24	0,01			
<0,001	<0,20	<0,01	<0,01	32	0,01			
<0,001	<0,10	<0,004	<0,003	42	0,01			

⁻ ER : activité oestrogénique en ng E2-Eq/L ; GR : activité glucocorticoïde en ng DEX-Eq/L ; AR : activité androgénique en ng DHT-Eq/L ; aAR : activité anti-androgénique en µg FLU-Eq/L ; HAPL : activité AHP-like en ng BAP-Eq/L ; DL : activité dioxin-like en ng TCDD-Eq/L.

⁻ Les cases colorées en bleu indiquent une activité quantifiée. Pour une même activité, l'intensité de la couleur augmente avec la valeur mesurée, toutes matrices confondues (eaux ponctuelles, POCIS et SR). Les cases grises indiquent une absence de résultat (non interprétable ou pas d'échantillon sur la Risle).

⁻ Les valeurs correspondent à une moyenne des valeurs mesurées à 0 et 15 jours pour les prélèvements d'eaux ponctuels, et à une moyenne de deux membranes par site pour les SR (la variabilité entre réplicas SR est très faible, illustrée en Annexe 4).

⁻ n.c. = non calculé i) pour AR, aAR ou GR car interférence transcriptionnelle dans la lignée MDA-kb2, ii) pour HAPL et DL dans les POCIS car blancs actifs en HAPL

Le Tableau 3 montre que des profils d'activités *in vitro* contrastés selon les stations, l'activité considérée ou le type d'échantillonnage. Les activités les plus fréquemment retrouvées sont les activités estrogéniques (ER) et HAP-like (HAPL). Les autres activités (GR, AR, aAR et DL) sont également présentes mais de façon plus ponctuelle, en fonction des sites et/ou du type d'échantillonnage.

Activité oestrogénique

Dans les extraits des prélèvements d'eau ponctuels, une activité oestrogénique (ER) est quantifiée sur 11 sites sur 20. Les niveaux détectés vont de 0,04 ng E2-Eq/L (Risle) à 8,8 ng E2-Eq/L, certains étant particulièrement actifs comme le Gier, la Jalle, la Rosselle, la Souffel ou la Vilaine. Pour 7 sites (Clain, Gier, Jalle, Lazaret, Rosselle, Souffel, Tréboul et Vilaine), les niveaux mesurés sont significatifs car supérieurs à la valeur seuil de 0,56 ng E2-Eq/L au-delà de laquelle il existe un risque pour l'environnement (Escher et al 2018, Brion et al 2019). Ce point est discuté plus en détail dans le chapitre 3.5.

La comparaison des activités ER dans les extraits d'eaux avec celles mesurées dans les POCIS et les SR montre des profils différenciés.

L'analyse des extraits de POCIS, qui captent les composés polaires à semi-polaires, identifie une large majorité de sites positifs pour cette activité (18/20). S'ils confirment les activités détectées dans les eaux, les POCIS révèlent également une activité sur d'autres sites non identifiés par le prélèvement ponctuel. C'est le cas par exemple de l'Escaut ou de l'Hers mort qui présentent une forte activité ER dans les POCIS laquelle n'est pas détectée dans les prélèvements ponctuels.

En revanche, de très faibles activités ER sont mesurées dans les extraits SR, qui eux concentrent préférentiellement les composés apolaires. Ces résultats sont cohérents avec le fait que, dans les eaux de surface, les activités oestrogéniques *in vitro* sont généralement médiées par des substances organiques semi-polaires comme les hormones, certains bisphénols ou encore des phyto-œstrogènes (Neale et al 2015, Tousova et al 2019, Serra et al 2020).

Activités glucocorticoïde et (anti)androgénique

D'autres activités endocriniennes ont été investiguées dans le cadre de cette étude. Des activités glucocorticoïdes et (anti)androgéniques sont détectées sur certains sites par le bioessai MDA-kb2. Ce bioessai exprime à la fois le récepteur des androgènes (AR) et celui des glucocorticoïdes (GR). Dans le cas d'une réponse positive avec un échantillon, un second test en présence d'inhibiteurs spécifiques de chacun des récepteurs est réalisé afin de déterminer quel type composé actif est présent dans l'échantillon.

L'analyse des extraits d'eau montre que 7 sites présentent une activité liée au récepteur des glucocorticoïdes (GR). Ce résultat est notable dans la mesure où, à notre connaissance, les substances connues capables d'activer ce récepteur sont majoritairement des substances pharmaceutiques ciblant spécifiquement le GR (Schriks et al 2011, Sonavane et al 2018, Weizel et al 2018, Hashmi et al 2020). Ces résultats suggèrent donc une contamination associée à un rejet urbain, industriel (e.g. industrie pharmaceutique) ou hospitalier, notamment sur l'Iton et le Gier, où le niveau de contamination est le plus fort.

L'analyse des extraits de POCIS et de SR fournit des informations complémentaires aux extraits d'eau ponctuels. Tout d'abord, l'activité GR est confirmée pour le site de l'Iton, à la fois dans les POCIS et les SR. En revanche, la réponse du bioessai est principalement médiée dans les EIP par des activités androgéniques sur le Gier, la Rosselle, la Souffel et la Vilaine, sites pour lesquels l'activité GR prédominait dans les extraits d'eau ponctuels.

Un seul échantillon a permis d'identifier une activité anti-androgénique (aAR) ; il s'agit de l'échantillon SR sur le Clain. Ce site étant principalement sous pression agricole, cette activité pourrait être mise en regard de l'occurrence de pesticides connus pour exercer une activité anti-androgénique dans ce bioessai (Aït-Aïssa et al 2010). Cette activité reste néanmoins relativement modeste au regard d'autres niveaux d'activité reportés avec le même bioessai dans d'autres contextes (Creusot et al 2013, Tousova et al 2019).

Au bilan, la combinaison des méthodes d'échantillonnage montre que ces sites sont impactés par des mélanges de différentes activités PE, incluant œstrogènes, glucocorticoïdes et androgènes. Ce type de profil suggère la présence de pressions de type urbaines et/ou industrielles.

Activités HAPL et DL

Des activités associées aux composés HAP-like (HAPL) sont détectées dans tous les sites, dans les extraits d'eaux ponctuelles et les extraits SR. Les niveaux quantifiés vont de 0,05 à 0,3 µg BaP-Eq/L pour les extraits d'eau et de 0,004 à 1,2 µg BaP-Eq/L pour les extraits SR. La vilaine, la Rosselle et la Jalle ressortent parmi les plus actifs dans les eaux ponctuelles et les SR.

Des activités dioxin-like (DL) sont également quantifiées, de manière moins fréquente que l'activité HAPL, dans les extraits d'eau et de SR principalement pour les sites les plus actifs en HAPL (e.g. Jalle, Rosselle, Vilaine). Ces activités DL étant mesurées par le même bioessai que l'activité HAPL mais après 24 heures d'exposition des cellules au cours de laquelle les composés facilement dégradés sont métabolisés par les cellules, il semble vraisemblable qu'elles soient, au moins pour partie, dues à des résidus de HAP qui persisteraient après 24 heures.

Les SR présentent plusieurs avantages par rapport aux autres modes d'échantillonnage pour quantifier les activités HAPL et DL. Ils permettent une forte concentration sélective des composés organiques apolaires dissous : le facteur d'enrichissement final testé dans les bioessais est supérieur à 1000 pour les SR alors qu'il est de 200 pour les POCIS et 50 pour les eaux ponctuelles. Les blancs terrain et blancs procédure ne sont pas affectés pas une contamination au cours de la manipulation (Annexe 2) et il existe une bonne répétabilité entre les réplicas déployés sur chaque site (Annexe 4). Ils fournissent une évaluation quantitative de l'activité HAPL dans l'eau grâce à la détermination de taux d'échantillonnage spécifique à chaque site. Au final, ils permettent une quantification des activités HAPL sur plusieurs ordres de grandeur, mettant en évidence les sites très faiblement contaminés des sites beaucoup plus impactés.

Concernant les extraits de POCIS, des activités HAPL significatives ont été mesurées dans les blancs procédures (BP) et les blancs terrain (BT), à des niveaux parfois proches de ceux mesurés dans les POCIS effectivement déployés sur sites (cf. Tableau et Figure en Annexe 2). Bien que certains sites apparaissent actifs, la quantification de ces activités au regard de celle mesurée dans les BT apparaît incertaine. C'est pourquoi nous avons

choisi de ne pas rapporter de mesures quantitatives de HAPL et DL dans les POCIS dans le Tableau 3. Les données mesurées en ng/g de matrice sont néanmoins indiquées en Annexe 2.

Au vu de nos résultats, l'utilisation des EIP de type membrane SR apparaît comme la méthode d'échantillonnage la plus robuste et la plus fiable pour quantifier les activités HAPL et DL dans les eaux de surface.

3.4 HIERARCHISATION DES SITES EN FONCTION DES BIOESSAIS ET DES MATRICES ECHANTILLONNEES

Une analyse comparative par la méthode de regroupement hiérarchique (hierarchical clustering) a été réalisée dans le but d'évaluer le regroupement des sites au regard de leur profil d'activités in vitro (en TEQ-bio) et des matrices d'échantillonnage.

Le résultat de cette analyse est présenté dans la Figure 4.

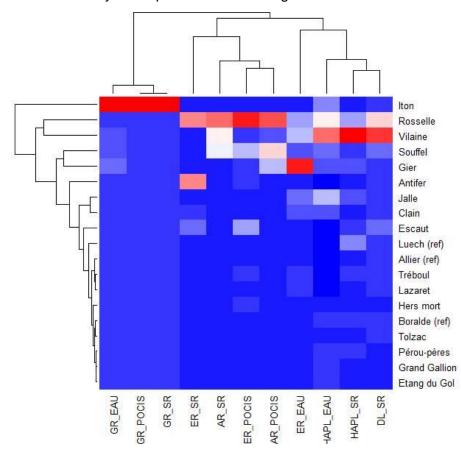


Figure 4. Regroupement hiérarchique (hierarchical clustering, R) des données de TEQ-Bio in vitro dans les extraits d'eaux ponctuelles, de POCIS et de SR pour l'ensemble des sites de l'étude. Le site de la Risle, qui n'a pas été échantillonné pour les SR, n'est pas inclus dans l'analyse. Echelle de couleurs : du bleu foncé (non détecté) au rouge (plus actif).

On observe que les sites les plus contaminés par les polluants PE (i.e. Rosselle, Souffel, Vilaine, Iton, Gier) sont regroupés sur le haut du graphique et bien discriminés par rapport aux autres sites. L'Iton se démarque des autres sites en raison des activités GR élevées

qui ont été mesurées par les trois types d'échantillonnage. Les activités PE et DL sur les autres sites ne permettent pas de les discriminer entre eux. Sur cet ensemble sont regroupés les sites de référence (Allier, Luech et Boralde) ou les sites d'outre-mer (Péroupères, Grand Gallion, Etang du Gol), sites peu actifs dans les bioessais.

Les variables (couple bioessai_matrice) qui expliquent ces groupements de sites sont également réparties en groupes de proximité : i) ER et AR dans les EIP, ii) HAPL et DL dans l'eau et les SR et iii) les activités GR (toutes matrices) qui marquent principalement l'Iton. Il est notable que cette analyse révèle une distinction entre les informations données par l'activité ER mesurée dans l'eau ponctuelle et les activités stéroïdiennes (ER, AR) dans les EIP. La distance entre ces deux paramètres est à relier aux disparités observées entre POCIS et eau sur certains sites spécifiques, comme l'activité ER sur le Clain (présente dans l'eau et absente dans les POCIS) ou l'Escaut (absente dans l'eau et présente dans les POCIS), ou encore la présence/absence d'activité AR dans les EIP et l'eau, respectivement.

Au bilan, l'analyse comparative montre la pertinence des profils d'activités mesurées à l'aide du panel de bioessais. Elle permet de discriminer les sites les plus contaminés et de les prioriser en vue d'investigations plus fines qui pourraient être entreprises pour identifier l'origine de ces activités.

3.5 Interpretation des activites in vitro au regard de valeurs seuils

La quantification des activités biologiques à l'aide des bioessais *in vitro* soulève la question du seuil de significativité de ces réponses vis-à-vis d'un effet potentiel à un niveau supérieur d'organisation biologique (e.g. impact sur les organismes entiers) et, à plus long terme, d'un risque pour l'environnement.

Dans ce but, la notion de valeurs seuils (effect-based trigger values ou EBT) pour les bioessais in vitro a été récemment développée (Carrere et al 2019). Des valeurs seuils pour différents bioessais in vitro ont ainsi été proposées, sur la base de différents scenarios de risque basés sur les NQE (Kunz et al 2015, Escher et al 2018), les PNECs (concentrations prédites sans effets) (Van der Oost et al 2017) ou à partir de données expérimentales (Kase et al 2018, Brion et al 2019). Des valeurs seuils dans l'eau ont ainsi été proposées pour les activités in vitro caractérisées dans cette étude (Tableau 4). Pour certains bioessais, des valeurs seuils spécifiques sont disponibles (MELN/ER, MDA-kb2/AR et MDA-kb2/aAR); pour d'autres (MDA-kb2/GR et PLHC-1), des valeurs seuils développées pour des bioessais analogues (GR-CALUX, PAH-CALUX, DR-CALUX) sont reportées dans le Tableau 4.

Tableau 4. Valeurs seuils proposées pour les bioessais in vitro utilisées dans cette étude.

Activité in vitro	Valeur seuil pour le bioessai utilisé	Valeur seuil pour un bioessai analogue	Référence
ER	0,56 ng E2-Eq/L (MELN)	-	Brion et al 2019
AR	10 ng DHT-Eq/L (MDA-kb2)	-	Escher et al 2018
aAR	3,46 μg FLU-Eq/L (MDA-kb2)	-	Escher et al 2018
GR	Pas de valeur seuil proposée pour le bioessai MDA-kb2	100 ng DEX-Eq/L (GR-CALUX)	Van der Oost et al 2017
HAPL	Pas de valeur seuil proposée pour le bioessai PLHC-1	150 ng BaP-Eq/L (PAH-CALUX) 62,5 ng BaP-Eq/L (PAH-CALUX) 6.2 ng BaP-Eq/L (PAH-CALUX)	Van der Oost et al 2017 De Baat et al 2020 Escher et al 2018
DR	Pas de valeur seuil proposée pour le bioessai PLHC-1	0,05 ng TCDD-Eq/L (DR-CALUX)	Van der Oost et al 2017

Sur la base de ces valeurs seuils, il est possible de fournir une indication sur le risque en calculant un quotient de risque (RQ) qui correspond au ratio de la valeur de TEQ mesuré dans un échantillon sur la valeur seuil proposée : RQ=TEQ-Bio/EBT. Un RQ supérieur à 1 indique un dépassement de la valeur seuil et donc un risque potentiel pour l'environnement.

Cette approche a été appliquée aux activités mesurées dans les eaux ponctuelles (valeur moyenne entre T0 et T15) et dans les EIP. Le résultat est donné dans le Tableau 5.

Tableau 5. Quotients de risque (RQ) calculés à partir des activités in vitro dans les extraits d'eau et des EIP. Valeurs seuils utilisées pour le calcul des RQ: ER: Brion et al 2019; GR, DL: van der Oost et al 2017; AR, aAR: Escher et al 2018; HAPL: de Baat et al 2020. Code couleur: vert: RQ < 1, rouge: RQ > 1, blanc: non calculé.

			E	AU					P	OCIS	3		SR		
·	ER	GR	AR	aAR	HAP	DL	∑RQ	•	ER	GR	AR	aAR	HAP	DL	∑RQ
Gier	15,7	1,1	0,0	0,0	1,2	0,0	18,0	Gier	1,5	0,0	0,1	0,0	2,0	0,0	3,6
Rosselle	5,2	0,2			3,3	5,3	14,0	Rosselle	18,9	0,0	0,2		4,9	3,0	26,9
Vilaine	5,7	1,0			4,8	0,0	11,5	Vilaine	1,4	0,0	0,0		18,9	4,8	25,1
Jalle	2,9	0,4			2,2	5,8	11,4	Jalle	0,3	0,0	0,0		1,8	0,5	2,5
lton	0,7	8,7			1,7	0,0	11,1	lton	0,1	2,2			0,2	0,5	3,0
Souffel	2,2	0,6			1,6	0,0	4,4	Souffel	7,2	0,0			0,8	1,1	9,1
Clain	2,3	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0	3,6	Clain	0,1	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,4
Tréboul	1,1	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	1,5	Tréboul	0,6	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	1,2
Lazaret	1,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	1,4	Lazaret	0,3	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,8
Gd Gallion	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,9	Gd Gallion	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,3	0,8
Etang Gol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,9	Etang Gol	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,2	0,6
Boralde (ref)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,8	Boralde (ref)	0,2	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,3
Pérou-pères	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,8	Pérou-pères	0,2	0,0	0,0	0,0	0,7	0,2	1,1
Tolzac	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,7	Tolzac	0,5	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,6
Risle	0,1	0,0	0,0	0,0	0,7	0,0	0,7	Risle	0,4	0,0	0,0				0,4
Hers mort	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,5	Hers mort	1,2	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	1,4
Escaut	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,4	Escaut	6,0	0,0	0,0	0,0	0,9	1,2	8,2
Antifer	0,4	0,0	0,0	0,0		0,0	0,4	Antifer	0,5	0,0		0,0	0,5	0,0	1,0
Allier (ref)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	0,0	0,3	Allier (ref)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	0,5
Luech (ref)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,2	Luech (ref)	0,1	0,0	0,0	0,0	4,2	0,0	4,3

L'approche basée sur les RQ permet d'identifier 9 sites présentant au moins un dépassement de la valeur seuil dans les extraits d'eaux et 10 sites pour les EIP.

Parmi les sites identifiés comme étant à risque, 6 sont mis en avant par les deux types d'échantillonnage : Gier, Rosselle, Vilaine, Souffel, Jalle et Iton. Inversement, 7 sites ne présentent aucun dépassement de la valeur seuil quel que soit le type d'échantillonnage : Allier, Antifer, Risle (pas de donnée dans les SR), Tolzac, Pérou-pères, Etang du Gol, Grand Gallion.

En revanche, l'Escaut, l'Hers-mort, le Luech et la Boralde seraient déclassés uniquement sur la base des EIP; inversement, le Clain, le Tréboul et le Lazaret le seraient uniquement par le prélèvement ponctuel. Parmi ces sites, l'Escaut et l'Hers-mort sont emblématiques car ce sont deux sites soumis à de fortes pressions anthropiques et donc a priori multi-contaminés.

D'une manière générale, ces résultats montrent que les RQ dans les extraits EIP et eaux classent de manière similaire 13 sites sur 20.

L'intérêt d'une telle approche basée sur l'utilisation de valeurs seuils a été démontré dans différents contextes en Europe pour la surveillance de la contamination chimique sur la base de bioessais (Van der Oost et al 2017, Hamers et al 2018, Alygizakis et al 2019, De Baat et al 2020). Elle fait partie des recommandations fortes formulées pour l'utilisation des outils biologiques dans la future surveillance DCE (Carrere et al 2019). Dans le cadre de notre étude, en utilisant des proxys pour certains bioessais, nous observons que cette approche permet d'identifier les sites *a priori* multi-contaminés comme étant les plus à risques pour les modes d'actions considérés.

Néanmoins, il convient de noter que le développement de ces valeurs seuils est récent. Pour l'activité ER, les différentes études qui ont proposé des valeurs selon différents scenarios sont très concordantes entre elles, avec des valeurs proches allant de 0.1 à 0.56 ng E2-Eq/L, selon les études et les bioessais considérés (Serra et al 2020). Par exemple, pour le bioessai MELN utilisé dans notre étude, la valeur 0,56 ng E2-Eq/L définie au regard de données expériementales indiquant un effet *in vivo* chez le poisson zèbre (Brion et al 2019) a été éprouvée dans différents contextes (Serra et al 2020, Simon et al, soumis, voir aussi chapitre 3.7.).

Pour d'autres activités *in vitro*, il existe moins de recul et donc plus d'incertitude sur les valeurs seuils proposées. C'est notamment le cas de l'activité HAPL, pour laquelle nous ne disposons pas de valeur seuil dans le bioessai PLHC-1 (cellules de poisson) utilisé dans notre étude et avons utilisé celles publiées pour le bioessai PAH-CALUX (cellules humaines). Pour ce bioessai, trois valeurs différentes (6, 62,5 et 150 ng BaP-Eq/L,) ont été publiées (Tableau 4). La comparaison des RQ dérivés de ces trois valeurs seuils montre un classement des sites qui peut être très différent selon la valeur retenue (Annexe 5). Ce constat indique que, si le concept des valeurs seuils pour interpréter les données *in vitro* au regard d'un risque pour les écosystèmes aquatiques est pertinent, des travaux restent à mener pour améliorer et éprouver certaines valeurs seuils existantes, notamment pour l'activité HAPL *in vitro*.

Dans cette optique, une approche pertinente complémentaire à ce travail consistera à appliquer un bioessai *in vivo* de détection d'effets dioxin-like et développementaux sur embryons de poisson zèbre exposés aux extraits SR générés dans cette étude. La confrontation des données *in vivo* avec les valeurs de TEQ *in vitro* permettra de tester l'hypothèse d'une corrélation positive entre ces deux essais et, sur la base d'une telle corrélation, de tester s'il existe une valeur de BaP-Eq *in vitro* à partir de laquelle un impact toxique est observé à l'échelle *in vivo*. Une telle corrélation a déjà été démontrée pour l'étude de l'activité HAPL de sédiments de rivières, les échantillons les plus actifs dans les deux bioessais présentant également une toxicité développementale marquée chez le poisson zèbre (Aït-Aïssa et al 2015). Cette démarche *in vitro* / *in vivo* a également déjà été utilisée avec succès pour déterminer et éprouver la valeur seuil d'activité estrogénique dans le bioessai MELN (Brion et al 2019).

3.6 ACTIVITE ESTROGENIQUE: COMPARAISON AVEC LES ANALYSES CHIMIQUES

Dans le cadre de l'étude DEMO-EIP du RSP (action RSP4), la recherche d'hormones cestrogènes a été menée par le partenaire LNE dans des échantillons d'eaux (échantillons non filtrés) prélevés à T0 et T15 sur 10 sites communs. Les 3 hormones recherchées, l'estrone (E1, LQ = 0,1 n/L), le 17b-estradiol (E2, LQ = 0,1 ng/L) et l'éthyniloestradiol (EE2, LQ = 0,035 ng/L), font partie des substances de la liste de vigilance (WatchList) de la DCE.

Ces analyses ont montré la présence d'E1 et E2 dans certains échantillons. L'EE2 n'a jamais été détecté (S. Lardy-Fontan, communication personnelle).

Pour permettre la comparaison avec les mesures d'estradiol-équivalents données par le bioessai MELN (TEQ-Bio), ces concentrations ont été converties en E2-Eq chimiques (TEQ-Chem) en appliquant, pour un composé i, un facteur d'activité estrogénique relative (EEFi) à sa concentration (Ci) mesurée dans l'échantillon, selon la relation : E2-Eq-chem=∑(CixEEFi). Le facteur EEFi est déterminé par le ratio entre l'EC20 de l'E2 (molécule de référence) et l'EC20 du composé i.

La Figure 5 présente une comparaison des TEQ-Bio et des TEQ-Chem pour l'activité estrogénique dans les échantillons d'eau.

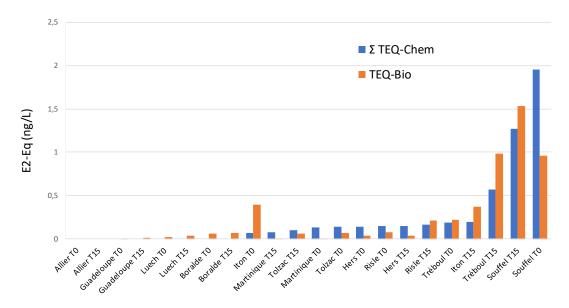


Figure 5. Comparaison des concentrations en E2-Eq mesurées par le bioessai MELN (TEQ-Bio) et de celles prédites par l'analyse de E1, E2 et EE2 (∑ TEQ-Chem) dans 20 échantillons d'eaux prélevés sur 10 sites (mesures à T0 et T15 sur chaque site).

Le résultat montre une excellente cohérence entre le bioessai MELN et l'analyses des hormones oestrogéniques. L'estrone (E1) (quantifié dans 14 échantillons sur 20) et dans une moindre mesure l'estradiol (quantifié dans 7 échantillons sur 20) expliquent de 17% à >100% l'activité mesurée par le bioessai. Ce constat est en accord avec les observations rapportées pour les eaux de surface dans d'autres contextes en Europe (Neale et al 2015, Könneman et al 2018, Käse et al 2018, Serra et al 2020) ou aux Etats-Unis (Conley et al 2017).

Sur certains sites, l'activité prédite par la chimie apparaît néanmoins plus importante que celle mesurée par le bioessai (e.g. Souffel T0, Hers-mort, Risle). Cette différence pourrait venir du fait que les extraits préparés dans les deux analyses sont réalisés sur des échantillons d'eaux différents (fraction dissoute pour les bioessais, fraction totale incluant la phase particulaire pour la chimie) et avec des protocoles d'extraction différents. De fait, la comparaison est effectuée sur des échantillons qui ne sont pas strictement identiques. Néanmoins, les deux approches fournissent une image de la contamination très similaire et identifient de la même manière les 3 sites les plus actifs.

Pour comparer plus avant le diagnostic en termes de risques à partir de ces deux approches, nous avons transcrit les valeur de TEQ en quotient de risque (RQ-Bio) en utilisant la valeur de 0,56 ng E2-Eq/L (Brion et al 2019) et les valeurs de TEQ-Chem en quotient de risque chimique (RQ-Chem) en utilisant la relation RQ-Chem = \sum (TEQ-Chem / NQE) avec des valeurs de NQE de 3,6 ng/L pour l'estrone et 0,4 ng/L pour l'estradiol (Kase et al 2018). Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6. Comparaison des quotients de risques mesurés par le bioessai MELN (RQ-bio) et les analyses de E1 et E2 (RQ-Chem) dans les eaux de surface.

	RQ-Chem	RQ-Bio
Pérou-Pères T0	0,0	0,0
Pérou-Pères T15	0,0	0,0
Grand Gallion T0	0,0	0,0
Grand Gallion T15	0,0	0,0
Souffel T0	3,0	1,7
Souffel T15	2,1	2,7
Iton T0	0,0	0,7
Iton T15	0,4	0,7
Risle T0	0,3	0,1
Risle T15	0,3	0,4
Allier T0	0,0	0,0
Allier T15	0,0	0,0
Hers T0	0,0	0,1
Hers T15	0,0	0,1
Boralde T0	0,0	0,1
Boralde T15	0,0	0,1
Tréboul T0	0,0	0,4
Tréboul T15	0,9	1,8
Luech T0	0,0	0,0
Luech T15	0,0	0,1
Tolzac T0	0,0	0,1
Tolzac T15	0,0	0,1

Le Tableau 6 montre une prédiction du risque similaire entre les deux approches. Seul l'échantillon du Tréboul à T15 apparaît à risque avec le bioessai alors qu'il ne le serait pas au regard des analyses chimiques (RQ-Chem = 0,9).

Au vu de ces résultats, le bioessai *in vitro* MELN apparaît comme une alternative pertinente à l'analyse chimique pour identifier les sites à risque selon les critères DCE. Ce constat rejoint les recommandations faites dans le cadre de différents programmes de surveillance des hormones stéroïdiennes à l'échelle européenne (Käse et al 2018, rapport Aït-Aïssa et al 2018).

3.7 ACTIVITE OESTROGENIQUE *IN VITRO*: COMPARAISON AVEC UN IMPACT *IN VIVO*

Nous avons montré qu'un nombre de sites présentaient une valeur d'activité estrogénique in vitro supérieure à la valeur seuil établie pour le bioessai MELN (Tableau 5). Une approche expérimentale pour éprouver la pertinence de ce seuil consiste, pour un échantillon donné, à mesurer un impact in vivo à l'échelle de l'organisme et à vérifier s'il est correctement prédit par la mesure in vitro. A l'INERIS, cette approche est appréhendée pour l'activité oestrogénique à l'aide du bioessai EASZY basé sur une lignée transgénique de poisson zèbre répondant spécifiquement aux activateurs du récepteur des œstrogènes (Brion et al. 2012). Une comparaison systématique sur un ensemble de 33 eaux de surface et eaux usées a montré qu'au-delà d'une certaine valeur d'E2-Eq in vitro, un effet in vivo était observé (Brion et al. 2019). Cette comparaison a permis de déterminer des valeurs seuils spécifiques du bioessai in vitro considéré, e.g. 0,56 ng E2-Eq/L pour le bioessai MELN utilisé dans notre étude.

Le bioessai EASZY a été appliqué à 9 échantillons d'eaux (extraits) de notre étude, afin d'évaluer l'activité estrogénique *in vivo* des échantillons et de la comparer au diagnostic de risque donné par le bioessai *in vitro* MELN (Tableau 7).

Tableau 7: Comparaison de l'activité estrogénique in vivo (bioessai EASZY) et le risque estrogénique prédit par le bioessai in vitro MELN dans les échantillons d'eaux (prélèvements ponctuels à T0). Les résultats sont exprimés en ng E2-Eg/Ls.

Sites	In vivo (EASZY)	In vitro (RQ MELN)
Gier	Actif	31,0
Vilaine	Actif	9,9
Souffel	Actif	1,7
Jalle	Non actif	3,3
Iton	Non actif	0,7
Antifer	Non actif	0,2
Risle	Non actif	0,1
Pérou-pères	Non actif	0,0
Grand Gallion	Non actif	0,0

Trois des 9 sites examinés, i.e. le Gier, La Vilaine et la Souffel, sont actifs avec le bioessai EASZY. Pour ces 3 sites les niveaux d'activité *in vivo* (6-34 ng E2-Eq/L) sont cohérents à ceux reportés précédemment dans d'autres sites européens (Brion et al 2019). Ces trois sites sont correctement prédits par le bioessai *in vitro* MELN. De manière similaire, 4 des 5 des sites inactifs *in vivo*, l'Iton, la Risle, Pérou-Pères et du Grand Gallion présentent des valeurs d'E2-Eq *in vitro* en deçà de la valeur seuil pour l'activité oestrogénique et donc un risque correctement prédit. Pour ces sites, la confrontation des données *in vivo* et *in vitro* montre donc une cohérence entre les deux bioessais et confirme la pertinence de la valeur seuil déterminée précédemment.

Seul l'échantillon du site de la Jalle donne une indication contraire entre les bioessais puisqu'il apparait non actif *in vivo* et actif *in vitro* avec une valeur d'E2-Eq *in vitro* supérieure à la valeur seuil de 0,56 ng/L. La raison de cette discordance n'est pas connue. Une hypothèse possible suppose la présence dans les extraits de molécules interférentes qui auraient une influence différente sur la réponse oestrogénique dans les deux bioessais. C'est par exemple le cas des polluants agonistes du récepteur AhR, comme les HAP, qui se comportent comme des agonistes dans le bioessai MELN et des antagonistes dans le bioessai EASZY. Le site de la Jalle apparaît parmi les sites contaminés au regard des activités HAPL (Tableau 5), ce qui va dans le sens de cette hypothèse. Il n'est donc pas exclu que ce type de contaminants aient interféré négativement dans le bioessai EASZY.

Dans l'ensemble, ces résultats renforcent la pertinence du diagnostic *in vitro* au regard d'un impact à l'échelle de l'organisme et soulignent l'intérêt du couplage entre bioessais *in vitro* et *in vivo* dans la caractérisation du danger associé aux matrices environnementales. Ils suggèrent également la nécessité d'éprouver et d'affiner les valeurs seuils, par exemple en appliquant cette approche dans d'autres contextes environnementaux et/ou sur différentes matrices.

4. APPLICABILITE POUR LA SURVEILLANCE CHIMIQUE DES MILIEUX : RECOMMANDATIONS

Sur la base d'un retour d'expérience et des données acquises dans le cadre de cette étude, un ensemble de recommandations relatives à l'utilisation des bioessais est proposé afin de les mettre en œuvre dans un contexte de surveillance opérationnelle de la qualité chimique des eaux de surface.

4.1 STRATEGIE D'ECHANTILLONNAGE

Un des objectifs de l'étude était de comparer l'apport du prélèvement EIP par rapport au prélèvement ponctuel pour établir le diagnostic de la qualité chimique des eaux de surface à l'aide d'un panel d'outils *in vitro*. Les principaux constats qui ressortent de cette étude sont synthétisés dans le Tableau 8.

Tableau 8. Evaluation comparée des différents d'échantillonnage pour la mise en évidence de activités PE et DL in vitro

	Prélèvement ponctuel d'eau	POCIS	SR
Intégration dans le temps	Non	Oui	Oui
Capacité de concentration de l'échantillon (facteur d'enrichissement maximal testé dans les bioessais)	+ (50 X)	++ (200 X)	+++ (>1000 X)
Quantification dans l'eau	Oui	Semi- quantificatif	Oui
	ER	ER	HAPL
Activités pertinentes à mesurer	GR	GR	DL
-	HAPL	AR	aAR

Sur la base des résultats acquis, les constats suivants peuvent être faits :

- l'échantillonnage ponctuel d'eau fournit un diagnostic cohérent au regard de la typologie des sites investigués (i.e. sites de référence pas ou peu actifs, sites sous pression urbaine ou industrielle très actifs);
- les EIP confirment, dans une majorité de cas, le diagnostic établi sur la base des analyses des prélèvements ponctuels d'eau de surface. Cependant, ils apportent une information complémentaire aux échantillons ponctuels pour des activités mesurées sur certains sites: détection d'activités ER sur des sites non révélés par l'eau; mise en évidence d'activités AR non détectées dans l'eau ponctuelle; amélioration de la quantification d'activité HAPL par les SR;
- les POCIS sont adaptés et pertinents pour la mise en évidence d'activités endocriniennes de type ER, AR et GR ;
- les SR constituent un mode d'échantillonnage à privilégier pour détecter et quantifier les activités HAPL et DL.

Les différents types d'échantillonnage s'avèrent globalement équivalents dans leurs performances mais aussi complémentaires sur certains aspects plus spécifiques. Différentes stratégies d'échantillonnage peuvent être mises en œuvre pour une surveillance basée sur les bioessais.

Ainsi, dans une démarche de comparaison de sites à large échelle, le prélèvement ponctuel, plus facile à mettre en œuvre sur le terrain, s'avère suffisant pour identifier les sites plus contaminés. La limite de cette approche reste qu'elle ne fournit qu'une image de la contamination à un temps donné et ne peut ne pas rendre compte d'une contamination transitoire ou, comme ce fut le cas pour le Gier à T15, sous-estimer une contamination après un épisode de crue (phénomène de dilution).

Les EIP offrent l'avantage de concentrer les polluants présents dans l'eau et ainsi augmenter la sensibilité de la détection des substances actives vis-à-vis des bioessais utilisés. De plus, ils fournissent une mesure intégrée dans le temps, donc plus représentative de la contamination du site. Cela a été notamment observé pour l'Escaut canalisé ou l'Hers-mort, deux sites de mauvaise qualité chimique non identifiés comme tels par le prélèvement ponctuel. Néanmoins, les POCIS fournissent une quantification plus incertaine des concentrations de TEQ-Bio dans l'eau, du fait des taux d'échantillonnage pas nécessairement connus des substances détectées et/ou influencés par les conditions d'échantillonnage. Du point de vue logistique, leur déploiement sur le terrain reste plus contraignant car ils nécessitent de se déplacer deux fois sur un même site. L'utilisation des EIP peut donc être préconisée dans une démarche d'investigation plus fine pour caractériser plus avant la contamination de sites spécifiques.

4.2 IMPORTANCE DES CONTROLES QUALITE

Cette étude a mis en avant l'importance des procédures d'échantillonnage et d'extraction sur la qualité des blancs (blancs terrain et blancs procédure) pour garantir l'exploitabilité des données fournies par les bioessais.

Les extractions de SR et de POCIS ont été réalisées respectivement à l'Ifremer et à l'Inrae de Lyon. Si les protocoles d'extraction des EIP dédiés aux bioessais étaient définis au départ de l'étude, un travail préalable de mise en place des méthodes a été nécessaire pour s'assurer de leur validité (notamment absence d'interférence avec les bioessais) au sein de ces laboratoires.

Pour les membranes de silicone (SR), une mise au point méthodologique préalable sur la base de membranes blanches dopées ou non avec des polluants modèles a permis de calibrer le protocole d'extraction et de vérifier sa bonne compatibilité avec les bioessais de détection d'activité estrogénique (ER), androgénique (AR) et HAP-like (AhR). Au bilan, il y a un bon recouvrement des matrices dopées et aucune contamination des blancs permettant une analyse quantitative fiable des activités biologiques mesurées dans les SR.

Les essais préalables d'extraction des POCIS ont généré des blancs positifs pour les activités estrogéniques et HAP-like. La source de ces contaminations a été identifiée et des changements opérés (changement des tubulures, utilisation de solvants neufs pour l'élution). Le problème a été résolu pour l'activité oestrogénique. Cependant une activité HAP-like résiduelle subsiste dans les blancs d'extraction des POCIS. Cette activité HAP-

like semble inévitable car associée à la phase d'adsorption (HLB) des POCIS obtenus commercialement.

Les problèmes soulevés par les blancs posent la question des pratiques à adopter pour la préparation d'extraits destinés spécifiquement aux bioessais (e.g. utiliser du matériel et des solvants dédiés). L'extraction telle qu'elle est pratiquée en analyse environnementale en routine peut générer des contaminations qui ne sont pas nécessairement problématiques pour les analyses chimiques utilisant la chromatographie associée à la spectrométrie de masse, qui sont spécifiques et sélectives, mais qui peuvent interférer avec la réponse des bioessais qui évaluent la réponse à un mélange global (extrait organique). Dans une perspective de déploiement de ces outils en routine, la prise en compte des facteurs susceptibles d'engendrer des contaminations d'extrait au cours de la préparation d'échantillon est particulièrement importante à considérer par les laboratoires d'analyses habitués à traiter des échantillons environnementaux en vue de réaliser des analyses ciblées sur des polluants individuels.

4.3 STRATEGIE DE BIOESSAIS

L'étude a porté sur la quantification de certaines activités biologiques, avec un nombre limité de bioessais complémentaires. Cette stratégie s'est avérée efficace pour discriminer et classer les sites les plus impactés sur la base des activités biologiques mesurées *in vitro* qui ont permis de rendre compte de la contamination des eaux de surface par des composés PE et DL (i.e. démarche de criblage, identification de hotspots de contamination). Si cette étude fait la preuve de l'intérêt d'une telle approche, il est important de souligner qu'elle peut favorablement évoluer sous plusieurs aspects afin d'obtenir une vision plus exhaustive des contaminants du milieu et de leurs effets, sur la base par exemple de modes d'actions fréquemment identifiés dans les eaux de surface (e.g. Busch et al 2016). Cela passera en particulier par :

- l'intégration d'autres outils bioanalytiques prenant en compte d'autres modes d'actions afin d'augmenter le diagnostic sur les types de contaminants en présence. C'est le cas par exemples des pesticides inhibiteurs du photosystème II, d'autres perturbateurs endocriniens actifs sur d'autres voie de signalisation impliqué dans le métabolisme (PXR) et les régulations endocriniennes (e.g. PR, GR), pour lesquels des bioessais in vitro sont établis;
- l'intégration de bioessais *in vivo* de toxicité (e.g. tests embryo-larvaire sur poisson zèbre, daphnies, algues...) pour ancrer les réponses bio-analytiques vis-à-vis d'une (éco)toxicité globale des échantillons. Ces approches combinant bio-essais *in vitro* et *in vivo* ont été éprouvées et sont préconisées pour une démarche plus holistique de la surveillance des masses d'eau (Sonavane et al 2018, Brack et al 2019) ;
- l'intégration de réponse à l'échelle de l'organisme pour la définition et l'amélioration des valeurs seuils. L'approche *in vitro / in vivo* développée pour définir et éprouver les valeurs d'activité estrogénique pourrait être étendue à d'autres mécanismes d'action pour lesquels il existe un besoin d'éprouver les valeurs seuils actuellement proposées, comme c'est le cas pour l'activité HAPL *in vitro*. Une limite à cette approche reste la disponibilité de bioessais *in vivo* pour certains modes d'action et pour lesquels la signification toxicologique en termes d'impact pour les organismes aquatiques est moins bien connue que celles médiées par les récepteurs ER notamment.

5. CONCLUSIONS

Cette étude a montré l'opérationnalité et la pertinence d'un panel de bioessais *in vitro* de détection de polluants de type PE et DL pour prioriser un ensemble de 20 sites d'eaux de surface représentatifs de différents contextes de contamination et pressions anthropiques. Une analyse des forces et faiblesses a permis de proposer des recommandations et d'identifier des points d'améliorations sur les procédures à mettre en œuvre pour une utilisation optimale de ces outils et de de leur interprétation dans un contexte de surveillance opérationnelle.

L'interprétation des profils d'activité *in vitro* au regard de valeurs seuils disponibles a montré la pertinence d'un classement des sites basé sur le risque. Pour l'activité estrogénique *in vitro*, la valeur seuil préétablie s'est avérée robuste pour classer les sites au regard de données de chimie analytique ciblant des polluants prioritaires et prédire un effet *in vivo* chez le poisson. Pour les autres activités *in vitro*, des incertitudes sur les valeurs seuils ont été identifiées qu'il s'agira de réduire pour permettre une interprétation rationnelle des activités biologiques mesurées.

Enfin des points d'amélioration de la stratégie mise en œuvre ont été identifiés : définitions d'une batterie de bioessais plus complète, amélioration des grilles d'interprétation. Plusieurs outils bio-analytiques sont d'ores et déjà disponibles et reconnus par la communauté scientifique, aux niveaux français et européen et pourraient être rapidement mis en œuvre dans cette perspective de raffinement du diagnostic de la contamination chimique des milieux. Leur mise en œuvre dans les réseaux de surveillance peut être recommandée de façon plus systématique pour acquérir de l'information sur l'état de contamination des milieux et éprouver ces méthodes dans un contexte opérationnel de surveillance ou de contrôle d'enquête.

L'intégration des bioessais dans les stratégies de surveillance vise à répondre aux limites actuelles de la surveillance de la qualité chimique des eaux de surface basée sur un nombre fini de substances jugées prioritaires. Elle répond aux exigences d'une meilleure compréhension de cette contamination et des risques associés pour l'environnement, et ce à des coûts économiques moindres. Elle répond enfin au besoin identifié de développement d'approches holistiques de l'évaluation de l'état chimique des eaux dans le cadre de la DCE.

6. VALORISATION

Publications

Brion F, De Gussem V, Buchinger S, Hollert H, Carere M, Porcher JM, Piccini B, Féray C, Dulio V, Könemann S, Simon E, Werner I, Kase R, Aït-Aïssa S. Monitoring estrogenic activities of waste and surface waters using a novel in vivo zebrafish embryonic (EASZY) assay: comparison with in vitro cell-based assays and determination of effect-based trigger values. Environment International, 2019, art. 104896.

Chardon C, et al. Bioassay-based profiling of steroid- and dioxin-like activities in French river waters using grab and integrative sampling. *Article en préparation*.

Communications en congrès

Chardon C, Maillot-Maréchal E, Piccini B, Daval A, Miège C, Noëm-Chéry E, Tixier C, Allan I, Brion F, Aït-Aïssa S. Bioassay-based profiling of steroid- and dioxin-like activities in French river waters using grab and integrative sampling. Présentation orale au 29ème congrès SETAC-Europe, Helsinki, Mai 2019.

Chardon C, Maillot-Maréchal E, Piccini B, Daval A, Miège C, Tixier C, Allan I, Togola A, Lardy-Fontan S, Brion F, Aït-Aïssa S. Biosurveillance d'activités stéroïdiennes et dioxin-like dans les eaux de surfaces françaises par une approche couplant bioessais et échantillonnage ponctuel et passif. Présentation orale au Congrès de la Société Française d'Ecotoxicologie (SEFA), Juillet 2020.

7. REFERENCES

- Aït-Aïssa S, Laskowski S, Laville N, Porcher JM, Brion F. (2010) Anti-androgenic activities of environmental pesticides in the MDA- kb2 reporter cell line. Toxicology in vitro, 24(7), 1979-1985.
- Aït-Aïssa S, Creusot N, Brion F (2015a) Démarche bio-analytique pour l'identification de polluants émergents dans les milieux aquatiques Application aux sédiments de l'étude prospective. Rapport INERIS-ONEMA, 32p + annexes.
- Aït-Aïssa S, Creusot N (2015b) Approche bio-analytique : validation de la mesure de l'activité œstrogénique dans les matrices environnementales Revue bibliographique. Rapport AQUAREF-INERIS DRC-15-136927-12327A, 2015 32 p.
- Aït-Aïssa et al (2018) Contribution à la validation de la mesure de l'activité oestrogénique in vitro dans les eaux de surface et les eaux usées Rapport final AQUAREF 2018 DRC-18-159227-11202B 17 p + annexes.
- Altenburger R, Aït-Aïssa S, Antczak P, Backhaus T, Barcelo D, Seiler TB, Brion F, Busch W, Chipman K, López de Alda M, de Aragão Umbuzeiro G, Escher BI, Falciani F, Faust M, Focks A, Hilscherova K, Hollender J, Hollert H, Jäger F, Jahnke A, Kortenkamp A, Krauss M, Lemkine G, Munthe J, Neumann S, Schymanski E, Scrimshaw M, Segner H, Slobodnik J, Smedes F, Subramaniam K, Teodorovic I, Tindall AJ, Tollefsen KE, Walz KH, Williams TD, Van den Brink PJ, van Gils J, Vrana B, Zhang X, Brack W (2015) Future water quality monitoring Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. Science of the Total Environment, 512-513:540-551.
- Alygizakis NA, Besselink H, Paulus GK, Oswald P, Hornstra LM, Oswaldova M, Medema G, Thomaidis NS, Behnisch PA and Slobodnik J (2019) Characterization of wastewater effluents in the Danube River Basin with chemical screening, in vitro bioassays and antibiotic resistant genes analysis. Environment International 127: 420-429.
- Brack W, Aït-Aïssa S, Backhaus T, Dulio V, Escher BI, Faust M, Hilscherova K, Hollender J, Hollert H, Munthe J, Posthuma L, Seiler TB, Slobodnik J, Teodorovic I, Tindall AJ, de Aragão Umbuzeiro G, Zhang X, Altenburger R. (2019) Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. Environmental Sciences Europe, 31:10
- Brion F, Le Page Y, Piccini B, Cardoso O, Tong SK, Chung BC, Kah O. (2012) Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures In Vivo Using Transgenic,521 (cyp19a1b-GFP) Zebrafish Embryos. Plos One 2012, 7, (5) e36069.
- Brion F, De Gussem V, Buchinger S, Hollert H, Carere M, Porcher JM, Piccini B, Féray C, Dulio V, Könemann S, Simon E, Werner I, Kase R, Aït-Aïssa S. (2019) Monitoring estrogenic activities of waste and surface waters using a novel in vivo zebrafish embryonic (EASZY) assay: comparison with in vitro cell-based assays and determination of effect-based trigger values. Environment International, 130, art. 104896

- Busch W, Schmidt S, Kuhne R, Schulze T, Krauss M and Altenburger R (2016) Micropollutants in European rivers: A mode of action survey to support the development of effect-based tools for water monitoring. Environmental Toxicology and Chemistry 35(8): 1887-1899.
- Carere M et al. (2019) Proposal for Effect-Based Monitoring and Assessment in the Water Framework Directive. Report to the CIS WG Chemicals on the outcome of the work performed in the subgroup on effect-based methods (EBMs). Mandate 2016-2018.
- Conley JM, Evans N, Cardon MC, Rosenblum L, Iwanowicz LR, Hartig PC, Schenck KM, Bradley PM and Wilson VS (2017) Occurrence and In Vitro Bioactivity of Estrogen, Androgen, and Glucocorticoid Compounds in a Nationwide Screen of United States Stream Waters. Environmental Science & Technology 51(9), 4781-4791.
- Creusot N, Aït-Aïssa S, Tapie N, Pardon P, Brion F, Sanchez W, Thybaud E, Porcher JM, Budzinski H. (2014) Identification of synthetic steroids in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges based on a bioanalytical approach and passive sampling. Environmental Science & Technology, 48(7), 3649–3657
- Creusot N, Tapie N, Piccini B, Balaguer P, Porcher JM, Budzinski H, Aït-Aïssa S. (2013) Distribution of steroid- and dioxin-like activities between sediments, POCIS and SPMD in a French river subject to mixed pressures. Environmental Science and Pollution research, 20(5)2784-2794
- De Baat ML, Van der Oost R, Van der Lee GH, Wieringa N, Hamers T, Verdonschot PFM, De Voogt P, Kraak MHS (2020) Advancements in effect-based surface water quality assessment. Water Research. 183, art. 116017.
- Dévier MH, Mazellier P, Aït-Aïssa S., Budzisnki H. (2011) New challenges in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures. Comptes Rendus Chimie, 14(7-8), 766-779.
- Escher BI, Ait-Aissa S, Behnisch PA, Brack W, Brion F, Brouwer A, Buchinger S, Crawford SE, Du Pasquier D, Hamers T, Hettwer K, Hilscherova K, Hollert H, Kase R, Kienle C, Tindall AJ, Tuerk J, van der Oost R, Vermeirssen E and Neale PA (2018) Effect-based trigger values for in vitro and in vivo bioassays performed on surface water extracts supporting the environmental quality standards (EQS) of the European Water Framework Directive. Science of the Total Environment 628-629: 748-765.
- Hamers T, Legradi J, Zwart N, Smedes F, de Weert J, van den Brandhof EJ, van de Meent D and de Zwart D (2018) Time-Integrative Passive sampling combined with TOxicity Profiling (TIPTOP): an effect-based strategy for cost-effective chemical water quality assessment. Environmental Toxicology and Pharmacology 64: 48-59.
- Harman C, Allan IJ and Vermeirssen ELM (2012) Calibration and use of the polar organic chemical integrative sampler-a critical review. Environmental Toxicology and Chemistry 31(12): 2724-2738.
- Hashmi MAK, Krauss M, Escher BI, Teodorovic I and Brack W (2020) Effect-Directed Analysis of Progestogens and Glucocorticoids at Trace Concentrations in River Water. Environmental Toxicology and Chemistry 39(1): 189-199.
- Kase R, Javurkova B, Simon E, Swart K, Schlüsener M, Buchinger S, Könemann S, Escher BI, Carere M, Dulio V, Aït-Aïssa S, Hollert H, Valsecchi S, Polesello S, Behnisch P, di Paolo C, Olbrich D, Tavazzi S, Sychrova E, Gundlach M, Schlichting R, Leborgne L, Clara M, Scheffknecht C, Marneffe Y, Chalon C, Tusil P, Soldan P, von Danwitz B, Schwaiger J, Moran Palao A, Bersani F, Perceval O, Kienle C, Vermeirssen E, Hilscherova K, Reifferscheid G, Werner I. (2018) Screening and risk management solutions for steroidal oestrogens in surface and wastewater. Trends in Analytical Chemistry, 102, 343-358.
- Köneman S, Kase R, Simon E, Stwart K, Buchinger S, Schlüsener M, Hollert H, Escher BI, Werner I, Aït-Aïssa S, Dulio V, Valsecchi S, Polesello S, Schaan S, Behnisch P, Javurkova B, Perceval O, Di Paolo C, Clayton H, Olbrich D, Tavazzi S, Sychrova E, Gundlach M, Schlichting R, Leborgne L, Clara M, Scheffknecht C, Marneffe Y, Chalon C, Tušil P, Soldan P, von Danwitz B, Schwaiger J, Moran Palao A, San Martín Becares I, Bersani F, Vermeirssen E, Hilscherova K, Reifferscheid G, Carere M (2018) Effect-based and chemical analytical methods to monitor oestrogens under the EuropeanWater Framework Directive. Trends in Analytical Chemistry, 102, 225-235

- Kunz PY, Kienle C, Carere M, Homazava N and Kase R (2015) In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 106: 107-115.
- Mathon B, Togola A, Mazzella N, Lardy-Fontan S, Dabrin A, Allan I, Ghestem JP, Tixier C, Gonzalez JL, Dherret L, Yari A, Richard L, Moreira A, Eon M, Delest B, Noel-Chery E, El Mossaoui M, Alasonati E, Miège C Surveillance prospective évaluation de la pertinence des échantillonneurs intégratifs passifs (EIP) pour la surveillance des milieux aquatiques Campagnes in situ mises en œuvre Rapport AQUAREF 2019 23 p+Annexes.
- Moschet C, Vermeirssen ELM, Singer H, Stamm C and Hollender J (2015) Evaluation of in-situ calibration of Chemcatcher passive samplers for 322 micropollutants in agricultural and urban affected rivers. Water Research 71: 306-317.
- Neale P, Aït-Aïssa S, Brack W, Creusot N, Denison MS, Deutschmann B, Hilscherová K, Hollert H, Krauss M, Novák J, Schulze T, Seiler TB, Serra H, Shao Y, Escher BI (2015) Linking in vitro effects and detected organic micropollutants in surface water using mixture toxicity modeling. Environmental Science & Technology, 49 (24) 14614-14624.
- Schriks M, van Leerdam JA, van der Linden SC, van der Burg B, van Wezel AP and de Voogt P (2010) High-Resolution Mass Spectrometric Identification and Quantification of Glucocorticoid Compounds in Various Wastewaters in The Netherlands. Environmental Science & Technology 44(12): 4766-4774.
- Serra H, Brion F, Chardon C, Budzinski H, Schulze T, Brack W, Aït-Aïssa S. (2020) Estrogenic activity of surface waters using zebrafish- and human-based in vitro assays: the Danube as a case-study. Environmental Toxicology and Pharmacology, 78, art 103401.
- Sonavane M, Schollée J, Hidasi A, Creusot N, Brion F, Suter MJF, Hollender J, Aït-Aïssa S. (2018) An integrative approach combining passive sampling, bioassays and effect-directed analysis to assess the impact of wastewater effluent. Environmental Toxicology and Chemistry, 37 (8), 2079-2088.
- Staub PF, Dulio V, Gras O, Perceval O, Aït-Aïssa S, Aminot Y, Budzinski H, Lardy-Fontan S, Lestremau F, Miège C, Munschy C, Togola A, Vulliet E (2019) A Prospective Surveillance Network for improved identification of contaminants of emerging concern (CECs) and testing of innovative monitoring tools in France. NORMAN Bulletin, 6, 21-24.
- Tousova Z, Vrana B, Smutna M, Novak J, Klucarova V, Grabic R, Slobodnik J, Giesy JP and Hilscherova K (2019) Analytical and bioanalytical assessments of organic micropollutants in the Bosna River using a combination of passive sampling, bioassays and multi-residue analysis. Science of the Total Environment 650: 1599-1612.
- van der Oost R, Sileno G, Suarez-Munoz M, Nguyen MT, Besselink H and Brouwer A (2017) SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part I-Model design and effect-based trigger values. Environmental Toxicology and Chemistry 36(9): 2385-2399.
- Vindimian E (2020). REGTOX : macro Excel™ pour dose-réponse. https://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html, accédé le 17/06/2020.
- Weizel A, Schlusener MP, Dierkes G and Ternes TA (2018) Occurrence of Glucocorticoids, Mineralocorticoids, and Progestogens in Various Treated Wastewater, Rivers, and Streams. Environmental Science & Technology 52(9): 5296-5307.

Annexe 1. Protocoles d'extraction des eaux, des membranes SR et des POCIS

Préparation des extraits d'eau par extraction en phase solide (SPE)

Les échantillons de 4L d'eau sont décongelés à température ambiante puis filtrés (Filtre GF/C, 47 mm de diamètre, 1,2 μm, Whatman) afin de séparer les matières en suspension. Les filtres sont pesés avant filtration, sont séchés et pesés à nouveau après filtration, puis sont conservés à -20°C. L'extraction des échantillons d'eau est réalisée sur des colonnes de type HLB (Hydrophobic-Lipophilic Balanced, 200mg, OASIS Waters). Les colonnes sont préparées avec dans l'ordre 5 mL de dichlorométhane (DCM, Milipore, 99,8%), 5 mL d'un mélange DCM/méthanol (MeOH, VWR chemicals, 99,9%) (v/v), 5mL de MeOH, puis 5 mL d'eau ultrapure. 4mL d'eau ultrapure sont disposés au-dessus de la phase pour éviter son assèchement. Les échantillons passent sur les colonnes au goutte à goutte. Après extraction, la phase est séchée durant 2 h. L'élution est réalisée avec 10 mL de MeOH, 10 mL d'un mélange DCM/MeOH (v/v), puis 10 mL de DCM. Les extraits sont conservés à -18°C. Un blanc d'extraction (4 L d'eau ultrapure) est réalisé lors de chaque série d'extractions.

A température ambiante, les extraits sont passés aux ultra-sons durant 5 minutes, puis évaporés à sec dans un évaporateur rotatif (EZ-2plus, Genevac). L'extrait sec est repris dans 1,2 mL du mélange DCM/MeOH (50/50 v/v) dans un tube ambré de 1,5 mL pour conservation. Un aliquote de cet extrait est évaporé sous flux d'azote et repris dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour utilisation dans les bioessais. Un suivi gravimétrique est réalisé afin d'utiliser les masses exactes pour le calcul des facteurs de concentration.

Extraction des membranes SR (réalisées à l'IFREMER de Nantes)

Les membranes SR sont décongelées durant 30 minutes à température ambiante. Elles sont plongées dans deux pots d'eau ultra-pure successivement à l'aide de pinces. Elles sont essuyées sur toute la longueur et sur les deux faces avec un chiffon non pelucheux, préalablement nettoyés dans deux bains de MeOH passés aux ultrasons 15 minutes. Les membranes propres et sèches sont pesées puis placées dans un pot en verre ambré de 280 mL. Une première extraction au cyclohexane (environ 200 mL) est réalisée durant une nuit. Le solvant est transvasé dans un ballon de 500 mL. Les membranes sont extraites pendant 4 h minimum avec du MeOH. Il est transvasé dans le même ballon de 500 mL. Les parois du pot sont rincées avec du MeOH et transvasé dans le même ballon. Le ballon est évaporé jusqu'à environ 3 mL, ensuite transféré dans un tube gradué. Les parois du ballon sont rincées avec 2 mL de MeOH le ballon de 500 mL. Les extraits sont évaporés à 1mL puis transférés en ampoule en rinçant le tube avec 2 fois 500 µL de MeOH. Ensuite, un aliquote de 300 µL est transféré dans un tube ambré avec insert, puis évaporé sous flux d'azote jusqu'à l'obtention d'un volume de 10 μL environ. 100μL de diméthylsulfoxyde (DMSO) y sont ajoutés. Le restant de DCM/MeOH est évaporé sous flux d'azote durant quelques minutes. Un suivi gravimétrique est réalisé : les extraits sont pesés lors de chaque transfert de tube afin d'utiliser les masses exactes pour le calcul des facteurs de concentration.

Les extraits sont conservés à -20°C avant utilisation pour les bioessais.

Extraction des POCIS (réalisées à l'Inrae de Lyon)

Pour chaque série d'extraction, deux blancs d'extraction sont réalisés: un blanc d'extraction sans phase et blanc d'extraction avec phase (masse équivalente à 4 POCIS environ 800 mg) afin d'évaluer toute contamination externe à l'échantillon apportée par la manipulation. Pour 8 sites, un POCIS non exposé (blanc terrain) est disponible, il est extrait seul.

L'extraction des POCIS est réalisée selon le protocole suivant.

Les membranes externes en PES sont rincées à l'eau distillée avant de transférer la phase HLB dans des cartouches en verre contenant un disque fritté. Les phases HLB de 3 à 4 POCIS exposés par site (selon les sites) sont mises en commun dans une même cartouche. Après séchage durant 24 h, la phase est pesée puis un second disque fritté est ajouté au-dessus de celle-ci. L'élution séquentielle de la phase HLB est effectuée avec 7 x 5 mL de MeOH, 7 x 5 ml de DCM/MeOH (50/50 v/v) puis 7 x 5 mL de DCM pour les POCIS exposés et les blancs d'extraction. Pour les blancs terrain (1 POCIS), les mêmes séquences sont réalisées avec uniquement 2 x 5 mL de solvant. Les extraits sont évaporés à sec dans un évaporateur rotatif (EZ-2plus, Genevac).

L'extrait sec est rincé trois fois avec 300µL du mélange DCM/MeOH (50/50 v/v). Les deux premiers volumes de rinçage sont transférés dans un tube ambré avec insert et évaporés successivement, le dernier volume de rinçage est disposé dans le même tube pour conservation (-18°C) jusqu'à l'analyse. Un aliquote de cet extrait est évaporé sous flux d'azote et repris dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour utilisation dans les bioessais. Un suivi gravimétrique est réalisé afin d'utiliser les masses exactes pour le calcul de la masse de phase HLB par volume d'extrait.

Annexe 2. Activités ER et HAPL dans les blancs procédure et les blancs terrain

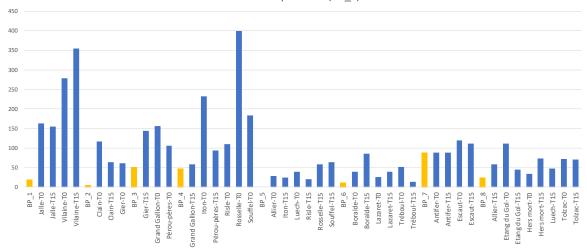
Tableau 9 : Activités oestrogénique et HAP-like (HAPL) dans les blancs procédures. n.d. : activité non détectée.

	Matrice	N° extraction	Activité estrogénique (E2-Eq)	Activité HAPL (BaP-Eq)
Blancs	EAU	1	0,05	19
Procédure	(ng/L)	2	0,06	6
		3	n.d.	52
		4	n.d.	48
		5	0,39	n.d.
		6	n.d.	13
		7	n.d.	89
		8	n.d.	24
	POCIS	1	n.d.	476
	(ng/g)	2	n.d.	1470
	SR	1	n.d.	19
	(ng/g)	2	n.d.	n.d.
	2,	3	n.d.	n.d.
		4	n.d.	n.d.

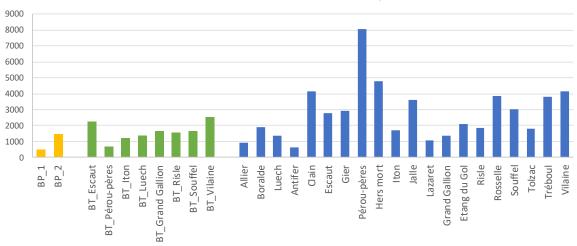
Tableau 10 : Activités oestrogénique et HAP-like (HAPL) dans les blancs terrain des POCIS et des SR. Ces BT pour les membranes SR ont été réalisés sur tous les sites. En revanche, des BT pour les POCIS n'ont pu être effectués que pour 9 sites, dont 8 ont été extraits (BT Clain : perte de la phase HLB au cours de l'étape extraction).

	Matrice	Site	Activité estrogénique (E2-Eq)	Activité HAPL (BaP-Eq)
Blancs	POCIS	Escaut	n.d.	2247
terrain	(ng/g)	Guadeloupe	n.d.	661
		Iton	n.d.	1218
		Luech	n.d.	1341
		Martinique	n.d.	1675
		Risle	n.d.	1835
		Souffel	n.d.	1661
		Vilaine	n.d.	2527
	SR	Allier	n.d.	65
	(ng/g)	Antifer	n.d.	1
		Boralde	n.d.	0,4
		Clain	n.d.	26
		Escaut	n.d.	3
		Etang du Gol	n.d.	n.d.
		Gier	n.d.	n.d.
		Grand Gallion	n.d.	n.d.
		Hers mort	n.d.	1
		Iton	n.d.	1
		Jalle	n.d.	n.d.
		Lazaret	n.d.	1
		Luech	n.d.	4
		Pérou-pères	n.d.	n.d.
		Rosselle	n.d.	n.d.
		Souffel	n.d.	4
		Tolzac	0,03	2
		Tréboul	n.d.	2
		Vilaine	n.d.	n.d.

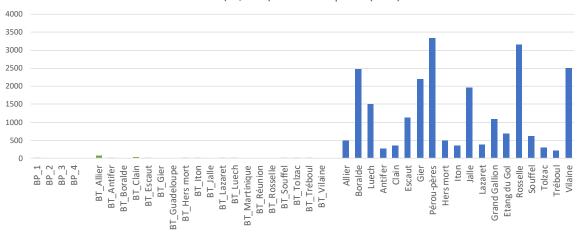
EAUX: Activité HAPL en **ng BaP-Eq/L** dans les blancs procédure (BP, barres jaunes) et les extraits d'eaux (barres bleues). Les données sont groupées par série d'extraction avec le BP correspondant (BP x)



POCIS: Activité HAPL en ng BaP-Eq/g dans les blancs procédure (BP, jaune), les blancs terrain (BT, vert) et les POCIS exposés (bleu)



SR: Activité HAPL en ng BaP-Eq/g dans les blancs procédure (BP, jaune), les blancs terrain (BT, vert) et les SR exposés (bleu)



Annexe 3. Extraits d'eaux ponctuels : variabilité entre les deux temps de prélèvement

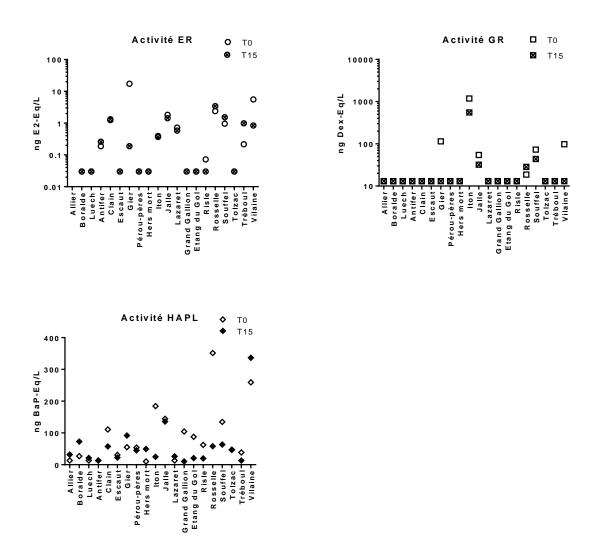


Figure 6. Activités ER, GR et HAPL dans les prélèvements ponctuels d'eaux réalisés à 0 (T0) et à 15 jours (T15).

Annexe 4. Activité HAPL dans les deux membranes SR déployées sur chaque site

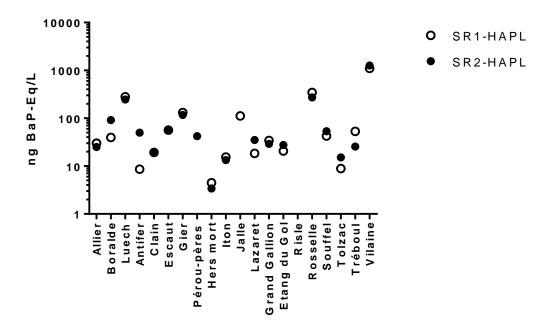


Figure 7. Activité HAPL dans les SR1 et SR2. Un seul réplicat analysé sur la Jalle et Pérou-pères.

Annexe 5. Influence de la valeur seuil sur le RQ calculé pour l'activité HAPL dans les extraits de SR

Tableau 11. Influence de la valeur seuil (ici pour PAH-CALUX) sur le RQ calculé pour l'activité HAPL dans les extraits de SR (Vert : RQ< 1 ; rouge : RQ>1)

6	62,5	150
Escher	De Baat	Van der
2018	2020	Oost 2017
4,4	0,4	0,2
10,5	1,1	0,4
42,3	4,2	1,8
4,7	0,5	0,2
3,1	0,3	0,1
9,1	0,9	0,4
20	2	0,8
6,8	0,7	0,3
0,6	0,1	0,0
2,3	0,2	0,1
17,9	1,8	0,7
4,3	0,4	0,2
5,1	0,5	0,2
3,9	0,4	0,2
49,7	5	2,1
7,7	0,8	0,3
1,9	0,2	0,1
6,3	0,6	0,3
190,3	19,1	7,9
	Escher 2018 4,4 10,5 42,3 4,7 3,1 9,1 20 6,8 0,6 2,3 17,9 4,3 5,1 3,9 49,7 7,7 1,9 6,3	Escher 2018 De Baat 2020 4,4 0,4 10,5 1,1 42,3 4,2 4,7 0,5 3,1 0,3 9,1 0,9 20 2 6,8 0,7 0,6 0,1 2,3 0,2 17,9 1,8 4,3 0,4 5,1 0,5 3,9 0,4 49,7 5 7,7 0,8 1,9 0,2 6,3 0,6