

Etude prospective 2012 sur les contaminants émergents



***Etude prospective 2012 :  
Apport des outils  
biologiques (bioessais et  
biomarqueurs) pour le  
diagnostic de la  
contamination des milieux  
aquatiques***

*Rapport final*

*Selim Aït-Aïssa, François Brion, Nicolas Creusot, Wilfried Sanchez*  
*INERIS*

Juillet 2014

## Contexte de programmation et de réalisation

---

Cette étude vise, à travers plusieurs actions, à appuyer les gestionnaires dans la démarche de caractérisation et de réduction des émissions de substances dangereuses vers les masses d'eau. Elle a pour objectif l'amélioration de la connaissance des pressions polluantes (et notamment des rejets ponctuels dans les milieux aquatiques, ce qui s'inscrit dans l'action n°5 du plan micropolluants 2010 – 2013 du MEDDE), l'aide au diagnostic et à la mise en œuvre des stratégies de réduction et de mesures de gestion ciblées vis-à-vis des sources polluantes.

Convention ONEMA-INERIS 2012-2013, Action n°4 Déploiement d'outils biologiques dans les eaux de surface de métropole

## Les auteurs

---

*Selim Ait-Aïssa, Ingénieur étude & recherche*  
*Selim.ait-aissa@ineris.fr*

*François Brion, Ingénieur étude & recherche*  
*Francois.brion@ineris.fr*

*Nicolas Creusot, Ingénieur étude & recherche*  
*Nicolas.creusot@ineris.fr*

*Wilfried Sanchez, Ingénieur étude & recherche*  
*Wilfried.sanchez@ineris.fr*

*Unité Ecotoxicologie in vitro et in vivo*  
*INERIS*  
*Parc Technologique Alata B.P. 2*  
*60550 Verneuil-en-Halatte*

## Les correspondants

---

*Onema : Olivier Perceval, DAST, olivier.perceval@onema.fr*

*Référence du document : DRC-14-127339-06620A*

Approbation INERIS	Approbation ONEMA
M. Eric Thybaud Direction DRC Date d'approbation	M. Olivier Perceval Direction DAST Date d'approbation

<b>Droits d'usage :</b> Couverture géographique : Niveau de lecture [plusieurs choix possibles] : Nature de la ressource <b>[plusieurs choix possibles] :</b>	<b>accès libre</b> national experts document
--	---

## PRÉAMBULE

Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

La responsabilité de l'INERIS ne pourra être engagée si les informations qui lui ont été communiquées sont incomplètes ou erronées.

Les avis, recommandations, préconisations ou équivalent qui seraient portés par l'INERIS dans le cadre des prestations qui lui sont confiées, peuvent aider à la prise de décision. Etant donné la mission qui incombe à l'INERIS de par son décret de création, l'INERIS n'intervient pas dans la prise de décision proprement dite. La responsabilité de l'INERIS ne peut donc se substituer à celle du décideur.

Le destinataire utilisera les résultats inclus dans le présent rapport intégralement ou sinon de manière objective. Son utilisation sous forme d'extraits ou de notes de synthèse sera faite sous la seule et entière responsabilité du destinataire. Il en est de même pour toute modification qui y serait apportée.

L'INERIS dégage toute responsabilité pour chaque utilisation du rapport en dehors de la destination de la prestation.

	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	Selim Ait-Aïssa François Brion Nicolas Creusot Wilfried Sanchez	Jean-Marc Porcher	Eric Thybaud
Qualité	Ingénieurs Recherche – Unité Ecotoxicologie in vitro et in vivo Direction des Risques Chroniques	Responsable de l'Unité Ecotoxicologie in vitro et in vivo Direction des Risques Chroniques	Responsable pôle Impacts et Dangers sur le vivant Direction des Risques Chroniques
Visa			

SOMMAIRE

<b>Résumé</b> .....	<b>6</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>Synthèse opérationnelle</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>14</b>
<b>2. Les sites d'études</b> .....	<b>16</b>
<b>3. Caractérisation de la contamination des eaux de surface par une approche bio-analytique</b> .....	<b>18</b>
3.1. Contexte et objectifs.....	18
3.2. Méthodologie.....	19
3.2.1. Démarche globale.....	19
3.2.2. Echantillonnage et préparation des échantillons.....	19
3.2.3. Bioessais <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	20
3.3. Activités PE et DL dans les rivières françaises : bioessais <i>in vitro</i> .....	20
3.3.1. Etablissement de profils d'activités <i>in vitro</i> .....	20
3.3.2. Etablissement de profils de dangers et priorisation de sites.....	23
3.3.3. Contribution de polluants actifs ciblés par les analyses chimiques.....	26
3.4. Activités PE et DL dans les rivières françaises : bioessais <i>in vivo</i> sur embryons de poisson zèbre.....	27
3.4.1. Activités œstrogéniques.....	28
3.4.2. Activités dioxin-like dans les sédiments de rivières françaises.....	30
3.4.3. Discussion sur l'utilisation des bio-essais sur embryons de poisson zèbre.....	32
3.5. Conclusions sur l'approche bio-analytique <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	33
<b>4. Impacts sur les poissons sauvages : réponses de biomarqueurs</b> .....	<b>34</b>
4.1. Contexte et méthodes.....	34
4.2. Résultats.....	36
4.2.1. Perturbation du métabolisme des xénobiotiques.....	36
4.2.2. Neurotoxicité.....	36
4.2.3. Perturbation endocrinienne.....	37
4.2.4. Immunotoxicité.....	38
4.3. Conclusion sur les biomarqueurs.....	39
<b>5. Conclusion générale</b> .....	<b>40</b>
<b>6. Bibliographie</b> .....	<b>41</b>
<b>7. Annexes</b> .....	<b>43</b>



## Résumé

L'étude prospective mise en œuvre en 2012 avait pour objectif principal d'acquérir de l'information sur l'occurrence environnementale de polluants non pris en compte par la réglementation actuelle (i.e. polluants émergents et/ou peu surveillés) à travers le suivi de 159 stations réparties sur l'ensemble des bassins hydrographiques français (métropole et DOM). En complément des analyses chimiques dans le sédiment et les eaux de surfaces, un volet « outils biologiques innovants » a également été mis en œuvre sur 20 sites en métropole. Ces outils comportent d'une part un panel de bioessais *in vitro* et *in vivo* utilisés dans une approche bio-analytique permettant la détection spécifique de composés perturbateurs endocriniens et *dioxin-like* ; d'autre part, des biomarqueurs permettant d'évaluer l'impact *in situ* de la contamination sur les goujons peuplant ces sites.

L'approche bio-analytique montre une contamination ubiquitaire des rivières françaises par des contaminants de type perturbateur endocrinien (PE) et *dioxin-like* (DL) avec des niveaux d'activité qui varient selon les sites, les compartiments (sédiment vs colonne d'eau) et les activités considérées. Les niveaux de contamination sont généralement proches de ceux rencontrés dans les cours d'eau européens à l'exception de certains sites que l'on peut juger comme préoccupants en raison de leur forte contamination par des PE et/ou DL ainsi que par leurs profils toxicologiques atypiques (e.g., activités glucocorticoïdes). Il est important de noter que certains de ces sites sont actuellement classés en bon état écologique et/ou chimique selon les critères de la DCE. Concernant les biomarqueurs, ils confirment un impact potentiel sur les goujons, en particulier sur les sites les plus impactés en termes d'exposition aux PE, identifiés à travers l'approche bio-analytique.

Plus globalement cette étude montre l'opérationnalité des outils biologiques innovants mis en œuvre pour caractériser la contamination chimique du milieu aquatique et l'impact sur les poissons. Les données complètent les analyses chimiques dans la mesure où elles révèlent des sites contaminés par des composés PE ou DL qui ne sont pas pris en compte actuellement dans les analyses chimiques ciblées. Sur la base de ces résultats on pourra préconiser l'utilisation de ces outils pour aider à l'identification de polluants émergents et pour la surveillance des masses d'eau.

Mots clés (thématique et géographique) : outils bio-analytiques ; perturbateurs endocriniens ; composés dioxin-like ; biomarqueurs poisson ; surveillance environnementale.

---

### **Abstract**

The large national screening study that took place in 2012 aimed at increasing the knowledge on environmental occurrence of non regulated pollutants (i.e. emerging and/or not monitored pollutants) through the chemical screening of 159 French sites. In addition to chemical analyses, biological tools including a range of *in vitro* and *in vivo* bioanalytical assays as well as fish biomarkers were deployed at 20 selected sites. The bioanalytical approach revealed an ubiquitous contamination by endocrine disrupters and dioxin-like substances. The contamination profiles varied according to sites, compartments (i.e. sediment versus dissolved phase water) and the type of biological activity measured. Overall, the contamination levels are similar with those generally reported in European rivers, although some hot-spot sites have been revealed as regards to high activities (endocrine disrupters and dioxin-like) and/or non-typical profiles (e.g. glucocorticoid activity). It is noteworthy that some of these sites are currently classified as good ecological and/or chemical status according to WFD criteria. Fish biomarkers confirmed a potential impact on wild gudgeons, especially at the highly contaminated sites, as revealed by the bioassays.

Overall, this study shows the suitability and applicability of such innovative biological tools to characterize the chemical contamination and its potential impacts on wild fish. These data provide complementary information as regards to chemical analyses since they identify sites contaminated by chemicals that are currently not taken into account by targeted chemicals analyses. On the basis of such information, one could recommend the use of such biological tools to help the identification of emerging pollutants and for environmental monitoring of water bodies.

Key words (thematic and geographical area) : bioanalytical tools; endocrine disrupters; dioxin-like compounds ; fish biomarkers ; environmental monitoring.

---

## **Synthèse opérationnelle**

### **1. Contexte de l'étude prospective.**

L'étude prospective réalisée en 2012 a été initiée par la direction de l'eau et de la biodiversité (DEB) du MEDDE dans le cadre de l'action 16 du plan d'action national pour lutter contre la pollution des milieux aquatiques (Plan Micropolluants) prévoyant la mise à jour des listes de substances à surveiller. Elle fait également résonance à l'étude prospective prévue dans le plan national sur les résidus de médicaments dans les eaux (mai 2011) visant à rechercher des résidus de médicaments dans les eaux. Les résultats de cette étude visent à contribuer à la réflexion qui doit être menée par les agences de l'eau et les offices de l'eau pour mettre à jour la liste des substances pertinentes à surveiller de manière régulière sur un nombre de point limité du RCS, dans leurs futurs programmes de surveillance.

Dans le cadre de cette étude, il a été décidé de mettre en œuvre des outils biologiques innovants sur un nombre restreint de sites pour évaluer la contamination chimique des milieux sur la base de réponses biologiques et déterminer l'opérationnalité de ces outils pour la surveillance.

### **2. Contexte et Objectifs du travail portant sur les outils biologiques dans le cadre de l'étude prospective**

La surveillance de la qualité chimique des masses d'eau est actuellement réalisée au travers d'analyses chimiques ciblant des composés définis, à priori, comme prioritaires ou pertinents sur la base de leur (éco)toxicité. Cependant, ces analyses ne fournissent qu'une vision partielle de la contamination environnementale. En effet, ces analyses ne ciblent qu'un nombre réduit de composé au regard de la diversité des contaminants présents dans les milieux aquatiques et ne peuvent pas prendre en compte les effets de mélange ne fournissant ainsi qu'une évaluation partielle de la contamination chimique et des dangers (éco)toxiques associés.

Parallèlement à ces approches, des outils biologiques innovants ont été développés et permettent de palier aux limites inhérentes à la chimie analytique. L'utilisation d'outils biologiques basés sur le mécanisme d'action des toxiques (e.g. bioessais et biomarqueurs) peut fournir des informations nouvelles dans l'évaluation de la qualité chimique des milieux aquatiques, tant sur la connaissance et la caractérisation des contaminants d'intérêt (éco)toxicologique (e.g. perturbateurs endocriniens, composés dioxin-like) que sur leurs impacts à l'échelle de l'organisme au laboratoire (bioessais *in vivo*) ou dans le milieu naturel (biomarqueurs sur espèces autochtones).

L'objectif principal de nos travaux était de statuer sur l'opérationnalité de ces outils et sur leur intérêt pour la surveillance des milieux.

### **3. Déroulement de l'étude**

Dans le cadre de l'étude prospective, des outils biologiques ont été déployés sur une vingtaine de sites en métropole. Il s'agissait d'une part de bioessais *in vitro* et *in vivo* utilisés dans une démarche bio-analytique permettant la détection spécifique et la quantification de composés de type perturbateurs endocriniens (PE) et dioxin-like (DL), d'autre part de biomarqueurs sur des poissons prélevés *in situ* permettant d'évaluer l'impact sur les organismes peuplant ces milieux.

#### **3.1. Choix des sites**

Un ensemble de 20 sites parmi les 115 sites cours d'eau de métropole de l'étude prospective a été sélectionné. La mesure des biomarqueurs nécessitant la sélection d'un organisme sentinelle, c'est cette contrainte qui a orienté le choix des sites. Le goujon a été retenu comme espèce sentinelle. Les

20 sites retenus couvrent l'ensemble des pressions identifiées dans l'étude prospective : pression urbaine, agricole, industrielle, sites classés en mauvais état écologique et sites de référence.

### 3.2. Echantillonnage.

#### *3.2.1. Eaux de surface et sédiments*

Les échantillons de sédiment analysés correspondent à ceux prélevés et préparés (lyophilisation et tamisage) pour la campagne d'analyses chimiques.

L'échantillonnage de la colonne d'eau a été réalisé à l'aide de capteurs passifs de type POCIS (*Polar Organic Compounds Integrative Samplers*) permettant une mesure intégrée de la contamination sur l'ensemble de la période d'échantillonnage. L'extraction des sédiments et des POCIS a été réalisée selon des méthodologies préalablement validées pour l'extraction d'une diversité de classes chimiques présentant une large gamme de polarité.

#### *3.2.2. Poissons*

Les prélèvements de goujons adultes, mâles et femelles, ont été réalisés par pêche à l'électricité entre le mois d'août et le mois d'octobre 2012 afin de disposer d'individus hors de la période de reproduction et de limiter l'impact de l'échantillonnage sur le peuplement des sites étudiés. Au final, seuls 14 sites sur les 20 ont pu être échantillonnés du fait de l'absence de goujons au moment de la pêche et/ou des mauvaises conditions météorologiques (e.g., débit trop fort dans la rivière).

### 3.3. Outils bio-analytiques et biomarqueurs

Un panel de bioessais *in vitro* et *in vivo* basé sur le mécanisme d'action des substances a été utilisé afin de dresser des profils d'activités toxicologiques (activités PE ou dioxin-like) et fournir un premier niveau de diagnostic sur les familles de composés actifs présents.

Les bioessais *in vitro* sont basés sur l'utilisation de cultures cellulaires humaines ou ichthyennes permettant la détection de perturbateurs endocriniens (œstrogènes, (anti)androgène, glucocorticoïdes, ligands du Pregnane X Receptor ou PXR) et dioxin-like. En parallèle, deux bio-essais *in vivo* sur des embryons de poisson zèbre ont été utilisés pour la détection de xéno-œstrogènes et de composés dioxin-like.

Le second volet de l'étude porte sur l'évaluation des effets induits par les différents stress présents sur les sites chez le poisson grâce à l'utilisation d'une approche multi-biomarqueurs. Les biomarqueurs sont des réponses biologiques mesurées au sein d'un organisme reflétant l'interaction entre l'organisme étudié et son milieu de vie. Ici, un ensemble de biomarqueurs relatifs à différentes fonctions physiologiques et/ou mécanismes d'action des contaminants a été mesuré (i.e. la défense vis-à-vis des polluants environnementaux ; l'altération neurotoxique ; la reproduction ; l'immunité ; la gestion de l'énergie).

## **4. Principaux résultats**

Le panel de bio-essais *in vitro* et *in vivo* mis en œuvre au sein d'une démarche de bio-analyse sur des extraits de sédiment et d'eau de surface a permis d'apporter des informations nouvelles et pertinentes en dressant un bilan de la contamination des systèmes aquatiques par des familles de polluants émergents à activité perturbateurs endocriniens et *dioxin-like*.

Les résultats montrent qu'il existe une forte occurrence environnementale de composés à activité dioxin-like dans les eaux de surface et plus encore dans les sédiments quel que soit le bassin hydrographique et le type de pression anthropique. Ce constat rejoint celui fait via les analyses chimiques. Cependant, les analyses chimiques ciblées de 20 HAP n'expliquent que très partiellement les activités biologiques liées à la présence de ces composés. Il est important de noter que ces activités biologiques mesurées dans des lignées cellulaires se confirment *in vivo* chez l'embryon de poisson zèbre. Pour les sites les plus contaminés, ces composés induisent des altérations du développement qui sont typiques de ces substances.

L'autre enseignement de cette étude concerne la contamination ubiquiste de l'environnement par des contaminants à activité perturbateur endocrinien quel que soit le bassin hydrographique et le type de

pression anthropique. Nos résultats montrent des activités de type perturbateur endocrinien qui sont multiples. En effet, elles ne sont pas restreintes aux composés œstrogéniques plus fréquemment ciblés puisque des activités androgéniques, anti-androgéniques, glucocorticoïdes, PXR-like ont été aussi quantifiées. La nature et le niveau de contamination varient selon le site ainsi que selon le compartiment investigué pour un site donné. Il est important de noter que pour certains sites, les perturbateurs endocriniens détectés induisent des réponses biologiques au niveau moléculaire, biochimiques et histologiques chez les poissons zèbre au laboratoire ou chez les goujons peuplant ces sites témoignant des dangers et des risques que font peser les PE sur les milieux aquatiques. Comme pour les composés dioxin-like, les analyses n'expliquent que très faiblement les réponses biologiques mesurées dans les bio-essais. Ce point démontre l'intérêt de ces outils et de cette approche pour caractériser la contamination des milieux aquatiques par les PE qui ne sont pas pris en compte dans les listes des substances à surveiller.

Au delà de ce constat, cette démarche permet de hiérarchiser les sites sur la base des profils de réponses toxicologiques et d'identifier des sites fortement contaminés ou présentant des profils de contamination atypiques. Il est remarquable de constater que parmi ces sites, certains présentent un bon état écologique et/ou chimiques selon les critères de la DCE alors qu'ils peuvent être considérés comme préoccupant sur la bases des activités et des réponses biologiques mesurés dans notre étude. Les outils biologiques apportent donc de l'information supplémentaire sur la qualité des eaux au regard des outils réglementaires traditionnels.

Sur ces sites, des investigations supplémentaires pourraient être engagées pour identifier les molécules responsables des activités et des effets et pour évaluer aussi les risques écotoxicologiques pour les populations.

## 5. Préconisations

Sur la base de cette étude, différentes préconisations peuvent être formulées pour utiliser ces outils dans une démarche globale de caractérisation de la contamination chimique des milieux par les perturbateurs endocriniens et composés dioxin-like (figure 1).

Dans le cadre d'une surveillance à grande échelle on pourra privilégier dans un premier temps l'emploi de bio-essais basés sur les mécanismes d'actions des substances chimiques qui permettent un diagnostic le plus large possible et qui soit suffisamment facile à mettre en œuvre pour une utilisation à haut-débit. En ce sens, les outils biologiques *in vitro* sont particulièrement adaptés. En outre, le diagnostic peut se faire sur la base d'un échantillonnage des matrices environnementales (eaux de surface, sédiments) qui est facilement réalisable contrairement à l'échantillonnage des poissons qui est plus demandeurs en ressources et moyens et parfois soumis à des aléas climatiques par exemple. Si ces outils sont performants, ils présentent un certains nombre de limites. Ainsi, dans le cadre de cette étude, des différences de réponses entre les modèles cellulaires (*in vitro*) et les modèles embryonnaires de poisson zèbre (*in vivo*) ont été constatées notamment pour les activités œstrogéniques. Ces différences reflètent en partie des différences inter-espèces, i.e., des différences de réponses entre des modèles humains et de poisson. Ce constat soulève la question du choix des modèles biologiques à intégrer dans le panel de bio-essais à mettre en œuvre. On pourra préconiser à plus long terme l'intégration de modèles cellulaires poissons pour l'ensemble des activités biologiques recherchées dans cette étude notamment pour une évaluation plus pertinente des dangers vis-à-vis des milieux aquatiques.. Ces modèles sont en cours de développement et de validation et restent pour le moment dans un contexte de recherche. A noter que certains des modèles cellulaires humains utilisés dans cette étude font actuellement l'objet de travaux d'inter-comparaison, de normalisation au niveau européen et international favorisant leurs reconnaissances dans un contexte réglementaire.

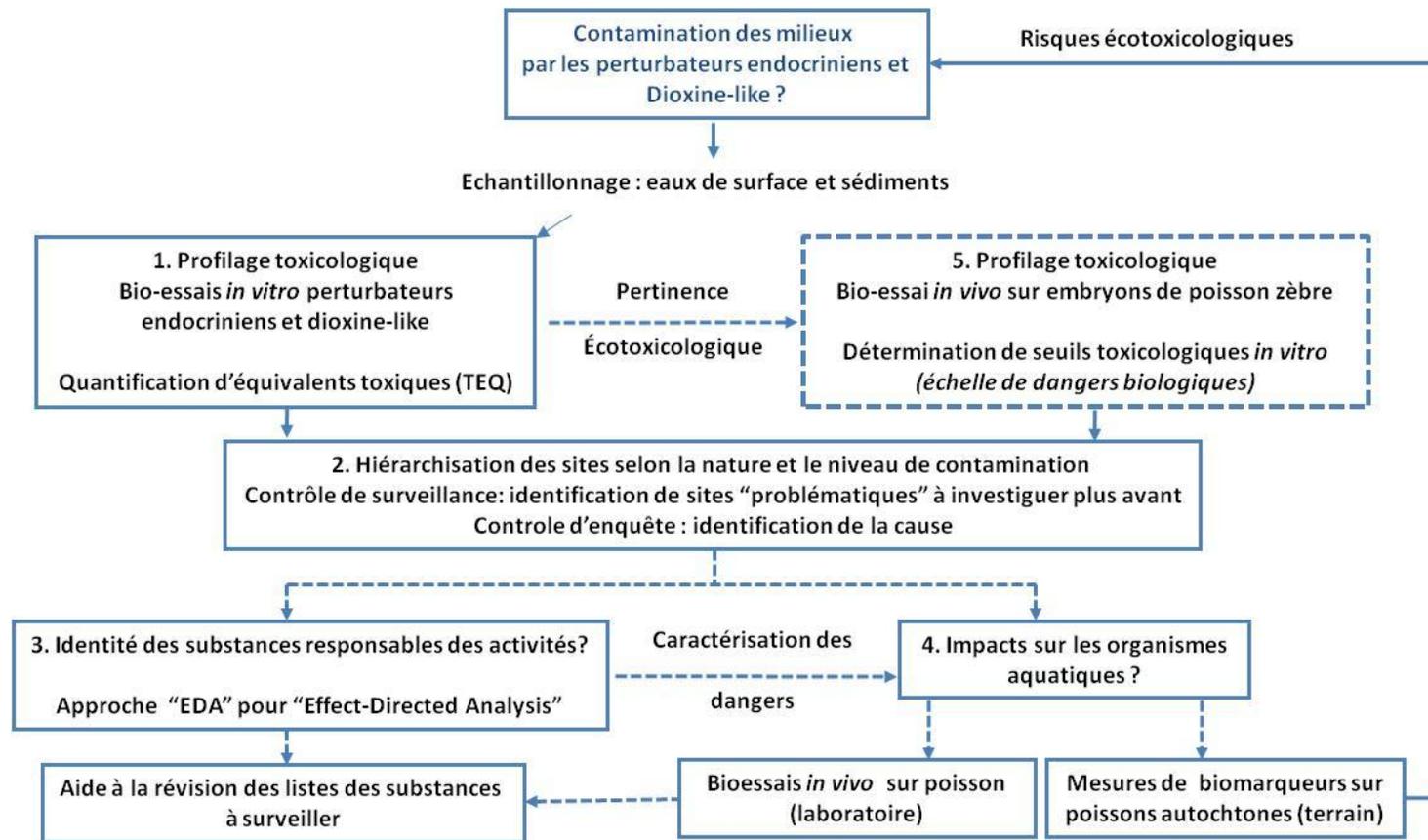
Ces bio-essais *in vitro* permettent une quantification d'équivalents toxiques qui servent à la hiérarchisation des sites. Néanmoins, une limite réside dans l'interprétation écotoxicologique de ces valeurs en termes d'effets biologiques. C'est pour cette raison que la comparaison des données obtenues *in vitro* et *in vivo* permettra à terme la détermination de seuils toxicologiques *in vitro* afin d'établir une échelle de danger biologique.

Même si l'interprétation des données *in vitro* en terme de danger reste un enjeu de recherche, elles permettent d'identifier des sites préoccupants du point de vue de la contamination chimique des milieux par les perturbateurs endocriniens et les composés dioxin-like.

Dans un deuxième temps, des investigations plus poussées sur les sites préoccupants peuvent être engagées afin :

- 1) d'identifier les substances responsables des activités biologiques : Cette démarche peut reposer sur l'utilisation d'une approche combinant outils biologiques et analyses chimiques (approche EDA « effect directed analysis »).
- 2) d'évaluer les réponses biologiques induites par les polluants chez des poissons. Cette étape passe soit par des expérimentations au laboratoire sur des embryons de poissons zèbres à partir d'extraits organiques soit en conduisant des études *in situ* sur les populations de poissons autochtones (mesure de marqueurs biologiques).

Au sein de la démarche, ces deux approches ne s'opposent pas et répondent à des objectifs différents (identification des causes, contrôle de surveillance). Même si cette approche globale nécessite d'évoluer (exemple : intégration de nouveaux modèles biologiques, normalisation des modèles, etc.) on peut noter qu'elle est d'ores et déjà opérationnelle et peut être mise en œuvre dans des programmes de surveillance des milieux aquatiques afin d'intégrer des informations relatives à la contamination chimique des milieux par les PE et les DL qui sont insuffisamment pris en compte actuellement.



**Figure 1.** Proposition d'un schéma organisationnel d'utilisation des outils biologiques dans un contexte opérationnel de biosurveillance de la contamination des milieux aquatiques par des polluants perturbateurs endocriniens et dioxin-like. Cette approche permet de caractériser, sur la base de réponses biologiques, la contamination chimique des milieux par des polluants qui ne sont que très partiellement intégrés aux listes des substances à surveiller (**item 1**). Elle permet d'investiguer et de hiérarchiser un grand nombre de sites en fonction de leurs profils toxicologiques (**item 2**). Des investigations plus poussées peuvent alors être conduites pour aboutir à i) l'identité des substances responsables des activités biologiques (**item 3**) ii) une caractérisation des effets biologiques chez les organismes par la conduite de bio-essais in vivo de laboratoire et/ou l'analyse de marqueurs biologiques sur les poissons sauvages (**item 4**) dans une optique de caractérisation des risques écotoxicologiques. Dans la phase d'intégration des outils biologiques in vitro pour la biosurveillance, l'**item 5** permet d'apporter des éléments d'interprétation des équivalents toxiques via la détermination de seuils de réponses permettant d'élaborer une échelle des dangers biologiques. Dans une démarche opérationnelle de surveillance des milieux, ces bioessais in vivo s'envisagent sur des sites très contaminés ou présentant des profils toxicologiques atypiques nécessitant des investigations plus poussées ainsi que sur des substances pures identifiées via l'EDA (**item 4**).



## **1. INTRODUCTION**

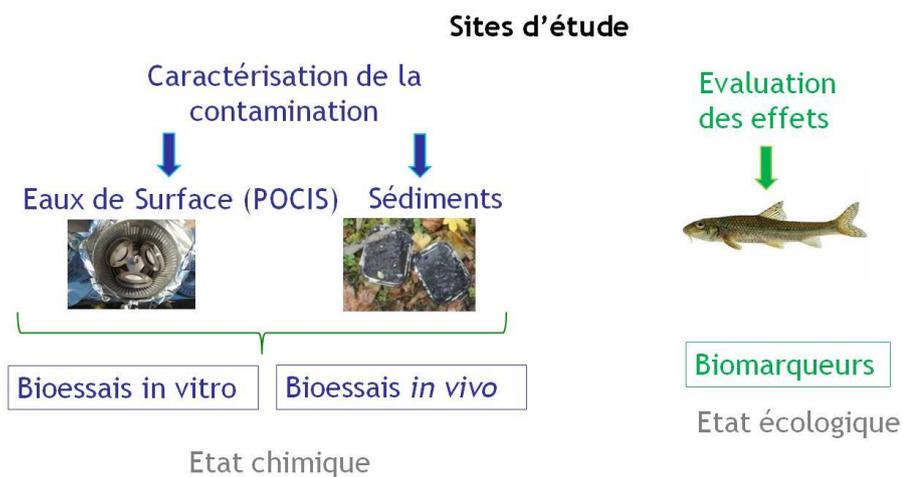
Le plan national micropolluants 2010-2013 prévoyait, dans son action 16, la mise à jour des listes de substances qui doivent faire l'objet d'une surveillance. Par ailleurs, le plan national sur les résidus de médicaments dans les eaux publié en mai 2011, prévoit une étude prospective permettant de rechercher des résidus de médicaments dans les eaux. C'est dans ce cadre que la direction de l'eau et de la biodiversité (DEB) du MEDDE a initié en 2012 une étude prospective dans les eaux de surface (continentales et littorales) de métropole et des DOM, et dans les eaux souterraines des DOM (une étude similaire dans les eaux souterraines de métropole s'est déroulée en 2010-2011).

Les principaux objectifs de cet exercice étaient 1) d'acquérir des connaissances, représentatives à l'échelle nationale, sur la présence de "polluants émergents", 2) de disposer de données complémentaires sur des molécules déjà surveillées, mais dont les matrices sur lesquelles s'opère aujourd'hui la surveillance ne sont pas pertinentes ou alors pour lesquelles les limites de quantification de la surveillance méritent des examens complémentaires.

Il s'agit donc d'une opération de recherche et développement d'ampleur nationale. Elle permettra d'identifier les substances à enjeu en matière de développement de connaissances toxicologiques et écotoxicologiques des substances et de techniques analytiques. Cette démarche d'étude prospective permet de contribuer aux réflexions sur les futurs programmes de surveillance.

Dans le cadre cette étude nationale, il a été décidé de mettre en œuvre des outils biologiques sur un nombre défini de sites dans les eaux de surface en métropole. Dans le cadre de ses recherches, l'INERIS développe depuis plusieurs années des outils biologiques (bioessais *in vitro* et *in vivo*, biomarqueurs) dédiés à l'étude des effets perturbateurs endocriniens chez le poisson et à leur utilisation pour la surveillance des milieux. En complément des approches chimiques, qui renseignent sur la présence de substances individuelles, et des approches écologiques qui sont très intégratrices et relativement peu spécifiques, l'utilisation d'outils biologiques innovants basés sur mécanisme d'action des toxiques (e.g. bioessais et biomarqueurs) peut prétendre fournir des informations nouvelles dans l'évaluation de la qualité chimique des milieux aquatiques, tant sur la connaissance et la caractérisation des contaminations d'intérêt (éco)toxicologique (e.g. perturbateurs endocriniens, composés dioxin-like) que sur leurs impacts à l'échelle de l'organisme au laboratoire (bioessais *in vivo*) ou dans le milieu naturel (biomarqueurs sur espèces autochtones). Ainsi, en contribuant à une meilleure caractérisation de la contamination et plus globalement des pressions environnementales, ces outils pourraient permettre d'orienter les investigations à mener afin d'identifier et de prioriser des polluants émergents en vue de réduire leur émission et leur diffusion dans l'environnement.

Des outils biologiques innovants ont été déployés sur une vingtaine de sites cours d'eau en métropole (Figure 2). Il s'agit d'une part de bioessais *in vitro* et *in vivo* utilisés dans une démarche bio-analytique permettant la détection spécifique et la quantification de composés de type perturbateurs endocriniens (PE) et dioxin-like (DL), d'autre part de biomarqueurs sur poissons prélevés *in situ* permettant d'évaluer l'impact sur les organismes peuplant ces milieux. L'objectif principal était de statuer sur l'opérationnalité de ces outils et de leur intérêt en complément des analyses chimiques réalisées dans le cadre de cette étude.



**Figure 2.** Stratégie de déploiement des outils biologiques dans le cadre de l'étude prospective 2012.

Après une description de la méthodologie utilisée pour la sélection des sites d'études, le présent rapport s'articule autour de 2 grandes parties : la première portant sur le déploiement de l'approche bio-analytique basée sur l'utilisation conjointe de bioessais *in vitro* et *in vivo* pour caractériser la contamination dans les sédiments et la colonne d'eau ; la deuxième présentant la mise en œuvre des biomarqueurs *in situ* chez le goujon.

## 2. LES SITES D'ÉTUDES

Un ensemble de 20 sites parmi les 115 sites cours d'eau de métropole de l'étude prospective a été sélectionné pour permettre l'application des bioessais *in vitro* et *in vivo* et des biomarqueurs. La mesure des biomarqueurs nécessitant la sélection d'un organisme sentinelle, c'est cette contrainte qui a orienté le choix de sites. Afin de faciliter la compréhension et l'interprétation des réponses biologiques mesurées, il est apparu préférable de sélectionner une espèce déjà maîtrisée par l'unité d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo* de l'INERIS. Les espèces potentielles sont alors le chevaine (*Leuciscus cephalus*), le gardon (*Rutilus rutilus*), le goujon (*Gobio gobio*), l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) et le chabot (*Cottus sp.*).

Une première étape du travail de sélection de l'espèce sentinelle et des sites d'étude a consisté en l'analyse, pour les 115 sites cours d'eau retenus pour l'étude prospective, des peuplements piscicoles. Ce travail a été réalisé grâce à la banque IMAGES de l'ONEMA. Les résultats sont présentés dans le [tableau 1](#).

**Tableau 1.** Nombre de sites permettant l'échantillonnage des espèces utilisables pour la mesure des biomarqueurs parmi les sites de l'étude prospective (cours d'eau)

	Chevaine	Gardon	Goujon	Epinoche	Chabot
Nb de sites	23	22	37	2	4

Au regard de ces résultats, le goujon a été retenu comme sentinelle dans le cadre de cette étude. Il s'agit d'un poisson dont la physiologie et le potentiel en écotoxicologie sont largement documentés. Cette connaissance permet une bonne compréhension des résultats. De plus, pour cette espèce, déjà utilisée par l'INERIS dans d'autres études, l'ensemble des biomarqueurs proposés est déjà disponible évitant ainsi un lourd travail de développement méthodologique.

La liste des 37 sites ainsi retenus a été soumise aux délégations interrégionales de l'ONEMA afin d'une part de confirmer la présence de goujon, compatible avec nos objectifs de prélèvements (20 poissons adultes), et d'autre part d'identifier les sites qui font l'objet d'un prélèvement dans le cadre du réseau de contrôle de surveillance (RCS) permettant ainsi une rationalisation de l'échantillonnage.

Cette seconde étape a permis d'écartier un site sur lequel le prélèvement de goujons s'avère difficile. Ainsi, parmi les 36 sites restant, 20 ont été sélectionnés pour échantillonnage en 2012 au cours de la période août-octobre. Ces 20 sites permettent de couvrir l'ensemble des pressions préalablement identifiées dans l'étude prospective (pression urbaine, agricole, industrielle), des sites classés en mauvais état écologique et des sites de référence ([Tableau 2](#)).

**Tableau 2.** Liste des sites retenus pour le déploiement des outils biologiques dans le cadre de l'étude prospective 2012.

Code agence	Code Onema	Abréviation	Site	Type	Bassin*
42080	05190124	AUV	Auvézère à Ségur-le-Chateau	Pression agricole	AG
4034650	04636703	BED	Bedat à Saint Laure	Pression urbaine	LB
006880	05170022	BRA	Bramerit à Grandjean	Référence	AG
03096650	03510249	CHE	Chée à Merlaut	Mauvais état écologique	SN
104000	05472016	GAR	Garonne en amont du Lot	Pression agricole	AG
156950	05312018	HER	Hers mort à Saint Sauveur	Mauvais état écologique	AG
4127000	04530108	JOU	Jouanne à Forcé	Pression industrielle	LB
4004000	04430045	LOB	Loire à Bas-en-Basset	Pression agricole	LB
4015000	04420380	LOI	Loire à Briennon	Pression urbaine	LB
4134700	04490500	LOM	Loire à MontJean sur Loire	Pression agricole	LB
4009000	04420376	LOV	Loire à Veauchette	Pression urbaine	LB
6118550	06300073	LUE	Luech à Genolhac	Référence	RMC
2058000	02540173	MAD	Madon à Xeuilley	Pression agricole	RM
03104000	03510066	MAR	Marne à Matougues	Pression urbaine	SN
4037900	04630029	OLL	Dore à Olliergues	Pression industrielle	LB
03219780	03270132	RIS	Risle à Ambenay	Pression industrielle	SN
4119000	04720110	SAR	Sarthe à Arnage	Pression urbaine	LB
03250430	03140095	SOU	Soulevre à Carville	Référence	SN
03078110	03771007	YER	Yerres à Courtomer	Pression agricole	SN
01089000	01590055	YSE	Yser à Bambecques	Pression agricole	AP

\*AG : Adour-Garonne, LB : Loire-Bretagne, SN : Seine-Normandie, RMC : Rhone-Méditerranée-Corse, RM : Rhin-Meuse, AP : Artois-Picardie

Les prélèvements de goujons adultes, mâles et femelles, sont réalisés par pêche à l'électricité entre le mois d'août et le mois d'octobre afin de disposer d'individus hors de la période de reproduction et de limiter l'impact de l'échantillonnage sur le peuplement des sites étudiés. Ces prélèvements sont réalisés soit par l'ONEMA dans le cadre du suivi du réseau de contrôle de surveillance de la DCE soit par l'INERIS lorsque les sites choisis n'entrent pas dans ce cadre (**Tableau 3**). Au final, 6 sites sur les 20 (GAR, LUE, MAR, SOU, SAR, YSE) n'ont pu être échantillonnés du fait de l'absence de goujons au moment de la pêche et/ou des mauvaises conditions météorologiques (débit trop fort dans la rivière). Pour cette même raison, le sédiment et les POCIS n'ont pas été prélevés sur un des 20 sites (YSE).

**Tableau 3.** Répartition des sites d'échantillonnage des goujons selon le type de site et l'organisme en charge de l'échantillonnage.

	Référence	Agricole	Urbain	Industriel	Mauvais état
Nb de sites ONEMA	1	6	5	2	2
Nb de sites INERIS	2	1	0	1	0
Total	3	7	5	3	2

### **3. CARACTERISATION DE LA CONTAMINATION DES EAUX DE SURFACE PAR UNE APPROCHE BIO-ANALYTIQUE**

#### **3.1. CONTEXTE ET OBJECTIFS**

Si les analyses chimiques, très sensibles et sélectives, constituent actuellement des méthodes de choix incontournables pour l'évaluation de la qualité chimique, elles ne fournissent qu'une vision partielle de la complexité de la contamination des eaux de surface. En effet, les analyses quantitatives ne ciblent nécessairement que des substances ou familles de substances choisies a priori, sans prendre en compte l'ensemble des contaminants présents, leurs produits de transformation, etc. De plus, elles ciblent des composés individuels et ne tiennent pas compte des effets de mélange potentiels, fournissant ainsi une évaluation utile mais partielle du danger (éco)toxique pour les organismes exposés. Par ailleurs, elles restent peu informatives sur certaines familles de polluants d'intérêt écotoxicologique tels que les perturbateurs endocriniens (PE) pour lesquels il existe encore un manque de connaissances sur leur identité dans les cours d'eaux français.

En complément à l'analyse chimique, d'autres approches, dites bio-analytiques, sont aujourd'hui disponibles pour répondre aux enjeux de la surveillance de la qualité chimique des milieux aquatiques. Basées sur l'utilisation de bioessais (*in vitro* ou *in vivo*), elles permettent la détection spécifique et sensible de polluants actifs au sein de matrices environnementales (i.e. sédiment, eau de surface, effluents). La quantification des activités en équivalent-toxiques (TEQ) au sein des échantillons autorise une comparaison directe avec les concentrations en contaminants ciblés par les analyses chimiques (Aït-Aïssa 2009). Ainsi, les approches bio-analytiques permettent de dresser un diagnostic intégré de la qualité chimique des eaux en renseignant sur l'identité et le mécanisme d'action (e.g. interaction avec les récepteurs nucléaires) du ou des composés responsables de l'activité biologique mesurée (Aït-Aïssa et Creusot 2011).

Dans le cadre de cette étude, une batterie de bioessais *in vitro* et *in vivo* a été déployée sur 20 sites de l'étude prospective 2012 dans le but (1) d'apporter des informations supplémentaires sur la contamination des milieux aquatiques par des composés PE et dioxin-like (DL) en termes d'occurrence et d'effet (2) de statuer sur l'apport de l'utilisation de ce type de bioessais pour la surveillance de la qualité chimique des eaux au regard des outils déjà existants.

## 3.2. MÉTHODOLOGIE

### 3.2.1. DÉMARCHE GLOBALE

La démarche bio-analytique globale mise en œuvre dans cette étude est synthétisée dans la Figure 3.

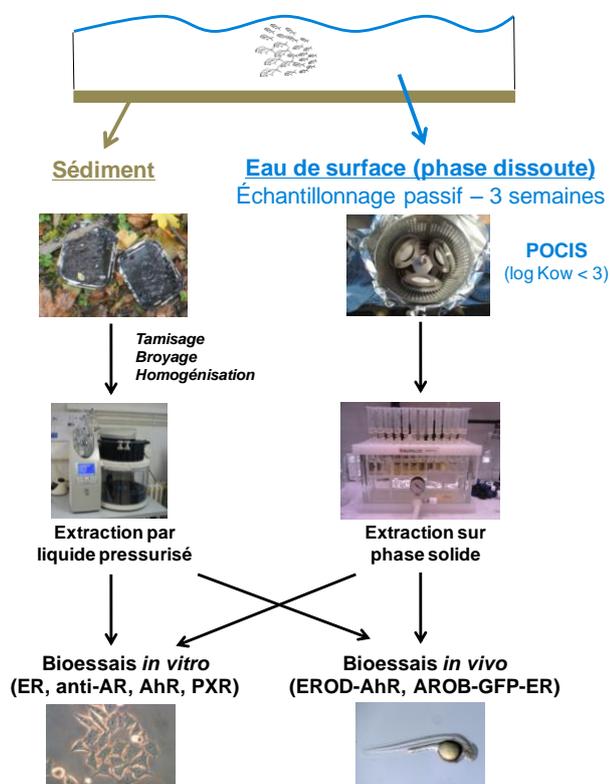


Figure 3. Démarche bio-analytique mise en œuvre dans le cas de l'étude prospective 2012

### 3.2.2. ÉCHANTILLONNAGE ET PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Les activités PE et dioxin-like ont été recherchées dans les sédiments et dans la colonne d'eau (phase dissoute).

Le sédiment constitue une matrice de choix pour évaluer la contamination d'un site par des composés semi-polaires à non-polaires. Nous avons montré précédemment la pertinence de cette matrice pour le suivi par bioanalyse de composés de type PE et DL (Louiz et al 2008, Kinani et al 2010, Creusot et al 2013 a et b). Les échantillons analysés correspondent à ceux prélevés et préparés (lyophilisation et tamisage) pour la campagne d'analyses chimiques et extraits par une méthode optimisée pour la bio-analyse (Creusot 2011). L'échantillonnage de la colonne d'eau a été réalisé à travers le déploiement de capteurs passifs de type POCIS (*Polar Organic Compounds Integrative Samplers*) permettant une mesure intégrée de la contamination sur l'ensemble de la période d'échantillonnage (Togola et Budzinski, 2007). Des études récentes menées par notre laboratoire en association avec le LPTC de l'Université Bordeaux I (H. Budzinski) ont démontré tout l'intérêt du couplage POCIS-bioessais pour caractériser des niveaux traces de contaminants bio-disponibles dans la colonne d'eau (Creusot et al. 2010, Creusot et al. 2013, Creusot et al. 2014). L'extraction des sédiments et des POCIS a été réalisée selon des méthodologies préalablement validées pour l'extraction d'une diversité de classes chimiques présentant une large gamme de polarité (Creusot, 2011 ; Tapie et al. 2011). In fine, un extrait organique de chaque sédiment ou POCIS est obtenu (DMSO) et analysé par les bioessais. Des blancs d'extraction ont été systématiquement réalisés et analysés en parallèle des échantillons de manière à détecter toute contamination liée aux procédures.

### 3.2.3. BIOESSAIS *IN VITRO* ET *IN VIVO*

Une batterie de bioessais *in vitro* et *in vivo* (Tableau 4) a été appliquée afin de dresser des profils d'activités toxicologiques relativement larges des échantillons et de fournir, sur la base de leurs mécanismes d'action, un premier niveau de diagnostic sur les familles de composés actifs potentiellement présents.

**Tableau 4.** Bio-essais *in vitro* (tests cellulaires) et *in vivo* (embryon de poisson zèbre) utilisés pour la détection de composés actifs dans les échantillons de sédiment et d'eau

	Modèle biologique (principe)	Type d'activité (mesure)	Composés de référence	Exemples de contaminants environnementaux actifs
<b>Bioessais <i>in vitro</i></b>	<b>MELN (luciférase)</b>	Estrogénique	Œstradiol (E2)	Stéroïdes naturels et synthétiques (œstradiol, éthinil-œstradiol, lévonorgestrel) ; produits cosmétiques (filtres UV, parabens) ; plastifiants (bisphénol A) ; surfactants (alkylphénols) ; pesticides (méthoxychlor)
	<b>MDA-kb2 (luciférase)</b>	(Anti)androgénique, glucocorticoïde	Dihydro-testostérone (DHT), Dexaméthasone (DEX)	Stéroïdes naturels et synthétiques (testostérone, dihydroxytestostérone, trenbolone) ; pesticides (DDT, vinclozoline) ;
	<b>HG5LN-hPXR (luciférase)</b>	Xénobiotique (PXR)	SR12813	Nombreux xénobiotiques dont médicaments, pesticides, certains plastifiants, stéroïdes, surfactants
	<b>PLHC-1 (EROD)</b>	Dioxon-like, HAP-like	Dioxine (TCDD), benzo(a)pyrène (BaP)	HAP, PCB-DL, dioxines, furanes
<b>Bioessais <i>in vivo</i></b>	<b>Embryon de poisson zèbre sauvage – WT/AB (EROD/BFCOD)</b>	Dioxin-like	Dioxine (TCDD)	HAP, PCB-DL, dioxines, furanes
	<b>Embryon de poisson zèbre transgénique-cyp19a1b-GFP (GFP fluorescence)</b>	Estrogénique	Œstradiol (E2)	Stéroïdes naturels et synthétiques (oestrogènes, androgènes aromatisables, progestagènes), alkylphénols, bisphénols, parabènes, pesticides organochlorés, benzophénones...

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, 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase) et permettant la détection de composés de type oestrogènes, (anti)androgènes, glucocorticoïdes, dioxin-like et ligands du Pregnane X Receptor (PXR). En parallèle, deux bio-essais *in vivo* utilisant des embryons de poisson zèbre et permettant de révéler l'effet de substances de type xéno-œstrogènes et dioxin-like ont été appliqués. En complément aux tests *in vitro*, l'intérêt est de replacer les mécanismes d'action des xénobiotiques dans le contexte de l'organisme et d'en évaluer les effets à un stade critique du développement qu'est l'embryogenèse.

Un intérêt majeur des bioessais mis en œuvre dans cette étude réside dans leur capacité à quantifier de manière spécifique et sensible l'activité biologique d'un extrait environnemental en tenant compte de l'ensemble de sa composition chimique à travers le calcul d'équivalents toxiques biologiques (i.e. Bio-TEQ) (Aït-Aïssa, 2009).

## 3.3. ACTIVITÉS PE ET DL DANS LES RIVIÈRES FRANÇAISES : BIOESSAIS *IN VITRO*

### 3.3.1. ÉTABLISSEMENT DE PROFILS D'ACTIVITÉS *IN VITRO*

Le tableau 5 présente une vue globale de l'occurrence des activités PE et dioxin-like dans les sédiments et les POCIS des différents sites mesurée par les tests *in vitro*. Les valeurs de concentrations mesurées en équivalents-toxiques pour chaque extrait de sédiment et de POCIS sont données respectivement en Annexes 1 et 2.

**Tableau 5.** Synthèse de l'occurrence des activités *in vitro* dans les sédiments (Sd) et les POCIS (PO).

Sites	Œstrogénique		Anti-androgénique		Gluco-corticoïde		Xénobiotique (PXR)		Dioxin-like (24h)		HAP-like (4h)		Pression	Bassin
	Sd	PO	Sd	PO	Sd	PO	Sd	PO	Sd	PO	Sd	PO		
AUV													Agricole	AG
GAR	n.t.		n.t.		n.t.		n.t.		n.t.		n.t.		Agricole	AG
HER													Urbaine	AG
BRA													Industrielle	AG
JOU													Industrielle	LB
SAR													Urbaine	LB
LOM													Agricole	LB
LOB													Agricole	LB
LOI													Urbaine	LB
OLL													Industrielle	LB
LOV													Urbaine	LB
BED													Urbaine	LB
YER													Agricole	SN
SOU													Agricole	SN
CHE													Mauvais	SN
MAR													Urbaine	SN
RIS													Industrielle	SN
MAD													Agricole	RMC
LUE													Référence	RMC
YSE		n.t.		n.t.		n.t.		n.t.		n.t.		n.t.	Agricole	AP

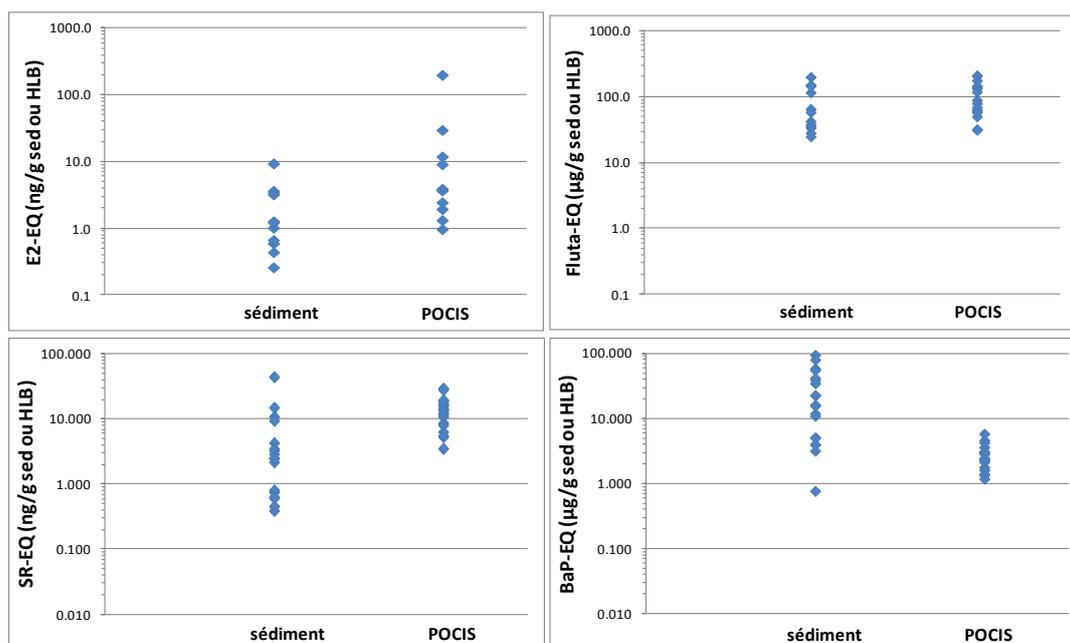
En gris échantillon actif ; en blanc, échantillon inactif ; n.t. échantillon non testé

D'une manière générale, le criblage *in vitro* montre l'occurrence de composés de type PE et DL dans une majorité des sites, quelque soit le bassin hydrographique et le type de pression anthropique. Les activités de type œstrogénique (15 sites positifs sur 19 investigués), anti-androgénique (18 sur 19), xénobiotique (19 sur 19) et HAP/dioxin-like (19 sur 19) sont les plus fréquemment détectées, dans les sédiments ou les POCIS. A l'inverse, aucune activité de type androgénique n'a été détectée et un seul site présentait une activité de type glucocorticoïde dans la phase dissoute (La Dore à Olliergues).

Si ce constat est en accord avec des études précédentes rapportant la présence de composés œstrogéniques et dioxin-like dans les eaux de surface françaises (Kinani et al 2010, Labadie et Budzinski 2005, Fenet et al 2003, David et al 2010), nos résultats révèlent ici la présence de composés susceptibles d'affecter d'autres voies de signalisation (récepteurs des xénobiotiques PXR, des androgènes AR et des glucocorticoïdes GR) et confortent la nécessité d'intégrer d'autres cibles que les récepteurs des œstrogènes (ER) ou de la dioxine (AhR) pour une bio-analyse plus réaliste et plus exhaustive de la contamination.

#### Niveaux d'activités dans les différents sites

Les niveaux d'activités mesurés varient d'un à deux ordres de grandeurs d'un site à l'autre (Figure 4).



**Figure 4.** Répartition des valeurs de BioTEQ entre le sédiment la colonne d'eau sur les différents sites de l'étude.

Ces niveaux sont globalement cohérents avec ceux rapportés dans d'autres cours d'eau en Europe. On constate néanmoins que certains des sites investigués présentent des valeurs relativement fortes par rapport aux valeurs rapportés dans la littérature (e.g. 0.1-1 ng-E<sub>2</sub>-EQ/g et 1-10 µg DHT-EQ/g). C'est le cas pour les activités œstrogénique (9 ng E<sub>2</sub>-EQ/g séd.) et PXR (44 µg SR-EQ/g séd.) dans le sédiment de l'Yerres, de l'activité anti-androgénique (202 µg DHT-EQ/g séd.) dans le sédiment de la Risles et de l'activité dioxin-like dans les sédiments de la Risles et de la Loire à Veauchette (96 µg BaP-EQ/g et 81 µg BaP-EQ/g).

Les niveaux obtenus pour l'activité DL dans le sédiment sont également relativement élevés par rapport à d'autres études (1-10 µg BaP-EQ/g de séd). Néanmoins, elles sont cohérentes avec une précédente étude menée par notre laboratoire sur trente sites RCS et qui avait montré la présence de fortes activités dioxin-like dans le bassin Artois-Picardie (5-290 µg BaP-EQ/g) (Aït-Aïssa, 2010).

Dans les POCIS, les données de la littérature sont plus rares, excepté pour l'activité œstrogénique. Les quantités d'E<sub>2</sub>-EQ de nos sites sont similaires à ceux de rivières suisses faiblement impactées (Vermeirssen et al. 2005) à l'exception de la Loire à Montjean (199 µg E<sub>2</sub>-EQ /g HLB). A notre connaissance, seulement deux études rapportent des niveaux d'activité aussi élevés que ceux de Montjean. La première menée sur une rivière soumise à une forte pression agricole (élevage bovin), la seconde réalisée sur une rivière fortement impactée en aval d'un rejet de station d'épuration urbaine (9000 équivalents-habitants).

#### *Distribution entre le sédiment et la phase dissoute*

Selon les sites et le type d'activité, les profils (Tableau 5) et les niveaux d'activités *in vitro* (Figure 4 et Annexes 1 et 2) diffèrent d'un compartiment à l'autre.

Par exemple, une activité œstrogénique importante est détectée dans le sédiment de l'Yerre (YER - 9 ng E<sub>2</sub>-EQ/g séd.) mais pas dans l'eau de surface. Inversement, on détecte une activité œstrogénique dans les POCIS de l'Auvézère (AUV) mais pas dans le sédiment, ce qui semble indiquer que les composés actifs pour cette cible biologique diffèrent d'un compartiment à l'autre. Concernant les activités dioxin/HAP-like, elles sont plus importantes dans le sédiment que dans la colonne d'eau. Ceci s'explique par la nature hydrophobe des composés actifs dans ce bioessai (e.g. HAP, PCB, dioxines) lesquels sont principalement associés à la phase particulaire et plus particulièrement au sédiment. Ceci est confirmé par la quasi-absence dans les POCIS d'activité dioxin-like à 24 h, laquelle est indicatrice de fortes concentrations en composés dioxin-like persistants

de type organo-halogénés (e.g. PCB, PCDD/DF) (Aït-Aïssa, 2010). Ce résultat mets néanmoins en évidence dans la phase dissoute la présence de composés de type HAP, rapidement métabolisés dans le bioessai (détection par le test EROD à 4h mais pas à 24h). A l'inverse de l'activité dioxin-like, l'activité PXR est plus fréquemment et fortement détectée dans les POCIS. De par son rôle clef dans la détoxification des xénobiotiques, ce récepteur est caractérisé par une diversité de ligands environnementaux (Lemaire et al. 2006, Creusot et al. 2010) dont de nombreuses substances pharmaceutiques et phytosanitaires, lesquels sont majoritairement polaires et préférentiellement captés par les POCIS (Tapie et al 2011). Le résultat obtenu dans cette étude apparait donc logique et ce bioessai pourrait révéler la présence de ce type de contaminants dans la phase dissoute.

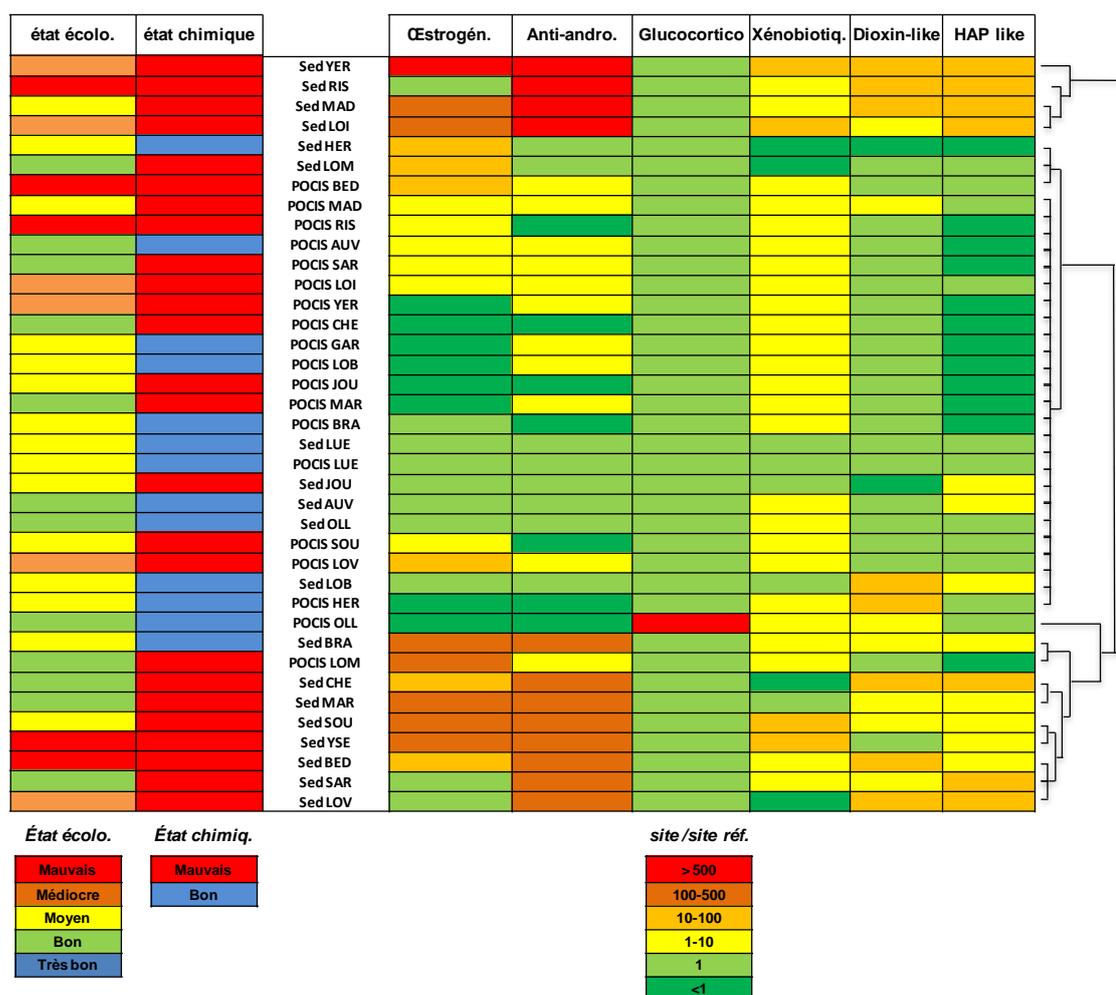
La compartimentation des activités peut également être mise au regard des propriétés physico-chimiques de la matrice analysée. Par exemple, dans le sédiment, il est notable que les 4 échantillons les plus actifs (YER, MAD, LOI, RIS) sont également les plus riches en matière organique (%TOC en Annexe I). La forte teneur en matière organique pourrait expliquer en partie les fortes activités du fait d'un piégeage des contaminants. Il est en effet connu que le carbone organique sédimentaire joue un rôle prépondérant dans l'adsorption des contaminants organiques, notamment à travers des interactions hydrophobes entre les composés et un sédiment riche en matière organique (Gong et al 2011). Dans notre étude toutefois, la normalisation des activités par la teneur en carbone organique total plutôt que par la masse totale de sédiment sec ne modifie pas le classement entre les sites ce qui montre que le TOC n'influe pas sur la mesure finale.

Dans les POCIS, un résultat notable est la détection d'une activité anti-androgénique. Si une telle activité a déjà été rapporté dans les sédiments de rivière (Weiss et al. 2009, Kinani et al. 2010), sa présence dans la colonne d'eau est plus rarement rapportée et est généralement associé à des composés de types pesticides, plastifiant ou alkylphénols (Hill et al. 2010). Des travaux menés par notre laboratoire ont déjà mis en évidence la présence de tels composés dans les eaux de surface à travers l'utilisation de capteurs passifs de type SPMD (semi permeable membrane device) dédiés au captage de composés peu polaires ( $\log K_{ow} > 3$ ). Dans le cas présent, la présence de composés anti-androgéniques de nature polaire est particulièrement novatrice et soulève la question de leur identité.

### 3.3.2. ETABLISSEMENT DE PROFILS DE DANGERS ET PRIORISATION DE SITES

Pour classer les sites selon le profilage *in vitro*, il est possible d'utiliser des méthodes de hiérarchisation statistique (méthode des *clusters*) et ainsi de dresser un profil de danger associé (Hamers et al. 2010). Dans cette étude, nous avons utilisé la méthode préconisée par Hamers et al. (2010) pour classer les activités mesurées dans les échantillons de sédiment et de POCIS, après normalisation des données par rapport à un site de référence. Le site du Luech (référence écologique du RCS) a été choisi comme référence dans notre étude. Le classement des sites qui en ressort est mis en regard de l'état écologique et de l'état chimique tel que défini par la Directive Cadre sur l'Eau (Figure 5) et de la typologie identifiées des sites.

### Profil de danger PE



**Figure 5.** Etablissement de profils de danger sur la base des bioessais *in vitro* et comparaison avec l'état écologique et chimique. NB : le choix du code couleur pour les bioessais est arbitraire.

La hiérarchisation des sites sur la base de leur profil d'activité *in vitro* selon la méthode des clusters permet de distinguer différents groupes, parmi lesquels :

- un groupe de site (POCIS ou sédiment) faiblement contaminés (au milieu) ;
- un groupe de 4 sédiments très fortement contaminés (en haut) qui correspondent aux sites évoqués plus haut (YER, MAD, LOI, RIS) plus riche en matière organique ;
- un groupe fortement contaminé constitué de 8 sédiments et un POCIS (Montjean) ;
- un groupe constitué uniquement par les POCIS d'Olliergues.

Dans une démarche de criblage de sites, cette méthodologie permet ainsi d'identifier des sites particuliers (i.e. fortement contaminés ou présentant un profil de contamination atypique). C'est par exemple le cas du site d'Olliergues qui est le seul à présenter une activité de type glucocorticoïde ou de la Loire à Montjean qui présente une activité œstrogénique particulièrement forte dans la phase dissoute.

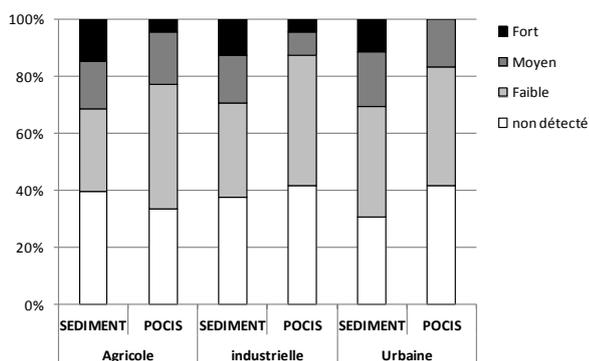
Du point de vue méthodologique, il convient de s'interroger sur la notion de site de référence. En effet, l'utilisation du code couleur met en évidence que certains sites présentent des niveaux d'activités inférieurs (couleur vert foncé) à ceux du site de référence, ici le Luech. Sur ce site, on détecte une activité dioxin-like (DL) mais pas d'activité œstrogénique ou anti-androgénique détectables. De ce fait, le choix de ce site pourrait surestimer le danger lié aux activités œstrogénique et anti-androgénique et sous-estimer le danger lié aux composés dioxin-like. En effet, bien que le Luech présente l'activité DL la plus basse, aucun site n'apparaît comme très éloigné de la référence et

de ce fait, on n'identifie aucun hot-spot pour ce type de contaminants. Néanmoins, ce constat est surtout le reflet du caractère ubiquitaire de la contamination de cette famille de composés – quelque soit le site considéré on retrouve une activité DL qui est de ce fait peu discriminante pour identifier des sites dangereux.

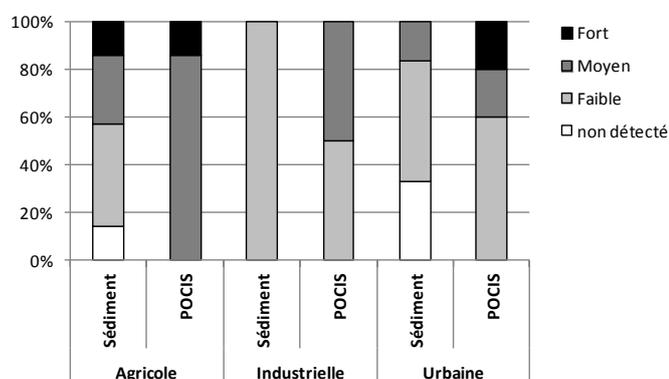
Ensuite, les profils de danger obtenus montrent logiquement que la qualité PE des sédiments et des eaux de surface (POCIS) est moins bonne (couleur marron et rouge) sur les sites soumis à de fortes pressions anthropiques et classés en mauvais état écologique et chimique (couleur rouge). Par exemple, les sites présentant les plus fortes activités dans le sédiment (groupe YER, MAD, LOI, RIS) présentent également un état écologique médiocre et un état chimique mauvais. Néanmoins, il est intéressant de noter que certains sites en bon état écologique et/ou chimique peuvent être considérés comme préoccupants. C'est le cas des eaux de surface de la Loire à Montjean et de la Dore à Olliegues et du sédiment du Bramerit à Grand-Jean. Nos outils apportent donc de l'information supplémentaire sur la qualité des eaux au regard des outils réglementaires traditionnels.

Il est également intéressant de noter que sur la base d'une telle analyse les compartiments d'un même site peuvent être fortement discriminés (e.g. POCIS et sédiment du Bramerit et de l'Yerres). Un tel constat confirme la nécessité de considérer l'ensemble des compartiments pour une évaluation optimale de la contamination.

Enfin, d'une manière générale et pour les sites étudiés, il ne semble pas y avoir de relation claire entre le type de pression anthropique identifiée (agricole, urbaine ou industrielle) et les niveaux de réponse donnés par le profil global *in vitro* (Figure 6). Toutefois, si l'on considère les bioessais individuellement, l'activité mesurée par le bioessai PXR est plus forte sur les sites soumis à une pression agricole (Figure 7). Il est intéressant de rappeler ici que nombre de pesticides actuellement utilisés et retrouvés dans l'environnement aquatique sont actifs dans ce test (Lemaire et al 2006, Creusot et al 2010), ce qui pourrait expliquer la tendance observée.



**Figure 6.** Répartition des niveaux de contamination par les PE (tous tests confondus) en fonction du type de pression



**Figure 7.** Répartition des niveaux d'activité PXR en fonction du type de pression

### 3.3.3. CONTRIBUTION DE POLLUANTS ACTIFS CIBLÉS PAR LES ANALYSES CHIMIQUES

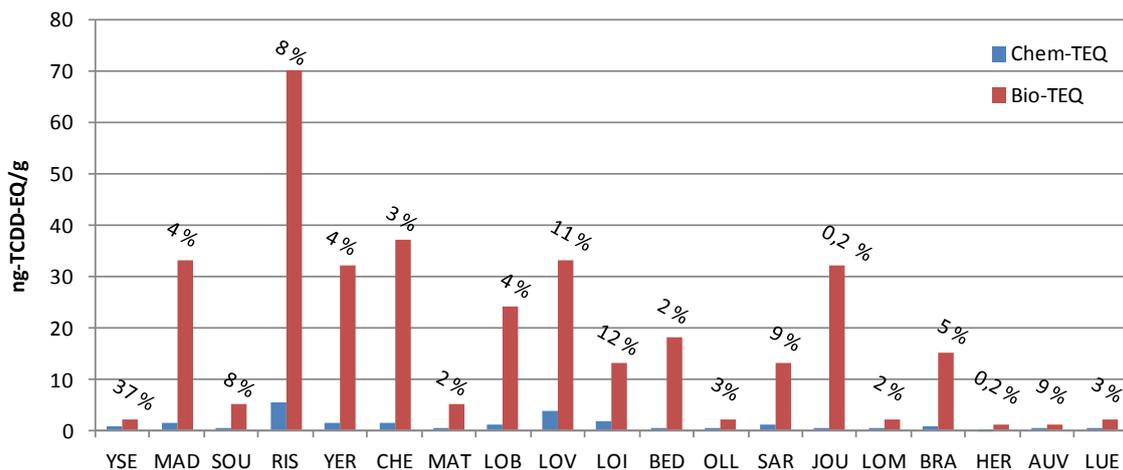
Si le profil toxicologique permet d'identifier des sites fortement contaminés ou atypiques, tout en fournissant des pistes sur la nature des contaminants (e.g. composés de types glucocorticoïdes dans le cas de Olliergues), il convient ensuite d'identifier le(s) composé(s) responsable(s) des activités mesurées afin de déterminer les sources de pollution et, le cas échéant, de proposer des actions visant à surveiller et réduire la contamination.

Pour identifier les substances responsables des activités mesurées dans les échantillons, l'approche dite *mass-balance analysis* consiste à comparer les activités biologiques des extraits (Bio-TEQ) à l'activité théorique basée sur la quantification chimique de substances individuelles (Chem-TEQ). Cette dernière est déterminée selon la relation  $\text{Chem-TEQ} = \sum(C_i \cdot \text{TEF}_i)$ , avec  $C_i$  la concentration mesurée d'un composé  $i$  et TEF son facteur d'activité dans le bioessai. Dans notre étude, nous avons utilisé les données de quantification chimique dans les sédiments collectées dans le cadre de l'étude prospective 2012 et du réseau de contrôle de surveillance de la directive cadre sur l'eau disponibles auprès des agences de l'eau. La liste des substances PE et DL utilisée ici est présentée en [Annexe 3](#). Elle regroupe des HAP, des PCB, des alkyphénols, le bisphénol A, des stéroïdes naturels (œstrone) et des pesticides.

Le [tableau 6](#) synthétise les différentes substances identifiées dans les sédiments et leur contribution globale dans les bioessais. Un exemple de comparaison Bio-TEQ vs. Chem-TEQ est illustré dans la [figure 8](#) pour l'activité dioxin-like dans les sédiments. Le détail des résultats pour chaque sédiment et chaque bioessai est présenté en [annexe 4](#).

**Tableau 6.** Principales substances actives présentes dans les sédiments et leur contribution aux activités biologiques mesurées par les bioessais (ratio Chem-TEQ/Bio-TEQ).

	ER	PXR	AhR 24h	AhR 4h
<b>Substances analysées dans les sédiments (données RCS + Etude prospective)</b>	Œstrone, mestranol, 4-tert-octylphénol, bisphénol A, propylparaben, $\alpha$ -cyperméthryn, méthoxychlor, métolachlor, 44'DDD	Diazepam, clotrimazole, triclosan, carbamazépin, $\alpha$ -cyperméthryn, 44'DDD, métolachlor, transnonachlor, 4-tert-octylphénol, bisphénol A, PCB 180/101/138/153	Dibenzo(a,c)anthracène, benzo(e)pyrène, benzo(g,h,i)fluoranthène, benzo(j)fluoranthène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, indeno(123)pyrène	
<b>Ratio ChemTEQ/BioTEQ (%)</b>	<b>0.1 - 1.1 %</b>	<b>0.1 - 0.3 %</b>	<b>0.2 - 37%</b>	<b>0.1 - 4%</b>



**Figure 8.** Comparaison des valeurs de TCDD-EQ dans les sédiments calculées sur la base des analyses chimiques (Chem-TEQ) et des bioessais (Bio-TEQ). %= Chem-TEQ/Bio-TEQ × 100.

Globalement, les composés ciblés par l'étude prospective ou dans le cadre du RCS n'expliquent que très faiblement les différentes activités PE et DL investiguées dans le sédiment. En effet, à l'exception de l'activité DL dans le sédiment de l'Yser (YSE) (AhR-24h) qui est expliqué à 37 % (Figure 8), les pourcentages d'explication restent inférieurs à 10% pour l'activité EROD-24h, à 5% pour l'activité EROD-4h, à 1% pour l'activité œstrogénique et inférieurs à 0,3 % pour l'activité PXR (Annexe 4). Concernant l'activité DL, les principaux contributeurs sont les HAP appartenant à la liste de 16 HAP prioritaires (US-EPA). Pour l'activité œstrogénique, le 4-*tert*-octylphénol et le 4,4'-DDD sont les principaux contributeurs bien qu'ils n'expliquent que très faiblement l'activité.

Dans l'ensemble ces résultats illustrent une faible contribution des substances ciblées par les analyses chimiques seules. Ce résultat est somme toute logique et en accord avec de précédentes études sur la bio-analyse d'eaux de surface où, excepté dans des cas spécifiques où la source de pollution est identifiée *a priori*, on explique rarement plus de 30% des activités (Creusot 2011). Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il subsiste encore un manque de connaissance sur les ligands environnementaux des récepteurs étudiés dans cette étude et une approche ciblant une liste définie de substances cibles ne prend pas nécessairement en compte la grande complexité des mélanges environnementaux.

Plus globalement, nos résultats montrent que les analyses chimiques menées dans le cadre des programmes de surveillance peuvent sous-estimer le danger environnemental lié aux PE et qu'il devient nécessaire de prendre en compte des mesures plus intégratives, comme celles fournies par les bioessais.

### 3.4. ACTIVITÉS PE ET DL DANS LES RIVIÈRES FRANÇAISES : BIOESSAIS *IN VIVO* SUR EMBRYONS DE POISSON ZÈBRE

En complément des bioessais *in vitro* mis en œuvre dans le cadre de cette étude, des bioessais *in vivo* sur embryons de poisson zèbre ont été réalisés sur les mêmes extraits organiques de POCIS et de sédiments (voir Figure 9). Basés sur les mécanismes d'actions des substances, ces bioessais *in vivo* permettent la détection et la quantification :

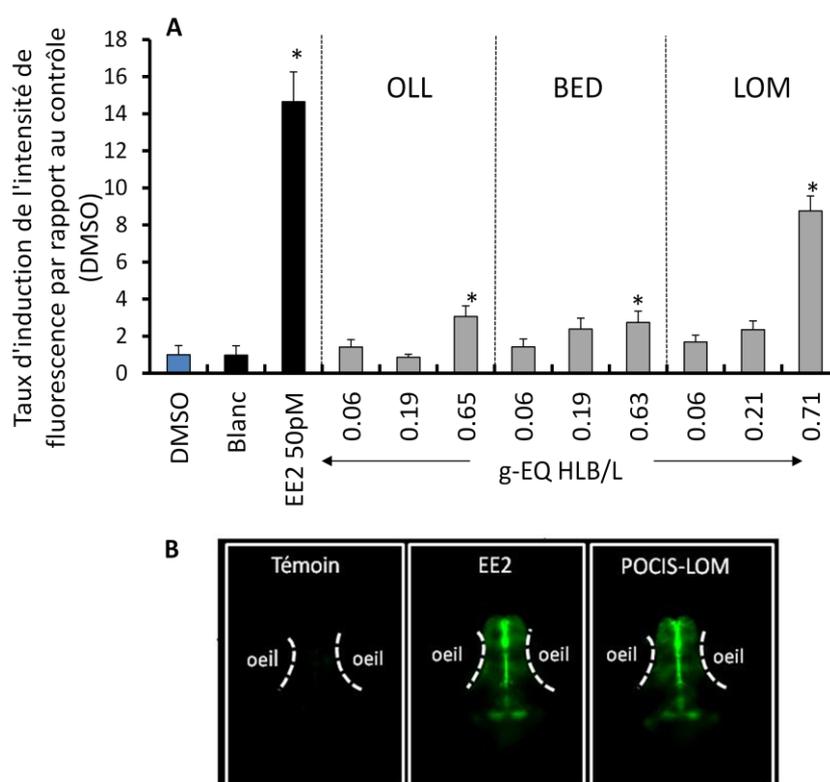
- (1) d'activité œstrogénique via la mesure de l'expression d'un gène œstrogène-régulé dans le cerveau des poissons (le gène *cyp19a1b*) à l'aide de la lignée transgénique *cyp19a1b*-GFP (Brion et al., 2012)
- (2) (ii) d'activité dioxin-like via les mesures d'activités enzymatiques EROD et BFCOD.

L'ensemble de ces mesures a été réalisé chez des embryons vivants (mesures non invasives) âgés de 4 jours-post fécondation après 96 heures d'exposition aux extraits organiques.

Du point de vue pratique, l'exposition aux extraits est réalisée en petit volume (cristallisoirs de 20 mL) et la mesure finale du bioessai est faite par simple mesure de fluorescence sur poissons vivants soit à l'aide d'un microscope pour la mesure de la GFP dans la lignée cyp19a1b-GFP soit à l'aide d'un lecteur microplaque 96 puits pour les activités EROD et BFCOD. Cette simplicité de test rend ces bioessais compatibles pour du criblage *in vivo* d'échantillons.

### 3.4.1. ACTIVITÉS ŒSTROGÉNIQUES

Sur l'ensemble des extraits de sédiments et de POCIS testés sur les embryons de poissons zèbres transgéniques cyp19a1b-GFP, trois extraits ont induits de manière significative une réponse œstrogénique. Dans ce bioessai, cette activité œstrogénique se manifeste par une augmentation de l'intensité de la fluorescence dans le cerveau des poissons qui est quantifiée (Figure 9). Il s'agissait de trois extraits organiques de POCIS issus des sites prélevés sur le bassin Loire-Bretagne à Olliergues (Dore), Saint-Laure (Bedat) et Mont-Jean sur Loire (Loire).



**Figure 9.** (A) Intensité moyenne de la GFP (Green Fluorescence Protein) mesurée dans le cerveau d'embryons de poissons zèbres transgéniques cyp19a1b-GFP exposés à des extraits de POCIS issus des sites OLL, BED et LOM. \* dénote une différence significative ( $p < 0,05$ ) par rapport au groupe contrôle (DMSO). L'EE2 50 pM induit massivement la GFP et sert de témoin positif. Le nombre de mesure est de  $n = 10-16$  embryons par condition. (B) Illustration d'une réponse œstrogénique chez des embryons poissons zèbres transgéniques cyp19a1b-GFP exposés à l'extrait organique de POCIS pour le site LOM.

Le tableau 7 présente les activités œstrogéniques *in vivo* exprimées en ng E2-EQ/g-HLB qui ont été calculées pour ces trois sites sur la base de l'induction de la fluorescence émise par les organismes. Elles sont comparées à celles mesurées *in vitro* dans la lignée MELN qui a été utilisée pour détecter des composés œstrogéniques (voir paragraphe 3.3.) ainsi que celles mesurées dans une lignée cellulaire hépatique de poisson zèbre exprimant un récepteur des œstrogènes de poisson zèbre.

**Tableau 7.** Quantification de l'activité œstrogénique (exprimée en ng E2-EQ/g-HLB) mesurée sur les trois sites présentant une activité *in vivo* chez les embryons de poisson zèbre. Les données obtenues *in vitro* dans la lignée humaine MELN et dans une lignée de poisson zèbre (ZELH-ERβ2) sont rapportées à titre de comparaison (n.d. = activité œstrogénique non détectée)

Bio-essai	Sites		
	OLL	BED	LOM
<i>in vivo</i> (cyp19a1b-GFP)	54	44	202
<i>in vitro</i> (MELN)	nd	30	199
<i>in vitro</i> (ZELH-ERβ2)	88	40	273

On constate une très bonne concordance des activités œstrogéniques calculées pour les sites BED et LOM sur la base des bio-essais *in vitro* et *in vivo*. Ces données confirment les activités œstrogéniques mesurées *in vitro* pour ces deux sites signifiant que les substances œstrogéniques présentes dans les extraits organiques sont capables d'induire l'expression d'un gène œstrogène-dépendant, le gène *cyp19a1b*, dans le système nerveux central au cours du développement embryonnaire des poissons. Parmi ces sites, Mont-Jean sur Loire (Loire) présente une activité œstrogénique élevée dans la phase dissoute et apparaît comme un site particulièrement contaminé.

À Olliergues (rivière Dore), les composés présents dans la phase dissoute semblent induire une réponse œstrogénique spécifique chez le poisson zèbre. En effet, alors qu'aucune activité œstrogénique n'a été quantifiée *in vitro* dans la lignée humaine MELN, les composés présents dans la phase dissoute ont induit l'expression du gène *cyp19a1b*. De manière intéressante, une activité œstrogénique comparable a été quantifiée sur cet extrait organique dans une lignée hépatique œstrogène-sensible de poisson zèbre (Tableau 7). Des investigations futures seront nécessaires pour tenter d'identifier la ou les substances responsables de ces activités œstrogéniques dans les modèles *in vitro* et *in vivo* de poisson zèbre, qui pourraient rendre compte d'effets observés *in situ* sur les populations de poissons autochtones peuplant ce site (cf. paragraphe 4.2.3. sur les biomarqueurs de perturbation endocrinienne). Cette différence de réponse obtenue entre la lignée cellulaire humaine et le modèle embryonnaire de poisson sur le site d'Olliergues soulève la question des différences inter-espèces pour les œstrogènes, différences qui sont renseignées entre les mammifères et les poissons pour différents ligands des récepteurs ER (Matthews et al., 2002, Cosnefroy et al., 2012). Elle pose la question du choix des outils biologiques à utiliser dans le suivi d'activité œstrogénique dans le milieu aquatique.

Pour l'ensemble des autres extraits de POCIS, aucune réponse œstrogénique n'a pu être mise en évidence sur les embryons de poissons zèbres transgéniques. Plusieurs raisons peuvent être avancées pour expliquer ces différences de réponses. La première réside dans le fait qu'*in vivo* les extraits sont 5 fois plus dilués comparativement aux modèles *in vitro*. La seconde explication résiderait dans la différence de sensibilité des deux modèles. Cependant, il convient de noter que le modèle embryonnaire présente une sensibilité importante aux composés œstrogéniques qui est comparable aux modèles *in vitro* les plus sensibles pour certains composés (Brion et al., 2012). Il est probable que la quantité et/ou la nature des substances œstrogéniques présentes dans les extraits puissent expliquer ces différences de réponse. À l'exception du site d'Olliergues, il convient de noter que seuls les extraits présentant des équivalents E2 inférieurs à 12 ng E2-EQ/g n'induisaient pas de réponse *in vivo*. À titre de comparaison, l'EC10 d'induction du gène *cyp19a1b* dans la lignée de poisson zèbre *cyp19a1b-GFP* est de 27 ng d'E2 / L (Brion et al., 2012).

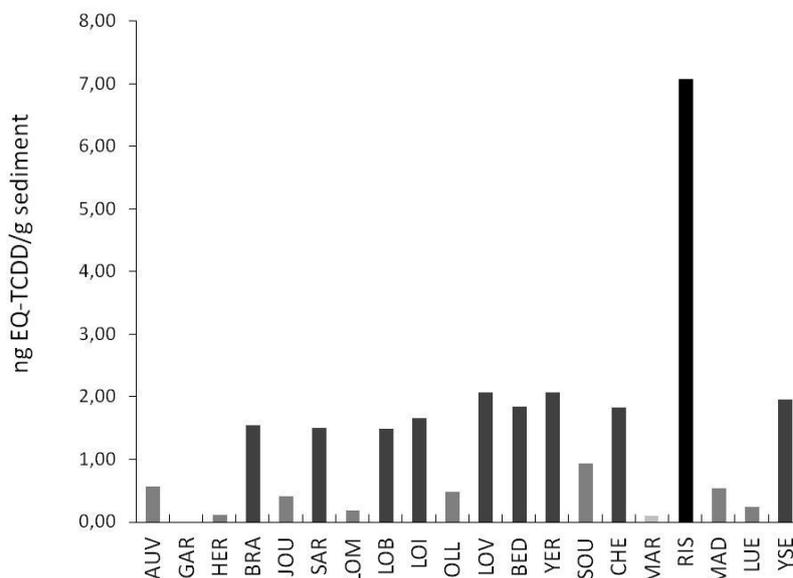
De même, aucun des sédiments testés n'a induit de réponse dans le modèle embryonnaire alors que des activités œstrogéniques ont été quantifiées *in vitro* dans le modèle humain MELN pour 11 des 20 sites testés. Cette absence de réponse œstrogénique dans le modèle embryonnaire de poisson a été récemment confirmée *in vitro* dans une lignée hépatique de poisson zèbre exprimant un récepteur des œstrogènes de poisson zèbre (lignée ZELH-ERβ2). Cette différence notable avec le modèle cellulaire humain MELN pourrait en partie s'expliquer par la présence de composés dioxin-like dans la matrice sédimentaire. En effet, il a été démontré que les composés dioxin-like induisent des réponses œstrogéniques dans la lignée MCF7 dont est dérivée la lignée MELN (Ohtake et al., 2003). Au contraire, chez les poissons, nos travaux ont permis de démontrer que les composés dioxin-like, comme la TCDD ou le B[a]P, induisaient des effets anti-œstrogéniques c'est-à-dire qu'ils bloquent l'action des œstrogènes (Cheshenko et al., 2007). Il est donc probable que la forte occurrence des

composés dioxin-like dans les sédiments des rivières françaises (voir paragraphes 3.3.1) ait conduit à des effets contraires, i.e. antagonistes, à ceux des composés œstrogéniques présents dans les matrices sédimentaires conduisant à une absence d'effet œstrogénique *in vivo*. Ainsi, on pourrait préconiser de fractionner les extraits organiques de sédiments afin de séparer les composés œstrogéniques et les composés dioxin-like pour s'affranchir de ces effets de mélanges et révéler la présence des substances œstrogéniques. Cette démarche a été récemment entreprise avec succès pour détecter des composés œstrogéniques dans le sédiment de rivières à l'aide du bioessai sur embryon de poisson zèbre transgénique cyp19a1b-GFP (Fetter et al., 2014).

### 3.4.2. ACTIVITÉS DIOXIN-LIKE DANS LES SÉDIMENTS DE RIVIÈRES FRANÇAISES.

Les composés organiques persistants à activité dioxin-like (dioxine, hydrocarbures aromatiques polycycliques) ont été recherché dans la matrice sédimentaire à l'aide de bio-essai *in vivo* sur embryon de poisson zèbre via la mesure de l'activité enzymatique hépatique EROD liée aux cytochromes P4501A. La **figure 10** illustre l'ensemble des activités dioxin-like mesurée *in vivo* sur l'ensemble des sites et exprimée en ng EQ-TCDD/g de sédiment. Le premier constat réside dans le fait qu'aucun des sédiments testés n'était dépourvu d'activité dioxin-like, des inductions d'activités EROD ayant été mesurées pour l'ensemble des sédiments testés. Cependant, les activités dioxin-like sont variables selon les sédiments, le site le plus contaminé (La Risle à Ambert) présentant une activité dioxin-like 66 fois plus importante que celles mesurées dans les sédiments les moins actifs. Sur la base de ces activités biologiques, trois catégories de sites selon leurs activités ont été distinguées:

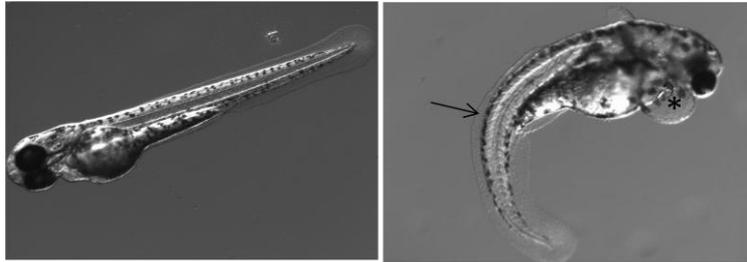
- sites faiblement actifs (AUV, HER, JOU, LOM, OLL, SOU, MAR, MAD, LUE) présentant des équivalents-dioxine compris entre 0,1 et 1 ng EQ-TCDD/g.
- sites moyennement contaminés (BRA, SAR, LOB, LOI, LOV, BED, YER, CHE, YSE) avec des équivalents-dioxine mesurés compris entre 1 et 2 ng EQ-TCDD/g (BRA, SAR, LOC, LOI, LOV, BED, YER, CHE, YSE)
- un site fortement contaminé présentant une forte activité dioxin-like (RIS).



**Figure 10.** Activités dioxin-like *in vivo* quantifiées sur la base de la mesure d'induction de l'activité EROD dans un bio-essai sur embryon de poisson zèbre. L'ensemble des sites présente une activité dioxin-like plus ou moins marquée. Le site GAR n'a pas été testé.

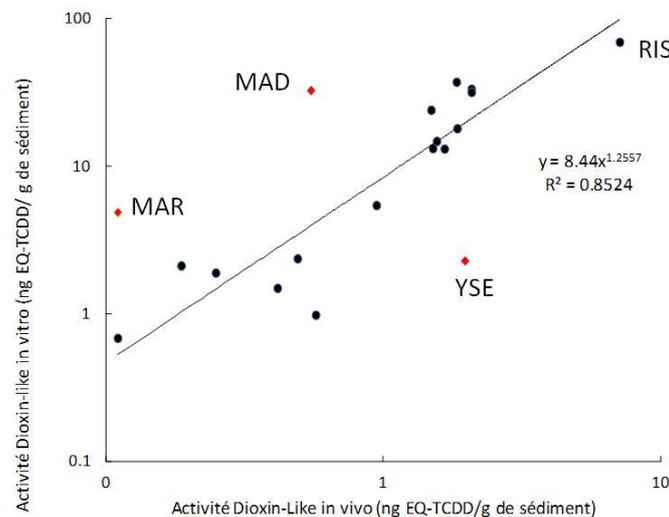
Outre des inductions d'activités EROD, les embryons de poissons zèbres exposés à l'extrait organique de sédiment de la Risle présentaient des anomalies majeures du développement qui sont typiques d'une exposition à des composés de type dioxine et HAP: malformations de la queue, œdèmes péricardiques, diminution de la fréquence cardiaque et de la circulation sanguine, comportement léthargique. La **figure 11** illustre certaines de ces anomalies qui ont été observées chez

l'ensemble des individus exposés à la plus forte concentration de cet extrait, i.e. 4 g-EQ sed/L. Pour l'ensemble des autres extraits testés, aucune de ces anomalies n'a été observée.



**Figure 11.** Exemple de malformation induite chez un embryon de poisson zèbre exposé au sédiment de la Risle à Ambert qui possède l'activité dioxin-like la plus marquée. A gauche : poisson témoin ; à droite : poisson exposé à un extrait de sédiment montrant une malformation de la queue (flèches) et un œdème péricardique (astérisque).

L'analyse comparative des données obtenues *in vivo* sur les embryons et *in vitro* obtenues dans la lignée cellulaire hépatique de poisson PLHC-1 est illustrée par la **figure 12**. On observe que globalement les activités dioxin-like mesurées *in vivo* et *in vitro* sont bien corrélées ( $R^2 = 0,86$ ). Cependant pour trois sites (MAR, MAD et YSE, points en rouge sur la **figure 12**), des différences notables ont été observées. Ainsi, les sites MAD et MAR sont classés comme moyennement ou faiblement contaminés sur la base des données *in vivo* alors que leur activité dioxin-like *in vitro* les classe parmi les sites les plus contaminés. A l'inverse, l'activité dioxin-like mesurée chez les embryons à partir du sédiment YSE révèle une forte contamination que le test *in vitro* sur lignée cellulaire sous-estime. Malgré tout, si ces trois sites sont intégrés dans l'analyse de corrélation, celle-ci est restée significative avec un  $R^2 = 0,58$ .



**Figure 12.** Corrélation entre les activités dioxin-like mesurées *in vivo* chez les embryons de poisson (abscisse) et celles mesurées *in vitro* sur lignée cellulaire (ordonnée). Deux sites (en rouge) ont été exclus de l'analyse de la corrélation (voir texte).

Si globalement les mesures d'activités *in vitro* et *in vivo* se corrélaient, il est important de noter que les équivalents TCDD par gramme de sédiment mesurés *in vitro* sont en moyenne 13 fois supérieurs aux équivalents TCDD mesurés *in vivo*. Cette différence peut s'expliquer en partie par une différence de sensibilité de réponse des bio-essais vis-à-vis de la TCDD. En effet, la concentration induisant 50% ( $EC_{50}$ ) de réponse EROD de la dioxine chez l'embryon de poisson zèbre

est 10 fois plus faible que celle mesurée dans la lignée hépatique PLHC-1 utilisée dans cette étude ( $EC_{50}$  TCDD *in vivo* =  $8 \cdot 10^{-12}$  M contre  $EC_{50}$  TCDD *in vitro* =  $9,8 \cdot 10^{-11}$  M).

Outre les mesures d'activités EROD, l'ensemble des sédiments a été testé pour déterminer leurs effets sur une activité enzymatique hépatique liée aux cytochromes P450 de la famille 3A (activité enzymatique BFCOD). Ces cytochromes sont impliqués dans le métabolisme de xéno-biotiques et de composés endogènes, notamment les hormones stéroïdiennes. Les résultats obtenus (Annexe 5) montrent que la majorité des sédiments induisent les activités BFCOD. Chez les poissons, les régulations des gènes *cyp3A* sont moins bien connues que chez les mammifères. Cependant, il a été mis en évidence que, chez les embryons, le récepteur de la dioxine (récepteur *Aryl hydrocarbon* ou AhR) régulait positivement l'expression du gène *cyp3A65* (Tseng et al. 2005). De même, des données récentes obtenues au laboratoire montrent qu'un ensemble de composés dioxin-like induisent l'activité BFCOD *in vitro* et *in vivo* chez les poissons (Creusot et al. en préparation). Chez les poissons, l'implication du récepteur *Pregnane X receptor* (PXR) dans cette régulation a également été démontrée (Li et al. 2008). Ce récepteur est connu pour être la cible de nombreux composés pharmaceutique et de pesticides (Creusot et al. 2010, Lemaire et al. 2006). Chez les poissons, des composés azolés sont capables, au contraire, d'inhiber les activités enzymatique BFCOD (Hasselberg et al. 2008). Aussi, les modulations de l'activité BFCOD mesurées dans notre étude reflètent-elles très certainement la présence de composés de différentes natures (e.g. dioxine, HAP, médicaments, pesticides) dans les matrices environnementales ce qui peut expliquer les différences de réponses observés avec les activités EROD.

L'ensemble de ces données démontrent que les substances présentes dans les matrices sédimentaires testées sont capables d'affecter différents cytochromes P450 hépatiques impliqués dans le métabolisme de xéno-biotiques et de composés endogènes (P450 1A et 3A) au cours du développement embryonnaire chez les poissons.

### 3.4.3. DISCUSSION SUR L'UTILISATION DES BIO-ESSAIS SUR EMBRYONS DE POISSON ZÈBRE.

Dans cette partie de l'étude, nous démontrons la faisabilité de mettre en œuvre des bio-essais *in vivo* sur embryons de poissons zèbres pour la détection et la quantification d'activité œstrogéniques et dioxin-like à partir d'extraits organiques de matrices environnementales

Les données obtenues *in vivo* ont permis de confirmer la présence de composés à activité œstrogénique dans les eaux de surface de certains sites qui peuvent être considérés comme préoccupants pour les organismes aquatiques, comme c'est le cas des eaux de surface de la Loire à Montjean, du Bedat à Saint Laure, de la Dore à Olliergues. Pour ce dernier site, une réponse œstrogénique a été obtenue dans le modèle poisson zèbre alors qu'aucune activité œstrogénique n'a été quantifiée dans la lignée humaine MELN révélant des différences inter-modèles qu'il s'agira de mieux documenter dans l'avenir. Quoiqu'il en soit, pour les sites présentant des profils de danger particuliers comme c'est le cas de la Dore, le modèle poisson zèbre *in vivo* fournit des informations complémentaires aux modèles *in vitro* qui permettent une meilleure caractérisation de la contamination et des effets.

Par ailleurs, nos données confortent celles obtenues *in vitro* sur les activités dioxin-like en démontrant la forte occurrence environnementale de ces activités sur l'ensemble des sédiments investigués. Le site de la Risle apparaît de ce point de vue comme particulièrement contaminé.

Au sein de la démarche bio-analytique, les bioessais *in vivo* apportent des informations toxicologiques pertinentes sur les impacts biologiques potentiels des substances quantifiées dans les matrices. En effet, ces bioessais se basent sur l'analyse d'expression de gènes cibles s'exprimant dans le foie (*cyp1* et *cyp3a*) et le cerveau (*cyp19a1b*). Ainsi, au-delà de l'aspect purement bio-analytique, nos données démontrent que les polluants présents dans la matrice sédimentaire affectent l'expression d'enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques et de composés endogènes. De même, on peut conclure que dans les eaux de surface de certains sites (LOM, BED, OLL), des polluants œstrogéniques ciblent les cellules gliales radiales qui jouent un rôle prépondérant dans le développement du cerveau en donnant naissance aux neurones. Ces résultats suggèrent donc un impact potentiel des polluants sur des processus neuro-développementaux.

Enfin, conjointement aux analyses moléculaires et biochimiques, il est possible d'évaluer des critères de toxicité plus globaux, lesquels ont permis de mettre en évidence des altérations du développement embryo-larvaire (e.g. œdèmes, malformation de la queue) pour le site de la Risle. L'utilisation de bio-essai *in vivo*, plus intégratif que les essais *in vitro*, permet de tenir compte d'une complexité biologique (embryon) dans un modèle de vertébré aquatique. Les réponses obtenues sont

donc plus pertinentes si l'on souhaite aller plus loin que la simple détection de familles de composés chimiques.

### 3.5. CONCLUSIONS SUR L'APPROCHE BIO-ANALYTIQUE *IN VITRO* ET *IN VIVO*

Dans cette partie de l'étude prospective, nous avons mis en œuvre une batterie de bio-essais *in vitro* et *in vivo* au sein d'une démarche bio-analytique sur des extraits de sédiment et d'eau de surface. Du point de vue opérationnelle, nous démontrons la faisabilité d'échantillonner les matrices environnementales (eau de surface, sédiments) et de tester les extraits organiques sur un panel d'outils biologiques innovants. Les résultats obtenus à l'aide de ces bio-essais ont permis d'apporter des informations nouvelles et pertinentes en dressant un bilan de la contamination des systèmes aquatiques par des familles de polluants émergents à activité perturbateurs endocriniens et *dioxin-like* et d'identifier des sites particulièrement contaminés sur différents bassins. L'établissement de profils d'activités *in vitro*, sur la base de la quantification d'équivalents-toxiques, s'avère un outil sensible et performant pour 1) cribler et hiérarchiser les différents sites et 2) fournir des informations complémentaires aux analyses chimiques en mettant en exergue l'occurrence de substances à activité PE et DL, substances qui ne sont que très partiellement pris en compte par les listes de surveillance. Nos résultats illustrent également la nécessité de considérer les différents compartiments du milieu pour une évaluation optimale de la contamination et montrent que les contaminants responsables d'une même activité peuvent différer d'un compartiment à l'autre.

Cette démarche bioanalytique ouvre donc la voie à des investigations plus poussées pour identifier les composés responsables des activités biologiques. Cette information serait particulièrement pertinente sur les sites qui se sont révélés très contaminés ou présentant des profils atypiques. Dans cette optique, il convient de mettre en place une approche de type EDA (*Effect-Directed Analysis*) combinant outils biologiques et analyses chimiques pour isoler les molécules actives et les identifier par spectrométrie de masse (Brack et al 2003). Une telle approche a par exemple été entreprise avec succès sur le site d'Olliergues où divers stéroïdes d'origine pharmaceutiques ont été identifiés (Creusot et al, 2014). Il conviendrait de déployer une démarche similaire sur d'autres sites particuliers comme la Loire à Montjean afin d'identifier les molécules responsables des activités œstrogéniques mesurées *in vitro* et *in vivo*.

Cette étude soulève également la question du choix des bioessais à utiliser au sein d'une batterie pour une évaluation du risque pour les organismes aquatiques. Dans notre étude, le bioessai *in vivo* sur poisson zèbre a fourni des informations importantes en termes d'effet sur organisme entier, ce que les tests *in vitro* ne permettent pas d'évaluer. Du point de vue bio-analytique, Il existe une bonne concordance, qualitative et quantitative, entre les essais *in vitro* et *in vivo* pour l'activité dioxin-like des sédiments (tous les sites). Pour les activités œstrogénique mesurées dans les POCIS des réponses spécifiques ont été obtenues à l'aide du modèle poisson zèbre pour le site de la Dore à Olliergues. Des différences notables sont également révélées comme l'absence *in vivo* de détection d'effet œstrogénique dans le sédiment, différence qui a par ailleurs été confirmée par un bioessai *in vitro* basé sur des cellules de poisson zèbre récemment développé (Cosnefroy et al. 2012). Ces résultats soulèvent l'importance du choix du modèle biologique pour évaluer la contamination des milieux à l'aide de bioessais. Pour une évaluation pertinente du danger PE pour les poissons, il est important de considérer des bioessais représentatifs des espèces du milieu aquatique. En ce sens, ceux développés chez le poisson zèbre peuvent être préconisés dans cette démarche bio-analytique des milieux aquatiques.

Les bioessais *in vivo* permettent en outre de révéler des effets au niveau moléculaire et biochimique, au sein de tissus cibles (cerveau et foie) dans un organisme en développement. Ainsi, la comparaison des réponses *in vitro* et *in vivo* permet d'envisager la détermination de seuils de réponse *in vitro* au-delà desquels on peut s'attendre à un effet à l'échelle de l'organisme. En ce sens, l'utilisation conjointe des bio-essais *in vivo* permettent d'apporter des éléments d'information pour une interprétation toxicologique à la mesure des équivalents toxiques sur la base des bio-essais *in vitro*. Il s'agira dans le futur de poursuivre cette démarche en l'appliquant à un ensemble plus conséquent de sites, afin de confirmer cette tendance et d'affiner des seuils de réponse biologique *in vitro*.

## **4. IMPACTS SUR LES POISSONS SAUVAGES : RÉPONSES DE BIOMARQUEURS**

### **4.1. CONTEXTE ET MÉTHODES**

Un premier volet de l'étude porte sur l'évaluation des effets induits par les différents stress présents sur les sites chez le poisson grâce à l'utilisation d'une approche multi-biomarqueurs. Les biomarqueurs sont des réponses biologiques mesurées au sein d'un organisme reflétant l'interaction entre l'organisme étudié et son milieu de vie. De ce fait, les biomarqueurs représentent une réponse précoce à la contamination intégrant la biodisponibilité des polluants, leur métabolisation par les organismes, les interactions entre les contaminants ainsi que la sensibilité et la susceptibilité des espèces étudiées. Afin de caractériser au mieux l'impact de la contamination du milieu sur les organismes qui y vivent, il est désormais reconnu comme nécessaire de recourir à une approche multi-biomarqueurs combinant des paramètres relatifs à différentes fonctions physiologiques des organismes étudiés et/ou à différents mécanismes d'action des contaminants. Cette approche permet grâce à l'analyse des réponses obtenues i) d'appréhender au mieux les groupes de substances ou les mécanismes d'action des contaminants qui sont impliqués dans les perturbations mesurées au niveau des organismes et, ii) d'envisager d'éventuelles conséquences de ces perturbations individuelles sur les populations. Dans le cadre de l'étude prospective de recherche de micropolluants dans les eaux de surface des DOM et de métropole, une approche multi-biomarqueurs a été mise en œuvre en complément des analyses chimiques mais également des approches écotoxicologiques précédemment décrites.

Dans ce contexte, un ensemble de biomarqueurs relatifs à différentes fonctions physiologiques et/ou mécanismes d'action des contaminants a été mesuré ([Tableau 8](#)).

**La défense vis-à-vis des polluants environnementaux.** Les poissons disposent de mécanismes de défense en charge de l'élimination des xénobiotiques. L'induction de ces systèmes de défense va d'une part signer l'exposition mais également induire un risque de perturbation de la fitness des organismes du fait de l'utilisation massive d'énergie. Ainsi, la mesure d'indicateurs de biotransformation (EROD, GST) s'avère pertinente pour mieux comprendre des perturbations du métabolisme énergétique en lien avec l'exposition des organismes. De même, la mesure d'un marqueur d'atteinte cellulaire comme la lipoperoxydation fournit une information complémentaire quant aux capacités de défense des organismes.

**L'altération neurotoxique.** De nombreux polluants environnementaux sont connus pour altérer la transmission de l'influx nerveux. Cette perturbation peut alors retentir sur le comportement des individus et sur les fonctions vitales mettant alors en péril le maintien des organismes dans le milieu. Pour évaluer les atteintes neurotoxiques, la mesure de l'activité cholinestérasique est décrite comme un biomarqueur pertinent chez les organismes aquatiques.

**La reproduction.** Cette fonction qui est garante du renouvellement des populations peut se voir perturber selon différentes voies. La plus connue est celle liée à l'exposition à des perturbateurs endocriniens qui peut induire une disparition des populations piscicoles. Dans ce contexte, différents indicateurs peuvent être mesurés pour diagnostiquer une éventuelle perturbation de la fonction endocrine (vitellogénine, épaissement de l'épithélium rénal, intersexe).

**L'immunité.** Elle est impliquée dans la défense des organismes vis-à-vis des agressions externes notamment par des pathogènes. Cette fonction peut être altérée par les polluants environnementaux entraînant alors une hypersensibilité des organismes et une plus grande vulnérabilité aux agressions biologiques. Aussi, dans ce contexte, la mesure de différents indicateurs du statut immunitaire des poissons s'avère pertinente (formule leucocytaire, phagocytose, apoptose/nécrose, stabilité lysosomale).

**La gestion de l'énergie.** Il s'agit en effet d'un processus central qui supporte de nombreuses fonctions physiologiques (reproduction, immunité, défense...). Aussi, la perturbation des mécanismes de gestion de l'énergie par des polluants et d'autres stress environnementaux peut avoir des conséquences sur le maintien des individus et des populations. Afin d'appréhender les perturbations du métabolisme énergétique, différents paramètres décrits comme de bons biomarqueurs peuvent être utilisés en lien avec les capacités digestives ou l'état et l'allocation des réserves énergétiques. C'est notamment le cas du facteur de condition.

**Tableau 8.** Biomarqueurs mesurés chez le poisson dans le cadre de l'étude prospective. Le tableau présente pour chaque paramètre proposé son intérêt ainsi que différentes informations méthodologique (type de méthode, organe utilisé, recommandations d'échantillonnage).

Biomarqueurs	Fonction/mécanisme d'action	Intérêt	Organe utilisé	Méthode
Activité EROD	Métabolisation des polluants organiques	Exposition aux polluants agonistes du récepteur Ah (HAP, PCB,...)	Foie	Dosage fluorimétrique
Glutathion-S-Tranferase	Métabolisation des polluants organiques	Exposition à des polluants organiques	Foie	Dosage colorimétrique
Acétylcholinestérase	Neurotoxicité	Exposition à des polluants neurotoxiques, lien avec perturbations du comportement	Muscle	Dosage colorimétrique
Lipo-peroxydation	Effet du stress oxydant, état général du poisson	Marqueur général d'exposition des organismes	Foie	Dosage fluorimétrique
Vitellogénine	Reproduction	Exposition aux polluants oestrogéno-mimétiques	Sang	ELISA
Phagocytose	Immunité	Capacité de défenses immunitaires	Rate	Cytométrie en flux
Flambée oxydative	Immunité	Capacité de défenses immunitaires	Rate	Cytométrie en flux
Stabilité lysosomale	Etat de santé général/Immunité	Etat général	Rate	Cytométrie en flux
Intersexe	Reproduction	Exposition à des perturbateurs endocriniens, perturbation de capacité de reproduction	Gonade	Histologie
Agrégats macrophagiques	Immunité/Etat général	Etat général, perturbation immunitaire	Rein	Histologie

## 4.2. RÉSULTATS

### 4.2.1. PERTURBATION DU MÉTABOLISME DES XÉNOBIOTIQUES

3 biomarqueurs ont été mesurés au niveau hépatique : l'activité EROD, enzyme de biotransformation de phase 1 ; l'activité GST, enzyme de biotransformation de phase 2 et les TBARS, indicateur de lipoperoxydation.

L'analyse des résultats se fait en comparant la moyenne de chaque site obtenue par des mesures individuelles effectuées sur 20 poissons environ à une valeur basale construite à partir d'un historique de données collectées à l'INERIS et intégrant le site du Bramerit à Grandjean (BRA) qui est la seule station de référence telle que définie par la DCE qui a permis le prélèvement de goujons.

Les résultats obtenus (**Tableau 9**) mettent en évidence une induction de l'activité EROD chez les poissons provenant de 4 sites (BED, HER, LOI et LOV) qui pourrait traduire l'exposition des goujons à des polluants organiques métabolisables par des enzymes de phase 1. De même, des inductions de l'activité GST ont été mesurées sur 2 sites (LOV et MAD) confirmant l'exposition à des polluants organiques sur le site de la Loire à Veauchette (LOV). Par contre, aucun phénomène d'inhibition de cette activité enzymatique pouvant traduire une diminution des capacités de défense des poissons n'a été observé. Pour compléter, peu d'atteintes de type lipoperoxydation ont été observées puisque seuls les poissons du site MAD présentent une induction significative des TBARS qui traduit les effets de stress notamment chimiques (en lien avec la réponse de la GST) sur les membranes cellulaires.

**Tableau 9.** Déviation par rapport à la référence de 3 biomarqueurs relatifs aux mécanismes de défense vis-à-vis des xénobiotiques (EROD, GST et TBARS) mesurés chez des goujons échantillonnés sur 14 stations dans le cadre de l'étude prospective « eau de surface en Métropole ». (+, induction ; =, pas d'effet ; ANOVA suivi d'un test de Tuckey avec  $p < 0,05$ )

	EROD	GST	TBARS
AUV	=	=	=
BED	+	=	=
BRA	=	=	=
CHE	=	=	=
HER	+	=	=
YER	=	=	=
JOU	=	=	=
LOA	=	=	=
LOI	+	=	=
LOM	=	=	=
LOV	+	+	=
MAD	=	+	+
OLL	=	=	=
RIS	=	=	=

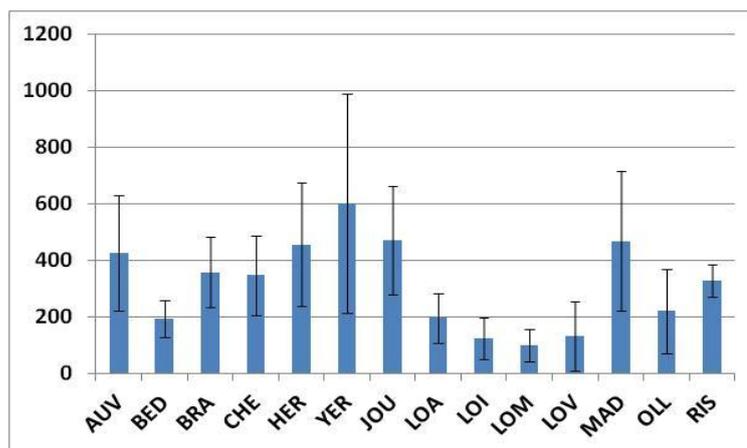
Ces premiers résultats mettent en évidence, sur quelques sites d'étude, la réponse des organismes à une exposition à des stress pouvant être de nature diverses mais dont l'origine reste à préciser.

### 4.2.2. NEUROTOXICITÉ

L'activité de l'acétylcholinestérase est mesurée dans le muscle de goujons échantillonnés sur 14 sites. Les résultats sont analysés, comme pour les mécanismes de défense vis-à-vis des polluants, au regard d'une valeur basale préalablement établie.

Les résultats obtenus (**Figure 13**) montrent des inhibitions de cette activité enzymatique sur 5 sites d'étude (BED, LOA, LOI, LOM et LOV). Historiquement décrite comme imputable aux organophosphorés et aux carbamates, des nombreuses autres familles de molécules peuvent inhiber l'activité de l'AChE, une inhibition qui peut se traduire sur d'autres fonctions de l'organisme notamment son comportement. A la lecture de ces résultats, force est de constater que les 4 stations échantillonnées sur la Loire se caractérisent par une activité AChE faible ce qui pourrait être expliqué par les pressions anthropiques exercées sur ce fleuve. A contrario, les goujons échantillonnés sur l'Yerres à Courtomer (YER) se caractérisent par une induction significative de l'activité AChE. Bien

que la signification toxicologique de ce phénomène ne soit pas connue, ce type de réponse peut être le reflet de l'exposition à différents polluants organiques et minéraux.

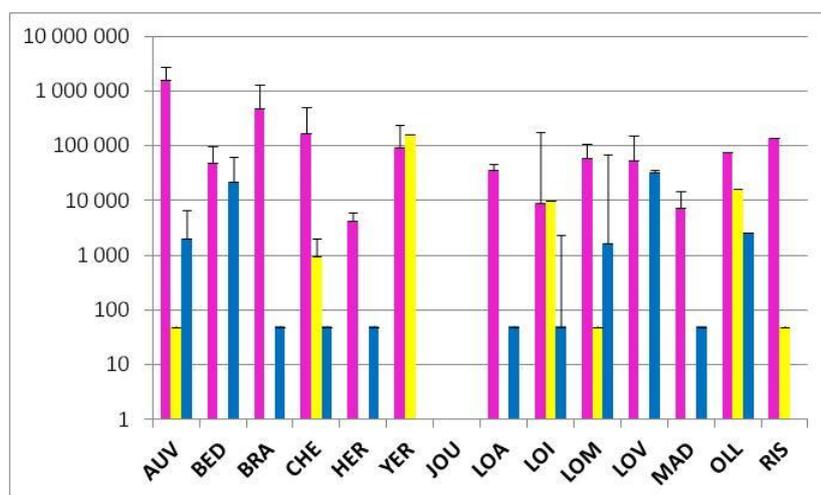


**Figure 13.** Activité de l'AChE musculaire exprimée en U/g de protéines chez des goujons échantillonnés sur 14 stations dans le cadre de l'étude prospective « eau de surface en Métropole ».

#### 4.2.3. PERTURBATION ENDOCRINIENNE

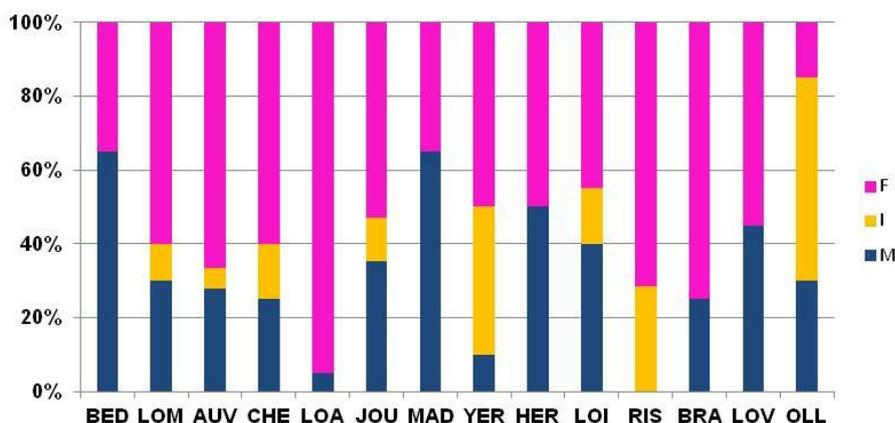
Afin d'appréhender les effets d'une exposition à des polluants perturbateurs endocriniens, deux biomarqueurs sont utilisés : la vitellogénine circulante et l'intersexualité.

Concernant la mesure de la vitellogénine (VTG), les résultats obtenus sont présentés sur la **figure 14**. Sur les sites BED et LOV, les goujons mâles échantillonnés présentent des concentrations de VTG élevées (>10 µg/mL) en comparaison aux valeurs basales observées sur les sites non impactés étudiés dans le cadre de cette étude ou dans d'autres travaux (Sanchez et al., 2011). De même, sur le site YER, les poissons intersexués présentent également une concentration de VTG circulante proche de celle mesurée chez les femelles. Sur ces trois sites, les inductions de VTG observées traduisent très certainement une exposition à des polluants perturbateurs endocriniens à activité oestrogénique. Un profil similaire est observé chez les goujons échantillonnés sur le site OLL. Toutefois, au regard des résultats de la mesure de l'intersexe observés sur ce site et qui montrent un occurrence importante (55%) avec une diminution de la proportion de goujons femelles (*i.e.* masculinisation ; Sanchez et al., 2011), ce résultat pourrait indiquer soit une synthèse naturelle de VTG par des poissons génétiquement femelles soit une exposition à des polluants pouvant avoir une activité oestrogénique.



**Figure 14.** Concentration de la vitellogénine circulante (ng/mL) chez les goujons échantillonnés dans le cadre de l'étude prospective. Les histogrammes représentent en bleu les mâles, en jaune les intersexués et en rose les femelles.

Pour ce qui est de l'évaluation de l'intersexualité, deux paramètres sont mesurés : l'occurrence qui représente la proportion de poissons affectés par rapport aux poissons échantillonnés et la sévérité qui est évaluée en utilisant un indice préalablement développé chez le flet (Bateman et al., 2009) (Figure 15). Les résultats obtenus montrent que 8 des 14 sites échantillonnés présentent des poissons intersexués avec une occurrence qui varie entre 5 et 55%. Si chez le goujon, une occurrence de l'ordre de 5 % peut être considérée comme normale, force est de constater que plusieurs sites présentent des occurrences significativement supérieures. C'est notamment le cas de YER (40%) et de RIS (29%) où des indices de sévérité significativement plus élevés sont également observés (8,1 et 2,4 respectivement). Ces réponses traduisent l'exposition des organismes à des perturbateurs endocriniens et tendent à indiquer de potentielles perturbations de la reproduction.



**Figure 15.** Occurrence de l'intersexe exprimée en pourcentage par rapport au nombre de poissons échantillonnés chez des goujons provenant de 14 stations dans le cadre de l'étude prospective.

#### 4.2.4. IMMUNOTOXICITÉ

Les mesures de paramètres en lien avec le statut immunitaire des poissons ont été réalisées sur 13 sites. La formule leucocytaire, l'apoptose et la nécrose, la phagocytose et la flambée oxydative ont été mesurées immédiatement après le prélèvement des poissons (Tableau 10). L'analyse des résultats se fait en comparant les résultats obtenus sur un site donné à ceux obtenus sur un site de référence (BRA).

**Tableau 10.** Variation des réponses des immuno-marqueurs mesurés chez des goujons échantillonnés sur 13 stations dans le cadre de l'étude prospective. Le site de référence utilisée pour la comparaison est BRA. (+, induction ; =, pas d'effet ; ANOVA suivi d'un test de Tuckey avec  $p < 0,05$ )

	Formule leucocytaire	Nécrose	Phagocytose	ROS
AUV	=	=	+	=
BED	=	=	=	=
BRA	=	=	=	=
CHE	=	=	+	=
HER	=	=	=	=
YER	=	=	=	=
JOU	=	=	=	+
LOA	=	=	=	=
LOI	=	=	=	=
LOM	=	+	=	+
LOV	+	+	=	=
MAD	=	=	+	=
RIS	+	+	=	+

Les résultats obtenus mettent en évidence une déstabilisation leucocytaire associée à une augmentation de la mortalité cellulaire sur les sites LOV et RIS qui pourraient traduire la réaction des poissons suite à l'exposition à un stress biologique. De plus, des inductions de la phagocytose et de la flambée oxydative sont observées sur plusieurs sites (AUV, CHE, JOU, LOM, RIS) et peuvent être expliquées pour l'exposition à un stress biologique et/ou à un stress chimique. Force est de constater

que sur l'ensemble des sites étudiés, aucune inhibition des défenses immunitaires pouvant suggérer un affaiblissement de l'organisme n'a été observée.

### 4.3. CONCLUSION SUR LES BIOMARQUEURS

La mesure d'un ensemble de biomarqueurs chez des goujons échantillonnés sur un ensemble de sites répartis sur le territoire national apporte des éléments de conclusion sur la qualité des milieux aquatiques étudiés. En effet, sur la base des réponses biologiques observées chez le poisson, plusieurs sites se distinguent des autres.

- La Dore à Olliergues (OLL) où les poissons présentent une occurrence élevée d'intersexualité sévère associée à une induction de la vitellogénine circulante. Ce profil de réponses traduit l'exposition à des polluants perturbateurs endocriniens imputable à la présence d'une activité industrielle à l'amont du site<sup>1</sup>.
- La Risles à Ambenay (RIS) où une proportion importante de goujons intersexués a été mise en évidence traduisant probablement l'exposition des polluants perturbateurs endocriniens.
- Le Bedat à Saint Laure (BED) où une augmentation significative de la vitellogénine circulante a été mise en évidence chez les goujons mâles probablement en raison de la pression urbaine exercée sur le site d'étude.
- L'Yerres à Courtomer (YER) où les poissons présentent un profil de réponse (induction de l'ACHé, de la vitellogénine et intersexualité) qui traduit l'exposition à de multiples stress.
- La Loire (LOA, LOI, LOM, LOV) qui est le seul grand fleuve étudié ici sur une grande partie de son linéaire, présente des poissons qui se caractérisent par une inhibition de l'activité AChE traduisant l'exposition à un stress neurotoxiques. De plus, les poissons échantillonnés sur le site de la Loire à Veauchette (LOV) présentent une induction de la vitellogénine ainsi qu'une déstabilisation de la formule leucocytaire associée à une augmentation de la mortalité cellulaire ; un profil qui traduit l'exposition à un panel complexe de polluants chimiques voire biologiques.

Ces différents résultats montrent l'intérêt de la mesure des biomarqueurs chez des poissons sauvages pour évaluer les effets, sur la santé des organismes, des différentes pressions exercées sur les sites d'étude. Toutefois, le besoin de disposer d'une espèce sentinelle bien connue et largement répartie sur la zone d'étude rend complexe la mise en œuvre d'une approche multi-biomarqueurs sur des poissons sauvages à large échelle.

---

<sup>1</sup> Le site de la Dore à Olliergues a fait l'objet d'investigations spécifiques préalablement à cette étude qui ont mis en évidence le même profil de réponses du fait de l'exposition à des substances actives médicamenteuses (Sanchez et al. 2011, Creusot et al. 2014).

## 5. CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans un contexte de surveillance de l'état chimique des masses d'eau, cette étude démontre l'intérêt d'une batterie de bioessais *in vitro* et *in vivo* en tant qu'outil de diagnostic de la qualité chimique et d'identification des sites d'intérêt au regard de la contamination par les perturbateurs endocriniens. Pour certains sites les plus contaminés (e.g. OLL, YER, RIS, LOM), la mesure de biomarqueurs biochimiques, notamment d'exposition aux perturbateurs endocriniens (vitellogénine, intersexualité), a confirmé un impact potentiel de la contamination chimique sur les populations de poissons autochtones. Si un lien de causalité reste difficile à établir entre exposition chimique et effets chez des poissons sauvages, en raison des stress multiples auxquels sont soumis ces organismes, il est notable que le diagnostic basé sur les bioessais et les biomarqueurs identifie les mêmes sites comme étant les plus impactés.

Cette approche présente néanmoins certaines limites. Si elle fournit un premier niveau de diagnostic, elle ne permet pas d'identifier formellement les molécules responsables des effets. Dans ce but, une démarche combinant approches biologique et analytique, de type EDA, peut être préconisée. Si les bioessais *in vitro* basés sur cellules humaines apparaissent des outils sensibles et performants pour le criblage d'échantillons, les bioessais *in vivo* restent indispensables pour une évaluation des effets à l'échelle de l'individu. Notamment, dans une démarche d'évaluation du risque pour les organismes aquatiques, la définition de la batterie de bioessais apparaît déterminante. Notre étude confirme la pertinence du modèle poisson zèbre dans une démarche intégrée *in vitro* et *in vivo* pour la caractérisation de PE au sein de mélanges environnementaux.

Au niveau national et international, il y a aujourd'hui consensus de la part des acteurs scientifiques et réglementaires pour considérer ces outils et les inclure dans les stratégies à mettre en place pour la future surveillance des substances émergentes dans les milieux aquatiques. Néanmoins l'évaluation de l'opérationnalité d'une telle démarche basée sur les réponses biologiques reste un axe de recherche et de développement important.<sup>2</sup>

Du point de vue opérationnel, notre étude a permis de révéler et de caractériser la contamination des milieux par des molécules à activité de perturbateurs endocriniens ; les analyses chimiques n'expliquant pas ou que très partiellement les activités biologiques mesurées par les bioessais. Ces résultats soulèvent d'une part la nécessité de mieux renseigner ces activités biologiques de manière plus systématique dans le cadre de la surveillance des milieux, d'autre part d'identifier les molécules responsables de ces activités afin d'affiner la liste des substances prioritaires à surveiller.

Au regard des limites des analyses chimiques ciblant des composés individuels, l'intégration de bioessais permettant une détection plus exhaustive de contaminants d'intérêt écotoxicologique peut être préconisée si l'on souhaite correctement évaluer l'état de contamination des masses d'eau. Notre étude montre l'opérationnalité et la complémentarité des outils biologiques mis en œuvre pour la détection et la quantification de familles de polluants émergents (e.g. PE) ainsi que l'évaluation de leurs impacts des populations autochtones. Si les bioessais (*in vitro* et *in vivo*) peuvent être appliqués en routine sur des matrices environnementales faciles à échantillonner (sédiments, eaux de surface), une meilleure connaissance de leur pouvoir prédictif. En particulier, l'établissement de concentrations seuils *in vitro* au-delà desquelles un danger est mesuré *in vivo* constitue un axe de développement qu'il s'agira de poursuivre pour affiner le diagnostic à l'aide de ces outils. Enfin, si les biomarqueurs peuvent, sur certains sites particuliers, rendre compte d'un impact des contaminants sur les individus peuplant ces sites, sa mise en œuvre logistique à large échelle constitue un enjeu.

---

<sup>2</sup> Différents travaux sur l'évaluation, la validation et la standardisation des bioessais sont actuellement menés dans le cadre de groupes de travail (e.g. NORMAN, AQUAREF) ou de projets collaboratifs (e.g. FP7-EDA-EMERGE, FP7-SOLUTIONS) auxquels l'INERIS participe.

## 6. BIBLIOGRAPHIE

- Ait-Aïssa, S. (2009). "Outils bio-analytiques *in vitro* : principe et apports pour la surveillance des contaminants organiques dans le milieu aquatique." Rapport d'étude.
- Aït-Aïssa, S. (2010). "Caractérisation de l'état de contamination de sédiments de rivières par des composés à activité « dioxin-like » : développement et application d'un outil bio-analytique *in vitro* " Rapport d'étude.
- Ait-Aïssa, S. et N. Creusot (2011). "Veille relative aux avancées scientifiques et techniques des approches EDA pour la surveillance des substances émergentes." Note de synthèse.
- Bateman, K. S., G. D. Stentiford et S. W. Feist (2004). "A ranking system for the evaluation of intersex condition in european flounder (*Platichthys flesus*)." *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(12): 2831-2836.
- Brion, F., Le Page, Y., Piccini, B., Cardoso, O., Tong, S.-K., Chung, B.-c. and Kah, O. (2012) Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures *in vivo* using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos. *PLoS one* 7, e36069.
- Cheshenko, K., Brion, F., Le Page, Y., Hinfray, N., Pakdel, F., Kah, O., Segner, H. and Eggen, R.I.L. (2007) Expression of zebra fish aromatase cyp19a and cyp19b genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol. Sci.* 96, 255-267.
- Cosnefroy, A., Brion, F., Maillot-Marechal, E., Porcher, J.M., Pakdel, F., Balaguer, P. and Ait-Aïssa, S. (2012) Selective Activation of Zebrafish Estrogen Receptor Subtypes by Chemicals by Using Stable Reporter Gene Assay Developed in a Zebrafish Liver Cell Line. *Toxicol. Sci.* 125, 439-449.
- Creusot, N. (2011). "Contribution de l'approche effect directed analysis à l'identification de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques." Thèse de doctorat, Université Bordeaux I.
- Creusot, N., S. Ait-Aïssa, N. Tapie, P. Pardon, F. Brion, W. Sanchez, E. Thybaud, J.-M. Porcher et H. Budzinski (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., H. Budzinski, P. Balaguer, S. Kinani, J.-M. Porcher et S. Ait-Aïssa (2013a). "Effect-directed analysis of endocrine-disrupting compounds in multi-contaminated sediment: identification of novel ligands of estrogen and pregnane X receptors." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(8): 2553-2566.
- Creusot, N., S. Kinani, P. Balaguer, N. Tapie, K. LeMenach, E. Maillot-Marechal, J. M. Porcher, H. Budzinski et S. Ait-Aïssa (2010). "Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(2): 569-583.
- Creusot, N., N. Tapie, B. Piccini, P. Balaguer, J.-M. Porcher, H. Budzinski et S. Ait-Aïssa (2013b). "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.
- David, A., E. Gomez, S. Ait-Aïssa, M. Bachelot, D. Rosain, C. Casellas et H. Fenet (2010). "Monitoring organic contaminants in small French coastal lagoons: comparison of levels in mussel, passive sampler and sediment." *Journal of Environmental Monitoring* 12(7): 1471-1481.
- Fenet, H., E. Gomez, A. Pillon, D. Rosain, J. C. Nicolas, C. Casellas et P. Balaguer (2003). "Estrogenic activity in water and sediments of a French river: Contribution of alkylphenols." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44(1): 1-6.
- Fetter E, Krauss M, Brion F, Kah O, Scholz S, Brack W. Effect-directed analysis for estrogenic compounds in a fluvial sediment sample using transgenic cyp19a1b-GFP zebrafish embryos. *Aquat Toxicol.* 2014 May 19;154C:221-229. doi: 10.1016/j.aquatox.2014.05.016.
- Gong, J., Y. Ran, D.-Y. Chen et Y. Yang (2011). "Occurrence of endocrine-disrupting chemicals in riverine sediments from the Pearl River Delta, China." *Marine Pollution Bulletin* In Press, Corrected Proof.
- Hamers, T., P. E. G. Leonards, J. Legler, A. D. Vethaak et C. A. Schipper (2010). "Toxicity profiling: An integrated effect-based tool for site-specific sediment quality assessment." *Integrated environmental assessment and management* 6(4): 761-773.
- Hasselberg, L., Grøsvik, B.E., Goksøyr, A. and Celander, M.C. (2005) Interactions between xenoestrogens and ketoconazole on hepatic CYP1A and CYP3A, in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comparative Hepatology* 4
- Hill, E. M., K. L. Evans, J. Horwood, P. Rostkowski, F. O. Oladapo, R. Gibson, J. A. Shears et C. R. Tyler (2010). "Profiles and some initial identification of (anti)androgenic compounds in fish exposed to wastewater treatment works effluents." *Environmental Science & Technology* 44(3): 1137-1143.

- Kinani, S., S. Bouchonnet, N. Creusot, S. Bourcier, P. Balaguer, J. M. Porcher et S. Ait-Aissa (2010). "Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers." *Environmental Pollution* 158(1): 74-83.
- Labadie, P. et H. Budzinski (2005). "Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France)." *Environmental Science & Technology* 39(14): 5113-5120.
- Lemaire, G., W. Mnif, J. M. Pascussi, A. Pillon, F. Rabenoelina, H. Fenet, E. Gomez, C. Casellas, J. C. Nicolas, V. Cavailles, M. J. Duchesne et P. Balaguer (2006). "Identification of new human pregnane X receptor ligands among pesticides using a stable reporter cell system." *Toxicological Sciences* 91(2): 501-509.
- Li, D., Yang, X.L., Zhang, S.J., Lin, M., Yu, W.J. and Hu, K. (2008) Effects of mammalian CYP3A inducers on CYP3A-related enzyme activities in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*): Possible implications for the establishment of a fish CYP3A induction model. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 147, 17-29.
- Louiz, I., S. Kinani, M. E. Gouze, M. Ben-Attia, D. Menif, S. Bouchonnet, J. M. Porcher, O. K. Ben-Hassine et S. Ait-Aissa (2008). "Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of *in vitro* cell-based bioassays: Contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs)." *Science of the Total Environment* 402(2-3): 318-329.
- Matthews JB, Fertuck KC, Celius T, Huang YW, Fong CJ, Zacharewski TR (2002). Ability of structurally diverse natural products and synthetic chemicals to induce gene expression mediated by estrogen receptors from various species. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 82(2-3):181-94.
- Menuet, A., E. Pellegrini, F. Brion, M. M. Gueguen, I. Anglade, F. Pakdel et O. Kah (2005). "Expression and estrogen-dependent regulation of the zebrafish brain aromatase gene." *Journal of Comparative Neurology* 485(4): 304-320.
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K. Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., Yanagisawa, J., Fujii-Kuriyama, Y., Kato, S. (2003). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423 (6939): 545-550
- Pellegrini, E., K. Mouriec, I. Anglade, A. Menuet, Y. Le Page, M.-M. Gueguen, M.-H. Marmignon, F. Brion, F. Pakdel et O. Kah (2007). "Identification of aromatase-positive radial glial cells as progenitor cells in the ventricular layer of the forebrain in zebrafish." *Journal of Comparative Neurology* 501(1): 150-167.
- Sanchez, W., W. Sremski, B. Piccini, O. Palluel, E. Maillot-Marechal, S. Betouille, A. Jaffal, S. Ait-Aissa, F. Brion, E. Thybaud, N. Hinfray et J.-M. Porcher (2011). "Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges." *Environment International* 37(8): 1342-1348.
- Tapie, N., M. H. Devier, C. Soulier, N. Creusot, K. Le Menach, S. Ait-Aissa, B. Vrana et H. Budzinski (2011). "Passive samplers for chemical substance monitoring and associated toxicity assessment in water." *Water Science and Technology* 63(10): 2418-2426.
- Togola, A. et Budzinski, H. (2007) Development of polar organic integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems. *Anal. Chem.* 79, 6734-6741
- Tseng, H.P., Hseu, T.H., Buhler, D.R., Wang, W.D. and Hu, C.H. (2005) Constitutive and xenobiotics-induced expression of a novel CYP3A gene from zebrafish larva. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 205, 247-258.
- Vermeirssen, E. L. M., O. Korner, R. Schonenberger, M. J. F. Suter et P. Burkhardt-Holm (2005). "Characterization of environmental estrogens in river water using a three pronged approach: Active and passive water sampling and the analysis of accumulated estrogens in the bile of caged fish." *Environmental Science & Technology* 39(21): 8191-8198.
- Weiss, J. M., T. Hamers, K. V. Thomas, S. van der Linden, P. E. G. Leonards et M. H. Lamoree (2009). "Masking effect of anti-androgens on androgenic activity in European river sediment unveiled by effect-directed analysis." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 394(5): 1385-1397.

## **7. ANNEXES**

Annexe 1.

Annexe 2.

Annexe 3.

Annexe 4.

Annexe 5.

**Annexe 1.** Quantification des activités PE (Bio-TEQ) *in vitro* dans les sédiments au regard des pressions, du bassin, de la teneur en carbone organique total (COT), de l'état écologique et de l'état chimique des sites investigués.

	ER	Anti-AR	GR	PXR	TCDD-like	HAP-like	Pression	Bassin	COT	état écologique	état chimique
	ngE2-EQ/g	µgFlu-EQ/g	µgDex-EQ/g	µgSR-EQ/g	ngTCDD-EQ/g	µgBaP-EQ/g				2011	2011
<b>AUV</b>	n.d.	n.d.	n.d.	2.2	1.0	5.2	Agricole	AG	1.25	bon	bon
<b>GAR</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	Agricole	AG	4.34	moyen	bon
<b>HER</b>	0.4	n.d.	n.d.	0.5	0.7	0.8	Urbaine	AG	< 0,4	moyen	bon
<b>BRA</b>	3.6	34.1	n.d.	2.9	14.8	23.1	Industrielle	AG	3.46	moyen	bon
<b>JOU</b>	n.d.	n.d.	n.d.	0.8	1.5	12.0	Industrielle	LB	0.46	moyen	mauvais
<b>SAR</b>	n.d.	28.6	n.d.	3.5	13.2	39.4	Urbaine	LB	1.7	bon	mauvais
<b>LOM</b>	0.3	n.d.	n.d.	0.4	2.1	4.0	Agricole	LB	< 0,4	bon	mauvais
<b>LOB</b>	n.d.	n.d.	n.d.	0.7	24.1	22.9	Agricole	LB	5.23	moyen	bon
<b>LOI</b>	3.2	153.3	n.d.	15.0	13.1	42.4	Urbaine	LB	5.71	mediocre	mauvais
<b>OLL</b>	n.d.	n.d.	n.d.	2.5	2.4	4.1	Industrielle	LB	0.27	bon	bon
<b>LOV</b>	n.d.	43.0	n.d.	n.d.	33.5	81.1	Urbaine	LB	3.77	mediocre	mauvais
<b>BED</b>	0.6	38.2	n.d.	2.5	18.1	11.1	Urbaine	LB	0.91	mauvais	mauvais
<b>YER</b>	9.3	117.6	n.d.	44.3	31.8	59.4	Agricole	SN	7.39	mediocre	mauvais
<b>SOU</b>	1.3	35.6	n.d.	9.4	5.4	15.9	Agricole	SN	5.41	moyen	mauvais
<b>CHE</b>	0.7	59.1	n.d.	n.d.	37.3	35.0	Mauvais état	SN	3.32	bon	mauvais
<b>MAR</b>	1.2	65.9	n.d.	0.6	4.9	5.1	Urbaine	SN	0.52	bon	mauvais
<b>RIS</b>	n.d.	202.0	n.d.	4.3	69.6	96.0	Industrielle	SN	5.88	mauvais	mauvais
<b>MAD</b>	3.4	190.5	n.d.	3.3	32.8	56.1	Agricole	RM	4.67	moyen	mauvais
<b>LUE</b>	n.d.	n.d.	n.d.	0.6	1.9	3.2	Référence	RMC	0.44	moyen	bon
<b>YSE</b>	1.0	25.2	n.d.	10.9	2.3	16.3	Agricole	AP	2.95	mauvais	mauvais
<b>LOD</b>	0.01	0.2	0.04	0.1	0.9	0.0005					

*n.t.*, échantillon non testé

**Annexe 2.** Quantification des activités PE (Bio-TEQ) *in vitro* dans les POCIS au regard des pressions, du bassin, de la teneur en carbone organique total (COT), de l'état écologique et de l'état chimique des sites investigués

	ER	Anti-AR	GR	PXR	TCDD-like	HAP-like	Pression	Bassin	état écologique	état chimique
	ngE2-EQ/g HLB	µgFlu-EQ/g HLB	µgDex-EQ/g HLB	µgSR-EQ/g HLB	ngTCDD-EQ/g HLB	µgBaP-EQ/g HLB			2011	2011
<b>AUV</b>	1.9	134.8	n.d.	13.660	n.d.	2.4	Agricole	AG	bon	bon
<b>GAR</b>	< LOQ	80.2	n.d.	16.026	n.d.	2.3	Agricole	AG	moyen	bon
<b>HER</b>	n.d.	n.d.	n.d.	29.546	12.6	3.7	Urbaine	AG	moyen	bon
<b>BRA</b>	1.3	n.d.	n.d.	6.327	n.d.	1.4	Industrielle	AG	moyen	bon
<b>JOU</b>	n.d.	n.d.	n.d.	8.674	n.d.	2.4	Industrielle	LB	moyen	mauvais
<b>SAR</b>	3.7	143.2	n.d.	7.999	n.d.	2.5	Urbaine	LB	bon	mauvais
<b>LOM</b>	198.6	89.9	n.d.	12.359	n.d.	2.2	Agricole	LB	bon	mauvais
<b>LOB</b>	n.d.	64.6	n.d.	11.536	n.d.	1.4	Agricole	LB	moyen	bon
<b>LOI</b>	2.4	70.0	n.d.	5.284	n.d.	1.6	Urbaine	LB	mediocre	mauvais
<b>OLL</b>	n.d.	n.d.	80.5	17.584	4.5	4.3	Industrielle	LB	bon	bon
<b>LOV</b>	11.9	50.5	n.d.	14.554	n.d.	3.0	Urbaine	LB	mediocre	mauvais
<b>BED</b>	29.6	178.5	n.d.	19.505	n.d.	2.9	Urbaine	LB	mauvais	mauvais
<b>YER</b>	n.d.	136.0	n.d.	10.817	n.d.	1.8	Agricole	SN	mediocre	mauvais
<b>SOU</b>	9.1	n.d.	n.d.	28.078	n.d.	3.1	Agricole	SN	moyen	mauvais
<b>CHE</b>	n.d.	n.d.	n.d.	13.699	n.d.	1.2	Mauvais état	SN	bon	mauvais
<b>MAR</b>	n.d.	58.7	n.d.	5.533	n.d.	1.4	Urbaine	SN	bon	mauvais
<b>RIS</b>	3.9	n.d.	n.d.	19.102	n.d.	3.1	Industrielle	SN	mauvais	mauvais
<b>MAD</b>	3.8	147.6	n.d.	16.378	5.4	4.7	Agricole	RM	moyen	mauvais
<b>LUE</b>	1.0	31.7	n.d.	3.494	n.d.	5.9	Référence	RMC	moyen	bon
<b>YSE</b>	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	Agricole	AP	mauvais	mauvais
<b>LOD</b>	0.04	0.8	0.13	0.4	3.1	0.008				

*n.t., échantillon non testé car non échantillonné*

**Annexe 3.** Liste des composés PE analysés dans le cadre de l'étude prospective et du réseau de surveillance DCE ainsi que le potentiel relatif de chacun de ces composés pour les activités EROD 24h (TCDD-EF), EROD 4h (BaP-EF), PXR-like (SR12813-EF) et oestrogénique (E<sub>2</sub>-EF).

		TCDD-EF	BaP-EF	SR12813-EF	E2-EF
<b>Hormones</b>	Estrone	n.a.	n.a.	n.a.	0.02
	Mestranol	n.a.	n.a.	n.a.	0.02
<b>Médicaments</b>	Carbamazepine	n.a.	n.a.	1.0E-03	n.a.
	Diazepam	n.a.	n.a.	2.0E-03	n.a.
	Clotrimazole	n.a.	n.a.	0.04	n.a.
	Triclosan	n.a.	n.a.	6.0E-03	n.a.
	Tamoxifen	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>Plastifiants</b>	3,5-Di-tert-butylphénol	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	2,6-Di-tert-butylphénol	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	4-tert-butylphénol	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	4-tert-octylphénol	n.a.	n.a.	n.a.	1.1E-04
	Bisphenol A	n.a.	n.a.	0.03	4.5E-05
	Propylparaben	n.a.	n.a.	n.a.	7.4E-06
<b>Pesticides</b>	Alpha-cyperméthrine	n.a.	n.a.	0.03	1.0E-06
	Prochloraz	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	DDD 44'	n.a.	n.a.	0.04	6.8E-07
	DDE 44'	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	Méthoxychlore	n.a.	n.a.	n.a.	3.2E-06
	Métolachlore	n.a.	n.a.	0.07	4.3E-06
	Trans-Nonachlor	n.a.	n.a.	0.02	n.a.
<b>HAP</b>	Dibenzo(a,j)anthracene	6.1E-03	3.7	n.a.	n.a.
	Dibenzo(a,c)anthracene	6.1E-03	3.7	n.a.	n.a.
	Benzo(e)pyrène	5.1E-04	1.0	n.a.	n.a.
	Benzo(g,h,i)fluoranthène	4.2E-03	2.9	n.a.	n.a.
	Benzo(j)fluoranthène	4.2E-03	2.9	n.a.	n.a.
	Benzo(k)fluoranthène	4.2E-03	2.9	n.a.	n.a.
	Chrysène	3.8E-04	0.3	n.a.	n.a.
	Benzo(b)fluoranthène	4.6E-04	0.7	n.a.	n.a.
	Benzo(a)anthracène	9.8E-05	0.3	n.a.	n.a.
	Benzo(a)pyrène	5.1E-04	1	n.a.	n.a.
	Indéno(123cd)pyrène	1.6E-03	0.8	n.a.	n.a.
<b>PCB</b>	PCB 180	n.a.	n.a.	0.01	n.a.
	PCB 101	n.a.	n.a.	0.003	n.a.
	PCB 138	n.a.	n.a.	0.01	n.a.
	PCB 153	n.a.	n.a.	0.01	n.a.

*n.a. non actif*

**Annexe 4.** Comparaison des valeurs de chem-TEQ et de bio-TEQ

		AhR-24h ng TCDD-EQ/g sed.	AhR-4h ng BaP-EQ/g sed.	PXR ng SR-EQ/g sed.	ER ng E2-EQ/g sed.
<b>YSE</b>	Σ ChemTEQ	0.736	676.134	0.164	0.001
	BioTEQ	2.0	16338.0	10882.0	0.1
	<b>% chem/Bio</b>	<b>36.8%</b>	<b>4.1%</b>	<b>&lt; 0.1%</b>	<b>1.1%</b>
<b>MAD</b>	Σ ChemTEQ	1.2	915.8	1.0E-02	1.7E-07
	BioTEQ	33.0	56127.0	3.3	3.4
	<b>% chem/Bio</b>	<b>3.7%</b>	<b>1.6%</b>	<b>0.3%</b>	<b>&lt; 0.1%</b>
<b>SOU</b>	Σ ChemTEQ	0.4	268.4	0.5	6.1E-04
	BioTEQ	5.0	15828.0	9426.0	1.3
	<b>% chem/Bio</b>	<b>7.7%</b>	<b>1.7%</b>	<b>&lt; 0.1%</b>	<b>&lt; 0.1 %%</b>
<b>RIS</b>	Σ ChemTEQ	5.4	4065.7	0.1	n.d
	BioTEQ	70.0	96965.0	4272.0	n.d
	<b>% chem/Bio</b>	<b>7.8%</b>	<b>4.2%</b>	<b>&lt; 0.1%</b>	-
<b>YER</b>	Σ ChemTEQ	1.2	918.2	0.2	1.5E-05
	BioTEQ	32.0	59380.0	44279.0	9.3
	<b>% chem/Bio</b>	<b>3.8%</b>	<b>1.5%</b>	<b>&lt; 0.1%</b>	<b>&lt; 0.1%</b>
<b>CHE</b>	Σ ChemTEQ	1.3	966.1	n.d	1.3E-07
	BioTEQ	37.0	35026.0	n.d	0.7
	<b>% chem/Bio</b>	<b>3.4%</b>	<b>2.8%</b>	-	<b>&lt; 0.1%</b>
<b>MAT</b>	Σ ChemTEQ	0.1	96.7	n.d	n.d
	BioTEQ	5.0	5087.0	635.0	1.2
	<b>% chem/Bio</b>	<b>2.2%</b>	<b>1.9%</b>	-	-
<b>LOB</b>	Σ ChemTEQ	1.0	784.9	1.3E-02	6.4E-06
	BioTEQ	24.0	22905.0	745.0	-
	<b>% chem/Bio</b>	<b>4.1%</b>	<b>3.4%</b>	<b>&lt; 0.1%</b>	-
<b>LOV</b>	Σ ChemTEQ	3.5	2963.5	3.6E-02	4.3E-04
	BioTEQ	33.0	81313.0	n.d	n.d
	<b>% chem/Bio</b>	<b>10.7%</b>	<b>3.6%</b>	-	-
<b>LOI</b>	Σ ChemTEQ	1.5	1273.5	0.1	9.4E-07
	BioTEQ	13.0	42358.0	14987.0	3.2
	<b>% chem/Bio</b>	<b>11.8%</b>	<b>3.0%</b>	<b>&lt; 0.1%</b>	<b>0.1%</b>
<b>BED</b>	Σ ChemTEQ	0.4	283.7	2.2E-02	4.6E-04
	BioTEQ	18.0	11083.0	2491.0	0.6
	<b>% chem/Bio</b>	<b>2.2%</b>	<b>2.6%</b>	<b>&lt; 0.1%</b>	<b>0.1%</b>
<b>OLL</b>	Σ ChemTEQ	0.1	52.5	2.8E-02	1.2E-05
	BioTEQ	2.0	4077.0	n.d	n.d
	<b>% chem/Bio</b>	<b>3.0%</b>	<b>1.3%</b>	-	-
<b>SAR</b>	Σ ChemTEQ	1.1	841.8	1.6E-02	6.7E-06
	BioTEQ	13.0	39390.0	3478.0	n.d
	<b>% chem/Bio</b>	<b>8.6%</b>	<b>2.1%</b>	<b>&lt; 0.1%</b>	-
<b>JOU</b>	Σ ChemTEQ	0.1	46.3	n.d	2.5E-03
	BioTEQ	32.0	59380.0	804.0	n.d
	<b>% chem/Bio</b>	<b>0.2%</b>	<b>0.1%</b>	-	-
<b>LOM</b>	Σ ChemTEQ	0.0	37.2	n.d	n.d
	BioTEQ	2.0	4000.0	390.0	0.3
	<b>% chem/Bio</b>	<b>2.1%</b>	<b>0.9%</b>	-	-
<b>BRA</b>	Σ ChemTEQ	0.7	544.2	n.d	n.d
	BioTEQ	15.0	23071.0	2874.0	3.6
	<b>% chem/Bio</b>	<b>4.7%</b>	<b>2.4%</b>	-	-
<b>HER</b>	Σ ChemTEQ	0.0	2.6	n.d	n.d
	BioTEQ	1.0	776.0	455.0	0.4
	<b>% chem/Bio</b>	<b>0.2%</b>	<b>0.3%</b>	-	-

<b>AUV</b>	Σ ChemTEQ	0.1	77.8	4.6E-03	7.6E-08
	BioTEQ	1.0	5171.0	2172.0	n.d
	<b>% chem/Bio</b>	<b>8.7%</b>	<b>1.5%</b>	<b>&lt; 0.1%</b>	-
<b>LUE</b>	Σ ChemTEQ	0.1	46.6	n.d	n.d
	BioTEQ	2.0	3220.0	606.0	n.d
	<b>% chem/Bio</b>	<b>3.0%</b>	<b>1.4%</b>	-	-

**Annexe 5.** Concentration induisant 20% d'effet (CE<sub>20</sub>) sur l'activité enzymatique hépatique BFCOD mesurée chez des embryons de poissons zèbres exposés aux extraits organiques de sédiments. Pour les sites BRA et CHE, la CE<sub>20</sub> n'a pu être calculée car l'ensemble des dilutions de l'extrait induisait une réponse maximale. Cette réponse maximale (100% d'induction) est égale à la réponse observée chez des embryons exposés à la substance de référence, la TCDD à 0.05 nM.

Site	Induction (+) / Inhibition(-)	CE <sub>20</sub> induction activité BFCOD (gEQsed/L)
AUV	+	1.51
GAR	Non testé	
HER	+	3.02
BRA	+	<0.24
JOU	+	3.34
SAR		
LOM	+	3.39
LOB	+	0.16
LOI	+	1.16
OLL	+	2.70
LOV	- (*)	
BED	+	1.71
YER	Non testé	
SOU	=	
CHE	+	<0.52
MAR	+	3.52
RIS	+	0.85
MAD	+	0.11
LUE	+	0.5
YSE	+	1.21

(\*) 100% de mortalité observée à la plus faible dilution testée

Alata  
Onema  
Hall C – Le Nadar  
5 square Félix Nadar BP 2  
94300 Vincennes 60550 Verneuil-en-Halatte  
01 45 14 36 00 03 44 55 66 77  
[www.onema.fr](http://www.onema.fr)

Ineris  
Parc Technologique

[www.ineris.fr](http://www.ineris.fr)