

Place des méthodes bio-analytiques dans la directive-cadre européenne sur l'eau (DCE)



Risques chroniques

Octobre 2020

Pour qualifier l'état chimique des milieux aquatiques, la directive-cadre européenne sur l'eau (DCE) impose une surveillance basée sur l'analyse chimique d'une liste de substances et groupes de substances prioritaires (45), fournissant une information très limitée au regard des milliers de molécules chimiques présentes dans les eaux.

La surveillance réglementaire en vigueur s'avère ainsi insuffisante pour évaluer l'état de la contamination des milieux aquatiques par les substances chimiques. En effet, la très grande majorité des substances chimiques et leurs produits de transformation ne sont pas recherchés et ne sont donc pas pris en compte dans l'évaluation de la qualité chimique des milieux aquatiques, alors qu'elles contribuent au risque chimique.

Face à ces constats, de nouvelles stratégies de surveillance qui incluent des méthodes de mesure intégratives de la complexité des contaminations et qui prennent en compte les risques associés aux effets de mélanges des substances, ont été développées. Parmi ces nouvelles stratégies, celles basées sur les effets biologiques sont identifiées comme des méthodes complémentaires à l'approche basée sur l'analyse chimique.

L'Ineris travaille depuis 2003 en appui des pouvoirs publics sur la mise en œuvre de la DCE et développe depuis 2000 des outils bio-analytiques *in vitro* et *in vivo*, en particulier sur les effets des perturbateurs endocriniens.

L'objectif de cette note est de fournir aux gestionnaires en charge de la DCE, un état des lieux des actions menées aux niveaux national et européen sur l'application des méthodes bio-analytiques pour la surveillance de la qualité chimique des masses d'eaux et de fournir des éléments de perspectives concernant leur introduction future dans la surveillance réglementaire.

Les outils bio-analytiques au service de la qualité des milieux

Différentes méthodes basées sur les effets biologiques ont été développées et sont potentiellement utilisables en surveillance environnementale. Dans le cadre de la présente note, nous nous intéressons spécifiquement aux outils bio-analytiques⁽¹⁾, c'est-à-dire aux bioessais de laboratoire basés sur le mécanisme d'action des polluants et utilisés dans une démarche d'analyse pour qualifier la contamination chimique.

Les outils bio-analytiques sont définis comme des systèmes d'essais *in vitro* (modèles cellulaires ou acellulaires) ou *in vivo* (organismes entiers) permettant la mesure quantitative d'une réponse biologique spécifique d'un mode d'action toxique (Figure 1). C'est le cas par exemple des bioessais avec gène rapporteur permettant la détection de polluants de type perturbateurs endocriniens capables d'interférer avec les récepteurs des hormones stéroïdiennes et de perturber les processus physiologiques régulés par ces hormones.

Les bioessais basés sur l'expression d'un gène cible, facilement mesurable par luminescence ou fluorescence (e.g. gène rapporteur), sont des outils simples d'utilisation et adaptés au criblage (tests en petits volumes), sensibles (détection de contaminants à de très faibles concentrations) et spécifiques d'un mode d'action (e.g. activation de récepteur). Ils sont pertinents pour détecter des polluants actifs au sein de matrices environnemen-

tales complexes (e.g. eaux, sédiments, sols, particules atmosphériques...) et présentent de nombreux avantages qui en font d'excellents outils pour la biosurveillance. En effet :

- / ils intègrent l'ensemble des substances actives présentes au sein de l'échantillon, tout en incluant/considérant les possibles interactions entre elles (effets de mélange) ;
- / ils apportent une information sur des substances ayant le même mode d'action (e.g. perturbateurs endocriniens, composés dioxin-like, inhibiteurs de la photosynthèse...)
- / ils fournissent un résultat quantitatif que l'on exprime en quantité d'équivalents-toxiques ou TEQ par quantité d'échantillon analogue aux concentrations mesurées par analyses chimiques.

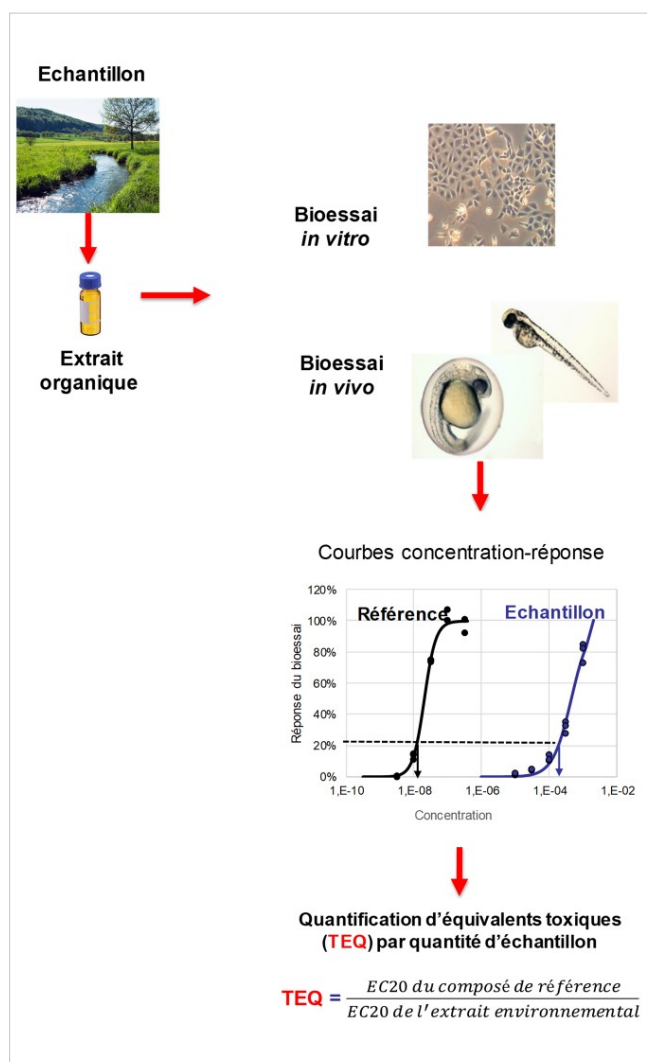


Figure 1 / Exemple d'outils bio-analytiques basés sur le mécanisme d'action de certains perturbateurs endocriniens appliqués à la quantification d'équivalents-toxiques biologiques (TEQ) dans une matrice environnementale

Apport des outils bio-analytiques dans la surveillance DCE

Études de démonstration et domaines d'application

La démonstration de la pertinence et de l'opérationnalité des outils bio-analytiques dans un contexte de surveillance environnementale a été faite dans le cadre de nombreux programmes de recherche au niveau national (e.g. Etude prospective 2012⁽²⁾, Réseau de Surveillance Prospective⁽³⁾, AQUAREF) et européen (e.g. projets FP7-SOLUTIONS⁽⁴⁾, Science Policy Interface-Estrogen Monitoring⁽⁵⁾). Ces travaux ont montré la performance des méthodes biologiques pour caractériser différentes matrices du milieu aquatique telles que les eaux de surface et les sédiments, ainsi que les rejets aqueux. Elles ont été menées pour diagnostiquer la contamination chimique sur un grand nombre de sites incluant des sites DCE mais également pour étudier l'influence de rejets sur un bassin versant.

Aujourd'hui, un consensus de la communauté scientifique et des gestionnaires s'est dégagé sur la définition des domaines d'application des outils bio-analytiques dans le contexte de la DCE :

- / l'identification des pressions et des sources de pollutions (e.g. identification de groupes de substances ayant le même mode d'action présentes dans les rejets) ;
- / l'évaluation de l'état chimique et de l'impact des pollutions sur le milieu ;
- / l'évaluation de l'efficacité des mesures de gestion pour réduire la pollution.

Plus spécifiquement, les experts s'accordent sur le fait que la valeur ajoutée des outils bio-analytiques en surveillance concerne différents aspects :

- / Caractérisation de l'imprégnation des milieux : Les bioessais permettent de surveiller des familles de substances partageant un même mode d'action. En ce sens ils apportent des informations complémentaires au suivi réglementaire « substance par substance » car ils permettent de prendre en compte les effets associés aux mélanges de substances dans l'évaluation des risques chimiques sur les écosystèmes et ainsi de réduire le risque de non prise en compte de substances, produits de transformations et mélanges dangereux non ciblés par les analyses chimiques. Leur introduction dans une démarche globale, en combinaison avec la comparaison des analyses chimiques (de substances individuelles avec les normes de qualité environnementale réglementaires existantes ou d'empreintes chimiques via des analyses non

ciblées), permet de fournir une vision plus intégrée de la contamination et donc une meilleure évaluation de la qualité.

/ Priorisation des sites à risque :

L'établissement de profils de toxicité permettent d'identifier des sites très contaminés par rapport à un ensemble de sites investigués (priorisation). Sur les sites identifiés comme les plus problématiques, il est ensuite possible de mettre en œuvre des démarches plus sophistiquées pour identifier les molécules responsables des effets détectés, comme par exemple l'approche dite EDA (*Effect-Directed Analysis*) qui intègre bioessais et analyses chimiques et permet une identification chimique orientée par les effets.

/ Contribution à l'interprétation du lien entre état chimique et état écologique :

Les bioessais permettent d'anticiper des atteintes potentielles à un niveau supérieur d'organisation biologique avant qu'elles ne se manifestent. Le pouvoir prédictif du diagnostic basé sur les bioessais sera d'autant plus pertinent qu'il intégrera des modes d'action bien identifiés comme éléments initiateurs d'effet adverse (i.e. *adverse outcome pathways* ou AOP) à l'échelle de l'organisme.

Des acquis et des besoins de développement

Certains outils bio-analytiques présentent aujourd'hui un degré de maturité avancé et sont intégrés de façon fréquente dans les programmes de surveillance prospectifs. C'est le cas des bioessais *in vitro* de détection des polluants perturbateurs endocriniens de type oestrogéniques⁽⁶⁾. Pour ces bioessais, les résultats de la recherche ont démontré 1) la pertinence pour la quantification d'activités oestrogéniques dans les eaux de surface et eaux usées⁽⁷⁾ ; 2) le caractère prédictif et complémentaire de ces mesures par rapport à la caractérisation chimique des eaux (analyses des hormones E1, E2, EE2)⁽⁸⁾ et 3) la pertinence de ces mesures *in vitro* par rapport à un impact toxicologique chez le poisson⁽⁹⁾.

Ces bioessais sont validés (OCDE-TG455, OCDE-TG458, ISO 19040-3:2018), disponibles sur le marché et il existe des grilles d'interprétation (valeurs seuils) qui sont en cours de discussion dans les groupes d'experts DCE au niveau Européen⁽¹⁰⁾. De plus, concernant les hormones oestrogéniques, pour lesquelles l'analyse chimique à des niveaux de détection compatibles avec les normes de qualité environnementale est à la fois compliquée et coûteuse, la surveillance par les bioessais *in vitro* s'avère une alternative pertinente à la surveillance chimique, par exemple en ajoutant l'activité oestrogé-

nique *in vitro* dans la liste des substances prioritaires de la DCE. L'ensemble de ces éléments concourent à promouvoir leur utilisation pour la surveillance réglementaire.

Des bioessais similaires à ceux utilisés pour l'activité oestrogénique, permettant de considérer d'autres modes d'action associés à d'autres familles de toxiques, sont également disponibles. Ils s'appliquent par exemple aux composés dioxine-like et à d'autres composés perturbateurs endocriniens (e.g. androgènes, glucocorticoïdes), ou encore aux polluants inhibiteurs de la photosynthèse. Si leur degré de maturité est moins avancé s'agissant notamment de la définition de valeurs seuils, ils doivent être considérés car ils permettent de dresser des profils de contamination plus larges et ainsi d'étendre le diagnostic de la qualité chimique des milieux aquatiques.

Dans une perspective d'application des outils biologiques pour une évaluation plus exhaustive des risques associés à la contamination chimique, des recommandations ont été faites dans le cadre des différents projets de recherche. Ces projets proposent des approches intégrées combinent des outils bio-analytiques renseignant différents modes d'actions (e.g. perturbation endocrinienne, dioxin-like, génotoxicité...) et des bioessais d'écotoxicité tels que les tests sur algues, daphnies et embryons de poisson (Brack *et al* 2019, Carrere *et al* 2019).

Enfin, en marge des développements des approches basées sur les outils biologiques, l'approche non ciblée basée sur la spectrométrie de masse haute résolution (empreintes chimiques) vise également à obtenir une image plus exhaustive de la contamination. Il s'agira dans le futur de favoriser le couplage entre les bioessais et les approches de chimie non ciblée, par exemple via des approches EDA, pour améliorer la corrélation entre présence de substances chimiques et effets observés

Actions en cours et perspectives

Au bilan, les outils bio-analytiques sont des outils pertinents et fonctionnels pour la surveillance des contaminations chimiques. Leur mise en œuvre, en complément ou dans certains cas en alternative des outils existants (comparaison de normes de qualité environnementale avec des analyses chimiques), permettrait une amélioration de la caractérisation de l'état des eaux.

Afin de permettre leur mise en œuvre opérationnelle dans un cadre réglementaire, des actions sont en cours au niveau européen pour définir et harmoniser les stratégies d'application dans le contexte de la DCE. Ces actions visent notamment à travailler sur la définition de

valeurs seuils et à l'élaboration de guides méthodologiques pour la définition de ces valeurs. Des propositions ont déjà été émises dans ce sens par un consensus sous l'égide du CIS WFD⁽¹¹⁾ et font l'objet des travaux de groupes d'experts français et européens⁽¹²⁾ auxquels l'Ineris participe.

Enfin, s'il existe encore des besoins d'amélioration (définitions de batteries de bioessais plus complètes, amélioration des grilles d'interprétation...), plusieurs outils bio-analytiques sont d'ores et déjà disponibles et reconnus par la communauté scientifique et les laboratoires de référence, aux niveaux français et européen. Leur mise en œuvre dans les réseaux de surveillance peut être recommandée de façon systématique pour acquérir de l'information complémentaire sur l'état de contamination des milieux et éprouver ces méthodes dans un contexte opérationnel de surveillance ou de contrôle d'enquête.

Références et liens utiles

Rapports d'études Ineris sur les bioessais :

/ Aït-Aïssa S (2009) Outils bio-analytiques *in vitro* : principe et apports pour la surveillance des contaminants organiques dans le milieu aquatique. Rapport Ineris-DRC-08-95306-16732A.

<https://www.ineris.fr/fr/outils-bio-analytiques-vitro-principe-apports-surveillance-contaminants-organiques-milieu-aquatique>

/ Aït-Aïssa S, Brion F, Creusot N, Sanchez W (2014) Etude prospective 2012 : Apport des outils biologiques (bioessais et biomarqueurs) pour le diagnostic de la contamination des milieux aquatiques. Rapport Ineris-Onema. DRC-14-127339-06620A

/ Aït-Aïssa S, Creusot N, Brion F (2015) Démarche bio-analytique pour l'identification de polluants émergents dans les milieux aquatiques – Application aux sédiments de l'étude prospective 2012. Rapport Ineris-Onema. DRC-15-136859-12228A.

/ Aït-Aïssa S (2018) Contribution à la validation de la mesure de l'activité oestrogénique *in vitro* dans les eaux de surface et les eaux usées. Rapport AQUAREF 2018 – DRC-18-159227-11202C - 16 p.+annexes.

https://www.aquaref.fr/system/files/Aquaref_G2d2_2017_Validation_mesure_oestrogénique_invitro_0.pdf

Rapports de groupes d'experts européens

/ Wernersson *et al* (2015) The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive.

<https://enveurope.springeropen.com/articles/10.1186/s12302-015-0039-4>

/ Carere M *et al* (2019) Proposal for Effect-Based Monitoring and Assessment in the Water Framework Directive. Report to the CIS WG Chemicals on the outcome of the work performed in the subgroup on effect-based methods (EBMs). Mandate 2016-2018.

/ Compte-Rendu du Workshop "Effect-based monitoring under the WFD, Opportunities, Challenges and Needs", 14-15 Novembre 2019, Utrecht, PB.

/ Käse R, Dulio V. Recommendations for the use of effect-based methods for monitoring of estrogens in surface waters – Outcomes of the Dübendorf Workshop (21 June 2017).

https://www.ecotoxcentre.ch/media/178820/estrogen-monitoring-recommendations-2017_final.pdf

Recommandations issues du projet européen FP7-SOLUTIONs :

/ Brack W *et al* (2019) Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONs recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. Environmental Sciences Europe.

<https://enveurope.springeropen.com/articles/10.1186/s12302-019-0192-2>

/ Altenburger *et al* (2019) Future water quality monitoring: improving the balance between exposure and toxicity assessments of real-world pollutant mixtures. Environmental Sciences Europe.

<https://enveurope.springeropen.com/articles/10.1186/s12302-019-0193-1>

Rapports du projet MICROPOLIS :

/ Application d'outils biologiques pour la recherche et la caractérisation des effets des micropolluants

dans les eaux usées - Caractérisation de la toxicité des eaux usées à Sophia Antipolis

http://oai.afbiodiversite.fr/cindocoai/download/PUBLI/997/1/2017_012.pdf_1393Ko

/ Synthèse

https://professionnels.ofb.fr/sites/default/files/2019-09/Micropolis%20Indicateurs_Livrable%2004_Synthe_se_Octobre%202018.pdf

Rapports et recommandations du projet REGARD :

/ Synthèse opérationnelle présentant la détection de composés perturbateurs endocriniens et dioxin-like à l'aide de bioessais *in vitro* dans les eaux usées, pluviales et naturelles - Juin 2019.

https://www.bordeaux-metropole.fr/content/download/115020/1407540/version/2/file/Regard_Synthese_bioessais_in_vitro_06-2019.pdf

- ⁽¹⁾ Méthodes mentionnées dans le Plan national sur les Micropolluants (2016-2021, Action 32) et la stratégie Nationale sur les Perturbateurs Endocriniens (SNPE 2, §2.2.1.1., §3.4.1.1).
- ⁽²⁾ Aït-Aïssa *et al.* (2014) Etude prospective 2012 : Apport des outils biologiques (bioessais et biomarqueurs) pour le diagnostic de la contamination des milieux aquatiques. Rapport INERIS-ONEMA, DRC-14-127339-06620A
- ⁽³⁾ Staub *et al.* (2019) A Prospective Surveillance Network for improved identification of contaminants of emerging concern (CECs) and testing of innovative monitoring tools in France. NORMAN Bulletin, 6, 21-24.
- ⁽⁴⁾ <https://www.solutions-project.eu/>
- ⁽⁵⁾ <https://www.ecotoxcentre.ch/projects/aquatic-ecotoxicology/monitoring-of-steroidal-estrogens/>
- ⁽⁶⁾ i.e. substances capables d'interagir avec le récepteur des œstrogènes et de moduler son activité.
- ⁽⁷⁾ Aït-Aïssa (2018) Contribution à la validation de la mesure de l'activité œstrogénique *in vitro* dans les eaux de surface et les eaux usées. Rapport AQUAREF. Könneman *et al.* (2018) Trends in Analytical Chemistry.
- ⁽⁸⁾ Käse *et al.* (2018) Trends in Analytical Chemistry
- ⁽⁹⁾ Brion *et al.* (2019) Environment International
- ⁽¹⁰⁾ Carere M *et al.* 2019 Proposal for Effect-Based Monitoring and Assessment in the Water Framework Directive. Report to the CIS WG Chemicals on the outcome of the work performed in the subgroup on effect-based methods (EBMs). Mandate 2016-2018.
- ⁽¹¹⁾ Compte-rendu du Workshop Utrecht 2019 "Effect-based monitoring under the WFD, Opportunities, Challenges and Needs. Carere M *et al.* 2019 "Proposal for Effect-Based Monitoring and Assessment in the Water Framework Directive. Report to the CIS WG Chemicals on the outcome of the work performed in the subgroup on effect-based methods (EBMs). Mandate 2016-2018.
- ⁽¹²⁾ Un groupe de travail français sur les bioessais, co-piloté par l'OFB et l'Ineris a été mis en place en 2017. Ce groupe inclue des gestionnaires de l'environnement (OFB, Agences, DEB), des institutionnels (Ineris, INRAE, Ifremer, BRGM) et des entreprises (BioMae, Watchforg, TameWater). Il vise à dresser un inventaire des bioessais existants (plus de 150 bioessais inventoriés) et proposer des critères de performance pour les prioriser en fonction du domaine d'utilisation visé (e.g. suivis de rejets, contrôle de surveillance, contrôle d'enquête...). Ces travaux doivent aboutir à établir des recommandations sur les stratégies d'utilisation de bioessais en fonction de l'objectif DCE. Ce groupe français fait miroir au groupe européen « Effect-Based Methods », sous-groupe du WG Chemicals de la Direction Générale de l'Environnement de la commission européenne. En 2019, le groupe européen a publié un rapport détaillé sur les connaissances actuelles sur les plans scientifique, applicatif et législatif en lien avec l'utilisation des méthodes basées sur les effets biologiques dans le cadre de la DCE (Carere *et al* 2019).