



HAL
open science

**Développement et utilisation d'outils bio-analytiques
pour la surveillance des milieux et le contrôle d'enquête.
Démarche bio-analytique pour l'identification de
polluants émergents dans les milieux aquatiques -
Application aux sédiments de l'étude prospective.
Rapport final**

S. Aït-Aïssa, N. Creusot, François Brion

► **To cite this version:**

S. Aït-Aïssa, N. Creusot, François Brion. Développement et utilisation d'outils bio-analytiques pour la surveillance des milieux et le contrôle d'enquête. Démarche bio-analytique pour l'identification de polluants émergents dans les milieux aquatiques - Application aux sédiments de l'étude prospective. Rapport final. Ineris. 2015, 61p. hal-03977235

HAL Id: hal-03977235

<https://hal.science/hal-03977235>

Submitted on 7 Feb 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

RAPPORT D'ÉTUDE
N° DRC-15-136859-12228A -

14/12/2015

Développement et utilisation d'outils bio-analytiques pour la surveillance des milieux et le contrôle d'enquête

Démarche bio-analytique pour l'identification de polluants émergents dans les milieux aquatiques – Application aux sédiments de l'étude prospective

Rapport final

Avec le soutien financier de



**Démarche bio-analytique pour l'identification de
polluants émergents dans les milieux aquatiques –
Application aux sédiments de l'étude prospective**

Rapport final

**ONEMA
Hall C – Le Nadar
5, square Félix Nadar
94300 VINCENNES**

Liste des personnes ayant participé à l'étude : Sélim AÏT-AÏSSA, Nicolas CREUSOT, François BRION, Fabrizio BOTTA, François LESTREMAU, Claudine CHATELLIER, Emmanuelle MAILLOT-MARECHAL, Benjamin PICCINI, Cyril TURIES

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 équivalents 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	S. AIT-AISSA N. CREUSOT F. BRION	J-M. PORCHER	E. THYBAUD
Qualité	Ingénieurs à l'unité d'Écotoxicologie <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Responsable de l'unité d'Écotoxicologie <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	Responsable du pôle Dangers et Impact sur le Vivant
Visa			

TABLE DES MATIÈRES

SYNTHESE POUR L'ACTION OPERATIONNELLE	6
1. INTRODUCTION.....	9
2. CRIBLAGE <i>IN VITRO</i> ET HIÉRARCHISATION DES SITES	10
2.1 Profilage toxicologique et niveaux d'activité PE	12
2.2 Profil de danger <i>in vitro</i> et mise en regard des indicateurs de la DCE	13
2.2.1 Hiérarchisation et identification de sites prioritaires sur la base des activités <i>in vitro</i>	15
2.2.2 Comparaison profil de danger <i>in vitro</i> et typologie des sites	16
2.2.3 Comparaison profil de danger <i>in vitro</i> et états DCE.....	17
3. CARACTÉRISATION DES EFFETS <i>IN VIVO</i>.....	19
4. IDENTIFICATION DE COMPOSÉS ACTIFS	21
4.1 Contribution de polluants actifs connus	21
4.1.1 Recherche de xéno-oestrogenes	22
4.1.2 Recherche d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....	23
4.1.3 Recherche de glucocorticoïdes	24
4.2 Isolement et identification de (nouveaux) polluants (approche EDA).....	24
4.2.1 Isolement des composés a activité glucocorticoïdes	24
4.2.2 Identification de candidats par spectrométrie de masse haute résolution	25
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	27
6. VALORISATION	29
7. REFERENCES.....	30
8. LISTE DES ANNEXES	32

SYNTHESE POUR L'ACTION OPERATIONNELLE

1. Contexte, objectifs de l'action et démarche de l'étude

L'étude prospective nationale 2012

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 (Botta et Dulio 2014). 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 (20) pour évaluer la contamination chimique des milieux sur la base de réponses biologiques et déterminer l'opérationnalité de ces outils pour la surveillance. Ces premiers travaux ont fait l'objet d'un rapport en 2014, dressant l'intérêt de tels outils (Aït-Aïssa et al 2014). Dans le présent rapport, nous rapportons l'application des bioessais *in vitro* et *in vivo* au sein d'une démarche bio-analytique intégrée pour caractériser la contamination organique des sédiments de l'ensemble des sites métropolitains (120) de l'étude prospective.

Apports des outils biologiques dans la surveillance de la contamination des milieux aquatiques

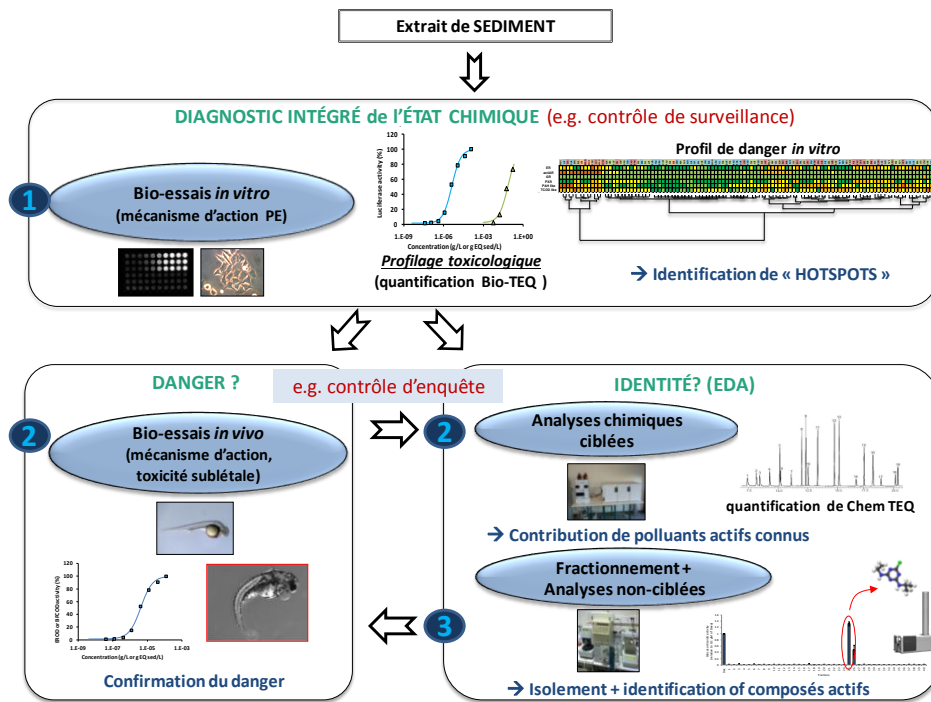
Du point de vue réglementaire, la surveillance de la qualité chimique des milieux aquatiques est aujourd'hui réalisée au travers d'analyses chimiques ciblées sur une liste définie de substances prioritaires, ce qui ne fournit qu'une vision partielle de la complexité environnementale et du danger (éco)toxique associé aux pollutions au sein des masses d'eaux. D'autres approches, dites **bio-analytiques**, intégrant des mesures d'effets biologiques dans une démarche analytique sont aujourd'hui disponibles (Wernerson et al. 2015). Ces approches, plus intégratrices des contaminations multiples du milieu, peuvent prétendre compléter utilement les analyses chimiques ciblées, d'une part en révélant la présence de familles de contaminants pertinents du point de vue (éco)toxicologique, d'autre part en orientant leur identification chimique.

Les travaux menés par l'INERIS depuis quelques années ont conduit à l'établissement d'un certain nombre de bioessais *in vitro* et *in vivo* valides pour le criblage et la caractérisation de composés perturbateurs endocriniens (PE) et dioxin-like (DL). Nous avons démontré que ces outils biologiques sont également applicables à la détection de tels contaminants actifs au sein de matrices environnementales complexes tels que des sédiments ou des eaux de surface (Louiz et al 2008, Kinani et al 2010, Creusot et al 2013, 2014) et leur intégration au sein d'une démarche d'analyse dirigée par l'effet (EDA) permet l'identification de tout ou partie des contaminants responsables d'effets (Creusot et al 2013, 2014).

Objectif et démarche mise en œuvre

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'**opérationnalité** de ces outils bio-analytiques à l'échelle d'un réseau pour (1) **surveiller** l'état chimique et identifier des sites à risques ; (2) **identifier** des polluants dangereux en vue de leur priorisation.

La démarche qui a été mise en œuvre dans ce projet et éprouvée pour l'évaluation de la qualité chimique de sédiments de rivière est schématisée dans la figure suivante. Elle consiste en 1) le criblage d'extraits *in vitro*, 2) la confirmation du danger *in vivo* et 3) l'identification des molécules responsables des effets observés. Cette démarche a été appliquée à l'ensemble des 120 sites investigués dans l'étude prospective 2012, en focalisant sur le compartiment sédimentaire.



2. Principaux résultats

Cette étude a mis en avant plusieurs résultats significatifs relatifs à la démarche bio-analytique et à la caractérisation des contaminants de type perturbateurs endocriniens et dioxin-like dans les sédiments.

Criblage *in vitro* et hiérarchisation des sites

- Nouvelles données sur l'occurrence sédimentaire de PE et dioxin-like, à l'échelle du territoire national
- Méthodologie de hiérarchisation de sites selon leur profils de contamination par les PE et composés dioxin-like tel que mesurés par les bioessais *in vitro*.
- D'une manière générale, les profils *in vitro* PE fournissent des informations différentes des indicateurs DCE sur l'état chimique et l'état écologique. Une tendance à l'identification d'un mauvais état chimique est notée pour l'activité dioxin-like dans les sédiments.
- Outil de screening haut-débit applicable en routine à l'échelle d'un réseau de surveillance.
- Un seul site a présenté une activité GR détectable. Le sédiment ne semble pas être une matrice de choix et il serait plus pertinent d'investiguer la colonne d'eau pour rendre compte de l'occurrence environnementale de ces contaminants *a priori* plutôt hydrophiles.

Caractérisation des effets *in vivo*

- Intégration de bioessais *in vivo* dans la démarche bio-analytique. Prise en compte du danger écotoxique.
- Bonne concordance *in vitro* et *in vivo* pour les composés dioxin-like

Identification de contaminants actifs

- Intérêt des outils biologiques pour orienter l'identification chimique des polluants responsables des effets observés, 1) via des analyses chimiques ciblées et une approche mass-balance pour évaluer la contribution des polluants prioritaires, 2) via l'EDA pour isoler les contaminants actifs majoritaires en vue de leur identification par analyses chimiques non ciblées.
- Une liste de molécules candidates a été établie sur la base des activités GR

Opérationnalité et intérêt de l'approche bio-analytique

- l'opérationnalité des outils *in vitro* pour la surveillance et la hiérarchisation de sites : établissement de profils de contamination sur la base de valeurs quantitatives, transformation des données vers des classes (code couleur) utile pour les gestionnaires ;
- l'opérationnalité de la démarche *vitro / vivo* pour le diagnostic de danger PE dans le compartiment sédiment : le modèle embryon de poisson s'avère un outil de criblage efficace (rapide et quantitatif) et pertinent du point de vue (éco)toxicologique ;
- la faible contribution des analyses de polluants prioritaires dans les effets observés conforte l'apport supplémentaire des bioessais et confirme les limites de l'approche analytique basée sur une liste définie des substances pour décrire l'état de contamination du milieu.

3. Recommandations

Plusieurs perspectives de travail sont identifiées:

- *Améliorer la définition des classes de danger sur la base TEQ mesurés par les bioessais.* Une application systématique de l'approche, aux sédiments mais également aux eaux de surface, peut prétendre identifier des valeurs seuils en équivalents-toxiques *in vitro* au-delà desquels un effet *in vivo* sera observé avec une forte probabilité;
- *Intégration des outils dans le contrôle de surveillance.* Il est admis maintenant que plusieurs des bioessais mis en œuvre sont des outils de criblage performants, potentiellement utilisables en routine. Toutefois, une limite actuelle à leur utilisation est l'absence de méthodes standardisées et de normes qui permettrait leur transfert vers les laboratoires ou structures d'analyses en routine. Des travaux engagés par l'INERIS et l'ONEMA, notamment dans le cadre d'AQUAREF, visent à contribuer à la validation d'outils dans ce contexte.
- *Améliorer l'identification dans la démarche EDA :* besoin de développer des compétences et de l'expertise dans l'identification chimique (par HR-MS) d'inconnus dans des fractions toxiques. Ce développement passera également par la mise en commun des banques de données de spectrométrie de masse haute résolution.

1. INTRODUCTION

Du point de vue réglementaire, la surveillance de la qualité chimique des milieux aquatiques est aujourd'hui réalisée au travers d'analyses chimiques ciblées sur une liste définie de substances prioritaires, ce qui ne fournit qu'une vision partielle de la complexité environnementale et du danger (éco)toxique associé aux pollutions au sein des masses d'eaux. D'autres approches, dites **bio-analytiques**, intégrant des mesures d'effets biologiques dans une démarche analytique sont aujourd'hui disponibles (Wernerson et al. 2015, Altenburger et al 2015). Ces approches, plus intégratrices des multiples contaminants du milieu, peuvent prétendre compléter utilement les analyses chimiques ciblées, d'une part en révélant la présence de familles de contaminants pertinents du point de vue (éco)toxicologique, d'autre part en orientant leur identification chimique. Toutefois, si la pertinence de telles approches pour la caractérisation et l'identification de contaminants actifs est aujourd'hui démontrée, leur utilisation en routine pour la surveillance des milieux reste à être évaluée.

Les travaux menés par l'INERIS depuis quelques années ont conduit à l'établissement d'un certain nombre de bioessais *in vitro* et *in vivo* valides pour le criblage et la caractérisation de composés perturbateurs endocriniens (PE) et dioxin-like (DL). Nous avons démontré que ces outils biologiques sont également applicables à la détection de tels contaminants actifs au sein de matrices environnementales complexes tels que des sédiments ou des eaux de surface (Louiz et al 2008, Kinani et al 2010, Creusot et al 2010) et leur intégration au sein d'une démarche d'analyse dirigée par l'effet (EDA) permet l'identification de tout ou partie des contaminants responsables d'effets (Creusot et al 2013, 2014).

La démarche bio-analytique en place à l'INERIS à l'initiation de ce projet est présentée dans la Figure 1 ; elle peut se décomposer en trois grandes phases. Une première phase de **diagnostic de la qualité chimique** des sédiments basé sur le mécanisme d'action et l'effet à travers l'établissement de profils de contamination sur la base de bioessais *in vitro* et *in vivo* (étape 1 – bio-diagnostic). Cette première étape de criblage permet de prioriser les échantillons et/ou d'orienter les analyses chimiques des contaminants bio-détectés. Une seconde phase permettant l'**identification chimique** des composés actifs à travers (i) la mise en œuvre d'analyses chimiques ciblées (étape 2- évaluation de la contribution de polluants actifs connus), (ii) un fractionnement couplé à la bio-détection afin d'isoler les composés actifs pour leur identification par analyses chimiques en spectrométrie de masse haute résolution (étape 3-identification de (nouveaux) polluants).

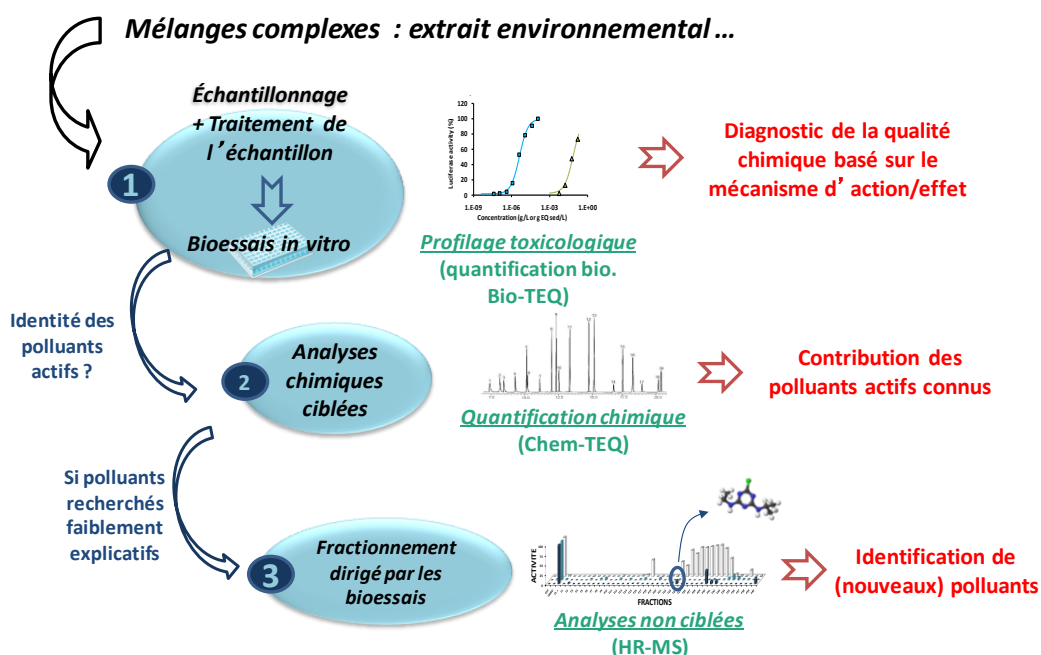


Figure 1 : Concept de la démarche bio-analytique mise en œuvre dans cette étude.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'**opérationnalité** d'une telle démarche bio-analytique à l'échelle d'un réseau pour (1) **surveiller** l'état chimique des masses d'eau et identifier des sites à risques ; (2) **identifier** des polluants dangereux en vue de leur priorisation. Dans le cadre de l'étude prospective 2012 (Botta et Dulio, 2014), nous avons montré la faisabilité et l'intérêt d'une batterie de bioessais *in vitro* et *in vivo* comme outils de diagnostic (étape 1 de la démarche présentée en figure 1) de la contamination organique d'eaux de surface et de sédiments pour un nombre limité de sites (Aït-Aïssa et al. 2014). Dans la présente étude, nous avons appliquée la démarche complète à l'ensemble des 120 sites investigués dans l'étude prospective 2012, en focalisant sur le compartiment sédimentaire.

Pour atteindre cet objectif, les travaux menés dans cette étude se sont organisés en 3 grandes étapes :

- 1) criblage *in vitro* et hiérarchisation des 120 sites ;
- 2) caractérisation *in vivo* d'un nombre restreint de sites sélectionnés sur la base du criblage *in vitro* en étape 1 ;
- 3) caractérisation chimique sur un nombre restreint de sites sélectionnés sur la base du criblage *in vitro* en étape 1 : identification de polluants actifs connus analyses ciblées et recherche de polluants inconnus par fractionnement et spectrométrie de masse en haute résolution.

2. CRIBLAGE *IN VITRO* ET HIÉRARCHISATION DES SITES

L'objectif de cette première partie du projet était de dresser le profil toxicologique PE et DL des 120 sédiments prélevés en France métropolitaine dans le cadre de l'étude prospective de manière à dresser une cartographie à l'échelle nationale. La description des 120 sites de l'étude est donnée en Annexe 1. La démarche globale de cette phase du travail est rappelée dans la Figure 2.

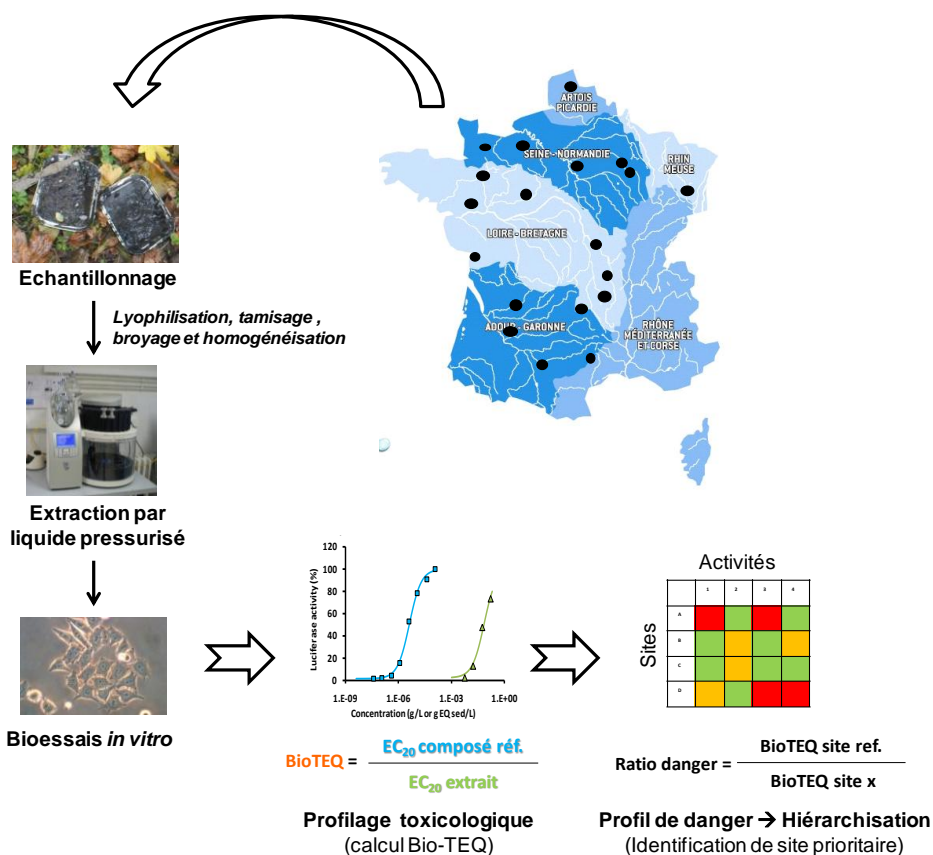


Figure 2 : Démarche expérimentale pour le criblage *in vitro* d'activités PE et DL dans les 120 sédiments de l'Etude Prospective 2012.

Les sédiments, lyophilisés et homogénéisés, ont été extraits par une **méthode ASE** (*Accelerated solvent extraction*) comme décrit précédemment (Aït-Aïssa et al 2014). Ce protocole d'extraction a été validé et optimisé pour l'extraction d'une diversité de composés présentant une large gamme de propriétés physico-chimiques et d'activités biologiques (Creusot et al. en révision). *In fine*, un extrait organique de chaque sédiment est obtenu, repris dans le 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.

Les **bioessais in vitro** sont basés sur l'utilisation de cultures cellulaires exprimant un gène rapporteur (i.e. luciférase) ou naturel (i.e. activité EROD, 7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase pour le bioessai AhR). La batterie mise en œuvre a été définie de manière à couvrir une large gamme de contaminants (Tableau 1).

Tableau 1 : Bioessais in vitro utilisés pour le criblage d'échantillons

	Voie de signalisation (récepteur cible)	Lignées cellulaires	Exemples de contaminants environnementaux actifs	Références
Récepteurs des stéroïdes	Oestrogènes (ER)	MELN	Stéroïdes naturels et synthétiques (œstradiol, éthinil-œstradiol, lévonorgestrel) ; filtres UV ; parabens ; bisphénol A, alkylphénols) ; certains pesticides	Balaguer et al 2001
	Androgènes (AR) Glucocorticoïdes (GR)	MDA-kb2	Stéroïdes naturels et synthétiques (testostérone, dihydroxytestostérone, trenbolone) ; certains pesticides (DDT, vinclozoline)	Wilson et al 2002
Métabolismes des xénobiotiques	Dioxine-like (AhR)	PLHC-1	HAP, PCB-DL, dioxines, furanes	Louiz et al 2008
	Pregnane (PXR)	HG5LN-hPXR	Nombreux xénobiotiques dont certains médicaments, certains pesticides, certains plastifiants, stéroïdes, surfactants	Creusot et al 2010

L'intérêt principal de ces outils demeure leur capacité à détecter de manière spécifique et sensible l'activité biologique globale d'un extrait environnemental complexe en tenant compte de l'ensemble des substances actives et biodisponibles (i.e. réponse intégrative prenant en compte les effets de mélange). Ils fournissent une mesure quantitative, à travers la **détermination d'équivalent-toxique biologique** (Bio-TEQ), tout en informant sur le mécanisme d'action des substances en présence (indicateur précoce de danger).

Dans notre étude, l'établissement de profils de contamination PE et DL a été réalisé à partir de la méthodologie proposée par Hamers et al 2010 qui consiste à établir :

- 1) Le **profil toxicologique**¹ de l'ensemble des sites. Ce profil est déterminé sur la base des valeurs de Bio-TEQ quantifiées pour chaque bioessai individuel. Les valeurs de Bio-TEQ de l'ensemble des sites investigués sont présentées en annexe 2 de ce rapport.
- 2) Le **profil de danger in vitro** à travers l'établissement d'un code couleur basé sur le ratio : BioTEQ site ref / BioTEQ site, représentant l'éloignement d'un site donné par rapport à une valeur de référence. Dans notre étude, le site du Luech (LUE) a été défini comme site de

¹ La terminologie « profil toxicologique » et « profil de danger in vitro » utilisée dans ce rapport a été choisie sur la base de celle proposée par Hamers et al 2010.

référence. Ce site est identifié comme référence écologique dans le cadre du réseau de contrôle de surveillance (RCS). Le choix des classes permettant d'établir le code couleur a été fait selon les recommandations de Hamers et al (2010). Cela reste un choix arbitraire qui peut être amené à évoluer dans le futur avec la définition de valeurs seuils par exemple (cf. discussion §3).

Enfin, l'établissement du profil de danger est accompagné d'une **hiérarchisation des sites** selon la méthode statistique dite des *clusters* afin de regrouper les sites selon leur profil de contamination global en vue d'identifier des sites d'intérêts (i.e. fort niveaux de contamination) sur lesquels mener des investigations plus poussées.

2.1 PROFILAGE TOXICOLOGIQUE ET NIVEAUX D'ACTIVITÉ PE

Le criblage des 120 sites de l'étude prospective révèle une **contamination ubiquitaire** des rivières françaises par des composés de type PE et dioxine-like (Annexe 2). Selon l'activité biologique considérée, les niveaux d'activités mesurés peuvent varier d'un à trois ordres de grandeurs d'un site à l'autre (Figure 3).

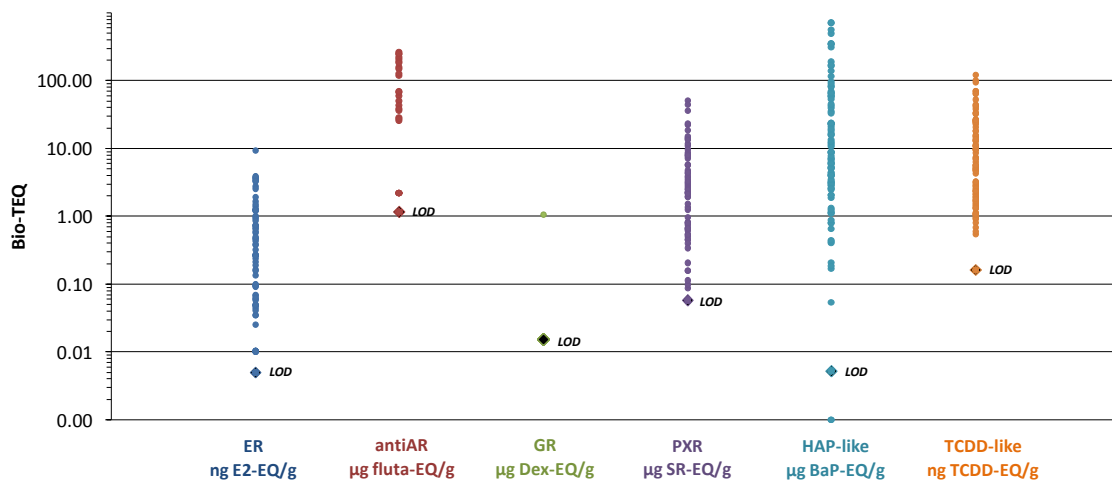


Figure 3 : Distribution des valeurs de BioTEQ pour les différentes activités investiguées dans les 120 sédiments de l'étude prospective 2012.

Globalement, ces niveaux moyens sont cohérents avec ceux rapportés dans d'autres sédiments investigués en Europe. Toutefois, certains sites présentent des valeurs relativement fortes par rapport aux valeurs communément rencontrées dans nos précédentes études (Creusot et al. 2013, Kinani et al. 2010, Aït-Aïssa 2010) ou rapportées dans la littérature (Houtman et al. 2006, Weiss et al. 2009, Vondracek et al. 2001). C'est par exemple le cas : pour l'activité oestrogénique, sur l'Yerres à Courtomer (9 ng E2-EQ/g séd.) ; pour l'activité PXR-like, l'Yerres à Courtomer (44 µg SR-EQ/g séd sur) et l'Iton à Chaise-dieu-du-theil (51 µg SR-EQ/g séd.); pour l'activité anti-androgénique, la Seine à Poissy (217 µg Fluta-EQ/g séd.), la Risle à Ambenay (202 µg Fluta-EQ/g séd.), la Luynes à Aix en Provence (243 µg Fluta-EQ/g séd.), la Marne à Gumière (245 µg Fluta-EQ/g séd.) et la Moselle à Hauconcourt (262 µg Fluta-EQ/g séd.); pour l'activité dioxin-like, l'Isle à Razac (334 µg BaP-EQ/g séd.) et à la Guitres (311 µg BaP-EQ/g séd.), l'Oust à Loudeac (348 µg BaP-EQ/g séd.), la Clain à Hanche (486 µg BaP-EQ/g séd.), la Meholle à Void (700 µg BaP-EQ/g séd.), Luynes à Aix en Provence (702 µg BaP-EQ/g séd.) et la Durance aux Mées (557 µg BaP-EQ/g séd.).

A noter que bien que les niveaux d'activité DL mesurés dans cette étude soient pour certains sites très élevés (1-10 µg BaP-EQ/g de séd) par rapport à ceux de la littérature dans d'autres contextes environnementaux (e.g. Louiz et al. 2008), ces valeurs sont en phase avec une précédente étude

menée par notre laboratoire sur trente sites RCS du bassin Artois-Picardie et qui avait montré la présence de fortes activités DL (5-290 µg BaP-EQ/g) (Aït-Aïssa et al 2010).

Un résultat isolé mais notable est la détection d'une forte activité glucocorticoïde (1 µg-Dexa-Eq/g) dans le sédiment de l'Iton à Normanville, une activité plus fréquemment associée à la phase dissoute et généralement absente dans le sédiment. A notre connaissance, cette étude est la première à mettre en évidence la présence de composés de type glucocorticoïdes dans des sédiments de rivière. En revanche, l'occurrence de tels composés dans les eaux de surface en aval de rejets hospitalier ou industriel a été rapportée (Schriks et al. 2010 ; Creusot et al. 2014).

2.2 PROFIL DE DANGER IN VITRO ET MISE EN REGARD DES INDICATEURS DE LA DCE

A partir de la quantification des activités biologiques individuelles, l'application d'un code couleur a permis de dresser des profils d'activité *in vitro* puis de classer les sites en fonction de ces profils selon la méthode des clusters. Le résultat est présenté dans la Figure 4. Dans cette figure, nous reportons également la typologie des sites (i.e. pression anthropique) ainsi que leurs états écologique et chimique tels que défini dans la DCE, à titre de comparaison avec le classement selon leur profil PE.

Le profil de danger est établi sur la base de la quantification des activités PE (BioTEQ) mises au regard de l'activité au sein d'un site de référence. La méthodologie de Hamers et al. (2010) propose d'utiliser comme référence un site de référence écologique. Notre choix s'est porté sur le site du Luech à Génolhac. D'une part, ce site est identifié comme référence écologique dans le cadre du réseau de contrôle de surveillance (RCS). D'autre part, il présentait des niveaux d'activités *in vitro* parmi les plus bas, suggérant de faibles niveaux de contaminations par les composés PE et DL.

Ainsi, à partir des BioTEQ de l'ensemble des sites (Annexe 2), nous avons calculé le **ratio de danger** (BioTEQ site / BioTEQ site de référence). À partir des valeurs de ratio obtenues, nous avons ensuite établi une échelle couleur allant du vert foncé (ratio de danger <1 signifiant que la BioTEQ de ce site est inférieure à celle du site de référence) au rouge (ratio de danger >100; la BioTEQ sur site est plus de 100 fois supérieur à celle du site de référence) (Figure 4). À travers ce code couleur il est ainsi possible de distinguer rapidement les sites présentant de faibles niveaux d'activité de ceux fortement contaminés et d'identifier ainsi les sites à investiguer plus avant.

Au delà du code couleur, la méthode statistique de **hiérarchisation** des clusters permet enfin, sous la forme d'un dendrogramme, de regrouper les sites présentant globalement des profils et des niveaux de contamination similaires (Figure 4).

D'une manière générale, cette analyse très globale permet d'identifier quelques groupes de sites avec des profils de contamination particuliers (e.g. 12 premiers sites discriminés par une forte activité anti-AR et TCDD-like ou sites du bas de la figure avec des profils plutôt ER, PXR et DL). Cette analyse globale révèle aussi une importante proportion de sites relativement peu discriminés et peu contaminés. Une analyse plus fine des résultats est donnée ci-après.

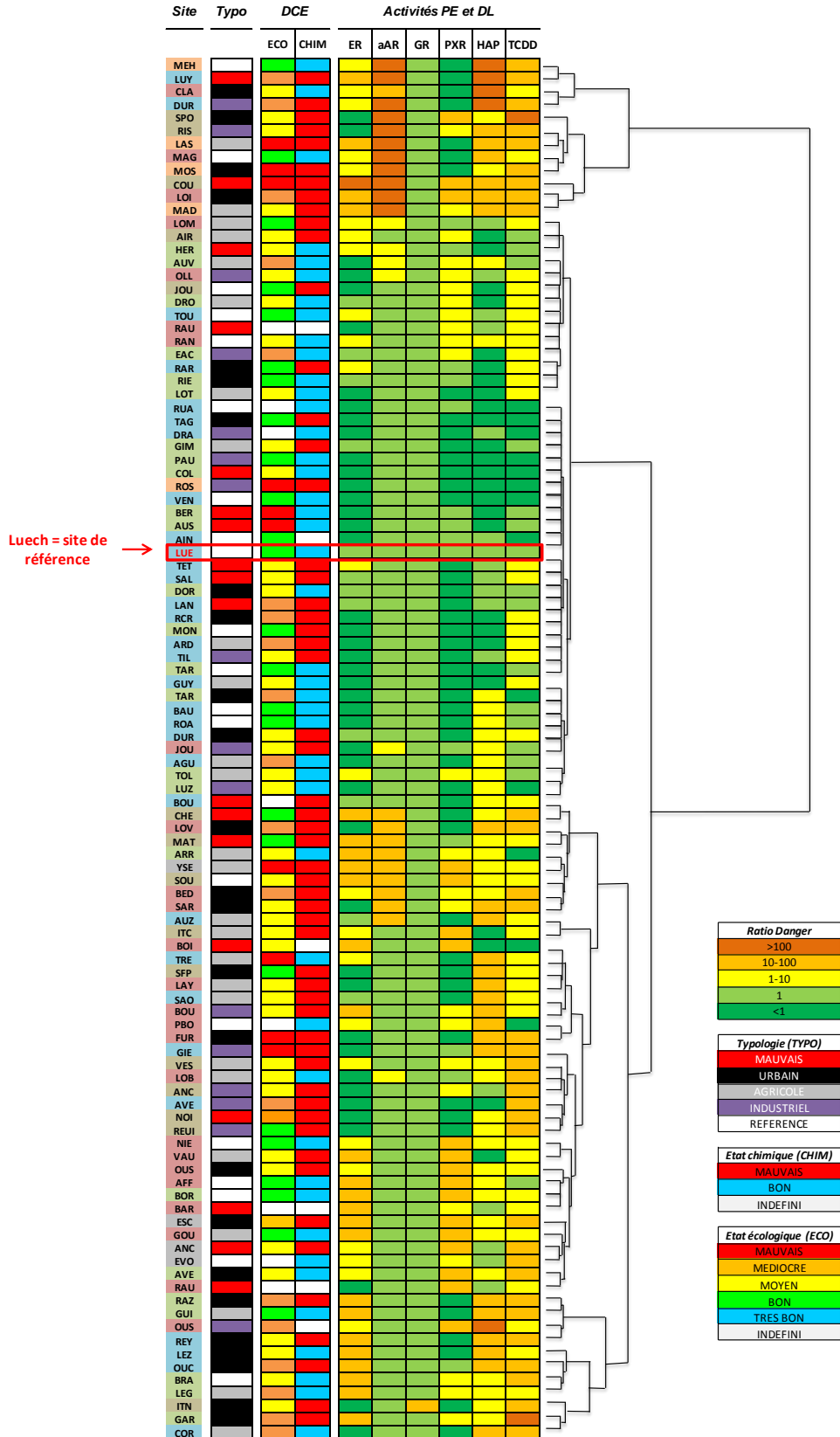


Figure 4 : Profils d'activités PE et DL in vitro des sédiments de l'étude prospective. Classification selon la méthode des clusters en fonction des activités in vitro et comparaison avec le type de pression anthropique (Typo) et l'état écologique (ECO) et chimique (CHIM) tels que définis dans la DCE.

2.2.1 HIÉRARCHISATION ET IDENTIFICATION DE SITES PRIORITAIRES SUR LA BASE DES ACTIVITÉS IN VITRO

L'établissement du profil de danger ainsi que la codification couleur associée montre que les activités ne sont pas toutes égales en termes de « danger PE *in vitro* ». Ce constat est conforté si l'on analyse chaque activité individuellement (Figure 5). En effet, si les niveaux des activités ER et PXR-like dans les sédiments ont une répartition assez similaire par rapport au site de référence (50-60% faiblement contaminés, 20% des sites moyennement contaminés et 25 % fortement contaminés), pour les activités TCDD-like et HAP-like, la proportion de sites fortement contaminés est plus importante (e.g. 39+30+2=71% pour l'activité TCDD-like) ce qui confirme le caractère ubiquitaire de la contamination par ce type de contaminants très hydrophobes et persistants et donc majoritairement associés à la phase sédimentaire.

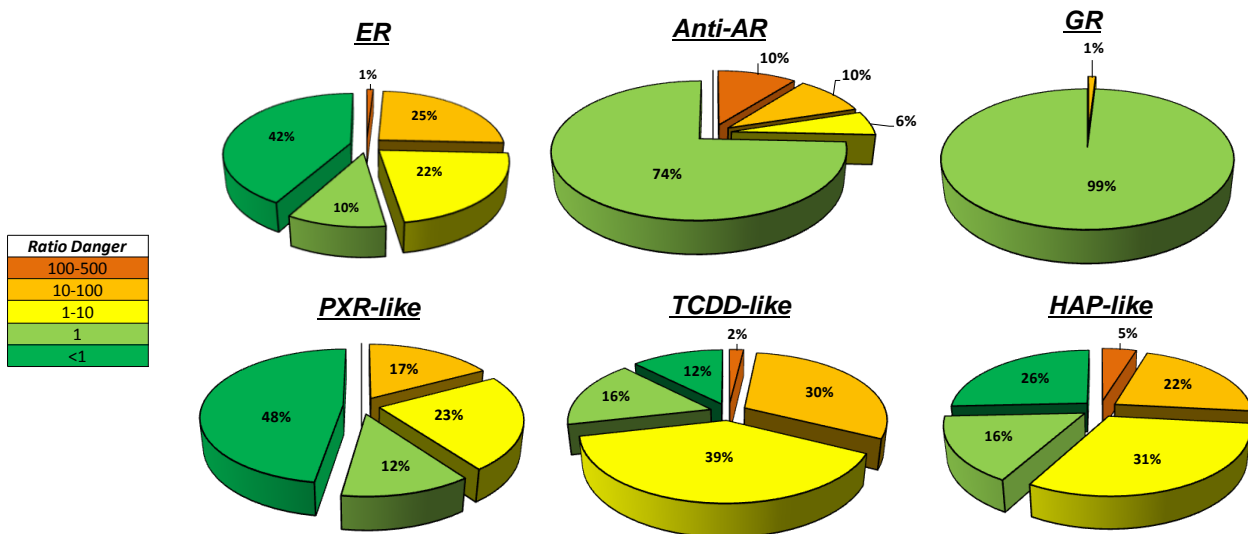


Figure 5 : Répartition des valeurs de ratio du danger *in vitro* (extraits de la figure 3) pour chaque activité sur l'ensemble des sédiments investigués.

Concernant l'activité anti-AR, une majorité de sites apparaît comme étant peu contaminés (**Figure 4**) suggérant soit une faible occurrence environnementale de ces composés soit que le sédiment n'est pas un compartiment de choix pour évaluer la contamination des milieux aquatique par ces composés. Il est néanmoins notable que l'activité anti-AR a permis de discriminer un groupe de sites comme particulièrement contaminés, sites également fortement contaminés en composés dioxin-like (i.e. 12 premiers sites de la Figure 4).

Un seul site a présenté une activité GR détectable. Dans l'environnement aquatique, les composés identifiés jusqu'à présents comme étant responsables des ces activités concernent uniquement les glucocorticoïdes naturels ou de synthèse (pharmaceutiques), qui sont plutôt de nature hydrophile (Creusot et al 2014, Schriks et al 2010, Cheng et al 2010). Le sédiment ne semble donc pas être une matrice de choix et il serait plus pertinent d'investiguer la colonne d'eau pour rendre compte de l'occurrence environnementale de ces contaminants (cf. § 4.1.3.).

Enfin, comme déjà évoqué dans le rapport de l'étude prospective (Aït-Aïssa et al 2014), il convient d'être vigilant quant à l'interprétation du code couleur vis-à-vis du **choix de la valeur de référence** qui peut conduire à une surestimation ou une sous-estimation du danger. En effet, si le site choisi comme référence présente une forte activité alors tous les sites apparaîtront comme peu ou faiblement contaminés. Il conviendra donc à l'avenir de mener une réflexion sur la définition de la valeur de référence pour l'établissement du code couleur du profil de danger. Par exemple, il pourrait être question dans le cas de l'activité œstrogénique, de ne pas choisir la valeur de bioTEQ d'un site de référence écologique mais plutôt une valeur seuil de référence telle que la NQE-E₂ qui a été définie récemment dans le cadre de la directive fille.

Si le code couleur établi est en soit informatif, la classification selon la méthode des *clusters* permet de structurer cette information de manière plus lisible, permettant ainsi d'identifier 3 groupes de sites selon leur profil et niveau de contamination global (par rapport au site de référence) :

- Les **sites fortement contaminés** qui présentent pour l'ensemble des sédiments investigués des niveaux d'activités élevés : MEH, LUY,CLA, DUR, SPO, RIS, LAS, MAG, MOS, COU, LOI, MAD
- Les **sites moyennement contaminés** pour lesquels seulement certaines des activités sont élevées : BOU, CHE, LOV, MAT, ARR, YSE, SOU, BED, SAR, AUZ, ITC, BOI, TRE, SFP, LAY, SAO, BOU, PBO, FUR, GIE, VES, LOB, ANC, AVE, NOI, REUI, NIE, VAU, OUS, AFF, BOR, BAR, ESC, GOU, ANC, EVO, AVE, RAU, RAZ, GUI, OUS, REY, LEZ, OUC, BRA, LEG, ITN, GAR, COR.
- Les **sites faiblement contaminés** qui présentent des faibles niveaux d'activités pour l'ensemble des tests : LOM, AIR, HER, AUV, OLL, JOU, DRO, TOU, RAU, RAN, EAC, RAR, RIE, LOT, RUA, TAG, DRA, GIM, PAU, COL, ROS, VEN, BER, AUS, AIN, LUE, TET, SAL, DOR, LAN, RCR, MON, ARD, TIL, TAR, GUY, TAR, BAU, ROA, DUR, JOU, AGU, TOL, LUZ.

Dans une démarche de surveillance de la qualité des eaux, cette classification par groupe permet donc **d'identifier des sites prioritaires** sur lesquels mener des investigations plus poussées afin de déterminer l'origine et/ou d'évaluer les conséquences de ces forts niveaux de contamination. De plus, l'établissement du code couleur permet également d'identifier « visuellement » des sites atypiques, tels que l'Iton à Normanville qui est le seul à présenter une activité glucocorticoïde et qui est ici classé parmi les sites moyennement contaminé.

2.2.2 COMPARAISON PROFIL DE DANGER *IN VITRO* ET TYPOLOGIE DES SITES

Les sédiments investigués dans cette étude ont été choisis de manière à couvrir différents types de pression anthropique : urbaine, agricole, industrielle, sites en mauvais état ou de référence écologique.

La Figure 4 met en regard le profil de danger hiérarchisé et ces différentes typologies (TYPO). *A priori*, il ne semble pas apparaître de lien évident entre une pression particulière et le niveau global d'activité *in vitro* (i.e. le groupe des sites fortement contaminés n'est pas associé à une pression donnée). Cette observation reste vraie quelque soit l'activité considérée (Figure 6). Par exemple, pour l'activité œstrogénique, sur les 20 sites les plus actifs on retrouve 2 sites en mauvais état, 7 sites sous pression urbaine, 5 sites sous pression agricole, 6 sites sous pression industrielle et 3 sites de référence. Il est par ailleurs notable que seule l'activité TCCD-like ne présente pas de site de référence parmi les 20 les plus contaminés.

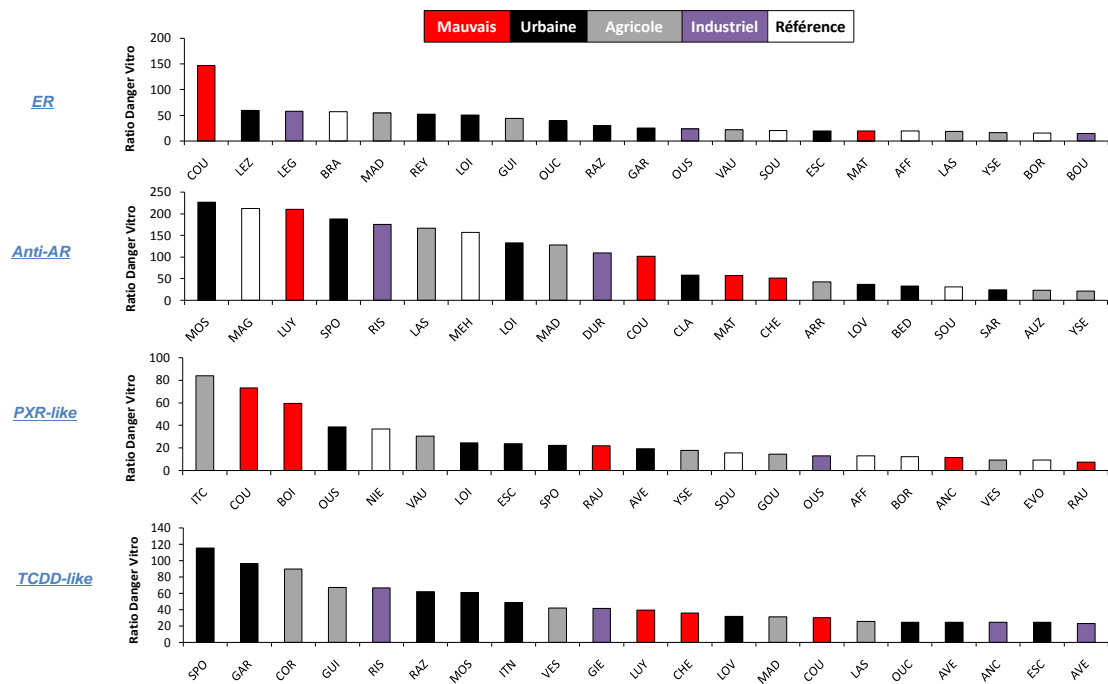


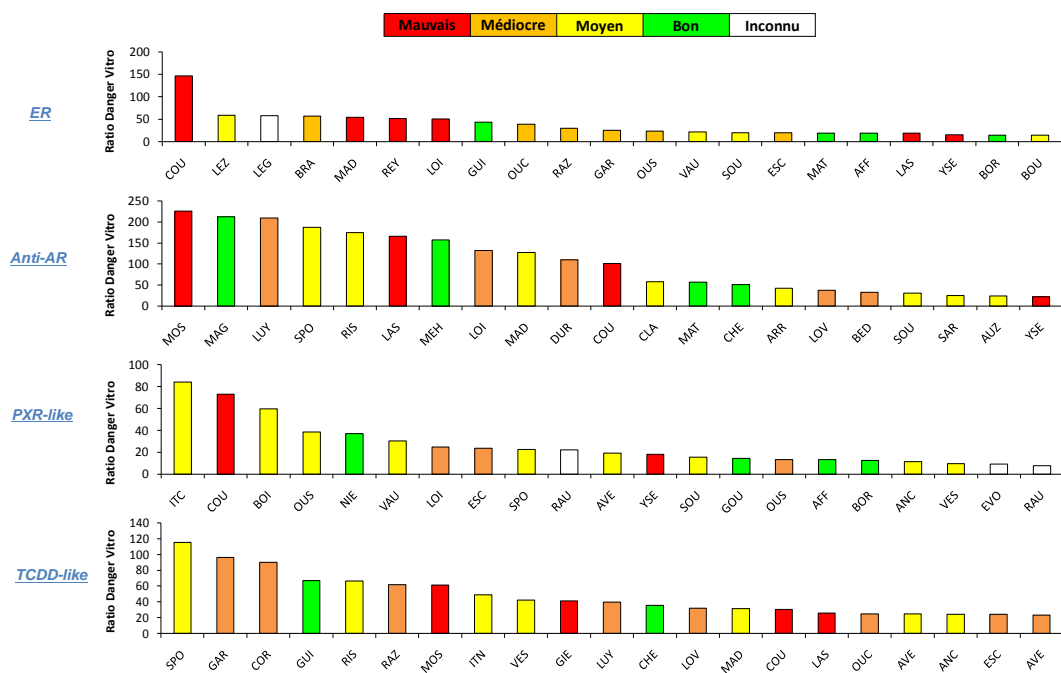
Figure 6 : Typologie des 20 sites les plus contaminés in vitro, activité par activité

2.2.3 COMPARAISON PROFIL DE DANGER IN VITRO ET ÉTATS DCE

Dans le cadre de la directive sur l'eau, la qualité globale de l'eau est définie selon l'état écologique basé sur des indicateurs écologiques (e.g. indice IBG, IPR, indicateurs hydro-morphologique) et l'état chimique basé sur le suivi des concentrations de 53 polluants prioritaires (i.e. NQE) dans la colonne d'eau.

Dans le cas présent, une confrontation de l'état de danger PE *in vitro* des 20 sites les plus actifs, activité par activité, avec l'état écologique/chimique met en évidence une absence de lien entre la classification de l'état écologique et le danger PE (Figure 7a). En effet quelque soit l'activité considérée, parmi les sites les plus contaminés par les PE, on retrouve aussi bien des sites en mauvais état écologique que des sites en bon état. Il en est de même pour l'état chimique bien que l'on observe une proportion plus importante de sites en mauvais état chimique (en rouge dans la Figure 7b).

a)



b)

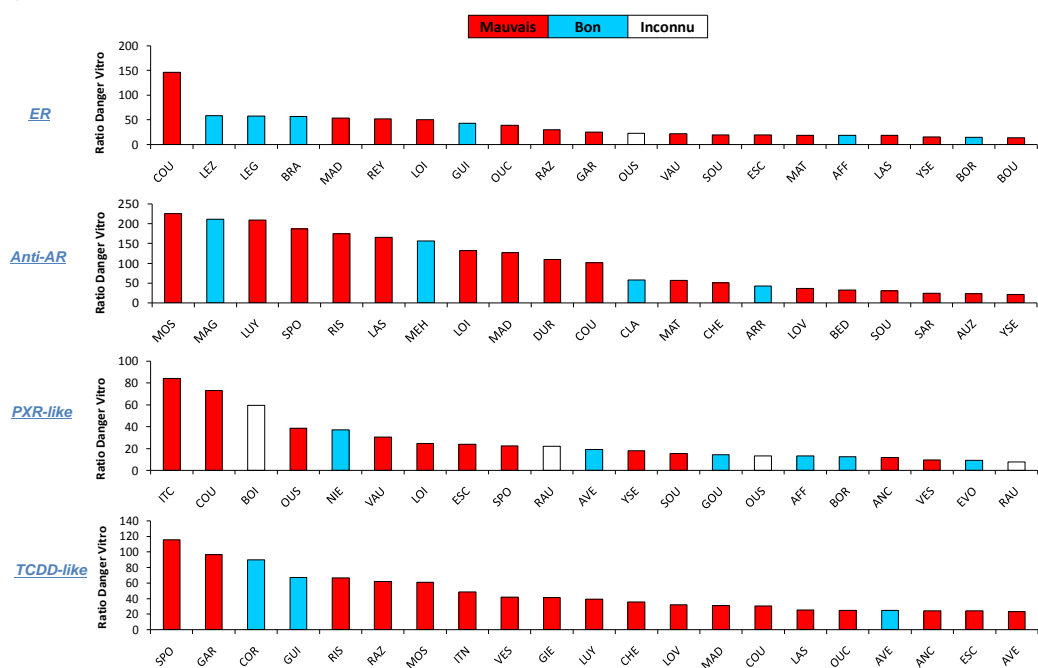


Figure 7 : Etats écologique (a) et chimique (b) de la DCE sur les 20 sites les plus contaminés mise au regard du danger in vitro PE, activité par activité.

Dans l'ensemble ces résultats confirment que le profilage toxicologique PE apporte une information supplémentaire concernant la qualité éco(toxi)cologique et chimique des masses d'eau.

3. CARACTÉRISATION DES EFFETS *IN VIVO*

Si les bioessais *in vitro* constituent un complément pertinent au regard des analyses chimiques, il faut garder à l'esprit qu'ils restent des systèmes simplifiés qui ne permettent pas de rendre compte des réponses à l'échelle d'un organisme. L'objectif de cette partie de l'étude était donc de confirmer, à l'échelle de l'organisme entier, les effets des échantillons identifiés lors du criblage *in vitro*. Pour cela, deux bioessais *in vivo* sur embryons de poisson zèbre, basés sur l'expression de gènes répondant spécifiquement aux composés œstrogéniques et aux composés DL, ont été mis en œuvre afin, notamment, de rendre compte des aspects pharmacocinétiques (absorption, transport, métabolisme) non pris en charge par les bioessais *in vitro* (Tableau 2).

Tableau 2 : Bioessais *in vivo* utilisés dans le cadre de cette étude

Modèle biologique (principe)	Type d'activité (mesure)	Composés de référence	Exemples de contaminants environnementaux actifs	Ref
Embryon de poisson zèbre sauvage – WT/AB (EROD)	Dioxin-like	Dioxine (TCDD)	HAP, PCB-DL, dioxines, furanes	Creusot et al 2012
Embryon de poisson zèbre transgénique-cyp19a1b-GFP (GFP fluorescence)	Estrogénique	Œstradiol (E2)	Stéroïdes naturels et synthétiques (œstrogènes, androgènes aromatisables, progestagènes), alkylphénols, bisphénols, parabènes, pesticides organochlorés, benzophénones...	Brion et al 2012

Sur les 120 sédiments de l'étude prospective, 30 extraits ont été testés sur embryons de poissons zèbres. Sur l'ensemble des sites investigués, aucune activité œstrogénique *in vivo* n'a pu être détectée. En revanche, une induction significative et dose-dépendante d'activité EROD a été détectée pour l'ensemble des échantillons (Annexe 3). Les dose-réponses ont permis la quantification de Bio-TEQs *in vivo* exprimés en ng TCDD-EQ/g de sédiments, par analogie à l'analyse *in vitro*. Les résultats sont reportés dans la figure 8 et comparés aux valeurs mesurées par le bioessai *in vitro*.

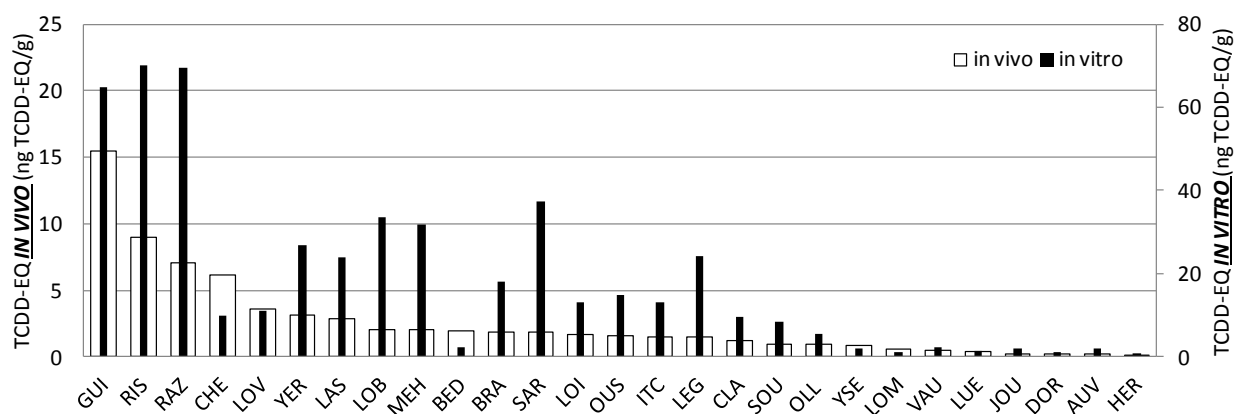


Figure 8 : Activités DL mesurées par les bioessais *in vivo* (en blanc) vs *in vitro* (en noir)

Les résultats de la Figure 8 montre que le test EROD *in vivo* sur embryon de poisson zèbre est tout à fait fonctionnel pour détecter et quantifier des activités DL dans des extraits de sédiments. Cette quantification est globalement cohérente avec les données *in vitro*, même si les niveaux mesurés en TCDD-EQ sont globalement inférieurs *in vivo*. Cette différence pourrait en partie s'expliquer par une différence dans les temps d'exposition (24h *in vitro* contre 96h *in vivo*) qui pourraient conduire à une métabolisation plus importante chez les embryons et qui expliquerait ainsi les niveaux plus faibles mesurés *in vivo*. Au-delà du temps d'exposition, des différences dans les capacités métaboliques et d'autres facteurs pharmacocinétique (biodisponibilité, transport, etc...) pourraient

également contribuer à ces différences. Ceci souligne une limite des réponses mesurées uniquement à l'échelle *in vitro* qui ne permettent pas de rendre compte de la réponse à l'échelle de l'organisme et donc du danger associé à ces mélanges complexes. L'intégration de mesures *in vivo* dans une démarche bio-analytique renforce la pertinence toxicologique de l'approche.

Bien que les niveaux d'activités diffèrent, les activités dioxin-like *in vivo* restent très fortement corrélées aux réponses *in vitro* ($R^2=0.6758$, Figure 9). La comparaison des mesures d'activités DL *in vitro* et *in vivo* aboutit à une classification globalement similaire des sites. Deux exceptions sont à noter, les sédiments de MAD et de GAR qui sont considérés comme très actifs *in vitro* et moyennement actifs *in vivo*. Ainsi, ces deux sites n'ont pas été intégrés à l'analyse comparative toutefois leur intégration au jeu de données aboutit à un facteur de corrélation R^2 de 0,53 ce qui reste significatif.

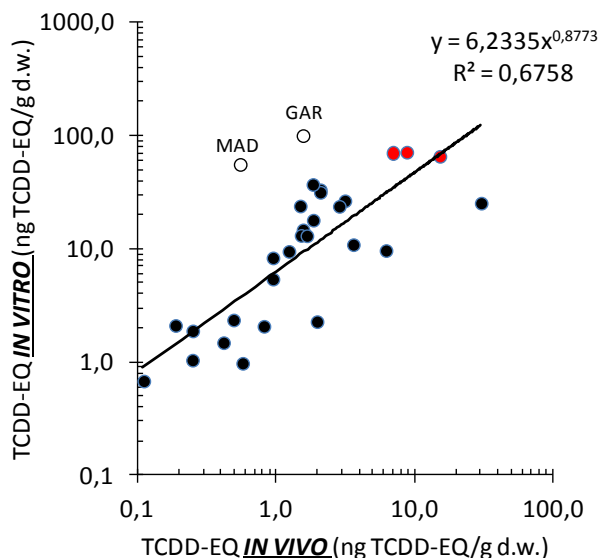


Figure 9 : Corrélation entre les activités DL *in vivo* et *in vitro*. En rouge, sites pour lesquels des anomalies du développement ont été observés – cf. Figure 9 ; en blanc, sites non intégrés à la corrélation.

Un résultat remarquable concerne l'observation d'anomalies du développement (Figure 10) sur les embryons exposés aux extraits des sédiments présentant les plus fortes activités dioxine-like *in vitro* et *in vivo* (sites identifiés en rouge sur la Figure 9). Ici, l'apport du bioessai *in vivo* permet non seulement de fournir une évaluation de l'exposition à des composés DL à l'échelle d'un organisme, telle que donnée par la mesure d'activité EROD, mais également de corréler cette exposition avec des effets précoces.

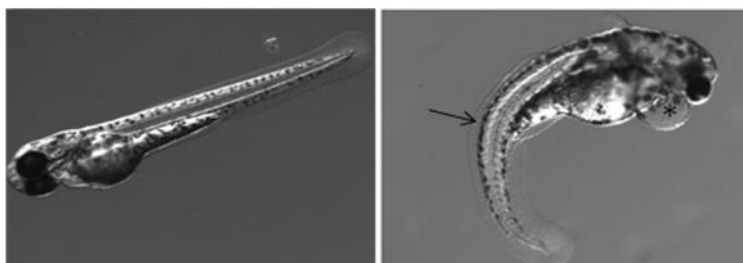


Figure 10 : Malformations induites chez un embryon de poisson zèbre exposé aux sédiments les plus contaminés en composés DL. À gauche : poisson témoin ; à droite : poisson exposé à un extrait de sédiment montrant une malformation de la queue (flèches) et un œdème péricardique (astérisque).

Dans l'ensemble, ces résultats renforcent les tendances démontrées lors de l'étude prospective pour un nombre plus restreint de sites (Aït-Aïssa et al 2014). Ils démontrent la pertinence du

bioessai *in vitro* en tant qu'outil prédictif d'un effet *in vivo* et l'intérêt du modèle embryon de poisson pour révéler des effets toxiques précoces associés à la présence de type de composés. Les deux types de bioessais déployés dans cette étude apparaissent donc complémentaires. Du point de vue pratique, ce sont deux bioessais utiles et robustes pour le criblage d'échantillons environnementaux dans une démarche bioanalytique.

4. IDENTIFICATION DE COMPOSÉS ACTIFS

L'établissement de profils de danger *in vitro* a permis d'identifier des sites présentant de forts niveaux d'activités PE et/ou DL ou ayant des profils de contamination particuliers. La question de la nature des substances détectées par les bioessais *in vitro* sur ces sites se pose alors. Cette dernière phase de l'étude avait pour objectif d'identifier ces substances, par la mise en œuvre d'analyses chimiques ciblées et non ciblées de manière à (i) établir la contribution de composés actifs connus à travers l'approche dite *mass balance analysis* et (ii) isoler et identifier de nouveaux contaminants en se basant sur une approche de type EDA.

4.1 CONTRIBUTION DE POLLUANTS ACTIFS CONNUS

Afin d'identifier les composés responsables des activités biologiques mesurées nous avons tout d'abord entrepris une analyse dite de *mass balance*. Celle-ci consiste à comparer l'activité biologique de l'échantillon mesurée par le bioessai (Bio-TEQ) à celle prédite par les analyses chimiques (Chem-TEQ). La Chem-TEQ est basée sur la concentration individuelle (C) de composés connus comme étant actifs et dont l'activité dans le bioessai est connue (donnée par son facteur de toxicité relatif ou $TEF_i = EC20 \text{ molécule de référence} / EC20 \text{ composé } i$). L'activité biologique théorique donnée par l'analyse chimique est alors calculée selon la formule : $Chem-TEQ = \sum(C_i * TEF_i)$.

Sur la base des activités biologiques détectées, des analyses quantitatives ciblant 43 composés ont été mises en œuvre sur les sites présentant les plus fortes activités (Tableau 3). La sélection des composés analysés s'est faite sur la connaissance de leur activité dans les bioessais et leur probable occurrence environnementale rapportée dans d'autres études. Notre choix s'est porté prioritairement sur les sites présentant une forte activité oestrogénique et dioxin-like en résonance à l'investigation *in vitro*. Un seul des sédiments présentant une activité glucocorticoïde (ITN), nous avons également investigués cette famille de composés dans ce sédiment.

Les différentes méthodes d'analyses sont détaillées en annexe 4.

Tableau 3 : Composés ciblés par analyses quantitatives et sélectionnés en lien avec leur activité biologique (nombre de composés)

Activité biologique	Classe chimique	Composés	Méthode d'analyse
Activité œstrogénique (19)	Stéroïdes (6)	œstrone (E ₁), α-œstradiol, β-œstradiol, éthinyl-œstradiol (EE ₂), Mestranol, œstriol (E ₃),	GC-MS avec dérivatisation
	Alkyphénols (4)	4-tert-octylphenol, 4-n-butoxyphenol, 4-n-nonylphenols, m-nonylphénols	
	Plastifiants (1)	Bisphénol A	
	Parabènes (2)	n-butylparabène, n-propylparabène	
	Benzophénones (2)	Tétrahydroxybenzophénone, 2,4,4'-Trihydroxybenzophénone	
Divers (4)	Pentachlorophénol, 1-hydroxypyrene, Diethylstilbestrol 2-hydroxyfluorène		
Activité gluco-corticoïde (10)	Stéroïdes naturels ou de synthèses (10)	prednisone, cortisone, prednisolone, cortisol, 6-α-methylprednisolone, desoximetasone, dexamethasone, triamcinolone acetonide, clobetasol propionate, fluticasone propionate	LC-MS/MS
Activités dioxin-like (14)	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (14)	naphtalène, acénaphène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)Fluoranthène, benzo(k)Fluoranthène, benzo(a)Pyrene, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)Perylen	LC-Fluo

4.1.1 RECHERCHE DE XÉNO-OESTROGENES

L'analyse réalisée en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS) a permis la recherche de 19 composés (Tableau 3) sur les 10 extraits de sédiment présentant les plus fortes activités œstrogéniques.

Les résultats révèlent la présence ubiquitaire des alkyphénols alors que les stéroïdes (i.e. E₁), le bisphénol A, les dérivés de HAP hydroxylés ainsi que le n-propylparabène ne sont détectés que ponctuellement sur certains sites (Annexe 5). La comparaison des activités biologiques (BioTEQ) et des analyses chimiques (ChemTEQ) montre une faible contribution des composés ciblés à l'activité œstrogénique mesurée par le bioessai (< 20%) (Figure 11; le tableau complet des analyses comparatives est présenté en annexe 5).

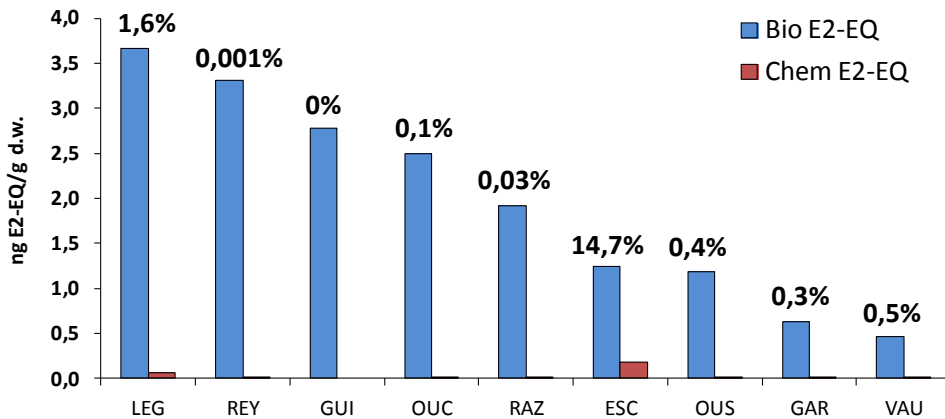


Figure 11 : Comparaison des concentrations en estradiol-équivalents (E2-EQ) dans les sédiments calculées sur la base des analyses chimiques (Chem E2-EQ) et des bioessais (Bio E2-EQ). %= Chem-TEQ/Bio-TEQ × 100.

Ces résultats montrant que les quelques familles de xéno-estrogènes ciblées par les analyses quantitatives ne sont que très peu ou pas explicatives de l'activité œstrogénique détectée restent conformes à ceux précédemment rapportés (Kinani et al. 2010, Creusot et al. 2013, Aït-Aïssa et al. 2014). Ils soulignent le manque de connaissances actuelles concernant la nature des composés œstrogéniques dans ce compartiment sédiment et le besoin de passer par des étapes de fractionnement pour identifier les composés actifs (Creusot et al 2013). A l'inverse, dans les eaux de surface, des composés tels que le l'estrone, le BPA ou les alkylphénols sont souvent identifiés comme des contributeurs significatifs des activités *in vitro* (Neale et al 2015).

4.1.2 RECHERCHE D'HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP)

L'activité EROD mesurée *in situ* ou en laboratoire est utilisée comme un marqueur de la présence de contaminants interagissant avec le récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR), tels que les PCB ou les HAP. Dans le cadre de cette étude, les sédiments présentant la plus forte activité EROD ont été soumis à des analyses chimiques afin de quantifier les 15 HAP dans le but d'évaluer leur contribution à l'activité biologique mesurée (Figure 12, Annexe 6).

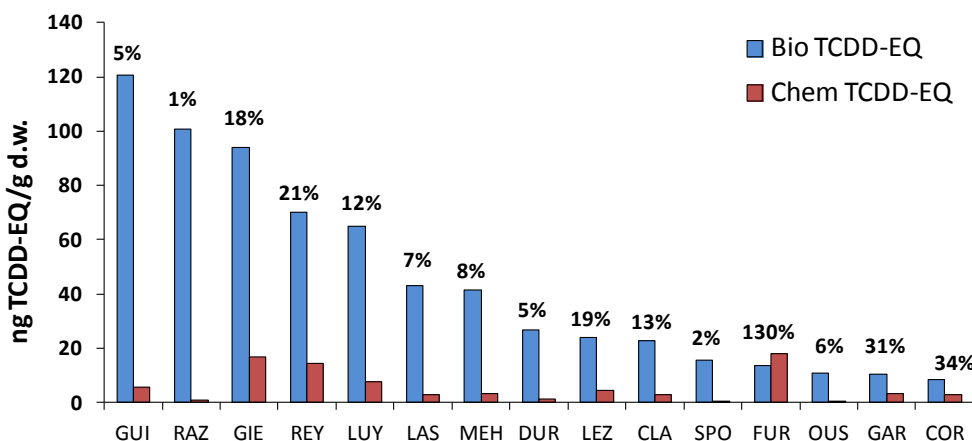


Figure 12 : Comparaison des activités dioxin-like dans les sédiments déterminées sur la base des analyses de HAP (Chem-TEQ) et des bioessais (Bio-TEQ). %= Chem-TEQ/Bio-TEQ × 100

Comme pour l'activité œstrogénique, les composés ciblés n'expliquent que partiellement l'activité dioxine-like, avec néanmoins une contribution plus significative pour l'activité TCDD-like (Annexe 6). Celle-ci varie de 1% à 34 % pour les sites GAR et COR. A noter que la totalité de l'activité TCDD-like est expliquée par les HAP pour le FUR.

4.1.3 RECHERCHE DE GLUCOCORTICOÏDES

Parmi les sédiments investigués, un seul, le sédiment ITN, présentait une activité glucocorticoïde. Il est important de rappeler que cette étude est la première à rapporter une telle activité dans un sédiment de rivière alors que la présence de cette activité a déjà observé dans des effluents hospitalier ou industriel (Van Den Linden et al. 2008, Creusot et al. 2014). Sur la base d'une recherche bibliographique, nous avons établi une liste de composés de type glucocorticoïdes candidats potentiellement présents dans l'environnement (Tableau 3).

Ces analyses ont été réalisées par chromatographie liquide ultra haute performance combinée à de la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MS-MS) qui est actuellement l'approche la plus sensible pour la détection ultra-trace de composés organiques dans les matrices environnementales. Dans le cas présent la limite de détection instrumentale (détecteur de masse) était comprise entre 10 et 25 µg/L (Annexe 4). Toutefois, les analyses ne nous ont pas permis de détecter les glucocorticoïdes recherchés dans le sédiment du site ITN. L'importante charge matricielle associée à ce sédiment pourrait expliquer en partie la non-détection des composés ciblés (i.e. extinction du signal en lien avec la matrice). De manière à réduire cette charge matricielle et isoler les composés actifs, nous avons finalement procédé à un fractionnement de l'extrait de sédiment (cf. §4.2. suivant).

Par ailleurs, s'agissant généralement de composés polaires à semi-polaires, il nous a paru pertinent d'aller investiguer également dans la colonne d'eau sur le site ITN. Une nouvelle campagne de prélèvement a donc été réalisée en Novembre 2013 sur le sédiment et sur la colonne d'eau à travers l'utilisation de capteurs passifs de type POCIS (Polar Organic Compound Integrative Sampler), déjà mis en œuvre dans le cadre de l'étude prospective (Aït-Aïssa et al. 2014). Si l'activité glucocorticoïde n'a pas pu être confirmée dans le sédiment en 2013, une telle activité a été détectée dans les POCIS (données non-montrées). Cependant, comme pour le sédiment de l'année 2012, les analyses chimiques ciblées n'ont pas permis de détecter les composés ciblés. Ainsi une perspective intéressante de ce travail serait de fractionner l'extrait de POCIS de manière à déterminer si les fractions actives du sédiment 2012 (cf. § 4.2) correspondent à celles des POCIS de l'année 2013 et ainsi déterminer si les composés détectés par les bioessais *in vitro* sont susceptibles d'être les mêmes entre 2012 et 2013.

4.2 ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE (NOUVEAUX) POLLUANTS (APPROCHE EDA)

Cette dernière partie du travail fait appel à l'utilisation combinée de bioessais *in vitro*, de méthodes de fractionnement et d'analyses chimiques haute résolution basées sur le concept EDA (Brack 2003). Dans son principe cette approche vise à fractionner l'extrait actif de départ en vue de réduire la complexité du mélange environnemental afin d'isoler les composés actifs au sein de fractions. Les fractions actives sont finalement soumises à une identification finale par spectrométrie de masse haute résolution.

4.2.1 ISOLEMENT DES COMPOSÉS A ACTIVITÉ GLUCOCORTICOÏDES

Le fractionnement a été réalisé ici selon la polarité des composés par chromatographie liquide haute pression selon le mode en phase inverse (RP-HPLC). Cette méthodologie a préalablement été calibrée et fait l'objet de plusieurs études qui ont démontré sa pertinence pour isoler des composés actifs au sein de matrice environnementales (Creusot et al. 2013, Creusot et al. 2014). Ce fractionnement a été réalisé sur le sédiment ITN présentant une activité glucocorticoïde a conduit à 40 fractions dont l'activité GR a été mesurée par bioessai (Figure 13).

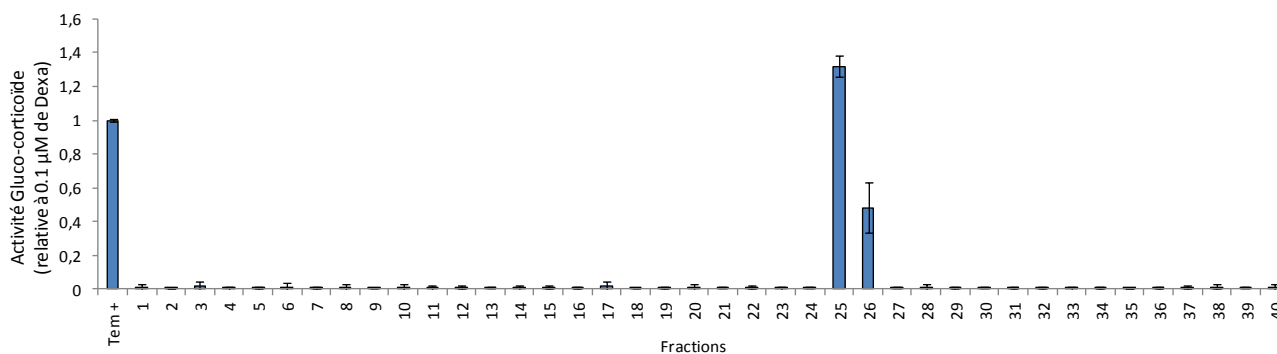


Figure 13 : Isolement de l'activité glucocorticoïde au sein du sédiment ITN après fractionnement par RP-HPLC. (Tem+ = témoin positif)

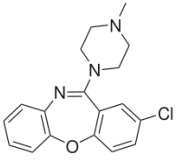
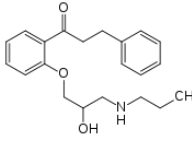
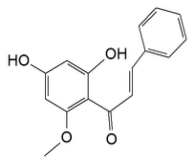
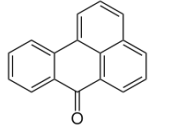
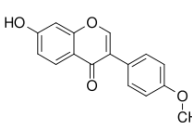
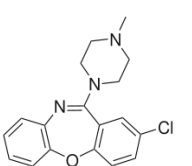
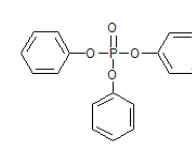
Parmi les 40 fractions de l'extrait initial, seules 2 fractions adjacentes (F25 et F26) présentaient une activité glucocorticoïdes suggérant que les composés responsables de cette activité avaient des propriétés physico-chimique proches. Afin d'identifier ces composés, nous avons entrepris des analyses par chromatographie liquide ultra-haute performance couplé à un spectromètre de masse à temps de vol (UHPLC-QTOF) permettant une acquisition du signal en haute résolution (HR-MS).

4.2.2 IDENTIFICATION DE CANDIDATS PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE HAUTE RÉOLUTION

D'un point de vue strictement méthodologique, ces analyses ont été réalisées selon différents modes d'injection et d'acquisition du signal de manière à disposer du plus grand nombre de candidats potentiels à l'identification structurale. Ainsi, tous les échantillons et les blancs ont été injectés en mode MS/MS en mode négatif puis en mode positif. Le mode MS/MS du LC/QTOF implique une alternance entre le mode MS et le mode MS/MS. Ainsi, lors de chaque cycle, les 2 ions les plus abondants du mode MS sont sélectionnés par l'instrument et fragmentés avec 3 énergies de collision (10, 20 et 40 eV) (il est indiqué au préalable au système les ions provenant de la contamination du système afin qu'il ne les prenne pas en compte pour la fragmentation). Ce mode permet ainsi de générer des données de fragmentation qui peuvent être comparées à des bases de données afin de faciliter l'interprétation des résultats obtenus. La base de données Metlin_AMRT_PCDL a été utilisée. Cette base contient à peu près 60 000 composés avec, pour à peu près 20% d'entre eux, des spectres de fragmentation. Selon la classification proposée par Schymanski et al (2014), ce type de comparaison permet de classer à un degré 2 de certitude la nature des composés détectés (niveau 5 : seule la masse est connue ; niveau 4 : la formule moléculaire est déterminée ; niveau 3 : une structure est proposée ; niveau 1 : confirmation de la nature de la substance par injection d'étalon). Certaines identifications proposées par le logiciel et basées sur un seul fragment n'ont pas été retenues. De même, certains composés ont été également retrouvés dans des blancs d'injections et n'ont pas été retenus. Un score d'identification est calculé par le logiciel de traitement du signal en comparant les spectres expérimentaux et ceux contenus dans la base de données spectrales.

Sur la base de ces méthodes, plusieurs molécules candidates ont été identifiées. Elles sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Candidats identifiés dans les fractions F25 et F26 du sédiment ITN

	Mode ionisation	Composés	Formule	Masse	Score	CAS	Structure
F25	Négative	-	-	-	-	-	-
	Positive	Loxapine	C ₁₈ H ₁₈ ClN ₃ O	327,1142	96,24	1977-10-2	
		Propafenone	C ₂₁ H ₂₇ NO ₃	341,1995	99,45	54063-53-5	
		Cardamonin	C ₁₆ H ₁₄ O ₄	270,0897	84,37	19309-14-9	
		Benzanthrone	C ₁₇ H ₁₀ O	230,0736	95,46	82-05-3	
		Formononetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	268,0737	85,83	485-72-3	
F26	Négative	-	-	-	-	-	-
	Positive	Loxapine	C ₁₈ H ₁₈ ClN ₃ O	327,1143	96,05	1977-10-2	
		Triphenylphosphate	C ₁₈ H ₁₅ O ₄ P	326,0714	92,84	115-86-6	

Parmi ces candidats, dont la présence réelle au sein de l'échantillon reste à être confirmée, aucun n'est décrit comme glucocorticoïde. Par ailleurs, à l'exception du formononetin, un phytoestrogène, aucun ne présente de structure stéroïdienne. La détection du triphénylphosphate est intéressante. Il s'agit d'un retardateur de flamme connu pour interagir avec différents récepteurs nucléaires (ER, PXR) et dont l'occurrence en tant que contaminant émergent des systèmes aquatiques est de plus en plus démontrée.

A ce stade de l'étude, et pour pouvoir conclure définitivement sur la liste des molécules identifiées, il s'agira d'obtenir des molécules pures auprès de sources commerciales afin d'évaluer leur activité dans notre bioessai et statuer sur leur contribution à la forte activité GR mesurée dans les fractions 25 et 26. En parallèle, en l'absence de molécules disponibles commercialement, l'utilisation d'un modèle *in silico* de type QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) basé sur le récepteur des glucocorticoïdes pourrait permettre de sélectionner dans cette liste les candidats qui pourraient potentiellement activer le récepteur GR et dont la présence réelle devrait être confirmée.

5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude décrit la mise en œuvre d'une approche bio-analytique intégrant un panel de bioessais *in vitro* et *in vivo* en combinaison avec des analyses chimiques pour caractériser la contamination de sédiments de rivières par des composés de type perturbateurs endocriniens et dioxin-like. La démarche mise en œuvre est une approche multi-étapes, visant à adresser différents challenges actuels liés à la surveillance de ce type de contaminants émergents. Elle est synthétisée dans la Figure 14.

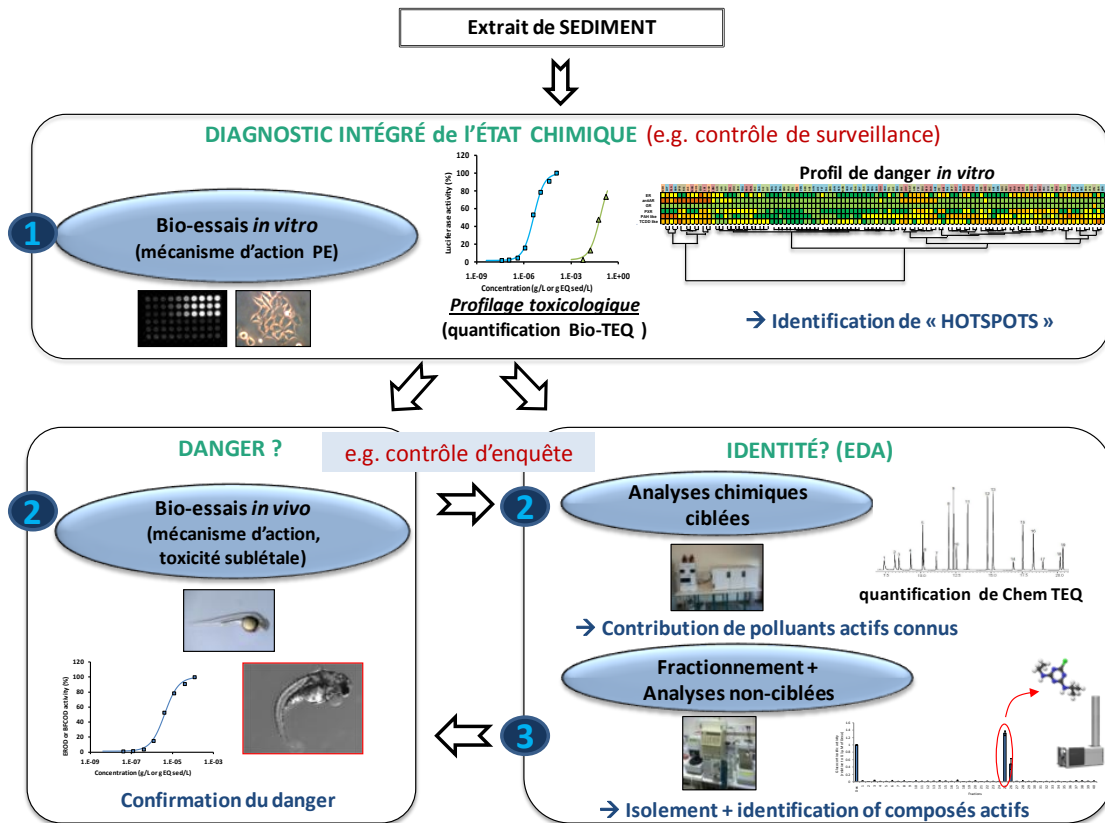


Figure 14 : Démarche bio-analytique globale développée dans cette étude et appliquée aux 120 sédiments de l'étude prospective 2012.

Ce travail a permis de réaliser plusieurs avancées significatives dans l'évaluation de la mise en œuvre de ces outils dans une optique de surveillance de ces contaminants. Elle a notamment permis de montrer :

- l'opérationnalité des outils *in vitro* pour la surveillance et la hiérarchisation de sites : établissement de profils de contamination sur la base de valeurs quantitatives, transformation des données vers des classes (code couleur) utile pour les gestionnaires ;

- l'opérationnalité de la démarche *vitro / vivo* pour le diagnostic de danger PE dans le compartiment sédiment : le modèle embryon de poisson s'avère un outil de criblage efficace (rapide et quantitatif) et pertinent du point de vue toxicologique;
- l'intérêt de l'approche mass-balance pour évaluer la contribution des polluants prioritaires dans les effets observés : les résultats confortent l'apport supplémentaire des bioessais et confirme les limites de l'approche analytique ciblant une liste définie des substances prioritaires pour décrire l'état de contamination du milieu;
- l'intérêt de l'EDA pour isoler les contaminants actifs majoritaires en vue de leur identification : le travail réalisé avec les composés glucocorticoïdes est novateur et offre des perspectives encourageantes sur la description de nouveaux contaminants dans nos rivières. S'il a permis de dresser une liste de composés candidats, il n'a pas permis à ce jour de conclure définitivement quant à leur contribution effective aux activités détectées dans le milieu.

Cette étude a également soulevé des perspectives de travail pour *in fine* asseoir ces nouveaux outils dans la future surveillance des milieux aquatiques. Parmi les points importants, il conviendra d'aborder :

- la **définition de valeurs de référence** pour raffiner les classes de danger *in vitro*. Actuellement, la définition des classes proposées est arbitraire et la question de la pertinence et de leur interprétation en termes de danger avéré pour l'organisme peut se poser. Dans cette optique, une application systématique de l'approche *vitro / vivo*, aux sédiments mais également aux eaux de surface, peut prétendre identifier des valeurs seuils en équivalents-toxiques *in vitro* au-delà desquels un effet *in vivo* sera observé avec une forte probabilité. Ce travail a été amorcé par notre laboratoire en ce qui concerne les activités œstrogéniques d'eaux de surface dans le cadre de projets de recherche européens (FP7-EDA-EMERGE, FP7-SOLUTIONS), ainsi que dans le cadre de la programmation ONEMA-INERIS 2016-2018.
- **Intégration des outils dans le contrôle de surveillance.** Il est admis maintenant que plusieurs des bioessais mis en œuvre sont des outils de criblage performants, potentiellement utilisables en routine. Toutefois, une limite actuelle à leur utilisation est l'absence de méthodes standardisées et de normes qui permettrait leur transfert vers les laboratoires ou structures d'analyses en routine. Les travaux menés dans le cadre d'AQUAREF (action G3b sur les outils biologiques) visent précisément à contribuer à leur validation au niveau européen afin d'aboutir à des méthodes standardisées en ce qui concerne l'activité œstrogénique d'eaux de surface. L'incorporation de ces méthodes dans des programmes de surveillance à l'échelle européenne (NORMAN, Joint Danube Survey, FP7-SOLUTIONS) en interface avec la direction générale de l'environnement de la commission européenne (DG-ENV), ainsi que la normalisation des méthodes (ISO), contribuera également à leur reconnaissance par les instances réglementaires.
- **l'approche EDA** est un outil puissant pour **identifier les substances responsables** des effets et les prioriser ; toutefois elle nécessite une expertise scientifique notamment en identification structurale. Il existe donc un besoin de développer des compétences et de l'expertise dans l'identification chimique (par HR-MS) d'inconnus dans des fractions toxiques. Ce développement passera également par la mise en commun de banques de données de spectrométrie de masse haute résolution. Enfin, pour une application plus routinière de l'EDA, la standardisation et l'automatisation des procédures de fractionnement conduira certainement vers une démocratisation des approches dans un futur proche.

6. VALORISATION

Publications

Creusot N, Devier MH, Budzinski H, Aït-Aïssa S (2015) Evaluation of an extraction method for mixture of endocrine disrupters in sediment using chemical and *in vitro* biological analyses. *Environmental Science and Pollution research*, en révision.

Creusot N, Brion F, Botta F, Lestremau F, Aït-Aïssa S. (in prep) Charaterising sediment organic contamination using *in vitro* and *in vivo* bioassays and target chemical analyses within a national-wide survey. *Manuscrit en préparation pour soumission à ES&T*.

Congrès

Brion F., N. Hinfray, N. Creusot, O. Kah, JM. Porcher and S. Aït-Aïssa. Assessing the estrogenic potency of chemicals, alone or in combination, and complex environmental matrices using a novel transgenic cy19a1b-GFP *in vivo* zebrafish assay (EASZY assay). *24th annual meeting of the SETAC Europe, May 11-15, 2014, Basel, Switzerland* (présentation orale)

Creusot N, Brion F, Lestremau F, Botta F, Feray C, Maillot Maréchal E, Piccini B, Turies C, Porcher JM, Aït-Aïssa S (2015) Bio-analytical strategy based on *in vitro* and *in vivo* bioassays for effect-based monitoring of bioactive organic chemicals in river sediments. *CONTASED2015, Contaminated Sediments: Environmental Chemistry, Ecotoxicology and Engineering, 8-13 March 2015, Ascona, Switzerland* (présentation orale)

Creusot N, Maillot Maréchal E, Botta F, Porcher JM, Aït-Aïssa S (2014) Endocrine disrupting activities profiling of monitored French river sites based on *in vitro* bio-analytical tools. *24th annual meeting of the SETAC Europe, May 11-15, 2014, Basel, Switzerland* (poster)

7. REFERENCES

- Aït-Aïssa, S. (2009). "Outils bio-analytiques in vitro : principe et apports pour la surveillance des contaminants organiques dans le milieu aquatique." Rapport d'étude DRC-08-95306-16732A, convention INERIS-ONEMA..
- 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 INERIS DRC-10-102867-04907A, convention INERIS-ONEMA.
- Aït-Aïssa, S., et al. (2014). "Etude prospective 2012 : Apport des outils biologiques (bioessais et biomarqueurs) pour le diagnostic de la contamination des milieux aquatiques." Rapport final DRC-14-127339-06620A.
- Aït-Aïssa, S. and N. Creusot (2011). "Veille relative aux avancées scientifiques et techniques des approches EDA pour la surveillance des substances émergentes." Rapport INERIS, convention INERIS-ONEMA.
- Altenburger, R., et al. (2015). "Future water quality monitoring — Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management." *Science of The Total Environment* 512–513: 540-551.
- Balaguer, P., et al. (2001). "Reporter cell lines are useful tools for monitoring biological activity of nuclear receptor ligands." *Luminescence* 16: 153-158.
- Botta F et Dulio V (2014) Résultats de l'étude prospective 2012 sur les contaminants émergents dans les eaux de surface continentales de la métropole et de DOM. Rapport final. Rapport INERIS. Juin 2014, 139 pages.
- Brack, W. (2003). "Effect-directed analysis: a promising tool for the identification of organic toxicants in complex mixtures?" *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 377(3): 397-407.
- Brion, F., et al. (2012). "Screening estrogenic activities of chemicals or mixtures in vivo using transgenic (cyp19a1b-GFP) zebrafish embryos." *PloS one* 7(5): e36069.
- Chang, H., et al. (2009). "Determination and Source Apportionment of Five Classes of Steroid Hormones in Urban Rivers." *Environmental Science & Technology* 43(20): 7691-7698.
- Creusot, N., et al. (2012). "Zebrafish embryos as bioanalytical tools for detection of estrogenic and dioxin-like chemicals in environmental matrices." Abstract book of the 22th World SETAC, 20-24 Mai 2012, Berlin.
- Creusot, N., et al. (2014). "BFCOD activity in fish cell lines and zebrafish embryos and its modulation by chemical ligands of human aryl hydrocarbon and nuclear receptors." *Environmental Science and Pollution Research* 22(21):16393-404.
- Creusot, N., et al. (2013). "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., et al. (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.
- Hamers, T., et al. (2010). "Toxicity profiling: An integrated effect-based tool for site-specific sediment quality assessment." *Integrated environmental assessment and management* 6(4): 761-773.
- Houtman, C. J., et al. (2006). "Estrogenic and dioxin-like compounds in sediment from Zierikzee harbour identified with CALUX assay-directed fractionation combined with one and two dimensional gas chromatography analyses." *Chemosphere* 65(11): 2244-2252.
- Kinani, S., et al. (2010). "Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers." *Environmental Pollution* 158(1): 74-83.
- Louiz, I., et al. (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.

- Neale, P. A., et al. (2015). "Linking in Vitro Effects and Detected Organic Micropollutants in Surface Water Using Mixture-Toxicity Modeling." *Environmental Science & Technology*, in press.
- Schriks, M., et al. (2010). "High-Resolution Mass Spectrometric Identification and Quantification of Glucocorticoid Compounds in Various Wastewaters in The Netherlands." *Environmental Science & Technology* 44(12): 4766-4774.
- Schymanski, E. L., et al. (2014). "Strategies to Characterize Polar Organic Contamination in Wastewater: Exploring the Capability of High Resolution Mass Spectrometry." *Environmental Science & Technology* 48(3): 1811-1818.
- Van der Linden, S. C., et al. (2008). "Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays." *Environmental Science & Technology* 42(15): 5814-5820.
- Vondracek, J., et al. (2001). "Monitoring river sediments contaminated predominantly with polycyclic aromatic hydrocarbons by chemical and in vitro bioassay techniques." *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(7): 1499-1506.
- Weiss, J. M., et al. (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.
- Wernersson, A.-S., et al. (2015). "The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive." *Environmental Sciences Europe* 27(1): 7
- Wilson, V. S., et al. (2002). "A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists." *Toxicological Sciences* 66(1): 69-81.

8. LISTE DES ANNEXES

Repère	Désignation	Nombre de pages
Annexe 1	Liste des 120 sites de prélèvement des sédiments de l'étude	3
Annexe 2	Quantification (Bio-TEQ) des activités de type perturbateur endocrinien et dioxin-like des sédiments de l'étude prospective	3
Annexe 3	Activités PE et DL in vivo	1
Annexe 4	Méthodes d'analyses chimiques quantitatives	
Annexe 5	Concentrations sédimentaires en xéno-estrogènes et comparaison avec les activités œstrogéniques <i>in vitro</i> (Chem-TEQ vs. Bio-TEQ)	1
Annexe 6	Concentrations sédimentaires en HAPs et comparaison avec les activités TCDD-like et HAP-like <i>in vitro</i> (Chem-TEQ vs. Bio-TEQ)	2

ANNEXE 1

Liste des 120 sites de prélèvement des sédiments de l'étude

Agence	Code station	Station	Nomenclature rapport
Artois Picardie	01089000	L'YSER À BAMBECQUE (59) *	YSE
	01133000	L'ANCRE À BONNAY (80)	ANC
	01138300	LES ÉVOISSONS À BERGICOURT (80)	EVO
	01016000	L'ESCAUT CANALISÉ À FRESNES SUR ESCAUT (59)	ESC
Seine Normandie	03250430	LA SOULEUVRE A CARVILLE 1 *	SOU
	03271965	L'AIRON A LES LOGES-MARCHIS 2	AIR
	03219780	LA RISLE A AMBENAY 2 *	RIS
	03241957	LE NOIREAU A BERJOU 1	NOI
	03199200	L'ITON A NORMANVILLE 1	ITN
	03197000	L'ITON A CHAISE-DIEU-DU-THEIL 1	ITC
	03032240	LE TRINQUELIN A SAINT-LEGER-VAUBAN 2	<i>Pas de sédiment</i>
	03051500	LE RU D'ANCOEUIL A MOISENAY 1	ANC
	03048000	LA SEINE A SAINT-FARGEAU-PONTHIERRY 1	SFP
	03078110	L'YERRES A COURTOMER 1 *	COU
	03125000	LA SEINE A POISSY 1	SPO
	03094700	LA JOUX A ROCHES-BETTAINCOURT 1	JOU
	03096650	LA CHÉE A MERLAUT 1	CHE
	03104000	LA MARNE A REUIL 1	REUI
	03105500	LA MARNE A MATOUGUES 1 *	MAT
03162000	LA VESLE A CHASSEMY 1	VES	
Adour-Garonne	151100	Le Tarnon en amont de Rousses	TAR
	99170	La Boralde Flaujaguèse en amont d'Espalion	BOR
	142100	Le Tarn à l'aval d'Albi	TAR
	176100	Le Montbrun en amont de Montbrun Bocage	MON
	79100	Le Dropt à Loubens	DRO
	218700	Le Gave de Pau en amont de Gavarnie	<i>Pas de sédiment</i>
	83585	Le Tolzac à Varès	TOL
	212000	Le Gave de Pau du confluent de l'Ousse au confluent du bras	PAU
	216210	Le Gave de Pau à Rieulhes	RIE
	127000	L'Aveyron à Rodez	AVE
	6880	Le Bramerit en aval de Grandjean *	BRA
	15300	Les Eaux Claires de sa source au confluent de la Charente	EAC
	5610	La Légère	LEG
	228500	Le Bergon au niveau de Réans	BER
	223210	Le Luzou de sa source au confluent de la Midouze	LUZ
	158700	L'Aussonnelle à Seilh	AUS
	118000	L'Arrats à St-Antoine	ARR
	156950	L'Hers mort au niveau de St-Sauveur *	HER
	161000	La Garonne en aval de Toulouse	GAR
	153000	La Gimone à Lafitte	GIM
	104000	La Garonne en amont du Lot *	LOT
	25830	Le Colinet (Soptier) en aval de Cézac	COL
	39000	L'Isle à Razac	RAZ
	47000	La Dordogne en aval de Bergerac	DOR
42080	L'Auvézère à Ségur-le-Château *	AUV	
29800	L'Isle à Guitres	GUI	
Loire Bretagne	4004100	LOIRE à BAS-EN-BASSET *	LOB
	4008000	FURAN à ANDREZIEUX-BOUTHEON	FUR
	4009000	LOIRE à VEAUCHETTE *	LOV
	4009250	MARE à GUMIERES	MAG

Agence	Code station	Station	Nomenclature rapport
	4015000	LOIRE à BRIENNON *	LOI
	4019700	BOURBINCE à VITRY-EN-CHAROLLAIS	BOU
	4025040	NIEVRE à DOMPIERRE-SUR-NIEVRE	NIE
	4034650	BEDAT à SAINT-LAURE *	BED
	4037900	DORE à OLLIERGUES *	OLL
	4046545	VAUVISE à JUSSY-LE-CHAUDRIER	VAU
	4050000	LOIRE à JARGEAU	<i>Pas de sédiment</i>
	4050100	OUSSANCE à INGRANNES	OUS
	4068483	LAYON à IVOY-LE-PRE	<i>Pas de sédiment</i>
	4074140	RAU DE LA GROSSE PLANCHE À SAINT-LACTENCIN	RAU
	4082550	CLAIN à ANCHE	CLA
	4085500	CLAIN à NAINTRE	<i>Pas de sédiment</i>
	4119000	SARTHE à ARNAGE *	SAR
	4127000	JOUANNE à FORCE *	JOU
	4134000	LAYON à SAINT-LAMBERT-DU-LATTAY	LAY
	4137050	BOIRE DE LA ROCHE À SAINT-JULIEN-DE-CONCELLES	BOI
	4140020	RAU VRIGNON À SAINT-AUBIN-DES-ORMEAUX	RAU
	4150865	PETITE BOULOGNE à SAINT-ETIENNE-DU-BOIS	PBO
	4160235	LE FOSSE NEUF À PRIN-DEYRANCON	<i>Pas de sédiment</i>
	4164758	RANCE à EREAC	RAN
	4170500	GOUET à SAINT-JULIEN	GOU
	4195690	OUST à LOUDEAC	OUS
	4199370	AFF à PAIMPONT	AFF
	4209990	VILAINE à GUICHEN	<i>Pas de sédiment</i>
	4607001	BARAIZE à SAINT-DENIS-D'ANJOU	BAR
	4134700	LOIRE à MONTJEAN-SUR-LOIRE *	LOM
	Rhin-Meuse	2005700	LA DOLLER A REININGUE
2018780		LA PETITE-FECHT À STOSSWIHR (B)	<i>Pas de sédiment</i>
2037500		LA SOUFFEL A MUNDOLSHEIM	LAS
2058000		LE MADON À XEUILLEY *	MAD
2074000		LA MEURTHE À BOUXIERES	<i>Pas de sédiment</i>
2084000		LA MOSELLE À HAUCONCOURT	MOS
2103800		LA ROSSELLE À PETITE-ROSSELLE	ROS
2107900		LA MEHOLLE À VOID	MEH
Rhone Méditerranée Corse	06172100	Têt à Sainte Marie la Mer	TET
	06580238	Baume à Rosières	BAU
	06194000	Luynes à Aix en Provence	LUY
	06159000	Durance aux Mées	DUR
	06038300	Corne à Saint Rémy	COR
	06074500	Tillet à Aix-les-Bains	TIL
	06404500	Lanterne à Sainte Marie en Chaux	LAN
	06416550	Salon à Chalindrey	SAL
	06416300	Durgeon à Vesoul	DUR
	06189500	Lez à Lattes	LEZ
	06169050	Agulla de la Mar à Alenya	AGU
	06177910	Tréboul à Castelnaudary	TRE
	06035330	Guyotte à St Bonnet en Bresse	GUY
	06127900	Avène à Saint Privat des Vieux	AVE
	06123250	Auzon à Montoux	AUZ
	06107980	Roanne à Saint Benoit en Diois	ROA
06083590	Ain à Sirod	AIN	

Agence	Code station	Station	Nomenclature rapport
	06118550	Luech à Genolhac *	LUE
	06710039	Toulourenc à Saint Leger du Ventoux	TOU
	06016000	Ouche à Crimolois	OUC
	06131550	Rhône à Arles	RAR
	06143650	Vénéon à Saint Christophe en Oisans	VEN
	06083000	Bourbre à Chavanoz	BOU
	06046000	Reyssouze à Viriat	REY
	06098000	Rhône à Chasse sur Rhône	RCR
	06097000	Gier à Givors	GIE
	06146500	Drac à Fontaine	DRA
	06051550	Ardières à Saint Jean d'Ardières	ARD
	06059500	Saône à Lyon	SAO
	06219590	Ru d'Aitone à Evisa	RUA
	06150170	Tagnone à Aleria	TAG

ANNEXE 2

Quantification (Bio-TEQ) des activités de type perturbateur
endocrinien et *dioxin-like* des sédiments de l'étude
prospective

SITES	ACTIVITES PE & Dioxin like					
	ER ng E2-EQ/g	antiAR µg Flu-EQ/g	GR µg Dex-EQ/g	PXR µg SR-EQ/g	AhR 4h µg BaP-EQ/g	AhR 24h ng TCDD-EQ/g
YSE	1,01	25,2	< LOD	10,9	16,3	2,3
ANC	0,39	< LOD	< LOD	7,0	5,0	15,2
EVO	0,38	< LOD	< LOD	5,6	2,8	12,9
ESC	1,24	< LOD	< LOD	14,4	8,4	25,5
SOU	1,26	35,6	< LOD	9,4	15,9	5,4
AIR	0,47	1,16	< LOD	1,2	0,01	0,9
RIS	< LOD	202,0	< LOD	4,3	96,0	69,6
NOI	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	7,0	18,0
ITN	< LOD	< LOD	1,1	< LOD	13,4	51,1
ITC	0,57	< LOD	< LOD	50,9	1,9	9,7
ANC	< LOD	< LOD	< LOD	2,7	3,1	25,5
SFP	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	63,6	7,4
COU	9,33	117,6	< LOD	44,3	59,4	31,8
SPO	< LOD	216,7	< LOD	13,6	22,43	120,8
JOU	< LOD	< LOD	< LOD	2,3	1,15	4,7
CHE	0,66	59,1	< LOD	< LOD	35,0	37,3
REUI	0,01	< LOD	< LOD	< LOD	4,3	20,1
MAT	1,22	65,9	< LOD	0,6	5,1	4,9
VES	0,21	< LOD	< LOD	5,7	6,8	44,0
TAR	0,03	< LOD	< LOD	0,06	9,0	< LOD
BOR	0,96	< LOD	< LOD	7,5	5,39	5,6
TAR	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,2	1,4
MON	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	2,06	2,8
DRO	0,04	< LOD	< LOD	1,0	0,8	3,1
TOL	0,19	< LOD	< LOD	2,2	32,4	1,3
PAU	< LOD	< LOD	< LOD	0,1	< LOD	0,5
RIE	0,06	< LOD	< LOD	0,5	0,7	7,0
AVE	0,24	< LOD	< LOD	11,6	7,1	25,9
BRA	3,63	< LOD	< LOD	2,9	23,1	14,8
EAC	0,07	< LOD	< LOD	3,7	1,1	10,9
LEG	3,67	< LOD	< LOD	3,9	17,9	9,6
BER	< LOD	< LOD	< LOD	0,7	0,2	1,1
LUZ	0,03	< LOD	< LOD	< LOD	23,0	< LOD
AUS	< LOD	< LOD	< LOD	0,5	< LOD	0,8
ARR	0,73	49,1	< LOD	1,9	20,6	< LOD
HER	0,44	2,2	< LOD	0,5	0,8	0,7
GAR	1,61	< LOD	< LOD	1,4	6,04	100,9
GIM	0,05	< LOD	< LOD	0,2	0,01	0,6
LOT	< LOD	< LOD	< LOD	0,2	0,9	6,3
COL	0,03	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
RAZ	1,92	< LOD	< LOD	< LOD	334,2	64,8
DOR	0,09	< LOD	< LOD	< LOD	2,5	1,0
AUV	< LOD	2,2	< LOD	2,2	5,2	1,0
GUI	2,78	< LOD	< LOD	< LOD	310,7	70,1
LOB	< LOD	2,2	< LOD	0,7	22,9	24,1
FUR	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	138,23	22,8
LOV	< LOD	43,0	< LOD	< LOD	81,1	33,5
MAG	0,13	245,0	< LOD	< LOD	79,3	6,9
LOI	3,21	153,3	< LOD	15,0	42,4	13,1
BOU	0,92	< LOD	< LOD	2,0	59,33	4,8
NIE	0,47	< LOD	< LOD	22,4	8,7	2,9

SITES	ACTIVITES PE & Dioxin like					
	ER ng E2-EQ/g	antiAR µg Flu-EQ/g	GR µg Dex-EQ/g	PXR µg SR-EQ/g	AhR 4h µg BaP-EQ/g	AhR 24h ng TCDD-EQ/g
BED	0,59	38,2	< LOD	2,5	11,1	18,1
OLL	< LOD	2,2	< LOD	2,5	4,1	2,4
VAU	1,40	< LOD	< LOD	18,5	1,3	2,1
OUS	0,26	< LOD	< LOD	23,4	347,76	11,0
RAU	0,04	< LOD	< LOD	4,6	3,1	1,7
CLA	0,09	67,3	< LOD	< LOD	482,5	8,4
SAR	< LOD	28,6	< LOD	3,5	39,4	13,2
JOU	< LOD	2,2	< LOD	0,8	12,0	1,5
LAY	< LOD	< LOD	< LOD	0,06	67,06	4,3
BOI	0,73	< LOD	< LOD	36,0	0,41	< LOD
RAU	< LOD	< LOD	< LOD	13,4	2,6	9,7
PBO	0,32	< LOD	< LOD	2,1	89,3	0,2
RAN	0,27	< LOD	< LOD	3,1	7,8	4,6
GOU	0,66	< LOD	< LOD	8,7	5,91	11,0
OUS	1,49	< LOD	< LOD	8,0	6,28	9,8
AFF	1,20	< LOD	< LOD	8,0	15,6	1,1
BAR	0,86	< LOD	< LOD	4,3	4,2	5,2
LOM	0,26	2,2	< LOD	0,4	4,0	2,1
LAS	1,20	192,3	< LOD	0,06	161,0	26,8
MAD	3,45	147,6	< LOD	3,3	56,1	32,8
MOS	0,27	261,6	< LOD	0,06	23,29	63,8
ROS	< LOD	< LOD	< LOD	0,06	0,00	< LOD
MEH	0,50	181,3	< LOD	0,06	699,6	23,9
TET	0,09	< LOD	< LOD	0,06	2,9	1,6
BAU	< LOD	< LOD	< LOD	0,06	6,1	0,9
LUY	0,73	242,6	< LOD	0,06	701,9	41,3
DUR	0,16	126,9	< LOD	0,06	556,5	15,5
COR	< LOD	< LOD	< LOD	0,06	184,4	94,1
TIL	< LOD	< LOD	< LOD	0,06	3,2	1,9
LAN	0,05	< LOD	< LOD	0,2	2,1	1,3
SAL	0,07	< LOD	< LOD	0,06	3,0	1,8
DUR	0,06	< LOD	< LOD	0,1	10,7	2,5
LEZ	3,76	< LOD	< LOD	0,06	115,6	10,5
AGU	< LOD	< LOD	< LOD	0,06	12,6	1,1
TRE	0,26	< LOD	< LOD	0,06	53,4	2,8
GUY	< LOD	< LOD	< LOD	0,06	0,43	1,7
AVE	< LOD	< LOD	< LOD	0,06	0,00	24,3
AUZ	< LOD	27,4	< LOD	0,06	67,2	5,2
ROA	< LOD	< LOD	< LOD	0,06	8,9	1,3
AIN	< LOD	< LOD	< LOD	0,8	3,9	< LOD
LUE	0,06	< LOD	< LOD	0,6	3,5	1,0
TOU	0,10	< LOD	< LOD	1,5	3,9	1,9
OUC	2,49	< LOD	< LOD	0,8	43,8	25,9
RAR	0,16	< LOD	< LOD	0,5	1,1	5,6
VEN	< LOD	< LOD	< LOD	0,06	0,01	< LOD
BOU	0,05	< LOD	< LOD	0,1	19,4	2,6
REY	3,31	< LOD	< LOD	0,06	343,9	13,8
RCR	< LOD	< LOD	< LOD	0,06	0,4	3,1
GIE	< LOD	< LOD	< LOD	0,6	164,5	43,2
DRA	< LOD	< LOD	< LOD	0,06	2,6	< LOD
ARD	< LOD	< LOD	< LOD	0,06	1,25	2,4

SITES	ACTIVITES PE & Dioxin like					
	ER ng E2-EQ/g	antiAR µg Flu-EQ/g	GR µg Dex-EQ/g	PXR µg SR-EQ/g	AhR 4h µg BaP-EQ/g	AhR 24h ng TCDD-EQ/g
SAO	0,05	< LOD	< LOD	0,06	65,0	1,8
RUA	< LOD	< LOD	< LOD	0,5	0,2	< LOD
TAG	< LOD	< LOD	< LOD	0,3	0,1	< LOD

ANNEXE 3

Activités PE et DL *in vivo*

**Activités œstrogénique et dioxin-like *in vivo* détectées par bioessais sur
embryon de poisson zèbre**

Site	Activité œstrogénique (+/-)	Activité dioxin-like (ng TCDD-EQ/g sed)
AUV	-	0,6
HER	-	0,1
BRA	-	1,6
JOU	-	0,4
SAR	-	1,5
LOM	-	0,2
LOB	-	1,5
LOI	-	1,7
OLL	-	0,5
LOV	-	2,1
BED	-	1,8
YER	-	2,1
SOU	-	0,9
CHE	-	1,8
RIS	-	7,1
LUE	-	0,3
YSE	-	2,0
LAS	n.i	3,1
MEH	n.i	2,8
CLA	n.i	0,9
GUI	n.i	8,9
RAZ	n.i	15,5
OUS	n.i	3,6
LEG	n.i	1,2
ITC	n.i	6,2
DOR	n.i	0,3
VAU	n.i	0,8
ESC	n.i	30,0
MAD	-	0,6
GAR	n.i	1,6

n.i. , non investigué

ANNEXE 4

Méthodes d'analyses chimiques quantitatives

Analyse par GC/MS

Les analyses en GC/MS ont été effectuées sur un GC/MS trappe d'ions (Varian) Elles ont été basées sur la publication suivante :

S. Kinani, S. Bouchonnet, S. Bourcier, N. Creusot, J.M. Porcher, S. Aït-Aïssa, Extraction and purification procedures for simultaneous quantification of phenolic xenoestrogens and steroid estrogens in river sediment by gas chromatography/ion trap mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2008; 22: 3651–3661

L'extraction était effectuée sur une prise d'essai de sédiments entre 0,5 et 1 g par ultrasons avec un mélange hexane/acétone (2 :1, v/v). Une étape de purification était ensuite mise en œuvre par le biais d'une cartouche C18 en série avec une cartouche de Florisil. Les extraits étaient ensuite mis à sec puis repris et dérivatisés avec un mélange BSTFA/TMCS/pyridine (49:1:50, v/v/v). Après chauffage à 75°C pendant 45 min, les extraits étaient ramenés à température ambiante puis injectés et analysés par GC/MS. Les Limites de quantification pour 1g de sédiments de prise d'essai sont présentées dans le tableau ci-dessous.

	LQ	
4-n-Butoxyphénol	0,4	ng/g
4-tert-Octylphénol	0,4	ng/g
n-Propylparaben	0,4	ng/g
n-ButylParaben	0,4	ng/g
Pentachlorophénol	0,4	ng/g
4-n-Nonylphénol (linéaire)	0,4	ng/g
Coupe des 4-NP	18,0	ng/g
2-Hydroxyfluorène	0,4	ng/g
2,4-Dihydroxybenzophénone	0,4	ng/g
Bisphénol-A	0,4	ng/g
Benzylparaben	0,4	ng/g
Diethylstilbestrol	0,4	ng/g
Tétrahydroxybenzophénone	0,4	ng/g
2,4,4'-Trihydroxybenzophénone	1,8	ng/g
1-Hydroxypyrrène	0,4	ng/g
alpha-Estradiol	0,4	ng/g
beta-Estradiol	0,4	ng/g
Estrone	0,4	ng/g
Mestranol	0,9	ng/g
Ethinylestradiol	0,4	ng/g
Estriol	0,4	ng/g

Analyse par LC/MS/MS

Les analyses ciblées ont été effectuées avec un système UHPLC/MS/MS (Acquity, Waters®) en mode MRM (Multiple reaction monitoring).

Analyse des glucocorticoïdes

Une colonne C18 Kinetex (2.6 µm, 10*2.1 mm, Phenomenex) a été utilisée avec une phase mobile constituée de méthanol et d'eau avec 0.1% d'acide formique. L'analyse était effectuée en mode négatif.

Les limites de quantification instrumentales (en µg/L) sont présentées dans le tableau ci-dessous.

	LQ
Prednisone	25
Cortisone	25
Hydrocortisone	25
Prednisolone	25
Dexamethasone	25
6-alpha-methylprednisolone	25
Triamcinolone acetonide	250
Desoximethazone	100

Analyse par LC/fluorescence

Les HAP ont été analysés par LC avec une détection par fluorescence avec un système UHPLC UltiMate3000 (Dionex).

La colonne utilisée est une Supelcosil LC-HAP (phase C18 (150*2.1, 3 µm, Supelco) La phase mobile est constituée d'eau et d'acétonitrile.

Les limites de quantifications instrumentales sont présentées ci-dessous.

	LQ (µg/L)
Naphtalène	10
Acénaphène	10
Fluorène	10
Phénanthrène	20
Anthracène	20
Pyrène	20
B(a)A	10
Chrysène	10
B(b)F	10
B(k)F	10
B(a)P	10
D(a,h)P	10
B(g,h,i)P	10
Fluoranthène	20
B(j)F	10
Indéno	10

ANNEXE 5

Concentrations sédimentaires en xéno-estrogènes et
comparaison avec les activités œstrogéniques in vitro (Chem-
TEQ vs. Bio-TEQ)

Concentrations (ng/g sed) des différents composés œstrogéniques dans les extraits de sédiments et leur contribution à l'activité œstrogénique globale (Bio-TEQ).

Composés ciblés	ESC		VAU		OUS		LEG		GAR		RAZ		GUI		OUC		REY		
	E2-EF	Ci	ChemTEQ	Ci	ChemTEQ	Ci	ChemTEQ	Ci	ChemTEQ	Ci	ChemTEQ	Ci	ChemTEQ	Ci	ChemTEQ	Ci	ChemTEQ	Ci	ChemTEQ
4-n-Butoxyphénol		<1.7		<0.4		<0.9		<0.6		<0.9		<0.6		<0.6		<0.6		<0.4	
4-tert-Octylphénol	1,1E-04	22,4	2,5E-03	6,1	6,7E-04	9,6	1,1E-03	11,5	1,3E-03	<0.9	2,9	3,2E-04	<0.6	9,5	1,0E-03	<0.4			
n-Propylparaben	7,4E-06	<1.7		<0.4		<0.9		0,6	4,2E-06	<0.9	<0.6		<0.6	1,2	9,2E-06	<0.4			
n-ButylParaben	4,9E-06	<1.7		<0.4		<0.9		<0.6		<0.9	<0.6		<0.6	<0.6	<0.4				
Benzylparaben	6,6E-06	<1.7		<0.4		<0.9		<0.6		<0.9	<0.6		<0.6	<0.6	<0.4				
2,4-Dihydroxybenzophénone		<1.7		<0.4		<0.9		<0.6		<0.9	<0.6		<0.6	<0.6	<0.4				
Tétrahydroxybenzophénone		<1.7		<0.4		<0.9		<0.6		<0.9	<0.6		<0.6	<0.6	<0.4				
2,4,4'-Trihydroxybenzophénone		<8.4		<2.1		<4.3		<2.8		<4.6	<0.6		<3.1	<0.6	<0.4				
Bisphénol-A	4,5E-05	18,6	8,4E-04	<0.4		<0.9		<0.6		<0.9	<0.6		<0.6	16,5	7,4E-04	0,5	2,4E-05		
4-n-Nonylphénol (linéaire)	3,3E-06	<4.8		<1.2		<2.4		<1.6		<2.6	<1.7		<1.8	<1.7	<1.0				
Coupe des 4-NP	3,3E-06	2895,9	9,6E-03	467,5	1,5E-03	985,0	3,3E-03	626,5	2,1E-03	635,0	2,1E-03	82,1	2,7E-04	<90	403,0	1,3E-03	<51		
2-Hydroxyfluorène	6,3E-06	2,5	1,6E-05	<0.4		<0.9		<0.6		<0.9	0,9	5,7E-06	<0.6	0,6	3,9E-06	<0.4			
1-Hydroxypyrene	9,9E-07	42,5	4,2E-05	<1.6		<3.2		<2.1		<3.4	6,2	6,1E-06	<2.3	5,8	5,8E-06	4,4	4,3E-06		
Diethylstilbestrol	1,7E-01	<5.1		<1.3		<2.6		<1.7		<2.8	<1.8		<1.9	<1.9	<1.1				
alpha-Estradiol	2,0E-02	<1.7		<0.4		<0.9		<0.6		<0.9	<0.6		<0.6	<0.6	<0.4				
beta-Estradiol	1,0E+00	<1.7		<0.4		<0.9		<0.6		<0.9	<0.6		<0.6	<0.6	<0.4				
Estrone	2,0E-02	8,4	1,7E-01	<0.4		<0.9		2,7	5,4E-02	<0.9	<0.6		<0.6	<0.6	<0.4				
Mestranol	2,0E-02	<4.2		<1.1		<2.1		<1.4		<2.3	<1.5		<1.6	<1.6	<0.9				
Ethinylestradiol	9,3E-01	<0.4		<0.4		<0.9		<0.6		<0.9	<0.6		<0.6	<0.6	<0.4				
Estriol	1,7E-01	<0.4		<0.4		<0.9		<0.6		<0.9	<0.6		<0.6	<0.6	<0.4				
Σ ChemTEQ			1,8E-01		2,2E-03		4,3E-03		5,7E-02		2,1E-03		6,0E-04		0,0E+00		3,1E-03		2,9E-05
BioTEQ			1,24		0,46		1,19		3,67		0,63		1,92		2,78		2,5E+00		3,31
% Chem/Bio			14,7%		0,5%		0,4%		1,6%		0,3%		0,0%		0,0%		0,1%		0,0%

ANNEXE 6

Concentrations sédimentaires en HAP et comparaison avec les activités TCDD-like et HAP-like in vitro (Chem-TEQ vs. Bio-TEQ)

Tableau : Concentrations (ng/g sed) en HAPs dans les extraits de sédiments et leur contribution à l'activité dioxin-like globale (Bio-TEQ).

TCDD-EF	LEZ		MEH		LAS		RAZ		LUY		GIE		REY		DUR		GUI		CLA		SPO		FUR		OUS		GAR		COR		
	Ci	Chem-TEQ	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	
Naphtalène	<LQ		<LQ		<LQ		<LQ		<LQ		<LQ		<LQ		<LQ		<LQ		<LQ		80,0		15,7		0,0		0,0		6,6		
Acénaphène	2.51		2.84		1.92		13.3		9.63		2.50		5.76		<LQ		18.7		<LQ		83,0		22,9		0,0		0,0		20,5		
Fluorène	20.3		9.23		5.14		48.9		26.4		45.4		60.2		<LQ		107		12.7		112,4		117,1		0,0		5,7		64,7		
Phénanthrène	322		575		116		1368		484		925		1908		114		2483		336		685,6		1058,6		73,3		90,0		1118,9		
Anthracène	59.8		79.3		14.5		320		65.2		233		550		5.28		286		43.7		182,4		124,0		0,0		17,9		179,7		
Fluoranthène	908		1532		373		1775		863		1057		3680		128		2780		943		1431,1		831,9		154,6		264,5		2368,3		
Pyrène	4,E-05	859	0,03	1299	0,05	332	0,01	1450	0,06	956	0,04	749	0,03	2900	0,11	117	0,00	2400	0,09	700	0,03	1121,9	0,04	630,6	0,02	116,7	0,00	225,8	0,01	1781,4	0,07
B(a)A	1,E-04	515	0,05	754	0,07	184	0,02	1278	0,12	458	0,04	565	0,06	2458	0,24	77,3	0,01	2141	0,21	522	0,05	693,5	0,07	357,0	0,03	53,8	0,01	127,3	0,01	905,8	0,09
Chrysène	4,E-04	474	0,18	685	0,26	194	0,07	971	0,37	504	0,19	601	0,23	2527	0,95	93,9	0,04	2091	0,79	482	0,18	1038,3	0,39	714,9	0,27	106,7	0,04	222,1	0,08	1906,6	0,72
B(b)F	5,E-04	556	0,26	735	0,34	229	0,11	1212	0,56	637	0,29	658	0,30	2644	1,22	86,7	0,04	2216	1,03	572	0,26	858,5	0,40	648,3	0,30	95,0	0,04	167,0	0,08	975,4	0,45
b(k)F	4,E-03	253	1,07	356	1,51	105	0,44	591	2,50	223	0,94	248	1,05	1346	5,69	36,7	0,16	1060	4,48	242	1,02	435,6	1,84	211,6	0,90	40,8	0,17	79,3	0,34	430,0	1,82
B(a)P	5,E-04	508	0,26	714	0,37	204	0,10	1266	0,65	565	0,29	559	0,29	2965	1,52	81,8	0,04	2289	1,17	599	0,31	919,1	0,47	472,9	0,24	121,3	0,06	179,4	0,09	961,7	0,49
D(a,h)A	6,E-03	110	0,67	157	0,96	43,6	0,27	298	1,82	167	1,02	130	0,79	718	4,39	8,32	0,05	565	3,45	115	0,70	167,8	1,03	73,0	0,45	0,0	0,00	27,0	0,17	114,9	0,70
B(g,h,i)P		560	0,00	598	0,00	183	0,00	1318	0,00	77,6	0,00	395	0,00	1977	0,00	3,82	0,00	2660	0,00	312	0,00	604,8	0,00	371,6	0,00	110,4	0,00	145,4	0,00	563,9	0,00
In(1,2,3,c,d)P	2,E-03	447	0,73	576	0,94	165	0,27	1030	1,69	269	0,44	199	0,33	2318	3,80	11,2	0,02	1928	3,16	191	0,31	894,4	1,47	427,6	0,70	172,9	0,28	154,6	0,25	7690,0	12,61
ΣChemTEQ		3,3		4,5		1,3		7,8		3,3		3,1		17,9		0,4		14,4		2,9		5,7		2,9		0,6		1,0		17,0	
BioTEQ		10,5		23,9		26,8		64,8		41,3		43,2		13,8		15,5		70,1		8,4		120,8		22,8		11,0		100,9		94,1	
%chem/bio		31%		19%		5%		12%		8%		7%		130%		2%		21%		34%		5%		13%		6%		1%		18%	

TCDD-EF, activité relative individuel (EC25 TCDD/ EC25 Composé i) ; Ci, Concentration du composé i ; Chem, Chem TCDD-EQ ; %

Tableau : Concentrations (ng/g sed) en HAPs dans les extraits de sédiments et leur contribution à l'activité HAP-like globale (Bio-TEQ).

	BaP-EF	LEZ		MEH		LAS		RAZ		LUY		GIE		REY		DUR		GUI		CLA		SPO		FUR		OUS		GAR		COR	
		Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem	Ci	Chem
Naphtalène		<LQ		<LQ		<LQ		<LQ		<LQ		<LQ		<LQ		<LQ		<LQ		<LQ		80,0		15,7		<LQ		<LQ		6,6	
Acénaphène		0,00		0,00		0,00		0,01		0,01		0,00		0,01		<LQ		0,02		<LQ		0,08		0,02		<LQ		<LQ		0,02	
Fluorène	0,0144	0,02	0,0003	0,01	0,0001	0,01	0,0001	0,05	0,0007	0,03	0,0004	0,05	0,0007	0,06	0,0009	<LQ		0,11	0,002	0,01	0,0002	0,11	0,002	0,12	0,002	0,00		0,01	0,0001	0,06	0,001
Phénanthrène		0,32		0,58		0,12		1,37		0,48		0,93		1,91		0,11		2,48		0,34		0,69		1,06		0,07		0,09		1,12	
Anthracène		0,06		0,08		0,01		0,32		0,07		0,23		0,55		0,01		0,29		0,04		0,18		0,12		0,00		0,02		0,18	
Fluoranthène		0,91		1,53		0,37		1,78		0,86		1,06		3,68		0,13		2,78		0,94		1,43		0,83		0,15		0,26		2,37	
Pyrène	3,6E-03	0,86	0,003	1,30	0,005	0,33	0,00	1,45	0,01	0,96	0,00	0,75	0,00	2,90	0,01	0,12	0,00	2,40	0,01	0,70	0,00	1,12	0,00	0,63	0,00	0,12		0,23		1,78	
B(a)A	0,258	0,52	0,13	0,75	0,19	0,18	0,05	1,28	0,33	0,46	0,12	0,57	0,15	2,46	0,63	0,08	0,02	2,14	0,55	0,52	0,13	0,69	0,18	0,36	0,09	0,05		0,13		0,91	0,23
Chrysène	0,292	0,47	0,14	0,69	0,20	0,19	0,06	0,97	0,28	0,50	0,15	0,60	0,18	2,53	0,74	0,09	0,03	2,09	0,61	0,48	0,14	1,04	0,30	0,71	0,21	0,11		0,22	0,06	1,91	0,56
B(b)F	0,694	0,56	0,39	0,74	0,51	0,23	0,16	1,21	0,84	0,64	0,44	0,66	0,46	2,64	1,83	0,09	0,06	2,22	1,54	0,57	0,40	0,86	0,60	0,65	0,45	0,10	0,07	0,17	0,12	0,98	0,68
b(k)F	2,9	0,25	0,73	0,36	1,03	0,11	0,30	0,59	1,71	0,22	0,65	0,25	0,72	1,35	3,90	0,04	0,11	1,06	3,07	0,24	0,70	0,44	1,26	0,21	0,61	0,04	0,12	0,08	0,23	0,43	1,25
B(a)P	1	0,51	0,51	0,71	0,71	0,20	0,20	1,27	1,27	0,57	0,57	0,56	0,56	2,97	2,97	0,08	0,08	2,29	2,29	0,60	0,60	0,92	0,92	0,47	0,47	0,12	0,12	0,18	0,18	0,96	0,96
D(a,h)A	3,66	0,11	0,40	0,16	0,57	0,04	0,16	0,30	1,09	0,17	0,61	0,13	0,48	0,72	2,63	0,01	0,03	0,57	2,07	0,12	0,42	0,17	0,61	0,07	0,27	0,00	0,00	0,03	0,10	0,11	0,42
B(g,h,i)P		0,56	0,00	0,60	0,00	0,18	0,00	1,32	0,00	0,08	0,00	0,40	0,00	1,98	0,00	0,00	0,00	2,66	0,00	0,31	0,00	0,60	0,00	0,37	0,00	0,11	0,00	0,15	0,00	0,56	0,00
In(1,2,3,c,d)P	0,843	0,45	0,38	0,58	0,49	0,17	0,14	1,03	0,87	0,27	0,23	0,20	0,17	2,32	1,95	0,01	0,01	1,93	1,63	0,19	0,16	0,89	0,75	0,43	0,36	0,17	0,15	0,15	0,13	7,69	6,48
Σ ChemTEQ		2,7		3,7		1,1		6,4		2,8		2,7		14,7		0,3		11,8		2,6		4,6		2,5		0,5		0,8		10,6	
BioTEQ		115,6		699,6		161,0		334,2		701,9		164,5		343,9		556,5		310,7		482,5		22,4		138,2		347,8		6,0		184,4	
%chem/bio		2%		1%		1%		2%		0%		2%		4%		0%		4%		1%		21%		2%		0%		14%		6%	

TCDD-EF, activité relative individuel (EC25 TCDD/ EC25 Composé i) ; Ci, Concentration du composé i ; Chem, Chem TCDD-EQ ;