

# Intersol 16 mars 2016 - Lille

## Polluants prioritaires et émergents : présence et impacts, analyses chimiques vs. Bioessais



Magali RIOU (Air-Santé-Odeur, Tauw France)

Matthijs BOUWKNEGT, Sébastien KASKASSIAN



**Tauw**



# Polluants organiques persistants



- Substances :

- Toxiques
- Persistantes
- Bioaccumulation et bioamplification
- Pouvant de déplacer sur de longues distances



**2004:** 12 substances listées:

Pesticides: Aldrin, Chlordane, DDT, Dieldrin, Endrin, Heptachlor, Mirex, Toxaphene

Industrial chemicals: Hexachlorobenzene, PCBs

Un-intentionally produced POPs PCDD/ PCDF ('dioxin')

**2009-2013:** 11 POPs ajoutées:

HCH isomers (-> more focus on stockpiles of waste isomers, a number of brominated flame retardants and PFOS



**Tauw**

Règlement Pop CE n° 850/2004

# Les polluants émergents



## Plus de 1000 polluants émergents listés :

- Détectés dans l'environnement mais qui ne sont pas encore recherchés en routine au niveau européen et qui de fait se trouvent peu documentés sur le comportement et les effets (éco)toxicologiques
  - S'ils sont caractérisés par des effets néfastes : polluants émergents
    - Exemple dans les surfactants, retardateur de flamme, produits pharmaceutiques et cosmétiques, additifs essence, biocides, pesticides : suspectés ou avérés perturbateurs endocriniens (PE)



Tauw

# Un sujet d'actualité



## Information grand public

- **Enquête de l'Obs** : ENQUÊTE EXCLUSIVE. Votre enfant est-il pollué ? Octobre 2015 L'Obs" a fait analyser 63 mèches de cheveux d'un panel d'enfants de moins de 12 ans. Résultat : les perturbateurs endocriniens, des substances chimiques qui dérèglent les hormones, s'y bousculent !
- **Reportage Cash Investigations France 2 (2/02/16)**  
Produits chimiques : nos enfants en danger
- **Enquête UFC** : Substances préoccupantes dans 185 produits cosmétiques ; 22 février 2016

## Information industriels

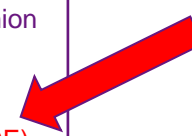
- **MEDDE** : les polluants organiques persistants : des substances à identifier pour pouvoir les éliminer – oct 2015



# Exemples de familles de molécules à effet perturbateur endocrinien et leurs sources potentielles



Exemples de familles de molécules à effet perturbateur endocrinien et leurs sources potentielles		
Famille chimique	Sources potentielles	Exemples
Phtalates	Plastiques, cosmétiques	Dibutyl phtalate
Alkylphénols	Détergents, plastiques, pesticides	Nonylphenol
Hydrocarbures aromatiques Polycycliques (HAP)	Sources de combustion: fumée de cigarette, émission des moteurs diesels, incendies	Benzo(a)pyrène
Polychlororbyphényles (PCB)	Transformateurs électriques	PCB, Arochlor
Anciens pesticides	Résiduels de stockage, pollution rémanente	DDT, Dieldrine, Chlordane
Autres pesticides	Agriculture, nettoyages urbains, jardins particuliers	Atrazine, Ethylène thiourée, Heptachlor, Lindane, Malathion
Retardateurs de flamme	Mousses pour les mobiliers, tapis, équipements électroniques	Polybromodiphényles (PBDE)
Dérivés phénoliques	Désinfectants, plastiques, cosmétiques	Bisphénol A, Parabens, Halogéno-phénols



Tauw

Source : Expertise collective AFSSET INSERM, 2008: Cancer et environnement.

## Exemple de polluants émergents : les Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)



- Les PBDE représentent un groupe de produits chimiques industriels largement utilisés comme retardateurs de flamme depuis les années 70
- Certains PBDE comme le pentaBDE ont des caractéristiques de POP et sont interdits par la convention de Stockholm
- Il existe des exceptions pour les articles fabriqués à partir de recyclage pouvant contenir des PBDE...
- La production totale de tous les PBDE de 1970 à 2005 est estimée entre 1.300.000 and 1.500.000 tonnes
- Cette production se retrouvera (mis à part dans les sites d'enfouissement et d'incinération) vers les réservoirs de « recyclage » des E-déchets : DEEE



**Tauw**



# Etude Ineris – Onema

## Matrice eaux

*Etude sur les contaminants émergents  
dans les eaux françaises*



Fréquence de quantification	Catégorie	Paramètre	Code CAS	Nb analyses	Fréquence de quantification	Conc. Max (µg/L)
> 99%	Produits de soins corporels	Ethyl-parabène	120-47-8	336	100%	0,4
	Plastifiants	Diisobutyl phthalate	84-69-5	330	99,7%	16,1
	Produits de soins corporels	Propyl-parabène	94-13-3	336	99,7%	0,4
	Produits de soins corporels	Méthyl-parabène	99-76-3	336	99,1%	1,03
Entre 99% et 50%	Plastifiants	Diéthyl phthalate	84-66-2	330	82,4%	10,89
	Plastifiants	n-Butyl Phthalate	84-74-2	330	78,2%	2,09
	Pesticides (metabolites)	Métolachlore ESA	171118-09-5	330	77,3%	0,98
	Plastifiants	Bisphenol A	80-05-7	331	86,5%	11,6
	Médicaments	Carbamazepine	298-46-4	336	72%	0,54
	Pesticides (metabolites)	Métolachlore OXA	152019-73-3	330	71,5%	1,62
	Médicaments	Acide niflumique	4394-00-7	331	66,5%	1,53
	Médicaments	Oxazepam	604-75-1	336	62,2%	2,01
	Médicaments	Ketoprofene	22071-15-4	336	52,9%	0,57
Entre 50% et 10%	Pesticides	Carbendazime	10605-21-7	336	49,4%	0,17
	Médicaments	Sulfamethoxazole	723-46-6	326	39,2%	0,08
	Additifs d'essence	Plomb diethyl	24952-65-6	229	38,8%	0,02
	Médicaments	Ofloxacin	82419-36-1	336	24,1%	0,90
	Pesticides	Acétochlore	34256-82-1	336	20,5%	0,90
	Pesticides	Piperonyl butoxyde	51-03-6	336	16,3%	0,64
	Médicaments	Acetazolamide	59-66-5	331	16,3%	0,03
	Pesticides	Prochloraz	67747-09-5	331	13,9%	0,14
	Pesticides	Flusilazole	85509-19-9	330	12,4%	0,02
	Produits industriels	Decahydronaphtalene	91-17-8	330	12,4%	0,07
	Alkyl perfluorés	Acide perfluoro-decanoïque	335-76-2	331	11,1%	0,13
	HAP & produits de dégradation	Dibenzothiophène	132-65-0	330	10,9%	0,02
	Produits de soins corporels	Triclosan	3380-34-5	331	10,2%	0,21

Juin 2014

# Etude Ineris – Onema

## Matrice sédiment

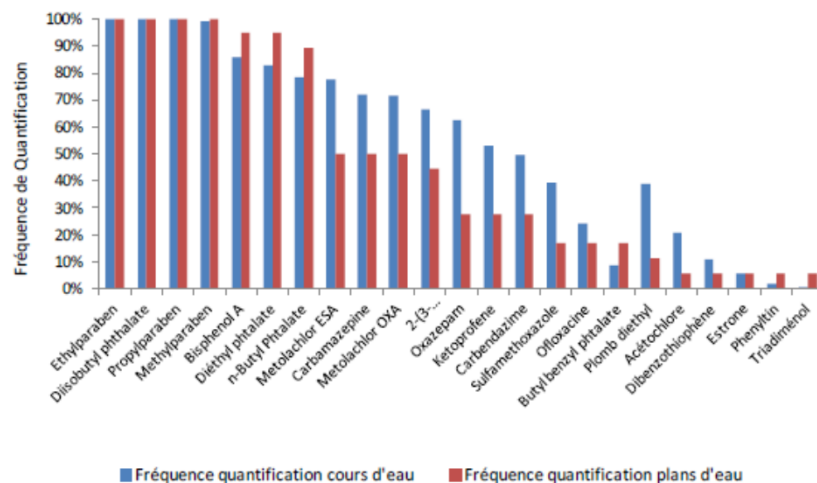
Etude sur les contaminants émergents  
dans les eaux françaises



Fréquence de quantification	Catégories	Paramètre	Code CAS	Nb analyses	Fréquence de quantification	Conc. Max (ng/g)
>95%	HAP & produits de dégradation	Benzo(e)pyrène	192-97-2	110	98%	788,5
	HAP & produits de dégradation	Benzo(g,h,i)fluoranthène	203-12-3	110	97%	148,5
	HAP & produits de dégradation	Triphenylene	217-59-4	110	97%	251,3
	HAP & produits de dégradation	Benzo(c)phenanthrene	195-19-7	110	97%	167,9
	HAP & produits de dégradation	1-Methylpyrene	2381-21-7	110	95%	187,2
Entre 50% et 95%	HAP & produits de dégradation	1-Methylchrysene	3351-28-8	110	94%	67,6
	HAP & produits de dégradation	6-Methylchrysene	1705-85-7	110	90%	40,1
	HAP & produits de dégradation	7,12-Dimethylbenzo(a)anthracene	57-97-6	110	86%	37,8
	HAP & produits de dégradation	Dibenzo(a,l)pyrene	191-30-0	110	86%	208
	HAP & produits de dégradation	Dibenzo(a,e)pyrene	192-65-4	110	85%	247,3
	HAP & produits de dégradation	Benzo(j)fluoranthène	205-82-3	111	83%	1406,7
	Additifs d'essence (metabolites)	Plomb diethyl	24952-65-6	111	82%	154
	HAP & produits de dégradation	Anthanthrene	191-26-4	110	75%	290
	Produits industriels	Decahydronaphtalene	91-17-8	110	73%	10,7
	Antioxydants	4-tert-Butylphenol	98-54-4	110	73%	1250,4
	HAP & produits de dégradation	Dibenzo(a,i)pyrene	189-55-9	110	71%	107,6
	HAP & produits de dégradation	Dibenzothiophène	132-65-0	110	70%	237,2
	Pesticides	DDE 44'	72-55-9	108	67%	26,1
	Produits industriels	Dibutyletain cation	818-08-6	111	61%	56,8
	Retardateurs de flamme	Décabromodiphényl ether (BDE-209)	1163-19-5	110	60%	115,2
	Pesticides	DDD 44'	72-54-8	109	58%	4,8
	HAP & produits de dégradation	Dibenzo(a,h)pyrene	189-64-0	110	55%	59,4
	HAP & produits de dégradation	Dibenzo(a,c)anthracene	215-58-7	111	50%	226,6
	HAP & produits de dégradation	Coronene	191-07-1	110	50%	233,2

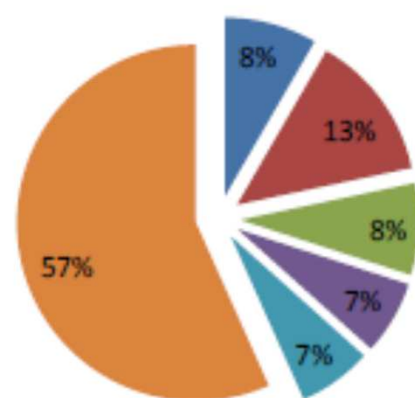


# Substances omniprésentes ?



Fréquence de quantification - cours d'eau vs plans d'eau (matrice eau)

Répartition spatiale des substances



- Rétrouvé dans 1 bassin
- Rétrouvé dans 2 bassins
- Rétrouvé dans 3 bassins
- Rétrouvé dans 4 bassins
- Rétrouvé dans 5 bassins
- Rétrouvé dans TOUS les bassins



Tauw

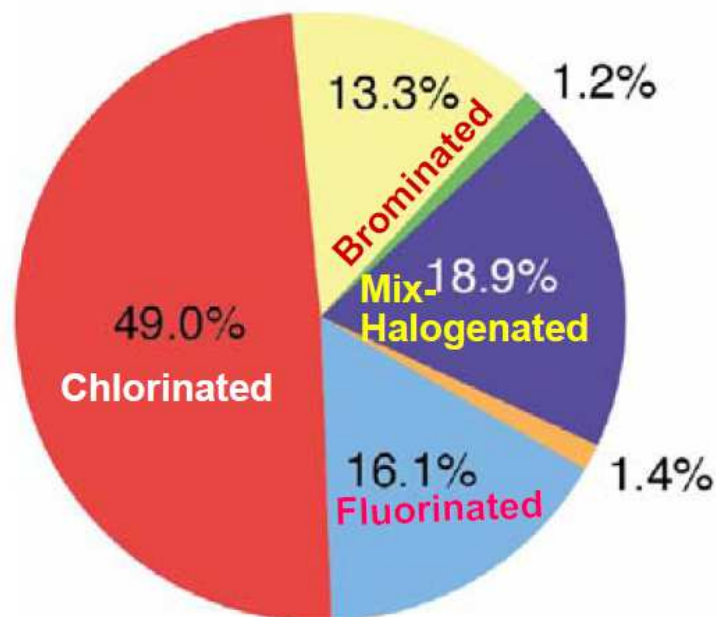
Etude sur les contaminants émergents dans les eaux françaises

Etude Ineris – Onema

# Pour les années à venir



- Evaluation d'environ 100 000 substances chimiques dans les bases de données selon les critères POP de REACH : 574 seraient potentiellement des POP's



➤ **Chlorinated, brominated and fluorinated persistent toxic substances need to be assessed systematically.** (Scheringer et al. (2012) Atmos. Pollution Research, 3, 383–391.)



M. Scheringer et al., (2012), Atmos. Pollut. Res. 3 DOI: 10.5094/APR.2012.044



# Pour les années à venir



- Problématique des polluants émergents qui ne sont pas encore recherchés
- Adaptation des industries à l'évolution de la réglementation : introduction de nouvelles substances dont les données de caractérisation sont moins documentées
- Difficulté de contrôle du marché international



Tauw

# Questions auxquelles nous devons répondre



- A quoi sommes nous exposés ?
  - Des substances sont autorisées mais présentent des risques
  - Des substances qui ne sont pas jugées préoccupantes ou pour lesquelles les données sont manquantes
  - Des produits de dégradation
  - Des effets cocktail
- Comment les mesurer ?
  - Tout ne peut pas être analysé en laboratoire : technique/coût
  - Comment interpréter les résultats à défaut de valeurs de référence/normes
- Dans quels cas
  - Analyses pour AEP : certains pesticides recherchés
  - Anciennes décharges, résidus pharmaceutiques, incendies...



# Une possibilité : l'analyse de risque basée sur les effets



## Analyse de risques classique :

- Analyses chimiques
- Sur un ensemble de substances recherchées prédéfinies
- Résultats intégrés dans des études de risques basées sur des valeurs standards

## Analyse de risques basés sur les effets :

- Analyses biologiques : les échantillons sont exposés à des organismes vivants (in vivo) ou des cultures de cellules (in vitro) = bioessay
- Les effets de toutes les substances présentent dans l'échantillon sont combinés
- Un effet toxique est mesuré : mortalité, cancer...



Tauw



# Bioessais



- Protocole H14 ; déchets/sédiments écotoxicité
- Programme Echibioteb

## Les tests in vitro

Mécanismes ciblés	Essais in vitro (réf.)	Mesure finale du test	Exemples de polluants environnementaux détectés	Partenaire
Récepteur des œstrogènes (ER)	Cellules MELN ( <i>Pillon et al, 2005</i> )	Activité luciférase	Stéroïdes naturels (E1, E2, E3) et synthétiques (EE2), alkylphénols, bisphénol A, certains pesticides organochlorés...	UMR8079
Récepteurs des hormones thyroïdiennes (TR)	Cellules PC-DR-LUC ( <i>Jugan et al, 2007</i> )	Activité luciférase	TBBPA, halophénols, PBDE, HAP	
Récepteurs des androgènes (AR) et des glucocorticoïdes (GR)	Cellules MDA-kb2 ( <i>Wilson et al, 2002, Kinani et al. 2010</i> )	Activité luciférase	Androgènes : testostérone, trenbolone Anti-androgènes : pesticides, alkylphénols, bisphénol A glucocorticoïdes : pharmaceutiques de type corticostéroïdes (dexaméthasone, cortisone,...)	INERIS
Récepteur de la dioxine (AhR)	Cellules PLHC-1 ( <i>Louiz et al, 2008, Kinani et al. 2010</i> )	Activité EROD	Dioxines et dioxin-like, HAPs, PCBs coplanaires...	
Génotoxicité	SOS Chromotest ( <i>Quillardet et al., 1982</i> )	Induction du gène SfiA	Génotoxiques et pro-génotoxiques : HAP, HAP nitrés, amines aromatiques, nitrosamines, certains pesticides et solvants organochlorés, métaux lourds, anticancéreux	ISM-LPTC



Tauw

# Bioessais



- Programme Echibioteb (suite)

## Les tests in vivo

Bio-test	Laboratoire/ex situ	Compartiment	Référence	Durée	Réponses étudiées	Partenaire
Bactérie <i>Vibrio fisheri</i> (Test Microtox)	laboratoire	Effluent / Eluat de boue	NF EN ISO 11348-3	1h	Toxicité aiguë (réduction de la bioluminescence)	ISM-LPTC
Micro-algue <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	laboratoire	Effluent / Eluat de boue	NF EN ISO 8692	3j	Croissance de la population	INERIS
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	laboratoire	Effluent / Eluat de boue	NF ISO 20665	7j	Reproduction	INERIS
Avoine	laboratoire	Boue	ISO /DIS 11269-1	4j	Elongation racinaire	INERIS
Avoine / cresson	laboratoire	Boue	NF ISO 11269-2	18j	Emergence et croissance des parties aériennes	INERIS
Gammaré <i>G. fossarum</i>	<i>Ex situ</i>	Effluent	Geffard et al. accepted Xuereb et al., 2009	30j	Survie Croissance Reproduction Taux d'alimentation	Cemagref
Insecte <i>Chironomus riparius</i>	<i>Ex situ</i>	Effluent	AFNOR T90-339-1	30j	Survie Croissance Emergence	Cemagref
Mollusque <i>Potamopyrgus antipodarum</i>	<i>Ex situ</i>	Effluent	Duft et al., 2007	30j	Survie Croissance Reproduction	Cemagref
Embryons et larves du Poisson <i>Oryzias latipes</i>	<i>Ex situ</i>	effluent	Cachot et al., 2007	20 à 30 j	Survie, croissance, taux d'éclosion, durée du développement, malformations, dommages à l'ADN	ISM-LPTC



Tauw

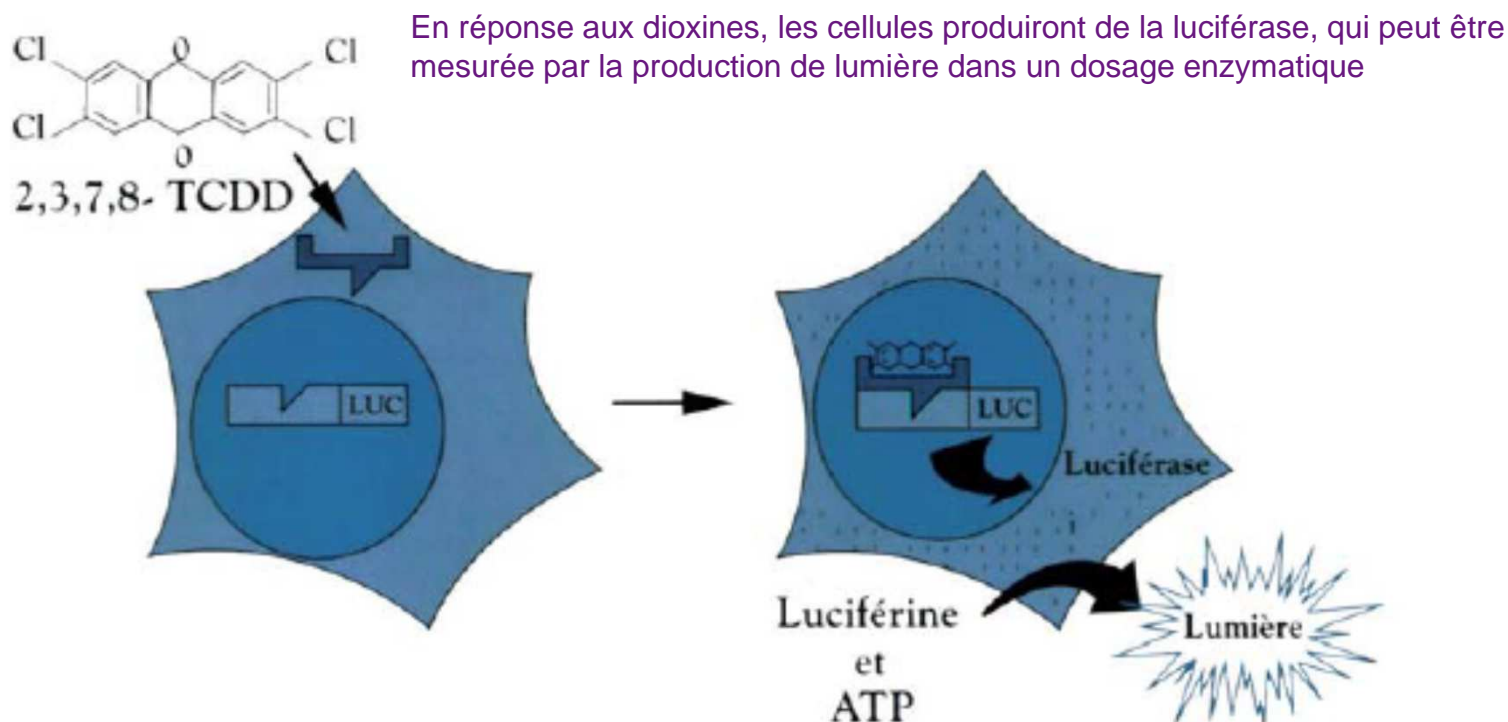
Source Cemagref

# Un exemple de test : Calux



**C**hemical **A**ctivated **L**uciferase gene **e**xpression (CALUX) est un bioessai utilisé dans la détection de substances spécifiques dans un échantillon

Les cellules CALUX produisent une lumière en réponse à leur exposition aux polluants ou groupes de polluant cibles qui présentent le même mode d'action : **perturbateur endocrinien ou dioxin-like**. [Berthold Technologies]



Ta

Source ISERM – Dioxines dans l'environnement, quel risque pour la santé ?

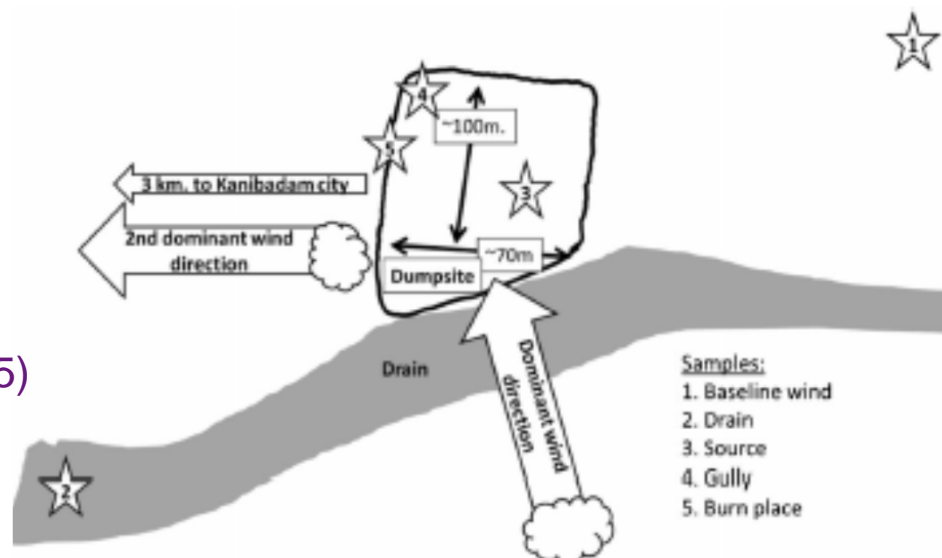
# Mise en œuvre des essais Calux par Tauw (NL) au Tajikistan



La décharge de Kanibadam avec 4 000t et plus de 40 substances, principalement des pesticides

- **Tests classiques** : 21 échantillons composites de sols superficiels analyses selon les packs standards DDT, DDD, DDE /HCH isomers/Drins -> puis calcul de risque  
Max: 900mg/kg HCH, 360mg/kg DDT/DDD/DDE
- **CALUX** : 5 échantillons pour chacun des 8 essais disponibles

Position des zones d'échantillonnage  
(Pieterse *et al.*, 2015)



Tauw

# Analyses chimiques (décharge Tajikistan)



Compound	Baseline Wind	Drain	Source	Gully	Burn Place
Alpha-HCH	0.0	0.0	690.0	3.8	0.033
Beta-HCH	0.0	0.0	120.0	13.0	0.084
Gamma-HCH	0.0	0.0	8.3	570.0	0.027
Delta-HCH	0.0	0.0	5.0	6.2	0
Aldrin	0.0	0.0	0.0	0.9	0
Dieldrin	0.0	0.0	1.4	0.0	0.059
Endrin	0.0	0.0	0.0	0.0	0
o,p-DDT	1.8	0.7	4.5	48.0	0.35
p,p-DDT	12.0	3.1	32.0	310.0	2.1
DDE (sum o,p and p,p)	0.8	1.1	1.1	15.2	1.2
DDD (sum o,p and p,p)	0	0.25	0.9	7.8	0.2

Compounds that were identified by chemical analyses in the soil samples (mg/kg dry weight). Compounds that were assessed but not detected: hexachlorobenzene, heptachlor, heptachlor epoxide, hexachlorobutadiene, isodrin, telodrin, endosulfan (alpha/beta), alpha-endosulfan sulphate, chlordane (alpha/gamma), PCB-28, PCB-52, PCB-101, PCB-118, PCB-138, PCB-153, PCB-163, PCB-180



**Tauw**

Concentrations des contaminants détectés dans les analyses chimiques sur les échantillons (Pieterse *et al.*, 2015)



# Réponses Calux (décharge Tajikistan)

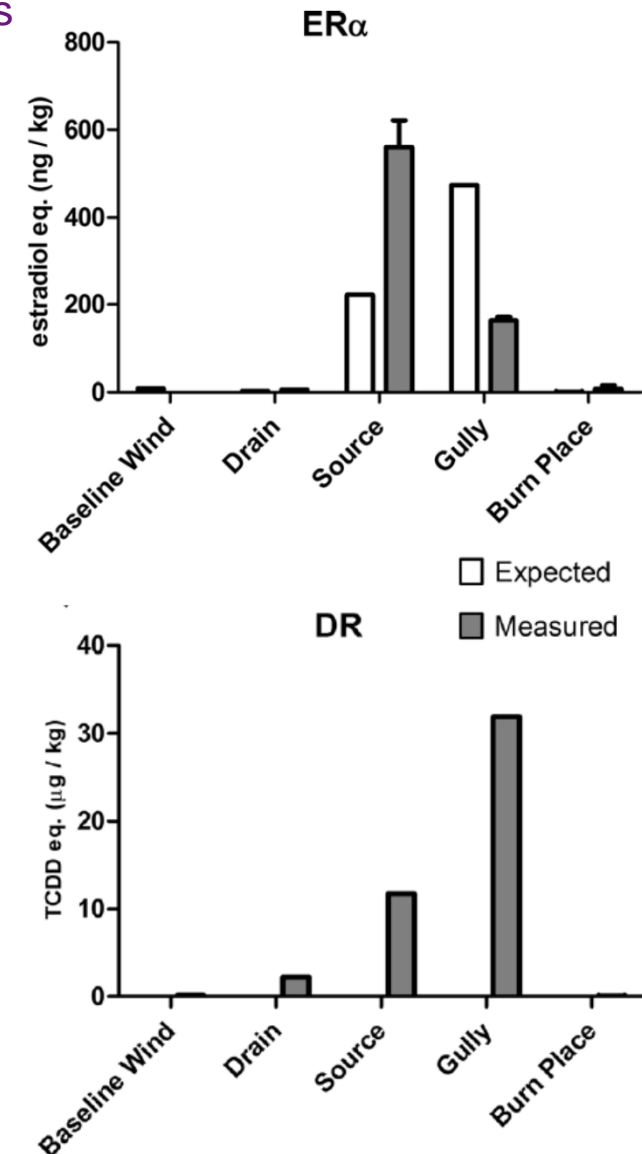


Comparaison des activités calculées (à partir des analyses chimiques) et mesurées par le CALUX, exprimées en équivalent de la molécule référence (Pieterse *et al.*, 2015)

CALUX assay	Biological effect
ER $\alpha$ (estrogen receptor $\alpha$ ) CALUX	endocrine disrupting effects by (pseudo)estrogens
AR CALUX (antagonist testing; androgen receptor)	endocrine disrupting effects by anti-androgens
PR CALUX (antagonist testing; progesterin receptor)	endocrine disrupting effects by anti-progestins
AP1 CALUX (AP1-signaling pathway)	effects on cell differentiation, proliferation and apoptosis which relate to carcinogenesis
DR CALUX (AhR receptor)	dioxin(-like) compounds related effects
PAH CALUX (AhR receptor)	(carcinogenic) PAHs-related effects
nrf2 CALUX (nrf2-signaling pathway)	measure for oxidative stress
p53 CALUX (p53-signaling pathway)	measure for genotoxicity

→ Effets toxiques mesurés par Calux sont SUPERIEURS à ceux estimés sur la base des analyses de composés connus (substances « inconnues ou non recherchées », effets cocktail ...)

**Tauw**



# Intérêts du test Calux



- Test utilisé depuis plusieurs années sur les produits agro-alimentaires (screening large spectre)
- Intérêt potentiel pour les sites suspectés d'être impactés pour éviter de multiplier les recherches
- Test non reconnu par l'administration : pas de référentiel d'interprétation (équivalence ?)
- Avis partagés sur l'intérêt du test :
  - permet de conclure dans un premier temps à l'absence de problème → arrêt des investigations ?
  - ne montre que les effets recherchés (et les autres ?)



# Conclusions & Perspectives



- Lorsque un grand nombre de polluants sont identifiés (suspectés ou détectés) --> faut-il continuer à rechercher de nouvelles molécules ?

Quel apport du bioessai ?

- Complément ou remplacement (si les effets attendus sont connus)
  - Pour anticiper les effets cocktail
  - Polluants  $< Lq$  (faibles doses) ou rarement recherchés
  - Évite de conclure hâtivement sur l'absence d'effets lorsque toutes les concentrations  $< lq$
- 
- Les essais basés sur les effets =
    - 1 effet = 1 essai ? 1 essais pour plusieurs effets ?
    - Quel essai réaliser / pour quels effets ?
- 
- Les polluants de « demain » ? Nanomatériaux, produits pharmaceutiques... (et leurs effets ?)



**Tauw**

Merci de votre attention !

Contact : [s.kaskassian@tauw.com](mailto:s.kaskassian@tauw.com)



Tauw