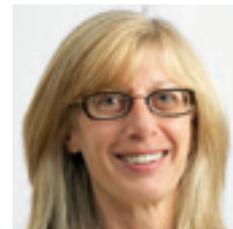


# Perturbateurs endocriniens : détecter, évaluer, éliminer



Inge Werner, biologiste, est directrice du Centre Ecotox de l'Eawag et de l'EPFL.

Coauteurs : Cornelia Kienle, Petra Kunz, Étienne Vermeirssen, Robert Kase

Les hormones et substances apparentées qui sont le plus souvent rejetées dans les lacs et rivières avec les effluents urbains peuvent nuire à la faune aquatique. L'écotoxicologie dispose de tests qui facilitent la détection et l'évaluation de ces polluants et aident à décider des stratégies de dépollution à mettre en œuvre en permettant, par exemple, de juger de l'efficacité des traitements complémentaires d'épuration.

Grande fut la surprise d'une équipe de chercheurs anglais lorsqu'ils découvrirent au début des années 1990 la présence répétée de poissons présentant à la fois des caractères sexuels mâles et femelles dans les cours d'eau (Fig. 1). Quelle pouvait être la cause de ce phénomène dit d'intersexualité? Les anomalies étaient particulièrement fréquentes en aval des stations d'épuration dont les effluents étaient peu dilués dans le milieu récepteur. En analysant ces effluents, on constata qu'ils contenaient des substances qui pouvaient féminiser les poissons mâles en agissant sur eux à la manière d'œstrogènes [1].

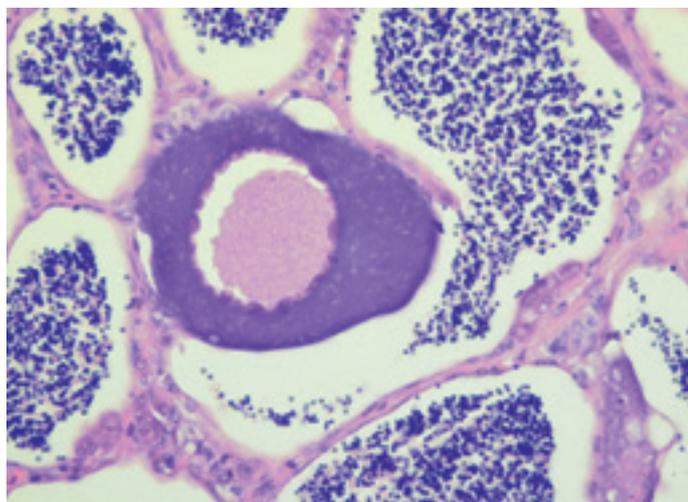
En plus des œstrogènes naturels d'origine humaine ou animale, de nombreuses substances synthétiques peuvent présenter des propriétés œstrogéniques. C'est par exemple le cas de l'éthinylestradiol contenu dans la pilule contraceptive ou du bisphénol A utilisé dans la fabrication de nombreux plastiques. Ces composés agissent de la même manière que les hormones sexuelles femelles et peuvent les imiter ou, en les concurrençant, bloquer leur activité. Les substances œstrogéniques perturbent le développement, la reproduction et la santé des animaux aqua-

tiques et surtout des poissons qui sont particulièrement sensibles en raison de la grande similitude de leur système hormonal avec celui de l'homme. Une autre particularité de ces substances est d'être toxique à des concentrations extrêmement faibles – moins d'un nanogramme par litre soit l'équivalent d'un litre de produit dans le lac de Bièvre –, ce qui les classe dans la catégorie des micropolluants.

**La Suisse aussi est concernée.** Les substances à activité hormonale, ou perturbateurs endocriniens, peuvent rejoindre le milieu aquatique de différentes façons mais leur principale voie de rejet est aujourd'hui l'assainissement communal car les micropolluants ne sont que très partiellement éliminés dans les stations d'épuration. Les travaux réalisés dans le cadre du projet Fischnetz ont montré que les substances œstrogéniques étaient en partie responsables de la perte de plus de 60 pour cent des effectifs de truites enregistrée en Suisse depuis le début des années 1980. De 2002 à 2007, un programme national de recherche a été dédié aux perturbateurs endocriniens (PNR 50) pour évaluer le risque environnemental qu'ils représentent. Les travaux ont révélé que les concentrations d'œstrogènes étaient nettement plus élevées en aval des stations d'épuration qu'en amont (Fig. 2). D'autre part, des quantités anormales de vitellogénine ont été observées chez certaines truites arc-en-ciel mâles [2]. Or la présence de cette protéine chez les mâles est un signe de pollution œstrogénique étant donné que ce précurseur de la vitelline, protéine des ovocytes, n'est normalement synthétisé que par les femelles à maturité sexuelle. Le PNR 50 conclut notamment que :

- ▶ Les perturbateurs endocriniens posent un problème en Suisse dans les cours d'eau assurant une trop faible dilution des effluents d'épuration qu'ils accueillent.
- ▶ L'efficacité des stations d'épuration suisses doit être évaluée et des solutions doivent être proposées pour les optimiser si nécessaire.
- ▶ La mise au point de méthodes standardisées pour la détection des substances œstrogéniques et pour l'évaluation de la qualité de l'eau doit être encouragée.
- ▶ Des critères de qualité environnementale doivent être définis sur des bases scientifiques pour permettre aux gestionnaires

Fig. 1 : Tissus testiculaires de gardon mâle du lac Léman vus en coupe : au centre, un ovocyte.



Daniel Bernet

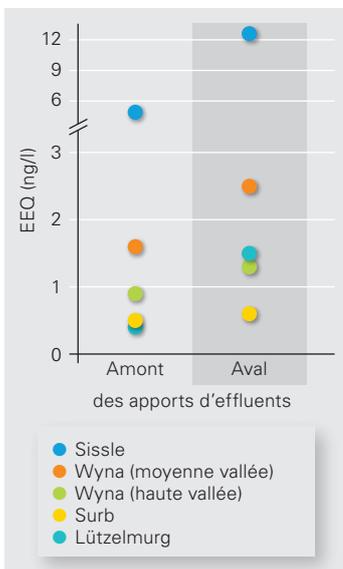


Fig. 2: Teneurs moyennes en substances œstrogéniques dans plusieurs rivières suisses en amont et en aval du point de rejet d'effluents de stations d'épuration. L'étude a été menée en 2004 et les rejets dans la Sissle ont été fortement réduits depuis. Les concentrations sont exprimées en équivalents-œstrogène (EEQ).

d'évaluer la contamination hormonale des eaux dont ils ont la charge et ces critères doivent être intégrés à la législation sur la protection des eaux.

Avec la complicité de l'Office fédéral de l'environnement (OFEV), de l'Eawag et d'autres partenaires, le Centre Ecotox s'est attelé, ces dernières années, à répondre à certaines de ces exigences.

**Quatre étapes pour évaluer la qualité des eaux.** Même si le PNR 50 avait montré que certains cours d'eau risquaient de présenter des teneurs critiques en œstrogènes et pseudo-œstrogènes en aval des stations d'épuration, on ne disposait pas de méthode scientifiquement éprouvée pour évaluer le degré de contamination des eaux par ce type de micropolluants. Pour combler cette lacune, nous nous sommes associés à l'Eawag dans le cadre du projet Stratégie Micropoll pour élaborer, sur mandat de l'OFEV, un système d'évaluation de la qualité de l'eau axé sur les micropolluants organiques [3]. Sur la foi de données de toxicité et d'occurrence, 47 substances ont tout d'abord été sélectionnées pour représenter les micropolluants susceptibles d'être rejetés par les systèmes d'assainissement communal suisses. Cette liste de composés représentatifs comporte divers médicaments, pesticides et produits industriels mais aussi huit perturbateurs endocriniens. Pour évaluer l'écotoxicité de ces substances, nous avons défini des critères de qualité environnementale, c'est-à-dire des concentrations ne devant pas être dépassées dans l'environnement aquatique pour que celui-ci ne subisse pas de dommages. Pour les calculer, nous nous sommes servis de données de toxicité aiguë et chronique obtenues sur des algues, des invertébrés et des poissons.

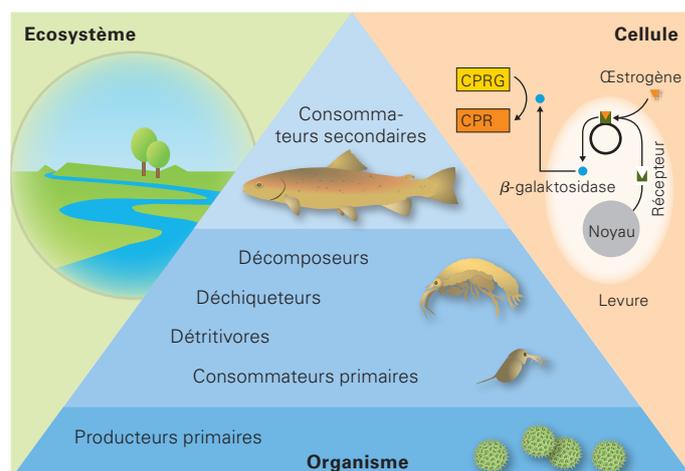
Le système d'évaluation propose une démarche en quatre étapes: Dans un premier temps, les cours d'eau potentiellement contaminés sont identifiés à partir du degré de dilution des effluents d'épuration dans le milieu récepteur. Le degré de pollution est ensuite déterminé par analyse chimique sur les sites

sensibles. Dans une troisième étape, la gravité de cette pollution est évaluée en comparant les concentrations mesurées dans l'environnement aux critères de qualité environnementale définis pour les micropolluants dosés. Suivant l'importance du dépassement, une classe de qualité est attribuée au cours d'eau selon un système à cinq niveaux. La dernière étape consiste à identifier les principales causes de contamination sur les sites touchés et à proposer des stratégies de dépollution. Ce système d'évaluation permet donc de localiser les secteurs de cours d'eau présentant des teneurs critiques en micropolluants et d'identifier les stations d'épuration devant être optimisées pour améliorer leur élimination.

**Comment réduire les rejets de micropolluants?** Des traitements complémentaires peuvent être mis en œuvre dans les stations d'épuration pour augmenter leur capacité d'élimination des micropolluants et en particulier des perturbateurs endocriniens. Deux techniques ont été étudiées sur pilote dans le cadre du projet Stratégie Micropoll: une ozonation suivie d'un traitement biologique d'une part et un traitement au charbon actif suivi d'une filtration de l'autre. Divers essais biologiques ont été mis en œuvre pour estimer l'efficacité des deux options de traitement (Fig. 3) et leurs qualités ont été évaluées pour les contrôles de routine effectués dans les stations d'épuration [4].

Deux types de biotests ont été utilisés: des essais *in vitro* et des essais *in vivo*. Les tests *in vitro* permettent une détection très sensible des effets des substances au niveau de mécanismes cellulaires spécifiques dans des lignées de cellules ou des organismes unicellulaires et se prêtent donc à la détection de certaines familles de composés chimiques comme les œstrogènes. Ils ne sont toutefois pas en mesure d'indiquer les effets des substances sur les organismes entiers. Les tests *in vivo*, de leur côté, sont effectués à l'échelle de l'organisme et s'intéressent aux effets sur les fonctions biologiques comme la croissance, la

Fig. 3: Dans le projet Stratégie Micropoll, les effets des micropolluants ont été étudiés à l'échelle de l'écosystème, de l'organisme et de la cellule. Plus le niveau d'organisation biologique est élevé, plus il est difficile d'attribuer les effets à des facteurs individuels.



survie, la reproduction ou la synthèse de vitellogénine. Ils appréhendent les effets de l'ensemble des substances présentes dans un échantillon mais ne donnent que très peu d'informations sur la nature des composés en présence.

Des échantillons d'eau usée ont été prélevés dans le pilote à différents stades de traitement puis analysés par voie chimique et biologique. Les tests *in vitro* ont montré que le traitement biologique déjà en place réduisait déjà considérablement la toxicité des effluents mais qu'il ne permettait pas d'éliminer totalement les polluants, comme en témoignait, notamment, l'œstrogénicité encore élevée des effluents à la suite de cette étape. D'après les tests *in vitro* un traitement consécutif au charbon actif ou à l'ozone permettait d'éliminer 80 pour cent des micropolluants restants. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse chimique.

Du côté des essais *in vivo*, le test sur truites arc-en-ciel a lui aussi confirmé l'efficacité des traitements complémentaires, la moindre toxicité des effluents se traduisant par une augmentation du taux d'éclosion, du poids et de la survie des embryons. Les autres tests *in vitro* ont livré des résultats disparates en raison, notamment, d'un manque de sensibilité. L'étude comparative des différents essais biologiques utilisés montre qu'aucun test pris isolément n'est en mesure d'appréhender la totalité de la toxicité d'un échantillon. Pour contrôler l'efficacité d'élimination des micropolluants dans les stations d'épuration, les tests *in vitro* semblent toutefois mieux adaptés que leurs homologues *in vivo*. Ils sont d'autre part plus faciles à mettre en œuvre, ce qui les qualifie pour les analyses de routine.

Les essais avec les biotests ne se sont pas contentés de prouver que l'ozonation et le traitement au charbon actif permettaient d'éliminer une grande diversité de micropolluants organiques et de lutter contre la pollution des eaux par les perturbateurs endocriniens. Ils ont également indiqué que suite à l'ozonation suivie d'un traitement biologique, les effluents ne semblaient pas non plus contenir de produits de transformation stables susceptible d'être toxiques pour l'environnement. Pour limiter les risques de rejet de tels composés, l'étape d'ozonation doit être impérativement suivie d'un traitement biologique actif.

**Comment mesurer et surveiller la pollution hormonale?** Au vu de ces résultats, la Confédération a décidé d'équiper un certain nombre de stations clés de ces techniques d'épuration afin de protéger la vie aquatique et la qualité des ressources en eau potable. En collaboration avec divers partenaires, elle a élaboré en ce sens un modèle de financement basé sur le principe du pollueur-payeur. Les juristes travaillent actuellement à une modification de la loi sur la protection des eaux qui permettrait de l'appliquer.

Malgré l'optimisation des stations d'épuration, il reste indispensable de surveiller la qualité de l'eau et de contrôler régulièrement les teneurs en perturbateurs endocriniens. Etant donné que les (pseudo)œstrogènes agissent à des concentrations extrêmement faibles, leur dosage individuel n'est pas toujours possible avec les méthodes analytiques habituelles. D'autre part, les effets des substances présentant des modes d'action similaires ont tendance à se cumuler de sorte que le mélange de plusieurs œstro-



Peter Schönenberger

Cornelia Kienle et Petra Kunz du Centre Ecotox discutant des résultats d'un test d'œstrogénicité sur levures.

gènes présents à des concentrations individuelles inférieures au seuil de toxicité peut avoir un effet biologique significatif. Pour déterminer avec sensibilité l'effet global des substances œstrogéniques présentes dans le milieu, il est donc pertinent de compléter les analyses chimiques de tests *in vitro*.

Sur mandat de l'OFEV, nous travaillons actuellement avec les autorités fédérales, les services cantonaux de la protection des eaux, plusieurs équipes de recherche et divers bureaux d'étude à l'élaboration d'un système de surveillance de la qualité de l'eau basé sur l'utilisation des biotests en analyse de routine. Pour pouvoir être utilisés dans un tel contexte, les biotests doivent remplir certaines conditions: ils doivent être à la fois sensibles et spécifiques de la famille de composés recherchés, faciles à mettre en œuvre et bon marché.

Dans une première campagne de mesures, nous avons déterminé la teneur en composés œstrogéniques dans de nombreux cours d'eau suisses accueillant des quantités importantes d'effluents d'épuration sans pouvoir les diluer suffisamment. Pour ce faire, nous avons utilisé deux tests *in vitro* déjà largement éprouvés dans le cadre du projet Micropoll: le test YES et le test ER-Calux. Le test YES (yeast estrogen screen) est un test simple, bon marché et accessible qui indique les effets œstrogéniques grâce à des cellules de levure génétiquement modifiées dans lesquelles la fixation des substances au récepteur humain des œstrogènes a été couplée à une réaction colorimétrique. L'essai ER-Calux est un test du commerce qui fait appel à une lignée de cellules humaines porteuses d'un récepteur des œstrogènes modifié. Suite au travail qu'il demande avec les lignées cellulaires, l'ER-Calux est plus difficile à mettre en œuvre et plus onéreux que le test YES mais il est également beaucoup plus sensible.

Les deux types de tests peuvent être pareillement utilisés pour contrôler le non dépassement du critère de qualité envi-

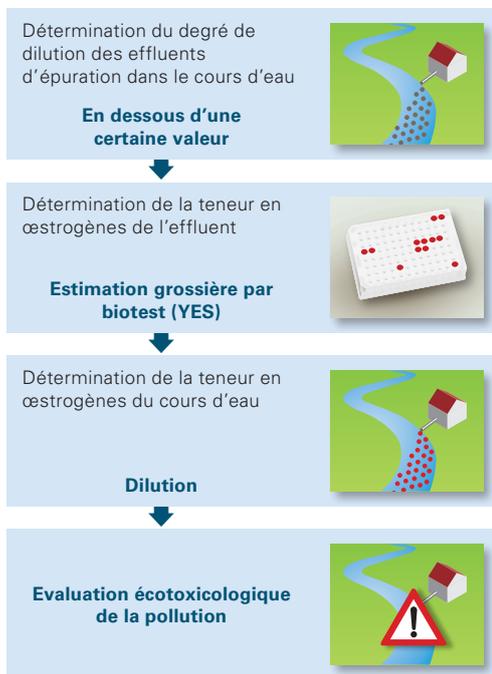


Fig. 4: Démarche envisageable pour évaluer le degré de pollution de l'eau par les perturbateurs endocriniens.

ronnementale fixé à 0,4 ng/l pour le 17 $\beta$ -estradiol et qui sert de référence pour les œstrogènes dont les concentrations sont exprimées en équivalents estradiol par litre. Ce seuil correspond à la norme de qualité environnementale proposée par l'Union européenne et le Centre Ecotox pour l'application de la directive-cadre sur l'eau. Dans les cours d'eau étudiés, les deux tests ont indiqué une activité œstrogénique plus importante en aval des stations d'épuration qu'en amont tandis que l'analyse chimique ne permettait pas de caractériser entièrement la pollution œstrogénique.

Pour déterminer l'œstrogénicité des secteurs de cours d'eau chargés en effluents d'épuration, nous recommandons d'utiliser le test YES, plus pratique. L'activité peut être évaluée dans l'effluent par le biotest puis extrapolée au cours d'eau en appliquant le facteur de dilution dans le milieu récepteur (Fig. 4). Bien qu'il soit moins sensible que l'ER-Calux, le test YES donne de bons résultats avec les échantillons d'eau fortement polluée. Sa simplicité et son faible coût lui donnent un avantage décisif pour les analyses de routine.

Les méthodes et stratégies que nous avons utilisées sont prometteuses et nos études montrent que les essais biologiques se prêtent à l'évaluation des effets œstrogéniques dans les cours d'eau. Mais avant que les laboratoires cantonaux ou privés puissent les employer, ils doivent être validés et standardisés. Au sein du groupe Effets hormonaux/xénohormones de l'organisme allemand de normalisation DIN, nous travaillons actuellement à la préparation d'une certification ISO pour les biotests.

**Beaucoup de questions en suspens.** Bien que nous ayons déjà beaucoup appris sur les perturbateurs endocriniens, de nombreuses questions restent encore sans réponse. Ainsi, les corégones du lac de Thoune présentent depuis une dizaine d'années des malformations des organes génitaux. Malgré tous

nos efforts de recherche, toutes les techniques employées et tout notre savoir sur l'action des polluants chimiques, nous n'avons pas encore pu identifier les causes du phénomène [5]. De nouvelles études indiquent d'autre part que, non contents d'agir sur les fonctions reproductrices, les perturbateurs endocriniens pourraient affaiblir les défenses immunitaires des poissons et les rendre plus sensibles aux maladies [6]. Ces effets multiples rendent les prévisions à l'échelle de la population particulièrement difficiles et leur superposition avec ceux d'autres polluants et facteurs de stress compliquent encore la situation.

D'un autre côté, notre connaissance des effets écotoxiques ne cesse de s'améliorer et nous disposons de méthodes de criblage à haut débit de plus en plus performantes. Notre capacité à mesurer les effets endocriniens ou autres sur les organismes aquatiques augmente donc de jour en jour. L'inconvénient des techniques à haut débit, cependant, est de livrer des résultats à l'échelle moléculaire qu'il est extrêmement difficile d'extrapoler à l'échelle de l'organisme tout entier. Nous plaçons nos espoirs dans les méthodes dites « omiques » comme la transcriptomique, la protéomique ou la métabolomique qui permettent d'examiner simultanément la totalité des gènes, des protéines ou des métabolites de l'être étudié. Ces techniques pourraient nous aider à trouver les voies métaboliques qui mènent d'une perturbation cellulaire à un symptôme à l'échelle de l'organisme. Nous pourrions alors déterminer des biomarqueurs spécifiques qui pourraient ensuite être utilisés dans les analyses de routine. Si nous y parvenons, nous pourrions enfin limiter notre recours à l'expérimentation animale pour évaluer les risques pour l'homme et l'environnement et préserver les écosystèmes naturels. ○ ○ ○

- [1] Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R., Sumpter J.P. (1994): Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chemical Ecology* 8, 275–285.
- [2] Vermeirssen E.L.M., Burki R., Joris C., Peter A., Segner H., Suter M.J.-F., Burkhardt-Holm P. (2005): Characterization of the estrogenicity of Swiss midland rivers using a recombinant yeast bioassay and plasma vitellogenin concentrations in feral male brown trout. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 2226–2232.
- [3] Götz C.W., Kase R., Hollender J. (2010): Mikroverunreinigungen – Beurteilungskonzept für organische Spurenstoffe aus kommunalem Abwasser. Eawag-Studie im Auftrag des Bafu.
- [4] Kienle C., Kase R., Werner I. (2011): Evaluation of bioassays and wastewater quality – *In vitro* and *in vivo* bioassays for the performance review in the project Strategy Micropoll. Oekotoxzentrum, Eawag/EPFL.
- [5] Bernet D., Liedtke A., Bittner D., Eggen R.I.L., Kipfer S., Küng C., Largiadèr C.R., Suter M.J.-F., Wahli T., Segner H. (2008): Gonadal malformations in whitefish from Lake Thun – Defining the case and evaluating the role of EDCs. *Chimia* 62, 383–388.
- [6] Casanova-Nakayama A., Wenger M., Burki R., Eppler E., Krasnov A., Segner H. (2011): Endocrine disrupting compounds – Can they target the immune system of fish? *Marine Pollution Bulletin* 63, 412–416.