

Nouvelles approches d'évaluation de la qualité chimique et (éco)toxicologique de rejets industriels

Février 2026

La caractérisation des mélanges complexes et du danger associé constitue un des défis scientifiques et techniques majeurs dans l'évaluation de la qualité chimique des milieux et de l'impact potentiel des rejets industriels sur ces milieux. Dans ce contexte, les stratégies bioanalytiques combinant méthodes basées sur les effets biologiques (bioessais) et approches physico-chimiques ont démontré leur pertinence pour caractériser des contaminations complexes dans différentes matrices environnementales (y compris les rejets) et identifier les substances responsables d'effet au sein de ces matrices. Ces approches offrent de nouvelles solutions pour améliorer la surveillance chimique réglementaire des milieux et des rejets industriels.

Description

La présente note fait le point sur les travaux de recherche menés par l'Ineris pour la mise en œuvre d'une démarche bioanalytique sur la période 2021-2025¹. Elle s'appuie notamment sur le développement d'outils de (bio)détection de perturbateurs endocriniens et leur application dans des programmes de surveillance (pré-) réglementaires, telle que la recherche d'activités endocriniennes dans des rejets industriels.

Enjeux : développer des outils pour mieux caractériser la qualité chimique des eaux, surveiller les rejets et évaluer le danger associé

Un très grand nombre de substances chimiques issues des activités humaines se retrouvent *in fine* dans les systèmes aquatiques où elles peuvent impacter la qualité du milieu à différents niveaux, depuis la dégradation de la qualité de l'eau jusqu'à des effets à plus long terme sur les populations exposées voire les écosystèmes (Figure 1). Dans une perspective de surveillance de la qualité chimique des milieux et des rejets, il apparaît important de disposer d'outils qui permettent d'alerter de façon précoce sur le danger associé à la présence de contaminants afin de pouvoir agir sur leur réduction à la source.

Dans le milieu, les contaminants chimiques sont présents sous forme de mélanges complexes et peuvent subir des

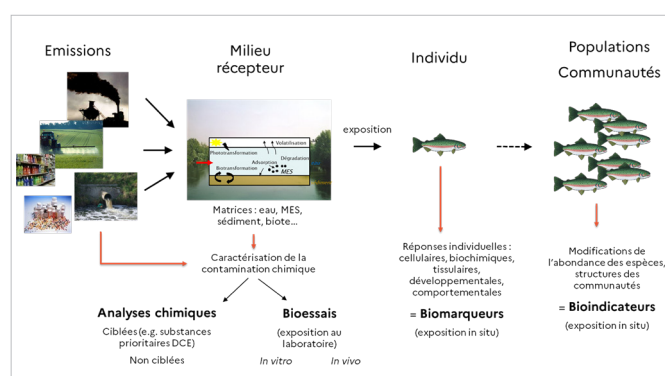


Figure 1 / Impacts des activités humaines sur la qualité chimique des milieux et les écosystèmes – quels outils pour les surveiller ? (MES : matières en suspension)

processus de transformation biotique et abiotique, qui peuvent générer des produits de transformation parfois plus toxiques que les composés parents. Dans ce contexte, comment identifier les substances émergentes à surveiller dans les milieux aquatiques et les rejets ? Comment prioriser celles qui présentent le risque le plus élevé ? Comment les surveiller efficacement ?

Aujourd'hui, la surveillance réglementaire de la qualité chimique des eaux ne considère qu'une infime partie de ces contaminations complexes. En Europe, la [Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE](#) (DCE) établit un cadre pour la surveillance et l'évaluation de la qualité de l'eau ; elle définit une liste finie de substances chimiques dan-

gereuses à surveiller en priorité, ne fournissant qu'une vision très partielle de la contamination environnementale et sans renseigner sur les effets des mélanges. L'obligation de mettre en place des tests écotoxicologiques², en complément des analyses chimiques, pour la surveillance des rejets aqueux a été introduite, pour la première fois dans le cadre de la directive sur les émissions industrielles (IED), dans les conclusions sur les Meilleures Techniques Disponibles (MTD) relatives aux systèmes communs de traitement/gestion des effluents aqueux et gazeux dans le secteur chimique (CWW), [parues en 2016](#). Cette disposition a été depuis reprise dans les conclusions sur les MTD sur l'industrie textile ([publiées en décembre 2022](#)). Dans le contexte de la révision de la DCE et de ses directives filles, les outils biologiques sont également poussés dans le cadre de la réglementation européenne sur les milieux aquatiques (DCE 2000/60/CE), notamment pour la surveillance de certaines substances comme les œstrogènes à l'aide de bioessais *in vitro*^{3,4,5}. Si les méthodes basées sur les effets biologiques sont aujourd'hui essentielles pour caractériser le danger associé aux mélanges complexes, elles fournissent des informations très limitées sur l'identité des substances chimiques responsables des effets observés.

Un des enjeux actuels est donc de disposer d'outils d'analyse qui 1) prennent en compte cette diversité de contaminants et leurs effets et 2) permettent d'identifier les substances responsables des effets observés. Dans ce contexte, les travaux de recherche de l'Ineris portent sur le développement d'approches (bio)analytiques intégrées combinant outils biologiques (i.e. bioessais) et analyses chimiques (i.e. analyses ciblées et non ciblées). La pertinence et la fonctionnalité de ces outils ont été démontrées pour détecter des substances chimiques à activité endocrinienne dans différentes matrices environnementales (eaux, air, sol) et pour identifier leur nature chimique par des analyses dirigées par les effets (EDA ou *effect-directed analysis*)⁶. Leur application récente dans le cadre de programmes de surveillance (pré)réglementaires vise à démontrer leur opérationnalité dans ce contexte.

Bioanalyse *in vitro* : recherche d'activités endocriniennes dans des rejets industriels

Principe de la bioanalyse *in vitro* des perturbateurs endocriniens

Un grand nombre de polluants environnementaux sont des perturbateurs endocriniens du fait de leur capacité à se lier à des récepteurs hormonaux au niveau intracellulaire et à induire des effets adverses sur des fonctions physiologiques majeures régulées par ces récepteurs. Les bioessais cellulaires *in vitro* qui expriment ces récepteurs couplés à un gène rapporteur facilement mesurable par luminescence constituent des outils de criblage sensibles et spécifiques pour détecter la présence de substances à activité endocrinienne dans des échantillons environnementaux complexes (Figure 2). Leur utilisation permet de quantifier ces activités en concentration d'équiva-

lents-hormones (ou équivalents-bioanalytiques ou BEQ), paramètre qui intègre l'ensemble des substances du mélange présentant le même mode d'action (Figure 2).

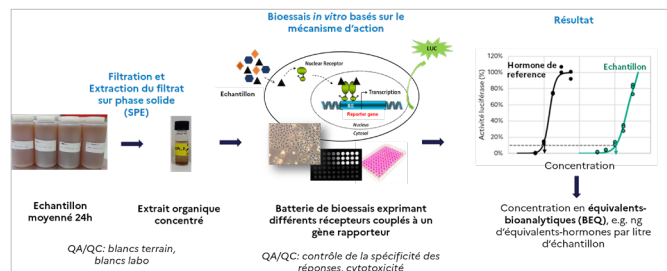


Figure 2 / Principe de l'analyse par bioessais *in vitro* d'activités endocriniennes dans des matrices aqueuses

Focus sur la démarche méthodologique visant à identifier les substances chimiques responsables des activités mesurées.

Les activités en BEQ données par les bioessais (BEQ_{bio}) sont comparables aux activités en BEQ déterminées par les analyses chimiques ciblées (BEQ_{chim}). Celles-ci sont basées sur l'analyse de molécules identifiées comme étant actives dans les tests et pour lesquelles un facteur d'activité relative (RPF ou TEF) a été déterminé, la valeur de BEQ_{chim} = concentration mesurée d'une substance i x RPF _{i} . La comparaison entre BEQ_{bio} et BEQ_{chim} permet d'évaluer la contribution des substances actives analysées à l'activité globale du mélange donnée par les bioessais. Toutefois, dans un grand nombre de cas, notamment en l'absence d'a priori fort sur les substances à analyser, cette approche basée sur des analyses ciblées ne permet d'expliquer le plus souvent qu'une petite partie des activités détectées. Pour identifier plus avant les molécules actives dans le mélange, il est alors possible de mettre en œuvre une approche dite EDA (pour Effect-Directed Analysis) qui consiste à fractionner le mélange initial (e.g. par méthode chromatographique) et à tester l'activité endocrinienne des différentes fractions afin d'isoler celles qui contiennent les substances actives (Figures 4A et B). Selon les profils chromatographiques ainsi obtenus, des hypothèses sur la nature des substances peuvent être formulées et ainsi guider l'identification de leur structure chimique par spectrométrie de masse en mode analyses de suspects ou analyses non ciblées (NTS).

Applications à des rejets industriels

La performance de cette approche pour détecter la présence de substances à activités endocriniennes et les quantifier dans différentes matrices environnementales (eaux de surface, eaux usées urbaines, rejets industriels, sédiments, sols, air) a été démontrée dans le cadre de différents programmes de recherche⁷.

L'application de ces bioessais dans des programmes de surveillance permet de renseigner l'état de contamination des masses d'eaux par ces familles de composés et d'identifier des sites particulièrement impactés pour lesquels une investigation plus poussée serait nécessaire, permettant parfois de remonter à la source de la conta-

mination⁸. De tels travaux ont ainsi permis d'identifier un rejet industriel comme une source importante de substances pharmaceutiques à activités hormonales⁹, très probablement responsables des effets observés sur la faune piscicole en aval du rejet¹⁰. Plus récemment, la même démarche bioanalytique a permis d'identifier une pollution d'une autre rivière française par des glucocorticoïdes et de mettre en évidence la contribution d'un site pharmaceutique comme une source majeure de la pollution (cf. Projet GLUCO¹¹). Dans les deux cas, des mesures de réduction de rejet ont par la suite été mises en place sur demande des autorités compétentes.

Ces travaux soulèvent la question à plus large échelle des rejets industriels en tant que sources potentielles d'émission de substances à activité(s) endocrinienne(s). Afin de dresser un premier état des connaissances à l'échelle nationale quant à la présence d'activités endocriniennes dans ce type de rejets, l'Ineris a mené une recherche d'activités endocriniennes dans des rejets de 33 sites industriels, représentatifs de différents secteurs dont 21 du secteur pharmaceutique (Rapport Effluents Pharma¹²) et de différents types de production pharmaceutique. Cette étude s'inscrivait dans le cadre de l'action 20 de la deuxième stratégie nationale sur les perturbateurs endocriniens (SNPE2) relative à la surveillance des rejets de certains secteurs d'activités industrielles et dans le contexte d'une action nationale d'inspection des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE), pilotée par la Direction Générale de la Prévention des Risques (DGPR) du Ministère de la Transition Écologique et de la Cohésion des Territoires (MTECT).

L'analyse des effluents industriels par une batterie de bioessais *in vitro* ciblant 14 modes d'actions endocriniens a révélé la présence de multiples activités endocriniennes dans la majorité des échantillons, lesquels présentaient des profils d'activités variés et parfois spécifiques d'un site à l'autre (Figure 3). Certaines, comme les activités estrogénique (ER), xénobiotique (PXR) ou celle en lien avec le transport de l'hormone thyroïdienne (TTR), semblent fréquemment retrouvées de façon indépendante du secteur industriel. D'autres activités en revanche ne sont retrouvées qu'en sortie de certains sites pharmaceutiques. C'est le cas des activités en lien avec les récepteurs des glucocorticoïdes (GR), des miné-

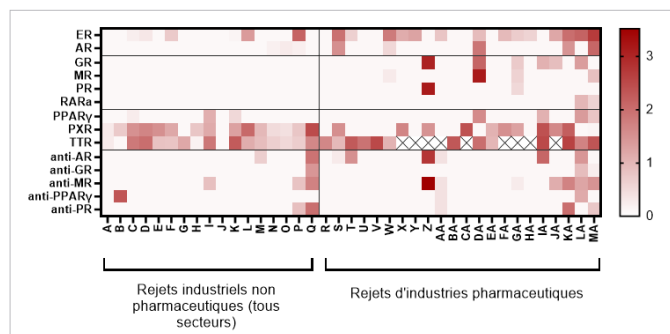


Figure 3 / Activités endocriniennes mesurées par bioessais *in vitro* dans des effluents industriels issus de différents secteurs dont le secteur pharmaceutique. Unité = $1 + \log(1/CE_{10})$, avec CE_{10} (concentration induisant 10% de réponse dans le bioessai) exprimée en facteur d'enrichissement relatif (REF) ; x = pas de donnée.

ralocorticoïdes (MR), des progestatifs (PR) ou des rétinoides (RAR). Typiquement, ces récepteurs sont activés de façon sensible et spécifique par des substances pharmaceutiques, dont ils sont la cible pharmacologique, et leur activation pourrait donc constituer une empreinte spécifique de ce type de substances.

Ces travaux documentent pour la première fois la présence de ce type d'activités dans des effluents industriels à une échelle nationale, avec une diversité de profils observés. Ils soulèvent la nécessité de caractériser plus avant les activités détectées, en termes d'interprétation des effets biologiques/toxiques associés aux activités endocriniennes détectées¹³ et d'identification des substances en cause, afin d'en réduire les rejets. Typiquement pour les activités endocriniennes *in vitro*, l'utilisation de l'approche EDA est un outil de recherche performant qui permet d'identifier les substances responsables. A titre d'exemple, son application à un rejet industriel présentant de fortes activités GR, MR et PR a permis d'isoler plusieurs fractions actives dans lesquels des corticoïdes de synthèse, expliquant les activités observées, ont été identifiés par spectrométrie de masse à haute résolution (Figure 4C).

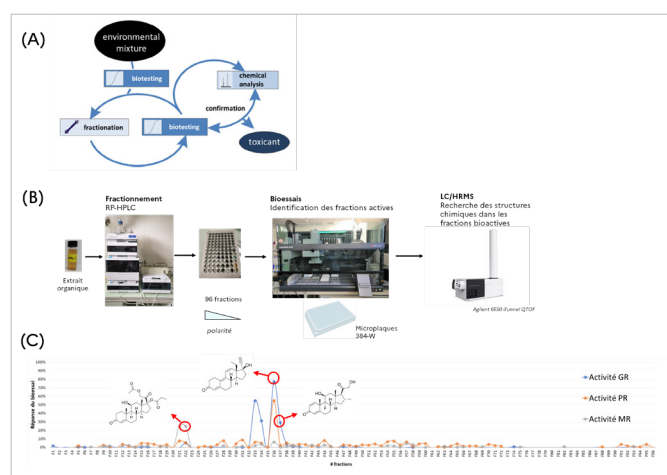


Figure 4 / (A) Principe de la démarche EDA (analyse guidée par l'effet ou Effect-Directed Analysis), schéma tiré de Brack et al 2016 (B) sa mise en œuvre au laboratoire à l'Ineris et (C) un exemple d'application à l'identification de substances à activité glucocorticoïde (GR), progestagène (PR) et minéralocorticoïde (MR) dans un rejet industriel.

Au bilan, ces travaux de recherche ont montré la pertinence de la démarche bioanalytique, combinant outils biologiques et analyses chimiques, pour mettre en évidence la présence et identifier la nature et quantifier les substances d'intérêt toxicologique, les perturbateurs endocriniens, au sein de matrices complexes tels que les effluents industriels. Cette approche, qui est complémentaire à l'approche analytique conventionnelle ciblant des substances prioritaires, a démontré toute sa pertinence dans un contexte de surveillance et a conduit, dans un certain nombre de cas, à la mise en place de mesures de réduction de rejet de certaines substances de la part des industriels.

Analyses non ciblées ou NTS

Une autre approche innovante visant à obtenir une image plus exhaustive de la contamination chimique d'un rejet consiste à utiliser les analyses chimiques non ciblées (ou *Non Target Screening* - NTS). L'approche NTS permet de constituer des empreintes chimiques de la matrice étudiée. Ces travaux à l'Ineris ont débuté avec l'acquisition en 2016 d'un chromatographe en phase liquide couplé à un spectromètre de masse à haute résolution de type temps de vol (LC-HRMS). Des analyses non ciblées ont été réalisées sur plus d'une centaine d'échantillons provenant d'eaux de surface et d'eaux de rejets industriels¹⁴ afin d'identifier des substances émergentes par une approche en mode suspect. Pour certains sites industriels complexes en termes d'activités et de substances potentiellement présentes dans les rejets, l'analyse non ciblée peut parfois être un outil complémentaire dans le cadre de la MTD dédiée à l'inventaire des flux pour laquelle il est nécessaire d'identifier la présence de substances à enjeux dans les effluents¹⁵. Des outils complémentaires peuvent être utilisés pour exploiter ces données HRMS par analyse des empreintes chimiques pour tenter d'identifier des marqueurs discriminants de certains types d'échantillons. Pour cela, une bancarisation systématique des données acquises a été mise en place pour accumuler assez de données en vue de tests statistiques. En complément, des outils basés sur l'intelligence artificielle ou des approches statistiques avancées ont été développés dans le cadre du programme scientifique d'Aquaref. Dans ce cadre, une étude a également été lancée pour évaluer la possibilité d'établissement de cartes de contrôle multivariées sur la base des empreintes acquises par analyse NTS afin de suivre la qualité des rejets.

Perspectives : préconiser des approches plus globales dans un contexte réglementaire

Au bilan, ces nouvelles méthodes, qui restent des outils de recherche performants, pourraient à terme être intégrées dans les futures stratégies d'évaluation de la qualité chimique des rejets (Figure 5). La mise en opérationnalité

de telles approches intégrées constitue un axe de développement important pour répondre aux enjeux actuels de la surveillance réglementaire des rejets en particulier et des milieux en général.

Au niveau réglementaire, une double approche est actuellement utilisée. D'une part, l'approche « par substance » se base sur une liste finie de substances individuelles prioritaires et ne renseigne pas sur la toxicité (le danger) associé au mélange. D'autre part, l'approche « par effet » s'appuie sur les bioessais d'écotoxicité générale identifiés dans le cadre des MTD en écotoxicologie pour certaines activités industrielles (chimie, textile) ; elle fournit des informations sur la toxicité globale de l'échantillon sans renseigner sur le type de substance en cause. Néanmoins, dans le cas où la toxicité d'un effluent industriel est ainsi mise en évidence, la méthodologie TIE/TRE (Toxicity Identification/Reduction Evaluations) est une méthode itérative, qui permet d'identifier la source de la toxicité pour chaque rejet individuel du process industriel. Cette démarche permet de localiser la source et ainsi réduire la toxicité en modifiant cette étape du process, par exemple en substituant la ou les substances utilisées, et en collectant ce rejet individuel pour un traitement spécifique.

L'approche bioanalytique, utilisant des bioessais basés sur le mode d'action des substances en couplage avec des analyses chimiques ciblées et non ciblées, vient utilement compléter les approches traditionnelles en renseignant sur des familles de polluants jusque-là non prises en compte dans la caractérisation des rejets. Ce couplage, via notamment l'approche EDA, permet de guider l'analyse vers les substances responsables de la toxicité observée, ce qui offre de nouvelles perspectives d'identification à la source des polluants responsables d'effets potentiels dans les milieux, qui reste un enjeu important dans la caractérisation des émissions en vue de leur réduction.

Les axes de développement en cours visent à étendre cette démarche scientifique à d'autres modes d'action/effets au sein de batteries de bioessais qui embrassent plus largement le spectre de contaminants d'intérêt (éco)toxicologique. Par exemple, le projet BIOCAIRE en cours évalue ainsi la qualité de rejets urbains et du milieu récepteur à l'aide d'une batterie de bioessais *in vitro* et *in vivo* incluant une gamme d'effets plus large (activités endocriniennes, génotoxicité, essais d'écotoxicité générale standardisés) dans le but d'émettre des recommandations sur les stratégies d'utilisation de ces outils dans un contexte de surveillance DCE. Enfin, dans le cadre des travaux Aquaref, l'Ineris travaille à l'élaboration de guides¹⁶ et à la définition de grilles d'interprétation des bioessais (définition de valeurs seuils), prérequis indispensables pour une application en routine de ces outils en surveillance réglementaire.

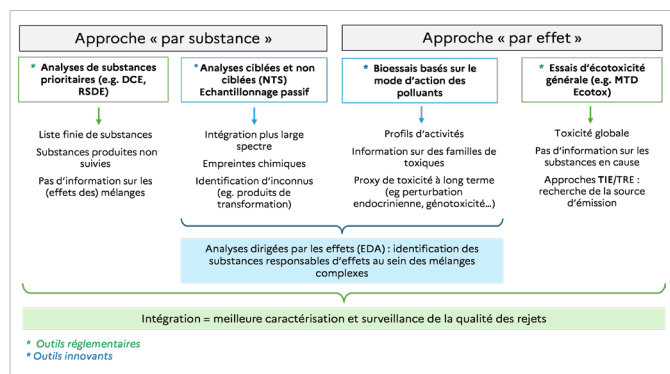


Figure 5 /
Approches développées à l'Ineris pour caractériser la qualité chimique et écotoxicologique des rejets.

¹ Ces travaux s'inscrivent dans l'objectif 13 du contrat d'objectif et de performance 2021-2025 de l'Ineris « Caractériser les impacts des pollutions sur la biodiversité et évaluer les risques associés, en renforçant les approches de surveillance biologique en complément de la surveillance chimique », particulièrement à son jalon 35 : « Proposer une stratégie globale d'évaluation de l'impact potentiel de certains rejets industriels sur les écosystèmes aquatiques ».

² [Approches IED et éco-toxicologiques pour la gestion des rejets industriels | Ineris](#)

³ Carere et al, "Technical Proposal for Effect-Based Monitoring and Assessment under the Water Framework Directive Effect-based methods report", Report to the Common Implementation Strategy (CIS) Working Group Chemicals on the outcome of the work performed in the subgroup on Effect-Based Methods (EBM), Octobre 2021.

⁴ [Une note sur la place des méthodes bio-analytiques dans la directive-cadre européenne sur l'eau \(DCE\) | Ineris](#)

⁵ Proposal for a Directive of the European Parliament and of the Council amending Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy, Directive 2006/118/EC on the protection of groundwater against pollution and deterioration and Directive 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of water policy - Analysis of the final compromise text with a view to agreement, <https://data.consilium.europa.eu/doc/document/ST-13706-2025-INIT/en/pdf>.

⁶ Brack et al 2016, doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.11.102

⁷ [Une note sur la place des méthodes bio-analytiques dans la directive-cadre européenne sur l'eau \(DCE\) | Ineris](#)

⁸ [Surveillance prospective - Apport des bioessais pour l'évaluation de la qualité chimique des milieux aquatiques | AQUAREF](#)

⁹ Creusot et al, Environmental Science and Technology 2014, doi.org/10.1021/es405313r

¹⁰ Sanchez et al, Environ Int 2011, doi.org/10.1016/j.envint.2011.06.002

¹¹ [Projet GLUCO – Caractérisation, identification et devenir d'une contamination par des glucocorticoïdes dans l'Iton et l'Eure | Ineris](#)

¹² [Recherche d'activités endocriniennes dans des rejets de sites industriels pharmaceutiques par une approche bioanalytique in vitro | Ineris](#)

¹³ La définition de valeurs seuils (EBT) pour les activités endocriniennes in vitro fait l'objet de travaux (Escher et al 2018 ; Brion et al 2019) y compris au niveau réglementaire (Carere et al, "Technical Proposal for Effect-Based Monitoring and Assessment under the Water Framework Directive Effect-based methods report").

¹⁴ Analyse non-ciblée des eaux de rejets d'industries, Rapport Ineris - 227183 - 2818773 - v1.0, 29/01/2025

¹⁵ [Caractérisation et surveillance des rejets industriels vers les eaux et Directive sur les émissions industrielles \(IED\) | Ineris](#)

¹⁶ [Inventaire et évaluation des méthodes biologiques issues de l'écotoxicologie pour la surveillance des milieux aquatiques en vue de leur utilisation dans le cadre de la DCE | Ineris](#)