

## **\_Ecotoxicologie des perturbateurs endocriniens**

### **\_Etude du BPA en mésocosmes**

**{14 novembre 2013}**

► Contact : Aurélie Prévot ◀

03 44 55 63 01 – 06 20 90 03 48 – [Aurelie.Prevot@ineris.fr](mailto:Aurelie.Prevot@ineris.fr)



## **Etude des perturbateurs endocriniens en mésocosmes : des effets confirmés du BPA sur les écosystèmes**

**Paris, 14 novembre 2013 – Les milieux aquatiques artificiels constituent des outils complémentaires aux bioessais de laboratoire pour évaluer l'écotoxicité des substances chimiques. L'INERIS a mené des travaux destinés à faire évoluer ses protocoles d'essai en mésocosmes pour mieux les adapter à la recherche sur les polluants émergents comme les perturbateurs endocriniens. A cette occasion, l'impact du BPA a été étudié : à une concentration de 100 µg/L de BPA, des effets sur l'ensemble des communautés d'organismes vivants sont confirmés.**

L'évaluation des substances chimiques avant leur mise sur le marché (règlement REACH) et la surveillance de leur devenir dans l'environnement, une fois ces substances utilisées (Directive Cadre sur l'Eau) s'appuient sur la mise en œuvre de bioessais pour évaluer l'écotoxicité des substances et établir des valeurs seuils de concentration. Ces tests standardisés présentent de nombreux avantages (reproductibilité, fiabilité, rapidité...) mais ont leurs limites : ils sont réalisés en conditions de laboratoire souvent peu représentatives des conditions naturelles. En complément des bioessais, les écosystèmes artificiels permettent d'étudier de manière plus « réaliste », du point de vue écologique, l'impact d'une substance chimique sur un système complexe de communautés d'organismes vivants.

Depuis 1995, l'INERIS dispose de mésocosmes, de type « rivières artificielles », pour mener ses travaux sur l'impact des contaminants aquatiques sur le milieu. L'étude des substances dites « émergentes » comme les perturbateurs endocriniens, les nanoparticules, les résidus pharmaceutiques, etc. est aujourd'hui un enjeu pour le développement et l'adaptation des protocoles d'essai en mésocosmes. Cela a conduit l'Institut à mener une étude sur trois ans pour faire évoluer sa méthodologie d'essai en mésocosmes, notamment pour l'étude des perturbateurs endocriniens (PE). A cette occasion un essai d'application de ces protocoles expérimentaux a été réalisé sur les effets bisphénol A (BPA).

Cette étude est des premières études réalisées en mésocosmes sur l'impact écotoxicologique du BPA. Le bisphénol A (BPA), dont les effets PE sur les organismes aquatiques ont été observés en laboratoire, est une substance dont l'impact environnemental est encore mal cerné, mais qui suscite l'intérêt des autorités publiques. Un groupe *ad hoc* d'experts, animé par l'INERIS, a par exemple travaillé pour la feuille de route transition écologique (FRTE) à une proposition de liste de substances prioritaires à surveiller, qui comprend le BPA.

L'impact du BPA sur les écosystèmes a été étudié sur trois niveaux de concentration : 1, 10 et 100 µg/L. Des effets ont été observés sur l'ensemble du réseau trophique (communautés de végétaux, d'invertébrés et de poissons) à 100 µg/L et sur les individus (poissons) à des concentrations inférieures. A 100 µg/L, la croissance des végétaux comme le cresson et la callitriche est affectée dès 59 jours d'exposition. A la même concentration, la structure de la communauté des macro-invertébrés est également affectée, avec un impact notable sur la taille des populations de quatre espèces : planaires (vers), glossiphonies (sangsues), chironomes (larves de mouche) et limnées (mollusques).

A 100 µg/L, un impact du BPA est observé sur la structure des populations d'épinoche à trois épines, un poisson couramment rencontré dans les rivières françaises. Les adultes sont plus nombreux et la taille standard des juvéniles est plus grande (20 mm), avec une classe de taille de juvéniles quasi-absente (10-15 mm). En-deçà de cette concentration, seuls des impacts physiologiques, l'atrophie des gonades, sont observés sur des individus, à 10 µg/L pour les mâles et dès 1 µg/L pour les femelles. Aucune conséquence de ces effets physiologiques sur le comportement et la structure des populations n'a pu être démontrée.

Ces observations ont comme intérêt principal de fournir des données pour l'établissement de seuils de concentrations de référence. Il est envisageable de considérer que 100 µg/L de BPA constitue la concentration visée la plus basse entraînant un effet (LOEC) sur une population, soit 73 µg/L en concentration réellement mesurée. De même, on peut estimer à 10 µg/L la concentration visée sans effet observé (NOEC), soit environ 5,6 µg/L en concentration mesurée. Cette valeur de la NOEC population est près de trois fois plus faible que la concentration proposée par l'Union Européenne en 2003, qui est de 16 µg/L.



## Quels enjeux pour l'évaluation de risques en écotoxicologie ?

L'écotoxicologie étudie l'impact des polluants chimiques sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes, notamment des écosystèmes aquatiques. La prévention des risques écotoxicologiques, qui constitue une grande part de l'expertise de l'INERIS, requiert d'évaluer à la fois le danger inhérent à la substance et d'étudier l'exposition de la faune et la flore à cette substance.

### Comment mesurer l'impact environnemental des substances chimiques ?

L'évaluation de risques repose sur le calcul du rapport entre la « concentration prévisible dans l'environnement » (Predictive Environmental Concentration – PEC), qui caractérise la présence de polluants et donc l'exposition du milieu et la « concentration prévisible sans effet sur l'environnement » (Predictive No Effect Concentration – PNEC), qui s'appuie sur la réalisation de bioessais pour évaluer l'écotoxicité d'une substance chimique.

Les bioessais sont des tests de laboratoire qui mesurent, dans des conditions expérimentales précises, la concentration de toxique et la durée d'exposition nécessaires pour entraîner un effet déterminé sur un organisme vivant.

Les tests d'écotoxicité portent sur la toxicité aiguë et la toxicité chronique<sup>1</sup> : la toxicité aiguë s'exprime en Concentration Efficace 50 (CE50), concentration pour laquelle des effets sont observés pour 50% des individus testés. La toxicité chronique se calcule en concentration sans effet observé (No Observed Effect Concentration – NOEC) et en concentration la plus basse entraînant un effet (Lowest Observed Effect Concentration – LOEC).

Compte tenu de la grande diversité des écosystèmes, ces bioessais doivent être représentatifs des différents niveaux du réseau trophique : producteurs primaires (végétaux), consommateurs primaires (animaux herbivores), consommateurs secondaires (animaux carnivores), décomposeurs (micro-organismes, invertébrés).

#### Les bioessais d'écotoxicité

Classiquement, l'écotoxicité vis-à-vis des producteurs primaires est évaluée à l'aide de deux essais standardisés, le premier consistant à déterminer la concentration inhibant 50% de la croissance de populations d'algues unicellulaires (*Pseudokirchneriella subcapitata* ou *Scenedesmus subscapitatus*), le second estimant la concentration inhibant 50% de la croissance de fronde de lentille d'eau (*Lemna minor*).

Deux tests sont standardisés et normalisés à l'échelle internationale pour les consommateurs primaires : en toxicité aiguë, un essai d'inhibition de la mobilité de 50% d'une population de micro-crustacés, les daphnies (*Daphnia magna*) sur 48h et en toxicité chronique, un test déterminant, sur 21 jours, la plus forte concentration n'entraînant pas d'effet sur la reproduction de ces mêmes daphnies.

Les essais pour les consommateurs secondaires sont généralement effectués sur des poissons-zèbres (*Danio rerio*) et des truitelles (*Oncorhynchus mykiss*) : en écotoxicité aiguë, il s'agit d'essai sur la létalité de 50% d'une population de poisson sur 96h. Des essais sont également réalisés sur les effets létaux après exposition prolongée (14 jours) et lors des premiers stades de développement des poissons.

En ce qui concerne les décomposeurs, deux essais standardisés évaluent l'inhibition d'oxygène de boues activées et l'inhibition de croissance d'une souche bactérienne de *Pseudomonas putida*.

### Le rôle des bioessais dans la réglementation sur les substances chimiques

Les bioessais sont des tests de référence à la fois dans le cadre de l'évaluation des substances avant leur mise sur le marché (règlement REACH<sup>2</sup>) et dans le cadre de la surveillance de leur devenir dans l'environnement, une fois ces substances utilisées (Directive Cadre sur l'Eau<sup>3</sup>).

<sup>1</sup> La toxicité aiguë se définit par des effets immédiats ou à court terme, à une dose massive et unique de la substance – la mortalité ou l'irréversibilité de l'effet sont souvent les critères de référence. La toxicité chronique désigne les effets à long terme, apparaissant après une exposition prolongée à des doses variables de la substance.

<sup>2</sup> Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances : règlement du Parlement Européen et du Conseil n°1907/2006 du 18 décembre 2006, concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances.

<sup>3</sup> Directive 2000/60/CE du Parlement Européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.

L'impact sur l'environnement fait partie de l'évaluation des risques que le règlement européen REACH exige des producteurs et importateurs de substances chimiques : REACH « repose sur le principe qu'il incombe aux fabricants, aux importateurs et aux utilisateurs en aval de veiller à fabriquer, mettre sur le marché, ou utiliser des substances qui n'ont pas d'effets nocifs pour la santé humaine ou l'environnement ». L'évaluation préconisée dans le règlement s'appuie sur le rapport PEC/PNEC et nécessite donc de procéder à des bioessais.

Les bioessais sont également utilisés dans le cadre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE), qui exige « d'obtenir un bon potentiel écologique et un bon état chimique des eaux de surface » et de « réduire progressivement la pollution due aux substances prioritaires et d'arrêter ou de supprimer progressivement les émissions, les rejets et les pertes de substances dangereuses prioritaires ». Le bon état chimique d'une masse d'eau est estimé par rapport au respect des Normes de Qualité Environnementales (NQE)<sup>4</sup>, qui se fondent sur les valeurs obtenues grâce aux bioessais (CE50, LOEC et NOEC).

Le recours aux bioessais présente un grand nombre d'avantages : ce type d'essais est capable de prédire les effets d'une grande variété de substances sur des organismes différents. Ils ont obtenu une reconnaissance de la communauté scientifique, et pour certains sont standardisés, voire normalisés au niveau international (AFNOR, ISO, OCDE...). Leurs résultats sont en effet répétables, ces tests sont reproductibles d'un laboratoire à l'autre et présentent un bon niveau de sensibilité pour détecter les effets. Ils sont enfin faciles à réaliser, rapides et peu coûteux.

---

<sup>4</sup> La NQE est « la concentration d'un polluant ou d'un groupe de polluants dans l'eau, les sédiments ou le biote qui ne doit pas être dépassée afin de protéger la santé humaine ou l'environnement » (DCE, art. 2, § 35)

## **Pourquoi utiliser les mésocosmes en complément des bioessais ?**

Les bioessais présentent des avantages certains, notamment dans un cadre réglementaire, mais la « représentativité écologique » de ces tests standardisés est discutée. En effet, ils sont réalisés en conditions de laboratoire contrôlées (température, lumière...) souvent fort éloignées des conditions réelles des milieux aquatiques. Cela rend les résultats plus difficilement extrapolables aux milieux naturels.

Les écosystèmes artificiels permettent, en complément des bioessais, d'étudier de manière plus « réaliste » l'impact d'une substance chimique sur un système complexe de communautés d'organismes vivants. Les milieux aquatiques artificiels recouvrent une grande variété de dispositifs expérimentaux : les microcosmes, qui reproduisent un écosystème simplifié en laboratoire ; les mésocosmes, qui permettent de simuler à moyenne échelle les conditions d'un milieu aquatique ; l'expérimentation sur une portion du milieu naturel, isolée par une enceinte artificielle. L'INERIS s'est doté en 1995 de mésocosmes pour conduire des études écotoxicologiques.

### **L'intérêt des mésocosmes : un certain « réalisme écologique »**

Les mésocosmes constituent un dispositif expérimental clos, qui sert à évaluer le comportement, le devenir et les effets à long terme des substances chimiques sur la structure et le fonctionnement des populations, des communautés et de l'écosystème en son entier, en étudiant l'interaction des communautés et groupes fonctionnels entre eux. L'objectif est de constituer des systèmes ayant des caractéristiques qui leur sont propres, dans lesquels vont pouvoir être mis en place des scénarios variés (organismes présents, nature de la contamination, etc.).

Les essais réalisés en mésocosmes sont à la fois plus faciles à conduire et à contrôler que les essais en milieu naturel et beaucoup plus réalistes, du point de vue écologique, que les études en laboratoire. Ils peuvent permettre l'obtention de données pertinentes dans des conditions de faisabilité et de fiabilité satisfaisantes. Les difficultés à résoudre dans l'utilisation de ce type de moyen d'essais portent surtout sur la reproductibilité des expérimentations, sur leur durée relativement longue et sur le degré de représentativité de ces dispositifs, qui ne peuvent pas servir de référence pour tous les écosystèmes naturels.

### **L'enjeu du « calibrage » des mésocosmes**

Les mésocosmes, mares ou rivières artificielles, sont couramment utilisés dans le cadre de la recherche scientifique, mais aussi de l'autorisation réglementaire de substances, pour l'étude du potentiel écotoxique des pesticides et des éléments-traces métalliques (ETM). A ce titre, des exigences sont requises : l'exposition des populations doit être déterminée de manière adéquate ; le mode de contamination du milieu doit être représentatif des modes de transfert attendus dans l'environnement ; les mésocosmes doivent contenir un minimum d'espèces les plus sensibles au contaminant étudié ; les conditions expérimentales doivent être précisément définies et représentatives du type de milieu dans lequel la contamination réelle peut intervenir ; tous les compartiments du milieu doivent être pris en compte (y compris les sédiments).

L'évaluation des polluants organiques peu solubles dans l'eau (HAP, PCB...) et l'étude des substances dites « émergentes » comme les perturbateurs endocriniens, les nanoparticules, les résidus pharmaceutiques, etc. sont aujourd'hui un enjeu pour le développement et l'adaptation des protocoles d'essai en mésocosmes. Cet enjeu est particulièrement important pour l'INERIS qui travaille depuis plusieurs années sur les perturbateurs endocriniens. L'Institut a donc mené une étude sur trois ans pour faire évoluer sa méthodologie d'essai en mésocosmes. A cette occasion un essai d'application de ces méthodes a été réalisé sur le BPA.

## Les caractéristiques des mésocosmes de l'INERIS

Construits en extérieur, les mésocosmes de l'INERIS sont des systèmes lotiques<sup>5</sup>, constitués de douze canaux en béton de 20 m de long, 1 m de large et 30 à 70 cm de profondeur. Ils permettent de tester jusqu'à trois conditions expérimentales distinctes et un « canal témoin », chaque situation pouvant être étudiée en triplicat. Les canaux peuvent contenir les différentes composantes d'un écosystème : sédiments, bactéries, champignons, planctons, invertébrés, poissons, etc.

Chaque canal possède une zone amont peu profonde, où l'écoulement de l'eau est plus rapide que dans la zone aval, plus profonde. Entre ces deux parties se trouve une pente dont le fond est tapissé de pierres. Trois biotopes<sup>6</sup> peuvent donc être constitués : cela augmente le nombre de variables à analyser, mais permet d'étudier un polluant dans des milieux divers et sur différentes espèces du même niveau trophique. Le système distribue l'eau en flux ouvert par un débit moyen de 1 m<sup>3</sup>/h. Un bac de mélange est présent en amont de chaque canal pour oxygéner l'eau et homogénéiser la diffusion du polluant ; un système de déversoir et de bac de récupération permet l'évacuation des eaux tout en préservant les organismes vivants.



Vue des mésocosmes de l'INERIS

© INERIS

<sup>5</sup> Dans les milieux aquatiques d'eau douce, les systèmes lotiques reproduisent les conditions d'eaux vives où circulent des courants (ruisseaux, rivières, fleuves...), par opposition aux systèmes lentiens qui reproduisent les caractéristiques des eaux calmes à faible renouvellement (lacs, étangs, mares...).

<sup>6</sup> Milieu défini par des caractéristiques physicochimiques stables et abritant une communauté d'êtres vivants (ou biocénose). Le biotope forme, avec sa biocénose, un écosystème.

## **L'étude de l'impact d'un perturbateur endocrinien en mésocosmes : des effets confirmés du BPA sur les communautés**

Afin de vérifier la pertinence des méthodes définies pour étudier, en mésocosmes, l'impact d'un polluant émergent sur les écosystèmes, un essai a été réalisé sur un polluant-type, de la famille des perturbateurs endocriniens (PE), dont les mécanismes sont étudiés par les écotoxicologues de l'INERIS. C'est l'une des premières études réalisée en mésocosmes sur l'impact écotoxicologique du BPA.

### **Pourquoi le BPA ?**

Le bisphénol A (BPA), dont les effets PE sur les organismes aquatiques ont été observés en laboratoire, a été choisi comme substance-type. En effet, le BPA est une substance dont l'impact environnemental commence à être surveillé et étudié de manière approfondie.

L'Anses a ainsi noté en 2011 qu'« *en France, le bisphénol A n'est pas suivi dans les réseaux de surveillance des milieux aquatiques et de ce fait peu de données sont disponibles sur les concentrations environnementales de cette molécule* »<sup>7</sup>. Dans le cadre de la surveillance des micropolluants, la conférence environnementale 2012 a décidé que « *pour les polluants émergents dans l'eau, une liste de 4 ou 5 substances prioritaires sera définie et un calendrier de campagnes de mesures, qui passeront d'exceptionnelles à cycliques* ».

Un groupe ad hoc d'experts, animé par l'INERIS, a travaillé à une proposition de liste de substances pour la feuille de route transition écologique (FRTE). Présentée et discutée lors de la conférence environnementale 2013, cette liste comprend le BPA, en particulier du fait de son caractère PE et ubiquiste. En effet, il est rencontré dans les eaux de surface et dans les eaux souterraines avec des taux de quantification significatifs dans tous les compartiments du milieu.

### **Le protocole de l'essai : trois niveaux de concentration**

L'impact du BPA sur les écosystèmes, notamment sur les dynamiques de populations d'épinoches à trois épines, a été étudié sur trois niveaux de concentration : 1, 10 et 100 µg/L. La plus petite concentration a été choisie car des effets sur des espèces sensibles ont été mis en évidence par des travaux de recherche (effet sur la structure et la composition des gonades).

La concentration moyenne correspond à des concentrations rencontrées couramment dans l'environnement, l'Anses indiquant « *qu'au niveau international, le BPA est régulièrement retrouvé dans les eaux de surface à des concentrations entre la dizaine de ng/L et la dizaine de µg/L* ». A ces concentrations, l'induction de marqueurs biologiques de la perturbation endocrinienne (vitellogénine pour les œstrogènes) est observée chez certaines espèces.

La concentration la plus élevée est supposée donner lieu à des effets notables sur toutes les communautés, avec des altérations des organes reproducteurs et une altération de la fertilité : macrophytes, macro-invertébrés et poissons.

Lors de l'expérience, les canaux ont été distribués aléatoirement de façon à obtenir trois canaux par concentration et trois canaux témoins. La date de contamination a été choisie pour laisser aux populations d'épinoches adultes un temps d'adaptation au milieu, de permettre la mise en place de la reproduction, tout en s'assurant que les premiers alevins sont exposés dès leur naissance. Un système automatisé de dilution et diffusion des concentrations de BPA a permis d'alimenter en continu les mésocosmes. Les concentrations de BPA ont été mesurées tous les mois pendant six mois. Après récupération des populations, les variables analysées comprenaient : la dérive des juvéniles, le nombre total d'individus dans la population, la distribution des classes de taille, le développement des organes sexuels.

---

<sup>7</sup> Effets sanitaires du bisphénol A. Rapport d'expertise collective, septembre 2011.

## Des effets confirmés sur l'ensemble des communautés à 100 µg/L

### *Les effets sur les macrophytes et les macro-invertébrés*

A 100 µg/L, des effets sont observés dès 59 jours d'exposition sur certaines espèces de macrophytes, le cresson (*Nasturtium officinale*) et la callitriche (*Callitriche platycarpa*), avec une croissance plus lente de ces espèces par rapport au canal témoin voire même, sur un laps de temps donné, une diminution du volume. La diminution du volume de ces macrophytes peut être due à l'impact direct du BPA mais aussi à un effet indirect : un changement d'alimentation des organismes brouteurs, du fait de la rareté de leur nourriture habituelle (épiphytes...). En parallèle, les paramètres environnementaux du milieu ont changé : le pH et le taux d'oxygène dissous de l'eau ont baissé tandis que son degré de conductivité augmentait. Il est possible que ce changement d'équilibre soit en partie dû aux modifications de la communauté des macrophytes.

A la même concentration, on relève un impact sur la structure de la communauté des macro-invertébrés, avec un impact sur quatre espèces : planaires (*Dugesia sp.*), glossiphonies (*Glossiphonia complanata*), chironomes (*Chironomidae sp.*) et limnées (*Radix balthica*). Le BPA a un impact négatif sur la taille des populations de planaires, contrairement aux glossiphonies dont les populations sont plus importantes : le BPA pourrait induire une augmentation de la compétition inter- et intra-espèces pour la nourriture. Les populations de chironomes (du fait de l'abondance de nourriture) et de limnées (du fait d'un impact sur la reproduction) voient, elles aussi, leur taux de croissance augmenter à cause du BPA.

### *Les effets sur les épinoches à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*)*

Un impact du BPA sur la structure des populations est observé à une concentration de 100 µg/L. Les adultes sont plus nombreux et la taille standard des juvéniles est plus grande (20 mm) qu'aux autres niveaux de concentration. Une hypothèse d'effet indirect du BPA serait l'abondance de macro-invertébrés (qui perturberait le rapport régulation alimentaire/densité de population), associée à un taux de survivance plus important des juvéniles de la première génération. Une hypothèse d'effet direct du BPA se fonde sur une modification de l'équilibre énergétique des individus, due à l'atrophie de certains organes sexuels (gonades) : l'investissement d'énergie entre la croissance et la reproduction n'est plus réparti de la même façon, ce qui explique par ailleurs la présence d'un plus grand nombre de mâles immatures.

Un autre effet est relevé : une classe de taille de juvéniles (10-15 mm) quasi-absente. Une hypothèse d'effet indirect du BPA serait la rareté de nourriture pour les individus les plus petits en fin d'expérimentation, situation qui profite aux individus les plus grands ; ces adultes de grande taille auraient peut-être aussi tendance à se nourrir sur la population des juvéniles. Une autre hypothèse de cette absence de juvéniles serait l'effet direct du BPA sur la reproduction.

En deçà de cette concentration, seuls des impacts physiologiques (atrophie des gonades) sont observés sur des individus, à 10 µg/L pour les mâles et dès 1 µg/L pour les femelles. Aucune conséquence (baisse de la reproduction, etc.) de ces effets physiologiques sur le comportement et la structure des populations n'a pu être démontrée. Des examens histologiques sont en cours pour poursuivre l'interprétation.

### *L'utilisation des données pour des valeurs seuils*

Ces observations ont comme intérêt principal de fournir des données pour l'établissement de seuils de concentrations de référence. Il est envisageable de considérer que 100 µg/L de BPA constitue la concentration nominale<sup>8</sup> la plus basse entraînant un effet (LOEC), soit 73 µg/L en concentration mesurée. De même, on peut estimer à 10 µg/L la concentration nominale sans effet observé (NOEC), soit environ 5,6 µg/L en concentration mesurée.

Cette valeur de la NOEC population est près de trois fois plus faible que la concentration proposée par l'Union Européenne en 2003 : 16 µg/L de BPA (qui correspond à la concentration sans effet sur l'éclosion des œufs et la production de vitellogénine des mâles vairon à grosse-tête et sans effet sur la formation d'oviductes chez la carpe commune).

<sup>8</sup> Dans les études d'écotoxicologie, la concentration nominale est le niveau de concentration qui est visé comme référence. La concentration mesurée est la concentration réellement observée, qui est obtenue par l'analyse d'échantillon d'eau. Le différentiel entre les deux s'explique par le comportement du contaminant dans le milieu, qui fait varier la concentration diffusée initialement (phénomènes d'adsorption dans les sédiments, d'évaporation...).

# Mise au point de méthodes pour l'étude des dynamiques de populations de poissons dans les mésocosmes de l'INERIS

Au plan général, les travaux conduits par l'INERIS sur trois ans ont permis de mieux comprendre les dynamiques de populations d'un consommateur secondaire communément rencontré dans les rivières européennes et françaises, l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*).

Cette espèce est particulièrement adaptée pour l'étude des perturbateurs endocriniens, car elle dispose de marqueurs biologiques pour les androgènes (spiggin) et les œstrogènes (vitellogénine).

L'épinoche est un modèle biologique fréquemment utilisé dans le cadre d'études en mésocosmes, mais la littérature scientifique signale une importante variabilité des facteurs gouvernant les dynamiques de populations, en fonction des caractéristiques du milieu, du site, de la latitude géographique.

## La définition d'une dynamique de population de référence en mésocosmes

Connaître avec un maximum de précisions les dynamiques de populations d'épinoches dans les conditions « témoin » propres aux mésocosmes de l'INERIS est indispensable pour calibrer les études d'impact des contaminants, notamment dans le cas de polluants comme les perturbateurs endocriniens, dont les effets sont très complexes à cerner.

En effet, la puissance statistique des études en mésocosmes est faible en raison de la grande variabilité des observations et du faible nombre de réplicats. Il est donc nécessaire de construire de bonnes références d'un comportement normal des espèces en conditions expérimentales pour être en mesure de déceler des perturbations.

Quatre phases distinctes sont observables dans le cycle de vie des populations d'épinoches dans les mésocosmes de l'INERIS : une augmentation massive et soudaine des effectifs en raison de la reproduction des individus « fondateurs » ; une saturation de l'écosystème entraînant une baisse d'effectifs ; une faible reprise ; une nouvelle chute à la fin de la période de reproduction.

Il semble que la prédation, qui sévit sur les nids et les juvéniles, influence fortement la dynamique. De même, la mortalité importante des mâles fondateurs pourraient provenir d'un investissement trop lourd de ceux-ci dans la reproduction. La température de l'eau et la quantité de nourriture, par leur impact sur le taux de croissance, sont identifiés comme des facteurs prépondérants d'influence sur la structure des populations d'épinoches dans les mésocosmes de l'Institut.

## Le développement d'une méthodologie d'essai spécifique pour l'étude des PE

Les informations récoltées ont également permis de perfectionner les protocoles d'essai et d'améliorer la collecte des données : un protocole de protection (bâche) des mésocosmes a été développé pour éviter la contamination des milieux d'une phase à l'autre de l'essai ; une méthode de sélection et d'introduction des espèces animales et végétales propices au développement de l'épinoche a été déterminée.

Les méthodes d'introduction des populations dans le milieu artificiel ont été définies avec précision (contrôle du sex-ratio initial, diminution du stress, identification individuelle des poissons...).

Le protocole de surveillance des populations a été optimisé (suivi de la dérive des juvéniles, suivi par observations visuelles de tous les stades et classes de taille, techniques d'échantillonnage : capture, marquage, recapture –CMR, méthode d'estimation de la distribution des tailles...), en incluant le suivi de l'évolution de l'habitat (physico-chimie, nourriture).

Un protocole de récupération des populations et d'acquisition des données a également été formalisé.



## **L'expertise de l'INERIS dans les essais écotoxicologiques**

Dans le cadre de l'évaluation de l'impact environnemental des substances, l'INERIS dispose d'une expertise sur les bioessais classiques d'écotoxicité aquatique et les outils expérimentaux systémiques comme les mésocosmes. L'Institut travaille également dans le domaine réglementaire sur la fixation des seuils de concentration. Dans un domaine plus prospectif, les équipes de l'INERIS étudient les mécanismes d'effets des polluants et les méthodes alternatives aux essais classiques (outils de biologie moléculaire *in vivo* et *in vitro*, modélisation numérique, biomarqueurs...).

### **Une expertise dans les études en mésocosmes**

Depuis la construction des mésocosmes, l'INERIS a étudié une dizaine de substances : résidus médicamenteux, pesticides, substances chimiques industrielles. Les équipes de l'Institut, en collaboration avec l'Université de Toulouse et l'Université de Paris VI, ont notamment analysé les effets d'un Élément-Trace Métallique (ETM), le cuivre. Le cuivre a été administré en continu sous forme de sulfate à différentes concentrations (5, 25 et 75 µg/L). Au-delà d'une concentration de 25 µg/L, les équilibres au sein des différentes communautés sont profondément modifiés : certaines populations sont en forte diminution tandis que d'autres sont en augmentation. En parallèle, des altérations des relations entre les différentes communautés ont également été relevées.

Ces travaux ont contribué à caractériser les effets du cuivre sur les différentes communautés aquatiques et ont ainsi permis d'améliorer l'évaluation des dangers du cuivre vis-à-vis des organismes aquatiques. La caractérisation des risques pour les écosystèmes aquatiques a également pu être affinée. La NOEC communauté a été mesurée à 4 µg/L (pour une concentration nominale de 5 µg/L) pour l'ensemble des communautés. A partir de ces données, la PNEC du cuivre pour les écosystèmes aquatiques a été estimée à 2 µg/L.

### **Une expertise dans les bioessais d'écotoxicité**

L'Institut est spécialiste des bioessais d'écotoxicité aquatique et terrestre, sur des substances chimiques et des matrices environnementales. Ses compétences lui permettent de développer des méthodes et des stratégies d'essai expérimental pour caractériser les risques écotoxiques ; à ce titre, il fournit une expertise technique à l'OCDE et participe aux instances de normalisation nationales et internationales.

L'INERIS a par exemple travaillé avec le CTIS, l'Université de Metz et l'Ademe sur l'utilisation d'une méthode multicritère, la méthode SIRIS, pour la sélection de bioessais pour évaluer l'écotoxicité des sols, le recours à des organismes biologiques étant de plus en plus fréquents dans d'autres domaines (sites pollués, déchets...) que les milieux aquatiques.

Plus récemment, les experts de l'Institut se sont penchés sur les contraintes spécifiques que posent les nanoparticules dans le cadre des bioessais. Ils ont ainsi analysé l'influence de certains paramètres (conditions d'essai, propriétés physico-chimiques) sur leur écotoxicité vis-à-vis du milieu aquatique. Dans le cadre de l'étude de l'écotoxicité de nanoparticules de cérium sur des micro-algues d'eau douce, il semble que l'état d'agglomération des particules et le protocole de préparation n'ont pas un impact significatif sur l'écotoxicité de ces particules.

### **Une expertise réglementaire au service des NQE**

La Directive Cadre sur l'Eau (DCE) stipule que chaque Etat-membre de l'Union Européenne devra appliquer des Normes de Qualité Environnementales (NQE) définies au niveau européen pour les substances prioritaires. Parallèlement, chaque pays doit définir des NQE pour des substances dites « pertinentes » au niveau national. C'est une des missions de l'INERIS que de proposer des valeurs seuils pour les NQE nationales.

L'Institut assure également depuis 2005 un rôle d'expert technique auprès de la DG Environnement de la Commission Européenne sur cet aspect de la mise en œuvre de la DCE. L'INERIS a établi une méthodologie de priorisation des substances pour permettre d'établir la liste des substances prioritaires, révisée tous les quatre ans, que prévoit la DCE. L'Institut coordonne également le réseau européen NORMAN, appui technique de la Commission sur la révision de la liste de substances prioritaires et sur l'évaluation et la surveillance des substances émergentes.

### **Une expertise des méthodes prospectives : biologie moléculaire, biomarqueurs, modélisation**

En s'appuyant sur ses travaux de recherche sur les mécanismes d'effets des polluants, notamment perturbateurs endocriniens, l'Institut a développé des approches biologiques nouvelles pour l'évaluation des substances et la surveillance des milieux aquatiques.

Les équipes de l'Institut ont développé des tests bio-analytiques *in vitro*, sur cultures cellulaires, capable de détecter l'activité œstrogénique et anti-androgénique de polluants. Par ailleurs, les chercheurs de l'INERIS et de l'Inserm ont développé un test *in vivo* à partir d'embryons de poisson-zèbre permettant de détecter les effets perturbateurs endocriniens de certains contaminants de l'environnement, grâce à l'expression d'un gène fluorescent. Ce test est en cours de validation à l'OCDE. L'utilisation de tests *in vitro* et *in vivo* basés sur le mécanisme d'action moléculaire des substances permet d'une part l'évaluation a priori des substances, avant leur mise sur le marché. Ils facilitent d'autre part une détection sensible et pertinente de polluants actifs au sein de matrices environnementales. Couplés aux analyses chimiques, ces outils sont, dans un contexte de multi-pollution, au service d'une stratégie de surveillance fondée sur « la chimie dirigée par la biologie ».

La surveillance des milieux aquatiques repose sur deux approches complémentaires : la quantification de certains polluants dans les matrices environnementales (approche « substance ») et la recherche de perturbations au niveau des populations (approche « milieu »). Dans cette dernière approche, l'INERIS développe des méthodes fondées sur le dosage de biomarqueurs. L'INERIS a mis au point une stratégie multi-biomarqueurs basée sur la mesure de marqueurs spécifiques de la perturbation endocrinienne, mais aussi de la biotransformation, du stress oxydant et de la neurotoxicité. L'INERIS a notamment conçu des méthodes pour la détection de marqueurs de la perturbation endocrinienne dans des espèces animales communes (dosage de la *spiggin* chez l'épinoche).

Dans le domaine de la modélisation numérique *in silico*, l'Institut a développé des modèles mathématiques mettant en relation les effets mesurés dans les milieux aquatiques sur les individus avec une exposition à un contaminant. Dans un deuxième temps, les équipes ont changé d'échelle en modélisant de l'individu à la population, notamment grâce aux données obtenues par les observations en mésocosmes. Le taux d'accroissement et la densité de population sont les critères étudiés à l'INERIS pour modéliser l'impact d'un polluant sur les populations. Les modélisateurs de l'Institut ont également travaillé sur un modèle alternatif à l'essai d'écotoxicité sur la daphnie recommandé dans le cadre de REACH : ce modèle mathématique a mis en relation les effets aigus, la structure chimique de la substance analysée et les effets chroniques. Il pourrait s'avérer utile pour réduire les coûts, le temps d'analyse et l'utilisation d'invertébrés dans le cadre des procédures d'évaluation.

## Les travaux de l'INERIS sur le BPA

L'INERIS met ses compétences au service de l'évaluation des risques liés au bisphénol A (BPA), principalement sur les questions de substitution de cette substance, d'un point de vue technico-économique. Ces travaux ont vocation à fournir aux pouvoirs publics des éléments d'aide à la décision sur la possibilité technique de développement et d'utilisation de substances qui pourraient être substituées au BPA, et sur la viabilité économique d'une telle mise en œuvre.

### Les analyses technico-économiques sur les substituts du BPA

L'INERIS a établi une fiche technico-économique du BPA, mise à jour en 2010. L'objectif de ce type de fiche est d'évaluer les enjeux économiques posés en France par la réduction ou la suppression des émissions dans l'eau, et par la substitution de certaines substances chimiques dangereuses. Elle dresse un bilan des différentes origines de la présence dans les eaux de ces substances ; évaluer l'importance économique de ces sources de rejets ; déterminer quels sont les moyens de réduction de ces rejets ; évaluer les coûts de ces moyens de réduction des rejets.

En 2011, les équipes de l'Institut ont publié un rapport d'étude complémentaire sur « l'identification d'actions de réduction des usages pour le BPA ». Ce rapport est un état de lieux de la situation française sur les substituts disponibles au BPA dans les articles en contact avec les aliments et notamment les contenants alimentaires destinés spécifiquement aux enfants. Cette étude bibliographique s'est notamment appuyée sur les témoignages issus d'entretiens avec les acteurs industriels du secteur.

Plus récemment, le ministère de l'Ecologie a décidé de proposer la restriction, dans le cadre de la procédure du règlement REACH, de l'utilisation du BPA dans les papiers thermiques. A cet effet, l'INERIS est en charge depuis juin 2013 de mener une enquête auprès des acteurs économiques de la filière des papiers thermiques en Europe. Cette étude doit identifier les contraintes et les moteurs des acteurs de ce marché, afin qu'ils soient pris en compte par les pouvoirs publics dans le cadre du dossier de restriction préparé par l'Anses.

### Un service national d'accompagnement à la substitution du bisphénol A

L'INERIS a été mandaté en 2011 par le ministère de l'Ecologie pour animer le Service national d'assistance à la substitution BPA ([www.ineris.fr/substitution-bpa](http://www.ineris.fr/substitution-bpa)). Ce site internet collaboratif est destiné à apporter un appui technique aux acteurs industriels en leur fournissant des informations sur les substances et matériaux alternatifs ainsi que sur les éléments de coûts.

Différentes ressources sont mises à disposition sur ce site : des documents relatifs à l'actualité de la substitution au BPA, des notes méthodologiques, des rapports et notes techniques. Ce site a vocation, par l'intermédiaire de son forum, à constituer un lieu d'échanges entre les différents acteurs de la substitution.

### Etude sur la contamination des prélèvements et l'exposition à l'hôpital

En dehors des aspects technico-économiques de la substitution, l'INERIS a eu l'occasion d'étudier le BPA sous l'angle de l'évaluation des expositions dans le cadre de sa participation à l'étude nationale ELFE (Etude longitudinale française depuis l'enfance). Lancée en 2011, ELFE a pour objectif d'analyser le développement physique, psychologique et social de l'enfant, en tenant compte de l'impact des facteurs environnementaux.

Une étude pilote a été réalisée en Seine Saint-Denis et Rhône-Alpes afin de valider les procédures de collecte, stockage et d'analyses des échantillons dans le cadre de ELFE, mais aussi pour décrire les niveaux d'imprégnation des mères aux substances émergentes comme le BPA et les phtalates. Les biomarqueurs du BPA ont été retrouvés chez plus de 90% des sujets, ce qui confirme le caractère ubiquiste de cette substance. Des analyses ont révélé que les concentrations urinaires en BPA mesurées pour les accouchements par césarienne ou forceps étaient significativement plus élevées que celles retrouvées pour les accouchements naturels ; les dispositifs médicaux comme les sondes urinaires ont été identifiés comme une voie d'exposition possible. Les questionnaires et mesures environnementales de l'étude ELFE devraient permettre de mieux cerner les sources d'exposition.



# INERIS en bref

**Plus de 20 ans d'existence et plus de 60 ans d'expérience : un expert héritier d'un savoir-faire issu des secteurs des mines, de l'énergie et de la chimie.**

L'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques a pour mission de contribuer à la prévention des risques que les activités économiques font peser sur la santé, la sécurité des personnes et des biens, et sur l'environnement. Il mène des programmes de recherche visant à mieux comprendre les phénomènes susceptibles de conduire aux situations de risques ou d'atteintes à l'environnement et à la santé, et à développer sa capacité d'expertise en matière de prévention. Ses compétences scientifiques et techniques sont mises à la disposition des pouvoirs publics, des entreprises et des collectivités locales afin de les aider à prendre les décisions les plus appropriées à une amélioration de la sécurité environnementale.

L'INERIS, établissement public à caractère industriel et commercial placé sous la tutelle du ministère chargé de l'Ecologie, a été créé en 1990. Il est né d'une restructuration du Centre de Recherche des Charbonnages de France (CERCHAR) et de l'Institut de Recherche Chimique Appliquée (IRCHA), et bénéficie d'un héritage de plus de 60 ans de recherche et d'expertise reconnues.

- Un effectif total de 588 personnes dont 352 ingénieurs et chercheurs.
- 40 spécialistes des géosciences basés à Nancy dans le cadre d'activités de recherche et d'expertise sur les risques liés à l'Après-Mine.
- Un siège dans l'Oise, à Verneuil-en-Halatte : 50 hectares, dont 25 utilisés pour des plates-formes d'essais, 25 000 m<sup>2</sup> de laboratoires.

## Domaines de compétence

- Risques accidentels : sites Seveso, TMD, GHS, malveillance, dispositifs technologiques de sécurité,
- Risques chroniques : pollution de l'eau et de l'air, sols pollués, substances et produits chimiques, CEM, REACh, environnement-santé,
- Risques sols et sous-sols : cavités, après-mine, émanations de gaz, filière CCS,
- Certification, formation, outils d'aide à la gestion des risques.

## Activité (budget 2013)

- Recettes : 75 M€
- Recherche amont et partenariale : 22 %
- Expertise en soutien des politiques publiques: 55 %
- Chiffres d'affaires entreprises : 23 %

L'INERIS est certifié ISO 9001 pour l'ensemble de ses activités depuis 2000. Plusieurs laboratoires disposent d'accréditations (essais, étalonnages, comparaisons inter-laboratoires, certification de produits industriels). L'INERIS possède également une installation d'essai reconnue conforme BPL.

## La Cellule d'Appui aux Situations d'Urgence (CASU)

L'Institut a créé en 2003 une Cellule d'Appui aux Situations d'Urgence (CASU) qui met, en temps réel et 24h/24, les compétences scientifiques et techniques de ses ingénieurs et chercheurs à la disposition des Ministères, des services déconcentrés du Ministère chargé de l'Ecologie et des services d'intervention de la Sécurité Civile (pompiers...).

## Acteur de l'Europe de la recherche, l'INERIS s'intègre à l'Europe de l'expertise

Avec 47% de taux de succès au 7<sup>ème</sup> programme cadre européen, l'INERIS est un des acteurs les plus performant au plan national.

## Une démarche de développement durable

Conformément au contrat d'objectifs le liant avec le MEDDE, l'INERIS a engagé une démarche de développement durable qui repose sur des pratiques éthiques et solidaires : un accord d'entreprise en faveur du travail des handicapés en 2007, la participation à une crèche inter-entreprises sous l'impulsion du CE...

## Chronologie de la démarche d'ouverture à la société de l'INERIS

### Avril 2005

Visite de la délégation de parlementaires de la Commission « Développement durable et aménagement du territoire ». Au cours de sa visite, la Commission a encouragé l'Institut à développer la capacité de ses experts et chercheurs à participer au débat public.

### Septembre 2006

Le renforcement de la capacité des experts à participer au débat public est inscrit dans le contrat d'objectifs 2006-2010 signé entre l'Etat et l'INERIS.

### 2007-2008

Le Grenelle de l'Environnement conforte la volonté d'ouverture à la société de l'Institut.

### Avril 2008

Organisation de la première rencontre-débat avec des représentants d'ONG et d'associations en vue d'échanger sur les résultats de travaux de recherche ou d'expertise de l'Institut. 24 autres débats ont été organisés depuis lors.

### Mai 2008

Le Conseil d'administration donne un avis favorable à l'évolution envisagée par l'INERIS de ses instances d'évaluation scientifique et technique. Il engage l'Institut à effectuer les démarches nécessaires pour préciser ses propositions.

### Octobre 2008

Signature d'une charte d'ouverture à la société avec l'IRSN et l'ANSES (ex-AFSSET).

### Juin 2009

Ouverture du séminaire scientifique annuel de l'Institut à la société civile. La création d'une Commission d'Orientation de la Recherche et de l'Expertise (CORE), composée de représentants des différentes composantes de la société, y est décidée.

Signature de l'avenant Grenelle au contrat d'objectifs Etat-INERIS qui fixe notamment pour objectif l'élargissement de la gouvernance scientifique à de nouveaux acteurs.

### Septembre 2009

Le Conseil d'administration est informé des modalités d'évolution de la gouvernance scientifique de l'Institut discutées lors du séminaire de juin.

# Gouvernance, alerte et déontologie à l'INERIS

Des règles de déontologie encadrent l'indépendance des avis de l'INERIS. Un comité indépendant suit l'application de ces règles et rend compte chaque année depuis 2001 directement au Conseil d'administration.

La gouvernance scientifique de l'INERIS est constituée d'un Conseil scientifique qui examine les orientations stratégiques de l'Institut; de trois commissions spécialisées qui évaluent les programmes et équipes scientifiques (la commission « risques accidentels », la commission « risques chroniques » et la commission « risques liés à l'utilisation du sol et du sous-sol »); et de la commission d'orientation de la recherche et de l'expertise (CORE) présentée ci-après.

## Commission d'Orientation de la Recherche et de l'Expertise (CORE)

La Commission d'Orientation de la Recherche et de l'Expertise (CORE) représente la concrétisation de la démarche d'ouverture de l'Institut. Officialisée par l'arrêté du 26 avril 2011 relatif aux comités d'orientation scientifique et technique de l'INERIS, elle marque le passage d'une gouvernance scientifique à une gouvernance scientifique et technique ouverte à la société civile.

### Composition

La Commission d'Orientation de la Recherche et de l'Expertise réunit 5 collègues (industriels, élus, syndicats, associations, État) et des personnalités qualifiées de l'enseignement supérieur ou de la recherche.

### Missions

- Identifie et propose des questions à traiter en priorité dans les différents domaines de la recherche et de l'expertise publique,
- Peut donner un avis sur les finalités des programmes de recherche et d'appui envisagés par l'Institut, notamment lors de l'élaboration de son contrat d'objectifs avec l'État,
- Est consultée sur les modalités de diffusion des travaux scientifiques permettant de rendre ceux-ci accessibles à un large public,
- Peut être consultée sur le contenu de certains rapports d'étude.

## Suites à donner aux éventuelles alertes

L'INERIS a la possibilité de se saisir de questions portant sur des risques, notamment à caractère environnemental ou sanitaire. Cet aspect a été pris en compte en septembre 2010, lors de l'adoption par délibération du CA, de la **Charte Nationale de l'Expertise**.

Cette dernière prévoit en effet dans son article 9 qu' « *en cas d'expression [au sein de l'Institut] d'un risque, notamment à caractère environnemental ou sanitaire, les établissements signataires s'engagent à s'en saisir pour rendre un avis sur les suites à y donner en termes d'expertise* ».

En conséquence, le protocole de gestion des ressources publiques, signé le 23 décembre 2010 par le directeur général de la prévention des risques et le directeur général de l'INERIS, prévoit pour l'INERIS d'entreprendre une première investigation du sujet « en amont » en cas d'expression de ces risques et précise que les propositions d'actions ou recherches complémentaires ont vocation à être présentées à la CORE pour avis : le rapport de la CORE étant transmis au Conseil d'administration de l'Institut...

### Mars 2010

Visite de la CORE à l'INERIS.

### Juin 2010

Première participation de la CORE au séminaire des orientations scientifiques et techniques de l'INERIS portant sur la préparation du contrat d'objectifs 2011-2015 de l'Institut.

### Septembre puis Décembre 2010

L'INERIS adopte, par délibération du Conseil d'administration, la charte nationale de l'expertise qui prévoit dans son article 9 des dispositions particulières relatives au devoir d'alerte. Le protocole de gestion des ressources publiques signé avec l'Etat en décembre prévoit donc pour l'INERIS d'entreprendre l'investigation « en amont » des suites à donner « en cas d'expression en son sein d'un risque, notamment à caractère environnemental ou sanitaire » et précise que les rapports qui en seront issus ont vocation à être présentés à la CORE pour avis.

### Octobre - Novembre 2010

Premières réunions de travail de la CORE qui s'implique notamment sur les travaux de hiérarchisation des substances chimiques conduits par l'Institut.

### Avril 2011

Parution au Journal Officiel de l'arrêté ministériel relatif aux comités d'orientation scientifique et technique de l'Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques. La CORE est officiellement créée.

### Septembre 2011

Le Conseil d'administration est informé de l'élargissement du comité de suivi de la charte de déontologie à un membre de la CORE issu du collège associations.

### Septembre - Octobre 2011

Les membres de la CORE sont nommés par le directeur général de l'INERIS après consultation du Conseil scientifique pour une durée de trois ans renouvelable.

### Avril 2012

Le Conseil d'administration de l'INERIS approuve la proposition de nomination du président et vice-président de la CORE.