

Les perturbateurs endocriniens dans l'eau

Un enjeu environnemental et sanitaire

Dr Ronan Colin, Institut Départemental d'Analyse et de Conseil (IDAC - Nantes)

Les préoccupations concernant l'exposition aux substances chimiques dans l'environnement sont assez récentes. La prise de conscience de l'impact de composés chimiques actifs sur le système hormonal, dits « perturbateurs endocriniens », souvent qualifiés de micropolluants émergents a conduit à un développement accru des recherches dans ce domaine. Pour la plupart d'entre eux, il n'existe pas de données de toxicité et il est difficile de prédire leur devenir dans l'environnement aquatique. Ce sont les résultats concernant la productivité des écosystèmes et des anomalies de la reproduction dans des populations de mollusques et de poissons qui ont soulevé le problème de toxicité et de perturbations possibles des régulations endocrines à moyen et long termes. Par ailleurs, il ressort des études une présence évidente de ces produits dans les milieux aquatiques, notamment au sein des stations de traitement des eaux usées. Même si aucune réglementation spécifique relative aux perturbateurs endocriniens n'existe à ce jour, la mise en place de méthodes d'analyses comme outils de diagnostic, adaptées aux eaux résiduaires urbaines et industrielles est un véritable défi pour les laboratoires environnementaux.

ABSTRACT

Endocrine disruptors in water An environmental and health issue

The scientific community focuses its attention on various chemicals considered as emerging pollutants. Among them, some compounds can interfere with the normal endocrine functions of wildlife and possibly humans by modifying hormone receptor levels and by altering the pattern of synthesis and metabolism of hormones. Although they are sometimes present in water (especially waste water but also in surface water and tap water) at low concentrations levels, these substances, called Endocrine Disrupting Compounds, may cause ecologic and health damages.

Le système endocrinien se compose de glandes endocrines qui synthétisent et libèrent dans l'organisme des hormones. Il constitue un des deux grands systèmes de communication de l'organisme, l'autre étant le système nerveux. Son rôle est essentiel pour la réalisation et l'équilibre de certaines grandes fonctions physiologiques. Les hormones sont véhiculées par le sang jusqu'à des cellules cibles et agissent en tant que messagers chimiques, régulant de nombreuses fonctions comme la croissance, le développement, la reproduction, l'utilisation des aliments dans l'organisme, la pression artérielle, les taux de glycémie et l'équilibre des fluides. Les perturbateurs endocriniens sont des

substances capables de dérégler l'action de ces hormones.

Qu'est ce qu'un perturbateur endocrinien

Une définition précise a été proposée par la Commission européenne : un perturbateur endocrinien est « une substance ou un mélange exogène (produit à l'extérieur de l'organisme) altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou sous-populations » (Commission Européenne, 1996). Les substances à action endocrine peuvent avoir une action directe agoniste, tel un ligand qui se fixe sur les mêmes récep-

teurs cellulaires qu'une substance de référence et qui produit, au moins en partie, les mêmes effets. Ainsi, dans le cas d'une forte affinité entre le ligand et le récepteur, les effets d'une hormone endogène (hormone produite par l'organisme) seront imités. Les perturbateurs endocriniens peuvent également avoir une action directe antagoniste, une substance exogène antagoniste étant définie comme un ligand qui se fixe sur les mêmes récepteurs cellulaires qu'une substance de référence et qui bloque toute action biologique de la cellule. Les perturbateurs endocriniens peuvent également agir de façon indirecte sur la concentration en hormones, par exemple en déséquilibrant la production d'hormones par l'inhibition ou la stimulation d'importantes réactions de catalyse enzymatique.

Classification

Le nombre de substances susceptibles d'être perturbatrices endocriniennes n'est pas exhaustif. Les classes qui apparaissent dans le tableau 1 sont cependant les plus importantes, celles dont on a déjà observé la présence dans l'environnement aquatique et qui sont susceptibles d'entrer en interaction avec des organismes non cibles.

Toxicité

Le cas le plus représentatif d'exposition à faible ou très faible dose est celui des effluents de station d'épuration, qui peuvent dans certains cas constituer une véritable mixture de substances dont la plupart sont connues pour posséder des propriétés de perturbation endocrinienne. Le

déclenchement de la production de vitellogénine (protéine des œufs) chez des poissons mâles exposés à ces effluents est un des meilleurs exemples de perturbation endocrinienne de faible intensité chez les animaux. La vitellogénine est naturellement produite chez les poissons femelles sous le contrôle d'œstrogènes sécrétés par les ovaires. Une étude dont les résultats ont été publiés par Purdom (1994) a mesuré la concentration en vitellogénine chez des truites arc-en-ciel exposées durant 3 semaines aux effluents de station d'épuration en Angleterre, avec pour objectif l'identification de cette anomalie mais également des substances responsables. Les résultats montrent une forte augmentation en vitellogénine chez les mâles puisque la concentration qui était de 33 µg/mL

Tableau 1 : Différentes classes de substances à action endocrine (Birkett et Lester, 2003)

Substance	
Hormones stéroïdes naturelles	
Cestrone	Hormone sexuelle
17 α-œstradiol	Hormone sexuelle
CEstriol	Hormone sexuelle
Médicaments / Hormones synthétiques	
17-α-Ethinylœstradiol	Hormone de synthèse, contraceptif
Diéthylstilbestrol	Œstrogène de synthèse
Mestranol	Hormone de synthèse, contraceptif
Tamoxifène	Traitement de certains cancers du sein
Phytoestrogènes	
Génistéine	Famille des isoflavones (légumineuses)
Formononétine	Famille des isoflavones (légumineuses)
Biochanine A	Famille des isoflavones (légumineuses)
Daidzéine	Famille des isoflavones (légumineuses)
Coumestrol	Famille des coumestanes (alimentation animale)
Alkylphénols	
Nonylphénol	Produit de dégradation
Nonylphénol éthoxylate	Agent de surface
Octylphénol	Produit de dégradation
Octylphénol éthoxylate	Agent de surface
Nonylphénol carboxylate	Produit de dégradation
Octylphénol carboxylate	Produit de dégradation
Composés organostanniques	
Tributylétain	Biocide
Composés organiques oxygénés	
Bisphénol A	Industrie plastique (production de polycarbonate et de résines époxydes)
Dioxines	Sous produits
Phtalates	Industrie plastique
Composés polychlorés	
Biphényles polychlorés (PCB)	Présents dans de nombreux secteurs de l'industrie (plastique, peintures, encres, isolation électrique...)
Retardateurs de flamme bromés	Prévention du feu
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	Sous produits de combustion, industrie chimique
Pesticides	
Lindane, Atrazine, Endosulfan, Linuron, Simazine, Dieldrine, etc	

Tableau 2 : Sources de perturbateurs endocriniens entrant dans les eaux environnementales (Birkett et Lester, 2003)

Source	Eau réceptrice	Substances susceptibles d'être présentes
Eaux usées domestiques	Eau de surface Eau souterraine Eau souterraine (alimentation)	Œstrogènes stéroïdes, Agents de surface, PAE, BPA
Eaux usées industrielles	Eau de surface Eau souterraine	Agents de surface, HAP, PCB, PBDE, pesticides, PAE, BPA
Décharge industrielle	Eau de surface Eau souterraine	Dioxines, PBDE, TBBA, PAE, PCB, HAP, pesticides, BPA
Peinture pour bateaux	Eau de surface	TBT
Écoulement agricole (récoltes)	Eau de surface Eau souterraine	Pesticides, AP, APE, PBDE, HAP
Écoulement agricole (animaux)	Eau de surface Eau souterraine	Oestrogènes stéroïdes
Ruissellement urbain	Eau de surface Eau souterraine	Pesticides, HAP
Lixiviats de décharge publique	Eau souterraine	HAP, PBDE, TBBA, BPA, PAE
Déposition par l'air	Eau de surface Eau souterraine	HAP, PCB, PCDD, PCDF, PBDE, TBBA, pesticides
Nature	Eau de surface Eau souterraine	HAP, Oestrogènes stéroïdes (phytoestrogènes)

Esters de l'acide phtalique (PAE) ; Bisphénol A (BPA) ; Hydrocarbures polyaromatiques (HAP) ; Biphényles polychlorés (PCB) ; Ethers diphényles polybromés (PBDE) ; Alkylphénols (AP) ; Alkylphénols Polyéthoxylates (APE) ; Tetrabromobisphénol A (TBBA) ; Tributylétain (TBT) ; Dibenzop-dioxines polychlorés (PCDD) et Dibenzofuranes polychlorés (PCDF).

de plasma après une semaine d'exposition, atteignait 192 µg/mL après deux semaines puis 373 µg/mL à la fin des trois semaines d'expérience. La présence de xénoestrogènes dans l'effluent de station d'épuration est donc indiscutable. En parallèle, cette même équipe a montré qu'une truite arc-en-ciel mâle plongée dans de l'eau ayant une concentration en 17- α -éthinyloestradiol de 25 ng/L durant six jours présentait une hausse de la concentration en vitellogénine de 0,001 µg/mL jusqu'à 1000 µg/mL. Cette étude témoigne du rôle majeur de la 17- α -éthinyloestradiol dans l'activité œstrogénique des effluents de station d'épuration. D'autres expériences menées avec des truites adultes mâles exposées au nonylphénol, métabolite du nonylphénol éthyoxylate utilisé comme agent de surface dans la production de détergents, ont montré une formation anormale de vitellogénine ainsi qu'une inhibition des testicules. On peut aussi citer les études qui montrent les dérèglements sexuels observés chez les rats suite à une exposition à certains phtalates. Enfin Le tributylétain (TBT) utilisé dans les peintures antiagrégation biologique sur les coques de navires a induit des changements de sexe chez des gastéropodes marins, observés sur les côtes de Grande Bretagne ou dans le pacifique à des concentrations de l'ordre du ng/L. Ces produits à base d'étain se retrouvent aussi dans certains coquillages consommés par les hommes (malformation des coquilles d'huître).

Concernant l'exposition à plus forte dose

on peut citer le cas d'un déversement accidentel de pesticides organochlorés dans les lacs en Floride (dicofol, DDT, DDE, ...) qui a induit des effets biologiques perceptibles chez les alligators avec en particulier une diminution de la taille du pénis, et des malformations des testicules. Ces alligators présentaient un taux très faible de testostérone et la présence d'œstrogènes en plus grande proportion. Des observations similaires ont été réalisées sur les tortues de ces lacs. Chez les mammifères, de nombreuses expériences menées sur des hamsters, des souris ou des rats démontrent que ces polluants peuvent induire une malformation des testicules, des modifications du cycle de reproduction ou une baisse de la fertilité.

Chez l'homme, les observations ont permis de mettre en évidence qu'une exposition foetale ou périnatale aux perturbateurs endocriniens peut entraîner une différenciation sexuelle et des malformations urogénitales suivies d'une diminution des capacités de reproduction à l'âge adulte. Parallèlement plusieurs symptômes, regroupés sous le terme de Syndrome de Dysgénésie Testiculaire, témoignent d'une altération des fonctions du système reproducteur chez l'homme depuis une vingtaine d'années comme des malformations génitales, une baisse de qualité du sperme et une augmentation des cancers des testicules et de la prostate. Chez la femme, des études épidémiologiques mettent en avant une tendance à la puberté précoce, des irrégularités menstruelles, une fertilité altérée, des

enfants prématurés, les cancers du sein et des organes génitaux en augmentation. L'origine de ces troubles du système de reproduction n'est pas clairement établie à ce jour mais il est possible que ces symptômes soient les conséquences d'une exposition aux perturbateurs endocriniens.

Ainsi, bien que l'hypothèse d'un lien entre les perturbateurs endocriniens et les anomalies liées au système reproducteur ne soit pas appuyée par un nombre suffisant de recherches, leur effet avéré sur la faune suffit à leur donner un grand intérêt en terme de santé et d'environnement.

Origine et devenir des perturbateurs endocriniens en milieu aqueux

La plupart des perturbateurs endocriniens possèdent une certaine ubiquité et peuvent être trouvés dans tous les milieux (eaux, sols, air). En ce qui concerne les polluants présents dans l'eau de rivière, les principales sources sont les effluents de station d'épuration, les eaux usées industrielles, les effluents de ferme et les lixiviats de décharge. Par ailleurs les eaux de ruissellement contribuent à la pollution diffuse par lessivage des sols.

Sources spécifiques concernant les perturbateurs endocriniens

Le tableau 2 résume les sources de perturbateurs endocriniens entrant dans les cours d'eau, souvent identifiés suite à des observations sur la faune du milieu récepteur.

Les perturbateurs endocriniens dans les eaux résiduaires

Les stations d'épuration reçoivent un large spectre de substances qui ne sont pas totalement éliminées tout au long de la filière des procédés de traitement. À leur sortie, un mélange complexe de molécules, incluant les métabolites issus du traitement, est finalement rejeté dans le milieu récupérateur. Seules certaines classes de perturbateurs endocriniens sont présentes. On y retrouve principalement les polluants naturels tels que les hormones et les phytoestrogènes ainsi que les produits chimiques d'usage domestique et industriel. Dans ce contexte, les effluents de station d'épuration sont considérés comme une source majeure de pollution œstro-

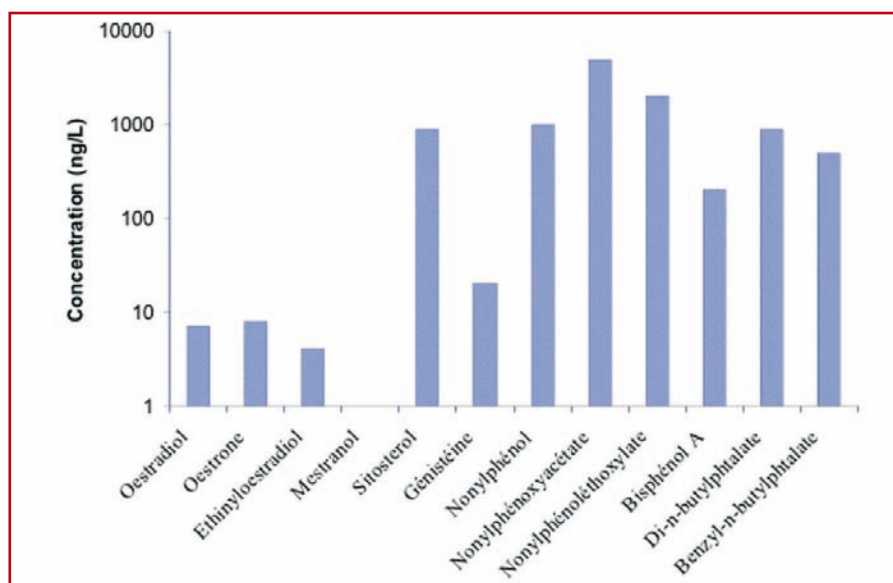


Figure 1 : Substances à action endocrine dans les eaux résiduaires d'une station d'épuration allemande (Wintgens et Melin, 2001).

génique pouvant jouer un rôle significatif dans la contamination de l'environnement (Cargouët et al., 2004). Les composés les plus souvent mis en cause en station d'épuration sont les stéroïdes naturels et de synthèse et les alkylphénols (Bruchet et Janex-Habibi, 2004).

La figure 1 présente les substances à action endocrine présentes dans les eaux résiduaires d'une station d'épuration allemande proche d'un site industriel ainsi que les niveaux de concentration correspondants. Notons qu'à l'entrée des usines de traitement d'eau potable, les mêmes molécules sont présentes à de plus faibles concentrations (dilution, dégradation dans le milieu naturel ou encore adsorption sur les sédiments). Elles sont parfois accompagnées de produits de dégradation dont on ignore généralement la toxicité.

Les substances nommées ci-dessus sont les plus courantes et sont présentes dans la majorité des eaux résiduaires des pays industrialisés. On retrouve 3 grandes classes de perturbateurs endocriniens qui sont les hormones naturelles et synthétiques (essentiellement des œstrogènes), les phénols (alkylphénols et bisphénol A) et les phtalates.

Les hormones sont excrétées via les urines ou les fèces. La plupart sont rapidement transformées et dégradées dans les stations d'épuration. Cependant, certaines hormones naturelles et synthétiques de type œstrogènes telles que l'œstrone, le 17- α -œstradiol et le 17- α -éthinyloœstradiol subsistent encore dans les effluents. Suite à des tests *in vitro* effectués sur un grand nombre de perturbateurs endocriniens, elles se sont avérées être les subs-

tances considérées comme les plus actives parmi tous les perturbateurs endocriniens (actives à faibles concentrations, c'est-à-dire de l'ordre de quelques ng/l). Les alkylphénols polyéthoxylylates font partie des agents de surfaces produits en très grande quantité et couramment utilisés dans l'industrie, l'agriculture et dans les activités domestiques (détergents). Par conséquent les alkylphénols polyéthoxylylates et leurs dérivés peuvent être retrouvés dans l'environnement à un niveau de concentration supérieur à celui des hormones ($\mu\text{g/L}$). Leur œstrogénicité, plus faible que les hormones, a été montrée sur les poissons. Le bisphénol A, fabriqué en grande quantité, est utilisé à plus de 90 % pour la production de polycarbonate, de résines époxydes, de résines polyester-styrène insaturées et de retardateurs de flamme. On le retrouve dans les plastifiants, les peintures, le papier ou encore les antioxydants. Le bisphénol A atteint l'environnement par pertes durant sa fabrication et par relargage des produits finis. De la même façon que les alkylphénols, le bisphénol A est un perturbateur endocrinien plus faible que les hormones. Les phtalates sont produits à très grande échelle, principalement dans la fabrication de matières plastiques. Ils entrent dans le milieu récepteur par des pertes durant leur fabrication, par relargage des produits finis et durant leur élimination. Certains d'entre eux, et/ou leurs métabolites, sont suspectés d'être des agents cancérigènes et des perturbateurs endocriniens. Ainsi le di-n-butylphthalate, le butylbenzyl phtalate et le di-2-éthylhexyl phtalate sont les trois grands représentants de cette classe de polluants.

La réglementation

Aujourd'hui, aucune réglementation spécifique relative aux perturbateurs endocriniens n'existe en France. Un Programme National de Recherche sur les perturbateurs endocriniens (PNRPE) a été lancé en juin 2004 par le ministère de l'environnement dont l'un des objectifs majeurs est d'établir des outils pour la réglementation. Au niveau européen des objectifs ont également été définis en 2004 par la Commission Européenne : établir une liste prioritaire de substances afin d'évaluer leur rôle dans la perturbation endocrinienne, estimer les voies d'exposition et les effets des substances de la liste prioritaire et mettre en place des programmes de recherche sur la présence de perturbateurs endocriniens dans l'eau potable, identifier les perturbateurs endocriniens, évaluer leur toxicité et lancer un important dispositif de recherche et développement ; à plus long terme il s'agit d'instaurer une législation et une régulation vis-à-vis des perturbateurs endocriniens. À ce jour, une liste prioritaire de pas moins de 553 substances a été établie avec l'objectif d'évaluer leur potentiel œstrogénique.

Méthodes d'analyse

Plusieurs méthodes sont actuellement utilisées pour détecter des perturbateurs endocriniens dans l'eau. Des tests *in vitro* et *in vivo* sont disponibles et permettent d'évaluer l'activité œstrogénique de l'échantillon. Cependant, lorsqu'il s'agit d'identifier et de quantifier précisément une substance dans une matrice donnée, les analyses chimiques sont plus adaptées. Plusieurs techniques sont disponibles actuellement pour l'analyse des perturbateurs endocriniens dans les eaux résiduaires et/ou les eaux de surface.

Parmi toutes ces techniques analytiques, la chromatographie en phase gazeuse (GC) et la chromatographie en phase liquide (LC) couplées à la spectrométrie de masse simple (MS) ou en tandem (MS/MS) sont aujourd'hui les moyens les plus adaptés pour l'analyse des perturbateurs endocriniens. Les limites de détection déjà atteintes en témoignent mais quelques composés s'avèrent encore plus compliqués à analyser, notamment les alkylphénols pour lesquels de meilleures performances sont attendues.

Tableau 3 : Techniques d'analyse utilisées pour la quantification des différentes classes de perturbateurs endocriniens dans l'environnement aquatique

Classe de polluants	Type d'échantillon	Séparation	Détection	LD (ng/L)	Référence
Hormones stéroïdes	Entrée station/Sortie station	LC	MS/MS	de 0,1 à 0,3	Stavarakakis et al., 2008
	Sortie station	GC	IC-MS	0,2	Xiao et al., 2001
	Sortie station	LC	DAD, MS (ESI)	2-500	Lopez de Alda et Barcelo, 2001
	Entrée station/Sortie station	LC	MS/MS (ESI)	0,08-0,9	Baronti et al., 2000
	Sortie station	LC	MS/MS	5-10	Lagana et al., 2004
	Sortie station	GC	MS	n.p.	Siegener et Chen, 2000
	Sortie station	GC	MS/MS	1	Kelly, 2000
	Entrée station/Sortie station	LC	MS/MS	0,2-0,5	Johnson et al., 2000
Alkylphénols	Entrée station/Sortie station	LC	MS/MS	de 0,5 à 10	Stavarakakis et al., 2008
	Sortie station	LC	APCI-MS	500	Castillo et al., 2000
	Sortie station	LC	ESI-MS	n.p.	Di Corcia et al., 2000
	Sortie station	LC	APCI/ESI-MS	20-100	Petrovic et al., 2003
	Sortie station	LC	UV	500	Ahel et al., 2000
Phtalates	Entrée station/Sortie station	LC	APCI-MS	0,06-0,1	Castillo et al.
Bisphénol A	Entrée station/Sortie station	LC	MS/MS	11	Stavarakakis et al., 2008
	Entrée station/Sortie station	GC	MS	n.p.	Lee et Peart, 2000
	Entrée station/Sortie station	GC	HRMS	n.p.	Pujadas et al., 2001

GC : chromatographie en phase gazeuse ; LC : chromatographie en phase liquide ; MS : spectrométrie de masse ; ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ; IC : chromatographie ionique ; DAD : détection à barrette de diodes ; ESI : ionisation electrospray ; APCI : ionisation chimique à pression atmosphérique ; UV : ultra-violet ; HRMS : spectrométrie de masse haute résolution ; n.p. : non précisé ; LD : limite de détection

Aujourd'hui le couplage chromatographie en phase liquide et spectrométrie de masse (LC/MS) présente d'énormes avantages : il permet notamment d'analyser des composés non volatils et à haut poids moléculaires, des composés polaires et des composés thermiquement instables qui ne pourraient pas être analysés en GC/MS ou seulement après une phase préalable de dérivation chimique. Les progrès techniques réalisés notamment dans la conception des interfaces d'ionisation (les plus courantes étant les sources ESI et APCI) ont ainsi largement contribué à l'expansion de la LC/MS ces dix dernières années.

Plusieurs types de spectromètres de masse existent ; on citera notamment dans l'ordre croissant de sélectivité et de pouvoir de résolution le spectromètre de masse quadripolaire, le spectromètre de masse à Temps de Vol (TOF : Time Of Flight) et le spectromètre de masse haute résolution à secteur magnétique. En outre, la combinaison des analyseurs de type quadripolaire (MSq/MSq) est devenue courante augmentant ainsi la sélectivité des analyses et la réduction des interférences causées par l'échantillon. L'hybridation des techniques (exemple :

q-TOF) laisse présager de performances analytiques jamais atteintes, pour l'investigation de matrices complexes comme les eaux résiduaires. Les analyseurs hybrides offrent notamment la possibilité de limiter les phases préparatoires fastidieuses et parfois pénalisantes de purification et préconcentration de la matrice. Toutefois la mise en œuvre de ces technologies demeure à ce jour financièrement inabordable dans les laboratoires d'analyses environnementales de routine, confrontés désormais à un véritable challenge analytique.

Conclusion

La présence de composés perturbateurs endocriniens dans l'environnement aquatique est une réalité : ils proviennent des rejets de l'activité industrielle, des rejets de l'activité humaine mais également de l'activité agricole. Dans ce contexte les stations d'épuration apparaissent comme des lieux de passage inévitables pour les perturbateurs endocriniens. Les nombreux exemples témoignant de l'impact de ces substances sur la vie aquatique pose la question de l'efficacité des traitements d'une filière classique. Il paraît donc nécessaire de comprendre le comportement des per-

turbateurs endocriniens au sein d'une station d'épuration afin d'améliorer les procédés de traitement et ainsi de limiter leur action sur des organismes non cibles. Ces mêmes composés risquent de se retrouver à l'entrée des usines de traitement d'eau potable. Il convient donc de vérifier si les étapes de traitements installées permettent d'éviter que l'homme soit exposé aux perturbateurs endocriniens via l'eau de consommation. Parallèlement, le développement de méthodes analytiques adaptées et fiables, au sein des laboratoires d'analyses environnementales, pour identifier et doser ce qu'il conviendrait désormais d'appeler « nano-polluants » est primordial. Cela constitue en effet une première étape indispensable pour l'observation du comportement de tels polluants en épuration des eaux qui doit permettre de confirmer leur rejet dans l'environnement et aussi d'approcher les mécanismes régissant leur élimination.

Remerciements : cet article fait suite aux travaux de thèse réalisés et publiés par Christophe Stavarakakis sous la direction du Professeur Pierre Le Cloirec (ENSCR Rennes) en collaboration avec Ronan Colin (IDAC - Nantes). ■