

**Arrêté du gouvernement wallon allouant une subvention au Groupement
d'Intérêt Scientifique wallon de Référence pour la qualité des EAUX
(GISREAUX)**

**RECHERCHE DE PERTURBATEURS ENDOCRINIENS ET D'AUTRES
SUBSTANCES D'INTÉRÊT RÉCENT DANS LES EAUX EN VUE DE LA
PROTECTION DE LA SANTE PUBLIQUE ET DE L'ENVIRONNEMENT**

PROGRAMME DE RECHERCHE « BIODIEN »

ANNEXE 1

ARRETE DE SUBVENTION

Rapport N° : 2018-01690

Cette annexe contient 19 pages

9

SERVICE PUBLIC DE WALLONIE

Arrêté du Gouvernement wallon allouant une subvention au groupement d'intérêt scientifique wallon de référence pour la qualité des eaux (GISREAUX) pour la recherche de perturbateurs endocriniens dans les eaux en vue de la protection de la santé publique et de l'environnement (Programme de recherche dénommé « BIODIEN »)

Le Gouvernement wallon,

Vu la loi spéciale du 8 avril 1980, des réformes institutionnelles, notamment l'article 6, § 1^{er}, VIII, 3^o, modifié par la loi du 8 avril 1988 ;

Vu les dispositions du chapitre V de la loi du 16 mai 2003 fixant les dispositions générales applicables aux budgets, au contrôle des subventions et à la comptabilité des communautés et des régions, ainsi qu'à l'organisation du contrôle de la Cour des comptes ;

Vu le décret du 15 décembre 2011 portant organisation du budget et de la comptabilité des Services du Gouvernement wallon ;

Vu le décret du 11 décembre 2013 contenant le budget général des dépenses de la Région wallonne pour l'année budgétaire 2014 et son programme justificatif ;

Vu le décret du 9 avril 1998 modifiant le décret du 7 juin 1990 portant création d'un Institut scientifique de service public en Région wallonne (ISSeP) ;

Vu le décret du 3 juillet 2003 créant le Centre wallon de Recherches agronomiques (CRA-W) ;

Vu le Livre II du Code de l'Environnement constituant le Code de l'Eau, notamment les articles D.20, D.179 et D.319 ;

Vu l'arrêté du Gouvernement wallon du 17 juillet 1997 relatif au contrôle administratif et budgétaire modifié par les arrêtés du Gouvernement wallon des 20 décembre 2001, 16 octobre 2003 et 8 décembre 2005 ;

Vu l'arrêté du Gouvernement wallon du 17 juillet 2009 portant règlement du fonctionnement du Gouvernement ;

Vu l'arrêté du Gouvernement wallon du 15 décembre 2011 fixant la répartition des compétences entre les Ministres et réglant la signature des actes du Gouvernement ;

Vu le contrat de gestion du 12 juin 2012 entre le Gouvernement wallon et la Société wallonne des eaux (SWDE), notamment le chapitre 3 relatif à la qualité de l'eau ;

Vu l'avis de l'Inspection des Finances, donné le 2 avril 2014 ;

Considérant l'accord de partenariat GISREAUX intervenu le 6 juin 2013 entre l'ISSeP, le CRA-W et la SWDE,

Arrête :

Article 1^{er}. Une subvention d'un montant de 398.823 € (trois cent nonante-huit mille huit cent vingt-trois euros) est allouée aux membres du groupement d'intérêt scientifique wallon de référence pour la qualité des eaux (GISREAUX) dont la coordination est actuellement assurée par l'Institut Scientifique de Service Public (ISSeP), rue du chéra 200, à 4000 Liège.

d7

Art. 2. La subvention mentionnée à l'article 1^{er} est octroyée en vue de couvrir les frais de fonctionnement, de personnel, d'entretien d'appareillage et les frais généraux relatifs au projet « Recherche des perturbateurs endocriniens dans les eaux et intéressant la santé humaine et l'environnement », à la réalisation duquel s'engagent en partenariat les laboratoires de l'ISSEP, de la SWDE et du CRA-W et dont le programme détaillé est décrit dans l'annexe 1 faisant partie intégrante du présent arrêté.

Art. 2bis. La bonne exécution des travaux dans leur ensemble est placée sous la responsabilité du coordinateur du GISREAUX qui doit veiller au respect des délais et à la qualité des livrables exigés à l'article 7 de la part des trois partenaires.

Art. 3. La durée du projet est de 24 mois prenant cours à la date du 1^{er} mars 2014.
La mission peut être prolongée sans entraîner de dépassement du budget total de la subvention avec l'accord du Comité constitué par l'article 10.

Art. 4. Les dépenses admissibles au titre de la présente subvention sont constituées des dépenses décrites à l'annexe 2 du présent arrêté, jugées utiles et nécessaires à la réalisation du projet subventionné et réellement engagées et payées par les bénéficiaires.

Art. 5. Le montant de la subvention visée à l'article 1^{er} constitue la somme maximale disponible pour couvrir les frais inhérents au projet.

La liquidation de cette subvention a lieu sur production de déclarations de créance détaillées pour chacun des « workpackages » décrits à l'annexe 1 et budgétisés à l'annexe 2.

La subvention est versée aux trois partenaires selon les modalités suivantes :

a) Pour ce qui concerne les travaux du CRA-W (WP 6) :

- un montant de 52 000 € (cinquante-deux mille euros) est liquidé 6 mois après le démarrage du projet, sur la base de la présentation d'une déclaration de créance introduite après approbation de l'état d'avancement des travaux par le Comité de pilotage scientifique mentionné à l'article 10;

- le solde de 19 840 € (dix-neuf mille huit cent quarante euros) est liquidé à la fin de la deuxième année sur base d'une déclaration de créance, après vérification des pièces justificatives attestant de l'ensemble des dépenses décrites à l'annexe 2 et couvertes par la subvention, et après approbation du rapport final mentionné à l'article 7 par le Comité de pilotage scientifique ;

- les sommes sont versées au compte n° BE63 0910 1292 8008 ouvert au nom du Centre wallon de Recherches agronomiques avec l'intitulé « programme BIODIEN » et les références reprises dans la déclaration de créance.

b) Pour ce qui concerne la SWDE (WP 7 et frais généraux concernant la cellule d'expertise scientifique) :

- un montant de 35 000 € (trente-cinq mille euros) de la subvention est liquidé 12 mois après le démarrage du projet, sur la base de la présentation d'une déclaration de créance introduite après approbation de l'état d'avancement des travaux par le Comité de pilotage scientifique mentionné à l'article 10;

- le solde de 18 800 € (dix-huit mille huit cents euros) est liquidé à la fin de la deuxième année sur base d'une déclaration de créance, après vérification des pièces justificatives attestant de l'ensemble des dépenses décrites à l'annexe 2 et couvertes par la subvention, et après approbation du rapport final mentionné à l'article 7 par le Comité de pilotage scientifique ;

- les sommes sont versées au compte n° BE72 0910 1139 6216 ouvert au nom de la Société wallonne des eaux avec l'intitulé « programme BIODIEN » et les références reprises dans la déclaration de créance.

67

c) Pour ce qui concerne les travaux de l'ISSeP (autres WP et frais généraux de coordination) :

- un montant de 148 000 € (cent quarante-huit mille euros) est liquidé 6 mois après le démarrage du projet, sur la base de la présentation d'une déclaration de créance introduite après approbation de l'état d'avancement des travaux par le Comité de pilotage scientifique mentionné à l'article 10;

- un montant de 65 000 € (soixante-cinq mille euros) est liquidé douze mois après le démarrage du projet, sur la base de la présentation d'une déclaration de créance introduite après approbation par le Comité de pilotage scientifique du rapport intermédiaire mentionné à l'article 7, à titre de deuxième avance ; en outre, le paiement de cette deuxième tranche est subordonné à la production de pièces permettant de justifier de l'utilisation de la première tranche ;

- le solde de 60 183 € (soixante mille cent quatre-vingt trois euros) est liquidé à la fin de la deuxième année sur base d'une déclaration de créance, après vérification des pièces justificatives attestant de l'ensemble des dépenses décrites à l'annexe 2 et couvertes par la subvention, et après approbation du rapport final mentionné à l'article 7 par le Comité de pilotage scientifique.

Le remboursement des frais généraux relatifs à la coordination GISREAUX est effectué au prorata des travaux acceptés par le Comité de pilotage scientifique.

Les sommes sont versées au compte n° 091-0127032-88 ouvert au nom de l'Institut scientifique de Service public, avec l'intitulé « programme BIODIEN » et les références reprises dans la déclaration de créance.

Le versement de la subvention, à concurrence du montant prévu à l'article 1^{er} du présent arrêté, n'a pas pour conséquence de créer dans le chef des bénéficiaires un droit inconditionnel à l'octroi de la subvention, chaque versement étant considéré comme ayant été liquidé à titre de provision.

Aucun intérêt de retard ne peut être réclamé relativement à l'exécution des paiements effectués dans le cadre du présent arrêté.

La subvention n'est définitivement acquise qu'après approbation par la Direction générale opérationnelle Agriculture, Ressources naturelles et Environnement (DGO3) du Service public de Wallonie, des comptes définitifs, arrêtés par le coordinateur du GISREAUX.

Les bénéficiaires de la subvention mettent à la disposition de la Wallonie ou de toute personne mandatée par celle-ci, ainsi que de la Cour des Comptes, les documents généraux et comptables nécessaires au contrôle de l'exécution de sa mission.

La partie non justifiée de la subvention telle qu'elle apparaîtrait dans les comptes arrêtés conformément aux dispositions du présent arrêté doit être remboursée au SPW.

Art. 6. La subvention est imputée comme suit :

398 823 € (trois cent nonante-huit mille huit cent vingt-trois euros) à charge de l'allocation de base 01.03., Programme 13 de la Division organique 15, Titre I du Budget des dépenses de la Région wallonne pour l'année 2014.

Art. 7. (délivrables)

Six mois après le début du projet, le coordinateur du GISREAUX présente au Comité de pilotage institué à l'article 10, un état d'avancement de la mise au point des méthodes analytiques requises par le projet (chimie organique, bio-essais).

Douze mois après le début du projet, le coordinateur du GISREAUX présente un rapport intermédiaire portant sur la mise au point des méthodes d'analyse pour les polluants émergents recherchés dans le cadre du projet, leur validation sur une présélection d'échantillons de terrain, les actions déployées, les problèmes rencontrés (et les solutions apportées), les résultats acquis et les propositions qu'il formule pour la suite des travaux.

47

Un mois avant le terme du projet, le coordinateur du GISREAUX présente les contributions des trois partenaires au dossier scientifique complet constituant le rapport final des projets IMHOTEP et BIODIEN. Ces contributions intègrent notamment (i) un état de l'art de la problématique des perturbateurs endocriniens dans le cycle anthropique de l'eau, (ii) le descriptif des méthodes mises au point, (iii) l'ensemble des résultats des essais et analyses repris dans l'annexe 1 du présent arrêté, (iv) l'interprétation de ces résultats en termes de risques pour la santé humaine et l'environnement (analyse (éco-)toxicologique) et (v) sur base de cette analyse de risques, les recommandations les plus appropriées à destination des gestionnaires des ressources en eau en Wallonie.

Les rapports sont rédigés par les partenaires avec l'aide de la cellule d'expertise scientifique selon leurs contributions respectives et approuvés par le Comité constitué par l'article 10.

Art. 8. Pour le suivi technico-scientifique du projet, il est constitué un groupe de travail au même titre que ceux existants dans le programme IMHOTEP, constitué de membres du comité de pilotage scientifique d'IMHOTEP, des experts idoines issus de la cellule d'expertise scientifique du projet IMHOTEP et de toute personne utile au bon déroulement des travaux.

La présidence et l'animation de ce groupe de travail sont confiées au coordinateur du GISREAUX.

Le groupe de travail se réunit au minimum avant chaque réunion du Comité de pilotage scientifique du projet IMHOTEP afin de préparer le rapportage de l'état d'avancement des travaux qui doit lui être adressé.

Art. 9. La Wallonie et les bénéficiaires sont co-propriétaires, de plein droit, des résultats de la recherche faisant l'objet du présent arrêté.

Toute publication ou toute autre forme de diffusion relative à l'objet du présent arrêté est soumise à l'approbation du Comité de pilotage scientifique constitué par l'article 10 et fait mention de la Wallonie comme source de financement.

Les bénéficiaires associeront la Wallonie aux actions subventionnées dans le cadre du présent arrêté, en apposant notamment le logo officiel de la Wallonie dans les campagnes de publicité et de promotion du projet. Ces éléments peuvent être téléchargés à l'adresse suivante : <http://charte graphique.wallonie.be>

Le contenu scientifique et technique des publications des bénéficiaires et des auteurs associés et de leurs recommandations est soumis à l'avis du Comité de pilotage scientifique constitué par l'article 10.

Le bénéficiaire d'une aide régionale est tenu de respecter les dispositions du décret du 1^{er} avril 2004, relatif au contrôle des communications gouvernementales et les règles arrêtées par la Commission de contrôle que le décret a institué. Dans ce cadre, le bénéficiaire ne peut ni nommer ni faire figurer de photo du Ministre qui accorde l'aide financière, dans quelque publication que ce soit, sans en faire au préalable la demande au Ministre concerné, lequel doit lui-même en demander l'autorisation à la Commission de contrôle. Cette demande doit parvenir au Ministre concerné au moins un mois avant l'impression de la publication visée ou une mise en ligne sur un site Internet. La violation de ces règles dans le chef du bénéficiaire entraîne d'office la réclamation de l'aide régionale qui lui a été allouée.

Art. 10. Le Comité de pilotage scientifique du projet BIODIEN est identique à celui du projet IMHOTEP afin que celui-ci puisse vérifier la bonne synergie et complémentarité entre les deux projets. Il se réunit au même moment et avec la même fréquence.

47

Le comité de pilotage scientifique du projet IMHOTEP dispose des mêmes prérogatives concernant le projet BIODIEN et assure également la coordination administrative et le suivi de l'état d'avancement des travaux, l'assistance technique aux bénéficiaires, la validation et la publication des résultats du programme de recherche BIODIEN.

L'article 10, alinéa 2, de l'arrêté du Gouvernement wallon du 28 juin 2012 allouant une subvention à la société wallonne des eaux pour la recherche des substances émergentes dans les eaux et intéressant la santé publique et l'environnement, fixant la composition du comité de suivi administratif du projet IMHOTEP, est complété comme suit :

- d'un représentant de l'Institut bruxellois de gestion de l'environnement ;
- d'un représentant du CRA-W ;
- d'un représentant du DPEAI de la DGO3 ;
- du coordinateur du GISREAU.

Art. 11. Sans préjudice des présentes dispositions, les bénéficiaires de la subvention gèrent le personnel sous leur seule responsabilité. Ils informent immédiatement le président du Comité de pilotage scientifique ou son délégué de tout engagement ou remplacement à ce niveau.

La Wallonie ne peut être tenue pour responsable de tout dommage causé à des tiers du chef de la réalisation du projet subventionné.

Art. 12. Les trois bénéficiaires s'engagent à exécuter tous les travaux jugés indispensables et, en général, à remplir toutes les obligations nécessaires au bon aboutissement du projet.

Si un bénéficiaire ne respecte pas ses obligations, le paiement de la subvention peut être suspendu et les montants de la subvention déjà versés, récupérés.

Art. 13. La présente subvention est soumise à toutes les dispositions en matière de contrôle de l'octroi et de l'emploi des subventions accordées par les régions telles que prévues par les articles 11 à 14 de la loi du 16 mai 2003 fixant les dispositions générales applicables aux budgets, au contrôle des subventions et à la comptabilité des communautés et régions, ainsi qu'à l'organisation du contrôle de la Cour des comptes. Toutes les obligations mises à charge des bénéficiaires dans le présent arrêté constituent des conditions d'octroi de la subvention au sens des articles précités.

Namur, le 15 mai 2014.

Le Ministre-Président,



R. DEMOTTE,

Le Ministre de l'Aménagement du Territoire, de l'Environnement et de la Mobilité,

Pour copie conforme
11 juin 2014



HELLORE F., Attaché

Ph. HENRY



ANNEXE 1

Programme détaillé

BIODIEN (BIOessais DIrupteurs ENdocriniens)

A. Introduction – contexte

Les perturbateurs endocriniens (PE), selon la définition de l'OMS¹, sont des substances exogènes qui altèrent les fonctions des systèmes endocriniens et par conséquent entraînent des effets néfastes sur les organismes et les populations. Plus précisément, l'USEPA² se base plutôt sur les effets biologiques spécifiques pour élaborer sa définition : synthèse, sécrétion, transport, élimination des hormones naturelles responsables de la maintenance de l'homéostasie, reproduction, développement et comportement.

Ils constituent un challenge majeur, tant pour la santé humaine que pour l'environnement. Partout dans le monde, le cancer des testicules et du sein progressent et le nombre de spermatozoïdes diminue. L'âge de la puberté chez les jeunes filles a diminué et d'autres maladies, ne touchant pas nécessairement le système reproducteur, ont également progressé en lien avec les PE. Sur la faune, des effets sont avérés depuis de nombreuses années : diminution de la résistance générale, augmentation en taille de la thyroïde, du foie, anomalies testiculaires et ovariennes, perturbation des hormones thyroïdiennes, des œstrogènes et des androgènes. Par exemple, plusieurs études concernant les effets œstrogéniques chez les poissons ont révélé que les substances présentes dans l'eau (généralement des œstrogènes stéroïdes naturels et des alkylphénols) sont responsables de la féminisation des poissons mâles qui sont qualifiés « intersex ».

Les perturbateurs endocriniens sont des substances de structures très diverses. Ils comprennent une grande variété de classes chimiques qui rendent difficiles une recherche et une étude systématique, d'où l'intérêt pour ces catégories de substances d'utiliser des outils basés sur l'effet dans une approche de screening pour orienter le monitoring chimique.

Bien que très diversifiés en termes de structure, tous les composés partagent, en effet, des mécanismes communs avec des effets biologiques comme :

- le mimétisme ou l'antagonisme des effets des hormones ;
- l'altération des voies de synthèse et de métabolisme des hormones ;
- la modification au niveau des récepteurs hormonaux.

Au final, ces composés ont la capacité d'exercer des effets néfastes sur les plantes, les animaux, l'homme, et éventuellement tous les écosystèmes. La plupart des composés chimiques avec une activité endocrinienne sont œstrogéniques et seule une petite partie a un

¹ Organisation mondiale de la Santé

² US Environmental Protection Agency

potentiel androgénique ou anti-androgénique. L'union européenne a établi une liste de perturbateurs endocriniens, parmi lesquels 150 sont des composés synthétiques et 7 sont naturels. Certains sont des polluants organiques persistants (POPs), d'autres sont dégradés rapidement dans l'environnement ou métabolisés. Certains métaux lourds sont aussi connus pour affecter le système endocrinien.

Les perturbateurs endocriniens entrent dans l'environnement aquatique à partir de différentes sources :

- les effluents de stations d'épuration ;
- les eaux de ruissellement des milieux urbains, des routes, et celles issues des sols agricoles ;
- les rejets directs en eaux de surface ;
- les rejets accidentels.

Au début des années 2000, consciente du problème, la **Commission Européenne** a mis en œuvre une **stratégie communautaire concernant les perturbateurs endocriniens** (COM/99/0706 final et COM/2001/0262 final). Ces documents prévoient notamment de *veiller à ce que d'autres mesures telles que la législation concernant la protection de l'environnement (la directive-cadre sur l'eau³, par exemple) ou les consommateurs tiennent compte de la perturbation endocrinienne.*

Pour faciliter l'implémentation commune de la directive cadre sur l'eau, des groupes de travail (WG – Working Group) ont été mis en place. Le WG E s'intéresse aux aspects concernant les substances prioritaires et les aspects chimiques. Un sous-groupe de ce WG E, le CMEP (pour Chemical Monitoring and Emerging Pollutants), s'intéresse au monitoring des polluants émergents. Ses activités sont coordonnées par la DG ENV et le JRC. Dans le cadre de ses travaux, la rédaction d'un « TECHNICAL REPORT ON AQUATIC EFFECT-BASED MONITORING TOOLS » est en cours de finalisation. Ce rapport met notamment en évidence le rôle important des biotests *in vitro* pour le screening des perturbateurs endocriniens dans l'environnement et pour identifier les risques encourus par les masses d'eau suite à l'exposition combinée à plusieurs substances œstrogéniques. Trois tests sont recommandés, dont le YES (Yeast Estrogen Screen) test. Ce test mécanistique, utilisant des levures génétiquement modifiées permettant de quantifier l'activité œstrogénique de diverses matrices, a fait ses preuves dans de nombreux pays comme la France, où il a été utilisé avec succès dans le cadre du Programme National sur les Perturbateurs Endocriniens (PNRPE), en Suisse, où l'Oekotoxzentrum à Dübendorf l'utilise également, en Suède, où il a été mis en œuvre dans le cadre du screening national de 2005 (IVL, 2006). Le YES test a également été utilisé dans le cadre du programme européen COMPREHEND (Community Programme of Research on Endocrine Disrupters and Environmental Hormones) qui met en évidence la robustesse du test et sa fiabilité. Une relative simplicité et un coût abordable permettent également son utilisation en routine. Il s'agit là d'une liste non exhaustive de projets importants ayant utilisé le YES test ou le YAS test (Yeast Androgen Screen), mais en matière de suivi des effets des perturbateurs endocriniens, ils sont parmi les plus utilisés (Burkhardt Holm, 2010).

³ Annexe VIII de la directive 2000/60/CE: liste des principaux polluants : point 4. *Substances et préparations, où leurs produits de décomposition, dont le caractère cancérogène ou mutagène ou les propriétés pouvant affecter les fonctions stéroïdogénique, thyroïdienne ou reproductive ou d'autres fonctions endocriniennes dans ou via le milieu aquatique ont été démontrés.*

B. Objectifs et méthodologie

1. Objectifs du projet

Les perturbateurs endocriniens constituent, par leurs effets, une menace pour les populations d'organismes aquatiques et donc pour les écosystèmes. Le risque de féminisation des poissons est particulièrement préoccupant. En effet, ils constituent un des éléments biologiques permettant de définir l'état écologique des masses d'eau de surface. Dans la Directive cadre, pour ce qui est de l'ichtyofaune, on peut d'ailleurs lire comme caractéristiques d'un très bon état : *Les structures d'âge des communautés n'indiquent guère de perturbation anthropogénique et ne révèlent pas de troubles dans la reproduction ou dans le développement d'une espèce particulière.* Pour le bon état, ces troubles doivent être modérés. Ces caractéristiques ont été prises en compte dans le calcul de l'indice biotique via la structure d'âge.

Il est donc important de disposer d'outils capables de mettre en évidence la présence de substances qui perturbent les fonctions endocriniennes.

Le Gouvernement wallon a récemment alloué une subvention à la SWDE pour la recherche des substances émergentes (hormones stéroïdiennes et résidus de médicaments) dans les eaux et intéressant la santé publique et l'environnement (programme IMHOTEP). Toutes ces substances ne sont pas des perturbateurs endocriniens, mais il est prévu qu'un certain nombre d'analyses réalisées dans le cadre du programme IMHOTEP servira à « valider » les screenings de perturbation endocrinienne par levures effectués par l'ISSeP (YES test et YAS test). Le financement de ces bioessais n'est toutefois pas prévu dans le cadre de la subvention susmentionnée.

Le programme IMHOTEP s'intéresse principalement aux hormones et aux résidus de médicaments. Parmi les 44 substances actuellement envisagées dans le projet IMHOTEP, seules quelques hormones et le bactéricide triclosan sont susceptibles de faire réagir le YES test, alors que d'autres substances non analysées mais potentiellement présentes dans l'environnement peuvent aussi le faire réagir (nonylphénols, PBDE, bisphénol A, phtalates, etc.). Dans l'optique d'une recherche des perturbateurs endocriniens et de la comparaison avec les analyses chimiques pour évaluer le potentiel des bioessais comme outil de screening, il est donc important de mener des analyses chimiques complémentaires prenant en compte les perturbateurs endocriniens (autres que médicamenteux et hormonaux) les plus couramment retrouvés dans l'environnement.

Pour avoir une vision plus globale de la présence de perturbateurs endocriniens dans le milieu aquatique, ces autres familles de micropolluants organiques seront également analysées sans screening YES/YAS sur environ cent cinquante autres échantillons prévus dans le projet IMHOTEP, en Wallonie et, si possible, en Région Bruxelles-Capitale.

Il est également intéressant de mettre en parallèle, pour quelques analyses, les résultats obtenus avec le YES test et ceux obtenus avec un autre test souvent recommandé (comme par exemple le MELN) et d'autres méthodes de screening rapide de type ELISA.

Les principaux objectifs du projet peuvent être résumés en quatre points :

- compléter l'inventaire de la qualité des eaux wallonnes initié dans le projet IMHOTEP par la recherche de substances réputées perturbateurs endocriniens sur environ 250 échantillons jugés représentatifs ;
- évaluer le niveau d'activité (anti-)oestrogénique et (anti-)androgénique d'une centaine d'échantillons ;
- évaluer le potentiel des bioessais sur levure (YES/YAS tests) comme outils de screening (cf. point 8 du projet IMHOTEP) ;
- comparer les performances des YES/YAS tests avec d'autres méthodes de screening (kits ELISA).

2. Méthodologie générale

Il est proposé de réaliser le suivi d'environ 250 échantillons répartis de la sorte :

- 230 échantillons déjà prélevés dans le cadre du projet IMHOTEP parmi lesquels :
 - o 10 échantillons d'eau en bouteille
 - o 120 échantillons prélevés dans le cadre des réseaux de mesure gérés par l'ISSEP
 - o 100 échantillons d'eaux prélevés en dehors des réseaux de mesure gérés par l'ISSEP dont 50 pourraient être prélevés en région Bruxelles-Capitale moyennant la collaboration de l'IBGE.
- 20 échantillons supplémentaires prélevés dans le cadre du projet BIODIEN.

La répartition des analyses prévues sur ces différents échantillons est résumée à la Figure 1.

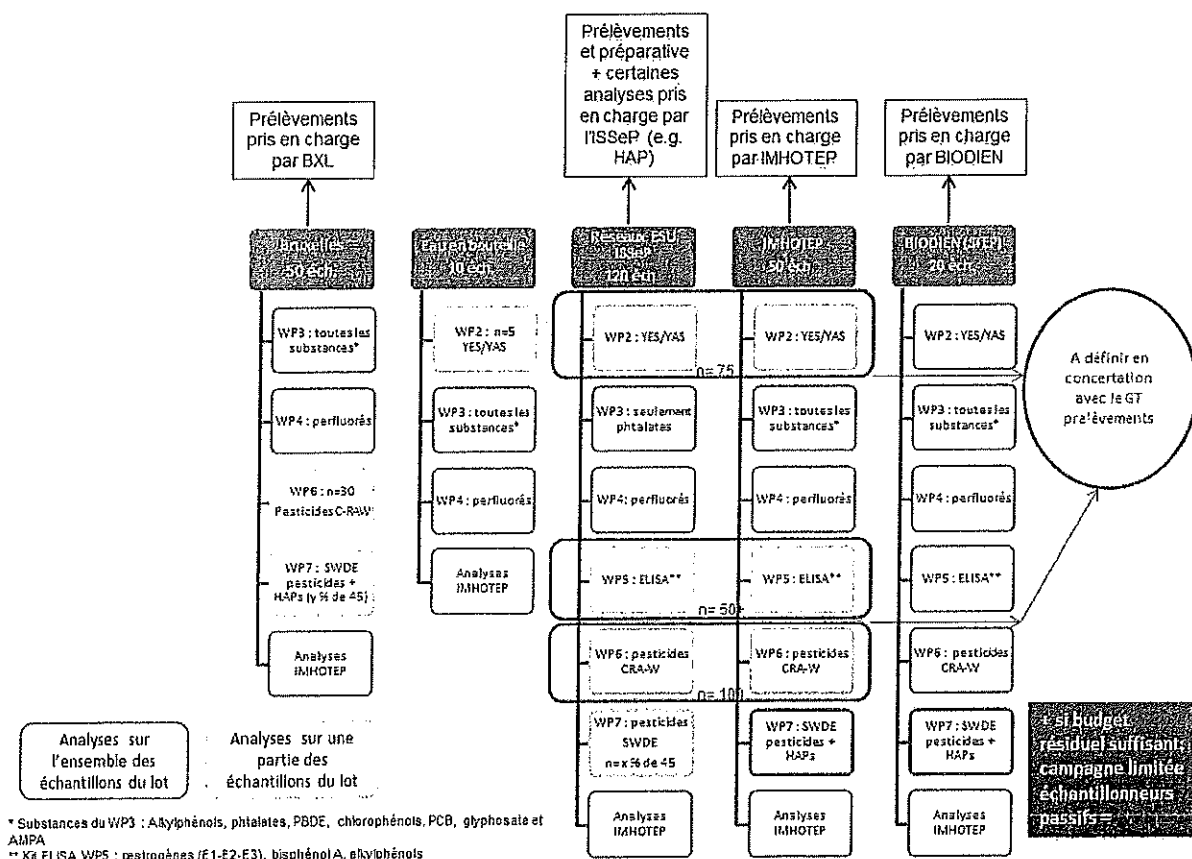


Figure 1. Plan d'analyses

Dans une optique d'optimisation, la majorité des prélèvements ainsi qu'une série d'analyses seront pris en charge par d'autres subventions gérées par la DGO3 (projet IMHOTEP, Réseaux ISSeP, projet GISER...).

In fine, la liste des 250 échantillons à prélever sera définitivement arrêtée par les membres du GT Echantillonnage du projet IMHOTEP, sur base des propositions énoncées ci-avant.

Des résultats d'activité oestrogénique obtenus dans le cadre du réseau (eaux de surface et effluents industriels) pourraient être utilisés en vue de prioriser certaines stations de prélèvement. Les tests ELISA pourraient également être utilisés dans le cadre de cette sélection. Le nombre d'analyses utilisées à cette fin sera toutefois déduit du nombre total d'analyses ELISA prévues dans le cadre du présent projet.

Les **analyses** réalisées viseront à évaluer les activités (anti)-oestrogéniques et (anti)-androgéniques à l'aide, respectivement, du YES et du YAS test (test *in vitro* utilisant des levures génétiquement modifiées par l'insertion notamment du récepteur humain à oestrogène et à androgène). Des analyses chimiques (cf. Figure 1 et description des WPs ci-après) seront réalisées en parallèle afin de compléter le panel de substances mesurées dans le cadre du projet IMHOTEP et pouvoir établir un lien entre les concentrations des différents perturbateurs endocriniens et les activités mesurées.

Finalement, il est prévu en fin de projet d'initier la mise en œuvre d'une campagne de mesures sur échantillonneurs passifs.

C. Programme de travail détaillé

Workpackage 1 : Prélèvement d'échantillons ponctuels

Outre les eaux en bouteille, les échantillons fournis par les réseaux ISSeP et les échantillons prélevés dans le cadre du projet IMHOTEP, **20 échantillons** ponctuels supplémentaires sont à prélever. Il est proposé de réaliser ces prélèvements au droit de rejets de stations d'épuration, en vue de caractériser l'influence de ces rejets sur la qualité des eaux de surface wallonnes. Ces échantillons pourraient par exemple être répartis sur 10 STEPs, avec à chaque fois un prélèvement en amont et un prélèvement en aval du rejet. La détermination des lieux de prélèvements se fera en concertation avec le GT Echantillonnage. Le GT Echantillonnage se prononcera également sur l'opportunité de réaliser d'autres types de prélèvement (par exemple, directement dans le rejet, ...)

Workpackage 2 : Analyses YES/YAS test

Les analyses YES/YAS (détermination de l'activité (anti)-oestrogénique et (anti)-androgénique) se feront sur un total de **100 échantillons** répartis en (cf. Figure 1) :

- 5 échantillons d'eau embouteillée

- 75 échantillons parmi les 120 prélevés au sein des réseaux « eaux de surface » de l'ISSeP et 50 autres échantillons prélevés aussi dans le cadre du projet IMHOTEP mais en dehors des réseaux ISSeP
- 20 échantillons prélevés dans le cadre du WP1 (STEP).

Cette répartition sera discutée en concertation avec le GT Echantillonnage du projet IMHOTEP.

Les résultats des YES/YAS seront mis en parallèle avec les résultats des analyses chimiques. En ce qui concerne l'activité oestrogénique (activité de loin la plus couramment étudiée dans la bibliographie), l'activité mesurée via le YES test sera comparée à l'activité calculée⁴.

Un budget de sous-traitance permettra de comparer les activités obtenues avec les YES/YAS tests avec celles obtenues à l'aide d'autres bioessais (comme par exemple MELN, ER/AR-CALUX).

Workpackage 3 : Analyses chimiques de perturbateurs endocriniens à l'ISSeP

Le choix des familles de substances à analyser découle essentiellement de l'analyse des informations contenues dans les documents de l'OMS « Endocrine Disrupting Chemicals - 2012 » et de la Commission Européenne « State of the art assessment of endocrine disrupters - Project Contract Number 070307/2009/550687/SER/D3-version révisée du 29.01.2012 ». Au sein de ces familles de substances, seuls certains constituants sont considérés comme ayant plus particulièrement des effets de perturbateurs endocriniens.

Les niveaux de concentration des familles de substances telles que les alkylphénols et éthoxylates, les phtalates, les PBDE, les chlorophénols, les PCB, les HAP, le glyphosate et son métabolite AMPA seront donc déterminés pour les **250 échantillons** repris en figure 1. Au niveau des HAP, seules les eaux des réseaux ESU ISSeP (120 échantillons) seront analysées dans le cadre de ce WP 3 ; les niveaux de concentration des HAP dans les autres eaux seront déterminés dans le cadre du WP7 (SWDE).

Outre la mise au point des méthodes d'analyse pour quelques constituants considérés comme perturbateurs endocriniens ou jugés utiles et non présents dans les analyses de routine à savoir le tétrabromobisphénol A, le nonylphenoxyacetic acid NPE1C et certains phtalates, les méthodes d'analyse pour ces familles sont déjà mises au point à l'ISSeP et tournent en routine.

Les noms des substances qui seront analysées sont présentés ci-dessous, par type de famille :

Alkylphénols et éthoxylates	Chlorophénols	HAP
bisphénol A	2-chlorophénol	Naphtalène
4 tert octylphénol	3-chlorophénol	Acénaphène
4 tert octylphénol monoéthoxylate	4-chlorophénol	Acénaphtylène

⁴ Combinaison de l'activité relative de chacune des principales substances œstrogéniques par rapport à la substance de référence 17 β -estradiol obtenue avec le YES test. L'activité relative sera soit déterminée expérimentalement avec les conditions d'essai adoptées, soit sur base de données de la bibliographie. Vu la quantité de substances recherchées dans ce projet, seules les substances les plus potentiellement actives seront utilisées pour ce calcul (E1, E2, E3, EE2, BPA, NP).

4 tert octylphénol diéthoxylate 4-nonylphénol (mélange de branchés) nonylphénol monoéthoxylate nonylphénol diéthoxylate 4-n-nonylphénol tétra bromobisphénol A (TBBPA) NPE1C	4-chloro-3-méthylphénol 2,4-dichlorophénol 2,5-dichlorophénol 2,4,6-trichlorophénol 2,3,6-trichlorophénol 2,3,5-trichlorophénol 2,4,5-trichlorophénol 2,3,4-trichlorophénol Pentachlorophénol	Fluorène Phénanthrène Anthracène Fluoranthène Pyrène Benzoanthracène Chrysène Benzo(b)fluoranthène Benzo(k)fluoranthène Benzo(a)pyrène Dibenzoanthracène Benzo(g,h,i)pérylène Indéno(1,2,3-c,d)pyrène
Phtalates	Polybromodiphényléthers	
di-éthylhexylphtalate (DEHP)	BDE 28 (tri-)	
di-décyl phtalate (DDcP)	BDE 47 (tétra-)	
di-n-octyl phtalate (DOP)	BDE 99 (penta-)	
dicyclohexyl phtalate (DCHP)	BDE 100 (penta-)	
benzyl butyl phtalate (BBP)	BDE 153 (hexa-)	
dibutyl phtalate (DBP)	BDE 154 (hexa-)	
diéthyl phtalate (DEP)	BDE 183 (hepta-)	
dipropyl phtalate (DPP)		
diméthyl phtalate (DMP)	Pesticides	
diisononylphtalate (DINP)	Glyphosate	
	AMPA	
		PCB
		PCB 28
		PCB 52
		PCB 101
		PCB 138
		PCB 118
		PCB 153
		PCB 180

Workpackage 4 : Mise au point de la méthode d'analyse des composés perfluorés

Le terme « composés perfluorés » (PFC) se réfère à une vaste famille de molécules chimiques comprenant des oligomères et des polymères. Il s'agit de composés tensio-actifs, neutres ou anioniques, présentant une grande stabilité sur les plans thermique, chimique et biologique.

Les composés perfluorés ont été ou sont utilisés dans de nombreuses applications industrielles, notamment pour les traitements anti-taches et imperméabilisants de textiles (vêtements, tissus, tapis, moquettes...), les enduits résistants aux matières grasses, les emballages en papier et/ou en carton autorisés pour le contact alimentaire, les revêtements anti-adhésifs, les mousses anti-incendie, les tensioactifs utilisés dans l'exploitation minière et les puits de pétrole, les cires à parquet, ou encore certaines formulations d'insecticides.

Depuis quelques années, un sous-groupe important au sein de cette famille de polluants chimiques émergents est celui des tensio-actifs organiques tels que le sulfonate de perfluorooctane (PFOS) et l'acide perfluorooctanoïque (PFOA), qui présentent une chaîne carbonée à huit atomes de carbone. Ces deux substances étant les principaux produits de dégradation finaux de nombreux composés perfluorés, elles sont retrouvées de façon généralement prépondérante dans les matrices environnementales ou biologiques. Le perfluorooctanesulfonique acide (PFOS) et ses dérivés figurent parmi les paramètres repris dans la Directive 2013/39/EU concernant les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau. Ces composés sont suspectés de réduire la fécondité féminine, d'altérer le cycle menstruel et de réduire le développement fœtal.

L'analyse de ces composés perfluorés (PFOS et PFOA) sera réalisée sur les **250 échantillons** moyennant une étape de mise au point préalable avant l'analyse des premiers échantillons (septembre 2014).

L'opportunité d'analyser d'autres composés perfluorés retrouvés fréquemment dans les eaux sera évaluée (PFHxA, PFHxS, PFHpA, PFHpS, ...) en se basant sur la bibliographie.

Workpackage 5 : Analyses de perturbateurs endocriniens par kit de type ELISA

Le principe de la technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) repose sur une reconnaissance immunoenzymatique. Le dosage se fait via une réaction catalysée par une enzyme qui libère un composé coloré mesurable par spectroscopie. Actuellement, de nombreuses substances telles que des toxines, protéines, molécules organiques, résidus médicamenteux... peuvent être détectées/dosées par cette technique. Ces tests permettent de réaliser un screening rapide, d'orienter les analyses ultérieures et donc de choisir les sites d'études à investiguer.

Dans le cadre du projet BIODIEN, le test ELISA sera utilisé pour la détection des œstrogènes (E1-E2-E3), des alkylphénols et du bisphénol A. Les tests ELISA concerneront environ **70 échantillons** parmi ceux faisant l'objet d'une analyse YES/YAS (hormis les eaux embouteillées ; cf Figure 1). Le nombre d'échantillons testés pourra éventuellement augmenter s'il y a possibilité de constituer des lots d'échantillons.

Le projet permettra de vérifier la bonne correspondance entre les résultats obtenus d'une part par les YES/YAS tests et d'autre part par les analyses chimiques. En fonction des résultats obtenus, on pourra mieux évaluer la pertinence d'utiliser ces tests pour le screening des sites à échantillonner, soit envisager une réorientation des substances à tester par cette technique.

Workpackage 6 : Analyses chimiques de pesticides agissant comme perturbateurs endocriniens par le CRA-W

Ce volet porte sur l'analyse d'environ **150 échantillons** sur 2 ans (cf. Figure 1) et dont une partie concernera les échantillons analysés par le YES/YAS test (WP2). Il est proposé d'analyser des pesticides qui figurent dans la liste prioritaire du programme d'actions de la Commission Environnement de l'Union Européenne concernant les perturbateurs endocriniens de tout type (à action œstrogénique et androgénique ou non). Sur base de la catégorisation réalisée par les experts européens reprise dans la base de données EDs et qui

classifie 432 substances actives de la façon suivante : catégorie 1 (au moins un cas avéré scientifiquement en in vivo), catégorie 2 (au moins un cas avéré scientifiquement en in vitro) et les catégories 3a (pas de données scientifiques) et 3b (pas de données), seuls les pesticides repris dans les catégories 1 et 2 ont été sélectionnés, en prenant en compte également l'évaluation du risque en rapport avec l'exposition⁵. Certains pesticides classés en catégories 3 ou non classifiés feront également l'objet d'analyses soit comme indicateurs, ou à titre informatif en raison de leur caractère de polluants émergent dans les eaux de surface suite aux résultats du projet PESTEUX (CRA-W, 2009-2010).

Pour les pesticides qui n'ont pas encore été analysés par les laboratoires du GISREUX, une méthode d'analyse devra être mise au point et validée avant l'analyse des échantillons.

La liste des substances à considérer dans le cadre du projet est reprise dans le tableau ci-dessous :

Substance active	Catégorie de toxicité			Exposition EU	Agréation agricole	Agréation biocide	Familles	Classes/groupe s chimiques
	1	2	3					
bifenthrin	X			XX			I	pyréthri-noïdes
carbaryl	X			XX			I	carbamates
cyhalothrin	X			XX			I	pyréthri-noïdes
deltamethrin	X			XX	X		I	pyréthri-noïdes
fenarimol	X			XX			F	dérivés de la pyrimidine
ketokonazole	X			XX	-			Imidazoles (hepatotoxique)
methoxychlor	X			XX			I	organochlorés
procymidone	X			XX	X		F	dicarboximides
resmethrin	X			XX	-		I	pyréthri-noïdes
picloram	X			X	-		H	pyridines
amitrol	X						H	triazoles
chlordane	X				-		I	organochlorés
chlordecone	X				-		I	organochlorés
mancozeb	X				X		F	dithiocarbamates
maneb	X						F	dithiocarbamates
omethoate	X						I	organophosphorés
thiram	X				X		F	carbamates
vinclozolin	X						F	dicarboximides
zineb	X						F	dithiocarbamates
bioalletrin (trans-allethrin)		X					I	pyréthri-noïdes

⁵ Sur base des informations contenues dans les documents suivants : "Annex 13, The summary profile of (41) category 1 chemical group 1", "Study on gathering information on 435 substances with insufficient data (EU final report 2002)" et "Second list of chemicals for Tier 1 screening, US FDA".

cypermethrin		X			X		I	pyréthrinoïdes
etridiazole		X					F	thiadiazoles
fenvalerate		X					I	pyréthrinoïdes
fenoxycarb		X					I	carbamates
fluvalinate		X			X		I	pyréthrinoïdes de synthèse
iprodione		X			X		F	dicarboxidimes
permethrin		X					I	pyréthrinoïdes
phenothrin (sumithrin)		X					I	pyréthrinoïdes de synthèse
pyrethrins		X			X	X	I	pyréthrinoïdes
triadimenol		X			X		F	triazoles
ziram		X					F	carbamates
chlorothalonil					X		F	organochlorés
chlorpyrifos			X		X		I	organophosphorés
cloquintocet- mexyl					X			-
cyproconazole			X		X		F	triazoles
difenoconazole			X		X		F	triazoles
epoxiconazole			X		X		F	triazoles
fluoxastrobine					X		F	strobilurines

Familles : I = insecticide, F = fongicide, H = herbicide.

La quasi-totalité des pesticides de catégorie 1 ont vu leur agréation pour usage agricole retirée dans le courant des années 2000 en raison de leur toxicité (thiram et deltaméthrin encore agréés), à l'exception du chlordane et du chlordecone dont le retrait est plus ancien mais qui sont toutefois maintenus dans la liste en raison de leur très grande persistance et de leur bioaccumulabilité. Le ketoconazole n'est pas agréé pour des usages agricoles mais est abondamment utilisé dans les préparations fongicides à usage médical (nizoral). Certains pesticides repris en catégorie 2 sont encore agréés.

Certaines substances actives ne sont pas reprises dans cette liste mais sont toutefois utilisées comme biocides. Ces substances pourraient être ajoutées à la liste des composés à suivre : bendiocarbe, cyfluthrine, spinosad et fipronil.

D'autres classes de pesticides pourraient être intéressantes à suivre tels que les insecticides néonicotinoïdes (imidaclopride (analysé dans le cadre du WP7), clothianidine, thiaclopride et thiaméthoxam), les fongicides strobilurines (azoxystrobin, picoxystrobin, fenamidone, famoxadone, kresoxim-méthyl et trifloxystrobin), certains fongicides triazoles à usages médicaux (itraconazole, voriconazole et posaconazole), les produits anti-parasitaires de type avermectines et aussi d'autres fongicides triazoles à usage agricole (metconazole, tebuconazole, propiconazole et prothioconazole).

Le choix des pesticides PE sera définitivement arrêté par le groupe de travail « molécules » commun aux projets IMHOTEP et BIODIEN.

La méthode d'analyse multi-résidus qui sera développée par le CRA-W pour les pesticides non encore analysés par les laboratoires du GISREAUX reprendra au minimum 15 substances actives parmi les substances proposées ci-dessus. Les molécules qui nécessitent une méthode d'analyse spécifique (amitrol, mancozeb, maneb et zineb) et celles qui n'ont jamais été agréées

sur le territoire belge ou français (phenothrin) ne seront pas prises en considération dans le développement des méthodes d'analyse.

La méthode comportera un volet analytique par UHPLC-MS/MS et un par GC-MS/MS en fonction de la nature des pesticides ciblés. La préparation des échantillons sera commune et comportera une étape de filtration suivie d'une concentration/purification par extraction en phase solide (SPE) sur colonne de type HLB et une reconstitution de l'échantillon adaptée à la technique analytique.

La méthode d'analyse sera validée selon les normes Européennes et Internationales en matière de validation de méthodes d'analyse des résidus de pesticides (SANCO 3029/99, 2000, SANCO 825/00, 2010 and SANCO 12495/2011, 2012), ainsi que selon les normes spécifiques dans le domaine de l'analyse des eaux (NF T90-210). Pour chaque substance active, les paramètres suivants seront mesurés et évalués : la spécificité, la linéarité de la réponse, la précision, la justesse, les limites de détection (LOD) et de quantification (LOQ) et la stabilité des pesticides en matrice. Une LOQ de 0.02 µg/L sera ciblée pour les molécules qui répondent le mieux en chromatographie. Pour les molécules moins sensibles, la LOQ sera fixée au cas par cas.

Workpackage 7 : Analyses chimiques de pesticides et de HAPs par la SWDE

Outre les analyses proposées dans le cadre du WP6, les analyses chimiques reprise au tableau suivant seront réalisées par la SWDE sur **115 échantillons** :

Substance active	Catégorie de toxicité			Exposition EU	Agréation agricole	Agréation biocide	Familles	Classes/groupes chimiques
	1	2	3					
fenitrothion	X			XX			I	organophosphorés
metribuzin	X			XX	X		H	triazines
2,4-D	X			X	X		H	auxines de synthèse
ioxynil	X			X	X		H	benzonitriles
terbutryn	X			X		X	H	triazines
acetochlor	X				-		H	chloroacétamides
alachlor	X				-		H	chloroacétamides
atrazine + desethylatrazine	X						H	triazines
DDT	X						I	organochlorés
linuron	X				X		H	urées substituées
trifluralin	X						H	toluidines
aldicarb		X					I	carbamates
aldrin		X					I	hydrocarbures chlorés
bromoxynil		X			X		H	hydroxy-benzonitriles

carbendazim		X			X	X	F	benzimidazoles et carbamates
carbofuran		X					I	carbamates
cyanazine		X					H	triazines
dieldrin		X					I	organochlorés
dimethoate		X			X		I	organophosphat es
diuron		X				X	H	urées substituées (phénylamines)
endosulfan		X					I	organochlorés
endrin		X					I	organochlorés
malathion		X					I	organophosphor és
methomyl		X					I	carbamates
parathion		X					I	organophosphor és
prochloraz		X			X		F	imidazoles
simazine		X					H	triazines
chlortoluron					X		H	urées substituées
isoproturon					X	X	H	urées substituées
metamitron					X		H	triazinones
pirimicarb					X		I	carbamates
terbuthylazine (traceur)					X		H	triazines

Les méthodes d'analyse concernées ont déjà été mises au point et validées pour l'ensemble des molécules à l'exception de l'acétochlor, la carbendazim et le pirimicarb. Pour ces 3 molécules, la méthode est déjà en cours de développement et la SWDE les incorporera dans son analyse de routine d'ici le début du présent programme de recherche.

La SWDE analysera également les HAP sur les 115 échantillons concernés par ce WP.

Workpackage 8 : Campagne échantillonneurs passifs

En fin de projet, il est envisagé d'initier la mise sur pied d'une campagne de mesures avec échantillonneurs passifs. Elle sera élaborée en concertation avec les deux groupes de travail du projet IMHOTEP (choix des stations, choix du/des types d'échantillonneur passif, analyses à réaliser).

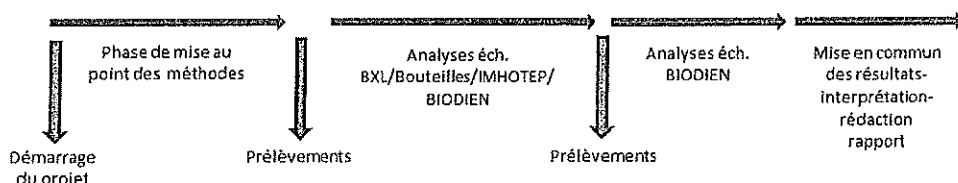
D. Planning prévisionnel

La durée du projet est de 2 ans prenant cours le 1^{er} mars 2014, de manière à synchroniser au mieux les phases du projet BIODIEN avec celles du projet IMHOTEP, en particulier au niveau de la prise d'échantillons communs.

Les phases principales des travaux, ainsi que l'élaboration et la fourniture des rapports respecteront le calendrier suivant :

	2014												2015												2016	
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2		
WP1-prélèvement																										
WP2-YES/YAS tests																										
WP3-analyses chimiques PE																										
WP4-perfluorés																										
WP5-kits ELISA																										
WP6-CRA-W (pesticides)																										
WP7-SWDE (pesticides et HAPs)																										
WP8*-échantillonneurs passifs																										

Mise au point
Prélèvement
Analyses
Interprétation /réaction rapport



ANNEXE 2

Budget détaillé

BUDGET DU PROGRAMME DE RECHERCHE BIODIEN (POUR UNE DUREE DE 2 ANS, EN EUROS)

Postes budgétaires	Sous-total (EUR)	Personnel	Fonction- nement	Frais d'analyse*
1. WORK PACKAGES				
WP1 (ISSEP)	1.600,00	600,00	600,00	400,00
WP2 (ISSEP)	88.010,00	41.175,00	600,00	46.235,00
WP3 (ISSEP)	70.840,00	49.840,00	-	21.000,00
WP4 (ISSEP)	39.040,00	26.866,00	600,00	11.574,00
WP5 (ISSEP)	24.766,00	16.824,00	600,00	7.342,00
WP6 (CRA-W)	71.840,00	45.840,00	-	26.000,00
WP7 (SWDE)	48.800,00	-	-	48.800,00
WP8 (ISSEP)	4.258,00	2.811,00	600,00	847,00
Sous-total	349.154,00			
2. FRAIS GENERAUX				
Participation au fonctionnement de la cellule d'expertise scientifique du projet IMHOTEP (gestion SWDE)	5.000,00			
Coordination GISREAUX (ISSEP)	44.669,00			
Sous-total	49.669,00			
TOTAL SUBVENTION	398.823,00			

*y compris le petit matériel, les réactifs, les consommables, la maintenance et la réparation des équipements, ...

Tous les postes sont à remboursement.
