

Avec le soutien de



# Cosmet'eau

## État de l'art sur les résidus de cosmétiques dans les milieux aquatiques

### Livrable 1.3 : Les outils de surveillance et de contrôle

2015

Auteurs : Adèle Bressy, Julien Le Roux, Anthony Marconi, Régis Moilleron

Contributeurs : Adèle Bressy, Catherine Carré, José-Frédéric Deroubaix, Bernard de Gouvello, Julien Le Roux, Anthony Marconi, Mathilde Soyer, Régis Moilleron.

**Citation du rapport** : Bressy A., Carré C., Deroubaix J.-F., de Gouvello B., Le Roux J., Marconi A., Soyer M., Moilleron R. (2015). État de l'art sur les résidus de cosmétiques dans les milieux aquatiques. Livrable 1 du projet *Cosmet'eau*.



## Table des matières

Table des matières .....	3
Liste des abréviations.....	5
Liste des illustrations.....	7
Liste des tableaux.....	7
Introduction générale aux livrables 1.1, 1.2, 1.3 et 1.4 .....	9
Introduction sur les outils de surveillance et de contrôle .....	11
1 Réglementation sur les cosmétiques et normes de rejet .....	11
1.1 Les principaux textes réglementaires .....	12
1.2 Les acteurs des produits cosmétiques .....	17
1.3 La surveillance des produits cosmétiques .....	18
1.4 Mise sur le marché des produits cosmétiques .....	19
1.5 Dans le reste du monde .....	20
2 Innovation dans les méthodes d'analyse chimique .....	21
2.1 Les échantillonneurs passifs intégratifs pour les biocides visés .....	21
2.1.1 Généralités sur les échantillonneurs passifs .....	21
2.1.2 Échantillonnage passif des parabènes .....	22
2.1.3 Échantillonnage passif des triclosan et triclocarban.....	22
2.1.4 Conclusion sur l'échantillonnage passif des triclosan et triclocarban .....	27
2.2 La spectrométrie de masse haute résolution .....	27
2.2.1 Les spectromètres de masse haute résolution .....	28
2.2.2 Traitement du signal .....	29
2.2.3 Exemples de screening dans la littérature .....	30
3 Apports des bioessais.....	33
3.1 Les outils d'analyse des effets biologiques ou bioessais.....	33
3.1.1 La pertinence des bioessais dans l'évaluation de la pollution de l'eau .....	33
3.1.2 La place des bioessais dans la réglementation .....	35
3.1.3 Typologie des bioessais .....	37
3.2 Innovations dans les bioessais .....	39
3.2.1 Différentiels d'organismes et d'effets.....	39
3.2.2 Méthodes issues des biotechnologies ou critères novateurs.....	40
3.3 Bioessais dans Cosmet'eau .....	44
Conclusion sur les outils de surveillance et de contrôle des résidus de cosmétiques dans les milieux aquatiques .....	47
Références bibliographiques.....	49



## Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
ANSM	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
CID	Collision induced dissociation
CIS	Stratégies d'Implémentation Communes (en anglais Common Implementation Strategies)
COLIPA	Comité de liaison de la parfumerie
COMCOS	comité permanent pour les produits cosmétiques
CosIng	Cosmetic Ingredients and substances
CPNP	Cosmetics Products Notification Portal
CSP	code de la santé publique
CTFA	Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association
DBE	Double-bond equivalent ou nombre d'insaturations de la molécule
DCE	Directive Cadre sur l'Eau
DCSMM	Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin
DEHP	phthalate de di-2-éthylhexyle, aussi désigné sous le sigle DEHP de l'anglais DiEthylHexyl Phthalate
DGCCRF	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DGCIS	Direction générale de la compétitivité, de l'industrie et des services
DGS	Direction générale de la santé
DGSanco	Direction Générale de la santé et des consommateurs
EI	Impact électronique (en anglais Electronic impact)
FWHM	Full-width-at-half-maximum
HRMS	high resolution mass spectrometry
INCI	International Nomenclature of Cosmetic Ingredients
LC	liquid chromatography
LC-MS	liquid chromatography – mass spectrometry
LDPE	low density polyethylene
LtQ	Trappe d'ion linéaire (en anglais Linear Trap Quadrupole)
MDMA	Ecstasy – 3,4-méthylènedioxy-méthamphétamine
MeTCS	Méthyltriclosan

MeTCS	Méthyltriclosan
MS	Spectrométrie de masse en anglais (Mass spectrometry)
MS <sup>E</sup>	Fragmentation simultanée à faible et haute énergie de collision
MS <sup>n</sup>	Multiple-stage mass spectrometry
NIST	National Institute of Standards and Technology
NQE	norme de qualité environnementale
PBs	Parabènes
PDMS	Polydimethylsiloxane
POCIS	polar organic chemical integrative sampler
POM	Polyoxyméthylène
PRC	performance reference compound
QTOF	Quadrupole-time-of-flight : couplage d'un quadripôle et d'un TOF
SCCP	Scientific Committee on Consumer Products ou Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs – CSSC
SCCS	Scientific Committee on Consumer Products
SPMD	semiperméable membrane devices
STEP	station d'épuration
TCC	Triclocarban
TCS	Triclosan
THC	$\Delta$ -9-tétrahydrocannabinol
TOF	Time of flight
TOF	time-of-flight, spectromètre de masse temps de vol
TWA	Time Weighted Average

## Liste des illustrations

Figure 1 : Exemple d'une recherche sur le portail CosIng..... 15

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Protocoles utilisés pour les échantillonneurs passifs dans la littérature ..... 24

Tableau 2 : Paramètres cinétiques et thermodynamiques des échantillonneurs passifs utilisés dans la littérature pour le TCS, TCC et MeTCS ..... 25

Tableau 3 : Concentrations en TCS et TCC mesurées par échantillonneurs passifs dans la littérature ..... 26



## Introduction générale aux livrables 1.1, 1.2, 1.3 et 1.4

De nombreuses substances utilisées dans la formulation des produits cosmétiques sont retrouvées, parfois en fortes concentrations, dans les eaux de surface du monde entier (Brausch and Rand, 2011; Peck, 2006). Elles font partie des substances les plus souvent retrouvées dans une étude américaine sur les eaux de surface en 2006 (Peck, 2006). En France, les parabènes, conservateurs utilisés dans les produits cosmétiques, ont été retrouvés dans 99 % des échantillons de l'étude prospective sur les micropolluants émergents commanditée par l'Onema et l'Ineris en 2012 (Botta and Dulio, 2014a). Ces substances peuvent avoir un effet négatif sur les écosystèmes aquatiques récepteurs (Bedoux et al., 2012; Orvos et al., 2002) car elles sont reconnues comme perturbateurs endocriniens (Gomez et al., 2005; Marlatt et al., 2013) ou suspectées d'augmenter la résistance de certains micro-organismes (SCCS, 2010), rendant *a priori* le cycle urbain de l'eau plus vulnérable dans des perspectives de potabilisation de l'eau. Il y a donc des enjeux à la fois sanitaires et environnementaux importants à mieux comprendre la dynamique de ces substances dans le système d'assainissement et leur impact dans le milieu récepteur.

D'après le règlement Cosmétiques (UE, 2009), un produit cosmétique est défini comme « une substance ou préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain [...] en vue [...] de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect [...] ». Les substances utilisées dans la formulation des cosmétiques et pouvant entraîner par leur présence une dégradation de la qualité des milieux aquatiques peuvent être classées selon leur fonction : les désinfectants, les parfums ou muscs synthétiques, les répulsifs d'insectes, les conservateurs et les filtres UV (Bester, 2009; Brausch and Rand, 2011; Gomez et al., 2005; Peck, 2006).

Dans le projet Cosmet'eau, seuls les désinfectants et conservateurs sont étudiés. Leurs propriétés de biocides impliquent intrinsèquement qu'ils pourront avoir un effet sur les écosystèmes aquatiques s'ils y sont déversés. Parmi cette classe d'additif, les plus utilisés jusque dans les années 2010 étaient les parabènes et le triclosan<sup>1</sup>. Ces substances sont également les plus emblématiques et les plus médiatisées en France et en Amérique du Nord (Halden, 2014). En France, un moment important dans la prise de conscience par le « grand public » des dangers des produits cosmétiques est celui de la diffusion de l'émission « Envoyé spécial », le jeudi 3 mars 2005, qui reprenait l'étude de Philipa Dardre de l'Université de Reading (Darbre et al., 2004) reliant leur utilisation à des cancers du sein. Cette prise de conscience des consommateurs a incité les industriels du secteur à proposer de nouvelles références (« sans parabène » ou « paraben free ») intégrant des produits de substitution aux molécules incriminées.

Ces substances, et en particulier les parabènes, sont intéressantes du point de vue de la sociologie du risque et des pratiques de consommation. En effet, suite à l'action médiatique de lanceurs d'alerte, une polémique s'est créée entre consommateurs inquiets et industriels au message rassurant. L'expression « lanceur d'alerte » a été inventée par les sociologues

---

<sup>1</sup> D'après la base de données Mintel consultée en mai 2015 (<http://fr.mintel.com/>)

Francis Chateauraynaud et Didier Torny en 1999 avec la publication de leur ouvrage *Les Sombres précurseurs* (Chateauraynaud and Torny, 1999). Ils y développent une sociologie pragmatique de l'alerte et du risque, qui réalise une configuration générale de traitement des risques qui a émergé dans les années 1990 en Europe (l'amiante, le nucléaire et le risque radioactif, la « vache folle »). La création de cette notion visait explicitement à la séparer de celles de dénonciateur et de délateur (qui se trouvent dans l'accusation visant quelqu'un en particulier), pour divulguer un état de fait, une menace dommageable pour le bien commun, l'intérêt public. La posture adoptée par Chateauraynaud et Torny (1999) permet d'aborder la thématique des risques en les situant plus largement dans le contexte de l'analyse des controverses et des politiques publiques.

Ce livrable vise à préciser le contexte et l'état des connaissances dans les divers domaines couverts par le projet *Cosmet'eau*, en particulier à l'échelle française et européenne (l'échelle internationale sera éventuellement abordée mais ne pourra pas être exhaustive en fonction des sujets). Son objectif est double. Il s'agit d'abord de réaliser un état des connaissances sur la présence dans les eaux urbaines des biocides et conservateurs provenant des produits cosmétiques ainsi que sur leur potentiel impact sanitaire et environnemental. Le deuxième objectif est de réaliser l'état de l'art sur les méthodes existantes pour évaluer la présence et l'impact des produits cosmétiques dans les eaux urbaines, étudier le lancement des alertes et leur diffusion, et estimer les pratiques de consommation.

Le livrable 1 est constitué de 5 sous livrables :

- Livrable 1.1 : Les conservateurs et biocides dans les produits cosmétiques
- Livrable 1.2 : Lancement et traitement de l'alerte
- Livrable 1.3 : Les outils de surveillance et de contrôle
- Livrable 1.4 : Les changements de pratiques
- Livrable 1.5 : Conclusion générale à l'état de l'art et perspectives pour le projet Cosmet'eau

## Introduction sur les outils de surveillance et de contrôle

La présence de biocides pouvant avoir un impact sur la qualité des milieux aquatiques récepteurs a été montrée dans le livrable 1.1 du projet Cosmet'eau (Bressy et al., 2015). L'objectif de ce livrable 1.3 est de présenter les outils en possession des gestionnaires et des chercheurs pour surveiller et limiter la présence de ces micropolluants dans les eaux de surface ainsi que pour en évaluer leur potentiel impact.

Pour mieux cerner les outils de surveillance et de contrôle des produits cosmétiques, un rappel sur le cycle de vie d'un produit cosmétique est nécessaire. La première étape concerne son développement chez le fabricant, intervient ensuite sa phase de commercialisation puis son utilisation par le consommateur et enfin la « fin de vie » du produit : élimination du produit en lui-même après utilisation et celle des emballages. Sur la base de ce schéma simplifié, comme évoqué précédemment, les produits cosmétiques peuvent présenter deux types d'impact :

- Un impact sanitaire : en France, cet aspect est pris en compte par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM). Un dossier thématique est d'ailleurs consacré aux produits cosmétiques dans la rubrique « Produits de santé » sur le site de l'ANSM (<http://ansm.sante.fr/Produits-de-sante/Produits-cosmetiques>).
- Un impact environnemental : les produits cosmétiques ne sont pas incriminés en eux-mêmes mais certains de leurs constituants sont mentionnés comme pouvant engendrer un tel impact (Daughton and Ternes, 1999; Dulio et al., 2009) : c'est notamment les cas des parabènes, phtalates, alkylphénols, nanoparticules, etc.

Les outils de surveillance et de contrôle des produits cosmétiques seront abordés sous trois angles de vue très différents. Les *outils réglementaires* peuvent permettre de limiter soit les émissions soit les rejets. Ils sont étudiés par le biais des textes de loi concernant la mise sur le marché des produits cosmétiques et les normes de rejets pour les micropolluants qui leur sont associés. Le cadre de cette étude réglementaire est la France et l'Union Européenne, même si les réglementations d'autres pays peuvent être présentées pour comparaison. D'autre part, de *nouveaux outils techniques* sont développés dans un objectif de surveillance pour améliorer nos connaissances sur ces substances et leurs impacts.

## 1 Réglementation sur les cosmétiques et normes de rejet

Le législateur a mis en œuvre un arsenal réglementaire qui se concentre plus particulièrement sur les premières étapes de la vie d'un produit cosmétique à savoir de sa conception à sa commercialisation. L'étape « fin de vie » n'est pas abordée en tant que telle. Les textes qui seront présentés aborderont cependant les deux aspects. La réglementation européenne, et donc *de facto* la réglementation française, sera majoritairement considérée. Le but n'est pas de fournir ici une analyse critique des différents textes mais de donner les moyens de retrouver rapidement les éléments réglementaires relatifs aux substances présentes dans les produits cosmétiques.

## 1.1 Les principaux textes réglementaires

Les substances utilisées dans les produits cosmétiques relèvent à la fois :

- des dispositions du règlement (CE) n°1223/2009 du Parlement européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques (UE, 2009), dit *Cosmétiques*, qui remplace la Directive 76/768/CEE du Conseil sur le rapprochement des législations des États membres relatives aux produits cosmétiques ;
- et des dispositions de la loi n°2014-201 du 24 février 2014 portant diverses dispositions d'adaptation au droit de l'Union européenne dans le domaine de la santé (article 3, I et II) : code de la santé publique (CSP), notamment les articles L.5131-1 à L. 5131-8 et L. 5431-1 à L.5431-9 ;
- et du règlement n°1907/2006 (UE, 2006), dit *REACH*<sup>2</sup>, entré en vigueur en 2007 pour sécuriser la fabrication et l'utilisation des substances chimiques dans l'industrie européenne ;
- et du règlement n°528/2012 (UE, 2012) du Parlement Européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides ;
- au niveau des Etats-Unis (<http://www.fda.gov/Cosmetics/default.htm>), la réglementation sur les produits cosmétiques s'appuie sur le Federal Food, Drug, and Cosmetic Act<sup>3</sup>, établi conjointement par la *Food Drug Administration* and le *Department of Health and Human Services*. La réglementation des cosmétiques aux Etats-Unis est complexe et partagée entre différents organismes (Lundov et al., 2009). Tous les conservateurs utilisés dans les cosmétiques sont évalués par le *Cosmetic Ingredient Review* (CIR). Les membres du CIR sont issus de l'industrie, la FDA et de la *Consumer Federation of America*. Les ingrédients évalués par le CIR sont publiés dans l'*International Journal of Toxicology* et affichés sur Internet avec les informations suivantes : (i) nom de l'ingrédient; (ii) conclusion sur l'ingrédient, qui peut être « *safe* », « *safe with qualifications* », « *insufficient data to support safety* », « *unsafe* » ; (iii) justification de la conclusion; et (iv) références bibliographiques. Les exigences sur la qualité microbiologique du produit fini et la capacité du produit à résister à la contamination en cours d'utilisation sont également incluses dans la législation. Il n'y aurait pas d'essai de pré-commercialisation ou d'approbation nécessaire avant de mise sur le marché d'un nouveau produit cosmétique aux États-Unis. La FDA ne réglementerait les produits cosmétiques qu'une fois qu'ils seraient commercialisés (Barel et al., 2014).

Il est à noter que les substances à usage cosmétique sont exemptées uniquement pour les aspects liés à la santé humaine du Rapport sur la Sécurité Chimique de *REACH* car ces aspects sont déjà prévus par le règlement *Cosmétiques* (Galimard, 2012). Ce dernier encadre la mise sur le marché et la vente des produits cosmétiques au sein de l'Union Européenne. Il définit la

---

<sup>2</sup> *REACH* est un acronyme anglais signifiant Registration (enregistrement de toutes les substances chimiques fabriquées ou importées sur le marché européen (tonnage > 1t/an) d'ici 2018), Evaluation (évaluation des propositions d'essais, des dossiers d'enregistrement et des substances), Authorisation (autorisation pour les substances extrêmement préoccupantes) of CHemicals (substances chimiques)

<sup>3</sup> US Food and Drug Administration (2004) Federal Food, Drug and Cosmetic Act

notion de Personne Responsable, la mise à disposition auprès des autorités du Dossier d'Information sur le Produit (DIP, cf. encadré), l'Évaluation de la Sécurité du produit cosmétique, la Notification, la libre circulation et l'interdiction des tests sur animaux. Depuis 2013, le règlement *Cosmétiques* remplace la Directive 76/768/CEE du Conseil du 27 juillet 1976 concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux produits cosmétiques (directive «Cosmétiques»). Le règlement *REACH*, quant à lui, permet de recenser, d'évaluer et de contrôler les substances chimiques fabriquées, importées, mises sur le marché européen. Les objectifs visés sont : la protection de la santé humaine et l'environnement face aux risques potentiels des substances chimiques, l'instauration d'une information complète et transparente sur la nature et les risques des substances, du fournisseur au client final, la sécurisation de la manipulation des substances chimiques par les salariés dans l'entreprise en imposant le respect de normes de sécurité, le renforcement de la compétitivité de l'industrie, en particulier l'industrie chimique européenne, secteur clé de l'économie en Europe.

L'arsenal législatif relatif aux produits cosmétiques est complété par de nombreux autres textes dont beaucoup sont des modifications du règlement *Cosmétiques*<sup>4</sup> :

Arrêté du 25 février 2015 relatif à la qualification professionnelle des évaluateurs de la sécurité des produits cosmétiques pour la santé humaine

Règlement (UE) n° 1004/2014 de la Commission du 18 septembre 2014 modifiant l'annexe V du règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques

Règlement (UE) n° 1003/2014 de la Commission du 18 septembre 2014 modifiant l'annexe V du règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques

Rectificatif au règlement (UE) n° 866/2014 de la Commission du 8 août 2014 modifiant les annexes III, V et VI du règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques. (JOUE du 28-08-2014)

Règlement (UE) n° 866/2014 de la commission du 8 août 2014 modifiant les annexes III, V et VI du règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques.

Règlement (UE) n° 358/2014 de la commission du 9 avril 2014 modifiant les annexes II et V du règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques.

Loi n° 2014-201 du 24 février 2014 portant diverses dispositions d'adaptation au droit de l'Union européenne dans le domaine de la santé. (JORF du 25-02-2014)

Règlement (UE) n° 1197/2013 de la Commission du 25 novembre 2013 modifiant l'annexe III du règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques.

---

<sup>4</sup><http://ansm.sante.fr/Activites/Surveillance-du-marche-des-produits-cosmetiques/Reglementation>  
<http://www.economie.gouv.fr/dgccrf/publications/juridiques/panorama-des-textes/Produits-cosmetiques-1105>

Décision d'exécution de la Commission du 25 novembre 2013 concernant les lignes directrices pour l'application de l'annexe I du règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques.

Règlement (UE) n° 658/2013 de la Commission du 10 juillet 2013 modifiant les annexes II et III du règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques.

Règlement (UE) n° 655/2013 de la Commission du 10 juillet 2013 établissant les critères communs auxquels les allégations relatives aux produits cosmétiques doivent répondre pour pouvoir être utilisées.

Règlement (UE) n° 483/2013 de la Commission du 24 mai 2013 modifiant l'annexe III du règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques.

Règlement (UE) n° 344/2013 de la Commission du 4 avril 2013 modifiant les annexes II, III, V et VI du règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement européen et du Conseil relatif aux produits cosmétiques.

Arrêté du 27 février 2013 modifiant l'arrêté du 6 février 2001 fixant la liste des substances qui ne peuvent pas entrer dans la composition des produits cosmétiques.

Arrêté du 27 février 2013 modifiant l'arrêté du 6 février 2001 fixant la liste des substances qui ne peuvent être utilisées dans les produits cosmétiques en dehors des restrictions et conditions fixées par cette liste.

Résolution ResAP (2006)1 du 8 novembre 2006 relative à un système de veille concernant les effets indésirables des produits cosmétiques (« cosmétovigilance » cf. encadré) en Europe destiné à protéger la santé publique.

La **cosmétovigilance** intègre tous les moyens de surveillance des effets indésirables résultant de l'utilisation des produits cosmétiques. Elle s'exerce sur l'ensemble des produits cosmétiques après leur mise sur le marché. En France, les acteurs de la cosmétovigilance sont les professionnels de la santé (médecins, pharmaciens...), l'ANSM et les industriels qui ont obligation de déclarer aux autorités tout effet contraire à l'obligation de sécurité d'un produit cosmétique (article L. 221-1-3 du Code de la consommation).

Pour compléter, ces textes réglementaires, l'ANSM émet régulièrement des décisions de police sanitaire pouvant notamment porter sur des substances à usage cosmétique (cf. encadré).

**Décision de police sanitaire (ANSM)** relative aux produits cosmétiques date du 11 mars 2015 portant retrait du marché et suspension de mise sur le marché, de fabrication, de conditionnement, de distribution, d'importation, d'exportation et d'utilisation des produits cosmétiques des sociétés LABORATOIRES ORGEV, ORGEV et ORGEV COSMETICS, et des dispositifs médicaux des sociétés NOVATEX BIOENGINEERING et LABORATOIRES ORGEV et portant retrait du marché et suspension de mise sur le marché, de distribution, d'importation, d'exportation, et d'utilisation des produits cosmétiques commercialisés par la société LABORATOIRES ORGEV INTERNATIONAL LTD et fabriqués et conditionnés sur le site de Rambouillet (78) et portant suspension pour 6 mois des activités exercées sur les produits cosmétiques des sociétés LABORATOIRES ORGEV, ORGEV et ORGEV COSMETICS, et sur les dispositifs médicaux des sociétés NOVATEX BIOENGINEERING et LABORATOIRES ORGEV.

Au niveau européen, le *Scientific Committee on Consumer Products* (SCCP ou Comité Scientifique pour la Sécurité des Consommateurs – CSSC) fournit à la Commission européenne des avis sur des questions liées à la sécurité et aux propriétés allergènes des produits cosmétiques et de leurs ingrédients eu égard à leur incidence sur la santé des consommateurs ainsi que des jouets, des textiles, de l'habillement, des produits d'hygiène corporelle, des

produits à usage domestique... ([http://ec.europa.eu/health/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/health/index_en.htm)). Cet organisme émet ses avis en s'appuyant sur un guide « The SCCP's notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation (8th revision) ». Ce document recense les informations concernant les tests réalisés sur les produits cosmétiques en Europe. Il est conçu pour fournir des orientations aux autorités publiques et à l'industrie cosmétique, afin d'améliorer la conformité avec la législation actuelle sur les produits cosmétiques.

Le SCCP a ainsi émis plusieurs notes sur les parabènes, le triclosan, le triclocarban :

- Scientific Committee on Consumer Products opinion on: Parabens COLIPA n° P82pdf Adopted by the SCCP during the 16th plenary meeting on 24 June 2008
- Scientific Committee on Consumer Products opinion on: Parabens COLIPA no. P82pdf Adopted by the SCCP during the 9th plenary meeting of 10 October 2006
- Scientific Committee on Consumer Products opinion on: Parabens, underarm cosmetics and breast cancer.pdf Adopted by written procedure on 28 January 2005
- Scientific Committee on Consumer Products opinion on: Triclocarban For other uses than as a preservative COLIPA no. P29pdf Adopted by the SCCP during the 4rd plenary meeting of 21 June 2005
- Scientific Committee on Consumer Products opinion on: Triclosan COLIPA no. P32pdf Adopted by the SCCP during the 9th plenary meeting of 10 October 2006

Enfin, le CosIng (pour Cosmetic Ingredients and substances, voir Figure 1) est une base de données de la Commission européenne qui permet de réaliser une synthèse sur la réglementation en vigueur pour une substance donnée si elle figure dans l'un des textes suivants :

- Règlement Cosmétiques (CE) n° 1223/2009 ;
- Directive Cosmétiques 76/768 / CEE ;
- Inventaire des ingrédients cosmétiques ;
- Avis sur les substances cosmétiques émis par les comités scientifiques.

The screenshot shows the CosIng portal interface. The header includes the European Commission logo and the text 'Health and Consumers' and 'Cosmetics - CosIng'. The main content area displays the following information:

Substance : Mixture of 5-Chloro-2-methyl-isothiazol-3(2H)-one and 2-Methylisothiazol-3(2H)-one with magnesium chloride and magnesium nitrate	
Substance	Mixture of 5-Chloro-2-methyl-isothiazol-3(2H)-one and 2-Methylisothiazol-3(2H)-one with magnesium chloride and magnesium nitrate
CAS #	55965-84-9 / 26172-55-4 / 2682-20-4
EC #	- / 247-500-7 / 220-239-6
Name of Common Ingredients	METHYLCHLOROISOTHIAZOLINONE AND METHYLISOTHIAZOLINONE
Glossary	
INNI/ISOIAN	
Regulation	(EC) No 1223/2009
Regulated By	89/174/EEC
Other Directives/Regulations	
Annex/Ref #	V/39
Product Type, body parts	
Maximum concentration in ready for use preparation	0.0015% (of a mixture in the ratio 3:1 of 5-Chloro-2-methyl-isothiazol-3(2H)-one and 2-Methylisothiazol-3(2H)-one)
Other	
Wording of conditions of use and warnings	
SCCS opinions	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0670/03 - Opinion concerning Update of Entry no. 39 of Annex VI to Directive 76/768/EEC on Cosmetic Products. Mixture of 5-Chloro-2-methyl-isothiazol-3(2H)-one and 2-Methylisothiazol-3(2H)-one</li> <li>• 0849/04 - Clarification of the SCCNFP Opinion on the Update of Entry no. 39 of Annex VI to Directive 76/768/EEC on Cosmetic Products. Mixture of 5-Chloro-2-methyl-isothiazol-3(2H)-one and 2-Methylisothiazol-3(2H)-one</li> <li>• 1238/09 - Opinion on Mixture of 5-chloro-2-methyl-isothiazol-3(2H)-one and 2-methyl-isothiazol-3(2H)-one</li> </ul>
Chemical/IUPAC Name	
Identified INGREDIENTS or substances e.g.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• METHYLCHLOROISOTHIAZOLINONE</li> <li>• METHYLISOTHIAZOLINONE</li> </ul>
Note	
Current Version	v.1

Figure 1 : Exemple d'une recherche sur le portail CosIng

Pour compléter cet dispositif, il est important de mentionner la nomenclature internationale des ingrédients cosmétiques ou INCI (pour International Nomenclature of Cosmetic

Ingredients) qui date de 1973 dont la Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA), association américaine est l'instigatrice. En Europe, son utilisation est obligatoire pour les cosmétiques depuis 1998 : tous les cosmétiques doivent donner sur leur emballage la liste complète des ingrédients dans l'ordre décroissant de leur quantité et sous leur dénomination INCI. Ainsi les noms des ingrédients sont les mêmes dans tous les pays qui utilisent le système INCI : États-Unis, Europe, Japon... La nomenclature INCI a une portée toute relative car elle ne permet pas de connaître la quantité exacte des ingrédients, ni leur origine et leur mode de fabrication. Les règles de fonctionnement de l'INCI sont définies dans l'International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, publié par la CTFA.

Les produits cosmétiques, en tant que tels, ne sont pas réglementés vis-à-vis de l'environnement. Les molécules qui possèdent des normes de qualité environnementale (NQE), définies dans la directive cadre sur l'eau (DCE) du 23 octobre 2000 (directive 2000/60) sont généralement des substances interdites dans les produits cosmétiques (annexe II du règlement Cosmétiques) comme c'est le cas du DEHP et du nonylphénol. Toutefois, les octylphénols et para-tert-octylphénol ne figurent pas dans les différentes annexes du règlement *Cosmétiques* et elles possèdent des NQE. Les NQE sont utilisées pour l'évaluation de l'état chimique qui concerne les 33 substances « prioritaires » et « dangereuses prioritaires » de la DCE, et pour l'évaluation de l'état chimique dans l'état écologique, qui concerne les substances dites « pertinentes » de la DCE. De plus la DCE mentionne dans son article 16 [...] *une évaluation ciblée en fonction du risque [selon la méthodologie du règlement (CEE) n° 793/93] axée uniquement sur l'écotoxicité aquatique et sur la toxicité pour l'homme via l'environnement aquatique [...]*... Plusieurs constituants des cosmétiques pourraient être concernés en raison des interrogations qui pèsent sur eux : triclosan, parabènes, méthylisothiazolinone, méthylchloroisothiazolinone... La Loi sur l'Eau et les Milieux Aquatiques (LEMA) du 30 décembre 2006 retranscrit en droit français la DCE et reprend à son compte ses objectifs.

Le plan national d'action Micropolluants définit dans un document unique, la stratégie globale de réduction de la présence des micropolluants dans les milieux aquatiques et décline les actions correspondantes engagées par l'ensemble des acteurs de l'eau, pour la période 2010-2013. L'Action de recherche et réduction des rejets des substances dangereuses dans l'Eau (3RSDE) est mentionnée dans le plan national, notamment à l'action n°5 « Renforcer la surveillance des rejets ponctuels dans les milieux aquatiques ». La circulaire du 5 janvier 2009 relative à la mise en œuvre de la 2<sup>e</sup> phase de l'action RSDE fixe les modalités de la surveillance des substances dangereuses dans les rejets industriels, notamment dans l'annexe 1 qui donne les listes par secteurs d'activité industrielle des substances dangereuses potentiellement présentes dans les rejets aqueux des établissements exerçant certaine activité industrielle. Le secteur d'activité 6 « industrie de la chimie » (chimie fine, chimie minérale, chimie organique, chlorochimie, cosmétique, pétrochimie, fabrication d'engrais, fabrication d'explosifs, pharmacie (hors galénique), formulation de produits phytopharmaceutiques) n'a fait l'objet d'aucun suivi dans cette deuxième phase. En effet, la quasi-totalité des sites de ce secteur avait été l'objet d'investigations lors de la première campagne 3RSDE, aussi aucune liste sectorielle n'a donc été définie ! Or dans la première phase, quasiment aucune des substances suivies ne relevaient de l'industrie cosmétique...

Plus récemment, l'Onema et l'Ineris, ont lancé une étude d'envergure sur les substances d'intérêt émergent (Botta and Dulio, 2014b). Cinq substances présentes dans les formulations

des produits de soins corporels (trois parabènes<sup>5</sup>, le triclosan et le 4-méthylbenzylidène camphre) ont fait partie de cette étude prospective et elles ont toutes été quantifiées au moins une fois sur les sites investigués. Les 3 parabènes, identifiés comme substances d'intérêt émergent à cause de leur utilisation diffuse et de leurs possibles effets comme perturbateurs endocriniens, ont été aussi les substances les plus quantifiées sur la totalité des substances recherchées lors de cette étude. Ainsi, les parabènes, comme les phtalates, ont été retrouvés dans plus de 99% des stations, y compris des stations de référence, sans distinction par rapport aux pressions. Il s'agit de substances utilisées dans des produits de large consommation et elles peuvent être considérées comme « omniprésentes » dans le milieu aquatique, sous réserve de confirmation de l'absence de faux positifs liés à des contaminations parasites lors de l'échantillonnage (Botta and Dulio, 2014b). Ces résultats plaident en faveur de l'introduction de certaines substances utilisées dans la formulation des produits cosmétiques dans la réglementation et dans le suivi de la qualité des milieux aquatiques. L'arrêté du 7 août 2015 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 établissant le programme de surveillance de l'état des eaux en application de l'article R. 212-22 du code de l'environnement va dans ce sens. En effet, il introduit certaines substances présentes dans les produits cosmétiques (comme les parabènes, le triclosan et le triclocarban) dans le programme de surveillance comme substances pertinentes. Comme le précise cet arrêté, « [...] *Contrairement aux substances de l'état chimique et de l'état écologique, les **substances pertinentes** à surveiller ne sont pas utilisées pour évaluer l'état des eaux de surface. Il s'agit de substances recherchées pour répondre aux objectifs du point I de l'article 4 du présent arrêté, et notamment pour préciser les niveaux de présence et de risque associés à ces substances, en vue d'une possible inclusion dans les listes de polluants spécifiques...* »

## 1.2 Les acteurs des produits cosmétiques

Au niveau européen, plusieurs institutions sont en charge des produits cosmétiques :

- Le Conseil Européen à l'origine du règlement *Cosmétiques* ;
- La Commission Européenne via les modifications apportées aux annexes du règlement *Cosmétiques*. La Commission Européenne est soutenue par deux comités scientifiques : le SCCP déjà mentionné et le comité permanent pour les produits cosmétiques (COMCOS) pour faciliter la mise en œuvre des mesures nécessaires à l'évolution technique des textes législatifs. Ce comité de réglementation est composé de représentants officiels des États membres de l'Union Européenne. Il est rattaché à

---

<sup>5</sup> Du fait de leur activité antibactérienne et antifongique, ils sont utilisés comme conservateurs dans les cosmétiques, les produits pharmaceutiques, les aliments et les boissons. On les retrouve dans plus de 80 % des produits de grande consommation. Le méthyl-parabène et le propyl-parabène sont les plus utilisés parmi les différents parabènes. Les tonnages de production déclarés par l'industrie pour ces composés (données enregistrées dans Portail de l'ECHA-REACH, <http://echa.europa.eu/fr/information-on-chemicals/registered-substances>) montrent des volumes de production en Europe compris entre 1000 et 10000 t/an pour le méthyl-parabène et des valeurs plus faibles, entre 100 et 1000 t/a, pour l'éthyl- et le proyl-parabène, mais tous ces composés sont également largement importés de l'Asie et des US... (Botta and Dulio, 2014b)

la Direction Générale de la santé et des consommateurs (DGSanco). Il peut être saisi sur l'initiative du président ou à la demande du représentant d'un État-Membre.

Au niveau national, les acteurs impliqués dans le cycle de vie des produits cosmétiques sont les industriels (à plusieurs niveaux), les utilisateurs finaux et les pouvoirs publics.

Pour les **industriels**, l'article 4 du règlement *Cosmétiques* impose la désignation d'une **personne responsable** (RP) pour tout produit cosmétique mis sur le marché européen. Cette personne responsable peut être le fabricant, l'importateur, voire le distributeur ou toute autre personne établie dans l'Union européenne. Elle sera en charge de répondre aux questions des autorités. Les autres intervenants sont **le distributeur**. Il fait partie de la chaîne d'approvisionnement et met le produit à disposition sur le marché. Le **fabricant** est « *toute personne physique ou morale qui fabrique ou fait concevoir ou fabriquer un produit cosmétique et commercialise ce produit sous son nom ou sa marque.* » L'**importateur** est « *toute personne physique ou morale établie dans l'Union européenne qui met sur le marché européen un produit cosmétique provenant d'un pays tiers (hors UE).* » Les industriels, outre les règlements Cosmétiques et Reach, sont soumis à la norme ISO 22716:2007 « Cosmétiques -- Bonnes pratiques de fabrication (BPF) -- Lignes directrices relatives aux bonnes pratiques de fabrication ». Comme le précise l'organisation internationale de normalisation (ISO), cette norme donne les lignes directrices pour la production, le contrôle, le stockage et l'expédition des produits cosmétiques. Ces lignes directrices couvrent les aspects liés à la qualité du produit mais, dans leur totalité, ne couvrent ni les aspects liés à la sécurité du personnel travaillant dans l'usine, ni les aspects liés à la protection de l'environnement. Les aspects liés à la sécurité et à l'environnement sont des responsabilités inhérentes à la société et peuvent être régis par les réglementations et les législations locales. Ces lignes directrices ne s'appliquent ni aux activités de recherche et développement ni à la distribution des produits finis.

Les **utilisateurs finaux** sont les consommateurs ainsi que les professionnels dont l'activité les amène à utiliser des produits cosmétiques.

Les **autorités compétentes** en charge des produits cosmétiques ont pour objectif d'assurer la sécurité des consommateurs. En France, l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM) et la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) du Ministère de l'économie, de l'industrie et du numérique jouent ce rôle. L'ANSM veille à la sécurité sanitaire des produits cosmétiques (évaluation des substances, inspection des acteurs de la filière cosmétique, contrôles en laboratoire et vigilance). La DGCCRF est en charge de la surveillance du marché (inspection, contrôle). La Direction générale de la santé (DGS) et la direction générale de la compétitivité, de l'industrie et des services (DGCIS) complètent le dispositif.

### **1.3 La surveillance des produits cosmétiques**

Le Ministère des affaires sociales, de la santé et des droits des femmes participe à l'élaboration de la réglementation européenne et pilote la législation nationale relative aux produits cosmétiques, en relation avec le Ministère des finances et des comptes publics et celui de l'économie, de l'industrie et du numérique. Comme le mentionne le Ministère des affaires sociales, de la santé et des droits des femmes, en France, « *la surveillance du marché des produits cosmétiques est assurée conjointement par l'ANSM et la DGCCRF (Direction générale de la concurrence, de la consommation, et de la répression des fraudes) qui mutualisent leurs*

*interventions dans le domaine de l'inspection et des contrôles en laboratoire. Ces contrôles de marché permettent la vérification des obligations applicables prévues par les textes, la vérification des conditions de fabrication et la réalisation de contrôles en laboratoire par les services de l'une et/ou l'autre, selon les spécificités et les compétences techniques de chacune. »*

### **1.4 Mise sur le marché des produits cosmétiques**

La procédure de mise sur le marché des produits comprend six phases (<http://www.sante.gouv.fr/produits-cosmetiques.html>), qui sont tirées du **règlement Cosmétiques** (UE, 2009) :

1. Déclaration d'ouverture ou d'exploitation auprès de l'ANSM.
2. Désignation par le fabricant d'une personne responsable pour chaque produit cosmétique mis sur le marché.
3. Constitution et mise à disposition des autorités compétentes d'un dossier d'information sur le produit (DIP, cf. encadré). Ce dossier est conservé pendant une période de dix ans à partir de la date à laquelle le dernier lot du produit cosmétique a été mis sur le marché. Il doit contenir :
  - une description du produit,
  - un rapport sur la sécurité du produit rédigé suite à l'évaluation de la sécurité,
  - une description de la méthode de fabrication et une déclaration de conformité aux bonnes pratiques de fabrication,
  - les preuves de l'effet revendiqué, lorsque la nature ou l'effet du produit cosmétique le justifient.
4. Évaluation de la sécurité du produit selon des critères définis par le règlement cosmétique. Cette évaluation donne lieu à un rapport sur la sécurité du produit qui doit être actualisé en tenant compte des informations pertinentes complémentaires apparues après la mise sur le marché du produit. Le règlement *Cosmétiques* prévoit que l'évaluation de la sécurité d'un produit cosmétique soit effectuée par une personne titulaire d'un diplôme ou d'un autre titre sanctionnant une formation universitaire d'enseignement théorique et pratique dans l'une des disciplines suivantes : pharmacie, toxicologie, médecine, discipline analogue.
5. Respect des règles de composition des produits, notamment des restrictions et interdictions de certaines substances prévues dans les annexes du règlement et régulièrement mises à jour.
6. Notification à la Commission d'un ensemble d'informations sur le produit (catégorie du produit, personne responsable, composition, étiquetage, etc.) par le biais d'un portail commun à l'ensemble des États membres (Cosmetics Products Notification Portal – CPNP).

En résumé, la mise sur le marché d'un produit cosmétique nécessite:

- Sa notification auprès des Centres Antipoison, via le système européen de notification électronique (CPNP) ;

- La constitution d'un dossier d'information produit (le dossier cosmétique, article R.5131-2 du Code de la santé publique) qui doit être actualisé régulièrement ;
- La mention d'informations obligatoires sur l'étiquetage.

**Dossier d'Information Produit DIP.** Le fabricant ou le responsable de la mise sur le marché doit s'assurer de l'innocuité de son produit et constituer un dossier cosmétique à tenir à disposition des autorités de contrôle à l'adresse indiquée sur l'étiquetage. Ce dossier comporte tous les éléments nécessaires relatifs à l'identité, à la qualité, à la sécurité pour la santé humaine et aux effets revendiqués par le produit cosmétique. Ces informations sur le produit doivent en particulier inclure un rapport sur la sécurité du produit cosmétique démontrant qu'une évaluation de la sécurité a été effectuée. Le règlement *Cosmétiques* indique les informations et données qui doivent figurer dans ce dossier.

Le DIF comprend entre autres :

Les données relatives à l'exposition au produit cosmétique et aux substances selon divers paramètres, prenant en considération les effets toxicologiques envisageables

Les résultats des analyses toxicologiques

Les éventuels effets indésirables du produit cosmétique sur la santé humaine...

## 1.5 Dans le reste du monde

D'après (Barel et al., 2014), il semblerait que le cadre élaboré par l'UE dans le règlement *Cosmétiques* tende à devenir un modèle vers lequel de nombreux autres pays et régions gravitent. Ainsi, si un ingrédient ou un produit veut être conforme à une échelle globale, plutôt que sur une base nationale voire régionale, il devra tenir compte des exigences de l'UE. Cependant, dans certains pays, des réglementations spécifiques plus restrictives ont vu le jour ces dernières années. Le Danemark, le 15 mars 2001, a introduit une réglementation spécifique sur les parabènes, qui sont désormais interdits dans les produits cosmétiques pour enfants de moins de trois ans (No. 1217 of 11 October 2013 – Statutory order on restriction on import, sale and use of certain parabens in cosmetic products for children under 3 years).

Au Canada, tous les cosmétiques assujettis à la Loi sur les aliments et drogues (L.R.C. (1985), ch. F-27) et au Règlement sur les cosmétiques. Les cosmétiques relèvent également de la Loi sur l'emballage et l'étiquetage des produits de consommation et à son Règlement, et toute substance chimique présente dans un cosmétique peut être assujettie à la Loi canadienne sur la protection de l'environnement (<http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/cosmet-person/regulations-reglements/index-fra.php>). Mais les cosmétiques peuvent également dépendre de la Loi canadienne sur la protection de l'environnement.

Au Japon, la réglementation sur les produits cosmétiques s'intègre dans un panel réglementaire qui comprend les produits cosmétiques et les substances ou préparation dites « quasi-médicaments ». Ainsi les premiers textes datent du début des années 1900. Mais depuis les années 2000, un renforcement de l'arsenal réglementaire se fait ressentir (<http://www.jcia.org/n/en/info/>) comme l'illustre les différents textes sortis récemment :

2001 Abolition in principle of cosmetics approval system [Cosmetics], Introduction of labeling of all ingredients, Institution of cosmetics standards

2004 Switch of antifatulent, disinfectant, stomach tonics, etc., to quasi-drugs category (new scope of quasi-drugs)

2005 Implementation of production and sale approval system, Separation of production and sales business and production business, Introduction of Good Quality Practices (GQP) and Good Vigilance Practices (GVP) for cosmetics

2014 Reinforcement of Adverse Effect Reporting system, Revision of "Caution" text, [Quasi-drugs, cosmetics]

## 2 Innovation dans les méthodes d'analyse chimique

Dans cette partie nous ne nous intéresserons à deux innovations techniques dans l'analyse des contaminants chimiques dans l'eau : les échantillonneurs passifs intégratifs qui permettent d'améliorer l'échantillonnage des molécules (Vrana et al., 2009) et la spectrométrie de masse haute résolution dont les spécificités permettent d'élargir le champ conceptuel de l'analyse des micropolluants (Krauss et al., 2010; Zedda and Zwiener, 2012).

### 2.1 Les échantillonneurs passifs intégratifs pour les biocides visés

La méthodologie classique pour étudier les micropolluants dans l'eau est basée sur des échantillonnages ponctuels ou moyen 24 h. Cette approche ne tient compte ni de la variabilité spatio-temporelle de la contamination (les pics de pollution ne sont, par exemple, pas intégrés dans la mesure), ni de la spéciation des contaminants. Les échantillonneurs passifs ont été développés pour améliorer la représentativité des échantillonnages. Ils permettent d'extraire et pré-concentrer *in situ* les micropolluants en intégrant la contamination sur une longue durée (de la semaine au mois). De plus ils n'intègrent que la fraction disponible des contaminants c'est-à-dire la fraction a priori la plus accessible aux organismes vivants et donc la plus toxique (Gourlay-Francé et al., 2008).

De nombreux précédents projets ont été menés sur les échantillonneurs passifs intégratifs et proposent des états de l'art complets sur le sujet, en particulier le projet financé par l'ANR Emestox (Emestox, 2013, 2010). Nous ne développerons ici que les applications spécifiques aux molécules qui nous intéressent.

#### 2.1.1 Généralités sur les échantillonneurs passifs

Un échantillonneur passif est un outil capable d'accumuler de façon passive, c'est-à-dire sans apport d'énergie, des composés présents dans le milieu durant une période de temps définie. Il va capter les molécules du milieu dans lequel il est exposé et les retenir sur une phase absorbante ou adsorbante. La quantité de composés retenus dans l'échantillonneur est reliée à la concentration moyenne sur la durée totale de l'exposition, appelée TWA (Time Weighted Average). Les échantillonneurs passifs les plus utilisés pour les substances organiques sont : les Semipermeable Membrane Devices (SPMD), les membranes polymériques, les Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) et les chemcatchers.

L'échantillonnage passif est basé sur le flux de molécules entre le milieu aquatique et la phase réceptrice de l'échantillonneur qui peut être modélisé par une cinétique du premier ordre (Huckins et al., 2006). En supposant que les constantes de vitesse sont indépendantes de la concentration en composés dans l'eau et que le milieu aquatique se comporte comme un réservoir infini, de concentration moyenne  $C_w$ , vis-à-vis de l'échantillonneur, la concentration

dans l'échantillonneur après une durée d'exposition  $t$  peut s'écrire, d'après Huckins *et al.* (2006) :

$$C_s = C_w K_{sw} (1 - \exp(-k_e t)) \quad \text{Équation 1}$$

avec  $K_{sw} = \frac{k_u}{k_e}$  Équation 2

Où  $C_s$  est la concentration en composé dans l'échantillonneur en ng/L,  $C_w$  la concentration en composé dans l'eau disponible pour l'accumulation en ng/L,  $k_u$  la constante d'accumulation en  $j^{-1}$ ,  $k_e$  la constante d'élimination en  $j^{-1}$ ,  $K_{sw}$  le coefficient de partage du contaminant entre l'échantillonneur et l'eau, et  $t$  la durée de l'exposition en  $j$ .

La vitesse d'accumulation est souvent exprimée par le taux d'échantillonnage  $R_s$  (en L/j) qui représente le volume d'eau extrait par l'échantillonneur par unité de temps d'exposition. Ce paramètre couramment appelé coefficient d'échantillonnage est donné par la relation suivante :

$$R_s = V_s k_u = V_s K_{sw} k_e \quad \text{Équation 3}$$

Où  $V_s$  est le volume de l'échantillonneur en L.

Les constantes  $K_{sw}$  et  $k_e$  sont propres au composé ciblé (famille,  $K_{ow}$ ), à l'échantillonneur (nature, rapport surface/volume) et aux conditions environnementales (température, hydrodynamique, présence de biofilm...). Elles doivent être déterminées par des calibrations au laboratoire et corrigées *in situ* pour tenir compte des conditions d'exposition. Pour cela, des traceurs internes appelés PRC (performance reference compound) sont mis dans l'échantillonneur avant exposition pour évaluer l'influence des conditions d'exposition (Booij *et al.*, 2002; Huckins *et al.*, 2002). Ils permettent de corriger le  $k_e$  du PRC utilisé à l'aide de l'équation suivante :

$$k_{ePRC}^{field} = - \frac{\ln(C_{PRC}(t)/C_{PRC}(0))}{t} \quad \text{Équation 4}$$

Avec  $C_{PRC}$  la concentration en PRC au début ou la fin de l'exposition (ng/L),  $t$  étant la durée de l'exposition ( $j$ ).

## 2.1.2 Échantillonnage passif des parabènes

Aucune publication ou étude n'a été trouvée sur l'utilisation d'échantillonneurs passifs pour les parabènes. Le rapport du réseau européen Norman sur les échantillonneurs passifs les classe comme molécules ayant un potentiel intéressant pour être surveillées par échantillonneur passif, de préférence les échantillonneurs de type polaire (Vrana *et al.*, 2009).

## 2.1.3 Échantillonnage passif des triclosan et triclocarban

### 2.1.3.1 Discussion sur les protocoles

Peu d'études ont utilisé l'échantillonnage passif pour les TCS et une seule pour le TCC (Gautam *et al.*, 2014). Elles concernent majoritairement l'échantillonnage en rivière (Gautam *et al.*, 2014; Grabic *et al.*, 2010; Hoque *et al.*, 2014; Sabaliunas *et al.*, 2003), en lac (Balmer *et al.*, 2004; Helm *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2010; Lindström *et al.*, 2002; MacLeod *et al.*, 2007) ou dans une baie (Perron *et al.*, 2013; Sacks and Lohmann, 2011). Les seules études concernant les eaux usées sont celles de (Grabic *et al.*, 2010) en entrée et sortie de STEP et (Hoque *et al.*, 2014) qui ont exposé des SPMD dans un bassin de traitement des eaux usées au Canada (sewage lagoon).

Le Tableau 1 résume les protocoles utilisés par les différents auteurs. En ce qui concerne l'outil utilisé, les SPMD et les POCIS sont les échantillonneurs qui ont été le plus mis en œuvre. Les membranes polymériques (en LDPE ou en polyoxyméthylène (POM)) et les chemcatchers ont également été testés mais plus rarement. L'utilisation des POCIS semble pourtant peu indiquée car ils sont surtout adaptés pour les molécules hydrophiles ce qui n'est pas le cas du triclosan ( $\log K_{ow} > 4$ ). Moins de la moitié des études utilisent des PRC dont une seule qui a choisi des molécules ayant des propriétés physico-chimiques proches des molécules visées. Les solvants de dialyse sont majoritairement de l'hexane et du dichlorométhane, solvants plutôt toxiques. Pour les membranes polymériques, la durée de dopage paraît très longue (21 à 28 jours) et le solvant proposé par (Perron et al., 2013) semble peu efficace du fait de la forte proportion de méthanol dans lequel les substances sont solubles.

Si les méthodes de mise en œuvre ne sont pas harmonisées, le calcul des concentrations dans l'eau à partir des concentrations dans les échantillonneurs l'est encore moins. En particulier beaucoup d'articles utilisent les échantillonneurs à l'équilibre, ce qui est en désaccord avec leur propriété intégrative, ou ne calibrent pas l'échantillonneur pour les molécules d'intérêt et ne tiennent pas compte des variations de conditions d'exposition (par les PRC).

### **2.1.3.2 Résultats obtenus dans la littérature**

Le Tableau 2 présente les paramètres cinétiques et thermodynamiques utilisés dans la littérature pour calibrer les échantillonneurs passifs, et le Tableau 3 résume les concentrations mesurées par les différents échantillonneurs passifs.

L'utilisation des POCIS a permis de mesurer les concentrations en TCS et TCC dans des eaux de rivière sous forte pression urbaine (Cf. Tableau 3), parfois lorsque les concentrations dans le ponctuel était en dessous des limites de quantifications (Gautam et al., 2014; Li et al., 2010; MacLeod et al., 2007). L'impact des rejets urbains a pu être montré par comparaison des concentrations accumulées par les membranes exposées dans le milieu. Les concentrations mesurées par POCIS sont cependant difficilement quantifiables étant donné qu'il n'y a pas de corrections des conditions d'exposition et que les Rs utilisés dépendent du mode de calibration comme le montre le Tableau 2. Les concentrations mesurées par (Gautam et al., 2014) ne sont, par exemple, pas toujours comparables aux concentrations évaluées par échantillonnage ponctuel.

Les SPMD ont permis d'évaluer l'évolution de la concentration en TCS (entre <LQ et 1,7 ng/L) et MeTCS (0,14 et 5,4 ng/L) sur des rivières tchèques impactées par des rejets urbains (Grabic et al., 2010). Mais dans cette étude, aucun échantillon ponctuel n'a été prélevé pour comparaison. Il a été mis en évidence une augmentation des concentrations en aval de rejets de STEP ainsi que l'apparition du MeTCS absent des eaux usées, prouvant la métabolisation du TCS en MeTCS (Grabic et al., 2010).

Les membranes polymériques semblent également être un outil pertinent pour ces molécules (Perron et al., 2013; Sacks and Lohmann, 2011). Avec des LDPE, (Sacks and Lohmann, 2011) n'ont pas détecté de TCS mais quantifié le MeTCS entre 40 et 225 ng/L dans la baie de Narrangansett. (Perron et al., 2013) ont comparé le POM et le LDPE comme polymère et il semble que le POM accumule mieux le TCS.

Il est important de noter que pour ces molécules aucun protocole harmonisé n'a été utilisé et que les concentrations sont donc « outils dépendantes ».

Tableau 1 : Protocoles utilisés pour les échantillonneurs passifs dans la littérature

Outil / molécules	PRC	Condition nettoyage / dialyse	Condition dopage	Durée d'exposition	Régime d'utilisation et modèle mathématique	Référence
SPMD TCS, MeTCS	-	cyclopentane	-	21 à 24 jours	régime linéaire avec $R_s=4L.j^{-1}$ choisi arbitrairement par rapport à d'autres molécules	(Balmer et al., 2004; Lindström et al., 2002)
SPMD TCS	-	hexane	-		pas de calcul de $C_w$	(Sabaliunas et al., 2003)
pharmaceutique- POCIS TCS	-		-		calibration de $R_s$ en pilote fermé sous plusieurs conditions hydrodynamiques et correction <i>in situ</i> en fonction de l'hydrodynamique	(MacLeod et al., 2007)
SPMD TCS, MeTCS	HAP et PCB deutérés	hexane	injection directe	21 jours	modèle de la couche limite de l'eau d'Huckins et al. 2006. Pas de calibration.	(Grabic et al., 2010)
pharmaceutique- POCIS TCS	-	hexane	-	26 à 29 jours		(2011, 2010)
LDPE TCS, MeTCS	OPd17 NPd4	dichlorométhane 24h puis hexane 24h	eau/méthanol 80/20 pendant 21 jours	28 jours	utilisation à l'équilibre avec facteur correctif si $C_{PRC}$ n'est pas nul	(Sacks and Lohmann, 2011)
SPMD TCS	-	hexane	-	28 jours	calibration en laboratoire par exposition statique Utilisation d'un modèle linéaire	(Helm et al., 2012)
LDPE, POM, fibres PDMS de SPME TCS	$^{13}C$ -MeTCS	acétone 24h, dichlorométhane 24h	méthanol/eau 80/20 (28 jours)	21 jours	modèle accumulation, calibration $K_{sw}$ en laboratoire (correction de la salinité) et estimation de $k_e$ avec des PRC	(Perron et al., 2013)
pesticide-POCIS TCS, TCC	-		-	28 jours	calibration en laboratoire	(Gautam et al., 2014)
SPMD TCS	fluorene d10, PCB 14, PCB 32	hexane	injection directe	14 jours	modèle linéaire, calibration de $k_e$ au laboratoire pour les PRC	(Hoque et al., 2014)
PDMS TCS	Analyse non destructive des PDMS par spectrophotométrie UV, pas d'application dans le milieu					(Kibbey et al., 2010, 2009)

**Tableau 2 : Paramètres cinétiques et thermodynamiques des échantillonneurs passifs utilisés dans la littérature pour le TCS, TCC et MeTCS**

	Rs (L/j)	logK <sub>sw</sub> LDPE	logK <sub>sw</sub> POM	logK <sub>sw</sub> SPME	Type d'échantillonneur passif	
TCS MeTCS		2.44 ± 0.40 4.41 ± 0.10	3.79 ± 0.26 5.27 ± 0.18	4.06 ± 0.13 4.90 ± 0.15	Membranes polymériques	(Perron et al., 2013)
TCS MeTCS		3.34 ± 0.40 4.54 ± 0.10			Membranes polymériques	(Sacks and Lohmann, 2011)
TCS	0.184 ± 0.132 1.92 ± 0.62				POCIS, calibration en laboratoire hydrodynamique calme hydrodynamique rapide	(MacLeod et al., 2007)
TCS TCC	0.015 0.005				POCIS, calibration en laboratoire	(Gautam et al., 2014)

**Tableau 3 : Concentrations en TCS et TCC mesurées par échantillonneurs passifs dans la littérature**

	Type d'échantillon	Caractéristiques	Concentration (ng/L)	Échantillonneur passif	Pays	Référence	
<b>TCS</b>	Entrée de STEP	STEP classique	33 – 84	SPMD	République Tchèque	(Grabic et al., 2010)	
		bassins	0,83 – 30	SPMD	Canada	(Hoque et al., 2014)	
	Sortie de STEP	STEP classique	9,5 - 23	SPMD	République Tchèque	(Grabic et al., 2010)	
		bassins	0,29 – 2,6	SPMD	Canada	(Hoque et al., 2014)	
	Milieu naturel influencé par activité anthropique	Moyenne des concentrations en aval de 3 STEPs		1,7 – 18	POM	USA	(Perron et al., 2013)
				8,8 – 13	LDPE		
		Influence STEP, agriculture et urbain	0,01 – 1,5	SPMD	Canada	(Helm et al., 2012)	
		Riv 1 : Amont ville Riv 1 : Aval ville Aval STEP Aval	0,22 – 0,58 0,13 – 0,46 <LQ – 0,63 1,4 – 1,7	SPMD	République Tchèque	(Grabic et al., 2010)	
		Lac Greifensee Rivière Glatt Source Rivière Glatt estuaire Lac Zürichsee	1,4 – 14 11 74 2,3 – 3,1	SPMD	Suisse	(Lindström et al., 2002)	
		Aval direct STEP Aval	10 – 28 3,9 – 13	POCIS	États-Unis	(Gautam et al., 2014)	
<b>TCC</b>	Milieu naturel influencé par activité anthropique	Aval direct STEP Aval	7,6 – 47 4,5 – 18	POCIS	États-Unis	(Gautam et al., 2014)	

### 2.1.3.3 Influence du pH

Le pKa du TCS (8,14 d'après (SCCS, 2010)) se situe dans la gamme de pH des cours d'eau. Le pH joue donc un rôle sur la spéciation du TCS sous forme neutre ou ionisée. Or les SPMD et les membranes polymériques ne sont pas adaptés pour accumuler les composés organiques ionisés (Esteve-Turrillas et al., 2007; Huckins, 2006). Le pH va donc impacter directement la capacité d'accumulation des échantillonneurs passifs. La forme négative du TCS est susceptible d'avoir un coefficient de partage plus faible que celui de la forme neutre (Kibbey et al., 2007).

(Sacks and Lohmann, 2011) ont déterminé l'effet du pH sur le coefficient de partage LDPE-eau. Ils ont montré que ce dernier diminue lorsque le pH augmente. Le log  $K_{SW}$  (dans le LDPE) du TCS sous forme neutre est supérieur d'environ deux unités à celui du TCS sous forme chargée.

Il est possible de tenir compte de l'effet du pH en reliant la concentration totale de TCS ( $C_{WTOT}$ ) à la concentration intégrée par l'échantillonneur (TCS sous forme neutre  $C_{WNeutre}$ ) selon l'équation proposée par (Kibbey et al., 2010) :

$$C_{WTOT} = C_{WNeutre} \cdot (10^{pH-pKa} + 1) \quad \text{Équation 5}$$

### 2.1.4 Conclusion sur l'échantillonnage passif des triclosan et triclocarban

L'échantillonnage passif des triclosan et triclocarban semble une méthodologie d'intérêt et prometteuse pour leur suivi dans les milieux aquatiques (Vrana et al., 2009). Les exemples trouvés dans la littérature montrent que les SPMD et les membranes polymériques sont les outils les plus adaptés. Cependant, même si les études décrivant la méthodologie à employer pour ces outils sont nombreuses pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et pour les polychlorobiphényles (PCB) (Booij et al., 2002; Huckins, 2006), les protocoles trouvés dans la littérature pour les TCS et TCC ne sont pas harmonisés et ne semblent pas rigoureux. Un effort devra être fait pour développer une méthodologie robuste dans Cosmet'eau et qui permette d'étudier quelle fraction de molécules est réellement échantillonnée en fonction du pH.

## 2.2 La spectrométrie de masse haute résolution

Depuis une vingtaine d'années, les micropolluants sont suivis de façon ciblée en fonction des réglementations, préoccupations de santé publique et avancées technologiques dans le domaine des sciences de l'analyse. Ces études ciblées ont cependant des limites. Elles ne permettent ni de détecter ni d'évaluer ce qui n'est pas recherché : les contaminations émergentes, les produits de substitution. D'autre part, elles ne donnent pas d'information sur le devenir des substances car elles ne mesurent pas les éventuels produits de dégradation. Dans ce contexte, les avancées dans les technologies d'analyse et notamment la spectrométrie de masse haute résolution peuvent apporter des solutions (Krauss et al. 2010).

L'identification et la quantification de micropolluants organiques dans les eaux sont souvent réalisées à l'aide de techniques analytiques avancées telles que la chromatographie couplée à la spectrométrie de masse. La détection de substances organiques moyennement polaires à polaires à l'état de traces est généralement réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS), avec des analyseurs de type triple-quadripôle en mode MRM (multiple reaction monitoring) (Müller et al., 2011). Ce mode, de par sa sélectivité et des rapports signal-sur-bruit (S/N) élevés, permet la quantification de molécules cibles (screening

ciblé) à des concentrations de l'ordre du ng/L. Le rapport S/N de ces analyseurs est cependant fortement réduit lorsqu'ils sont utilisés en mode balayage total (full scan). Depuis une dizaine d'années, les spectromètres de masse haute résolution (e.g., à temps-de-vol ou à transformée de Fourier, de type Orbitrap) ont fait de grandes avancées, et permettent d'obtenir de meilleurs rapports S/N en mode full scan. Ils sont donc de plus en plus utilisés pour des applications en screening non ciblé (identification des molécules présentes dans les échantillons sans sélection des ions *a priori*).

La spectrométrie de masse haute résolution permet d'obtenir la masse des composés détectés avec une précision suffisante (4 à 5 chiffres après la virgule) pour en déduire la composition élémentaire. La précision de masse est calculée par rapport à la masse exacte théorique de la molécule selon le rapport  $\Delta m/m$ , exprimée en ppm (parties par million). Plus la précision de l'appareil est élevée, plus le nombre de molécules possibles possédant la masse détectée sera faible.

À partir de la masse exacte et des massifs isotopiques détectés, il est possible de retrouver la formule moléculaire brute des composés. Des bases de données peuvent être ensuite utilisées pour connaître la structure moléculaire potentielle du composé, et des expériences de fragmentation MS/MS peuvent être menées pour vérifier que le composé présente bien cette structure. D'autres techniques peuvent également être utiles pour déterminer la structure des composés par spectrométrie de masse, par exemple en utilisant des réactions de dérivation ou bien l'échange hydrogène-deutérium (H/D), ou encore en effectuant des fragmentations multiples ( $MS^n$ ) (Krauss et al., 2010).

L'identification de molécules peut également s'appuyer sur des bases de données de spectres de masse. Ce type de bibliothèque existe depuis longtemps pour la chromatographie gazeuse (NIST). Le développement de telles bases de données pour la chromatographie liquide reste très récent car la fragmentation des molécules dépend de la méthode utilisée, du type de source et du type d'analyseur. Le nombre de composés présents dans ces bibliothèques tend à se développer.

Un autre paramètre important pour l'identification de molécules inconnues par spectrométrie de masse est la résolution de l'analyseur, calculée à partir de la largeur à mi-hauteur des pics (i.e., full-width-at-half-maximum, FWHM). Plus la résolution est élevée, plus la distinction entre deux signaux proches sera possible (Croley et al., 2012). La résolution (3000 à 10 000 FWHM) et la précision de masse (50 ppm) des spectromètres de masse de type quadripôle ou trappe d'ion ne sont pas suffisantes pour des applications poussées en screening. Les résolutions atteintes par les spectromètres de masse haute résolution (20000 à 150 000 FWHM) de type Temps de vol ou Orbitrap sont plus adaptées à ce genre d'applications.

## **2.2.1 Les spectromètres de masse haute résolution**

### **2.2.1.1 Temps de vol (Time-of-flight, TOF)**

Dans l'analyseur à temps de vol, les ions formés à la sortie de la source sont accélérés sous l'effet d'une tension. L'analyseur mesure ensuite le temps mis par un ion pour parcourir la longueur du tube, qui est proportionnel à son rapport masse sur charge ( $m/z$ ).

Avant d'arriver à l'analyseur, les ions formés subissent le même champ électrique d'accélération. Les ions possèdent donc une énergie cinétique similaire mais une vitesse différente (acquise lors de la phase d'accélération). Ils vont ensuite rencontrer un réflectron

(miroir électrostatique) produisant un champ électrique qui ralentit les ions jusqu'à inverser leurs vitesses. Ce plan de focalisation permet ainsi de séparer les ions ayant un même rapport  $m/z$ , les plus petits atteindront le détecteur en premier.

Le spectromètre TOF possède une résolution de l'ordre de 20 000 FWHM, une précision de masse de 3 ppm et peut atteindre des masses très élevées de 300 kDa (Krauss et al., 2010). L'utilisation du couplage quadripôle/TOF (ou QTOF) permet de sélectionner certains ions pour en obtenir ensuite la masse exacte.

### 2.2.1.2 Orbitrap

L'orbitrap est un analyseur récent formé d'une électrode creuse à l'intérieur de laquelle se trouve une électrode coaxiale en forme de fuseau (Hu et al., 2005). Cet analyseur piège les ions qui sont soumis, par la suite, à deux mouvements différents : un rotatoire, autour de l'électrode interne et un axial, le long de cette même électrode. Lorsque les ions sont, à la fois, présents sur la trajectoire circulaire et axiale, ils possèdent un  $m/z$  donné. Ce rapport  $m/z$  est défini par une analyse de transformation de Fourier, qui, grâce à une formule, fait une analogie entre le  $m/z$  et la fréquence axiale. Cet analyseur possède une résolution allant jusqu'à 150 000 FWHM et une précision de masse de 2-5 ppm (Hu et al., 2005). De plus, sa gamme dynamique, l'étendue des concentrations relatives détectables (soit le rapport de la plus grande sur la plus petite), s'étend de  $10^3$  à  $10^4$  et tout comme le TOF, il utilise le mode full scan (Krauss et al., 2010). Il peut également être utilisé en couplage avec une trappe d'ion linéaire (LTQ-Orbitrap) pour la sélection d'ions spécifiques.

Les avantages de l'Orbitrap par rapport aux quadripôles et trappes d'ion sont (Hogenboom et al., 2009) :

- Une meilleure sensibilité en full scan
- La mesure de la masse exacte pour calculer la composition élémentaire la plus probable
- En couplage avec une trappe d'ion (LTQ-Orbitrap), la possibilité de mesurer la masse exacte d'ions produits par fragmentations multiples ( $MS^n$ )

Les avantages de l'Orbitrap par rapport aux quadripôles et aux TOF sont :

- Une meilleure transmission d'ions, entraînant une plus grande sensibilité en  $MS^n$  et de meilleures limites de détection
- Une gamme d'intensité plus étendue sur laquelle peut être mesurée la masse exacte

## 2.2.2 Traitement du signal

Un algorithme de déconvolution des spectres de masses peut être appliqué aux chromatogrammes pour rechercher les groupes d'ions qui peuvent être associés à un pic chromatographique réel et donc représenter une molécule particulière. Différents filtres peuvent également être employés pour éliminer le bruit de fond et déconvoluer uniquement les pics pertinents. En effet, même après les étapes de préparation et d'extraction des échantillons, des interférences peuvent subsister du fait des matrices complexes étudiées (e.g., eaux usées) (Gómez-Ramos et al., 2011).

Plusieurs filtres sont généralement employés dans les étapes de déconvolution des chromatogrammes et d'identification par comparaison avec les bases de données (Gómez-Ramos et al., 2011) :

- un « filtre de pic » sélectionnant les ions de hauteur supérieure à un seuil donné
- un « filtre de composé » sélectionnant les pics d'abondance supérieure à un seuil donné
- un « filtre de masse » lors de la comparaison avec une base de données de composés connus. Un seuil de tolérance est défini pour la différence entre les masses des données brutes et les masses des composés de la base de données (ex. 5 ppm).
- un filtre de temps de rétention avec une tolérance définie (e.g.,  $\pm 0,3$  min) par rapport aux valeurs de la base de données

### 2.2.3 Exemples de screening dans la littérature

Les exemples de screening ciblés ou non ciblés pouvant être trouvés dans la littérature utilisent fréquemment des couplages GC-TOF, HPLC-(Q)TOF ou HPLC-(LTQ)-Orbitrap. Le screening de molécules inconnues de familles données peut être réalisé par d'autres méthodes spécifiques utilisant des spectromètres de masse basse résolution (triple-quadrupôle). Par exemple, des dérivés de flavonoïdes<sup>6</sup> ont été détectés puis identifiés par HPLC-MS/MS en sélectionnant en mode MRM les fragments caractéristiques produits à partir de la structure commune de type aglycone (Rak et al., 2010).

#### 2.2.3.1 GC-TOF

Deux exemples de screening utilisant le couplage GC-TOF se sont focalisés sur la recherche de xénobiotiques organiques dans les eaux aquatiques urbaines (Jernberg et al., 2013) et de contaminants organiques dans des sels marins (Serrano et al., 2011). Dans ces deux études, l'acquisition des spectres a été réalisée en mode full scan avec une source à impact d'électrons (EI). Les spectres de masse ont ensuite été déconvolués et comparés avec la base de données NIST. La liste de composés possibles est donnée pour une différence de masse inférieure à 5 ppm. Les structures de 36 composés ont été proposées (dont 4 ont été confirmées) dans la première étude (Jernberg et al., 2013), et 25 composés ont été identifiés dans la seconde (Serrano et al., 2011).

Un exemple récent est une étude de screening par analyse GC×GC-TOF, permettant d'identifier 50 composés organochlorés ou organobromés (présents dans la base de données NIST) sur 73 détectés dans un échantillon d'air intérieur (Hashimoto et al., 2013). L'identification des produits chlorés et bromés s'appuie sur le développement d'un logiciel d'extraction sélective des spectres de masse contenant les massifs isotopiques caractéristiques du chlore ou du brome.

#### 2.2.3.2 (U)HPLC-(Q)TOF

Plusieurs études de screening non ciblé ou semi-ciblé ont été réalisées avec des appareils de type LC-TOF ou LC-QTOF en mode full scan (García-Reyes et al., 2007; Gómez-Ramos et al., 2011; Ibáñez et al., 2008; Müller et al., 2011).

Un premier exemple a consisté en l'identification d'un produit inconnu dans un extrait de pomme par obtention de la masse exacte, de la formule brute correspondante et de la structure potentielle du produit par recherche dans diverses bases de données (García-Reyes et al., 2007). Le produit identifié (le pesticide difénoconazole) est ensuite confirmé par

---

<sup>6</sup> Les flavonoïdes (ou bioflavonoïdes) sont des métabolites secondaires des plantes partageant tous une même structure de base formée par deux cycles aromatiques reliés par trois carbones.

fragmentation CID (collision induced dissociation) et étude des fragments formés, ainsi que par analyse d'un standard analytique. Une quantification *a posteriori* est alors réalisée. Un autre exemple est donné dans la même étude, consistant en l'identification d'un composé inconnu présent dans des extraits de poire et de raisin. Le produit inconnu ne correspondait à aucun composé présent dans les bases de données considérées, et la fragmentation CID ne produisait pas d'ions fragments spécifiques. Un paramètre utile calculé par le logiciel de traitement des données conjointement à la formule brute est la valeur de DBE (double-bond equivalent, indiquant le nombre d'insaturations de la molécule). L'imazalil, un fongicide dont la formule brute était proche de celle calculée pour le composé inconnu, possédait également une valeur de DBE compatible. Le produit a donc raisonnablement été identifié comme un dérivé méthylé de l'imazalil qui était probablement une impureté présente dans la formulation commerciale de ce fongicide.

Un étude plus récente a validé une méthode de screening ciblé de 150 polluants organiques (pesticides, produits pharmaceutiques, drogues, conservateurs et filtres anti-UV) dans des échantillons d'eaux souterraines, d'eaux de surface et d'effluents d'eaux usées par UPLC-QTOF (Diaz et al., 2013). L'analyse a été conduite dans le mode MS<sup>E</sup>, consistant en une fragmentation simultanée à faible et haute énergie de collision. L'identification des polluants s'est faite par confirmation du temps de rétention et par la présence d'au moins deux ions fragments dont la masse exacte est mesurée.

Un exemple de screening non ciblé a consisté en l'étude de l'impact d'une décharge sur des ressources en eau (eaux souterraines) utilisées pour la production d'eau potable (Müller et al., 2011). En se basant sur la comparaison d'échantillons de lixiviats de décharge avec des échantillons d'eaux souterraines potentiellement impactées par les rejets de la décharge et des échantillons d'eaux avant et après potabilisation, les auteurs ont pu restreindre le nombre de molécules présentes dans l'ensemble des échantillons et donc mettre en évidence quelles molécules présentes dans l'usine de production d'eau potable étaient réellement issues de la décharge. Sur les 1700 pics détectés dans le lixiviat de décharge, 10 molécules ont été détectées en entrée de l'usine de production d'eau potable et 3 molécules dans l'eau potable produite (Müller et al., 2011).

Les études de screening s'appuient souvent sur des bases de données « maison » pour développer une approche semi-ciblée (Gómez-Ramos et al., 2011; Hernández et al., 2012; Ibáñez et al., 2008). Une étude a été consacrée à l'identification de produits de transformation de contaminants organiques dans des effluents d'eaux usées par une telle approche semi-ciblée (Gómez-Ramos et al., 2011). Une base de données de spectrométrie de masse exacte a été élaborée pour 147 composés et leurs principaux fragments générés par des expériences de fragmentation MS/MS. L'identification de ces produits et de leurs produits de transformation a ensuite été menée sur 8 échantillons d'effluents d'eaux usées. Les produits de transformation (non présents dans la base de données) ont été identifiés car ils possèdent des ions majoritaires communs avec des fragments présents dans la base de données. Cette approche se base donc sur des similarités entre la dégradation des produits dans les eaux usées et leur fragmentation dans les sources d'ions (« relation fragmentation-dégradation »). Par exemple l'érythralosamine, produit d'hydrolyse de l'érythromycine, possède un fragment de masse  $m/z$  540 commun avec l'érythromycine. Les produits de transformation détectés ont ensuite été confirmés par des expériences de fragmentation MS/MS et/ou par analyse de standards. Cette méthode offre un moyen robuste d'identifier certains produits de dégradation mais n'est en aucun cas exhaustive dans la mesure où d'autres produits de

dégradation peuvent n'avoir aucun fragment en commun avec le produit initial. Un autre exemple de cette approche est donné pour les produits de dégradation d'un insecticide (l'amtiraze), qui possèdent les mêmes masses que les ions produits lors de la fragmentation de cet insecticide (García-Reyes et al., 2007).

### **2.2.3.3 (U)HPLC-Orbitrap**

Plusieurs études de screening ciblé ou non ciblé ont été menées avec un analyseur de type Orbitrap. Une méthode a été développée par analyse UPLC-exactive-Orbitrap pour le screening de 43 composés pharmaceutiques et de fongicides dans des eaux de surface et des eaux souterraines (Chitescu et al., 2012). Les échantillons (100 mL) sont extraits par SPE sur cartouche Strata X et concentrés jusqu'à 250  $\mu$ L (10% v/v MeOH/H<sub>2</sub>O). L'acquisition des données est réalisée en mode full scan entre 100 et 1000  $m/z$  à une résolution de 50 000 FWHM.

Une étude a utilisé une HPLC couplée avec un analyseur LTQ-Orbitrap pour l'identification de composés inconnus dans différents types d'eaux dans l'optique d'identifier des polluants émergents polaires (Hogenboom et al., 2009). Ce couplage combine la capacité de spectrométrie de masse en tandem de la trappe d'ion (LTQ) avec la haute résolution et la masse exacte obtenues avec l'Orbitrap. Deux approches ont été utilisées : (1) une approche semi-ciblée pour la détection de produits pharmaceutiques, de benzotriazoles et de drogues illicites dans des eaux de surface, des eaux souterraines et des eaux potables; (2) une approche non ciblée pour l'identification de composés inconnus dans un échantillon d'eau souterraine et dans un extrait polaire d'échantillon de sol de décharge.

Les screenings ont été menés par comparaison avec une base de données MS masse exacte et MS<sup>n</sup> répertoriant 3000 polluants aquatiques. La base de données contenait, entre autres, la masse mesurée, la masse théorique, le temps de rétention relatif par rapport à deux étalons internes, le type d'échantillon, les ions produits et la composition élémentaire la plus probable. Dans un deuxième temps, les structures de molécules inconnues ont été identifiées par recherche dans la base de données NIST, puis dans des sites internet (Chemfinder, Chemspider). Les structures de composés inconnus ont ensuite été confirmées par fragmentations multiples MS<sup>n</sup>.

Les spectres de masse précise en full scan (50 à 1300 Da) ont été obtenus à haute résolution (100 000 FWHM). L'acquisition des données MS et MS<sup>n</sup> a été effectuée en temps réel en sélectionnant automatiquement les ions les plus intenses pour réaliser les fragmentations multiples MS<sup>n</sup>. L'avantage de ce mode d'acquisition est d'obtenir les spectres de fragmentation multiples de composés inconnus sans avoir à faire une présélection des ions.

Suivant la première approche, des composés pharmaceutiques ont été détectés dans les échantillons d'effluents d'eaux usées, dont des  $\beta$ -bloquants (e.g., aténolol, furosémide), un anti-épileptique (carbamazépine), des antibiotiques (e.g., sulfaméthoxazole), des analgésiques (e.g., diclofénac, tramadol) ou encore la lidocaïne (anesthésique). Des drogues illicites et leurs métabolites (méthadone, THC et ses dérivés, opiacés, MDMA, métabolite de la cocaïne : benzoylecgonine) ont également été détectés, ainsi que des benzotriazoles (produits anti-corrosifs). 5 benzotriazoles et 3 benzothiazoles ont également été détectées, 3 benzotriazoles étant également détectées dans des échantillons d'eau potable (0,01 à 0,1  $\mu$ g/L). La présence de ces composés a été confirmée par analyse de standards, et 10 produits pharmaceutiques ont été quantifiés dans les effluents traités d'eaux usées (0,1 à 2,7  $\mu$ g/L).

Un certain nombre de composés organiques polaires inconnus ont ensuite été détectés par l'approche non ciblée dans un échantillon d'eau souterraine. Grâce à la composition élémentaire obtenue à partir de la masse exacte et au profil de fragmentation, un de ces composés a été identifié comme le l'acide oxanilique du métolachlore, principal métabolite de l'herbicide métolachlore. Ce produit a été confirmé par analyse d'un standard. Plusieurs composés inconnus ont également été détectés dans une fraction polaire extraite d'un échantillon de sol de décharge. Un de ces composés a été identifié comme la méthylacridine, un hydrocarbure aromatique hétérocyclique, métabolite de l'acridine. Un autre HAP hétérocycliques contenant un atome d'azote, l'azapyrène (famille des azaarènes) a également été détecté. Ces composés sont particulièrement solubles et génotoxiques.

Un autre exemple de screening non ciblé a permis l'obtention de la masse exacte ( $m/z$  160,0272 Da), de la formule brute associée ( $C_5H_6Cl_1N_3O_1$ ) et finalement de la structure moléculaire d'un composé identifié comme un produit de transformation de l'herbicide chloridazone (méthyl-desphenyl-chloridazone) (Krauss et al., 2010).

### 3 Apports des bioessais

Les bioessais sont des méthodes basées sur le suivi d'un ou de plusieurs effets biologiques induits par des substances présentes dans des échantillons à tester lorsque ces derniers sont mis au contact d'organismes, tissus ou cellules vivants. Les activités humaines produisent des molécules organiques de plus en plus nombreuses, complexes et renouvelées par les industriels. Ces molécules sont souvent synthétisées et utilisées pour leur activité biologique (médicaments, pesticides, biocides...). Diffusées largement dans les milieux aquatiques, même présentes à des concentrations faibles, ces substances peuvent ainsi avoir un effet sur les organismes vivants.

Les bioessais constituent de fait de nouvelles approches pour seconder les outils analytiques physicochimiques, qui restent les références réglementaires mais montrent certaines limites : en particulier elles sont souvent ciblées et ne peuvent par nature pas tenir compte des effets des molécules, seules ou en mélange. Ces méthodes de bioessais sont de plus en plus préconisées par diverses instances internationales<sup>7</sup> pour l'évaluation de la pollution de l'eau. Cette partie se propose d'illustrer la place et la pertinence des bioessais dans la problématique de la qualité de l'eau, et des résidus de produits de soins personnels en particulier, et ses divers enjeux.

#### 3.1 Les outils d'analyse des effets biologiques ou bioessais

##### 3.1.1 La pertinence des bioessais dans l'évaluation de la pollution de l'eau

La première limite fonctionnelle de la mesure physicochimique réside dans le fait que la cible est de moins en moins bien connue, du fait des rapides innovations de l'industrie chimique.

---

<sup>7</sup> Ainsi la Communauté Européenne dans le contexte des Stratégies d'Implémentation Communes (ou CIS, « Common Implementation Strategies » en anglais) de la Directive Cadre Eau – CIS 19, 25 et 27 par exemple, mais aussi l'US EPA - qui bien que n'étant pas techniquement une instance internationale bénéficie d'une expertise reconnue mondialement - dans ses méthodes sur effluents entiers (<http://www.epa.gov/cwa-methods/whole-effluent-toxicity-methods>)

En outre, même connue, une substance subit diverses modifications physicochimiques et biologiques une fois dans l'environnement à mesure qu'elle interagit avec les autres espèces et qu'elle est transformée par les organismes. La question des interactions biologiques nous mène à la seconde limite des méthodes physicochimique : elles ne renseignent en rien sur l'activité/réactivité des molécules, uniquement sur leur éventuelle présence. Il ne s'agit pas là d'une limite technologique à repousser mais bien d'une différence conceptuelle fondamentale dans le champ de la mesure.

Les bioessais abordent le problème différemment : il ne s'agit plus de tenter d'identifier des substances chimiques présentes dans un échantillon mais de suivre l'effet de ce dernier, dans son intégralité ou après une extraction, sur des réponses cellulaires *in vitro* ou *in vivo*. Des cultures de cellules ou organismes unicellulaires, pluricellulaires voire supérieurs, sont alors utilisées comme sondes afin de qualifier les effets de la pollution dans la matrice aqueuse. Un bioessai répondra, dans la mesure où son implémentation est correcte et adaptée, même à une molécule ou une famille de molécules jamais décrites auparavant, ou non connues comme actives sur une voie particulière.

D'autre part, un bioessai est intégratif de tous les stressors de la fonction biologique suivie, incluant éventuellement leur biodisponibilité dans l'eau. Le bioessai renseignera ainsi sur la résultante de la contribution de chaque effet, agoniste ou antagoniste<sup>8</sup>, et des potentielles synergies positives ou négatives du mélange. Ceci est un avantage dans un contexte où les mélanges de polluants difficilement défrichables - on parle couramment de « cocktail » - compliquent l'évaluation de la situation à la fois en ce qui concerne un échantillonnage de qualité mais surtout vis-à-vis de la toxicologie. Si l'étude de substances isolées démontre un contexte déjà complexe, comme avec les phénomènes de doses-réponses non monotones<sup>9</sup>, que dire d'un échantillon environnemental où se mélangent des substances aux effets différents, parfois additifs, soustractifs, synergiques ? Quels mélanges représentatifs considérer pour les études toxicologiques, en nombres comme en proportions ?

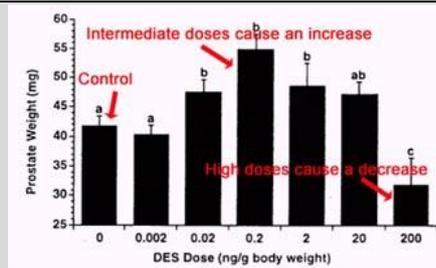
**Doses-réponses non monotones.** Généralement, il est attendu que les effets d'une substance active augmentent à mesure que sa dose croît elle-même et qu'ainsi, selon l'adage antique, la dose fasse le poison. On parle alors de dose-réponse monotone dans la mesure où dose et effet évoluent de concert, dans un même sens. Si c'est effectivement le cas pour beaucoup de contaminants chimiques, il est maintenant admis qu'il existe des modes d'action dits non monotones dans lesquels la courbe de la dose-réponse s'inverse à mesure que la dose croît. La courbe peut alors prendre la forme d'un U - auquel cas les réponses sont maximales à faibles et fortes doses - ou d'un U inversé - la réponse étant maximale dans une zone médiane - voire de divers autres profils. Dans tous les cas, la résultante est qu'une dose plus forte peut être associée, contre-intuitivement, à un effet moindre.

Quelques exemples de travaux illustrant le concept :

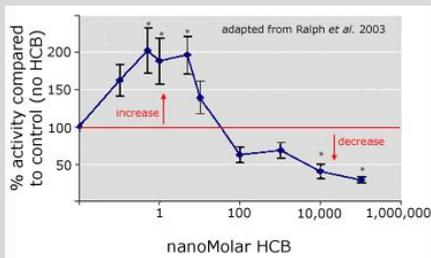
---

<sup>8</sup> C'est-à-dire si l'effet se traduit par l'activation d'une voie ou réponse donnée, ou au contraire sa répression.

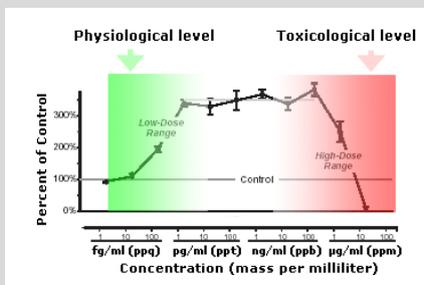
<sup>9</sup> Cf. encart dédié.



Poids de la prostate chez des rats exposés au diéthylstilbestrol (Saal et al., 1997)



Réponse androgénique de cellules prostatiques à l'hexachlorobenzène (Ralph et al., 2003)



Prolifération des cellules MCF-7 à des doses d'estradiol du fg/mL au µg/mL (Welshons et al., 2003)

L'utilisation de bioessais pour l'évaluation d'échantillons d'eaux réelles permet de visualiser une réponse déjà intégrée, et d'apporter de nouvelles lumières sur la problématique des mélanges dans le cas de tests sur des matrices de synthèse. (Bain and Kumar, 2014; Li et al., 2013; Liscio et al., 2014; Narotsky et al., 2015; Pan et al., 2015; Yang et al., 2008) Historiquement, les bioessais couramment utilisés en France/Europe dans les problématiques environnementales reposent sur la caractérisation de la mortalité de petits crustacés (*D. magna*, *T. platyurus*), d'algues unicellulaires (*C. vulgaris*, *R. subcapitata*) ou de bactéries marines naturellement bioluminescentes (*A. fischeri*). Bien qu'étant toujours couramment employés pour leur robustesse et le long recul expérimental auquel ils sont associés,<sup>10</sup> ces tests côtoient maintenant des méthodes plus récentes et/ou élaborées afin d'évaluer plus pertinemment la qualité de l'eau en regard de la complexité des pollutions modernes.

### 3.1.2 La place des bioessais dans la réglementation

Les analyses physicochimiques restent l'étalon réglementaire sur lequel se basent nombre de critères de qualité environnementale qui sont exprimés sur la base de seuils de concentration limites pour diverses substances cibles.

<sup>10</sup> Notamment par les gestionnaires de ressources responsables de la qualité des eaux et environnements dans leur périmètre, mais aussi d'autres parties prenantes comme les industriels détenteurs d'une installation classée ICPE, les prescripteurs institutionnels comme les DREAL etc. Le caractère réglementaire de ces trois types de tests est une des principales raisons de leur ubiquité.

Au niveau français s'appliquent les législations nationales et européennes sur la qualité de l'eau, en particulier la DCE qui fixe le bon état des masses d'eau selon des critères environnementaux incluant des objectifs légaux de concentrations sur une liste de substances dites prioritaires au niveau de la communauté (directive 2008/105/EC). La France se fixe en outre elle-même des objectifs propres et ambitieux, comme par exemple l'action de Recherche des Substances Dangereuses dans l'Eau (ou RSDE) qui a œuvré à établir un panorama des substances présentes dans les rejets industriels par activité. Si les bioessais ne sont pas en première ligne de la RSDE, ils ont été utilisés pour aborder les aspects d'évaluation du risque dans une démarche élargie, offrant notamment un cadre de sélection et de priorisation. Tronico VigiCell a d'ailleurs réalisé une étude sur les effluents finaux de 5 secteurs d'activité, mandatée par l'Agence de l'Eau Seine Normandie<sup>11</sup> et incluant les industries cosmétiques, dont les résultats d'impacts biologiques (toxicité générale sur un panel d'organismes/modèles, perturbations endocriniennes, génotoxicité, stress cellulaire) ont été adjoints à la somme de connaissances déjà produites au cours des deux dernières campagnes RSDE.

Les bioessais ne sont pas l'objet des NQE, traduites par les concentrations limites des listes de substances dangereuses/prioritaires dans la directive 2013/39/EU qui amende la directive 2008/105/EC susmentionnée. Néanmoins, la DCE au sens large requiert explicitement une approche intégrée du suivi et de l'évaluation de la qualité des eaux de surface. Ces évaluations prennent en compte les effets biologiques au niveau de populations/communautés de la faune et de la flore aquatique locale basés sur des indices spécifiques de qualité écologique (annexe V de la DCE sur phytoplanctons, macroalgues, angiospermes, invertébrés benthiques et poissons), mais laissent aussi place aux bioessais sur organismes et cultures cellulaires en laboratoire. Divers documents en lien avec les Stratégies d'Implémentation Communes (Common Implementation Strategies ou CIS) mentionnent l'importance des bioessais dans le cadre plus général des moyen et fins de la DCE. En particulier, le document n°19 (*Surface water chemical monitoring*) évoque les bioessais en lien avec le besoin d'introduire des techniques pour améliorer la qualité des évaluations et réduire le coût de ces dernières à mesure que de nouveaux outils sont disponibles. Si ce document rappelle que les bioessais ne peuvent pas être utilisés pour justifier du respect des NQE, les bioessais y sont décrits comme utiles au suivi et particulièrement propices à :

- la détection précoce de perturbations biologiques,
- l'établissement d'un lien entre mesures chimiques et écologiques,
- l'établissement d'un lien dose/exposition/effets,
- la constitution d'un système d'alerte amont,
- la mise à jour des évaluations de risque.

Le document n°3 (*Analysis of Pressures and Impacts*) des CIS enjoint à prendre en compte le risque potentiel d'effets cumulatifs de substances présentant des modes d'action similaires dans les évaluations de pression et d'impacts, ce qui est une des forces des méthodes basées sur les effets biologiques. Les documents 7 (*Monitoring under the Water Framework Directive*), 25 (*Chemical Monitoring of Sediment and Biota*) et 27 (*Deriving Environmental Quality Standards*) font aussi référence aux bioessais, notamment dans le cadre des mesures sur

---

<sup>11</sup> En date de rédaction de ce document, l'Agence de l'Eau Seine Normandie n'a pas encore diffusé ce rapport.

sédiments. Ces questions sont approfondies dans un rapport technique relativement récent (août 2014) du réseau scientifique NORMAN centré sur la question des évaluations basées sur les effets biologiques dans l'eau et l'avantage qu'elles peuvent procurer en termes de gestion de tous les aspects de gestion (risque, alerte, rapport information/coût etc.) du suivi environnemental en Europe.<sup>12</sup>

Enfin, il convient de noter que la directive équivalente à la DCE vis-à-vis du milieu marin, la DCSCMM (Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin – 2008/56/EC) est particulièrement mieux lotie en ce qui concerne les bioessais (avec par exemple l'inclusion de marqueurs d'imposex, d'adduits à l'ADN, d'activités métaboliques, de perturbation oestrogènes par mesure de la vitellogénine hépatique chez les poissons mâles etc.).

Dans tous les cas, il apparaît que si les bioessais ne sont pas forcément explicitement requis et imposés par la réglementation, les moyens et fins servis par cette dernière leur laisse une place parfois importante qui traduit leur utilité en complément des mesures physicochimiques qui sont et font la norme (Doyle et al., 2014).

### 3.1.3 Typologie des bioessais

Les bioessais sont graduellement passés de l'observation de phénomènes de mortalité d'organismes (comme par exemple les tests d'inhibition de croissance algale ou d'immobilisation aiguë de daphnies, respectivement OCDE 210 et OCDE 202) à l'observation de diverses anomalies sublétales au niveau de tissus ou de cellules (ex : le test de génotoxicité UmuC ou le test de mutagénicité de Ames, ISO 13829 et OCDE 471) sans pour autant rendre caduques les études de toxicité aiguë. Un test comme la conjonction de mesures sur l'inhibition de croissance d'une algue et de la détection parallèle de ses caractéristiques photosynthétiques est emblématique de cette évolution.(Escher et al., 2008)

Il n'existe dans tous les cas pas de classification des bioessais qui fasse référence, les distinctions possibles étant nombreuses quant au mode et à la nature des expositions ou à l'échelle organisationnelle :

- À un extrême du spectre on retrouve les tests en laboratoire et en conditions contrôlées. Ces derniers peuvent être basés sur des cultures de cellules (voire de structures subcellulaires) *in vitro*, ou sur l'exposition *in vivo* d'organismes (ou de plusieurs types d'organismes) entiers avec des matrices synthétiques ou des prélèvements environnementaux réels. Les tests d'activation de récepteurs membranaires (hormonaux, xénobiotiques etc.) entrent en grande majorité dans cette catégorie, de même que les tests de génotoxicité « Green Screen » ou la mesure de la phosphorylation de l'histone  $\gamma$ H2AX (ainsi que les tests UmuC et Ames susmentionnés).
- À l'autre extrême, on retrouve les observations faites sur la faune et la flore d'un biotope donné afin de qualifier des indicateurs à l'échelle de populations et de communautés entières. Un exemple bien connu est la mesure des populations de diatomées pour calculer l'indice biologique éponyme ou plus largement l'indice

---

<sup>12</sup> « Technical Report on Aquatic Effect-Based Monitoring Tools » du groupe de travail #2 du réseau NORMAN disponible ici :

[http://www.norman-network.net/sites/default/files/files/WG2/Effect-based%20tools%20CMEP%20report%20annex%2028%20April%202014\\_final.pdf](http://www.norman-network.net/sites/default/files/files/WG2/Effect-based%20tools%20CMEP%20report%20annex%2028%20April%202014_final.pdf)

biologique global normalisé (en retenant 38 taxons polluo-sensibles constituant 9 groupes indicateurs et en évaluant la richesse faunistique sur les 8 substrats les plus biogènes d'un cours d'eau). D'autres organismes suivis sont les copépodes et rotifères (qui peuvent aussi faire l'objet de tests *in vitro*), les nématodes etc.

- Les approches centrées sur les biomarqueurs<sup>13</sup> font le lien entre ces deux champs, pouvant résulter d'observations en laboratoire ou sur le terrain (selon si les modèles tests ont été exposés en conditions contrôlées ou prélevées dans l'environnement) et porter soit sur des marqueurs chimiques soit sur des effets biologiques plus larges au niveau individuel. On trouve couramment dans les biomarqueurs les mesures de vitellogénine hépatique chez le poisson mâle et l'intersex (tous deux marqueurs d'exposition à des perturbateurs type oestrogènes) ou son opposé l'imposex, l'activité hépatique EROD (activation de cytochromes permettant de remonter à une exposition à xénobiotiques type dioxines, HAP, PCBs etc.). Les prélèvements et préparations de tissus pour mesure de génotoxicité par tests comètes ou micronoyaux sont aussi couramment employés.

Si les observations sur le terrain sont par définition la qualification environnementale la plus représentative de l'impact final d'une pollution sur un ensemble complexe de facteurs et d'organismes, les tests en laboratoire ont quant à eux l'avantage de la reproductibilité et de la spécificité, leur conférant une pertinence particulière dans les efforts de standardisation des méthodes (Connon et al., 2012).

Un autre mode de catégorisation a été proposé sur la base du type d'effets biologiques observés. Un distinguo est ainsi réalisé entre :

- toxicité non spécifique, c'est-à-dire portant sur la mesure de la mort d'un organisme/microorganisme ou l'observation d'altérations générales non reliées à un mode d'action particulier (nécroses suite à atteintes de natures diverses par exemple),
- toxicité spécifique, avec un mode d'action identifié sur une cible cellulaire ou moléculaire donnée (perturbations endocriniennes, inhibition du photosystème II chez les organismes photosynthétiques),
- toxicité réactive, avec l'apparition de lésions typiques au niveau de structures importantes des cellules qui peuvent être délétères de diverses manières à terme (atteintes à l'ADN, atteintes dues au stress oxydant etc.)

Ce mode de classification (Tang et al., 2014) a l'avantage de dépasser en les intégrant les catégories *in vivo*, *in vitro* et biomarqueurs, même si cela se fait au détriment des indices écotoxicologiques (par exemple, comptages d'espèces, analyse des réseaux trophiques etc.) pour lesquels il n'est pas systématiquement pertinent. À ces catégories, certains auteurs (Escher et al., 2014; Hamers et al., 2010; Piva et al., 2011) ajoutent l'induction de voies métaboliques (qui sont plutôt un marqueur d'exposition) ainsi que l'activation de diverses voies adaptatives comme la synthèse de protéines de stress diverses ou des métabolismes plus spécifiques d'un organisme donné.

---

<sup>13</sup> Un biomarqueur est défini comme « une caractéristique mesurable, indicatrice de processus biologiques normaux ou pathologiques, ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique. » Ainsi la glycémie est un biomarqueur du diabète, tout comme la présence de tissus ovariens dans les gonades de poissons mâles est une indication de l'exposition à des perturbateurs endocriniens oestrogènes, par exemple.

Il est courant de distinguer les expériences en laboratoire regroupées sous la dénomination de bioessais d'un côté et les études écotoxicologiques *in situ* de l'autre. Ce n'est pas le cas dans le présent travail : dans ce document le terme de « bioessais » fait référence à tous types d'observations d'effets sur le vivant, en contraste avec les approches d'identification et dosage de substances chimiques et surtout sans chercher à ségréger *in vitro* et *in vivo*, ou laboratoire et *in situ*.

## **3.2 Innovations dans les bioessais**

Cette partie présente les grandes tendances des innovations dans les bioessais pour le suivi environnemental. Essentiellement, on peut observer dans la littérature un recours de plus en plus fréquent à la mise en parallèle de mesures simultanées, soit sur une gamme d'organismes, soit sur une gamme d'effets ou marqueurs cibles. Alternativement, on peut aussi trouver l'implémentation de tests novateurs dérivés des recherches en biotechnologies ou proposant de nouveaux critères/méthodes expérimentaux sur les organismes classiquement utilisés dans les tests normés.

### **3.2.1 Différentiels d'organismes et d'effets**

Une somme maintenant conséquente de travaux écrits ou oraux s'accorde sur l'importance de conduire des études non plus sur des organismes isolés avec un jeu limité d'observations, mais sur des gammes les plus variées possibles d'organismes et de critères expérimentaux en parallèle (Aguirre-Martínez et al., 2015; Altenburger et al., 2015; Brack et al., 2015; Connon et al., 2012; Escher et al., 2014; Seabra Pereira et al., 2014; Tang et al., 2014). Cette démarche y est invariablement décrite comme étant garante de la pertinence et de la performance dans les évolutions futures de l'évaluation de la qualité de l'eau, en soutien des méthodes classiques. Il s'agit de tester en parallèle et dans des conditions identiques ou comparables eaux et substances sur des organismes liés entre eux (dans une chaîne trophique par exemple) ou n'ayant aucun rapport autre que celui d'introduire une diversité dans le test. Alternativement, il peut aussi s'agir de travailler sur un seul, ou un nombre restreint d'organismes modèles mais en multipliant les cibles et effets biologiques explorés.

Cette approche a été appliquée dans le cas de tests de résidus médicamenteux (Aguirre-Martínez et al., 2015) et sur des effluents hospitaliers, souvent vecteurs intrinsèques d'impacts biologiques selon des modes d'action différents (Sharma et al., 2015). Chaque espèce présente des sensibilités variables à ces molécules conçues spécifiquement pour être bioactives et qui sont donc souvent plus que de simples stresseurs chimiques (Minguez et al., 2014; Ortiz de García et al., 2014). Ceci a été notamment mis en évidence au travers des sensibilités différentielles d'organismes ou de communautés aux parabènes et triclosan (Ortiz de García et al., 2014). Il n'est pas surprenant que certaines substances portent l'essentiel de la charge toxique d'un échantillon environnemental vis-à-vis d'une classe donnée, comme les herbicides le font pour les algues (Tang and Escher, 2014) ou les peintures « antifouling » des coques de bateau pour les microorganismes marins (Manzo et al., 2014). Le triclosan, biocide éprouvé, est d'une part associé à des mécanismes de toxicité aigüe (vis-à-vis d'invertébrés benthiques (Dussault et al., 2008; Gaume et al., 2012) par exemple) et d'autre part apparaît comme un perturbateur des fonctions reproductives : viabilité des gamètes, fertilisation et atteinte du stade pluteus chez l'oursin (Hwang et al., 2014), spermatogénèse et production aberrante de vitellogénine chez les poissons mâles (Raut and Angus, 2010). Les effets de

perturbateur endocrinien (agoniste œstrogène ou antagoniste en présence de l'hormone native) du triclosan sont d'ailleurs décrits comme pouvant opérer à des doses inférieures de plusieurs ordres de grandeur aux doses toxiques. Henry et Fair (2013) donnent par exemple, dans leur système basé sur cellules humaines, une cytotoxicité à partir de 100 µg/mL alors que les réponses cellulaires de type hormonales sont observables dès 0,002 µg/mL (Henry and Fair, 2013). Les effets perturbateurs endocriniens seront surtout évoqués au paragraphe suivant mais illustrent déjà à ce stade l'importance de choisir des paramètres expérimentaux allant au-delà de la seule survie d'organismes isolés, avec les organismes ou types cellulaires pertinents.

Autres substances souvent utilisées dans les cosmétiques et de moins en moins cantonnées aux crèmes dites solaires, les filtres ultraviolets pourraient ainsi être associés à un potentiel génotoxique dans des échantillons du milieu récepteur, des rejets d'industries chimiques, des effluents de stations d'épuration ou hospitaliers (Žegura et al., 2009).<sup>14</sup> Au final, ces diverses observations soulignent l'importance des panels regroupant différents organismes et/ou niveaux trophiques afin de prendre en compte à la fois les sensibilités propres des organismes mais aussi les possibles altérations des chaînes trophiques ou des biotes qui peuvent en découler. Au-delà de la toxicité directe, il apparaît même possible, par des approches multi-niveaux et multi-effets, de lier les stress physiologiques subtils induits par des xénobiotiques avec des perturbations plus larges au niveau de la communauté et de la structure macrobenthique (Seabra Pereira et al., 2014). Par exemple, même sans toxicité directe et sévère, de simples altérations physiologiques des comportements d'alimentation peuvent avoir des répercussions sur les dynamiques de populations entières suite à des modifications de la fertilité ou du cycle de vie (Coulaud et al., 2015). Dans tous les cas des stratégies de tests regroupant des panels d'organismes ou d'effets sont maintenant préconisées pour une meilleure évaluation du risque (Pablos et al., 2009; Tang and Escher, 2014), incluant bien évidemment plus spécifiquement les produits d'entretien personnel (Carbajo et al., 2015). Ces méthodes sont essentielles pour concevoir des tests plus sensibles ou spécifiques (de Paiva Magalhães et al., 2014; Zitova et al., 2009) et peuvent s'appliquer à tous types d'eaux, depuis les rejets jusqu'aux eaux dans les réseaux d'assainissement (Szklarek et al., 2015; Xiao et al., 2015).

### 3.2.2 Méthodes issues des biotechnologies ou critères novateurs

Les recherches académiques et en biotechnologies industrielles permettent d'identifier de nouveaux critères et paramètres expérimentaux d'intérêt dans le suivi environnemental.<sup>15</sup> Comme cela a été déjà illustré, c'est notamment le cas dès lors qu'il s'agit de descendre au niveau subléta dans l'observation des impacts sur le vivant. Cette identification peut se faire à dessein, dans un but déclaré de renouveler ou d'apporter un complément aux méthodes

---

<sup>14</sup> Dans l'étude de Žegura en 2009, sur 51 échantillons, 3 échantillons de rivières et 4 de lacs Slovènes sont positifs au test UmuC, en plus de 6 échantillons de rejets (industries chimiques, hôpitaux, STEP). 6 échantillons se sont avérés cytotoxiques sur HepG2 parmi les 51. En croisant les données, seul 1 rejet d'industrie chimique apparaît à la fois cytotoxique et génotoxique, permettant de suspecter que les espèces responsables de la génotoxicité ne sont pas nécessairement celles associées à la cytotoxicité dans cette étude.

<sup>15</sup> Pouvant aller de la validation de nouveaux modèles, tests, bio/marqueurs, « endpoints » expérimentaux, la pertinence de stratégies d'échantillonnage (enrichissements, extractions ou tests sur effluents totaux) à, plus globalement, la préconisation d'approches plus efficaces en regard de la complexité de la problématique, comme l'implémentation de panels de tests ou la synthèse d'observations comparables sur différents organismes.

historiques, ou s'avérer après coup utiles dans le contexte des évaluations de qualité de l'eau alors même que le but originel était tout autre, comme par exemple la recherche biomédicale. Les deux modes sont garants du maintien de la pertinence des campagnes d'étude et de leur adéquation avec la problématique, même si couramment le second mode peut nécessiter des qualifications et adaptations en termes de protocoles avant d'être pleinement effectif dans le domaine.

Ainsi, une voie efficace d'enrichissement des modes d'exploration est la validation de nouveaux critères en partant d'organismes modèles et de méthodes bien connus et répandus. Par exemple, *Daphnia magna* déjà largement utilisée dans des tests normés (dont immobilisation aigüe OCDE 202, reproduction OCDE 211), a été implémentée dans un test d'inhibition d'alimentation (Barata et al., 2008) prometteur : à 24h, les résultats sont largement comparables aux tests de reproduction à 7 jours et selon les substances à 21 jours, et si méthyl-/propyl-parabènes et Galaxolide (un musc synthétique agent de fragrance) se sont révélés légèrement actifs, les filtres UV octocrylène et 3-(4-méthyl-benzilidène)camphre ont fait preuve d'effets plus marqués (Pablos et al., 2015). Les comportements de nage/mobilité semblent aussi un bon critère d'effets biologiques chez la daphnie (Chevalier et al., 2015), ou chez la larve d'un autre organisme très souvent utilisé en écotoxicologie, le poisson zèbre *Danio rerio* - chez qui une analyse non invasive en temps réel par infrarouge a pu permettre de mettre en évidence des effets modérés du conservateur benzoate de sodium (Bichara et al., 2014). Toujours chez *Daphnia magna*, on a pu aussi voir une adaptation du protocole du puissant test « comètes » de génotoxicité (Pellegri et al., 2014) augurant de la possibilité d'études multi-niveaux toxicité aigüe / toxicité reproductive / génotoxicité directement sur les eaux à tester sous forme native, un des autres avantages de l'utilisation de cet organisme aquatique. Le même test « comète » sur la larve aquatique du moucheron *Chironomus riparius* (autre organisme modèle utilisé par exemple dans les tests normés d'immobilisation aigüe OCDE 235, de toxicité des sédiments OCDE 218 et toxicité de l'eau OCDE 219 et 233) a permis de conclure à une génotoxicité du triclosan dès 10 µg/L (dose sublétales) à 24h vis-à-vis de ce macroinvertébré benthique (Martínez-Paz et al., 2013). Un autre test de génotoxicité dérivé des méthodes de biotechnologies est le test micronoyaux. Ce test possède une relative popularité dans le suivi des organismes marins et est d'ailleurs considéré dans la DCSMM, même s'il est relativement lourd à mettre en œuvre. De récents travaux montrent son intérêt dans le suivi des pressions génotoxiques globales (en lien notamment avec l'étiage) dans une rivière sur les communautés de poissons et avec des sensibilités différentes selon les espèces (Obiakor et al., 2014).

**Génotoxicité : test comètes et test micronoyaux.**

\* Test Comète : ce test doit son nom au fait que les cellules dont le matériel génétique est endommagé y apparaissent sous la forme de comètes dont la traîne est d'autant plus importante que l'atteinte est élevée. Afin de le réaliser, les cellules tests sont enchâssées dans un gel d'agarose, traitées afin de fixer les potentielles atteintes au matériel génétique puis la préparation - généralement une lame de microscope - soumise à une électrophorèse avant marquage fluorescent. Les cellules intactes apparaissent sous la forme de spots brillants, correspondant au noyau, alors que les cellules ayant subi des dommages d'ordre génotoxique prennent la forme des comètes : le matériel génétique endommagé, plus lâche et déroulé, a en effet migré à partir du noyau sous l'action de l'électrophorèse et forme une queue plus ou moins marquée. La génotoxicité peut alors être exprimée selon divers paramètres comme les rapports de fluorescence entre tête et queue, la longueur de la queue par rapport à la comète elle-même, ou un calcul de variables dites « moments » intégrant plusieurs de ces paramètres.

\* Test Micronoyaux : ce test consiste à visualiser des morceaux d'ADN non intégrés au reste du matériel génétique nucléaire d'une cellule et provenant ou de dommages à l'ADN voire de chromosomes entiers

inadéquatement répartis. Ces morceaux « orphelins » restent aléatoirement dans le noyau d'une des cellules filles lors de la division de la cellule mère, n'ayant pas pu être redistribués par le fuseau mitotique au cours du processus (fragments acentriques issus de cassures doubles brins ou chromosomes entiers n'ayant pu subir capture ou migration suite à des dommages structurels). Ce test permet donc de visualiser des effets clastogènes - dommages sans modifications de la ploïdie - mais aussi aneugènes - donc avec anomalie du nombre de chromosomes final. Ce test est réalisé par coloration/marquage du matériel génétique après avoir bloqué la population cellulaire test en interphase. La fréquence des micronoyaux dans la population est comptée visuellement ou de plus en plus fréquemment par analyse d'image.

Il est vraisemblable que les effets génotoxiques passent en partie par des phénomènes de stress oxydant, le triclosan ayant été montré comme inducteur de lésions, marqueurs ou d'activités enzymatiques typiques dans divers modèles comme *Eisenia fetida* (Lin et al., 2012), *Achatina fulica* (Wang et al., 2014) voire même, aux côtés des parabènes, dans des études épidémiologiques de marqueurs d'inflammation et de stress oxydant chez l'humain (Watkins et al., 2015). Enfin, le méthylparabène a été montré comme altérant la réponse de gènes du développement ou de stress dans un suivi d'expression génique chez le Xénope (San Segundo et al., 2013), modèle utilisé dans les tests d'écotoxicité (notamment OCDE 231).

Une autre piste de mise à jour des méthodes consiste en la recherche de nouveaux organismes modèles et/ou méthodes sensibles et robustes pour explorer de nouveaux paramètres. Brièvement, on peut par exemple trouver des tests visant à apporter un remplacement ou un complément aux très répandues mesures sur *Aliivibrio fischeri* - germes de macroalgues (Girling et al., 2015), spores de fougères (Marugán et al., 2012) - ou au suivi des processus d'assainissement avec une détection potentiométrique de la production de CO<sub>2</sub> par *Pseudomonas putida* (Figueredo et al., 2015). Plus directement en lien avec la question des produits cosmétiques dans l'eau, de telles approches ont pu conduire à tester propylparabène et triclosan sur des cultures d'oignons (Herrero et al., 2012). Si le propylparabène a montré des effets significatifs avec réduction de la longueur racinaire et de l'index mitotique à 200 µM, c'est surtout le triclosan qui a présenté des effets dès 1 µM sur la croissance racinaire et les aberrations chromosomiques dans le méristème, avec des effets bien plus marqués à 10 µM incluant aussi la baisse d'index mitotique à cette dose.

Plus inattendu, le triclosan s'est avéré être 124 fois plus efficace que l'inhibiteur modèle Vérapamil dans l'inhibition des pompes calciques d'efflux chez les larves de l'oursin grimpeur (Anselmo et al., 2012). Ces pompes sont extrêmement importantes dans la résistance des organismes à divers polluants, qu'elles expulsent de la cellule – avec en conséquence un risque de potentialisation des toxiques. Les mécanismes d'antibiorésistance sont souvent médiés par l'existence de pompes d'efflux, il reste donc à déterminer quel pourrait être l'équilibre entre potentialisation possible d'antibiorésistance en réaction à ce biocide et antagonisation par neutralisation des pompes d'efflux. Accessoirement, le triclosan a été testé dans une méthode récente de profilage et de screening de modes d'action d'antibiotiques par diffusion sur disque de matrice gel (Silva et al., 2014).

De par toutes les activités biologiques mentionnées, il apparaît évident que parabènes, triclosan et triclocarban ne sont pas que des biocides efficaces mais possèdent aussi des impacts plus spécifiques. Les plus connus sont leurs actions de perturbateurs endocriniens essentiellement mises en évidence par des méthodes de biomarqueurs *in vivo* ou de biologie cellulaire *in vitro* grâce à l'emploi de cellules hormono-dépendantes ou génétiquement modifiées à l'aide d'un rapporteur.

**Cellules hormono-dépendantes ou à gènes rapporteur pour activation de récepteurs hormonaux :**

\* Cellules hormono-dépendantes : comme leur appellation l'indique, ces cellules animales/humaines sont dépendantes de la présence d'hormone pour leur croissance. C'est notamment le cas de la lignée de cancer mammaire MCF-7 dont la prolifération est utilisée dans un test de détection de perturbateurs endocriniens oestrogènes : après une étape initiale de privation en stéroïdes, la prolifération cellulaire est mesurée sur plusieurs jours après mise en contact avec les analytes. Une prolifération notablement supérieure au contrôle dénote la présence d'actifs hormono-mimétiques. Il est aussi possible de mettre en place un protocole pour observer les actions anti-hormones en mesurant d'éventuelles diminutions de la prolifération par rapport au contrôle.

\* Cellules à gènes rapporteurs : ces cellules sont modifiées avec un gène rapporteur exprimé lors de la mise en branle de la chaîne de transduction hormonale suite à la ligation, par une hormone ou un actif hormono-mimétique, du récepteur étudié. Dans les cellules possédant la machinerie moléculaire nécessaire, seul le gène rapporteur est rajouté pour témoigner de l'activation mais certains types cellulaires peuvent aussi nécessiter l'ajout de divers éléments de la chaîne de transduction s'ils ne sont pas naturellement présents. Le gène rapporteur peut assurer une réaction colorimétrique, comme dans les tests bien connus sur levures YES et YAS, ou maintenant plus souvent une réaction de production de lumière par bioluminescence. Dans ces tests, après mise en contact avec les analytes, l'intensité de la coloration ou du signal lumineux sera directement proportionnelle à l'activation du récepteur hormonal étudié. Là encore, il est possible d'étudier des effets anti-hormonaux en implémentant un protocole visant à observer les éventuelles chutes de signal en présence conjointe de l'hormone naturelle et des analytes/actifs à tester.

Le triclocarban s'avère particulier. Il n'apparaît pas agoniste réel des voies stéroïdes (cf. notamment la discussion de Tarnow et al. qui postulent les réponses positives dans les systèmes rapporteurs comme une interaction avec ce dernier plus qu'avec les voies hormonales à proprement parler (Tarnow et al., 2013); il est en revanche décrit comme coactivateur dès 1 µM des voies stéroïdes en présence des hormones naturelles ainsi que de la voie AhR, par laquelle il pourrait d'ailleurs influencer les communications croisées avec les voies stéroïdes (Ahn et al., 2008; Chen et al., 2008; Tarnow et al., 2013). En ceci il peut donc être suspecté d'être un perturbateur endocrinien à part entière.

Le triclosan, natif ou éventuellement via ses métabolites, semble lui aussi responsable de divers effets au niveau de récepteurs cellulaires transducteurs du signal à des concentrations de l'ordre du micromolaire. Il est ainsi décrit comme antagoniste ou agoniste de divers récepteurs dont stéroïdes, thyroïdes, AhR (Ahn et al., 2008; Hinthner et al., 2011; Rostkowski et al., 2011). Plus largement, il apparaît comme interférant avec divers processus de régulation génique ou de liaisons protéiques (Hinthner et al., 2011; Metcalfe et al., 2013) allant jusqu'à lui conférer un potentiel de promoteur tumoral *in vitro* mais aussi *in vivo* dans l'alimentation chez le rat à 0,08 % (Yueh et al., 2014). Ce type d'étude reste bien entendu à renforcer par des travaux additionnels, mais d'ores et déjà l'existence de ce genre de mécanismes est assez préoccupante en termes de danger et/ou risque.

Les parabènes sont eux aussi sur la sellette vis-à-vis d'effets pro-tumoraux : méthyl-, propyl- et butylparabène accroissent la prolifération et la migration de cellules tumorales mammaires humaines dès 10 µM (Darbre and Harvey, 2014; Khanna et al., 2014) mais présentent aussi en sus divers autres mécanismes de résistance aux traitements thérapeutiques à des doses de 1 µM ou moins (jusqu'à 10 nM) (Darbre and Harvey, 2014). Ceci n'est pas surprenant étant donné le caractère hormono-dépendant de ces cancers et l'abondante littérature qui assoit, avec plus ou très peu de doutes maintenant, le caractère fortement perturbateur endocrinien des parabènes comme agonistes oestrogènes (Wielogórska et al., 2015; Wróbel and Gregoraszczyk, 2014) et antiandrogènes (avec un effet pro-œstrogène final, donc) (Alam and Kurohmaru, 2014; Chen et al., 2007). Ces effets sont d'autant plus complexes ou marqués en

mélanges (Evans et al., 2012; Ma et al., 2014), y compris en mélanges environnementaux réels qui peuvent inclure des résidus de pesticides eux-même antiandrogènes pour des effets additifs/synergiques (Orton et al., 2014). Propyl- et butylparabène ont aussi des activités perturbatrices des voies glucocorticoïdes *in vitro* dès 10 nM (Klopčič et al., 2015) qui peuvent être mises en lien avec des observations environnementales sur l'exposition et l'impact au niveau des poisson de rivières Européennes (Macikova et al., 2014).

Enfin, il convient d'évoquer les potentiels pro-oestrogènes d'autres substances précédemment citées et surtout couramment utilisées dans les produits cosmétiques que sont les muscs et parfums (Evans et al., 2012; Orton et al., 2014), notamment dans les déodorants (Lange et al., 2014), ainsi que les filtres UV dont à nouveau 3-(4-méthylbenzylidène)camphre et benzophénone-3, chez le médaka (*Oryzias latipes*) (Inui et al., 2003; Kim et al., 2014).

### **3.3 Bioessais dans Cosmet'eau**

Pour conclure, les multiples modes d'action des résidus de produits cosmétiques s'apparentent en quelque sorte à des substances actives du monde du médicament. Tout du moins, ils présentent des modes d'actions biologiques particuliers qui sont loin de relever de la simple toxicité non spécifique et appellent donc ainsi des tests plus ciblés. C'est sur la base de ce constat qu'est proposée dans Cosmet'eau une gamme de bioessais recouvrant des modèles bactériens, algaux, fongiques et humains et surtout des effets allant de la toxicité générale (Dries et al., 2014; Pan et al., 2015) à des atteintes métaboliques/physiologiques pouvant conduire à des dysfonctions importantes à terme. Sont ainsi abordés la toxicité au niveau du système photosynthétique, vis-à-vis duquel les herbicides portent la majorité de l'effet (Arrhenius et al., 2014; Vermeirssen et al., 2010; Wilkinson et al., 2015), divers stress cellulaires (Elad et al., 2011; Plata et al., 2009; Simmons et al., 2009), la perturbation des récepteurs hormonaux (Escher et al., 2014; Grimaldi et al., 2015; Kunz et al., 2015) ou de détoxification (Beníšek et al., 2015) et les atteintes au matériel génétique dont la prépondérance a déjà été soulignée pour les résidus de produits de soin personnel. A noter qu'outre les atteintes au matériel génétique procaryote (Davidov et al., 2000), un modèle de suivi de la génotoxicité récent, plus sensible que le test comète et pertinent pour le suivi environnemental est proposé : le test de phosphorylation de  $\gamma$ H2AX (Audebert et al., 2012).

De fait, la situation de mélange d'espèces et de dérivés complexes, parfois inconnus ou imprévus, interagissant de diverses manières souligne les limitations du seul suivi de la présence/concentration de molécules choisies. Par exemple, il est courant de ne voir que des abattements partiels, voire quasi-nuls, de certaines activités biologiques alors même que les paramètres classiques sont abattus avec succès par les traitements d'assainissement (Osachoff et al., 2014; Wojnarowicz et al., 2014). Plus gênant, les traitements eux-mêmes peuvent être à l'origine de l'apparition d'activités biologiques au cours du process et ce de manière variable selon les process. C'est notamment la conclusion d'un travail très récent (mai 2015) mettant en parallèle 36 tests et 18 modes d'action sur 6 modes de traitement, où une augmentation des potentiels génotoxiques/mutagènes et réponse AhR a pu être décrite après certaines opérations (Jia et al., 2015). A noter que le panel utilisé est très similaire au panel proposé dans Cosmet'Eau et inclut génotoxicité, voies des récepteurs hormonaux, toxicité sur algue photosynthétique et plusieurs paramètres de stress cellulaire (osmotique, oxydant etc.). C'est aussi la conclusion d'une étude se basant sur un profil d'analyse toxicogénomique pour

suivre, entre autres, la dégradation par electro-Fenton du triclosan (Gou et al., 2014). Dans la même veine, un travail sur le suivi de la dégradation de 299 substances au travers d'un panel comprenant lui aussi génotoxicité, toxicité générale, inhibition photosynthétique et stress oxydant a pu montrer, après modélisation des mélanges et facteurs de toxicité, que les espèces suivies ne pouvaient expliquer que quelques pourcents des activités biologiques<sup>16</sup> retrouvées dans des eaux usées et recyclées (Tang et al., 2014).

Les approches bioessais offrent donc une nouvelle stratégie éclairante de la problématique complexe de la pollution de l'eau. Elles sont aussi au cœur des méthodes EDA (« Effect-Directed Analysis ») et TIE (« Toxicity Identification Evaluation ») qui visent à identifier ou isoler les polluants porteurs des activités biologiques en orientant les analyses physicochimiques sur les fractions actives. Bioessais et physicochimie fonctionnent alors en tandem pour une plus grande puissance et efficacité (Burgess et al., 2013). Si les bioessais permettent de travailler directement sur les matrices aqueuses natives au besoin, ils sont aussi utiles dans le suivi des sédiments ou des phases particulières (Creusot et al., 2013; Hafner et al., 2015; Kinani et al., 2010; Manzo et al., 2014; Maranhó et al., 2015; Perrichon et al., 2014). Cependant, la question de l'échantillonnage est alors critique afin de permettre une exposition correcte à une matrice représentative de la pollution de la matrice initiale. Elle sera abordée autant que faire-se-peut dans Cosmet'eau en tenant compte des défis que posent le traitement de ces prélèvements souvent gras et/ou multiphasiques.

---

<sup>16</sup> 3% pour la toxicité générale, 1% pour le stress oxydant



## Conclusion sur les outils de surveillance et de contrôle des résidus de cosmétiques dans les milieux aquatiques

Cet état de l'art a présenté les outils permettant la surveillance et la réduction des résidus de cosmétiques dans les eaux de surface.

Il apparaît que les *moyens réglementaires*, en France, visant les aspects environnementaux des parabènes, triclosan et triclocarban sont pour l'instant inexistantes. Seuls des aspects sanitaires sont pris en compte au travers des réglementations de mises sur le marché des cosmétiques. Ces substances sont pour l'instant autorisées dans les produits cosmétiques, dans des proportions limitées, et suivies dans le cadre de REACH.

En ce qui concerne la *surveillance dans le milieu aquatique*, l'étude bibliographique a montré que l'échantillonnage passif des parabènes n'a jamais été testé. Par contre le triclosan et le triclocarban ont été suivis par ces outils dans les eaux de surface et les eaux usées. Un manque de validation et d'homogénéité des méthodes a été mis en évidence mais les membranes polymériques (en LDPE ou PDMS) semblent un outil prometteur. Ces outils, dont le Leesu a l'expertise grâce au projet Emestox financé par l'Agence Nationale de la Recherche, seront ceux testés dans le projet Cosmet'eau. En ce qui concerne la spectrométrie de masse haute résolution, l'étude bibliographique a montré l'intérêt de cette technologie pour caractériser des échantillons d'eau contaminée par des micropolluants. Cependant les méthodes ne sont pas encore complètement développées et ne permettent de faire qu'une recherche semi-ciblée ou l'identification d'un composé en particulier. Un balayage non ciblé complet des substances présentes dans une eau n'est donc pour l'instant pas envisageable. Une méthode de recherche semi-ciblée des substituants aux parabènes pourrait être envisagée.

Ces méthodes chimiques, certes performantes, ne peuvent cependant pas répondre aux questions de l'effet global de la contamination puisqu'elles ne peuvent pas tenir compte de la totalité des substances présentes (y compris les éventuels produits de dégradation ou métabolisation des substances cibles), ni de l'effet de chaque substance, ni des interactions entre les différentes molécules ou avec la matrice. Des méthodes de bioessais mettant en parallèle des mesures simultanées, soit sur une gamme d'organismes, soit sur une gamme d'effets ou de marqueurs cibles, seront donc implémentées dans Cosmet'eau. Les tests proposés seront effectués sur :

- un large éventail d'organismes (cultures organotypiques, microorganismes unicellulaires de divers règnes),
- mis en contact en laboratoire avec des échantillons réels prélevés *in situ*,
- pour l'observation d'une large gamme d'effets de toxicité spécifique, non-spécifique et/ou réactive.



## Références bibliographiques

- Aguirre-Martínez, G.V., Owuor, M.A., Garrido-Pérez, C., Salamanca, M.J., Del Valls, T.A., Martín-Díaz, M.L., 2015. Are standard tests sensitive enough to evaluate effects of human pharmaceuticals in aquatic biota? Facing changes in research approaches when performing risk assessment of drugs. *Chemosphere* 120, 75–85. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.05.087
- Ahn, K.C., Zhao, B., Chen, J., Cherednichenko, G., Sanmarti, E., Denison, M.S., Lasley, B., Pessah, I.N., Kültz, D., Chang, D.P.Y., Gee, S.J., Hammock, B.D., 2008. In Vitro Biologic Activities of the Antimicrobials Triclocarban, Its Analogs, and Triclosan in Bioassay Screens: Receptor-Based Bioassay Screens. *Environ Health Perspect* 116, 1203–1210. doi:10.1289/ehp.11200
- Alam, M.S., Kurohmaru, M., 2014. Disruption of Sertoli cell vimentin filaments in prepubertal rats: An acute effect of butylparaben in vivo and in vitro. *Acta Histochemica* 116, 682–687. doi:10.1016/j.acthis.2013.12.006
- Altenburger, R., Ait-Aissa, S., Antczak, P., Backhaus, T., Barceló, D., Seiler, T.-B., Brion, F., Busch, W., Chipman, K., de Alda, M.L., de Aragão Umbuzeiro, G., Escher, B.I., Falciani, F., Faust, M., Focks, A., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Jäger, F., Jahnke, A., Kortenkamp, A., Krauss, M., Lemkine, G.F., Munthe, J., Neumann, S., Schymanski, E.L., Scrimshaw, M., Segner, H., Slobodnik, J., Smedes, F., Kughathas, S., Teodorovic, I., Tindall, A.J., Tollefsen, K.E., Walz, K.-H., Williams, T.D., Van den Brink, P.J., van Gils, J., Vrana, B., Zhang, X., Brack, W., 2015. Future water quality monitoring — Adapting tools to deal with mixtures of pollutants in water resource management. *Science of The Total Environment* 512–513, 540–551. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.057
- Anselmo, H.M.R., van den Berg, J.H.J., Rietjens, I.M.C.M., Murk, A.J., 2012. Inhibition of cellular efflux pumps involved in multi xenobiotic resistance (MXR) in echinoid larvae as a possible mode of action for increased ecotoxicological risk of mixtures. *Ecotoxicology* 21, 2276–2287. doi:10.1007/s10646-012-0984-2
- Arrhenius, Å., Backhaus, T., Hilvarsson, A., Wendt, I., Zgrundo, A., Blanck, H., 2014. A novel bioassay for evaluating the efficacy of biocides to inhibit settling and early establishment of marine biofilms. *Marine Pollution Bulletin* 87, 292–299. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.07.011
- Audebert, M., Zeman, F., Beaudoin, R., Péry, A., Cravedi, J.-P., 2012. Comparative potency approach based on H2AX assay for estimating the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 260, 58–64. doi:10.1016/j.taap.2012.01.022
- Bain, P.A., Kumar, A., 2014. Cytotoxicity of binary mixtures of human pharmaceuticals in a fish cell line: Approaches for non-monotonic concentration–response relationships. *Chemosphere* 108, 334–342. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.01.077
- Balmer, M.E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P.-A., Müller, M.D., Buser, H.-R., 2004. Occurrence of methyl triclosan, a transformation product of the bactericide triclosan, in fish from various lakes in Switzerland. *Environmental science & technology* 38, 390–395.
- Barata, C., Alañon, P., Gutierrez-Alonso, S., Riva, M.C., Fernández, C., Tarazona, J.V., 2008. A *Daphnia magna* feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sublethal toxicity test for Environmental Risk Assessment of toxic effluents. *Sci. Total Environ.* 405, 78–86. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.06.028

- Barel, A.O., Paye, M., Maibach, H.I., 2014. Handbook of Cosmetic Science and Technology, Fourth Edition, Édition : 4. ed. CRC Press, Boca Raton.
- Bedoux, G., Roig, B., Thomas, O., Dupont, V., Le Bot, B., 2012. Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 1044–1065.
- Beníšek, M., Kukučka, P., Mariani, G., Suurkuusk, G., Gawlik, B.M., Locoro, G., Giesy, J.P., Bláha, L., 2015. Dioxins and dioxin-like compounds in composts and digestates from European countries as determined by the in vitro bioassay and chemical analysis. *Chemosphere* 122, 168–175. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.11.039
- Bester, K., 2009. Analysis of musk fragrances in environmental samples. *Journal of Chromatography A* 1216, 470–480. doi:10.1016/j.chroma.2008.08.093
- Bichara, D., Calcaterra, N.B., Arranz, S., Armas, P., Simonetta, S.H., 2014. Set-up of an infrared fast behavioral assay using zebrafish (*Danio rerio*) larvae, and its application in compound biotoxicity screening. *J Appl Toxicol* 34, 214–219. doi:10.1002/jat.2856
- Booij, K., Smedes, F., Van Weerlee, E.M., 2002. Spiking of performance reference compounds in low density polyethylene and silicone passive water samplers. *Chemosphere* 46, 1157–1161.
- Botta, F., Dulio, V., 2014a. Résultats de l'étude prospective 2012 sur les contaminants émergents dans les eaux de surface continentales de la Métropole et des DOM (Convention Onema - Ineris No. DRC-13-136939-12927A).
- Botta, F., Dulio, V., 2014b. Résultats de l'étude prospective 2012 sur les contaminants émergents dans les eaux de surface continentales de la Métropole et des DOM (Convention Onema - Ineris No. DRC-13-136939-12927A).
- Brack, W., Altenburger, R., Schüürmann, G., Krauss, M., López Herráez, D., van Gils, J., Slobodnik, J., Munthe, J., Gawlik, B.M., van Wezel, A., Schriks, M., Hollender, J., Tollefsen, K.E., Mekenyan, O., Dimitrov, S., Bunke, D., Cousins, I., Posthuma, L., van den Brink, P.J., López de Alda, M., Barceló, D., Faust, M., Kortenkamp, A., Scrimshaw, M., Ignatova, S., Engelen, G., Massmann, G., Lemkine, G., Teodorovic, I., Walz, K.-H., Dulio, V., Jonker, M.T.O., Jäger, F., Chipman, K., Falciani, F., Liska, I., Rooke, D., Zhang, X., Hollert, H., Vrana, B., Hilscherova, K., Kramer, K., Neumann, S., Hammerbacher, R., Backhaus, T., Mack, J., Segner, H., Escher, B., de Aragão Umbuzeiro, G., 2015. The SOLUTIONS project: Challenges and responses for present and future emerging pollutants in land and water resources management. *Science of The Total Environment, Towards a better understanding of the links between stressors, hazard assessment and ecosystem services under water scarcity* 503–504, 22–31. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.05.143
- Brausch, J.M., Rand, G.M., 2011. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 82, 1518–1532. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.018
- Bressy, A., Carré, C., Deroubaix, J.-F., de Gouvello, Bernard, Le Roux, J., Marconi, A., Soyer, M., Moilleron, R., 2015. Livrable 1.1 du projet Cosmet'eau : État de l'art sur les résidus de cosmétiques dans les milieux aquatiques - Les conservateurs et biocides dans les produits cosmétiques (Livrable du projet Cosmet'eau).
- Burgess, R.M., Ho, K.T., Brack, W., Lamoree, M., 2013. Effects-directed analysis (EDA) and toxicity identification evaluation (TIE): Complementary but different approaches for diagnosing causes of environmental toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 1935–1945. doi:10.1002/etc.2299

- Carbajo, J.B., Perdigón-Melón, J.A., Petre, A.L., Rosal, R., Letón, P., García-Calvo, E., 2015. Personal care product preservatives: Risk assessment and mixture toxicities with an industrial wastewater. *Water Research, Occurrence, fate, removal and assessment of emerging contaminants in water in the water cycle (from wastewater to drinking water)* 72, 174–185. doi:10.1016/j.watres.2014.12.040
- Chateauraynaud, F., Torny, D., 1999. *Les sombres précurseurs. Une sociologie pragmatique de l’alerte et du risque*, éditions de l’EHESS. ed. Paris.
- Chen, J., Ahn, K.C., Gee, N.A., Ahmed, M.I., Duleba, A.J., Zhao, L., Gee, S.J., Hammock, B.D., Lasley, B.L., 2008. Triclocarban Enhances Testosterone Action: A New Type of Endocrine Disruptor? *Endocrinology* 149, 1173–1179. doi:10.1210/en.2007-1057
- Chen, J., Ahn, K.C., Gee, N.A., Gee, S.J., Hammock, B.D., Lasley, B.L., 2007. Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicology and Applied Pharmacology* 221, 278–284. doi:10.1016/j.taap.2007.03.015
- Chevalier, J., Harscoët, E., Keller, M., Pandard, P., Cachot, J., Grote, M., 2015. Exploration of daphnia behavioral effect profiles induced by a broad range of toxicants with different modes of action. *Environ. Toxicol. Chem.* doi:10.1002/etc.2979
- Chitescu, C.L., Oosterink, E., de Jong, J., (Linda) Stolker, A.A.M., 2012. Accurate mass screening of pharmaceuticals and fungicides in water by U-HPLC–Exactive Orbitrap MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403, 2997–3011. doi:10.1007/s00216-012-5888-8
- Connon, R.E., Geist, J., Werner, I., 2012. Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. *Sensors (Basel)* 12, 12741–12771. doi:10.3390/s120912741
- Coulaud, R., Geffard, O., Vigneron, A., Quéau, H., François, A., Chaumot, A., 2015. Linking feeding inhibition with reproductive impairment in *Gammarus* confirms the ecological relevance of feeding assays in environmental monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1031–1038. doi:10.1002/etc.2886
- Creusot, N., Budzinski, H., Balaguer, P., Kinani, S., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S., 2013. Effect-directed analysis of endocrine-disrupting compounds in multi-contaminated sediment: identification of novel ligands of estrogen and pregnane X receptors. *Anal Bioanal Chem* 405, 2553–2566. doi:10.1007/s00216-013-6708-5
- Croley, T.R., White, K.D., Callahan, J.H., Musser, S.M., 2012. The Chromatographic Role in High Resolution Mass Spectrometry for Non-Targeted Analysis. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 23, 1569–1578. doi:10.1007/s13361-012-0392-0
- Darbre, P.D., Aljarrah, A., Miller, W.R., Coldham, N.G., Sauer, M.J., Pope, G.S., 2004. Concentrations of parabens in human breast tumours. *Journal of Applied Toxicology* 24, 5–13. doi:10.1002/jat.958
- Darbre, P.D., Harvey, P.W., 2014. Parabens can enable hallmarks and characteristics of cancer in human breast epithelial cells: a review of the literature with reference to new exposure data and regulatory status. *J Appl Toxicol* 34, 925–938. doi:10.1002/jat.3027
- Daughton, C.G., Ternes, T.A., 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change? *Environmental Health Perspectives* 107, 907–938.
- Davidov, Y., Rozen, R., Smulski, D.R., Van Dyk, T.K., Vollmer, A.C., Elsemore, D.A., LaRossa, R.A., Belkin, S., 2000. Improved bacterial SOS promoter&Colon;lux fusions for genotoxicity detection. *Mutat. Res.* 466, 97–107.

- de Paiva Magalhães, D., da Costa Marques, M.R., Fernandes Baptista, D., Forsin Buss, D., 2014. Selecting a sensitive battery of bioassays to detect toxic effects of metals in effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 110, 73–81. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.08.019
- Diaz, R., Ibáñez, M., Sancho, J.V., Hernández, F., 2013. Qualitative validation of a liquid chromatography–quadrupole-time of flight mass spectrometry screening method for organic pollutants in waters. *Journal of Chromatography A* 1276, 47–57. doi:10.1016/j.chroma.2012.12.030
- Doyle, E., Biales, A., Focazio, M., Griffin, D., Loftin, K., Wilson, V., 2014. Effect-Based Screening Methods for Water Quality Characterization Will Augment Conventional Analyte-by-Analyte Chemical Methods in Research As Well As Regulatory Monitoring. *Environ. Sci. Technol.* doi:10.1021/es5053254
- Dries, J., Daens, D., Geuens, L., Blust, R., 2014. Evaluation of acute ecotoxicity removal from industrial wastewater using a battery of rapid bioassays. *Water Sci. Technol.* 70, 2056–2061. doi:10.2166/wst.2014.459
- Dulio, V., Morin, A., Staub, P.F., 2009. Les substances émergentes dans l’environnement. Note de synthèse sur l’état de l’art concernant les produits pharmaceutiques, les cosmétiques et les produits d’hygiène corporelle (partenariat ONEMA-INERIS 2008 No. DRC-09-95687-06381B).
- Dussault, E.B., Balakrishnan, V.K., Sverko, E., Solomon, K.R., Sibley, P.K., 2008. Toxicity of human pharmaceuticals and personal care products to benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 425–432. doi:10.1897/07-354R.1
- Elad, T., Almog, R., Yagur-Kroll, S., Levkov, K., Melamed, S., Shacham-Diamand, Y., Belkin, S., 2011. Online monitoring of water toxicity by use of bioluminescent reporter bacterial biochips. *Environ. Sci. Technol.* 45, 8536–8544. doi:10.1021/es202465c
- Emestox, 2013. Livrable D 4.5 - Utilisation et performances des membranes polymériques pour l’échantillonnage passif de composés organiques hydrophobes : paramètres cinétiques, méthodes pour la quantification des concentrations dans le milieu.
- Emestox, 2010. Livrable D1.3 - Échantillonnage passif des contaminants dans l’eau: bilans des méthodes et des applications in situ.
- Escher, B.I., Allinson, M., Altenburger, R., Bain, P.A., Balaguer, P., Busch, W., Crago, J., Denslow, N.D., Dopp, E., Hilscherova, K., Humpage, A.R., Kumar, A., Grimaldi, M., Jayasinghe, B.S., Jarosova, B., Jia, A., Makarov, S., Maruya, K.A., Medvedev, A., Mehinto, A.C., Mendez, J.E., Poulsen, A., Prochazka, E., Richard, J., Schifferli, A., Schlenk, D., Scholz, S., Shiraishi, F., Snyder, S., Su, G., Tang, J.Y.M., Burg, B. van der, Linden, S.C. van der, Werner, I., Westerheide, S.D., Wong, C.K.C., Yang, M., Yeung, B.H.Y., Zhang, X., Leusch, F.D.L., 2014. Benchmarking Organic Micropollutants in Wastewater, Recycled Water and Drinking Water with In Vitro Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1940–1956. doi:10.1021/es403899t
- Escher, B.I., Bramaz, N., Mueller, J.F., Quayle, P., Rutishauser, S., Vermeirssen, E.L.M., 2008. Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples. *J Environ Monit* 10, 612–621. doi:10.1039/b800949j
- Esteve-Turrillas, F.A., Pastor, A., Yusà, V., de la Guardia, M., 2007. Using semi-permeable membrane devices as passive samplers. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26, 703–712. doi:10.1016/j.trac.2007.05.006

- Evans, R.M., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2012. Additive Mixture Effects of Estrogenic Chemicals in Human Cell-Based Assays Can Be Influenced by Inclusion of Chemicals with Differing Effect Profiles. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0043606
- Figueredo, F., Abrevaya, X.C., Cortón, E., 2015. A new *P. putida* instrumental toxicity bioassay. *Environ Monit Assess* 187, 294. doi:10.1007/s10661-015-4499-1
- Galimard, A., 2012. Impact du règlement REACH sur les industries pharmaceutiques et cosmétiques. Université Paris-Sud.
- García-Reyes, J.F., Hernando, M.D., Molina-Díaz, A., Fernández-Alba, A.R., 2007. Comprehensive screening of target, non-target and unknown pesticides in food by LC-TOF-MS. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26, 828–841. doi:10.1016/j.trac.2007.06.006
- Gaume, B., Bourgougnon, N., Auzoux-Bordenave, S., Roig, B., Le Bot, B., Bedoux, G., 2012. In vitro effects of triclosan and methyl-triclosan on the marine gastropod *Haliotis tuberculata*. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 156, 87–94. doi:10.1016/j.cbpc.2012.04.006
- Gautam, P., Carsella, J.S., Kinney, C.A., 2014. Presence and transport of the antimicrobials triclocarban and triclosan in a wastewater-dominated stream and freshwater environment. *Water Research* 48, 247–256. doi:10.1016/j.watres.2013.09.032
- Girling, J.A., Thomas, K.V., Brooks, S.J., Smith, D.J., Shahsavari, E., Ball, A.S., 2015. A macroalgal germling bioassay to assess biocide concentrations in marine waters. *Marine Pollution Bulletin* 91, 82–86. doi:10.1016/j.marpolbul.2014.12.025
- Gomez, E., Pillon, A., Fenet, H., Rosain, D., Duchesne, M.J., Nicolas, J.C., Balaguer, P., Casellas, C., 2005. Estrogenic Activity of Cosmetic Components in Reporter Cell Lines: Parabens, UV Screens, and Musks. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 68, 239–251. doi:10.1080/15287390590895054
- Gómez-Ramos, M. del M., Pérez-Parada, A., García-Reyes, J.F., Fernández-Alba, A.R., Agüera, A., 2011. Use of an accurate-mass database for the systematic identification of transformation products of organic contaminants in wastewater effluents. *Journal of Chromatography A* 1218, 8002–8012. doi:10.1016/j.chroma.2011.09.003
- Gou, N., Yuan, S., Lan, J., Gao, C., Alshwabkeh, A.N., Gu, A.Z., 2014. A quantitative toxicogenomics assay reveals the evolution and nature of toxicity during the transformation of environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 48, 8855–8863. doi:10.1021/es501222t
- Gourlay-Francé, C., Lorgeoux, C., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2008. Polycyclic aromatic hydrocarbon sampling in wastewaters using semipermeable membrane devices: Accuracy of time-weighted average concentration estimations of truly dissolved compounds. *Chemosphere* 73, 1194–1200.
- Grabic, R., Jurcikova, J., Tomsejova, S., Ocelka, T., Halirova, J., Hypr, D., Kodes, V., 2010. Passive sampling methods for monitoring endocrine disruptors in the Svatka and Svitava rivers in the Czech Republic. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 550–555. doi:10.1002/etc.85
- Grimaldi, M., Boulahtouf, A., Delfosse, V., Thouennon, E., Bourguet, W., Balaguer, P., 2015. Reporter Cell Lines for the Characterization of the Interactions between Human Nuclear Receptors and Endocrine Disruptors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6, 62. doi:10.3389/fendo.2015.00062
- Hafner, C., Gartiser, S., Garcia-Käufer, M., Schiwiy, S., Hercher, C., Meyer, W., Achten, C., Larsson, M., Engwall, M., Keiter, S., Hollert, H., 2015. Investigations on sediment

- toxicity of German rivers applying a standardized bioassay battery. *Environ Sci Pollut Res Int.* doi:10.1007/s11356-015-4482-y
- Halden, R.U., 2014. On the Need and Speed of Regulating Triclosan and Triclocarban in the United States. *Environmental Science & Technology* 48, 3603–3611. doi:10.1021/es500495p
- Hamers, T., Leonards, P.E.G., Legler, J., Vethaak, A.D., Schipper, C.A., 2010. Toxicity profiling: An integrated effect-based tool for site-specific sediment quality assessment. *Integr Environ Assess Manag* 6, 761–773. doi:10.1002/ieam.75
- Hashimoto, S., Zushi, Y., Fushimi, A., Takazawa, Y., Tanabe, K., Shibata, Y., 2013. Selective extraction of halogenated compounds from data measured by comprehensive multidimensional gas chromatography/high resolution time-of-flight mass spectrometry for non-target analysis of environmental and biological samples. *Journal of Chromatography A* 1282, 183–189. doi:10.1016/j.chroma.2013.01.052
- Helm, P.A., Howell, E.T., Li, H., L. Metcalfe, T., M. Chomicki, K., D. Metcalfe, C., 2012. Influence of nearshore dynamics on the distribution of organic wastewater-associated chemicals in Lake Ontario determined using passive samplers. *Journal of Great Lakes Research* 38, 105–115. doi:10.1016/j.jglr.2012.01.005
- Henry, N.D., Fair, P.A., 2013. Comparison of in vitro cytotoxicity, estrogenicity and anti-estrogenicity of triclosan, perfluorooctane sulfonate and perfluorooctanoic acid. *J Appl Toxicol* 33, 265–272. doi:10.1002/jat.1736
- Hernández, F., Portolés, T., Ibáñez, M., Bustos-López, M.C., Díaz, R., Botero-Coy, A.M., Fuentes, C.L., Peñuela, G., 2012. Use of time-of-flight mass spectrometry for large screening of organic pollutants in surface waters and soils from a rice production area in Colombia. *Science of The Total Environment* 439, 249–259. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.09.036
- Herrero, O., Pérez Martín, J.M., Fernández Freire, P., Carvajal López, L., Peropadre, A., Hazen, M.J., 2012. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 743, 20–24. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.12.028
- Hinther, A., Bromba, C.M., Wulff, J.E., Helbing, C.C., 2011. Effects of triclocarban, triclosan, and methyl triclosan on thyroid hormone action and stress in frog and mammalian culture systems. *Environ. Sci. Technol.* 45, 5395–5402. doi:10.1021/es1041942
- Hogenboom, A.C., van Leerdam, J.A., de Voogt, P., 2009. Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography–hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1216, 510–519. doi:10.1016/j.chroma.2008.08.053
- Hoque, M.E., Cloutier, F., Arcieri, C., McInnes, M., Sultana, T., Murray, C., Vanrolleghem, P.A., Metcalfe, C.D., 2014. Removal of selected pharmaceuticals, personal care products and artificial sweetener in an aerated sewage lagoon. *Science of The Total Environment* 487, 801–812. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.063
- Huckins, J.N., 2006. *Monitors of organic chemicals in the environment: semipermeable membrane devices.* Springer, New York.
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Booij, K., 2006. *Monitors of Organic Chemicals in the Environment, Semipermeable Membrane Devices.* Springer, New York.
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Lebo, J.A., Almeida, F.V., Booij, K., Alvarez, D.A., Clark, R.C., Mogensen, B.B., 2002. Development of the permeability/performance reference compound approach for in situ calibration of semipermeable membrane devices. *Environ. Sci. Technol.* 36, 85–91. doi:10.1021/es010991w

- Hu, Q., Noll, R.J., Li, H., Makarov, A., Hardman, M., Graham Cooks, R., 2005. The Orbitrap: a new mass spectrometer. *J. Mass Spectrom.* 40, 430–443. doi:10.1002/jms.856
- Hwang, J., Suh, S.-S., Chang, M., Yun Park, S., Kwon Ryu, T., Lee, S., Lee, T.-K., 2014. Effects of triclosan on reproductive parameters and embryonic development of sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 100, 148–152. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.10.029
- Ibáñez, M., Sancho, J.V., Hernández, F., McMillan, D., Rao, R., 2008. Rapid non-target screening of organic pollutants in water by ultraperformance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27, 481–489. doi:10.1016/j.trac.2008.03.007
- Inui, M., Adachi, T., Takenaka, S., Inui, H., Nakazawa, M., Ueda, M., Watanabe, H., Mori, C., Iguchi, T., Miyatake, K., 2003. Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicology* 194, 43–50. doi:10.1016/S0300-483X(03)00340-8
- Jernberg, J., Pellinen, J., Rantalainen, A.-L., 2013. Identification of organic xenobiotics in urban aquatic environments using time-of-flight mass spectrometry. *Science of The Total Environment* 450–451, 1–6. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.02.006
- Jia, A., Escher, B.I., Leusch, F.D.L., Tang, J.Y.M., Prochazka, E., Dong, B., Snyder, E.M., Snyder, S.A., 2015. In vitro bioassays to evaluate complex chemical mixtures in recycled water. *Water Research* 80, 1–11. doi:10.1016/j.watres.2015.05.020
- Khanna, S., Dash, P.R., Darbre, P.D., 2014. Exposure to parabens at the concentration of maximal proliferative response increases migratory and invasive activity of human breast cancer cells in vitro. *J Appl Toxicol* 34, 1051–1059. doi:10.1002/jat.3003
- Kibbey, T.C.G., Chen, L., Sabatini, D.A., Mills, M.A., Nietch, C., 2010. Model stream channel testing of a UV-transparent polymer-based passive sampler for ultra-low-cost water screening applications. *Chemosphere* 80, 908–913. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.06.035
- Kibbey, T.C.G., Chen, L., Singhaputtangkul, N., Sabatini, D.A., 2009. A UV-transparent passive concentrator/spectrum deconvolution method for simultaneous detection of endocrine disrupting chemicals (EDCs) and related contaminants in natural waters. *Chemosphere* 76, 1249–1257. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.05.016
- Kibbey, T.C.G., Paruchuri, R., Sabatini, D.A., Chen, L., 2007. Adsorption of Beta Blockers to Environmental Surfaces. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5349–5356. doi:10.1021/es070152v
- Kim, S., Jung, D., Kho, Y., Choi, K., 2014. Effects of benzophenone-3 exposure on endocrine disruption and reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)—A two generation exposure study. *Aquatic Toxicology* 155, 244–252. doi:10.1016/j.aquatox.2014.07.004
- Kinani, S., Bouchonnet, S., Creusot, N., Bourcier, S., Balaguer, P., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S., 2010. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environmental Pollution* 158, 74–83. doi:10.1016/j.envpol.2009.07.041
- Klopčič, I., Kolšek, K., Dolenc, M.S., 2015. Glucocorticoid-like activity of propylparaben, butylparaben, diethylhexyl phthalate and tetramethrin mixtures studied in the MDA-kb2 cell line. *Toxicology Letters* 232, 376–383. doi:10.1016/j.toxlet.2014.11.019
- Krauss, M., Singer, H., Hollender, J., 2010. LC–high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397, 943–951. doi:10.1007/s00216-010-3608-9

- Kunz, P.Y., Kienle, C., Carere, M., Homazava, N., Kase, R., 2015. In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, SI: Analytical approaches 106, 107–115. doi:10.1016/j.jpba.2014.11.018
- Lange, C., Kuch, B., Metzger, J.W., 2014. Estrogenic activity of constituents of underarm deodorants determined by E-Screen assay. *Chemosphere* 108, 101–106. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.02.082
- Li, H., Helm, P.A., Metcalfe, C.D., 2010. Sampling in the Great Lakes for pharmaceuticals, personal care products, and endocrine-disrupting substances using the passive polar organic chemical integrative sampler. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 751–762. doi:10.1002/etc.104
- Li, H., Helm, P.A., Paterson, G., Metcalfe, C.D., 2011. The effects of dissolved organic matter and pH on sampling rates for polar organic chemical integrative samplers (POCIS). *Chemosphere* 83, 271–280. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.071
- Li, J.-Y., Tang, J.Y.M., Jin, L., Escher, B.I., 2013. Understanding bioavailability and toxicity of sediment-associated contaminants by combining passive sampling with in vitro bioassays in an urban river catchment. *Environ Toxicol Chem* 32, 2888–2896. doi:10.1002/etc.2387
- Lindström, A., Buerge, I.J., Poiger, T., Bergqvist, P.A., Müller, M.D., Buser, H.R., 2002. Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater. *Environmental Science and Technology* 36, 2322–2329.
- Lin, D., Xie, X., Zhou, Q., Liu, Y., 2012. Biochemical and genotoxic effect of triclosan on earthworms (*Eisenia fetida*) using contact and soil tests. *Environ. Toxicol.* 27, 385–392. doi:10.1002/tox.20651
- Liscio, C., Abdul-Sada, A., Al-Salhi, R., Ramsey, M.H., Hill, E.M., 2014. Methodology for profiling anti-androgen mixtures in river water using multiple passive samplers and bioassay-directed analyses. *Water Res.* 57, 258–269. doi:10.1016/j.watres.2014.03.039
- Lundov, M.D., Moesby, L., Zachariae, C., Johansen, J.D., 2009. Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermatitis* 60, 70–78.
- Macikova, P., Groh, K.J., Ammann, A.A., Schirmer, K., Suter, M.J.-F., 2014. Endocrine disrupting compounds affecting corticosteroid signaling pathways in czech and swiss waters: potential impact on fish. *Environ. Sci. Technol.* 48, 12902–12911. doi:10.1021/es502711c
- MacLeod, S.L., McClure, E.L., Wong, C.S., 2007. Laboratory calibration and field deployment of the polar organic chemical integrative sampler for pharmaceuticals and personal care products in wastewater and surface water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26, 2517–2529.
- Ma, D., Chen, L., Zhu, X., Li, F., Liu, C., Liu, R., 2014. Assessment of combined antiandrogenic effects of binary parabens mixtures in a yeast-based reporter assay. *Environ Sci Pollut Res Int* 21, 6482–6494. doi:10.1007/s11356-014-2497-4
- Manzo, S., Schiavo, S., Aleksy, P., Tabaku, A., 2014. Application of a toxicity test battery integrated index for a first screening of the ecotoxicological threat posed by ports and harbors in the southern Adriatic Sea (Italy). *Environ Monit Assess* 186, 7127–7139. doi:10.1007/s10661-014-3915-2

- Maranho, L.A., Moreira, L.B., Baena-Nogueras, R.M., Lara-Martín, P.A., DelValls, T.A., Martín-Díaz, M.L., 2015. A candidate short-term toxicity test using *Ampelisca brevicornis* to assess sublethal responses to pharmaceuticals bound to marine sediments. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 68, 237–258. doi:10.1007/s00244-014-0080-0
- Marlatt, V.L., Veldhoen, N., Lo, B.P., Bakker, D., Rehaume, V., Vallée, K., Haberl, M., Shang, D., van Aggelen, G.C., Skirrow, R.C., Elphick, J.R., Helbing, C.C., 2013. Triclosan exposure alters postembryonic development in a Pacific tree frog (*Pseudacris regilla*) Amphibian Metamorphosis Assay (TREEMA). *Aquatic Toxicology* 126, 85–94.
- Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2013. Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 758, 41–47. doi:10.1016/j.mrgentox.2013.09.005
- Marugán, J., Bru, D., Pablos, C., Catalá, M., 2012. Comparative evaluation of acute toxicity by *Vibrio fischeri* and fern spore based bioassays in the follow-up of toxic chemicals degradation by photocatalysis. *Journal of Hazardous Materials* 213–214, 117–122. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.01.075
- Metcalf, C.D., Kleywegt, S., Letcher, R.J., Topp, E., Wagh, P., Trudeau, V.L., Moon, T.W., 2013. A multi-assay screening approach for assessment of endocrine-active contaminants in wastewater effluent samples. *Science of The Total Environment* 454–455, 132–140. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.02.074
- Minguez, L., Di Poi, C., Farcy, E., Ballandonne, C., Benchouala, A., Bojic, C., Cossu-Leguille, C., Costil, K., Serpentine, A., Lebel, J.-M., Halm-Lemeille, M.-P., 2014. Comparison of the sensitivity of seven marine and freshwater bioassays as regards antidepressant toxicity assessment. *Ecotoxicology* 23, 1744–1754. doi:10.1007/s10646-014-1339-y
- Müller, A., Schulz, W., Ruck, W.K.L., Weber, W.H., 2011. A new approach to data evaluation in the non-target screening of organic trace substances in water analysis. *Chemosphere* 85, 1211–1219. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.009
- Narotsky, M.G., Klinefelter, G.R., Goldman, J.M., DeAngelo, A.B., Best, D.S., McDonald, A., Strader, L.F., Murr, A.S., Suarez, J.D., George, M.H., Hunter, E.S., Simmons, J.E., 2015. Reproductive toxicity of a mixture of regulated drinking-water disinfection by-products in a multigenerational rat bioassay. *Environ. Health Perspect.* 123, 564–570. doi:10.1289/ehp.1408579
- Obiakor, M.O., Okonkwo, J.C., Ezeonyejiaku, C.D., 2014. Genotoxicity of freshwater ecosystem shows DNA damage in preponderant fish as validated by in vivo micronucleus induction in gill and kidney erythrocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 775–776, 20–30. doi:10.1016/j.mrgentox.2014.09.010
- Ortiz de García, S.A., Pinto Pinto, G., García-Encina, P.A., Irusta-Mata, R., 2014. Ecotoxicity and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in aquatic environments and wastewater treatment plants. *Ecotoxicology* 23, 1517–1533. doi:10.1007/s10646-014-1293-8
- Orton, F., Ermler, S., Kugathas, S., Rosivatz, E., Scholze, M., Kortenkamp, A., 2014. Mixture effects at very low doses with combinations of anti-androgenic pesticides, antioxidants, industrial pollutant and chemicals used in personal care products. *Toxicology and Applied Pharmacology* 278, 201–208. doi:10.1016/j.taap.2013.09.008
- Orvos, D.R., Versteeg, D.J., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A., Cunningham, V., 2002. Aquatic toxicity of triclosan. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1338–1349.

- Osachoff, H.L., Mohammadali, M., Skirrow, R.C., Hall, E.R., Brown, L.L.Y., van Aggelen, G.C., Kennedy, C.J., Helbing, C.C., 2014. Evaluating the treatment of a synthetic wastewater containing a pharmaceutical and personal care product chemical cocktail: Compound removal efficiency and effects on juvenile rainbow trout. *Water Research* 62, 271–280. doi:10.1016/j.watres.2014.05.057
- Pablos, M.V., Fernández, C., del Mar Babín, M., María Navas, J., Carbonell, G., Martini, F., García-Hortigüela, P., Vicente Tarazona, J., 2009. Use of a novel battery of bioassays for the biological characterisation of hazardous wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1594–1600. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.12.016
- Pablos, M.V., García-Hortigüela, P., Fernández, C., 2015. Acute and chronic toxicity of emerging contaminants, alone or in combination, in *Chlorella vulgaris* and *Daphnia magna*. *Environ Sci Pollut Res* 22, 5417–5424. doi:10.1007/s11356-015-4119-1
- Pan, T., Li, H., Khare, S., Huang, B., Yu Huang, D., Zhang, W., Gabos, S., 2015. High-throughput screening assay for the environmental water samples using cellular response profiles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 114, 134–142. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.01.020
- Peck, A.M., 2006. Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386, 907–939. doi:10.1007/s00216-006-0728-3
- Pellegrini, V., Gorbi, G., Buschini, A., 2014. Comet Assay on *Daphnia magna* in eco-genotoxicity testing. *Aquatic Toxicology* 155, 261–268. doi:10.1016/j.aquatox.2014.07.002
- Perrichon, P., Le Bihanic, F., Bustamante, P., Le Menach, K., Budzinski, H., Cachot, J., Cousin, X., 2014. Influence of sediment composition on PAH toxicity using zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryo-larval assays. *Environ Sci Pollut Res Int* 21, 13703–13719. doi:10.1007/s11356-014-3502-7
- Perron, M.M., Burgess, R.M., Suuberg, E.M., Cantwell, M.G., Pennell, K.G., 2013. Performance of passive samplers for monitoring estuarine water column concentrations: 2. Emerging contaminants: Passive sampler performance for emerging contaminants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 2190–2196. doi:10.1002/etc.2248
- Piva, F., Ciaprini, F., Onorati, F., Benedetti, M., Fattorini, D., Ausili, A., Regoli, F., 2011. Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: A practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere* 83, 475–485. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.064
- Plata, M.R., Contento, A.M., Villaseñor, M.J., Cabezas, M.L., Ríos, Á., 2009. Development of a novel biotoxicity screening assay for analytical use. *Chemosphere* 76, 959–966. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.04.024
- Rak, G., Fodor, P., Abrankó, L., 2010. Three-step HPLC–ESI-MS/MS procedure for screening and identifying non-target flavonoid derivatives. *International Journal of Mass Spectrometry* 290, 32–38. doi:10.1016/j.ijms.2009.11.008
- Ralph, J.L., Orgebin-Crist, M.-C., Lareyre, J.-J., Nelson, C.C., 2003. Disruption of androgen regulation in the prostate by the environmental contaminant hexachlorobenzene. *Environ Health Perspect* 111, 461–466.
- Raut, S.A., Angus, R.A., 2010. Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1287–1291. doi:10.1002/etc.150

- Rostkowski, P., Horwood, J., Shears, J.A., Lange, A., Oladapo, F.O., Besselink, H.T., Tyler, C.R., Hill, E.M., 2011. Bioassay-directed identification of novel antiandrogenic compounds in bile of fish exposed to wastewater effluents. *Environ. Sci. Technol.* 45, 10660–10667. doi:10.1021/es202966c
- Saal, F.S. vom, Timms, B.G., Montano, M.M., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Dhar, M.D., Ganjam, V.K., Parmigiani, S., Welshons, W.V., 1997. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *PNAS* 94, 2056–2061.
- Sabaliunas, D., Webb, S.F., Hauk, A., Jacob, M., Eckhoff, W.S., 2003. Environmental fate of Triclosan in the River Aire Basin, UK. *Water Research* 37, 3145–3154. doi:10.1016/S0043-1354(03)00164-7
- Sacks, V.P., Lohmann, R., 2011. Development and use of polyethylene passive samplers to detect triclosans and alkylphenols in an Urban estuary. *Environmental Science and Technology* 45, 2270–2277.
- San Segundo, L., Martini, F., Pablos, M.V., 2013. Gene expression responses for detecting sublethal effects of xenobiotics and whole effluents on a *Xenopus laevis* embryo assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2018–2025. doi:10.1002/etc.2267
- SCCS, 2010. Opinion on triclosan (antimicrobial resistance). SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), European Union.
- Seabra Pereira, C.D., Abessa, D.M.S., Choueri, R.B., Almagro-Pastor, V., Cesar, A., Maranhão, L.A., Martín-Díaz, M.L., Torres, R.J., Gusso-Choueri, P.K., Almeida, J.E., Cortez, F.S., Mozeto, A.A., Silbiger, H.L.N., Sousa, E.C.P.M., Del Valls, T.A., Bainy, A.C.D., 2014. Ecological relevance of Sentinels' biomarker responses: A multi-level approach. *Marine Environmental Research, Pollutant Responses in Marine Organisms" (PRIMO17)* 96, 118–126. doi:10.1016/j.marenvres.2013.11.002
- Serrano, R., Nacher-Mestre, J., Portolés, T., Amat, F., Hernández, F., 2011. Non-target screening of organic contaminants in marine salts by gas chromatography coupled to high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Talanta* 85, 877–884. doi:10.1016/j.talanta.2011.04.055
- Sharma, P., Mathur, N., Singh, A., Sogani, M., Bhatnagar, P., Atri, R., Pareek, S., 2015. Monitoring hospital wastewaters for their probable genotoxicity and mutagenicity. *Environ Monit Assess* 187, 4180. doi:10.1007/s10661-014-4180-0
- Silva, I., Real, L.J., Ward, M.S., Xu, H.H., 2014. A disk-diffusion-based target identification platform for antibacterials (TIPA): an inducible assay for profiling MOAs of antibacterial compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 5551–5566. doi:10.1007/s00253-014-5623-9
- Simmons, S.O., Fan, C.-Y., Ramabhadran, R., 2009. Cellular Stress Response Pathway System as a Sentinel Ensemble in Toxicological Screening. *Toxicol. Sci.* 111, 202–225. doi:10.1093/toxsci/kfp140
- Szklarek, S., Stolarska, M., Wagner, I., Mankiewicz-Boczek, J., 2015. The microbiotest battery as an important component in the assessment of snowmelt toxicity in urban watercourses—preliminary studies. *Environ Monit Assess* 187. doi:10.1007/s10661-014-4252-1
- Tang, J.Y.M., Busetti, F., Charrois, J.W.A., Escher, B.I., 2014. Which chemicals drive biological effects in wastewater and recycled water? *Water Research* 60, 289–299. doi:10.1016/j.watres.2014.04.043

- Tang, J.Y.M., Escher, B.I., 2014. Realistic environmental mixtures of micropollutants in surface, drinking, and recycled water: herbicides dominate the mixture toxicity toward algae. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 1427–1436. doi:10.1002/etc.2580
- Tarnow, P., Tralau, T., Hunecke, D., Luch, A., 2013. Effects of triclocarban on the transcription of estrogen, androgen and aryl hydrocarbon receptor responsive genes in human breast cancer cells. *Toxicology in Vitro* 27, 1467–1475. doi:10.1016/j.tiv.2013.03.003
- UE, 2012. Règlement (UE) n° 528/2012 du Parlement Européen et du Conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides.
- UE, 2009. Règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement Européen et du conseil du 30 novembre 2009 relatif aux produits cosmétiques.
- UE, 2006. Règlement (CE) n°1907/2006 du Parlement Européen et du 18 décembre 2006 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques, modifiant la directive 1999/45/CE et abrogeant le règlement (CEE) n°793/93 du Conseil et le règlement (CE) n° 1488/94 de la Commission ainsi que la directive 76/769/CEE du Conseil et les directives 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE et 2000/21/CE de la Commission.
- Vermeirssen, E.L.M., Hollender, J., Bramaz, N., van der Voet, J., Escher, B.I., 2010. Linking toxicity in algal and bacterial assays with chemical analysis in passive samplers deployed in 21 treated sewage effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2575–2582. doi:10.1002/etc.311
- Vrana, B., Vermeirssen, E.L.M., Allan, I.J., Kohoutek, J., Kennedy, K., Mills, G.A., Greenwood, R., 2009. Passive sampling of emerging pollutants in the aquatic environment: state of the art and perspectives. Position Paper. NORMAN.
- Wang, X., Liu, Z., Wang, W., Yan, Z., Zhang, C., Wang, W., Chen, L., 2014. Assessment of toxic effects of triclosan on the terrestrial snail (*Achatina fulica*). *Chemosphere* 108, 225–230. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.01.044
- Watkins, D.J., Ferguson, K.K., Anzalota Del Toro, L.V., Alshawabkeh, A.N., Cordero, J.F., Meeker, J.D., 2015. Associations between urinary phenol and paraben concentrations and markers of oxidative stress and inflammation among pregnant women in Puerto Rico. *Int J Hyg Environ Health* 218, 212–219. doi:10.1016/j.ijheh.2014.11.001
- Welshons, W.V., Thayer, K.A., Judy, B.M., Taylor, J.A., Curran, E.M., vom Saal, F.S., 2003. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* 111, 994–1006.
- Wielogórska, E., Elliott, C.T., Danaher, M., Connolly, L., 2015. Endocrine disruptor activity of multiple environmental food chain contaminants. *Toxicology in Vitro* 29, 211–220. doi:10.1016/j.tiv.2014.10.014
- Wilkinson, A.D., Collier, C.J., Flores, F., Mercurio, P., O'Brien, J., Ralph, P.J., Negri, A.P., 2015. A Miniature Bioassay for Testing the Acute Phytotoxicity of Photosystem II Herbicides on Seagrass. *PLoS ONE* 10, e0117541. doi:10.1371/journal.pone.0117541
- Wojnarowicz, P., Yang, W., Zhou, H., Parker, W.J., Helbing, C.C., 2014. Changes in hormone and stress-inducing activities of municipal wastewater in a conventional activated sludge wastewater treatment plant. *Water Research* 66, 265–272. doi:10.1016/j.watres.2014.08.035
- Wróbel, A.M., Gregoraszczyk, E.Ł., 2014. Actions of methyl-, propyl- and butylparaben on estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  and the progesterone receptor in MCF-7 cancer cells and

- non-cancerous MCF-10A cells. *Toxicology Letters* 230, 375–381. doi:10.1016/j.toxlet.2014.08.012
- Xiao, Y., Araujo, C.D., Sze, C.C., Stuckey, D.C., 2015. Toxicity measurement in biological wastewater treatment processes: A review. *Journal of Hazardous Materials* 286, 15–29. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.12.033
- Yang, L.-H., Ying, G.-G., Su, H.-C., Stauber, J.L., Adams, M.S., Binet, M.T., 2008. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1201–1208. doi:10.1897/07-471.1
- Yueh, M.-F., Taniguchi, K., Chen, S., Evans, R.M., Hammock, B.D., Karin, M., Tukey, R.H., 2014. The commonly used antimicrobial additive triclosan is a liver tumor promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 17200–17205. doi:10.1073/pnas.1419119111
- Zedda, M., Zwiener, C., 2012. Is nontarget screening of emerging contaminants by LC-HRMS successful? A plea for compound libraries and computer tools. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 403, 2493–2502. doi:10.1007/s00216-012-5893-y
- Žegura, B., Heath, E., Černoša, A., Filipič, M., 2009. Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples. *Chemosphere* 75, 1453–1460. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.02.041
- Zitova, A., O'Mahony, F.C., Cross, M., Davenport, J., Papkovsky, D.B., 2009. Toxicological profiling of chemical and environmental samples using panels of test organisms and optical oxygen respirometry. *Environ. Toxicol.* 24, 116–127. doi:10.1002/tox.20387