



*Risques et leviers d'action relatifs  
aux rejets de médicaments, détergents et biocides  
dans les effluents hospitaliers et urbains*

# Évaluation de la dynamique de l'écotoxicité, de l'antibiorésistance, des effets perturbateurs endocriniens, et de la génotoxicité des effluents au cours de leur transport dans les réseaux d'assainissement

## Tâche 3.1 Effets biologiques en réseau

(Livrable final du 04/01/2019)

---

1 - Université de Limoges, UMR INSERM 1092, 123 Avenue Albert Thomas. 87060 Limoges.

*Christophe Dagot<sup>1</sup>, Marine Laquaz<sup>1-2</sup>*

2 - ENTPE, UMR 5023 LEHNA, 2 rue Maurice Audin, 69518 Vaux-en-Velin

*Marine Laquaz<sup>1-2</sup>, Yves Perrodin<sup>2</sup>*

3 - Université Paris Sud, Groupe Santé Publique environnement, UMR 8079 Écologie Systématique Évolution, CNRS, AgroParisTech. Faculté de Pharmacie. 5 rue Jean Baptiste Clément, 92290, Chatenay-Malabry

*Claire Barraud<sup>3</sup>, Viviane Huteau<sup>3</sup>, Julie Henry<sup>3</sup>, Maya Bimbot<sup>3</sup>, Yves Lévi<sup>3</sup>*



Avec le soutien de :



## Introduction

En appui sur le site pilote SIPIBEL ([www.sipibel.org](http://www.sipibel.org)), le programme RILACT a étudié les rejets de micropolluants émergents dans les effluents hospitaliers et urbains. Il permet de compléter le dispositif déjà en place, afin de répondre aux trois grands objectifs suivants partagés par les scientifiques et les gestionnaires locaux :

- Mieux connaître les sources de rejets et leurs processus de métabolisation et de dégradation dans les réseaux d'assainissement urbains et hospitaliers,
- Contribuer à la caractérisation des risques sanitaires et environnementaux liés à ces effluents,
- Identifier et expérimenter les leviers d'actions en impliquant toute la chaîne de responsabilité d'usage des médicaments, détergents et biocides.

| Volet                                                                                                                                                            | Tâche                                                   | Intitulé                                                                                                                                                                                                                                                    | Pilote    | Autre partenaire |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|------------------|
| <b>VOLET I – Développer des méthodes d'identification et quantification de médicaments, Détergents et biocides (DtB), métabolites et produits de dégradation</b> |                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                             |           |                  |
| 1                                                                                                                                                                | T1.1 : Analyses métabolites                             | Développer des méthodes d'analyses de métabolites et produits de dégradation de quelques composés pharmaceutiques ciblés                                                                                                                                    | ISA       |                  |
| 1                                                                                                                                                                | T1.2 : Analyses détergents                              | Développer des méthodes d'analyses dans les effluents des principaux détergents et biocides utilisés dans les établissements de soin                                                                                                                        | ISA       |                  |
| <b>VOLET II – Caractériser finement les rejets de médicaments et leur dynamique dans les effluents hospitaliers et urbains</b>                                   |                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                             |           |                  |
| 2                                                                                                                                                                | T2.1 : Rejets et dégradation des résidus de médicaments | Détecter et quantifier les phénomènes de dégradation ou de transformation des résidus de médicaments et de DtB lors de leurs transferts dans les réseaux et caractériser finement les rejets de médicaments dans les effluents en lien avec la modélisation | INSA      | SRB              |
| <b>VOLET III – Contribuer à l'évaluation des risques environnementaux par l'évaluation des effets biologiques</b>                                                |                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                             |           |                  |
| 3                                                                                                                                                                | T3.1 : Évolution des effets biologiques en réseau       | Évaluation de la dynamique de la toxicité, de l'écotoxicité et de l'antibiorésistance des effluents au cours du transport dans les réseaux d'assainissement                                                                                                 | PARIS SUD | GRESE ENTPE      |
| <b>VOLET IV - Développer des recherches et une étude sociologiques</b>                                                                                           |                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                             |           |                  |
| 4                                                                                                                                                                | T4.1 : Changement des pratiques                         | Étude sociologique et expérimentation de changement de pratiques sur le territoire                                                                                                                                                                          | EHESP     | EVS              |
| 4                                                                                                                                                                | T4.2 : Pratiques hospitalières                          | Mise en évidence de solutions pour limiter les rejets polluants d'un établissement de soin                                                                                                                                                                  | CHAL      | ENTPE            |
| <b>VOLET V – Valoriser et transférer les résultats observés et les connaissances acquises</b>                                                                    |                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                             |           |                  |
| 5                                                                                                                                                                | T5.1 : Coordination projet                              | Coordination du projet                                                                                                                                                                                                                                      | GRAIE     | SRB              |
| 5                                                                                                                                                                | T5.2 : Valorisation projet                              | Valorisation                                                                                                                                                                                                                                                | GRAIE     |                  |

Le présent livrable correspond au volet 3.1. du programme RILACT : « Évolution des effets biologiques en réseau ». L'hypothèse à l'origine de ce travail est la suivante : **un réseau d'assainissement fonctionne comme un réacteur susceptible de diminuer les effets biologiques des effluents du fait notamment du temps de transport et du contact avec le biofilm indigène et les biomasses circulantes notamment sur les matières en suspension et les sédiments.**

La caractérisation d'une matrice, telle que des eaux usées, fait le plus souvent appel à des analyses physico-chimiques car elles permettent de quantifier certains paramètres et de mettre en évidence des processus de métabolisation,

dégradation, adsorption, recombinaison de molécules chimiques. Cependant, ces analyses sont par essence non exhaustives et peuvent ne pas tenir compte ou ne pas montrer certains phénomènes. Les analyses ne sont pas en mesure de quantifier des effets biologiques et encore moins lorsqu'il s'agit de mélanges de contaminants aussi complexes qu'ils peuvent exister dans des eaux usées. L'étude des effets biologiques offre un regard complémentaire indispensable et intégrateur sur ces phénomènes en observant les impacts des potentielles évolutions des eaux usées au sein des réseaux sur des paramètres biologiques.

Le présent document expose les résultats d'écotoxicité (UMR CNRS 5023/ENTPE/Université Lyon 1, en collaboration avec la Plateforme technologique PROVADEMSE), d'antibiorésistance (UMR 1092 INSERM, Limoges), et les résultats d'effets sur les perturbateurs endocriniens et de génotoxicité (UMR CNRS 8079/AgroParisTech/Université Paris Sud), des effluents au cours du transport dans deux types de réseaux d'assainissement : urbain et hospitalier, sur des échantillons d'eau et/ou de biofilm.

## Liste des abréviations

AR : abondance relative

Bact\_16S : bactéries quantifiées à partir du nombre de copies du gène encodant d'ARN 16S mesuré par qPCR

BDDAC : Benzyldimethyldodecylammonium chloride

BDTAC : Benzyldimethyltetradecylammonium chloride

CE<sub>50</sub> : Concentration efficace 50 %

COD : Carbone Organique Dissous

DCO : Demande Chimique en Oxygène

Int1 : intégrons de classe 1

Int3 : intégrons de classe 3

qPCR : quantitative polymerase chain reaction (ou réaction en chaîne par polymérase quantitative)

SDBS : sodium decylbenzene sulphonate

E2 : 17  $\beta$  œstradiol

DHT : dihydrotestostérone

SPE : extraction en phase solide

ASE : extraction accélérée par solvants

4-NQO : 4-Nitroquinoline N-oxide

S9 : activateur métabolique

## Table des matières

---

|                                                                                                                           |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Introduction.....</b>                                                                                                  | <b>1</b>  |
| <b>1. Sites d'étude et campagnes de prélèvements .....</b>                                                                | <b>6</b>  |
| 1.1. Galerie urbaine de Choully .....                                                                                     | 6         |
| 1.2. Centre hospitalier d'Arcachon .....                                                                                  | 8         |
| 1.3. Campagnes d'analyses .....                                                                                           | 9         |
| <b>2. Écotoxicité.....</b>                                                                                                | <b>10</b> |
| 2.1. Matériels et méthodes.....                                                                                           | 10        |
| 2.1.1. Bioessais réalisés .....                                                                                           | 10        |
| 2.1.2. Analyse croisée des données .....                                                                                  | 14        |
| 2.2. Résultats en réseau urbain.....                                                                                      | 16        |
| 2.3. Résultats en réseau hospitalier.....                                                                                 | 22        |
| <b>3. Antibiorésistance.....</b>                                                                                          | <b>27</b> |
| 3.1. Matériels et méthodes.....                                                                                           | 27        |
| 3.1.1. Quantification des intégrons.....                                                                                  | 27        |
| 3.1.2. Analyse croisée des données .....                                                                                  | 27        |
| 3.2. Résultats en réseau urbain.....                                                                                      | 29        |
| 3.2.1. Quantification des intégrons dans les eaux .....                                                                   | 29        |
| 3.2.2. Quantification des intégrons dans le biofilm .....                                                                 | 36        |
| 3.3. Résultats en réseau hospitalier .....                                                                                | 40        |
| 3.3.1. Quantification des intégrons dans les eaux .....                                                                   | 40        |
| 3.3.2. Quantification des intégrons dans le biofilm .....                                                                 | 46        |
| 3.4. Conclusion sur l'écotoxicité et l'antibiorésistance.....                                                             | 48        |
| <b>4. Perturbateurs endocriniens et génotoxicité .....</b>                                                                | <b>50</b> |
| 4.1. Matériels et méthodes.....                                                                                           | 50        |
| 4.1.1. Préparation des échantillons.....                                                                                  | 50        |
| 4.1.2. Modèle cellulaire pour l'évaluation des effets perturbateurs de la transcription des récepteurs aux hormones ..... | 50        |

|                                                                  |                                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.3.                                                           | Test de cytotoxicité au bleu alamar sur les cellules de mammifères .....                           | 51        |
| 4.1.4.                                                           | Évaluation <i>in vitro</i> des perturbateurs de la transcription des récepteurs aux hormones ..... | 51        |
| 4.1.5.                                                           | Étude de la génotoxicité : SOS Chromotest .....                                                    | 51        |
| 4.1.6.                                                           | Analyses statistiques .....                                                                        | 52        |
| 4.2.                                                             | Résultats .....                                                                                    | 53        |
| 4.2.1.                                                           | Résultats pour le réseau urbain (galerie de Chouilly) .....                                        | 53        |
| 4.2.2.                                                           | Résultats pour le réseau hospitalier (Pôle santé d’Arcachon) .....                                 | 59        |
| 4.3.                                                             | Conclusion sur les effets « perturbateurs endocriniens » et la « génotoxicité » .....              | 63        |
| <b>5.</b>                                                        | <b>Conclusions générales et perspectives .....</b>                                                 | <b>65</b> |
| 5.1.                                                             | Conclusions générales .....                                                                        | 65        |
| 5.2.                                                             | Perspectives générales .....                                                                       | 65        |
| <b>6.</b>                                                        | <b>Références bibliographiques .....</b>                                                           | <b>67</b> |
| <b>Annexes .....</b>                                             | <b>68</b>                                                                                          |           |
| Annexes « écotoxicité » et « antibiorésistance » .....           | 68                                                                                                 |           |
| Liste des paramètres testés dans l’analyse statistique .....     | 68                                                                                                 |           |
| Annexe « écotoxicité » .....                                     | 15                                                                                                 |           |
| Réseau urbain .....                                              | 15                                                                                                 |           |
| Réseau hospitalier .....                                         | 21                                                                                                 |           |
| Annexe « antibiorésistance » .....                               | 24                                                                                                 |           |
| Réseau urbain .....                                              | 24                                                                                                 |           |
| Réseau hospitalier .....                                         | 34                                                                                                 |           |
| Annexes « perturbateurs endocriniens » et « génotoxicité » ..... | 39                                                                                                 |           |

## 1. Sites d'étude et campagnes de prélèvements

### 1.1. Galerie urbaine de Chouilly

Les contraintes de choix d'une portion de réseau étaient les suivantes :

- Une portion de réseau suffisamment longue pour avoir un temps de séjour susceptible de rendre perceptibles les éventuelles modifications de l'effluent,
- Une portion de réseau sans apport d'eau usée ou pluviale afin d'étudier le même effluent au cours de son trajet,
- Un site proche de l'observatoire SIPIBEL afin de pouvoir transporter le matériel à chaque campagne.

La combinaison de ces facteurs a permis de choisir le site de la galerie de Chouilly, une portion de réseau de 2,7 km, en condition en surface libre maintenant des conditions aérobies, qui transporte des effluents urbains de Saint-Genis Pouilly (Ain) à Satigny (Suisse) sans apports. Le point amont se situe à l'entrée de la galerie et le point aval au niveau d'un regard, 400 m après la fin de la galerie.

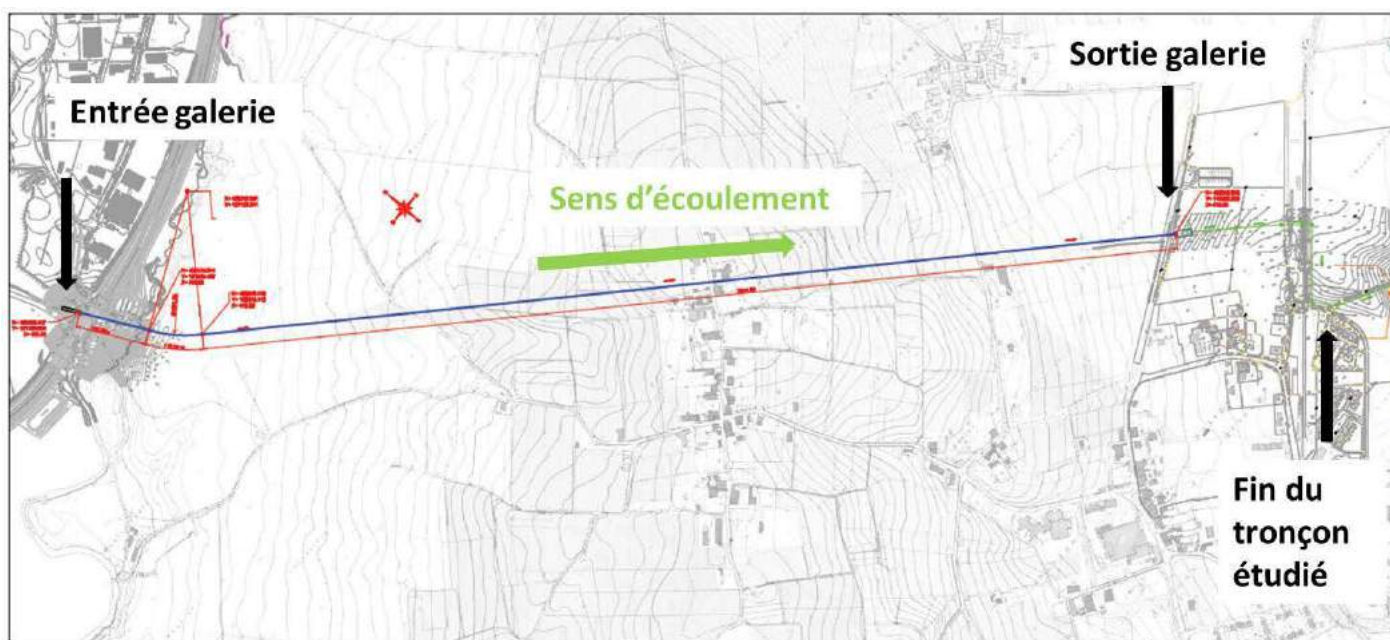


Figure 1 : Plan du tronçon de réseau étudié.

Deux séries de campagnes de prélèvement ont été répétées dans la galerie de Chouilly :

- La première série, dite ponctuelle, a consisté à prélever ponctuellement un échantillon d'eau à l'amont et un à l'aval, décalés entre eux d'une durée égale au temps de trajet des eaux usées dans la galerie. Ce protocole a été appliqué au total neuf fois, réparties sur trois journées : le 6 juillet, le 15 novembre et le 8 décembre 2016.
- La deuxième série, dite intégratrice, a consisté à prélever des échantillons aux points amont et aval de la galerie sur une période totale de trois heures, toujours décalés du temps de trajet de l'effluent à l'aval, en asservissant les prélèvements au débit écoulé. Ce protocole a été répété quatre fois, réparties sur deux journées : le 15 mars et le 5 avril 2017.



Le temps de trajet a été calculé à chaque campagne grâce à la sonde de mesure du débit installée à l'amont de la galerie par la société Suez. Ces mesures ont été vérifiées par des campagnes de traçage permettant de vérifier les mesures de débit et les temps de séjour spécifiques.

**Tableau 1 : Résumé des caractéristiques des campagnes de prélèvements dans la galerie de Chouilly.**

| Campagne | Date de prélèvement | Heure du prélèvement | Temps de séjour | Méthode de prélèvement |
|----------|---------------------|----------------------|-----------------|------------------------|
| 1        | 06/07/2016          | 09:22                | 37 minutes      | Ponctuelle             |
| 2        | 06/07/2016          | 10:23                | 37 minutes      | Ponctuelle             |
| 3        | 06/07/2016          | 10:45                | 37 minutes      | Ponctuelle             |
| 4        | 15/11/2016          | 08:35                | 43 minutes      | Ponctuelle             |
| 5        | 15/11/2016          | 09:32                | 37 minutes      | Ponctuelle             |
| 6        | 15/11/2016          | 10:30                | 43 minutes      | Ponctuelle             |
| 7        | 08/12/2016          | 08:40                | 44 minutes      | Ponctuelle             |
| 8        | 08/12/2016          | 09:30                | 43 minutes      | Ponctuelle             |
| 9        | 08/12/2016          | 10:30                | 45 minutes      | Ponctuelle             |
| 10       | 15/03/2017          | 08:30                | 33 minutes      | Intégratrice           |
| 11       | 15/03/2017          | 11:40                | 40 minutes      | Intégratrice           |
| 12       | 05/04/2017          | 08:30                | 43 minutes      | Intégratrice           |
| 13       | 05/04/2017          | 11:31                | 41 minutes      | Intégratrice           |

Des prélèvements de biofilm ont été réalisés à l'amont et à l'aval de la galerie de Chouilly grâce à l'installation de supports artificiels : des flacons en plastique de 50 mL, dont la surface a été grattée au papier de verre pour permettre une colonisation des bactéries plus facile, attachés en guirlande à un fil de pêche et immergés dans l'eau. Ces supports ont été installés et laissés pendant 3 à 5 semaines avant d'être collectés. Ces prélèvements ont été réalisés à 5 reprises en novembre et décembre 2016, mars, mai et juin 2017.

Ces prélèvements ont été réalisés avec l'aide de la Communauté de Communes du Pays de Gex, Suez, les Services Industriels de Genève (SIG) et l'Etat de Genève.





## 1.2. Centre hospitalier d’Arcachon

Dans le cadre de la collaboration entre les programmes RILACT et REMPAR à Arcachon, il a été décidé de conduire une série de campagnes communes sur la conduite de refoulement du Pôle de Santé d’Arcachon (PSA), d’une longueur de 2,5 km dans des conditions d’écoulement sous pression (conditions anoxiques). La particularité de ce site est l’acheminement des eaux usées du centre hospitalier via une canalisation en charge alimentée par une pompe. Cette disposition permet d’avoir un temps de trajet de l’effluent dans le réseau de plusieurs heures.

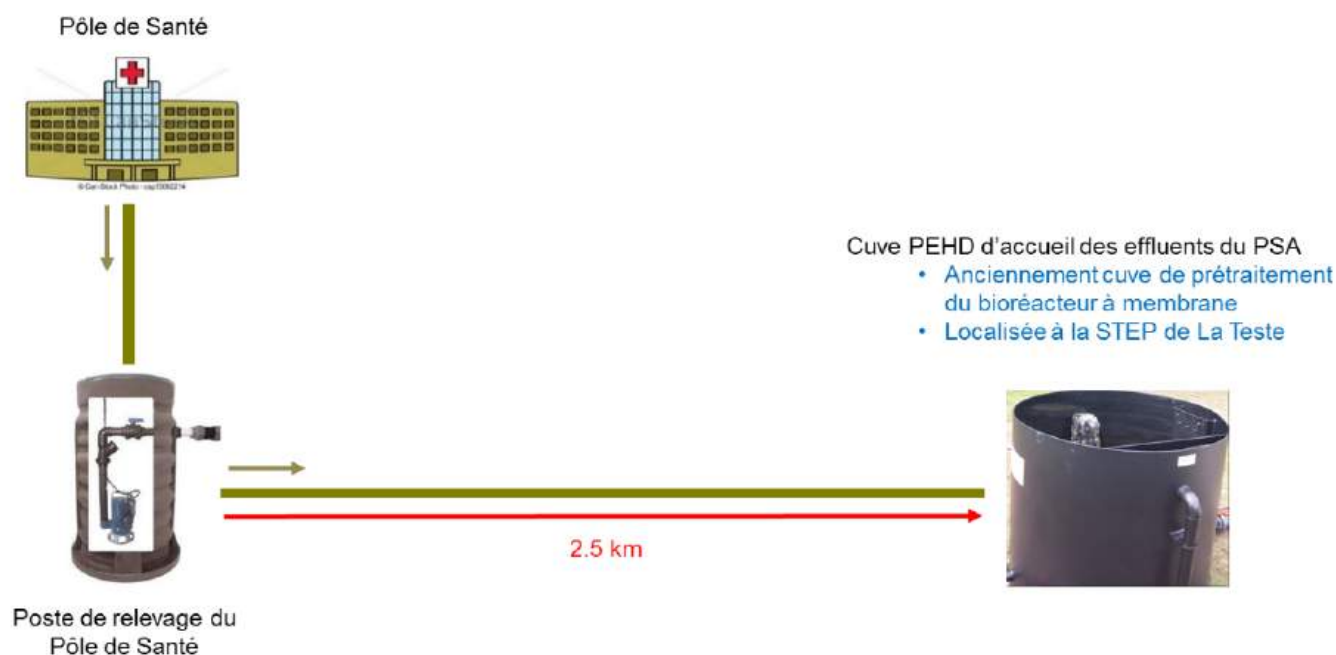


Figure 2 : Schéma du site de prélèvement hospitalier.

Tableau 2 : Résumé des caractéristiques des campagnes de prélèvements au Pôle santé d’Arcachon.

| Campagne | Date de prélèvement | Heure du prélèvement | Temps de séjour moyen | Méthode de prélèvement |
|----------|---------------------|----------------------|-----------------------|------------------------|
| 1        | 27/06/2017          | 11:20                | 3h17                  | Intégratrice           |
| 2        | 27/06/2017          | 16:30                | 7h50                  | Intégratrice           |
| 3        | 28/06/2017          | 06:00                | 3h                    | Intégratrice           |
| 4        | 28/06/2017          | 16:28                | 9h18                  | Intégratrice           |
| 5        | 29/06/2017          | 06:00                | 2h49                  | Intégratrice           |

Plus d’informations sur les modalités de prélèvement et l’analyse fine des dégradations de résidus de médicaments dans ce réseau sont disponibles dans le livrable « Bilan et analyse de campagnes de mesure d’études de la dégradation des résidus de médicaments en réseau : Cas d’une conduite anaérobie à Arcachon » (Tâche 2.1 « Rejet et dégradation de médicaments »).

Du fait d’un écoulement en charge, les prélèvements de biofilm ont été réalisés *in situ* (sur les surfaces en place) avec l’aide du SIBA (syndicat intercommunal du bassin d’Arcachon) et le personnel exploitant de la station de La Teste de Buch. À l’amont du réseau, un système de sécurité a permis à un membre de l’équipe de descendre dans la bêche du

stockage sans danger et de réaliser le prélèvement au niveau du tuyau d'alimentation de celle-ci (Photo figure 3). À l'aval, le tuyau n'étant pas directement accessible, un engin de chantier a été dépêché sur place afin de creuser jusqu'à une portion de celui-ci, de le déterrer et d'en découper un morceau afin de permettre le prélèvement (Figure 4).



Figure 3 : Prélèvement de biofilm dans la bache au niveau du Pôle de Santé d'Arcachon.



Figure 4 : Creusement d'une tranchée et prélèvement de biofilm dans la portion de tuyau excavé.

### 1.3. Campagnes d'analyses

---

Les campagnes d'analyses ont été déclinées sur les deux sites. Elles consistaient à déployer les analyses suivantes :

- Essais d'écotoxicité ;
- Mesure de la capacité d'antibiorésistance ;
- Mesures de l'effet de perturbations endocriniennes et de génotoxicité.

Ces éléments seront décrits de manière détaillée dans les parties suivantes.

En complément, des campagnes d'analyses chimiques ont été réalisées. Les résultats détaillés sont décrits dans le livrable de la tâche 2.1 du projet SIIBEL-Rilact.

## 2. Écotoxicité

---

### 2.1. Matériels et méthodes

---

#### 2.1.1. Bio-essais réalisés

##### Approche générale de l'élaboration d'une batterie de bio-essais

L'élaboration d'une batterie de bio-essais vise à tester les effluents avec les outils les plus divers et les plus sensibles possibles, en terme de réponse à des effluents potentiellement écotoxiques. Pour ce faire, on sélectionne tout d'abord des organismes appartenant à des groupes d'espèces différentes (micro-algues, rotifères, crustacés, ...) et à des niveaux trophiques différents (producteurs primaires, consommateurs primaires, détritivores,...). Cette approche est notamment celle qui est retenue par l'European Chemicals Bureau (ECB, 2003) dans son TGD (Technical Guidance Document) sur l'évaluation des risques environnementaux des substances chimiques mises sur le marché. Dans une deuxième phase, après essais préliminaires sur la(les) matrice(s) étudiée(s) (ici les effluents de réseaux urbains), on retient les essais qui se sont révélés les plus sensibles, les plus complémentaires, en tenant également compte du coût de ces derniers (recherche du meilleur rapport coût/efficacité).

##### Application au programme RILACT

L'application de l'approche générale ci-dessus aux effluents de réseaux urbains testés dans le cadre du programme RILACT a tout d'abord conduit à la sélection des quatre bio-essais suivants :

- Inhibition de la croissance algale de *pseudokirchneriella subcapitata* (producteurs primaires),
- Inhibition de la mobilité des daphnies (consommateurs primaires),
- Inhibition de la reproduction des rotifères *brachionus calyciflorus* (détritivores),
- Inhibition de la croissance de l'ostracode *heterocypris incongruens* (détritivores/filtreurs).

Dans un deuxième temps, des essais préliminaires ont été conduits afin de préciser les tests à utiliser et les procédures de préparation des échantillons les plus adaptées au contexte du programme RILACT. Tout d'abord, des essais daphnies menés sur des échantillons frais et congelés ont permis de retenir le choix des échantillons congelés. En effet, la congélation des eaux prélevées n'occasionnait que de faibles différences de résultats par rapport aux échantillons frais. Ensuite, le test sur des ostracodes s'est avéré trop peu sensible aux matrices testées, et n'a pas été retenu pour les campagnes suivantes. Puis, un essai comparé sur des échantillons « filtrés » et « non filtrés » pour les daphnies a montré que là encore les différences étaient faibles, et il a été décidé de conserver le test sur échantillon brut. Par ailleurs, les bio-essais sur micro-algues ne peuvent pas être réalisés sur échantillons non filtrés en raison notamment de risques d'interférences (en particulier avec les micro-algues initialement contenus par les effluents). Enfin, les bio-essais rotifères ne permettent pas de tester des échantillons bruts, du fait de la très faible taille des organismes pouvant conduire à leur entraînement physique par les particules en suspension.

Sur la base de ce travail préliminaire, la batterie de bio-essais retenue est celle présentée dans le tableau 3.

L'ensemble du travail expérimental réalisé correspondant à un total de 160 bio-essais, mis en œuvre sur les 38 échantillons prélevés (campagne préliminaire comprise), est présenté dans le tableau 4.

**Tableau 3 : Bio-essais réalisés dans le cadre du Programme RILACT - Protocoles.**

| Famille de bioessais           | Bioessais                                                                     | Norme ou protocole | Traitement de l'échantillon            | Principe                                                                                                                                |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Essai d'écotoxicité aigüe      | Inhibition de la mobilité de <i>Daphnia magna</i>                             | Norme ISO 6341     | Frais et congelé, filtré et non filtré | Après 24 et 48 h, un dénombrement est effectué des daphnies encore mobiles exposées à une gamme de concentration de la matrice étudiée. |
| Essais d'écotoxicité chronique | Inhibition de la croissance de l'algue <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | Norme NF T90-375   | Congelé, filtré à 0,45 µm              | Mesure après 72 h, de l'inhibition de la croissance d'une population algale exposée à une gamme de concentration de la matrice étudiée. |
|                                | Inhibition de la reproduction du rotifère <i>Brachionus calyciflorus</i>      | Norme NF ISO 20666 | Congelé, filtré à 0,45 µm              | Mesure après 48 h, de l'inhibition de la reproduction de rotifères exposés à une gamme de concentration de la matrice étudiée.          |

Tableau 4 : Bio-essais réalisés dans le cadre du programme RILACT.

| Campagne           | Nombre d'échantillons | Bioessais réalisés |                  |                      |                  |                  |                      |
|--------------------|-----------------------|--------------------|------------------|----------------------|------------------|------------------|----------------------|
|                    |                       | Daphnies           | Daphnies         | Daphnies             | Algues           | Rotifères        | Ostracodes           |
|                    |                       | frais non filtrés  | congelés filtrés | congelés non filtrés | congelés filtrés | congelés filtrés | congelés non filtrés |
| Préliminaire       | 2                     | 2                  | 0                | 2                    | 4                | 2                | 2                    |
| juil-16            | 6                     | 6                  | 0                | 6                    | 6                | 6                | 6                    |
| nov-16             | 6                     | 0                  | 6                | 6                    | 6                | 7                | 0                    |
| dec-16             | 6                     | 0                  | 6                | 6                    | 9                | 6                | 0                    |
| mars-17            | 4                     | 0                  | 0                | 4                    | 4                | 4                | 0                    |
| avr-17             | 4                     | 0                  | 0                | 4                    | 4                | 4                | 0                    |
| Arcachon           | 10                    | 0                  | 0                | 16                   | 10               | 16               | 0                    |
| <b>Total :</b>     | <b>38</b>             | <b>8</b>           | <b>12</b>        | <b>44</b>            | <b>43</b>        | <b>45</b>        | <b>8</b>             |
| <b>Total : 160</b> |                       |                    |                  |                      |                  |                  |                      |

Tableau 3 : Grille d'analyse simplifiée des tests écotoxicologiques cités (*Daphnia magna*, *Brachionus calyciflorus* et/ou *Pseudokirchneriella subcapitata*).

| Non toxique                                               | Peu toxique             | Toxique                 | Très toxique            |
|-----------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| CE <sub>50</sub> non mesurable ou CE <sub>20</sub> > 50 % | CE <sub>50</sub> > 50 % | CE <sub>50</sub> < 50 % | CE <sub>50</sub> < 10 % |

### 2.1.2. Analyse croisée des données

Deux types d'analyses ont été menés sur les données biologiques et chimiques, leurs caractéristiques sont synthétisées dans le tableau 6 :

**Tableau 6 : Caractéristiques des analyses menées sur les données biologiques et chimiques**

| Analyse             | « Statique »                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | « Dynamique »                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|---------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Objectif            | Mettre en évidence les <b>molécules potentiellement responsables de l'écotoxicité</b> des effluents<br>(→ caractérisation des effluents)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Mettre en évidence les corrélations entre l'évolution de différents paramètres au cours du trajet i.e. <b>le lien potentiel entre l'abattement des molécules et l'abattement de l'écotoxicité</b><br>(→ effet épurateur du réseau)                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Données considérées | <b>Valeurs de chaque paramètre</b> (biologique, chimique, physicochimique) pour chaque campagne (amont et aval confondus)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>Valeurs des variations calculées entre l'amont et l'aval</b> pour chaque paramètre (biologique, chimique, physicochimique) pour chaque campagne.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| Type de corrélation | Régression linéaire : calculée grâce à la fonction lm (linear model) sous R (logiciel dédié aux calculs statistiques)<br><br>Les corrélations présentées sont celles pour lesquelles le modèle linéaire s'applique aux données i.e. pour lesquelles des tendances apparaissent<br><br>Note : dans le cas de cette analyse la faiblesse du $R^2$ est due à la dispersion des données mais permet de mettre en évidence une tendance. Du fait de la complexité des mélanges étudiés, une relation linéaire forte n'est pas attendue. | Régression linéaire : calculée grâce à la fonction lm (linear model) sous R (logiciel dédié aux calculs statistiques)<br><br>Les corrélations présentées sont celles pour lesquelles le modèle linéaire s'applique aux données i.e. pour lesquelles des tendances apparaissent<br><br>Note : dans le cas de cette analyse la faiblesse du $R^2$ est due à la dispersion des données mais permet de mettre en évidence une tendance. Du fait de la complexité des mélanges étudiés, une relation linéaire forte n'est pas attendue. |
| Exemple             | Corrélation entre les valeurs de $CE_{50}$ du test daphnie et les valeurs de concentration en ibuprofène                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Corrélation entre les variations de la $CE_{50}$ du test daphnie entre l'amont et l'aval et les variations de concentration de Stepanquat GA90 (tensioactif à base d'ammonium quaternaire) entre l'amont et l'aval                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |

#### Analyse « statique » :

Les résultats des échantillons des campagnes urbaines d'une part (13 campagnes donc 26 échantillons) et hospitalières d'autre part (5 campagnes donc 10 échantillons) ont été cumulés pour chaque paramètre biologique ou chimique. Les échantillons amont et aval ont tous été traités indifféremment

car l'objet de cette étude est de faire un lien potentiel entre la toxicité envers un organisme et une ou plusieurs valeurs de paramètres chimiques.

#### Analyse « dynamique » :

Afin d'estimer l'évolution des résultats des bioessais et ceux de la caractérisation chimique entre l'amont et l'aval des réseaux étudiés, le pourcentage de variation entre l'amont et l'aval a été calculé pour chaque paramètre comme suit :

$$\text{Variation} = \frac{\text{Valeur amont} - \text{Valeur aval}}{\text{Valeur amont} + \text{Valeur aval}} \times 100$$

Ce calcul permet de mettre en évidence une évolution positive (abattement) ou négative selon que le paramètre est plus ou moins élevé au terme du transport dans le réseau tout en ramenant cette valeur à l'ordre de grandeur des valeurs mesurées. **Attention :** Une variation positive indique un abattement du paramètre étudié entre l'amont et l'aval, mais dans le cas de l'écotoxicité, une variation positive indique une toxicité plus importante et non pas un abattement de toxicité.

Les analyses dynamiques sur les échantillons en réseau urbain ont été menées sur les résultats de toutes les campagnes exceptée la campagne 7 qui présentait des résultats très différents des autres. Les résultats des 12 autres campagnes ont été cumulés pour l'exploitation en s'assurant que ceux-ci n'étaient pas statistiquement différents en fonction du mode de prélèvement (continu ou ponctuel) grâce à un test statistique non-paramétrique (test de Wilcoxon). Les analyses sur les échantillons hospitaliers ont été menées sur les 5 campagnes.

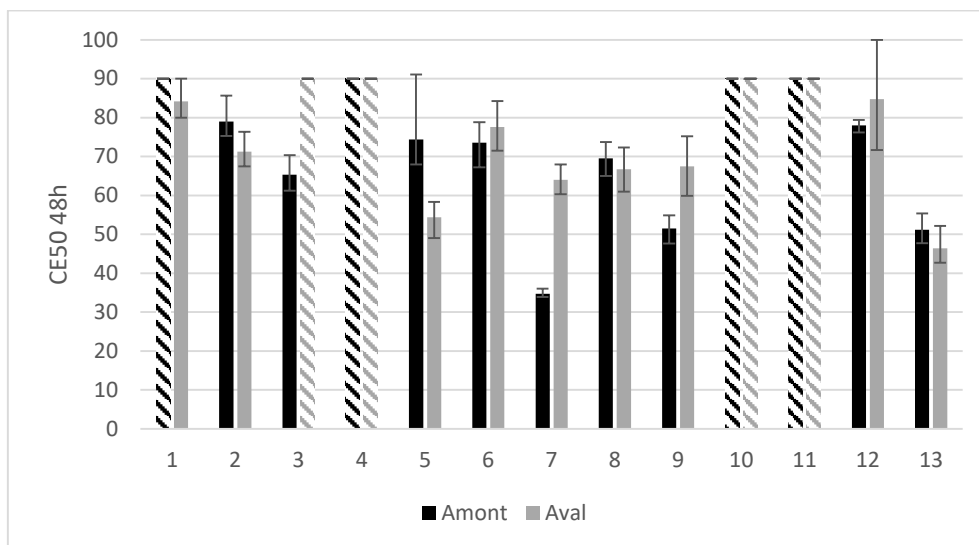


## 2.2. Résultats en réseau urbain

### RESULTATS

Les figures 5, 6 et 7 présentent les résultats de toutes les campagnes menées dans la galerie de Chouilly, ponctuelles et continues.

Les résultats des bioessais montrent une écotoxicité modérée à faible des eaux, avec peu de différences observables entre l'amont et l'aval et aucun résultat systématiquement reproductible d'une campagne à l'autre.



**Figure 5 : Essai de mobilité de *Daphnia magna*, résultats exprimés en CE<sub>50</sub> 48 h sur échantillons congelés, non filtrés. Les barres hachurées indiquent une absence de toxicité pour la gamme de concentration testée.**

Les valeurs de CE<sub>50</sub> sont indicatrices d'une écotoxicité vis-à-vis des daphnies de modérée à faible (entre 50 et 100 %) à l'exception de trois échantillons (CE<sub>50</sub> < 50 %). Les différences entre l'amont et l'aval ne suivent pas de tendance générale, l'écotoxicité augmente ou diminue selon le prélèvement. Cependant ces différences sont parfois assez marquées, comme dans le cas des prélèvements 5 (l'écotoxicité augmente) et 7 (l'écotoxicité diminue).

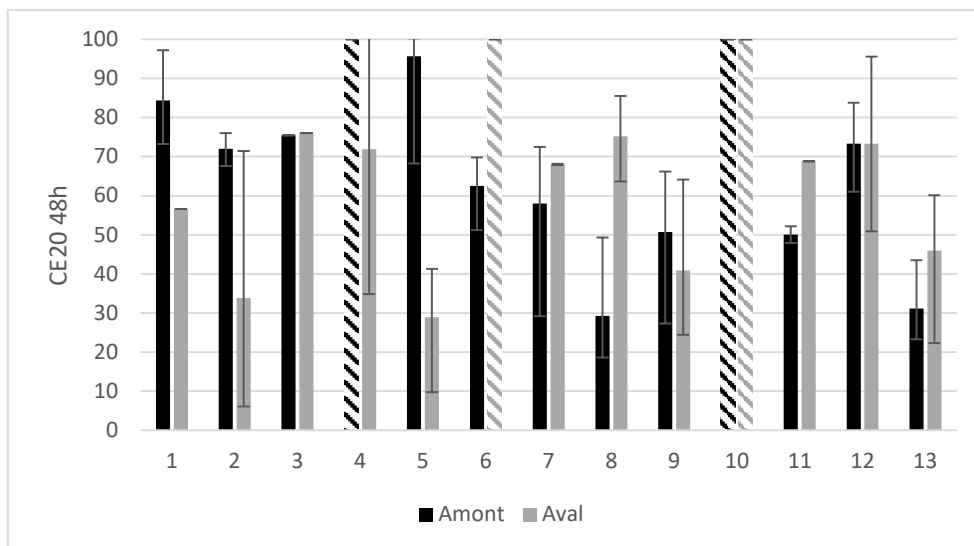


Figure 6 : Essai de reproduction de *Brachionus calyciflorus*, résultats exprimés en CE<sub>20</sub> 48h sur échantillons congelés, filtrés. Les barres hachurées indiquent une absence de toxicité pour la gamme de concentration testée.

Ces résultats montrent que ces organismes sont sensibles aux échantillons testés, la toxicité chronique est assez marquée (CE<sub>20</sub> < 30 %). La comparaison des résultats amont et aval n'indique pas de tendance générale mais une évolution notable de l'écotoxicité au cours du transport, par exemple une diminution marquée de l'écotoxicité lors du prélèvement 8.

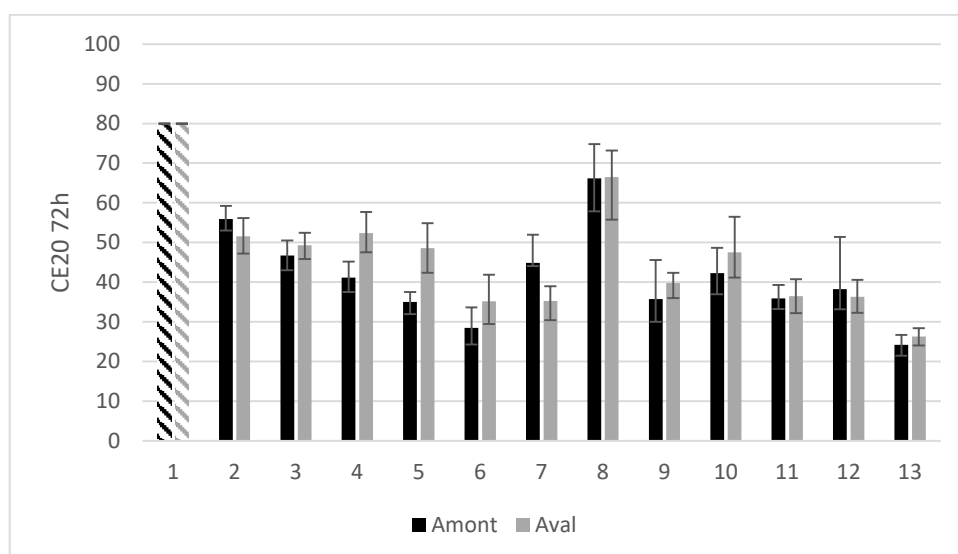


Figure 7 : Essai de reproduction de *Pseudokirchneriella subcapitata*, résultats exprimés en CE<sub>20</sub> 72 h sur échantillons congelés, filtrés. Les barres hachurées indiquent une absence de toxicité pour la gamme de concentration testée.

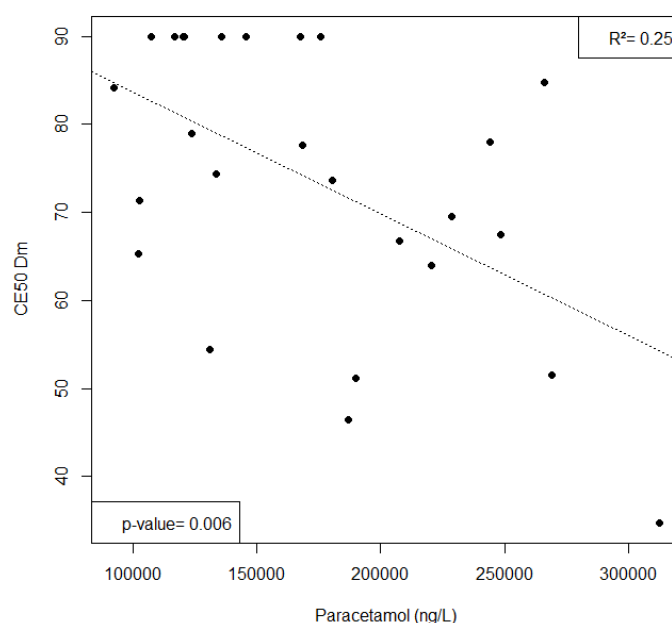
Pour ce bioessai aucune tendance générale ne se dégage entre l'amont et l'aval. Les résultats montrent une toxicité chronique assez élevée (CE<sub>20</sub> entre 30 et 50 %) vis-à-vis des algues mais des différences entre l'amont et l'aval peu perceptibles.

## ANALYSE CROISEE DES DONNEES

### Analyse « statique » ou caractérisation des effluents :

Les corrélations obtenues grâce au modèle linéaire calculé via le logiciel R sont les suivantes :

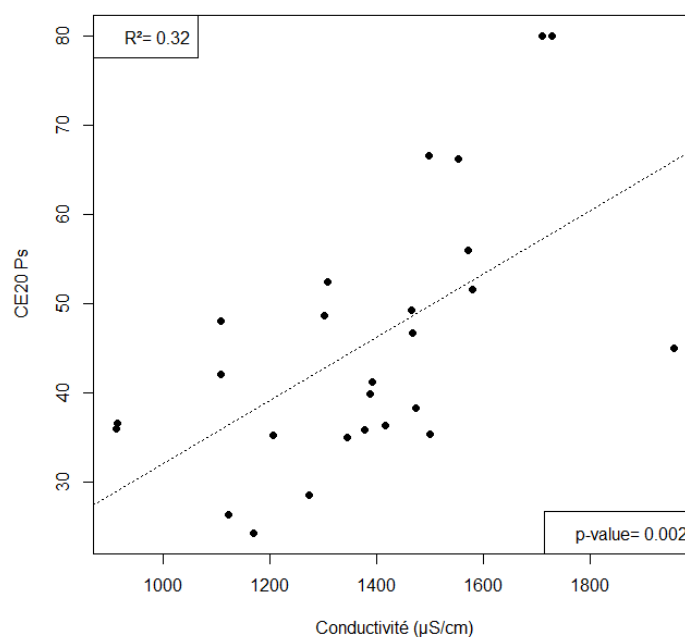
- La valeur de toxicité aigüe envers *Daphnia magna* est **positivement corrélée** (exemple en figure 8) à la valeur des paramètres suivants (i.e. la  $CE_{50}$  est inversement corrélée à ces paramètres, lorsque la valeur des paramètres augmente, la toxicité est plus forte) :
  - Concentration d'ibuprofène ( $R^2 = 0,46$ )
  - Concentration de paracétamol ( $R^2 = 0,25$ )
  - Concentration de Texapon N701S ( $R^2 = 0,23$ )
  - Concentration de Triton X100 ( $R^2 = 0,23$ )
  - Concentration d'azote total ( $R^2 = 0,23$ )
  - Concentration des surfactants anioniques ( $R^2 = 0,16$ )
  - Concentration en MES ( $R^2 = 0,15$ )
  - Concentration de carbone organique dissous ( $R^2 = 0,15$ )
  - Concentration d'acide salicylique ( $R^2 = 0,13$ )
  - Concentration de zinc ( $R^2 = 0,12$ )



**Figure 8 : Corrélation entre les valeurs de  $CE_{50}$  (daphnies) et la concentration de paracétamol, tous échantillons urbains confondus.**

- La valeur de **toxicité** chronique envers *Brachionus calyciflorus* est **positivement corrélée** à la valeur des paramètres suivants (i.e. la  $CE_{20}$  est inversement corrélée à ces paramètres) :
  - Concentration d'ibuprofène
  - Concentration des surfactants anioniques
  - Concentration de carbone organique dissous

- La valeur de **toxicité** chronique envers *Pseudokirchneriella subcapitata* est **inversement corrélée** à la valeur des paramètres suivants (i.e. la CE<sub>20</sub> est positivement corrélée à ces paramètres) :
  - o Concentration de NP10E
  - o Concentration de Sodium 2-ethylsulfate
  - o Concentration de SDBS C10
  - o Concentration de SDBS C11
  - o Concentration de SDBS C12
  - o Concentration de SDBS C13
  - o Conductivité



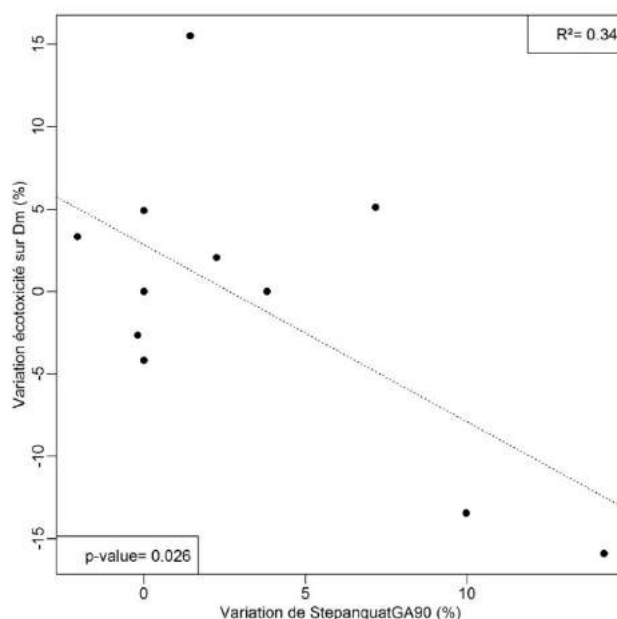
**Figure 9 : Corrélation entre les valeurs de CE20 (*Pseudokirchneriella subcapitata*) et la conductivité, tous échantillons urbains confondus. Note : la faiblesse du R<sup>2</sup> est due à la dispersion des données mais permet de mettre en évidence une tendance.**

#### Analyse « dynamique » ou effet épurateur du réseau :

Les corrélations obtenues grâce au modèle linéaire calculé via le logiciel R sont les suivantes :

- La variation de toxicité aigüe envers *Daphnia magna* montre une tendance **négativement corrélée** à la variation (ou abattement) du Stepanquat GA90 (i.e. une diminution de la toxicité de l'organisme est corrélée avec un abattement de ce paramètre).

Exemple :



**Figure 10 : Relation entre la variation de l'écotoxicité et la variation en pourcentage de la concentration de Stepanquat GA90 dans les échantillons urbains. Note : la faiblesse du  $R^2$  est due à la dispersion des données mais permet de mettre en évidence une tendance.**

- La variation de toxicité aigüe envers *Brachionus calyciflorus* montre une tendance **négativement corrélée** à la variation (ou abattement) de la concentration de cetylbetain (i.e. une diminution de la toxicité de l'organisme est corrélée avec un abattement de ce paramètre) et **positivement corrélée** à la variation (ou abattement) de la concentration de deux métabolites du sulfaméthoxazole : SMW impurity A et SMX glucuronide (i.e. la hausse de toxicité envers cet organisme est corrélée à une baisse de ces paramètres). Il est possible que ce résultat soit lié à un phénomène discuté dans le livrable « Bilan et analyse de campagnes de mesure d'études de la dégradation des médicaments en réseau : Cas d'une conduite anaérobie à Arcachon » (Tâche 2.1 « Rejet et dégradation de médicaments »), c'est-à-dire une augmentation de la concentration du sulfaméthoxazole (molécule mère des deux métabolites cités) qui serait plus toxique que ses produits de dégradation.
- La variation de toxicité aigüe envers *Pseudokirchneriella subcapitata* montre une tendance **négativement corrélée** à la variation (ou abattement) de la concentration de (i.e. une diminution de la toxicité de l'organisme est corrélée avec un abattement de ce paramètre) :
  - Texapon
  - SDBS C11
  - Sulfates
 et **positivement corrélée** à la variation (ou abattement) de la DCO et de la concentration de NP10E (i.e. la baisse de toxicité envers cet organisme est corrélée à une hausse de ces paramètres).

## BILAN

Les résultats d'écotoxicité des échantillons prélevés dans le réseau urbain ne présentent pas de tendance généralisable : l'effet sur les organismes testés augmente ou diminue pendant le trajet selon le prélèvement considéré. Il est tout de même notable que malgré le temps de séjour court, des différences existent ce qui implique que l'effluent évolue suffisamment en 45 minutes pour qu'une différence soit visible au niveau global.

L'analyse « statique » des résultats des paramètres étudiés permet de suggérer la responsabilité potentielle de certaines molécules responsables de la toxicité des effluents urbains dans ce cas. Il apparaît, parmi les molécules dont la concentration est corrélée à une toxicité envers les daphnies et les rotifères, des principes actifs de médicaments, des surfactants et un métal (le zinc). Au contraire, les surfactants semblent favoriser le développement algal, il peut s'agir d'un phénomène d'hormèse, qui masque la toxicité des polluants de l'effluent.

L'analyse « dynamique » des résultats des paramètres étudiés permet de suggérer des liens potentiels entre l'évolution de l'effet biologique mesuré et l'évolution de certains paramètres. La baisse ou l'augmentation au cours du transport des effluents de certains paramètres sont corrélées aux évolutions de l'écotoxicité du mélange complexe. La catégorie de molécule qui ressort est celle des surfactants qui semble corrélée à l'évolution des effets biologiques sur les trois organismes testés.

***L'analyse statistique réalisée sur les résultats est toutefois à prendre avec précaution car elle met en évidence des corrélations, parfois contre-intuitives, permettant d'alimenter la discussion des résultats, mais ne permettant pas de fournir de réponses définitives en ce qui concerne l'implication des composés dans l'écotoxicité d'un effluent.***

## 2.3. Résultats en réseau hospitalier

### RESULTATS

Les résultats des bioessais menés sur les échantillons provenant du réseau hospitalier d’Arcachon indiquent une écotoxicité plus importante que dans le réseau urbain de Choully, ce qui était attendu du fait de précédentes études notamment menées sur le site pilote de Bellecombe (SIPIBEL). Cependant, là encore, il n’est pas possible de dégager de tendance générale, excepté pour le bioessai sur les daphnies.

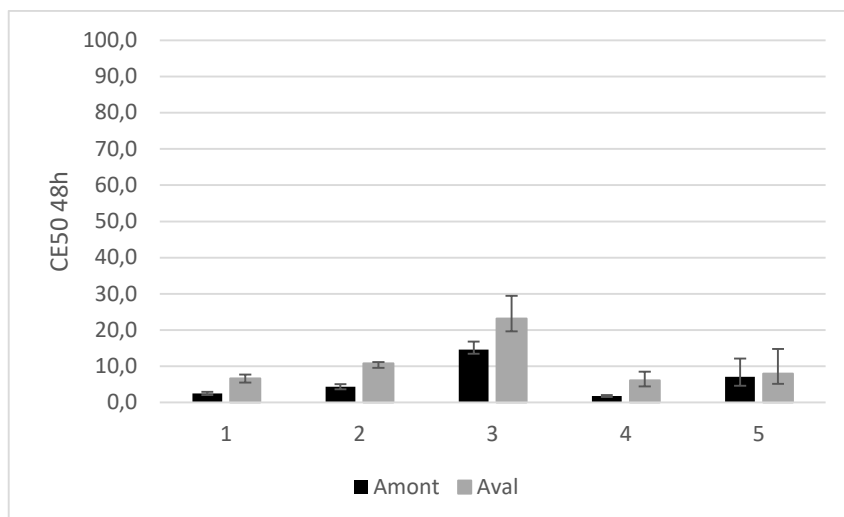


Figure 11 : Essai de mobilité de *Daphnia magna*, résultats exprimés en CE<sub>50</sub> 48h sur échantillons congelés, non filtrés. Campagnes 1,3 et 5 : temps séjour court. Campagnes 2 et 4 : temps de séjour long.

Les valeurs de CE<sub>50</sub> pour ce bioessai sont faibles, souvent inférieures à 10 %, ce qui indique une forte toxicité des échantillons pour les organismes. Les différences entre l’amont et l’aval sont assez faibles (quelques %), cependant elles sont dans le sens d’une diminution de l’écotoxicité pour les 4 premiers prélèvements. Il n’apparaît pas d’effet lié au temps de séjour.

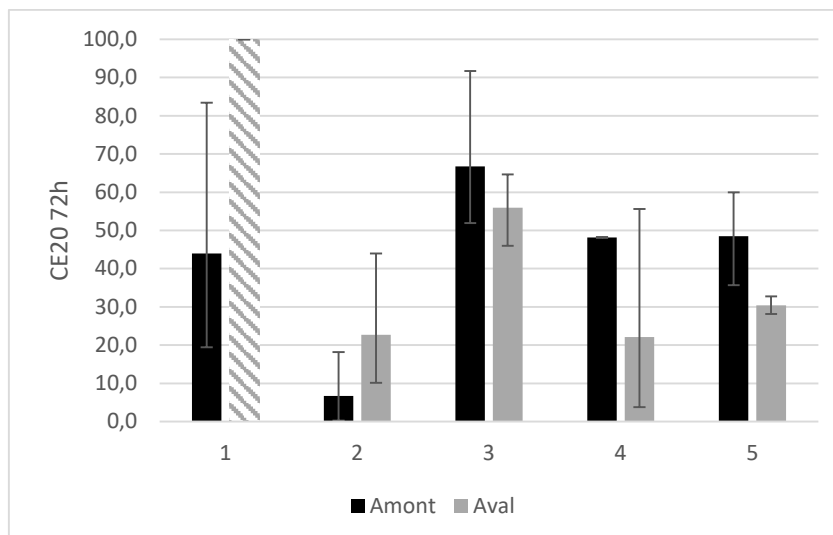


Figure 3 : Essai de reproduction de *Brachionus calyciflorus*, résultats exprimés en CE<sub>20</sub> 48h sur échantillons congelés, filtrés. Campagnes 1,3 et 5 : temps séjour court. Campagnes 2 et 4 : temps de séjour long. Les barres hachurées indiquent une absence de toxicité pour la gamme de concentration testée.

Les résultats de différence amont/aval sont assez variables d'un prélèvement à l'autre, sans effet lié au temps de séjour. Les valeurs de CE20 indiquent des écotoxicités également assez variables, de très toxique à non toxique selon l'échantillon.

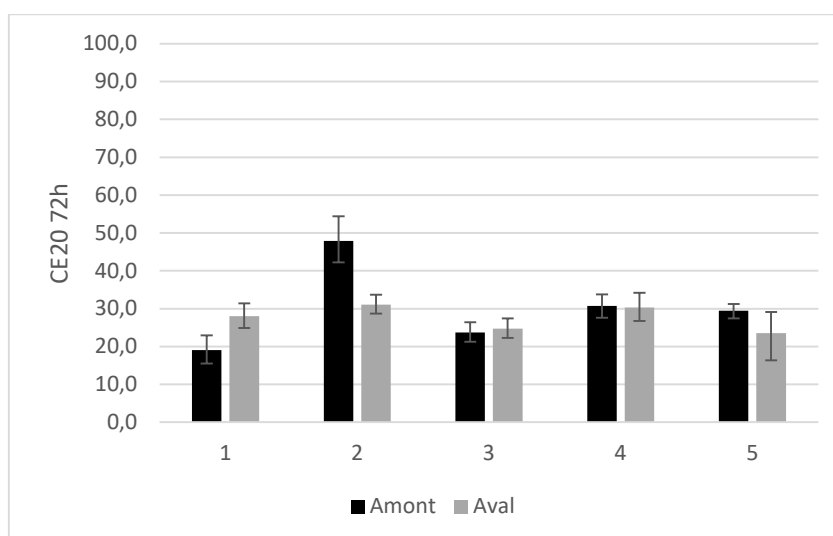


Figure 4 : Essai de croissance de *Pseudokirchneriella subcapitata*, résultats exprimés en CE<sub>20</sub> 72 h sur échantillons congelés, filtrés. Campagnes 1,3 et 5 : temps séjour court. Campagnes 2 et 4 : temps de séjour long.

Les résultats pour le test de croissance algale sont assez homogènes d'un prélèvement à l'autre, avec peu de différences entre l'amont et l'aval, une toxicité chronique marquée et pas d'effet lié au temps de séjour.

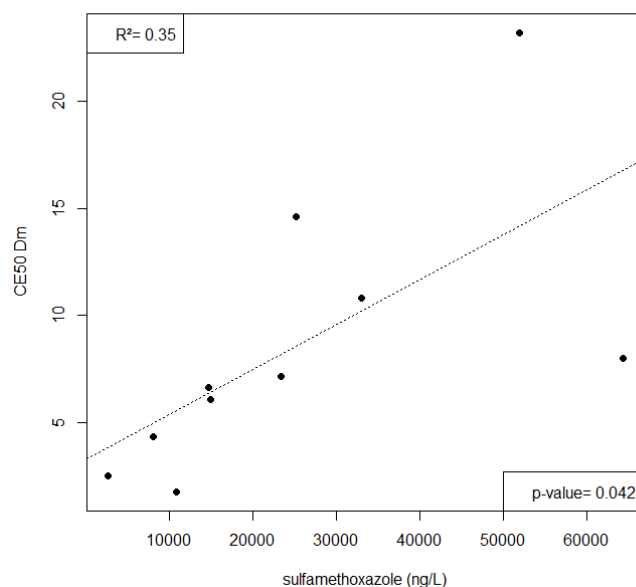


## ANALYSE CROISEE DES DONNEES

### Analyse « statique » ou caractérisation des effluents :

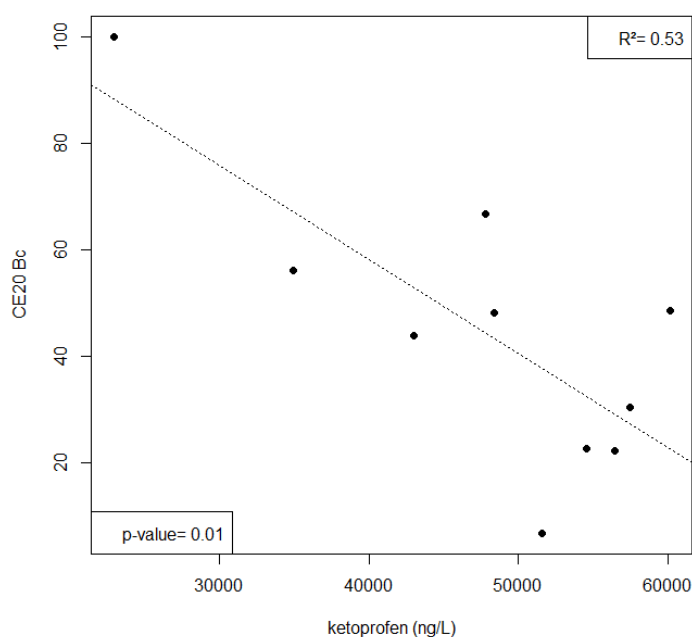
Les corrélations obtenues grâce au modèle linéaire calculé via le logiciel R sont les suivantes :

- La valeur de **toxicité** aigüe envers *Daphnia magna* montre une tendance **négativement corrélée** (Figure 14) à la valeur des paramètres suivants (i.e. la CE<sub>50</sub> est positivement corrélée à ces paramètres, lorsque la valeur des paramètres augmente, la toxicité est plus faible) :
  - Concentration de carbamazépine ( $R^2 = 0,54$ )
  - Concentration de SDBS C10 ( $R^2 = 0,37$ )
  - Concentration de BDTAC ( $R^2 = 0,36$ )
  - Concentration de sulfaméthoxazole ( $R^2 = 0,35$ )



**Figure 5 : Corrélation entre les valeurs de CE50 (daphnies) et la concentration de sulfaméthoxazole, tous échantillons hospitaliers confondus. Note : la faiblesse du  $R^2$  est due à la dispersion des données mais permet de mettre en évidence une tendance.**

- La valeur de **toxicité** chronique envers *Brachionus calyciflorus* montre une tendance **négativement corrélée** à la conductivité (i.e. la CE<sub>20</sub> est positivement corrélée à ce paramètre, lorsque la conductivité augmente, la CE<sub>20</sub> augmente) et **positivement corrélée** à la concentration en kétoprofène (i.e. lorsque la concentration en kétoprofène augmente, la toxicité envers cet organisme est plus importante).



**Figure 6 : Corrélation entre les valeurs de CE<sub>20</sub> (rotifères) et la concentration de kétoprofène, tous échantillons hospitaliers confondus. Note : la faiblesse du R<sup>2</sup> est due à la dispersion des données mais permet de mettre en évidence une tendance.**

#### Analyse « dynamique » ou effet épurateur du réseau :

La même analyse des corrélations a été menée, cependant le nombre de données est plus réduit car seulement 5 campagnes de prélèvement ont été réalisées sur le réseau du Pôle de Santé d'Arcachon. Les corrélations obtenues sont là encore à prendre avec précautions et peuvent servir de pistes de discussion des données obtenues.

Les corrélations obtenues grâce au modèle linéaire calculé via le logiciel R sont les suivantes :

- La variation de toxicité aigüe envers *Daphnia magna* montre une tendance **négativement corrélée** à la variation (ou abattement) du SDBS C10 (i.e. une diminution de la toxicité de l'organisme est corrélée avec un abattement de ce paramètre). Au contraire, elle est **positivement corrélée** à la variation (ou abattement) de la DBO<sub>5</sub>, du COD et du phosphore (la toxicité augmente lorsque ces paramètres sont abattus).
- La variation de toxicité aigüe envers *Brachionus calyciflorus* montre une tendance **négativement corrélée** à la variation (ou abattement) de la concentration de SDBS C12 (i.e. une diminution de la toxicité de l'organisme est corrélée avec un abattement de ce paramètre).

## BILAN

Les prélèvements réalisés dans un réseau hospitalier ont été réalisés pour réunir des conditions plus favorables à l'étude de l'évolution des effets biologiques en réseau : un temps de séjour plus long et des échantillons plus concentrés et plus écotoxiques. Ces conditions ont bien été réunies, cependant aucune évolution claire n'a pu être mise en évidence sur le plan des effets écotoxiques. Le seul schéma répétable sur les 5 prélèvements effectués est une faible diminution de l'écotoxicité des effluents sur *Daphnia magna* au cours du transport dans le réseau. Les autres bioessais montrent des résultats variables selon le prélèvement, sans effet lié à un temps de séjour plus ou moins long.

L'analyse croisée des données dite « statique » ne donne pas de tendance facilement interprétable. La présence de certaines molécules (sulfaméthoxazole, carbamazépine, SDBS C10 et BDTAC) semble diminuer l'écotoxicité envers les daphnies. À contrario, il ressort une corrélation entre la présence de kétoprofène et la toxicité envers les rotifères.

L'analyse croisée des données dite « dynamique » des résultats des paramètres étudiés permet de suggérer des liens entre l'évolution de l'effet biologique mesuré et l'évolution de certains paramètres. Comme dans l'étude des effluents urbains (voir paragraphe 2.2. Résultats en réseau urbain, section Bilan), l'abattement de certains surfactants est corrélé avec la baisse de l'écotoxicité envers les daphnies et les rotifères. À contrario, les variations de phosphore, de Carbone Organique Dissous et de DBO<sub>5</sub> ont un effet positif sur les daphnies, ce qui pourrait indiquer que l'augmentation de ces paramètres est favorable pour les organismes testés.

***L'analyse statistique réalisée sur les résultats est toutefois à prendre avec précaution car elle met en évidence des corrélations, parfois contre-intuitives, permettant d'alimenter la discussion des résultats, mais ne permettant pas de fournir de réponses définitives en ce qui concerne l'implication des composés dans l'écotoxicité d'un effluent.***

### 3. Antibiorésistance

#### 3.1. Matériels et méthodes

##### 3.1.1. Quantification des intégrons

Les intégrons sont des éléments génétiques mobiles spécifiques des bactéries capables d'acquérir, d'échanger et d'exprimer des gènes. On distingue généralement 3 classes d'intégrons qui diffèrent par la séquence protéique de leur intégrase. En tant que vecteur potentiel de gènes de résistance aux antibiotiques, **ils sont maintenant considérés comme un des marqueurs permettant une évaluation globale de l'antibiorésistance au sein d'un écosystème bactérien** (Amos, 2015, Gillings, 2015). Dans cette étude, leur mesure a permis d'estimer l'évolution du potentiel réservoir de bactéries antibiorésistantes entre différents points au travers de la quantité d'intégrons, notamment de classe 1, et par l'abondance relative, calculée en divisant la concentration en intégrons par la concentration de Bact\_16S dans un même extrait d'ADN.

L'extraction de l'ADN bactérien et la quantification des intégrons de classe 1, 2 et 3 par qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) ont été réalisées selon la méthode décrite dans l'article de Barraud (2010) et dans la thèse de Stalder (2012) sur des eaux et des biofilms : dans l'ADN extrait, des amorces spécifiques aux trois classes d'intégrons sont utilisées. La quantité de bactéries est estimée par quantification du nombre de copies du gène encodant l'ARN 16S, elle sera appelée bact\_16S. Les concentrations d'intégrons et de bactéries 16S sont ramenées à un volume d'eau filtrée ou à une masse sèche extraite dépendamment de la matrice étudiée. Chaque échantillon est prélevé en triplicat, puis filtré ou pesé en triplicat et enfin quantifié en triplicat : pour chaque échantillon prélevé, 9 valeurs sont obtenues.

Les quantifications ont été réalisées sur deux types de matrices : eau usée et biofilm, prélevés tel que décrit au point 1.

##### 3.1.2. Analyse croisée des données

Deux types d'analyses ont été menés sur les données d'intégrons et chimiques, leurs caractéristiques sont synthétisées dans le tableau 7.

**Tableau 7 : Caractéristiques des analyses menées sur les données d'intégrons et chimiques**

| Analyse             | « Statique »                                                                                                                                            | « Dynamique »                                                                                                                                                                                                                                           |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Objectif            | Mettre en évidence les <b>molécules potentiellement en lien avec l'occurrence des intégrons</b> dans des effluents<br>(→ caractérisation des effluents) | Mettre en évidence les corrélations entre l'évolution de différents paramètres au cours du trajet i.e. <b>le lien entre l'abattement des molécules et l'évolution du nombre d'intégrons ou de l'abondance relative</b><br>(→ effet épurateur du réseau) |
| Données considérées | <b>Valeurs de chaque paramètre</b><br>(concentration et ratios d'intégrons,                                                                             | <b>Valeurs des variations calculées entre l'amont et l'aval</b> pour chaque paramètre                                                                                                                                                                   |

|                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                     | abondance bactérienne, données chimique, physicochimique) pour chaque campagne (amont et aval confondus)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | (concentration et abondance relative, abondance bactérienne, données chimique, physicochimique) pour chaque campagne.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Type de corrélation | <p>Régression linéaire : calculée grâce à la fonction lm (linear model) sous R (logiciel dédié aux calculs statistiques)</p> <p>Les corrélations présentées sont celles pour lesquelles le modèle linéaire s'applique aux données i.e. pour lesquelles des tendances apparaissent</p> <p>Note : dans le cas de cette analyse la faiblesse du R<sup>2</sup> est due à la dispersion des données mais permet de mettre en évidence une tendance. Du fait de la complexité des mélanges étudiés, une relation linéaire forte n'est pas attendue.</p> | <p>Régression linéaire : calculée grâce à la fonction lm (linear model) sous R (logiciel dédié aux calculs statistiques)</p> <p>Les corrélations présentées sont celles pour lesquelles le modèle linéaire s'applique aux données i.e. pour lesquelles des tendances apparaissent</p> <p>Note : dans le cas de cette analyse le R<sup>2</sup> est plus proche de 1 que dans les autres analyses car le nombre de données est réduit, ce qui facilite l'obtention d'une relation linéaire.</p> |
| Exemple             | Corrélation entre les valeurs d'abondance relative (classe 1) et les valeurs de concentration en chloroforme                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | Corrélation entre les variations de concentration en intégrons de classe 1 entre l'amont et l'aval et les variations de concentration de carbamazépine entre l'amont et l'aval                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |

#### Analyse « statique » :

Les résultats des échantillons des campagnes urbaines d'une part (13 campagnes donc 26 échantillons) et hospitalières d'autre part (5 campagnes donc 10 échantillons) ont été cumulés pour chaque paramètre. Les échantillons amont et aval ont tous été traités indifféremment car l'objet de cette étude est de faire un lien entre les intégrons et une valeur de paramètre chimique.

#### Analyse « dynamique » :

Afin d'estimer l'évolution de l'antibiorésistance et des paramètres de chimie entre l'amont et l'aval des réseaux étudiés, le pourcentage de variation entre l'amont et l'aval a été calculé pour chaque paramètre comme suit :

$$\text{Variation} = \frac{\text{Valeur amont} - \text{Valeur aval}}{\text{Valeur amont} + \text{Valeur aval}} \times 100$$

Ce calcul permet de mettre en évidence une évolution positive ou négative selon que le paramètre est plus ou moins élevé au terme du transport dans le réseau tout en ramenant cette valeur à l'ordre de grandeur des valeurs mesurées.

Les analyses dynamiques sur les échantillons en réseau urbain ont été menées sur les résultats de toutes les campagnes exceptée la campagne 7 qui présentait des résultats très différents des autres et biaisait les calculs. Les résultats des 12 autres campagnes ont été cumulés pour l'exploitation en

s'assurant que ceux-ci n'étaient pas statistiquement différents en fonction du mode de prélèvement (continu ou ponctuel) grâce à un test statistique non-paramétrique (test de Wilcoxon). Les analyses sur les échantillons hospitaliers ont été menées sur les 5 campagnes.

## 3.2. Résultats en réseau urbain

### 3.2.1. Quantification des intégrons dans les eaux

#### 3.2.1.1. Résultats

Les résultats présentés ci-après sont ceux des analyses de quantification des intégrons de classe 1 et 3 (les intégrons de classe 2 étaient dans les concentrations non significatives), leur abondance relative, elles-mêmes quantifiées dans les échantillons d'eau à partir du nombre de copies du gène encodant l'ARN 16S par litre. Les résultats des 13 campagnes menées dans la galerie de Chouilly sont présentés sur les figures 16 à 20, les jours de prélèvements différents sont matérialisés par des lignes grises verticales.

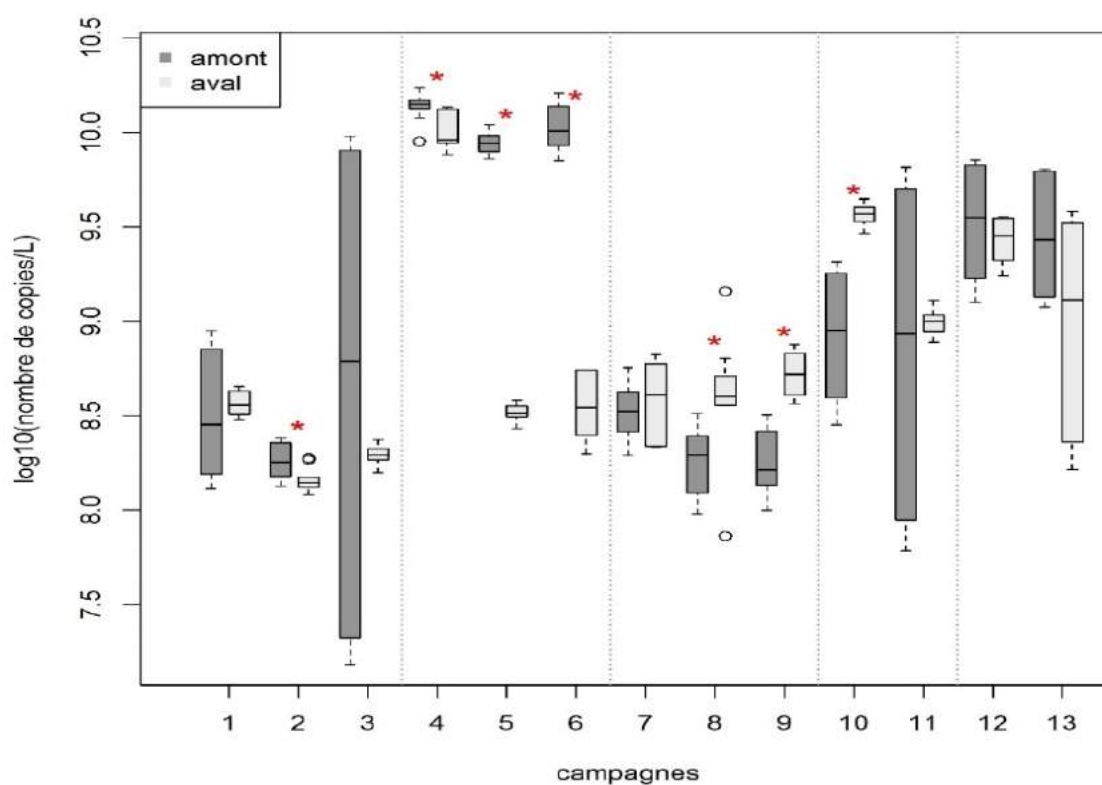


Figure 7 : Concentration en intégrons de classe 1 dans les eaux prélevées en réseau urbain. Les boîtes représentent la médiane, les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles, le minimum, le maximum et l'astérisque rouge représente une différence significative entre l'amont et l'aval.

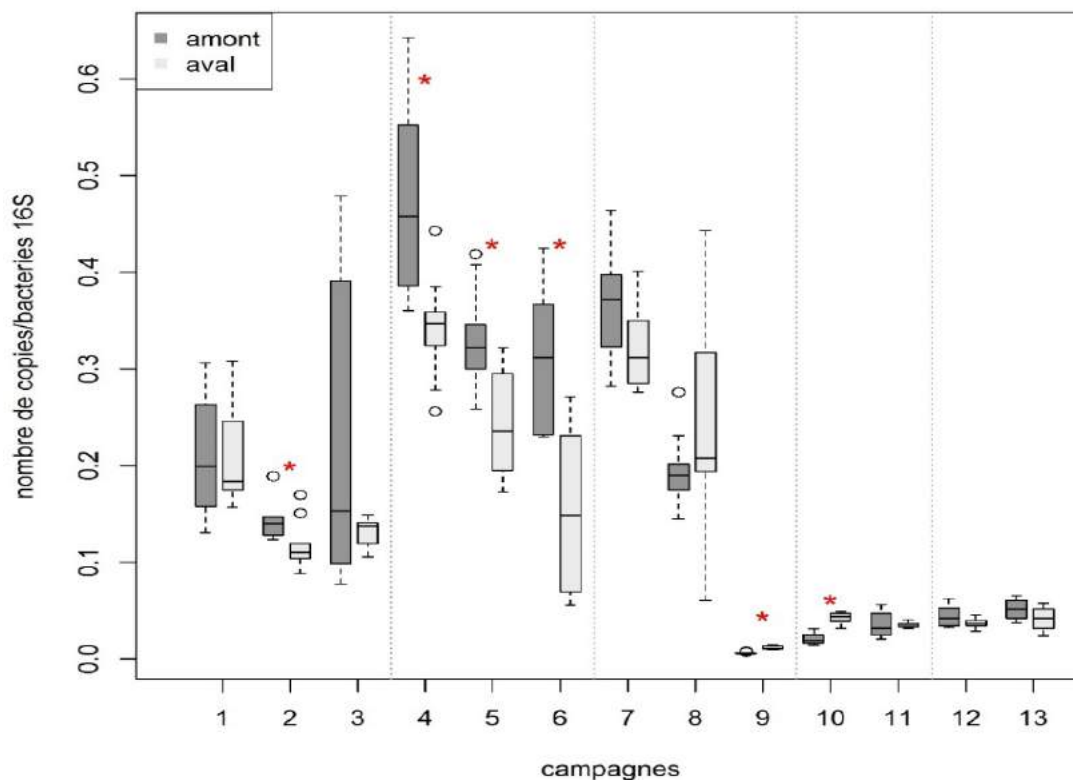


Figure 8 : Abondance relative des intégrons de classe 1 sur le nombre de bactéries 16S (nombre estimé à partir de la quantification des ARN 16S) dans les eaux prélevées en réseau urbain. Les boîtes représentent la médiane, les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles, le minimum, le maximum et l'astérisque rouge représente une différence significative entre l'amont et l'aval.

La concentration et l'abondance relative des intégrons de classe 1 ne suivent pas une évolution constante amont/aval sur tous les prélèvements. Au contraire, les tendances s'inversent selon les jours de prélèvement, sans logique saisonnière ou liée au mode de prélèvement. Les variations de concentration d'Int1 ne sont pas seulement liées à la variation du nombre total de bactéries, car l'abondance relative (le nombre d'intégrons par bactérie) évolue aussi.

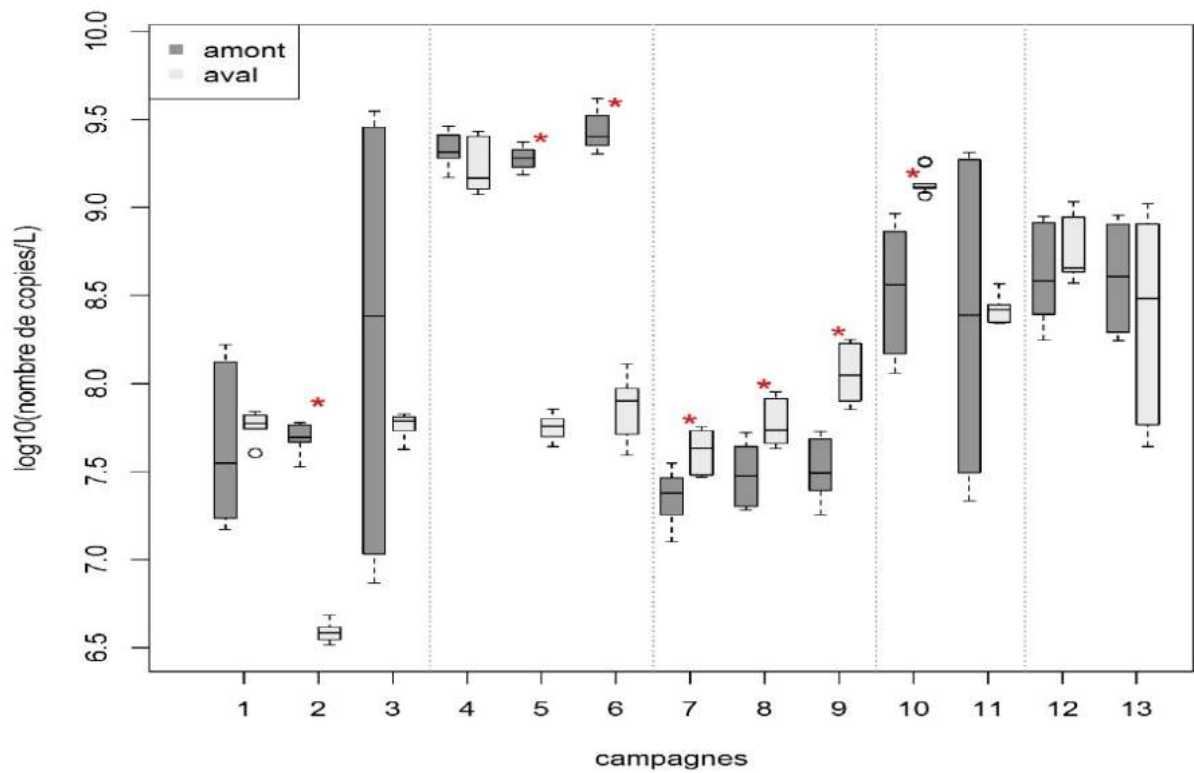


Figure 9 : Concentration en intégrons de classe 3 dans les eaux prélevées en réseau urbain. Les boîtes représentent la médiane, les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles, le minimum, le maximum et l'astérisque rouge représente une différence significative entre l'amont et l'aval.



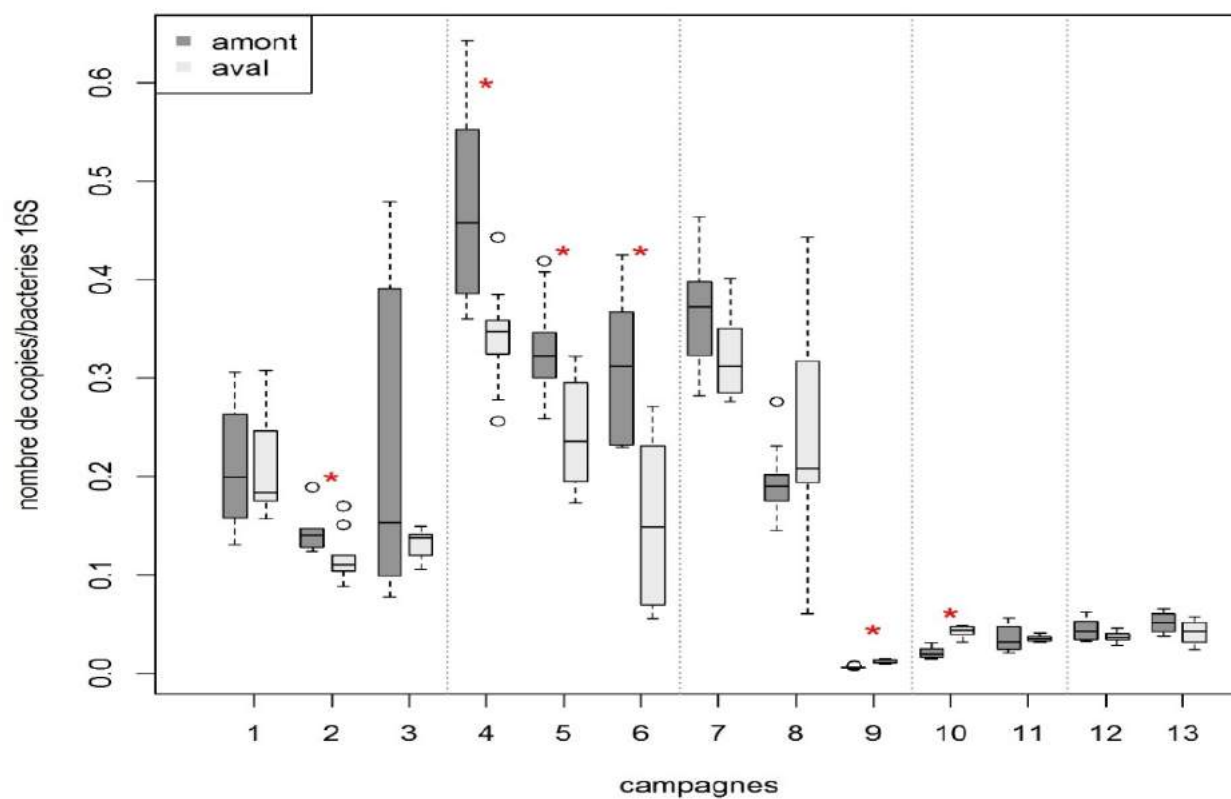
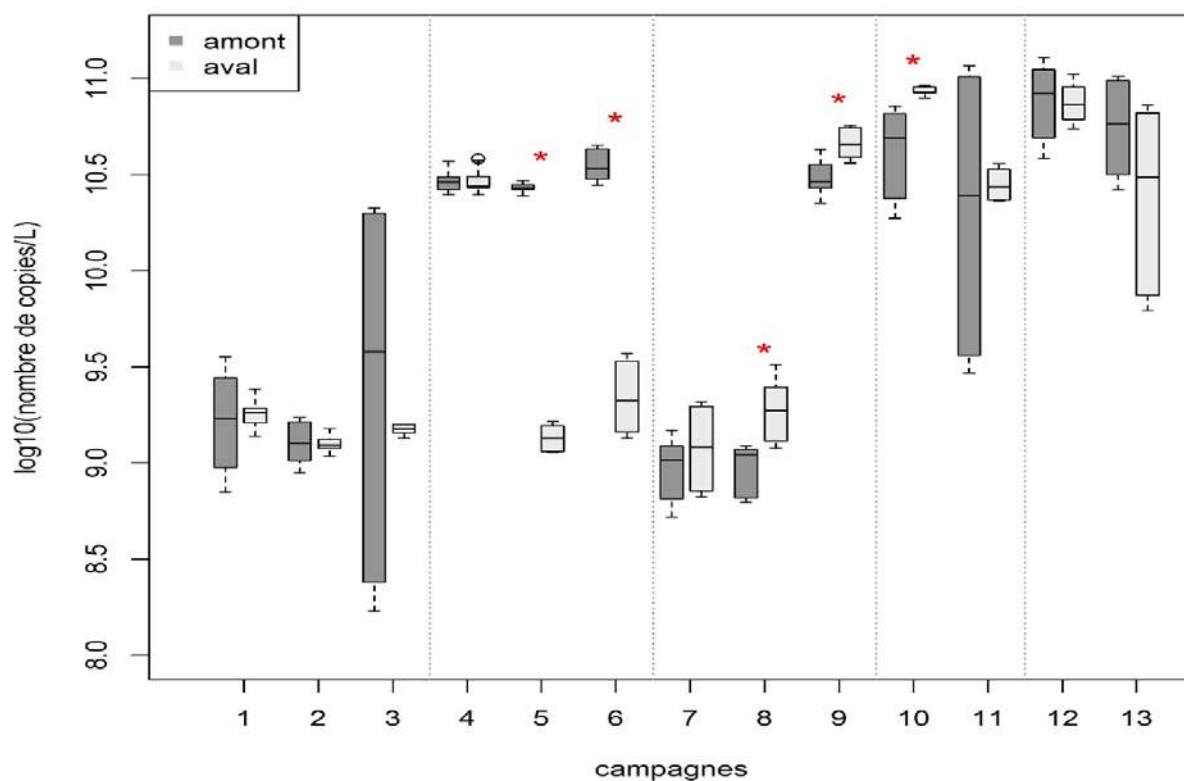


Figure 9 : Abondance relative des intégrons de classe 3 sur le nombre de bactéries 16S (nombre estimé à partir de la quantification des ARN 16S) dans les eaux prélevées en réseau urbain. Les boîtes représentent la médiane, les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles, le minimum, le maximum et l'astérisque rouge représente une différence significative entre l'amont et l'aval.

La concentration d'Int3 et son abondance relative suivent les mêmes variations que les Int1, sans tendance généralisable.



**Figure 20 : Abondance bactérienne quantifiée à partir des ARN 16S dans les échantillons d'eau urbains. Les boîtes représentent la médiane, les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles, le minimum, le maximum et l'astérisque rouge représente une différence significative entre l'amont et l'aval.**

L'abondance bactérienne dans les eaux prélevées dans le réseau urbain n'évolue pas de manière constante selon le prélèvement, cette abondance reste la même, diminue ou augmente entre l'amont et l'aval selon le prélèvement, indépendamment d'un effet saison ou mode de prélèvement.

### 3.2.1.2. Analyse croisée des données

#### Analyse « statique » ou caractérisation des effluents :

Les relations entre les paramètres, obtenues grâce au modèle linéaire calculé via le logiciel R, sont présentées dans le tableau 8

**Tableau 8 : Caractéristiques des analyses menées sur les données d'intégrons et chimiques**

|                                       |                           |                                  | R <sup>2</sup> |
|---------------------------------------|---------------------------|----------------------------------|----------------|
| Concentration d'intégrons de classe 1 | Corrélation négative avec | Concentration d'azote total      | 0,15           |
|                                       |                           | Concentration d'aténolol         | 0,17           |
|                                       |                           | Conductivité                     | 0,14           |
|                                       |                           | Concentration de MES             | 0,15           |
|                                       |                           | DCO                              | 0,2            |
|                                       |                           | Concentration de BDTAC           | 0,12           |
|                                       |                           | Concentration de BDDAC           | 0,13           |
|                                       |                           | Concentration de NP1OE           | 0,27           |
|                                       |                           | Concentration de NP2OE           | 0,16           |
|                                       |                           | Concentration de Stepanquat GA90 | 0,18           |

|                                                    |                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                              |
|----------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                    |                              | Concentration de Sodium<br>dodecylsulfate<br>Concentration de Triton X100<br>Concentration de SDBS C10<br>Concentration de SDBS C11<br>Concentration de SDBS C12<br>Concentration de SDBS C13<br>Concentration de sulfates                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 0,27<br>0,21<br>0,24<br>0,29<br>0,24<br>0,16<br>0,17                                                                                         |
| Abondance relative<br>des intégrons de<br>classe 1 | Corrélation positive avec    | DCO<br>Concentration d'incromine SD<br>Concentration de chloroforme<br>Concentration de sulfates                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 0,2<br>0,21<br>0,16<br>0,13                                                                                                                  |
| Concentration<br>d'intégrons de<br>classe 3        | Corrélation négative<br>avec | Concentration d'acide salicylique<br>Concentration d'aténolol<br>Concentration d'azote total<br>Conductivité<br>Concentration de MES<br>DCO<br>Concentration de zinc<br>Concentration de BDDAC<br>Concentration de NP1OE<br>Concentration de NP2OE<br>Concentration de Stepanquat GA90<br>Concentration de Sodium<br>dodecylsulfate<br>Concentration de Triton X100<br>Concentration de SDBS C10<br>Concentration de SDBS C11<br>Concentration de SDBS C12<br>Concentration de SDBS C13<br>Concentration de sulfates | 0,13<br>0,15<br>0,22<br>0,26<br>0,19<br>0,21<br>0,13<br>0,14<br>0,24<br>0,15<br>0,16<br>0,27<br>0,28<br>0,25<br>0,32<br>0,25<br>0,19<br>0,15 |
| Abondance relative<br>des intégrons de<br>classe 3 | Corrélation négative<br>avec | Concentration d'acide salicylique<br>Concentration de paracétamol                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 0,12<br>0,13                                                                                                                                 |
| Abondance<br>bactérienne<br>(bact16S)              | Corrélation négative<br>avec | Concentration d'azote total<br>Conductivité<br>Concentration de MES<br>DCO<br>Concentration de chrome<br>Concentration de NP1OE<br>Concentration de NP2OE<br>Concentration de Sodium<br>dodecylsulfate<br>Concentration de Triton X100<br>Concentration de SDBS C10<br>Concentration de SDBS C11<br>Concentration de SDBS C12<br>Concentration de SDBS C13                                                                                                                                                           | 0,14<br>0,28<br>0,13<br>0,18<br>0,12<br>0,25<br>0,17<br>0,33<br>0,24<br>0,3<br>0,34<br>0,29<br>0,21                                          |

Cette analyse met en évidence un lien plus fort avec les concentrations de surfactants, lorsqu'ils sont plus concentrés, les intégrons et l'abondance bactérienne ayant tendances à avoir des valeurs de concentrations et de ratio plus faible (voir les figures correspondantes en annexe).

#### Analyse « dynamique » ou effet épurateur du réseau :

Les corrélations obtenues grâce au modèle linéaire calculé via le logiciel R sont les suivantes :

- La variation de concentration des intégrons de classe 1 (ou abattement) est négativement corrélée à la variation (ou abattement) du Sodium dodecylsulfate et positivement corrélée à la variation de la carbamazépine et des sulfates (lorsque ces paramètres sont abattus, la concentration d'intégrons de classe 1 diminue également dans le réseau).
- La variation de la quantité de bactérie est négativement corrélée à celle de la MES organique c'est-à-dire que lorsque la matière en suspension organique augmente entre l'amont et l'aval, l'abondance bactérienne a tendance elle à diminuer. La variation de l'abondance bactérienne est positivement corrélée à celle de l'ammonium ( $\text{NH}_4$ ), de la carbamazépine, des sulfates et du SDBS C10.

#### *3.2.1.3. Bilan*

**Aucun schéma répétable d'un prélèvement à l'autre n'est observable** : les intégrons de classe 1 et de classe 3 diminuent ou augmentent entre l'amont et l'aval selon le prélèvement, que ce soit en concentration ou en abondance relative. Ces variations sont accompagnées d'une même variation de l'abondance bactérienne. On peut voir que pour les campagnes 2, 4, 5 et 6, le nombre d'intégrons ont tendance à diminuer dans les eaux, alors qu'ils ont tendance à augmenter dans les échantillons dans campagnes 7, 8, 9 et 10. Ce phénomène ne semble pas lié au mode de prélèvement, ni à la saison.

D'un point de vue de l'interprétation des mécanismes physico-chimiques en jeu, il est possible de suggérer la possibilité que la baisse de concentration des contaminants (notamment des sulfates et de la carbamazépine) induit une baisse de pression de sélection des bactéries résistantes traduite par une baisse des intégrons. Cependant d'autres phénomènes interviennent probablement puisque des relations inverses peuvent être mises en évidence avec d'autres paramètres comme le Sodium dodecylsulfate.

### 3.2.2. Quantification des intégrons dans le biofilm

Les résultats présentés ci-dessous sont ceux des analyses de quantification des intégrons de classe 1 et 3 et leur abondance relative dans les bactéries quantifiées dans les échantillons de biofilm à partir du nombre de copies d'ARN 16S par gramme de matière sèche. Ces échantillons ont été prélevés en novembre et décembre 2016, mars, mai et juin 2017 après un temps de développement du biofilm de 3 à 5 semaines.

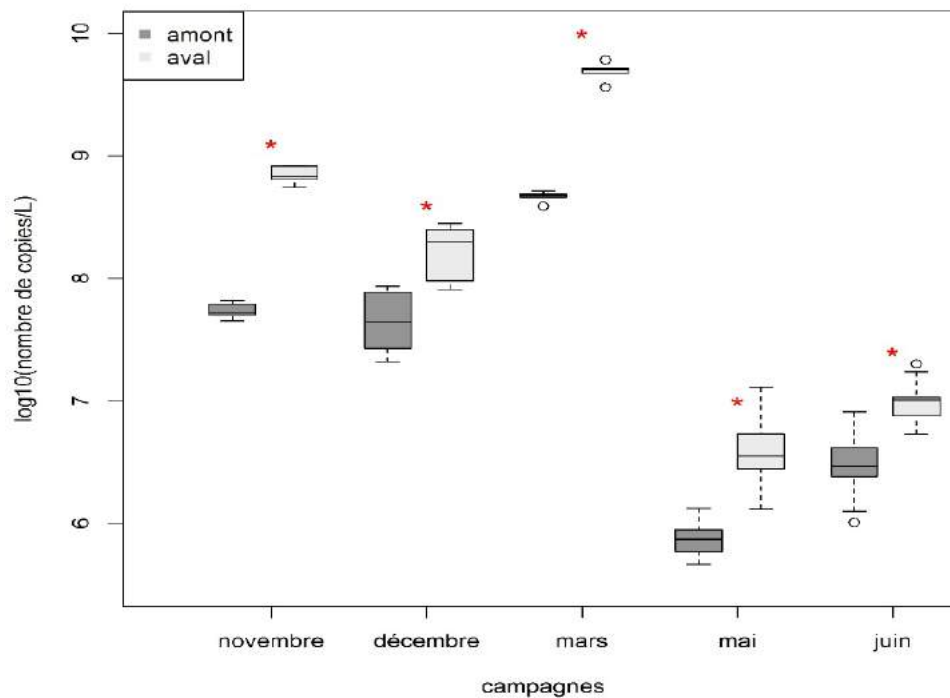
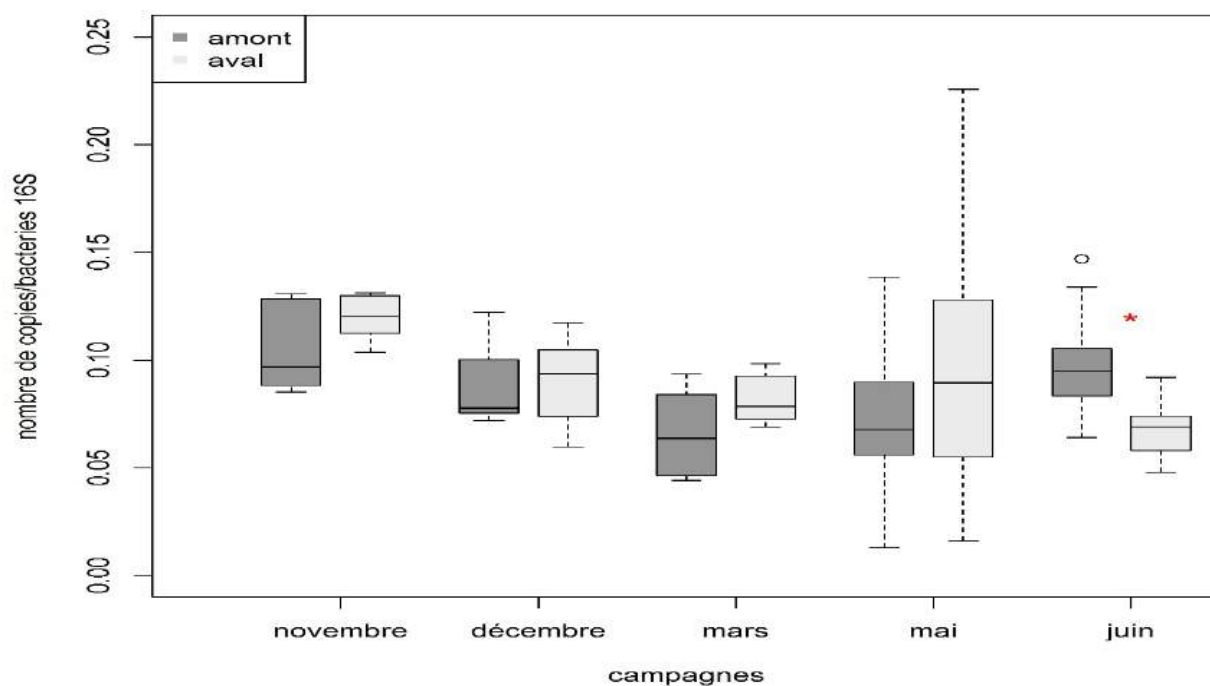


Figure 21 : Concentration en intégrons de classe 1 dans les biofilms prélevés en réseau urbain. Les boîtes représentent la médiane, les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles, le minimum, le maximum et l'astérisque rouge représente une différence significative entre l'amont et l'aval.



**Figure 22 : Abondance relative des intégrons de classe 1 sur le nombre de bactéries 16S (nombre estimé à partir de la quantification des ARN 16S) dans les biofilms prélevés en réseau urbain.**

La concentration d'Int1 est systématiquement statistiquement plus importante dans le biofilm prélevé à l'aval du réseau sur support artificiel (figure 22), cependant l'abondance relative des intégrons n'augmente pas, voire diminue en ce qui concerne le prélèvement de juin. Cette augmentation s'explique par l'augmentation de l'abondance bactérienne globale (Figure 23).

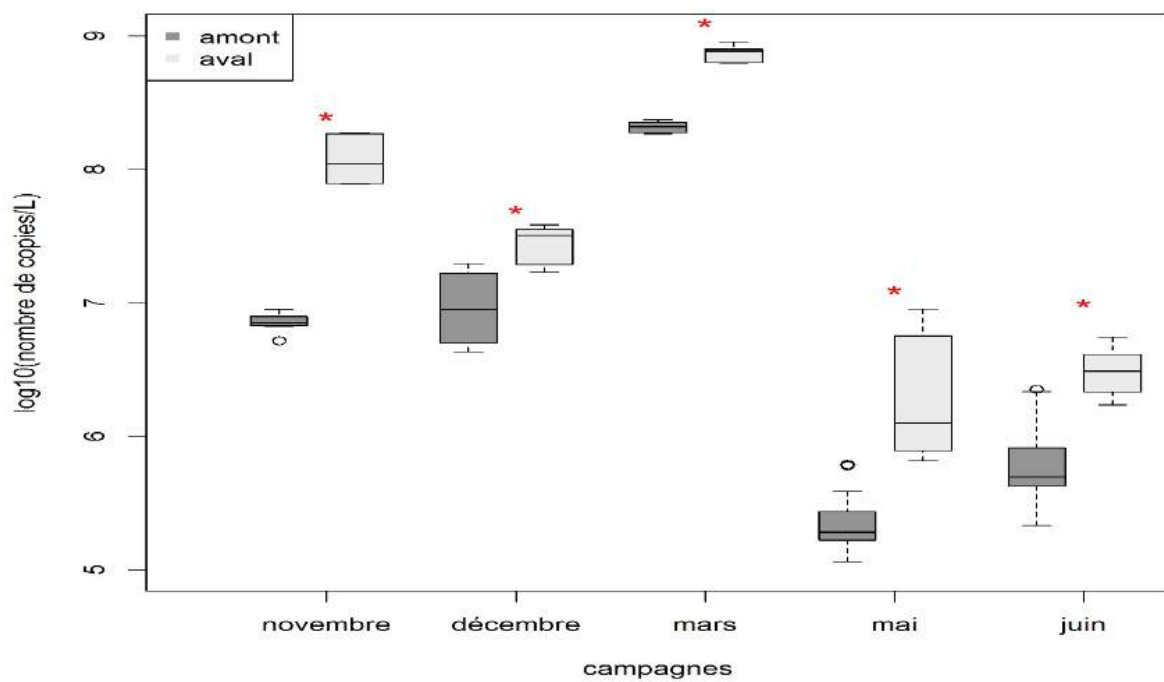


Figure 10 : Concentration en intégrons de classe 3 dans les biofilms prélevés en réseau urbain.

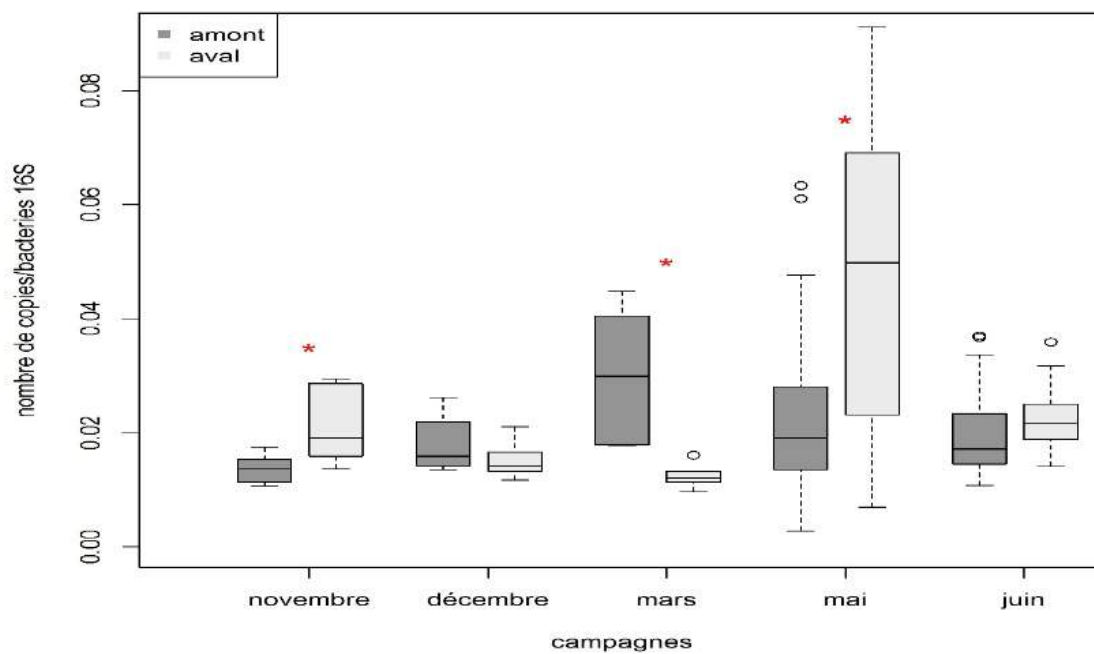
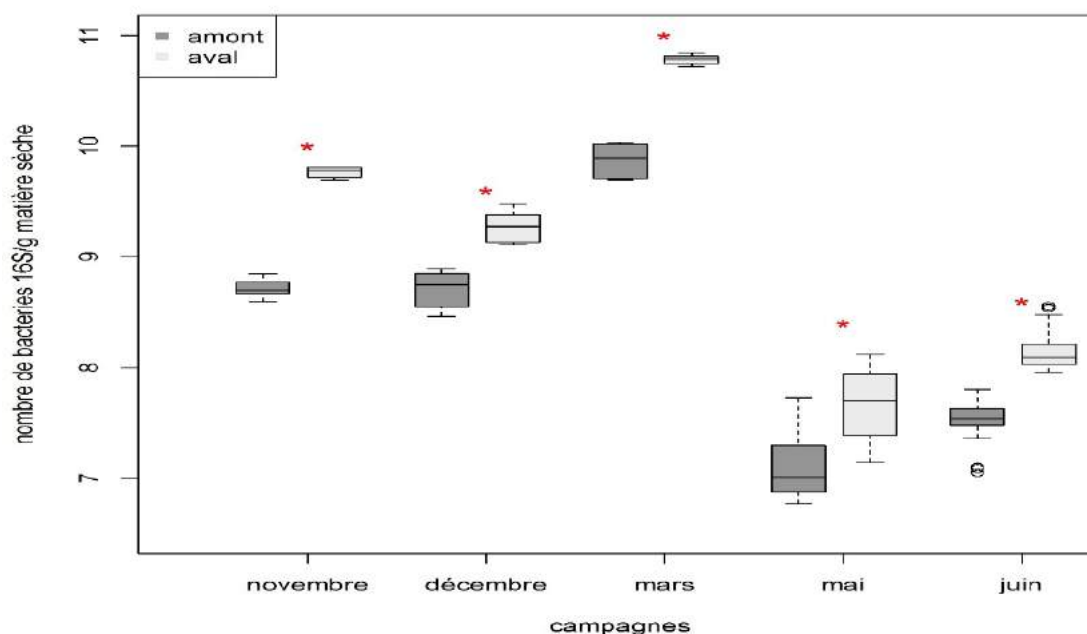


Figure 11 : Abondance relative des intégrons de classe 3 sur le nombre de bactéries 16S (nombre estimé à partir de la quantification des ARN 16S) dans les biofilms prélevés en réseau urbain.

La concentration d'Int3 augmente elle aussi systématiquement entre l'amont et l'aval dans le biofilm, mais contrairement aux Int1, le nombre de copies d'Int3 par bactérie varie selon le prélèvement. Cette

abondance relative augmente pendant les campagnes de novembre et mai, et diminue en mars. Les valeurs de l'abondance relative sont néanmoins nettement moindres que pour les intégrons de classe 1 (environ 3 fois plus de copies par bactérie).



**Figure 12 : Abondance bactérienne estimées à partir de la quantification des ARN 16S (bactéries 16S) dans les biofilms prélevés en réseau urbain.**

Les concentrations en intégrons de classe 1 et 3 augmentent significativement dans les échantillons de biofilm pour chaque prélèvement entre l'amont et l'aval. Cette augmentation semble surtout due à l'augmentation globale du nombre de bactéries (calculé à partir du nombre d'ARN 16S). De ce fait le nombre de copies d'intégrons par bactérie n'augmente pas systématiquement, voire il diminue. **L'antibiorésistance des bactéries estimée par l'abondance relative ne semble donc pas augmenter dans le biofilm, mais on constate globalement une augmentation de la quantité de bactéries (déduite de la quantification des gènes codent pour l'ARN 16S) et de l'antibiorésistance.**

La quantification des résidus de médicaments a pu être réalisée dans certains échantillons de biofilm par l'ISA : ceux du mois de mai et du mois de juin. Les concentrations sont exprimées en nanogramme par gramme de biofilm prélevé.

**Tableau 9 : Concentration en principes actifs de médicaments mesurée dans les biofilms prélevés à l'amont et à l'aval de la galerie de Chouilly en mai et juin 2017**

| Données en ng/g  | Amont (mai) | Aval (mai) | Amont (juin) | Aval (juin) | Limite de détection (LD) | Limite de quantification (Lq) |
|------------------|-------------|------------|--------------|-------------|--------------------------|-------------------------------|
| Sulfamethoxazole | <Lq         | 2,5        | <LD          | <LD         | 0,2                      | 0,5                           |
| Propranolol      | 64,3        | 19,0       | 38,4         | 46,4        | 0,2                      | 1,6                           |
| Carbamazepine    | 33,0        | <Lq        | 2,7          | 2,3         | 0,2                      | 0,8                           |
| Ketoprofen       | 42,5        | 7,5        | <Lq          | <Lq         | 0,8                      | 3,1                           |
| Trimethoprim     | 7,8         | 3,9        | <Lq          | <Lq         | 0,3                      | 1,6                           |



|                |       |       |      |      |     |     |
|----------------|-------|-------|------|------|-----|-----|
| Ofloxacine     | 197,4 | 170,9 | 47,6 | 30,3 | 0,3 | 1,6 |
| Sulfadiazine   | <Lq   | 1,8   | <LD  | <LD  | 0,3 | 1,6 |
| Oxazepam       | 9,0   | 108,3 | 21,6 | 27,8 | 0,2 | 1,6 |
| Ciprofloxacine | 398   | 302   | 360  | 370  | 50  | 100 |

Concernant ces deux campagnes (mai et juin), les résultats d'intégrons indiquent globalement une résistance plus marquée dans les biofilms en aval du réseau (en concentration et en AR). Cependant les analyses médicaments réalisées ne permettent pas d'apporter de piste de discussion potentielle de cette évolution.

### 3.3. Résultats en réseau hospitalier

#### 3.3.1. Quantification des intégrons dans les eaux

##### 3.3.1.1. Résultats

Les résultats présentés ci-dessous sont ceux des analyses de quantification des intégrons de classe 1 et 3, leur abondance relative dans les bactéries, elles-mêmes quantifiées dans les échantillons d'eau à partir du nombre de copies d'ARN 16S par litre. Les résultats des 5 campagnes menées dans la canalisation du Pôle de Santé d'Arcachon sont présentés sur les figures ci-dessous.

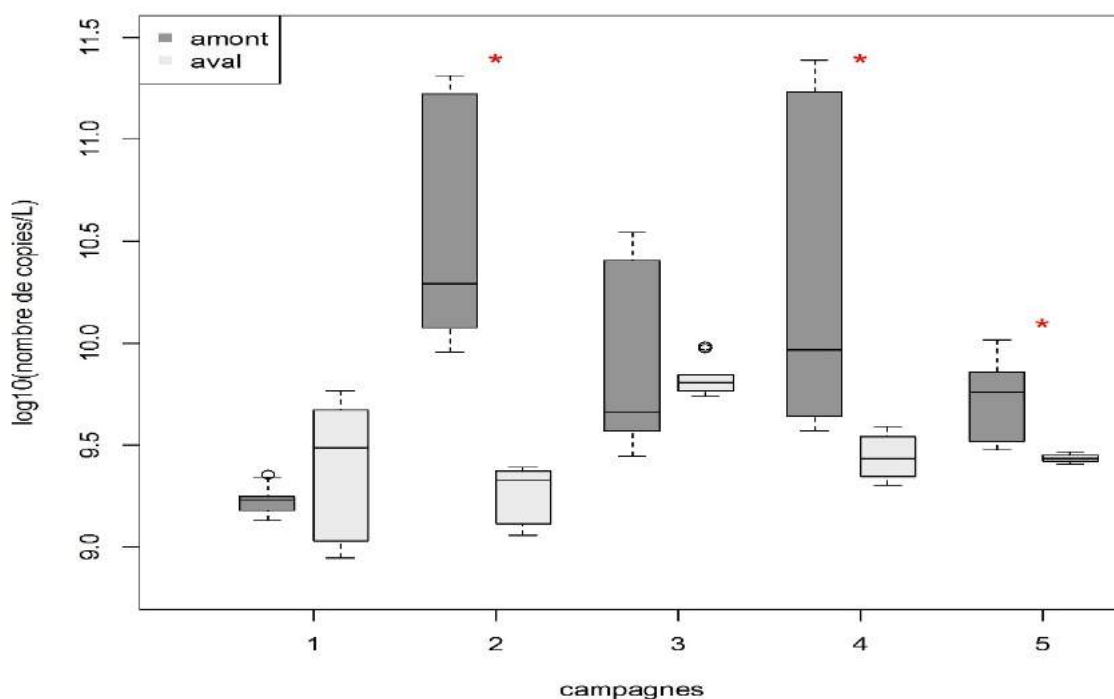


Figure 13 : Concentration en intégrons de classe 1 dans les eaux prélevées en réseau hospitalier. Les boîtes représentent la médiane, les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles, le minimum, le maximum et l'astérisque rouge représente une différence significative entre l'amont et l'aval.

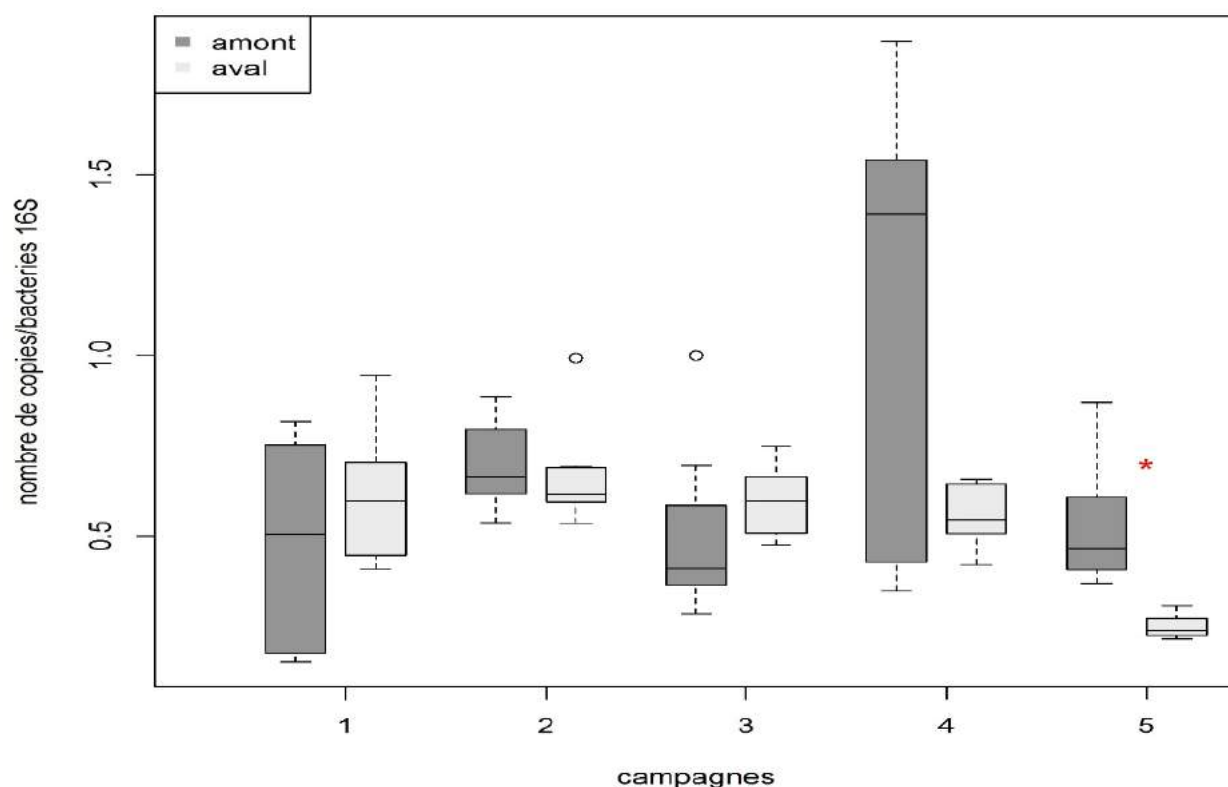


Figure 14 : Abondance relative des intégrons de classe 1 sur le nombre de bactéries 16S (nombre estimé à partir de la quantification des ARN 16S) dans les eaux prélevées en réseau hospitalier. Les boîtes représentent la médiane, les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles, le minimum, le maximum et l'astérisque rouge représente une différence significative entre l'amont et l'aval.

La concentration en intégrons de classe 1 diminue significativement dans l'eau entre l'amont et l'aval pour trois prélèvements sur cinq (2, 4 et 5), cette diminution semble due à la diminution du nombre total de bactéries (Figure 27). En effet l'abondance relative des intégrons dans les bactéries ne change pas, excepté en ce qui concerne le dernier prélèvement (Figure 28). Aucune dynamique spécifiquement liée au temps de séjour ne semble apparaître.

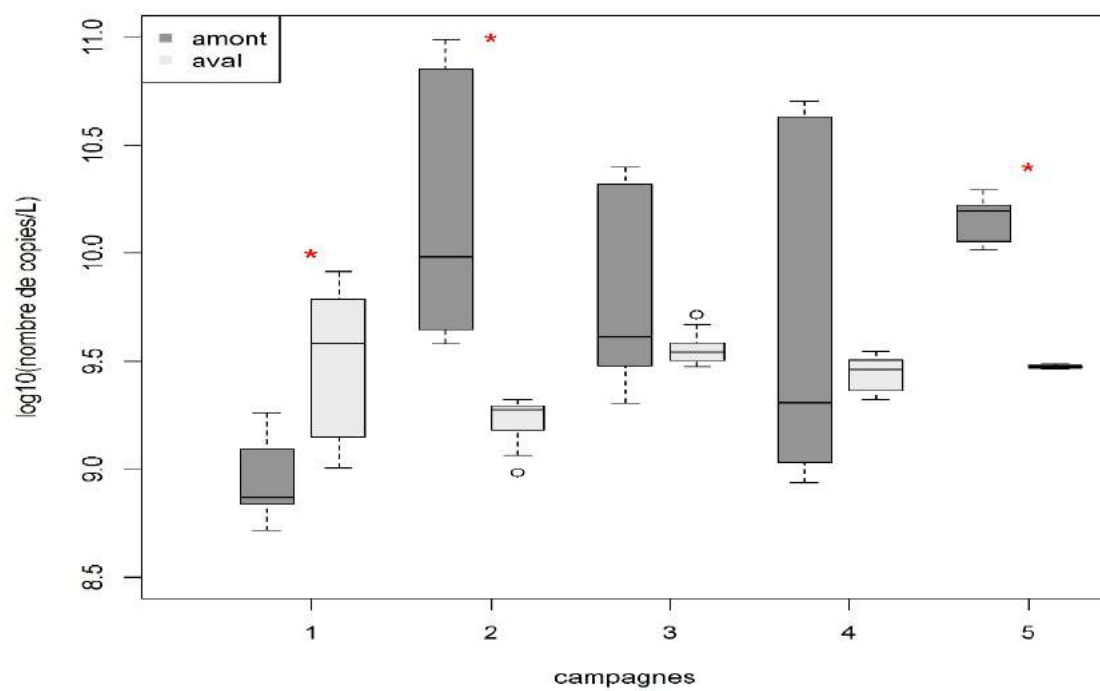


Figure 15 : Concentration en intégrons de classe 3 dans les eaux prélevées en réseau hospitalier. Les boîtes représentent la médiane, les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles, le minimum, le maximum et l'astérisque rouge représente une différence significative entre l'amont et l'aval.

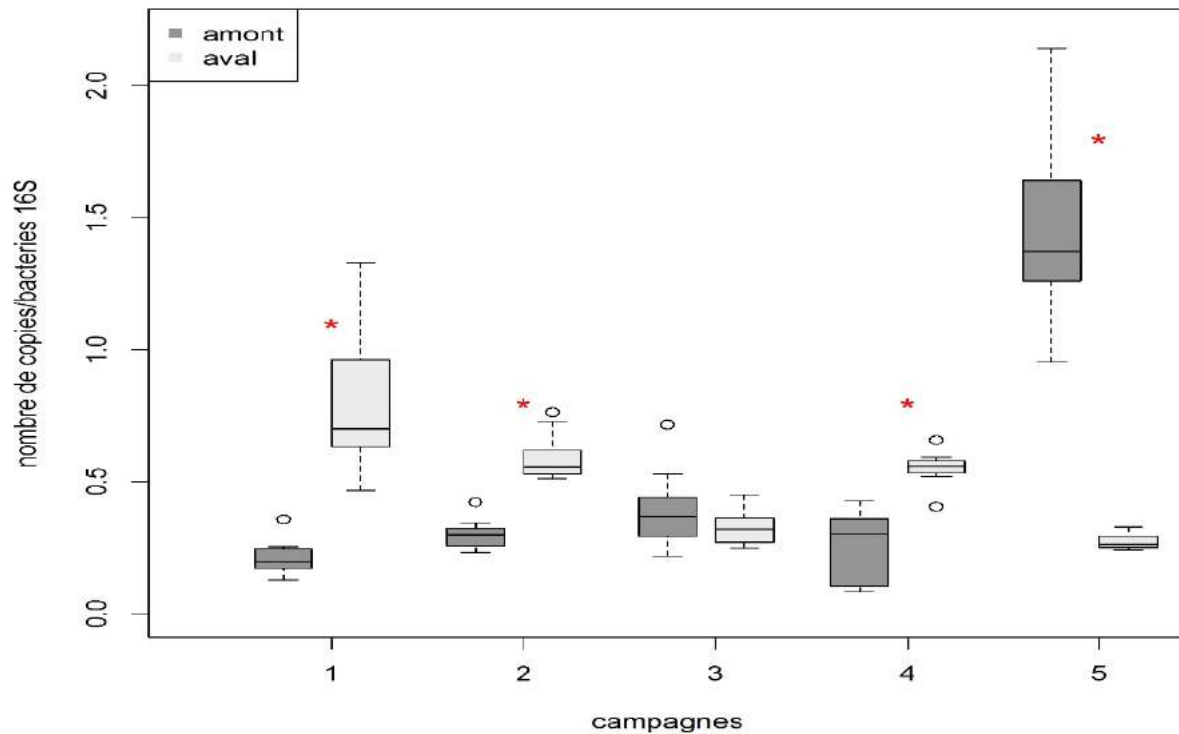
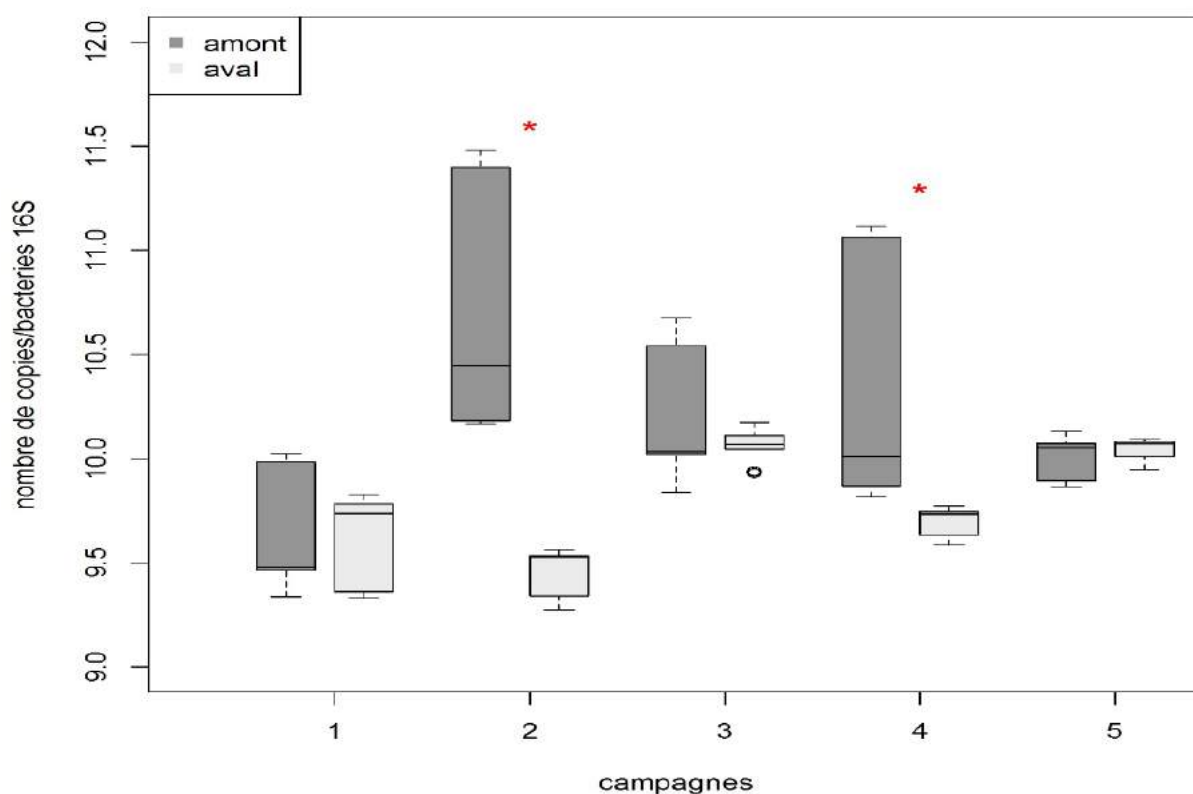


Figure 29 : Abondance relative des intégrons de classe 3 sur le nombre de bactéries 16S (nombre estimé à partir de la quantification des ARN 16S) dans les eaux prélevées en réseau hospitalier. Les boîtes représentent la médiane, les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles, le minimum, le maximum et l'astérisque rouge représente une différence significative entre l'amont et l'aval.

La concentration d'intégrons de classe 3 varie d'un prélèvement à l'autre, diminuant ou augmentant entre l'amont et l'aval (figure 29). Les diminutions sont explicables par une diminution globale du nombre de bactéries (Figure 30), excepté en ce qui concerne le prélèvement 1 et 5. Pour le premier prélèvement, la concentration en intégrons de classe 3 ainsi que leur abondance relative augmentent dans l'eau prélevée. Le dernier prélèvement fait apparaître la même dynamique que pour les intégrons de classe 1 c'est-à-dire que l'antibiorésistance potentielle des bactéries diminuerait (baisse de la concentration et de l'abondance relative).



**Figure 30 : Abondance bactérienne estimées à partir de la quantification des ARN 16S (bactéries 16S) dans les échantillons d'eau prélevés en réseau hospitalier. Les boîtes représentent la médiane, les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles, le minimum, le maximum et l'astérisque rouge représente une différence significative entre l'amont et l'aval.**

L'abondance bactérienne mesurée dans les échantillons d'eau prélevée en réseau hospitalier semble globalement diminuer ou rester stable.

#### 3.3.1.2. Analyse croisée des données

##### Analyse « statique » ou caractérisation des effluents :

Les corrélations entre les paramètres, obtenues grâce au modèle linéaire calculé via le logiciel R, sont les suivantes :

- La concentration d'intégrons de classe 3 montre une tendance positivement corrélée à la concentration de SMX impurity A (un métabolite du sulfaméthoxazole)  $R^2 = 0,34$ .
- L'abondance relative des intégrons de classe 3 montre une tendance positivement corrélée à la DCO ( $R^2 = 0,36$ ).

##### Analyse « dynamique » ou effet épurateur du réseau :

Les corrélations obtenues grâce au modèle linéaire calculé via le logiciel R sont les suivantes :

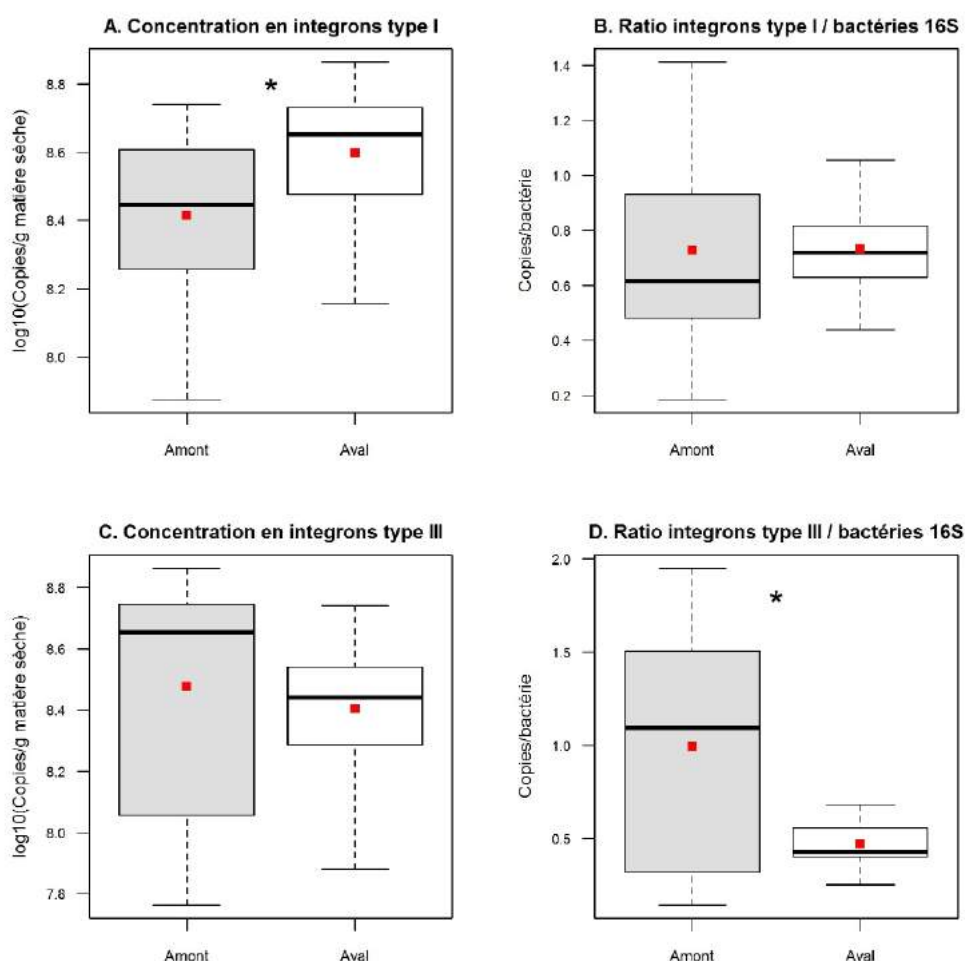
- La variation de concentration des intégrons de classe 1 montre une tendance négativement corrélée à la variation du kétoprofène ( $R^2 = 0,87$ ) et positivement corrélée à la variation du sodium 2-ethylsulfate (lorsque ce paramètre est abattu, la concentration d'intégrons de classe 1 diminue également dans le réseau)  $R^2 = 0,73$ .
- La variation de l'abondance relative des intégrons de classe 1 montre une tendance positivement corrélée à la variation de la concentration de ciprofloxacine ( $R^2 = 0,75$ ) et de diclofénac impurity E ( $R^2 = 0,92$ ), quand ces paramètres sont abattus entre l'amont et l'aval, l'abondance des Int1 l'est également.
- La variation de concentration des intégrons de classe 3 montre une tendance négativement corrélée à la variation du kétoprofène ( $R^2 = 0,79$ ), comme pour les intégrons de classe 1.
- La variation d'abondance relative des Int3 montre une tendance positivement corrélée à celle de la  $\text{DBO}_5$  ( $R^2 = 0,8$ ), de la concentration en  $\text{NH}_4^+$  ( $R^2 = 0,73$ ) et en propranolol ( $R^2 = 0,874$ ). Inversement, elle est corrélée négativement à la variation de concentration de l'ibuprofène ( $R^2 = 0,8$ ) et des SDBS C10 et C11 ( $R^2 = 0,7$ ).
- La variation de l'abondance bactérienne montre une tendance positivement corrélée aux variations de paracétamol ( $R^2 = 0,74$ ) et de carbamazépine ( $R^2 = 0,77$ ). Cela signifie que les abattements respectifs de ces paramètres entre amont et aval sont corrélés. Inversement, la diminution du COD entre l'amont et l'aval, est corrélée avec l'augmentation de l'abondance bactérienne ( $R^2 = 0,91$ ). Une interprétation possible serait le fait que les bactéries peuvent biodégrader le carbone organique dissous car il est directement consommable, ce qui est cohérent avec une balance positive de croissance des bactéries (plus de développement que de mort cellulaire).

#### 3.3.1.3. Bilan

Dans les échantillons d'eau prélevés en réseau hospitalier, il apparaît une tendance générale à la baisse de la concentration en intégrons, cependant l'abondance relative de ces derniers ne diminue pas systématiquement. **La baisse de nombre d'intégrons dans l'eau au cours du transport dans le réseau hospitalier indiquerait la diminution du nombre de bactérie porteuse de résistances. Cependant chacune des bactéries restantes conserverait individuellement un nombre constant d'intégrons, donc son potentiel de transfert de gènes de résistance.**

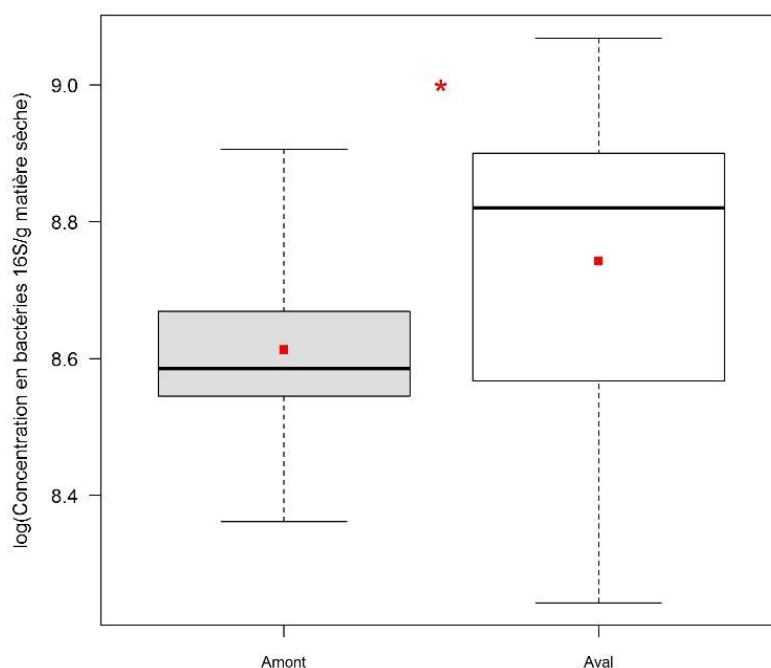
### 3.3.2. Quantification des intégrons dans le biofilm

Un seul prélèvement de biofilm a pu être réalisé à l'occasion de la semaine de terrain sur le site du Pôle Santé d'Arcachon tel que décrit au paragraphe 1\_2.



**Figure 31 : Résultats des analyses d'intégrons dans le biofilm prélevé en réseau hospitalier. Les boîtes représentent la médiane, les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles, le minimum, le maximum et l'astérisque rouge représente une différence significative entre l'amont et l'aval.**

La concentration en intégrons de classe 1 augmente dans le biofilm entre l'amont et l'aval, sans que cette différence ne se ressente dans l'abondance relative, ce qui est cohérent avec le fait que la concentration totale en bactérie est également plus importante à l'aval (Figure 31). De même, la concentration d'intégrons de classe 3 reste stable mais l'abondance relative de ceux-ci dans les bactéries diminue.



**Figure 16 : Résultats de la quantification des bactéries à partir du nombre de copies d'ARN 16S dans le biofilm prélevé en réseau hospitalier. Les boîtes représentent la médiane, les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles, le minimum, le maximum et l'astérisque rouge représente une différence significative entre l'amont et l'aval.**

Au bilan, **le nombre d'intégrons au sein du biofilm n'évolue pas de façon marquée, ne révélant pas d'évolution du résistome** entre l'amont et l'aval du réseau hospitalier pour ce prélèvement, même si l'abondance bactérienne augmente le fait que le support de développement du biofilm ne soit pas identique en amont et en aval induit un biais. Même si ces données sont rapportées au gramme de matière sèche de matrice prélevée, le biofilm n'a pas cru sur les mêmes surfaces ni dans les mêmes conditions d'oxygénation, la population bactérienne est donc potentiellement très différente.

La quantification des principes actifs de médicaments a pu être réalisée par l'ISA sur les échantillons de biofilm prélevés *in situ*. Les concentrations de médicament sont exprimées en nanogramme par gramme de biofilm prélevé.

**Tableau 10 : Concentration en médicaments mesurée dans les biofilms prélevés à l'amont et à l'aval de la conduite du Pôle de Santé d'Arcachon en juin 2017.**

| Données en ng/g  | Amont | Aval | Limite de détection (LD) | Limite de quantification (Lq) |
|------------------|-------|------|--------------------------|-------------------------------|
| Sulfamethoxazole | <Lq   | <Lq  | 0,2                      | 0,5                           |
| Propranolol      | 31,8  | 11,8 | 0,2                      | 1,6                           |
| Carbamazepine    | 1,7   | 1,3  | 0,2                      | 0,8                           |
| Ketoprofen       | <Lq   | <Lq  | 0,8                      | 3,1                           |
| Trimethoprim     | 2,0   | 1,7  | 0,3                      | 1,6                           |
| Ofloxacin        | 58,9  | 66,9 | 0,3                      | 1,6                           |
| Sulfadiazine     | <LD   | <LD  | 0,3                      | 1,6                           |
| Oxazepam         | 13,3  | 15,3 | 0,2                      | 1,6                           |
| Ciprofloxacin    | 396   | 942  | 50                       | 100                           |



Les concentrations mesurées sont faibles et peu différentes entre l'amont et l'aval, excepté en ce qui concerne la ciprofloxacine, dont la concentration augmente significativement. L'absence de tendance franche dans les évolutions des concentrations en résidus de médicaments ne permet pas de proposer d'interprétation à la hausse de l'abondance bactérienne dans le biofilm.

### 3.4. Conclusion sur l'écotoxicité et l'antibiorésistance

---

L'hypothèse avancée dans cette étude était la suivante : **le réseau d'assainissement fonctionne comme un réacteur susceptible de diminuer les effets biologiques des effluents du fait notamment du temps de transport et du contact avec du biofilm**. Cette hypothèse a été testée sur deux portions de réseaux aux caractéristiques très différentes grâce au suivi de deux paramètres biologiques : l'écotoxicité des effluents et l'antibiorésistance des bactéries présentes dans la colonne d'eau et dans le biofilm.

Le premier type de réseau étudié présente des caractéristiques de réseau d'assainissement urbain classique, il a été choisi afin de pouvoir étudier les modifications des effets biologiques dans une portion et cela a conditionné le choix d'une portion sans apport la plus longue possible. En pratique, le site choisi, malgré sa longueur peu commune (2,7 km), ne permettait un temps de séjour que de 45 minutes en moyenne. Le réseau hospitalier présentait les caractéristiques attendues : un réseau sans apports externes et un temps de séjour plus long (plusieurs heures).

En ce qui concerne le réseau urbain, les valeurs d'écotoxicité sont faibles et les différences entre l'amont et l'aval de la portion étudiée sont, elles aussi, faibles. Le temps de séjour réduit et l'éloignement de la source des polluants ont probablement influencé ces résultats. Toutefois, l'hypothèse d'un effet épurateur du réseau n'est pas remise en cause car les effets écotoxiques ont pu être abattus en amont du point étudié, c'est-à-dire que les phénomènes en cause (volatilisation de molécules très toxiques par exemple) pourraient être très rapides et intervenir à proximité du point d'émission.

L'étude du réseau hospitalier devait permettre de se situer à proximité plus directe de la source de polluants et d'avoir un temps de séjour plus long, permettant ainsi de faire apparaître des modifications plus marquées de l'effluent. Comme attendu, la toxicité des effluents hospitaliers est bien supérieure, mais les différences amont/aval sont faibles et ne suivent pas de schéma systématique, excepté concernant le bioessai d'immobilisation des daphnies pour lequel l'effluent sortant était toujours faiblement moins toxique que celui en entrée.

L'analyse « statique » des données, dans les réseaux urbain et hospitalier montre que l'écotoxicité des effluents envers les daphnies et les rotifères est assez bien corrélée avec la présence de certains principes actifs de médicaments (kétoprofène, ibuprofène, acide salicylique, paracétamol) et de certains surfactants. L'analyse « dynamique » permet de mettre en évidence des liens entre l'abattement de certaines molécules (en particulier des surfactants) et l'abattement de l'écotoxicité au cours du transport dans les réseaux.

***Il convient cependant de rester prudent quant à l'interprétation de ces corrélations. En effet, il est difficile de définir ce qui, au sein d'un mélange aussi complexe, peut causer l'écotoxicité globale d'un effluent, compte-tenu des différentes interactions possibles entre toutes les molécules en présence, (pouvant notamment conduire à des phénomènes de synergie ou d'antagonisme).***

→ Concernant l'antibiorésistance, les données dans le réseau urbain et dans le réseau hospitalier permettent de dégager les tendances suivantes :

**Tableau 11 : Synthèse des bilans.**

|                | Réseau urbain                                                                                                                                                                       | Réseau hospitalier                                                                                                                                                                        |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Eau</b>     | Pas de tendance                                                                                                                                                                     | <p><b>Diminution</b> de la quantité de bactérie et du nombre d'intégrons sans modification de l'abondance relative.</p> <p>Résistance moins marquée entre amont et aval</p>               |
| <b>Biofilm</b> | <p><b>Augmentation</b> de la quantité de bactérie et du nombre d'intégrons sans augmentation de l'abondance relative.</p> <p>Résistance un peu plus marquée entre amont et aval</p> | <p><b>Augmentation</b> de la quantité de bactérie et faible du nombre d'intégrons sans modification de l'abondance relative</p> <p>Pas de résistance plus marquée entre amont et aval</p> |

Il n'y a pas de faits probants indiquant une augmentation ou une diminution de l'antibiorésistance via un développement bactérien ou au sein des bactéries transportées dans les eaux transitant dans le réseau urbain. Ainsi, on ne peut considérer le réseau comme une source de risque supplémentaire, ni un premier traitement des effluents. Si la résistance semble moins marquée dans les bactéries transitant dans les eaux hospitalières entre l'amont et l'aval, l'abondance relative reste constante.

Un résultat est commun aux deux sites : l'abondance bactérienne augmente dans le biofilm entre l'amont et l'aval du réseau. Ce résultat est intéressant car il pourrait témoigner d'un effet réacteur qui tend à favoriser le développement des bactéries fixées dans le biofilm au fil du réseau. De plus, la diminution de l'abondance bactérienne dans les eaux observée dans le réseau hospitalier irait dans le sens d'une fixation des bactéries présentes dans la colonne d'eau au fur et à mesure du parcours dans le réseau, mais là encore, la prudence s'impose dans l'interprétation du fait de la différence d'échelle de prélèvement (temps court pour des eaux et temps long pour l'installation d'un biofilm). Il serait intéressant de connaître la composition des communautés bactériennes afin de confirmer ou d'infirmer ce lien et ces échanges entre la colonne d'eau et le biofilm.

L'analyse « statique » des données, ou caractérisation des effluents, semble indiquer que dans le réseau urbain, plus la concentration des surfactants est importante, moins la quantité d'intégrons est fortes. La causalité n'est cependant, là non plus, pas démontrée.

L'analyse « dynamique », ou effet épurateur des deux types de réseau, a permis de montrer un lien entre l'abatement de certaines molécules et la diminution des intégrons et de l'abondance bactérienne.

## 4. Perturbateurs endocriniens et génotoxicité

---

La perturbation endocrinienne (PE) est un terme qui englobe toutes les actions induisant une perturbation d'une part ou de tout le système endocrinien particulièrement complexe chez les mammifères. Ainsi les perturbations par des composés exogènes peuvent se produire dans la production, le transport des hormones, leur intégration dans les cellules et interactions avec leurs récepteurs, la transcription des récepteurs voire la métabolisation des hormones.

Ainsi, il est impossible de vérifier tous les effets potentiels d'un polluant ou d'un mélange. Les bioessais généralement employés évaluent les perturbations de la production d'hormones mais surtout les interactions avec les récepteurs ce qui constitue une part significative des effets PE.

### 4.1. Matériels et méthodes

---

Le sous-échantillonnage est réalisé dans 4 bouteilles en verre ambré de 1 L nettoyées et autoclavées, avec bouchon en téflon. Les échantillons sont conservés à + 4°C et envoyés dans les 24 heures au laboratoire par transporteur.

#### 4.1.1. Préparation des échantillons

Dès leur réception, les échantillons d'eaux usées sont immédiatement filtrés sur filtres en fibre de verre de porosité 2,7 µm puis 1 µm (Whatman). 250 mL d'eau sont filtrés sur des filtres préalablement et postérieurement séchés à 105°C pendant 2 heures, pour mesurer les matières en suspension (MES) et 500 mL d'eaux sont filtrés et les filtres sont conservés à -20°C pour extraction par système ASE (extraction par solvant accélérée). L'ensemble des eaux filtrées est conservé à 4°C jusqu'au lendemain.

Une extraction sur phase solide (SPE) est réalisée le lendemain sur cartouches 500 mg Oasis HLB (Waters, France) préalablement conditionnées par 10 mL de méthanol (MeOH) puis 10 mL d'eau ultrapure. Cinq cents mL d'échantillons d'eaux usées sont percolés sur les cartouches par aspiration douce. Les cartouches sont ensuite séchées sous-vides pendant 30 min puis éluées par 2 fois 5 mL de MeOH.

Les extraits sont évaporés à 25 °C, sous un flux d'azote puis le résidu sec est repris dans le solvant adéquat (Méthanol ou DMSO).

#### 4.1.2. Modèle cellulaire pour l'évaluation des effets perturbateurs de la transcription des récepteurs aux hormones

Deux modèles cellulaires génétiquement modifiés, MELN (Balaguer *et al.*, 1999) et AIZ-AR (Bartonkova *et al.*, 2015), ont été utilisés pour mesurer les perturbations de la transcription des **récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes** au contact des extraits. Ces cellules ont été transfectées avec le gène de la luciférase, placé sous le contrôle d'un élément de réponse

respectivement aux récepteurs des œstrogènes ou des androgènes. Ceci permet d'évaluer l'induction et la perturbation de transcription du principal récepteur aux hormones œstrogéniques ou du récepteur aux hormones androgéniques. L'effet agoniste est mesuré par une émission de luciférase mesurée par luminescence. L'effet antagoniste des extraits est mesuré par l'ajout simultané de l'hormone de référence (17  $\beta$  œstradiol ou dihydrotestostérone) à une concentration correspondante à l'EC<sub>50</sub> afin de mesurer une éventuelle diminution de la réponse cellulaire.

Les cellules MELN ont étéensemencés dans des plaques 96 puits blanches à une densité de  $2 \times 10^4$  cellules/puits avec un milieu DMEM sans rouge de phénol, supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) déprivé et 1 % d'antibiotiques et cultivé 4 heures avant utilisation. Les cellules MELN sont ensuite incubées pendant 16 h en présence et en absence des extraits dissous dans du DMSO et dilués au 1/1 000<sup>e</sup> dans le milieu de culture.

Les cellules AIZ-AR ont étéensemencées dans des plaques 96 puits blanches à une densité de  $2 \times 10^4$  cellules/puits avec un milieu RPMI sans rouge de phénol, supplémenté par 10 % de SVF déprivé, 1 % de glutamine, 1 % d'antibiotiques et cultivées 24 heures avant utilisation. Les cellules sont ensuite incubées 24 h en présence et en absence des extraits dissous dans du DMSO et dilués au 1/1 000<sup>e</sup> dans le milieu de culture. L'effet antagoniste sur le modèle AIZ-AR est mesuré en équivalent de flutamide.

#### **4.1.3. Test de cytotoxicité au bleu alamar sur les cellules de mammifères**

Après la durée d'incubation des cellules des lignées déjà décrites avec l'extrait, le milieu est changé pour un milieu similaire supplémenté avec 0,1 % de bleu alamar à la concentration de 1  $\mu$ M. Une lecture de la fluorescence à la longueur d'onde de 590 nm après une excitation à 530 nm est réalisée à t<sub>0</sub> puis après 2 heures d'incubation.

#### **4.1.4. Évaluation *in vitro* des perturbateurs de la transcription des récepteurs aux hormones**

Après incubation, les cellules sont lavées avec du PBS et l'activité luciférase est mesurée après lyse des cellules en utilisant un kit de dosage du gène rapporteur de la luciférase (Roche Applied Science, Meylan, France) en accord avec le protocole du fabricant. La bioluminescence est mesurée dans les plaques de culture à l'aide d'un Centro LB 960 microplate luminometer (Berthold, Thoiry, France) et les résultats sont exprimée en unité de luminescence relative (RLU). Chaque essai est réalisé en 4 replicats. En parallèle, une courbe dose-réponse de l'hormone naturelle principale est mesurée pour quantifier l'activité en ng/L équivalent en 17  $\beta$  œstradiol (E2) pour le modèle MELN et équivalent en dihydrotestostérone (DHT) pour le modèle AIZ-AR.

#### **4.1.5. Étude de la génotoxicité : SOS Chromotest**

L'essai consiste à mesurer l'activation du système de réponse SOS sur la bactérie *Escherichia coli* en réponse à une agression par un produit ou un mélange génotoxiques. La réponse est obtenue par des dosages colorimétriques d'activités enzymatiques après incubation de la souche bactérienne PQ37 avec les extraits. Le dosage de la phosphatase alcaline permet de mesurer l'effet toxique de l'extrait sur les cellules. Le dosage de la  $\beta$ -galactosidase exprime l'activation du système SOS. Les résultats sont exprimés en facteur d'induction. Une substance est considérée

comme génotoxique lorsque son facteur d'induction est supérieur à 1,5 (Quillardet et Hofnung 1985).

La souche de *E. coli* PQ37 est cultivée en milieu LB supplémenté avec 20 µg/mL d'ampicilline et incubée à 37°C sous agitation toute la nuit. Le lendemain, la souche est diluée à 2 % puis réincubée jusqu'à l'obtention d'une densité mesurée par absorbance avec une DO<sub>600 nm</sub> de 0,4, signifiant une phase exponentielle de croissance. Cette dernière culture est diluée au 1/10<sup>e</sup>, soit en milieu LB, soit avec un mélange d'activateurs métaboliques (S9mix). Une fraction bactérienne (145 µL) est distribuée dans des tubes Eppendorf contenant 5 µL d'extrait et incubée 2 h à 37°C puis, les activités β-galactosidase et phosphatase alcaline sont réalisées en 3 réplicats. En parallèle, un étalonnage est réalisé avec un génotoxique direct connu, le 4NQO.

#### 4.1.6. Analyses statistiques

Deux types d'analyses ont été menés sur les données biologiques et chimiques (voir liste en annexe I), leurs caractéristiques sont synthétisées dans le tableau 12.

**Tableau 12 : Description des tests statistiques réalisés.**

|                     |                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                    |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Objectif            | Mettre en relation les résultats des essais biologiques et les analyses chimiques ciblées.                                                                                                              | Analyser l'effet « temps de séjour » en conduite                                                                                                   |
| Données considérées | <b>Valeurs de chaque paramètre</b> (biologique, chimique, physicochimique) pour chaque campagne (amont et aval confondus)                                                                               | <b>Valeurs des variations calculées entre l'amont et l'aval</b> pour chaque paramètre (biologique, chimique, physicochimique) pour chaque campagne |
| Type de corrélation | Régression linéaire : calculée grâce à la fonction lm (linear model) sous R (logiciel statistique)<br>Les corrélations présentées sont celles pour lesquelles le modèle linéaire s'applique aux données |                                                                                                                                                    |

#### **Relation entre les résultats des essais biologiques et des analyses chimiques ciblées :**

Les résultats des analyses des échantillons prélevés dans la galerie de Chouilly d'une part (13 campagnes donc 26 échantillons) et celles sur la galerie du pôle santé d'Arcachon d'autre part (5 campagnes donc 10 échantillons), ont été analysés séparément.

Nous avons procédé à cette tentative d'analyse de corrélations tout en ayant conscience des limites très importantes de ce genre d'exercice dans une telle situation. Parmi ces limites figurent :

- Les extraits ont été réalisés différemment selon les laboratoires chacun avec sa méthode. Même si en théorie le résultat devrait être proche, rien ne permet de l'affirmer.
- Il peut exister des relations entre les effets biologiques et le mélange complet de polluants, une partie des polluants agissant en synergie ou antagonisme ou une molécule.
- Les analyses ne mettent pas en évidence toutes les molécules présentes et notamment les plus polaires.

- Enfin, une corrélation peut simplement signifier que l'une des molécules serait non pas responsable des effets, mais présente systématiquement dans les échantillons contenant un mélange ou une autre molécule induisant ces effets. Ce serait alors une sorte « d'indicateur » ce qui en soi serait un signal intéressant.

Il existe donc énormément de limites à cet exercice et les résultats doivent être considérés avec une extrême prudence.

#### **Analyse de l'effet « temps de séjour » en conduite :**

Afin d'estimer l'évolution des effets biologiques mesurés et des concentrations en contaminants ciblés entre l'amont et l'aval des réseaux étudiés, le pourcentage de variation entre l'amont et l'aval a été calculé pour chaque paramètre comme suit :

$$\text{Variation} = 1 - \frac{\text{Valeur aval}}{\text{Valeur amont}} \times 100$$

## **4.2. Résultats**

---

### **4.2.1. Résultats pour le réseau urbain (galerie de Chouilly)**

#### *4.2.1.1. Toxicité cellulaire*

Aucun effet toxique significatif n'a été détecté sur les lignées cellulaires et sur la souche bactérienne *E. coli* PQ 37 pour l'ensemble des échantillons aux concentrations testées.

#### *4.2.1.2. Effets perturbateurs de la transcription des récepteurs aux hormones*

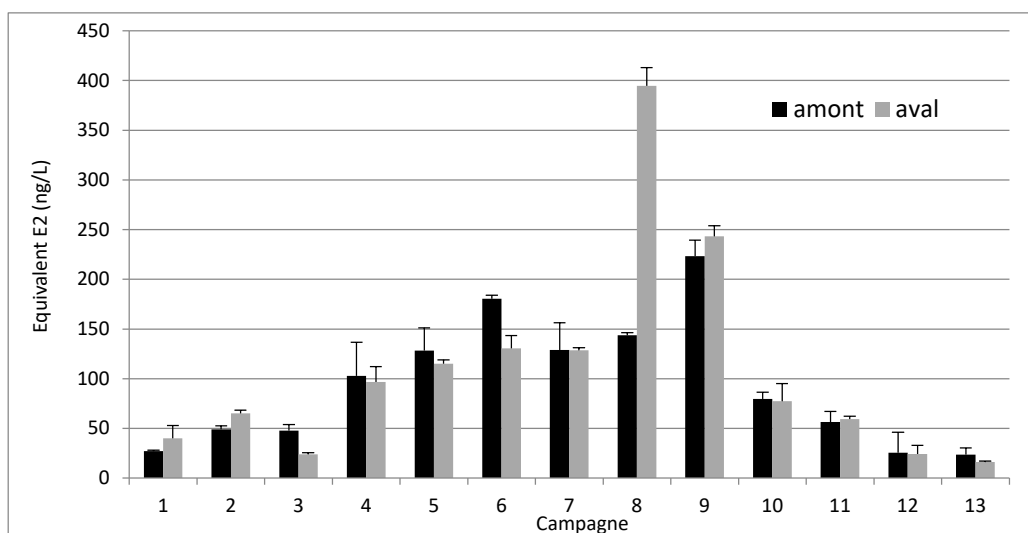
#### **4.2.1.2-A PERTURBATION DE LA TRANSCRIPTION DES RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES**

##### **4.2.1.2-A-1 MESURES REALISEES SUR LA PHASE DISSOUTE**

---

##### **a- EFFET AGONISTE**

Les résultats obtenus montrent une activité œstrogénomimétique variant, selon les campagnes, de 16 à 394 ng/L eq E2 (Figure 33). Il n'apparaît pas de différence significative d'évolution des concentrations entre les deux sites de prélèvement de la galerie de Chouilly (Test de Student apparié p=0,47).



**Figure 33: Effets œstrogénomimétique des extraits de la phase dissoute issues des échantillons prélevés en amont et en aval du tronçon de Chouilly. Les résultats sont exprimés en ng/L équivalent 17- $\beta$ -œstradiol (E2).**

#### b- EFFET ANTAGONISTE

Aucun effet antagoniste n'a été constaté sur les extraits aux concentrations testées.

#### c- RELATION ENTRE LES RESULTATS DES ESSAIS BIOLOGIQUES ET DES ANALYSES CHIMIQUES CIBLEES

Avec toute la prudence liée à ce genre d'évaluation, l'analyse statistique a révélé plusieurs corrélations (tableau 13 et figure 34), toutefois avec de faibles taux de régression et quelques valeurs de probabilité (p value) inférieures au niveau 5 %. Ce sont donc plutôt des tendances et, encore une fois, nous devons signifier que cela peut être un signal indicateur d'une pollution et non une relation directe avec la molécule concernée.

Il apparait une relation faible entre l'activité œstrogénomimétique et l'activité androgénomimétique.

**Tableau 13 : Liste des molécules présentant une corrélation avec les réponses œstrogénomimétique exprimées en équivalent 17- $\beta$ -œstradiol (E2), issues des échantillons prélevés dans le tronçon de Chouilly sans distinction amont et aval (graphique en annexe II).**

| Paramètre physicochimique   | $r^2$  | p      | Pente |
|-----------------------------|--------|--------|-------|
| Activité androgénomimétique | 0,5314 | 0,0001 | +     |
| Dodecyl sulfate de sodium   | 0,3808 | 0,0064 | -     |
| BDTAC                       | 0,6389 | 0,0001 | +     |
| Cetyl betaine               | 0,4137 | 0,0040 | +     |

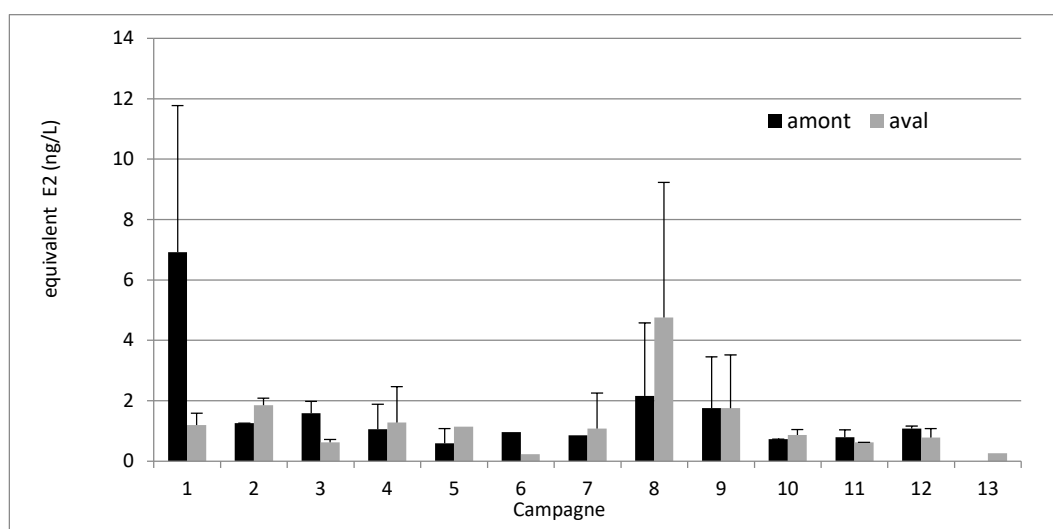
#### d-ANALYSE DE L'EFFET « TEMPS DE SEJOUR » EN CONDUITE

L'analyse statistique ne met pas en évidence de corrélations entre l'évolution des différents paramètres physicochimiques et l'évolution des taux d'activité œstrogénomimétique.

#### 4.2.1.2-A-2 MESURES REALISEES SUR LA PHASE PARTICULAIRE

##### a-EFFET AGONISTE

Les résultats obtenus montrent une activité œstrogénomimétique de faible intensité variant de la limite de quantification jusqu'à 6,9 ng/L Eq E2 (figure 34). L'analyse ne fait pas apparaître de tendance cohérente entre les deux points de la galerie de Chouilly (Test de Student apparié,  $p=0,61$ ).



**Figure 34 : Effets œstrogénomimétique des extraits des matières en suspension issues des échantillons prélevés en amont et en aval du tronçon de Chouilly. Les résultats sont exprimés en ng/L équivalent 17- $\beta$ -œstradiol (E2).**

##### b-EFFET ANTAGONISTE

Aucun effet antagoniste n'a été constaté sur les extraits des différents échantillons testés.

#### c-RELATION ENTRE LES RESULTATS DES ESSAIS BIOLOGIQUES ET DES ANALYSES CHIMIQUES CIBLEES

L'analyse statistique ne met pas en évidence de relations significatives.

#### d-ANALYSE DE L'EFFET « TEMPS DE SEJOUR » EN CONDUITE

Aucune relation significative n'est détectée.

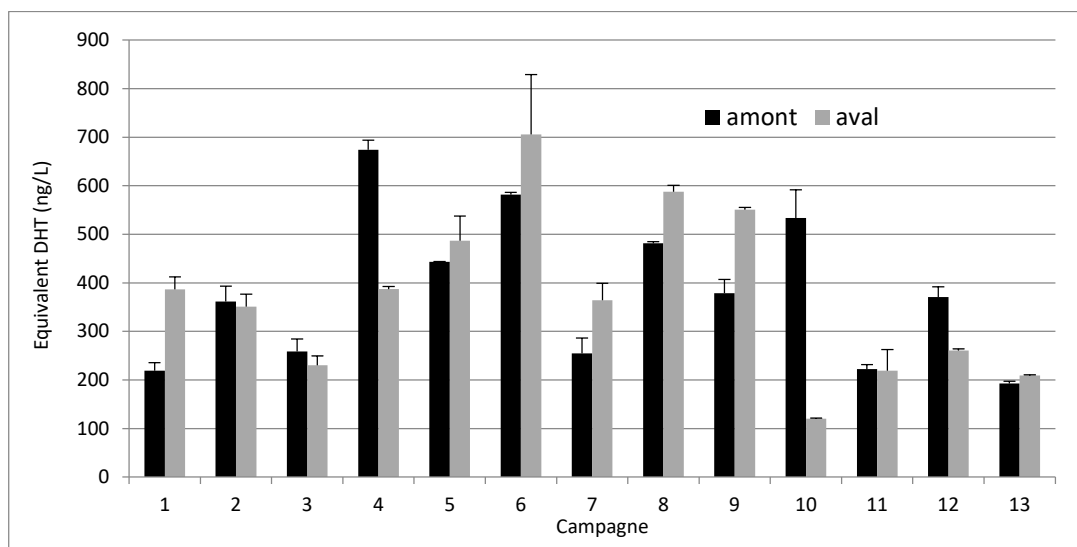


#### 4.2.1.2-B PERTURBATION DE LA TRANSCRIPTION DES RECEPTEURS AUX ANDROGENES

##### 4.2.1.2-B-1 MESURES REALISEES SUR LA CONTAMINATION DISSOUTE

###### a-EFFET AGONISTE

Tous les échantillons ont présenté une activité agoniste de 192 à 706 ng/L eq DHT (Figure 35). L'analyse ne révèle pas de tendance cohérente entre les deux points de la galerie de Chouilly (Test de Student apparié  $p=0,86$ ).



**Figure 35: Effets androgénomimétiques des extraits de la phase dissoute issues des échantillons prélevés en amont et en aval du tronçon de Chouilly. Les résultats sont exprimés en ng/L équivalent dihydrotestostérone (DHT).**

###### b-EFFET ANTAGONISTE

Aucun effet antagoniste n'a été constaté sur les extraits des différents échantillons testés.

###### c-RELATION ENTRE LES RESULTATS DES ESSAIS BIOLOGIQUES ET DES ANALYSES CHIMIQUES CIBLEES

L'analyse statistique a été réalisée en utilisant les résultats des effets androgénomimétiques et les différents paramètres physicochimiques (Tableau 14).

**Tableau 14 : Liste des molécules présentant une corrélation avec les réponses androgénomimétiques exprimées en équivalent dihydrotestostérone (DHT), issues des échantillons prélevés dans le tronçon de Chouilly sans distinction amont et aval (graphique en annexe III).**

| Paramètre physicochimique            | $r^2$  | p      | Pente |
|--------------------------------------|--------|--------|-------|
| Activité œstrogénomimétique          | 0,3498 | 0,0015 | +     |
| Toluène                              | 0,2803 | 0,0054 | -     |
| Acide salicylique                    | 0,1758 | 0,0330 | -     |
| decylbenzenesulphonate C10 de sodium | 0,3502 | 0,0097 | -     |
| decylbenzenesulphonate C11 de sodium | 0,3704 | 0,0074 | -     |
| decylbenzenesulphonate C12 de sodium | 0,3327 | 0,0122 | -     |
| DCF impurity E                       | 0,1725 | 0,0349 | -     |

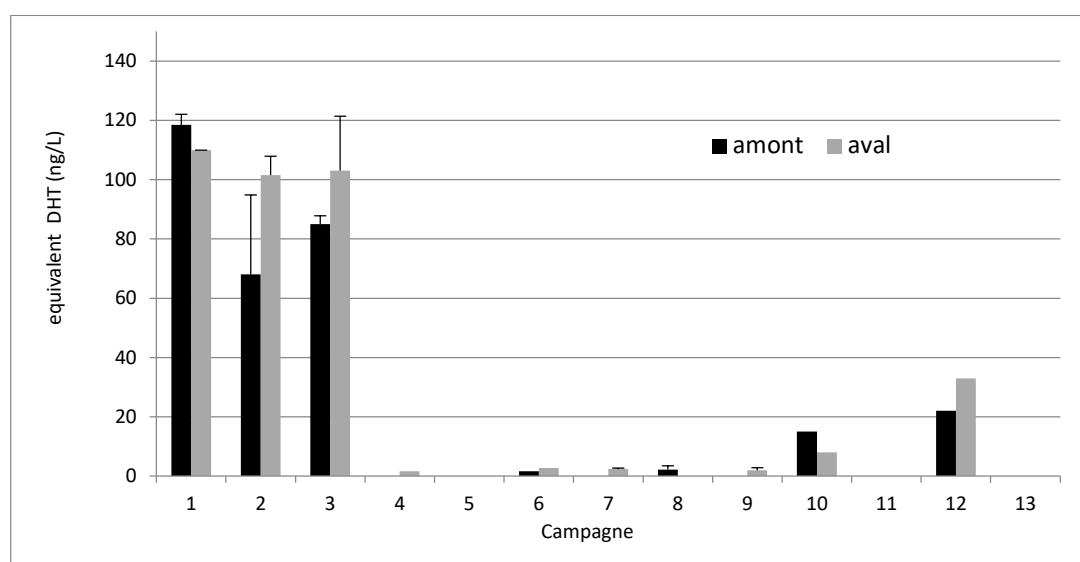
#### d-ANALYSE DE L'EFFET « TEMPS DE SEJOUR » EN CONDUITE

L'analyse statistique ne met pas en évidence de corrélations entre l'évolution des différents paramètres physicochimiques et l'évolution des taux d'activité androgénomimétiques.

#### 4.2.1.2-B-2 MESURES REALISEES SUR LES MATIERES EN SUSPENSION

##### a- EFFET AGONISTE

Les trois premières campagnes (prélevées le même jour) présentent des résultats élevés (Figure 36). Pour les autres campagnes, les effets sont nettement plus faibles, avec des valeurs inférieures à la limite de quantification pour quelques échantillons. L'ensemble des analyses ne fait pas apparaître de tendance cohérente entre les deux points de la galerie de Chouilly (Test de Student apparié  $p=0,28$ ).



**Figure 36 : Effets androgénomimétiques des extraits des matières en suspension issues des échantillons prélevés en amont et en aval du tronçon de Chouilly. Les résultats sont exprimés en ng/L équivalent dihydrotestostérone (DHT).**

## b-EFFET ANTAGONISTE

Aucun effet antagoniste n'a été constaté sur les extraits des différents échantillons.

## c-RELATION ENTRE LES RESULTATS DES ESSAIS BIOLOGIQUES ET DES ANALYSES CHIMIQUES CIBLEES

L'analyse statistique ne révèle aucune relation significative avec les molécules analysées dans la phase particulière.

## d-ANALYSE DE L'EFFET « TEMPS DE SEJOUR » EN CONDUITE

L'analyse statistique ne met pas en évidence de relations significatives.

### 4.2.1.3. Génotoxicité

Le tableau 15 présente les résultats des essais de génotoxicité des échantillons du réseau de Chouilly. En absence d'activateur métabolique, quelques échantillons présentent une génotoxicité à un équivalent d'eau concentrée d'un facteur 33 ou 67. Cette génotoxicité est faible, avec des facteurs d'inductions compris entre 1,54 et 1,60. Pour chaque campagne, aucun lien ne peut être établi entre les 2 points du réseau analysé. L'ajout d'activateur métabolique (S9) modifie parfois la réponse observée sans S9.

**Tableau 15 : Mesure de la génotoxicité sur SOS chromotest réalisé en amont et en aval du tronçon de la galerie de Chouilly, avec et sans activateur métabolique (S9). Le tableau présente la 1<sup>ère</sup> concentration considérée comme génotoxique (facteur d'induction supérieur à 1,5). Ø sans réponse génotoxique.**

| Campagne | Prélèvement | 1 <sup>ère</sup> réponse génotoxique |     |
|----------|-------------|--------------------------------------|-----|
|          |             | -S9                                  | +S9 |
| 1        | amont       | Ø                                    | Ø   |
|          | aval        | Ø                                    | Ø   |
| 2        | amont       | 33X                                  | Ø   |
|          | aval        | Ø                                    | Ø   |
| 3        | amont       | Ø                                    | Ø   |
|          | aval        | 33X                                  | Ø   |
| 4        | amont       | Ø                                    | Ø   |
|          | aval        | Ø                                    | Ø   |
| 5        | amont       | Ø                                    | Ø   |
|          | aval        | Ø                                    | Ø   |
| 6        | amont       | Ø                                    | Ø   |
|          | aval        | Ø                                    | Ø   |
| 7        | amont       | Ø                                    | Ø   |
|          | aval        | Ø                                    | Ø   |
| 8        | amont       | Ø                                    | Ø   |
|          | aval        | Ø                                    | 67X |
| 9        | amont       | 67X                                  | 33X |
|          | aval        | Ø                                    | 67X |
| 10       | amont       | Ø                                    | Ø   |
|          | aval        | Ø                                    | Ø   |
| 11       | amont       | Ø                                    | Ø   |
|          | aval        | Ø                                    | Ø   |
| 12       | amont       | Ø                                    | Ø   |
|          | aval        | Ø                                    | Ø   |
| 13       | amont       | Ø                                    | Ø   |
|          | aval        | Ø                                    | Ø   |

## 4.2.2. Résultats pour le réseau hospitalier (Pôle santé d'Arcachon)

### 4.2.2.1. Viabilité cellulaire

Un effet toxique significatif est observé sur les cellules permettant d'observer la transcription des récepteurs aux androgènes (figures 9 et 10). En diluant l'extrait, les potentiels effets androgéniques sont alors trop faibles pour être détectés. Cette toxicité masque alors les potentiels effets perturbateurs androgéniques.

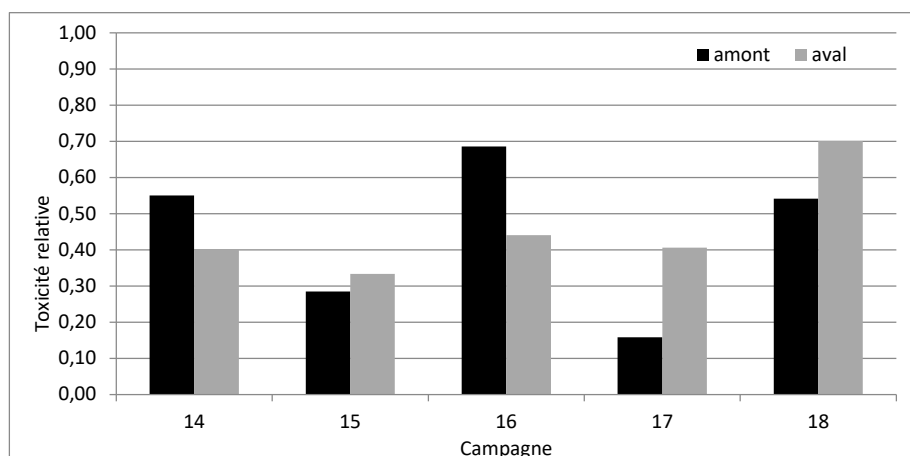


Figure 37 : Toxicité relative aux extraits de phase dissoute des échantillons prélevés en amont et en aval du tronçon de réseau hospitalier vis-à-vis des cellules permettant d'observer la transcription des récepteurs aux androgènes (à la concentration 1X équivalent eau)

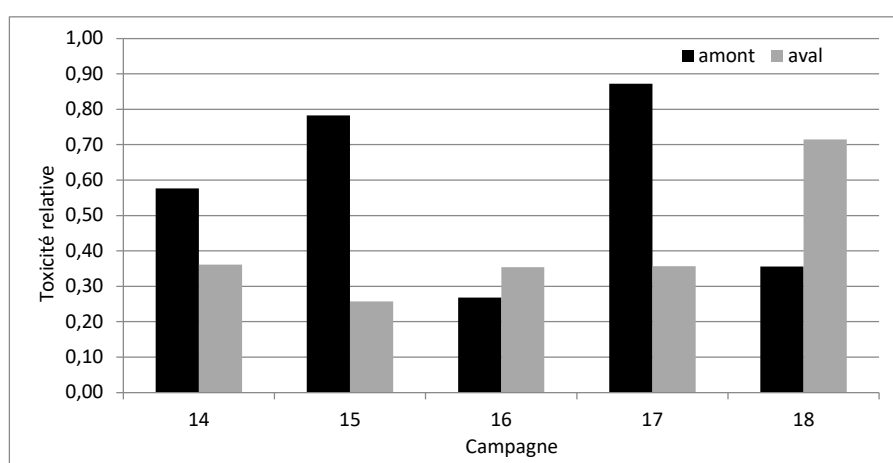


Figure 38 : Toxicité relative aux extraits des matières en suspension des échantillons prélevés en amont et en aval du tronçon de réseau hospitalier vis-à-vis des cellules permettant d'observer la transcription des récepteurs aux androgènes.

De manière contradictoire, aucun effet toxique significatif n'a été détecté sur les lignées cellulaires permettant d'observer la transcription des récepteurs aux œstrogènes et sur la souche bactérienne.

#### 4.2.2.2. Effets perturbateurs endocriniens

##### 4.2.2.2.1. PERTURBATION DE LA TRANSCRIPTION DES RECEPTEURS AUX ŒSTROGENES

###### 4.2.2.2.1-A MESURES REALISEES SUR LA CONTAMINATION DISSOUTE

###### a-EFFET AGONISTE

Tous les échantillons présentent une activité œstrogénomimétique variant, selon les campagnes, de 45 à 225 ng/L eq E2 (Figure 39). Néanmoins, aucune tendance cohérente entre les deux points du pôle santé Arcachon ne se dessine (Test de Student apparié  $p=0,90$ ).

Les résultats obtenus sont comparables avec ceux obtenus précédemment en réseau urbain.

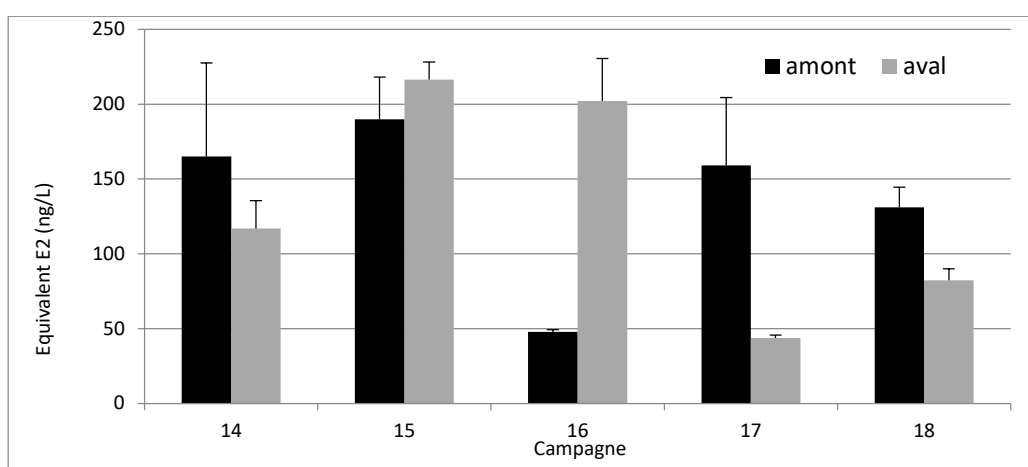


Figure 39: Effets œstrogénomimétique des extraits de la phase dissoute issues des échantillons prélevés en amont et en aval du pôle santé d’Arcachon. Les résultats sont exprimés en ng/L équivalent 17- $\beta$ -œstradiol (E2).

###### b-EFFET ANTAGONISTE

Aucun effet antagoniste n’a été constaté sur les extraits.

###### c-RELATION ENTRE LES RESULTATS DES ESSAIS BIOLOGIQUES ET DES ANALYSES CHIMIQUES CIBLEES

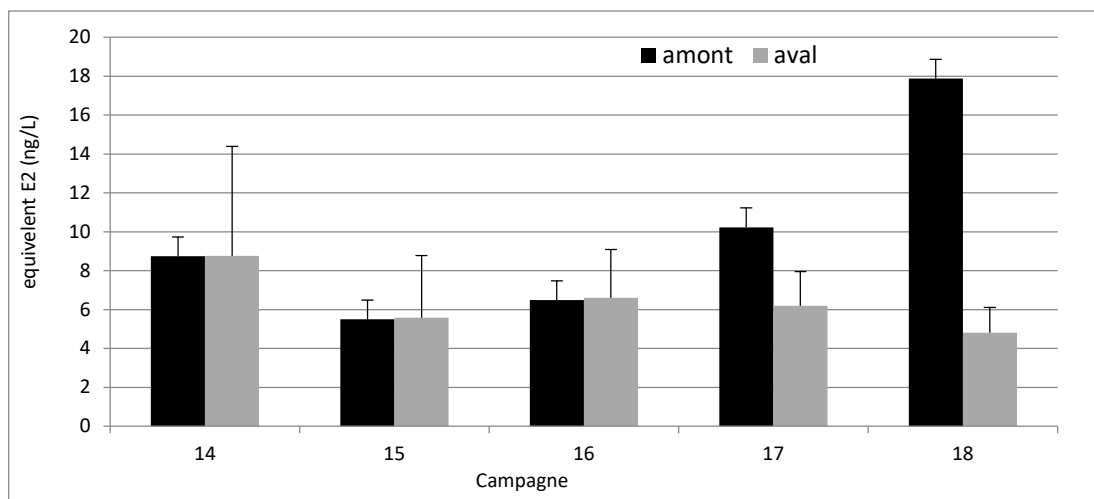
L’analyse statistique ne met pas en évidence de relations significatives avec des molécules cibles.

###### d-ANALYSE DE L’EFFET « TEMPS DE SEJOUR » EN CONDUITE

L’analyse statistique ne met pas en évidence de corrélations entre l’évolution des différents paramètres physicochimiques et l’évolution des taux d’activité œstrogénomimétique.

##### a-EFFET AGONISTE

Les échantillons présentent une activité œstrogénomimétique de faible intensité variant de 3 à 24 ng/L Eq E2 (Figure 40). L'analyse ne fait pas apparaître de tendance cohérente entre les deux points du pôle santé Arcachon (Test de Student apparié  $p = 0,26$ ).



**Figure 40: Effets œstrogénomimétique des extraits des matières en suspension issues des échantillons prélevés en amont et en aval du pôle santé d'Arcachon. Les résultats sont exprimés en ng/L équivalent 17- $\beta$ -œstradiol (E2).**

##### b-EFFET ANTAGONISTE

Aucun effet antagoniste n'a été constaté sur les extraits des différents échantillons.

##### c-RELATION ENTRE LES RESULTATS DES ESSAIS BIOLOGIQUES ET DES ANALYSES CHIMIQUES CIBLEES

L'analyse statistique ne met pas en évidence de molécules potentiellement responsables des effets perturbateurs endocriniens.

##### d-ANALYSE DE L'EFFET « TEMPS DE SEJOUR » EN CONDUITE

L'analyse statistique ne met pas en évidence de corrélations entre l'évolution des différents paramètres physicochimiques et l'évolution des taux d'activité œstrogénomimétique.

#### 4.2.2.2.2 PERTURBATION DE LA TRANSCRIPTION DES RECEPTEURS AUX ANDROGENES

##### 4.2.2.2.2-A MESURES REALISEES SUR LA CONTAMINATION DISSOUTE

La toxicité des échantillons sur les cellules AIZ-AR masque les effets possiblement androgéniques. L'abaissement des concentrations testées, dans le but de neutraliser la toxicité, rend indétectables les possibles effets agonistes et antagoniste.

##### 4.2.2.2.2-B MESURES REALISEES SUR LES MATIERES EN SUSPENSION

Tout comme pour l'étude de la contamination dissoute, la toxicité des échantillons sur les cellules AIZ-AR masque les effets possiblement androgéniques. L'abaissement des concentrations testées, dans le but de neutraliser la toxicité, rend indétectables les possibles effets androgénomimétiques.

#### 4.2.2.3. Génotoxicité

Le tableau VII rassemble les résultats de génotoxicité. L'absence d'activateur métabolique révèle seulement pour le point amont de la campagne 15 à une génotoxicité, à un équivalent d'eau concentrée d'un facteur 67.

L'ajout de S9, supprime la génotoxicité de ce point et ne modifie pas les profils génotoxiques des autres campagnes.

Ainsi, aucune différence entre les points de prélèvement du pôle santé Arcachon n'est observable.

**Tableau 16 : Mesure de la génotoxicité sur SOS chromotest réalisée en amont et en aval du pôle santé d'Arcachon, avec et sans activateur métabolique (S9). Le tableau présente la 1<sup>ère</sup> concentration considérée comme génotoxique (facteur d'induction supérieur à 1,5). Ø sans réponse génotoxique.**

| Campagne | Prélèvement | 1 <sup>ère</sup> réponse<br>génotoxique |     |
|----------|-------------|-----------------------------------------|-----|
|          |             | -S9                                     | +S9 |
| 14       | amont       | Ø                                       | Ø   |
|          | aval        | Ø                                       | Ø   |
| 15       | amont       | 67X                                     | Ø   |
|          | aval        | Ø                                       | Ø   |
| 16       | amont       | Ø                                       | Ø   |
|          | aval        | Ø                                       | Ø   |
| 17       | amont       | Ø                                       | Ø   |
|          | aval        | Ø                                       | Ø   |
| 18       | amont       | Ø                                       | Ø   |
|          | aval        | Ø                                       | Ø   |

### 4.3. Conclusion sur les effets « perturbateurs endocriniens » et la « génotoxicité »

Les objectifs de cette étude étaient de mesurer l'évolution de deux effets biologiques d'eaux usées (perturbateurs endocriniens et génotoxicité) au sein de réseaux afin d'identifier l'hétérogénéité et le devenir des effets en fonction des zones de distribution du réseau et du temps de séjour.

Pour répondre à cette problématique, deux réseaux d'assainissement, sans apport d'eaux usées ou pluviales ont été choisis. D'une part, un réseau urbain, la galerie de Chouilly, qui malgré une longueur importante (2,7 km), n'observe qu'un temps de séjour de 45 min. D'autre part, en collaboration avec le projet REMPAP, le réseau du pôle santé Arcachon permettait d'obtenir un temps de trajet de l'effluent dans le réseau de plusieurs heures et était ainsi susceptible de rendre perceptibles les éventuelles modifications de l'effluent.

La synthèse des résultats obtenus pour les deux effets biologiques mesurés est présentée dans le tableau 17 ci-dessous.

**Tableau 17 : Synthèse des différents paramètres analysés. L : phase liquide, P : phase particulaire et V : variation amont/aval. Effets biologiques : Vert : non significatif ; Jaune : moyen ; Rouge : très significatif - NM = non mesurable pour cause de toxicité. NS= variation amont/aval non significative –**

| Lieux               | Activité œstrogénomimétique |       |    | Activité anti- œstrogénique |      |    | Activité androgénomimétique |       |    | Activité anti- androgénique |      |    | Génotoxicité |    |
|---------------------|-----------------------------|-------|----|-----------------------------|------|----|-----------------------------|-------|----|-----------------------------|------|----|--------------|----|
|                     | L                           | P     | V  | L                           | P    | V  | L                           | P     | V  | L                           | P    | V  | L            | V  |
| Galerie de Chouilly | Rouge                       | Jaune | NS | Vert                        | Vert | NS | Rouge                       | Jaune | NS | Vert                        | Vert | NS | Vert         | NS |
| Pôle santé Arcachon | Rouge                       | Jaune | NS | Vert                        | Vert | NS | NM                          | NM    | NM | NM                          | NM   | NM | Vert         | NS |

La question principale de cette étude était de connaître l'évolution des effets toxiques des effluents en fonction du temps de séjour. Dans les conditions testées, il apparaît que l'évolution n'est pas significative pour les temps de séjour existants sur nos sites d'expérimentation.

Nous constatons des effets œstrogénomimétiques importants dans les extraits de la phase dissoute et de la phase particulaire pour les deux réseaux. Ces effets sont plus faibles à partir des matières en suspension.

Aucun effet anti-œstrogénique n'est constaté.

Au niveau du pôle santé Arcachon, et avec toutes les réserves présentées sur ces recherches de corrélations, aucun paramètre physicochimique testé ne semble se lier à l'effet œstrogénomimétique. Au sein de la galerie de Chouilly, certaines molécules semblent avoir un lien avec les effets œstrogéniques. Attention, toutefois, aucun lien direct ne peut être établi entre ces molécules et les effets œstrogéniques, néanmoins, ces molécules peuvent éventuellement jouer le rôle d'indicateur de la présence de composé œstrogénomimétique non dosé dans l'étude.



Nous constatons des effets androgénomimétiques dans les extraits de la phase dissoute et de la phase particulaire de la galerie de Chouilly. Ils sont plus importants avec la phase dissoute, la phase particulaire se situant en limite de quantification.

Aucun effet anti-androgénique n'est constaté.

Quelques molécules semblent en lien avec les effets androgénomimétiques différentes selon la phase dissoute ou particulaire.

Pour le pôle santé Arcachon, la toxicité des échantillons sur les cellules du modèle androgénomimétique masque les effets possiblement androgéniques. L'abaissement des concentrations testées, dans le but de neutraliser la toxicité, rend indétectables les possibles effets agonistes et antagoniste.

Concernant la génotoxicité, les eaux ne présentent généralement pas d'effet mesurable et quelques échantillons ont donné une réponse mais avec un niveau de concentration important de 33 fois.

## 5. Conclusions générales et perspectives

---

### 5.1. Conclusions générales

---

L'analyse globale des résultats obtenus avec les 4 familles d'essais biologiques mises en œuvre (écotoxicité, antibiorésistance, perturbateurs endocriniens et génotoxicité) et appliquées sur les deux sites (réseau urbain et réseau hospitalier) permet de tirer les conclusions suivantes (non hiérarchisées) :

- **Les résultats confirment la complémentarité des différents bioessais de la batterie définie** : ce ne sont pas toujours les mêmes bioessais qui sont les plus sensibles aux effluents testés. Ceci consolide les observations déjà effectuées sur le site pilote SIPIBEL.
- Dans les limites des conditions expérimentales sélectionnées et des tests menés, il apparaît que **l'évolution des effluents au cours de leur transport dans les réseaux étudiés est faible**, même dans le cas du réseau hospitalier choisi de manière à maximaliser les possibilités de variation (réseau plus long, concentrations plus fortes). Dans les cas où cette évolution est significative, son orientation est souvent variable, notamment en fonction de l'effet biologique mesuré. À titre d'exemple, dans le cas du suivi de l'écotoxicité de l'effluent hospitalier, le seul schéma répétable sur les 5 prélèvements effectués est une faible diminution de l'écotoxicité des effluents sur *Daphnia magna* au cours du transport dans le réseau.
- **Même si les résultats ne sont pas foncièrement discriminants, la recherche des intégrons reste une approche simple d'évaluation de la dissémination de l'antibiorésistance, les biofilms restant un réservoir bactérien susceptible d'être le siège de transfert de gènes.** En fonction des résultats globaux, une approche metagénomique associant les caractérisations du résistome et du microbiote permettrait d'affiner les résultats sur les évolutions du réseau/réacteur.
- **Concernant les effets perturbateurs de la transcription des récepteurs aux estrogènes et aux androgènes, il apparaît un effet estrogénomimétique significatif et quelques effets androgénomimétiques plus faibles et non systématiques**, le tout essentiellement dans la phase liquide. Aucun effet estrogéno ou androgéno antagonistes ont été constatés dans ces effluents.
- **L'identification des principales molécules responsables des effets sur les organismes initiée dans cette étude reste un travail complexe.** Le travail de corrélation effectué, avec toutes les précautions prises pour ce type d'étude, a néanmoins permis d'envisager des premiers « candidats » (en particulier certains détergents et principes actifs de médicaments), dont **l'implication reste à consolider par des études mécanistiques poussées.**

### 5.2. Perspectives générales

---

Les perspectives générales proposées à l'issue de cette étude sont les suivantes (non hiérarchisées) :

- Améliorer encore la batterie de bio-essais élaborée en poursuivant la réflexion sur les bio-essais les plus performants dans le contexte concerné (optimisation technico-économique de l'outil de suivi élaboré).

- Mettre en œuvre une étude pilote, avec la meilleure maîtrise possible des conditions d'expérimentation, en vue de mieux caractériser l'évolution des paramètres biologiques au cours du transport des effluents dans les réseaux (travail à effectuer en lien avec les travaux du livrable N°2).
- Utiliser la batterie de bio-essais sélectionnée pour le suivi d'autres situations nécessitant un monitoring biologique avancé.
- Poursuivre le travail d'identification des molécules responsables des effets.

## 6. Références bibliographiques

---

Amos G., Gozzard E., Carter C.E., Mead A., Bowes M.J., Hawkey P.M., Zhang L., Singer A.C., Gaze W.H., Wellington E.M.H. (2015) Validated predictive modelling of the environmental resistome. *The ISME Journal*, 9, 1467–1476.

Balaguer P, François F, Comunale F, Fenet H, Boussieux AM, Pons M, Nicolas JC, Casellas C (1999) Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Science of the Total Environment*, 233(1-3), 47-56.

Barraud O., Baclet M.C., Denis F., Ploy M.C. (2010) Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65 (8), 1642-1645.

Bartonkova I, Novotna A, Dvorak Z. (2015), Novel stably transfected human reporter cell line AIZ-AR as a tool for an assessment of human androgen receptor transcriptional activity, *PLoS ONE* 10(3): e0121316. doi:10.1371/journal.pone.0121316.

ECB, 2003. Technical Guidance Document (TGD) in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. European Chemical Bureau, Ispra (Italy), 2003, 1044 p.

Gillings M.R., Gaze W.H., Pruden A., Smalla K., Tiedje J.M., Zhu Y.G. (2015) Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal*, 9(6), 1269–1279.

Jugan M.L., Oziol L., Bimbot M., Huteau V., Tamisier-Karolak S., Blondeau J.P., Lévi Y. (2009) In vitro assessment of thyroid and estrogenic endocrine disruptors in wastewater treatment plants, rivers and drinking water supplies in the greater Paris area (France). *Science of the Total Environment*, 407 (11), 3579–3587.

Quillardet et Hofnung 1985 : The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat Res.* 1985 Jun;147(3):65-78.

Stalder T. (2012) Implication des effluents d'activités hospitalières et de la filière carnée sur la dissémination de l'antibiorésistance : Dynamique des intégrons de l'émission au rejet, thèse soutenue en 2012 à l'Université de Limoges.

### Annexes « écotoxicité » et « antibiorésistance »

---

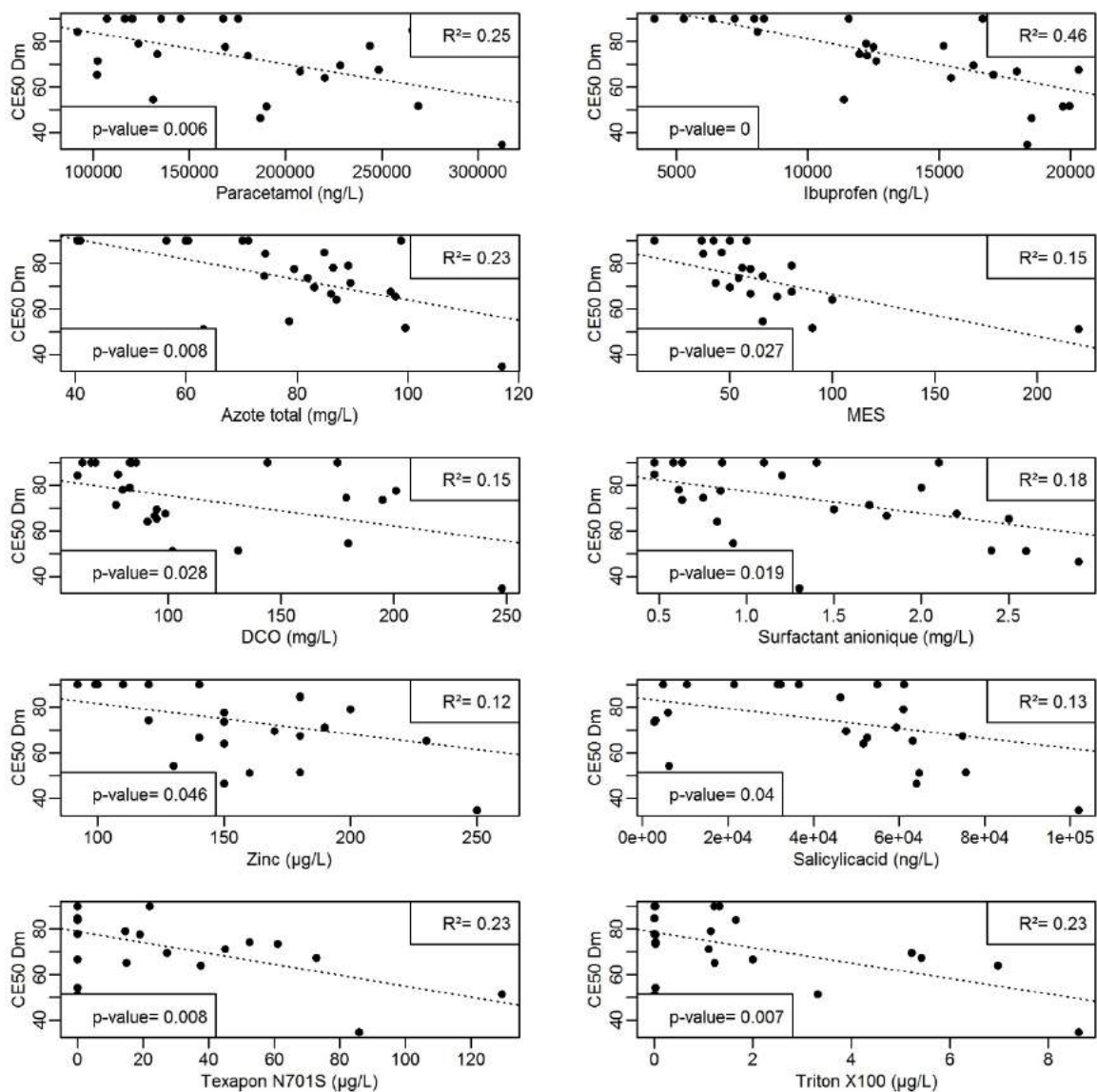
#### Liste des paramètres testés dans l'analyse statistique

|                                      |                                       |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| Paracetamol                          | Nonylphénoldiethoxylate NP2OE         |
| Sulfamethoxazole                     | AOX                                   |
| Propranolol                          | Zinc                                  |
| Diclofenac                           | Copper                                |
| Ibuprofen                            | Lead                                  |
| Carbamazepine                        | Chrome                                |
| Atenolold                            | Nickel                                |
| Ketoprofen                           | Texapon N701S                         |
| Salicylic acid                       | Stepanquat GA 90                      |
| SMX impurityA                        | Sodium dodecyl sulfate                |
| SMX glucuronide                      | Incromine SD                          |
| DCF 4HO                              | Comperlan 100                         |
| DCF 5HO                              | Benzyltrimethylammoniumchloride BDDAC |
| DCF impurity E                       | Cetyltrimethylammonium                |
| BOD5                                 | Sodium 2 ethylhexylsulfate            |
| COD                                  | Triton X100                           |
| NH <sub>4</sub>                      | Sodium decylbenzene sulphonate C10    |
| PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>        | Sodium decylbenzene sulphonate C11    |
| TKN ammonia organic N                | Sodium decylbenzene sulphonate C12    |
| Total phosphorous                    | Sodium decylbenzene sulphonate C13    |
| Residual COD                         | Conductivity                          |
| Mineral TSS (Total Suspended Solids) | DOC (Dissolved Organic Carbon)        |
| NO <sup>2</sup>                      | Organic TSS (TotalSuspendedSolids)    |
| NO <sup>3</sup>                      | pH                                    |
| Soluble COD (Chemical Oxygen Demand) | Sulphates                             |
| BDTAC                                | TOC (TotalOrganicCarbon)              |
| Chloroform                           | TSS (TotalSuspendedSolids)            |
| Toluene                              | Tetrachloroethylene                   |
| Anionic surfactant                   | 1,2,3 trimethylbenzene                |
| Non ionic surfactant                 | 1,2,4 trimethylbenzene                |
| 4,tert octylphenol                   | Sulphides                             |
| Nonylphenolmonoethoxylate NP1OE      |                                       |

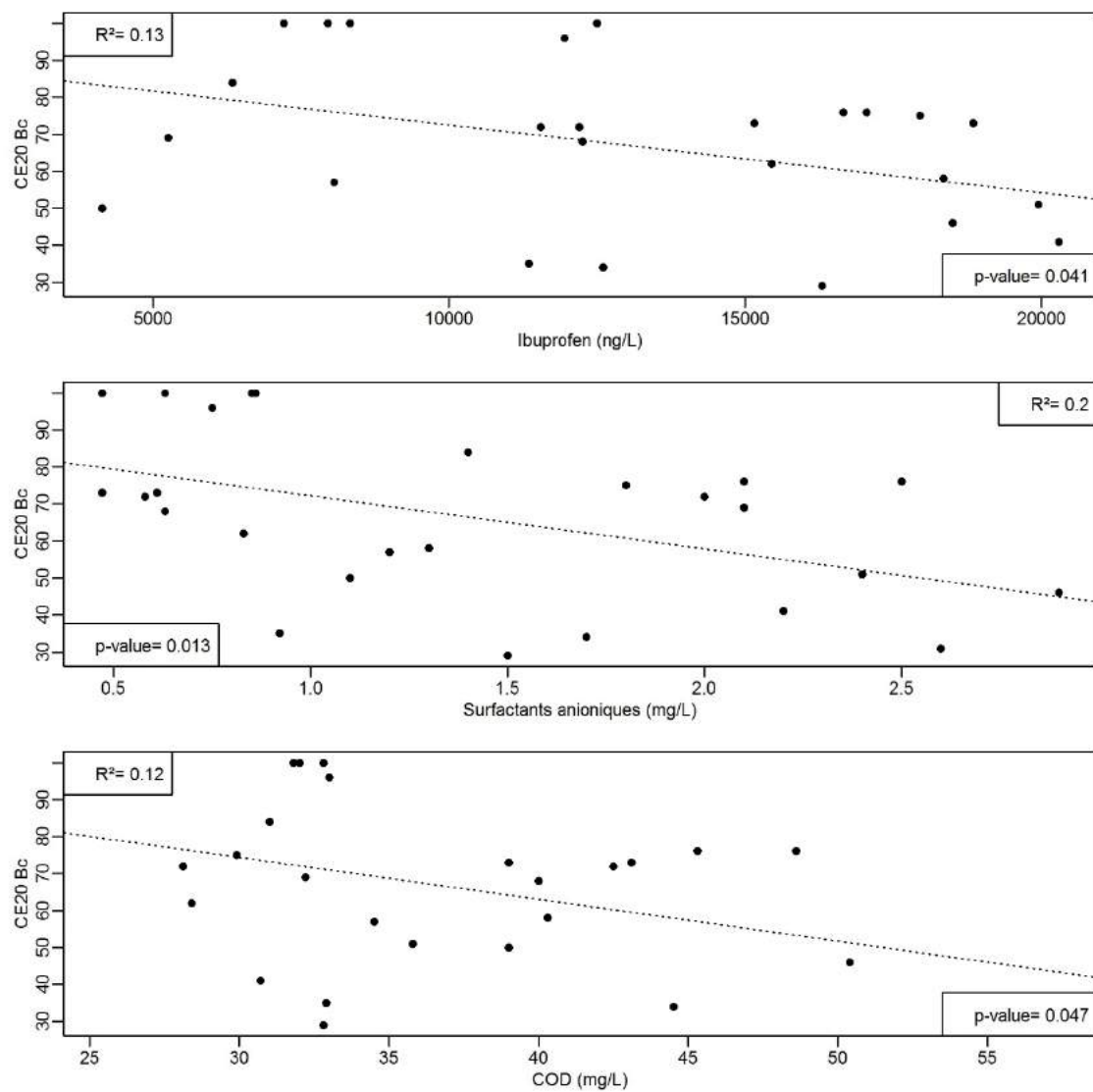
## Annexe « écotoxicité »

### Réseau urbain

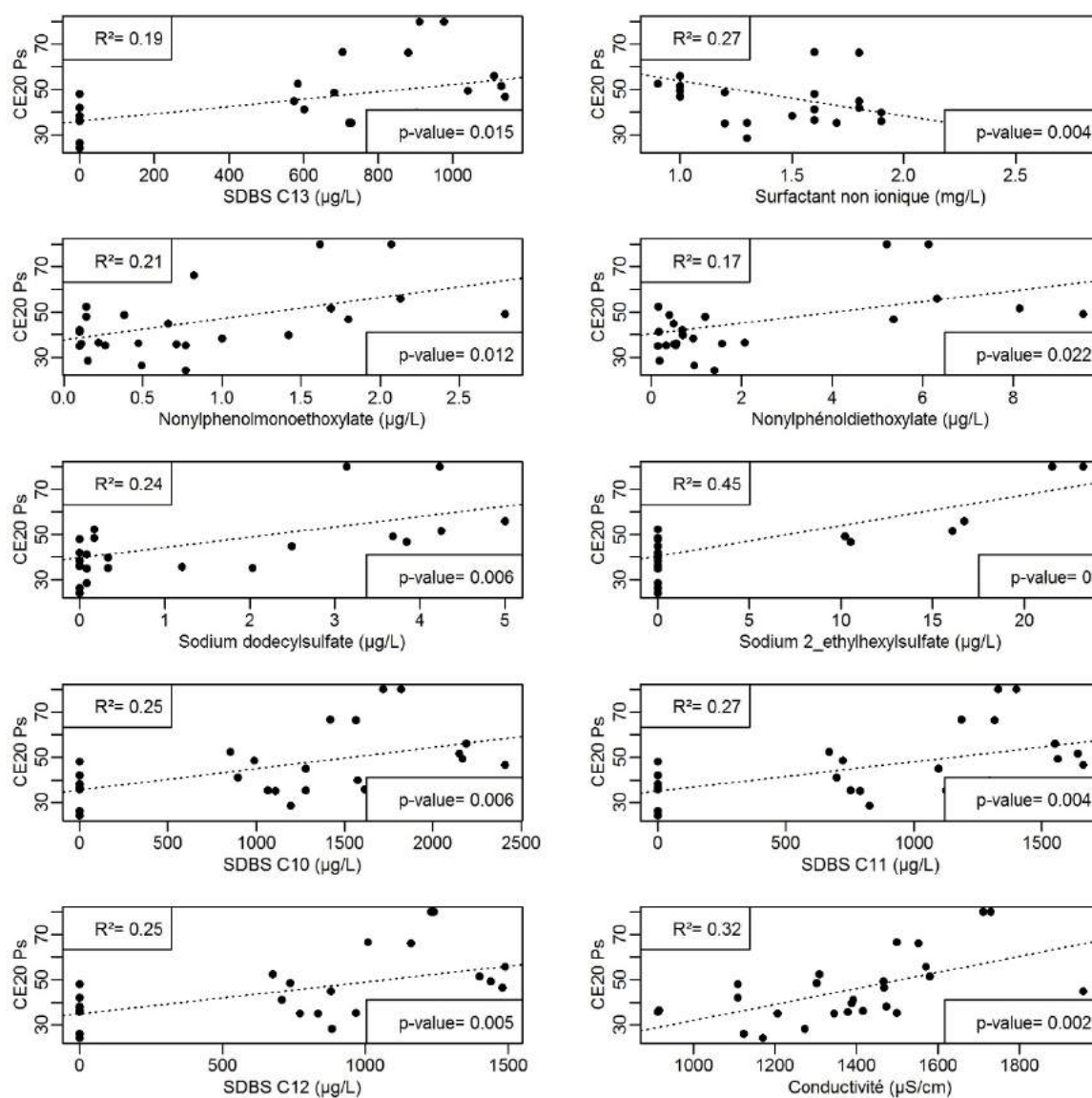
#### Analyse statique



Valeurs des  $CE_{50}$  du bioessai de mobilité des daphnies en fonction des concentrations de différents paramètres, pour tous les échantillons urbains.



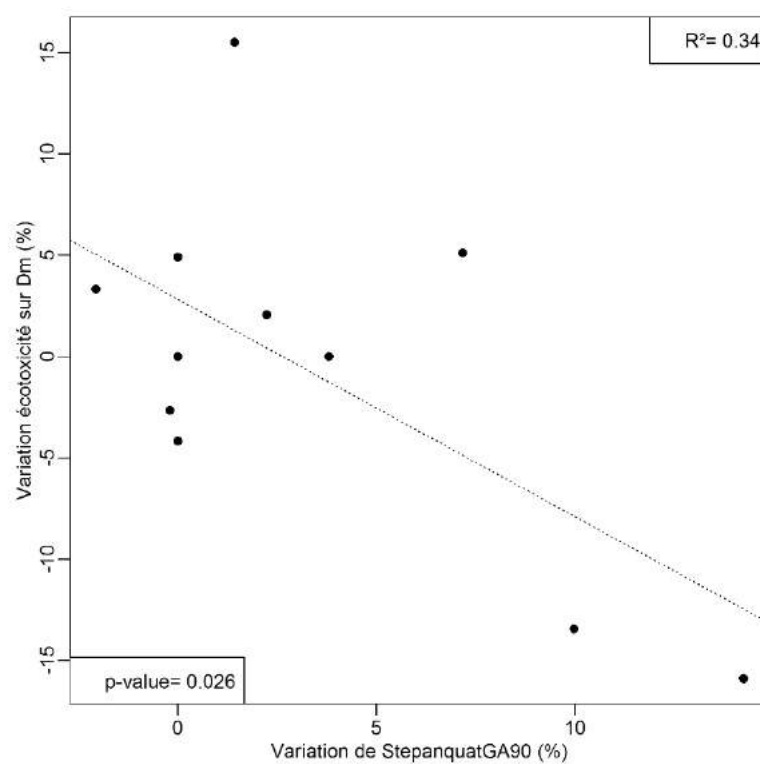
Valeurs des CE<sub>20</sub> du bioessai de reproduction des rotifères en fonction des concentrations de différents paramètres, pour tous les échantillons urbains.



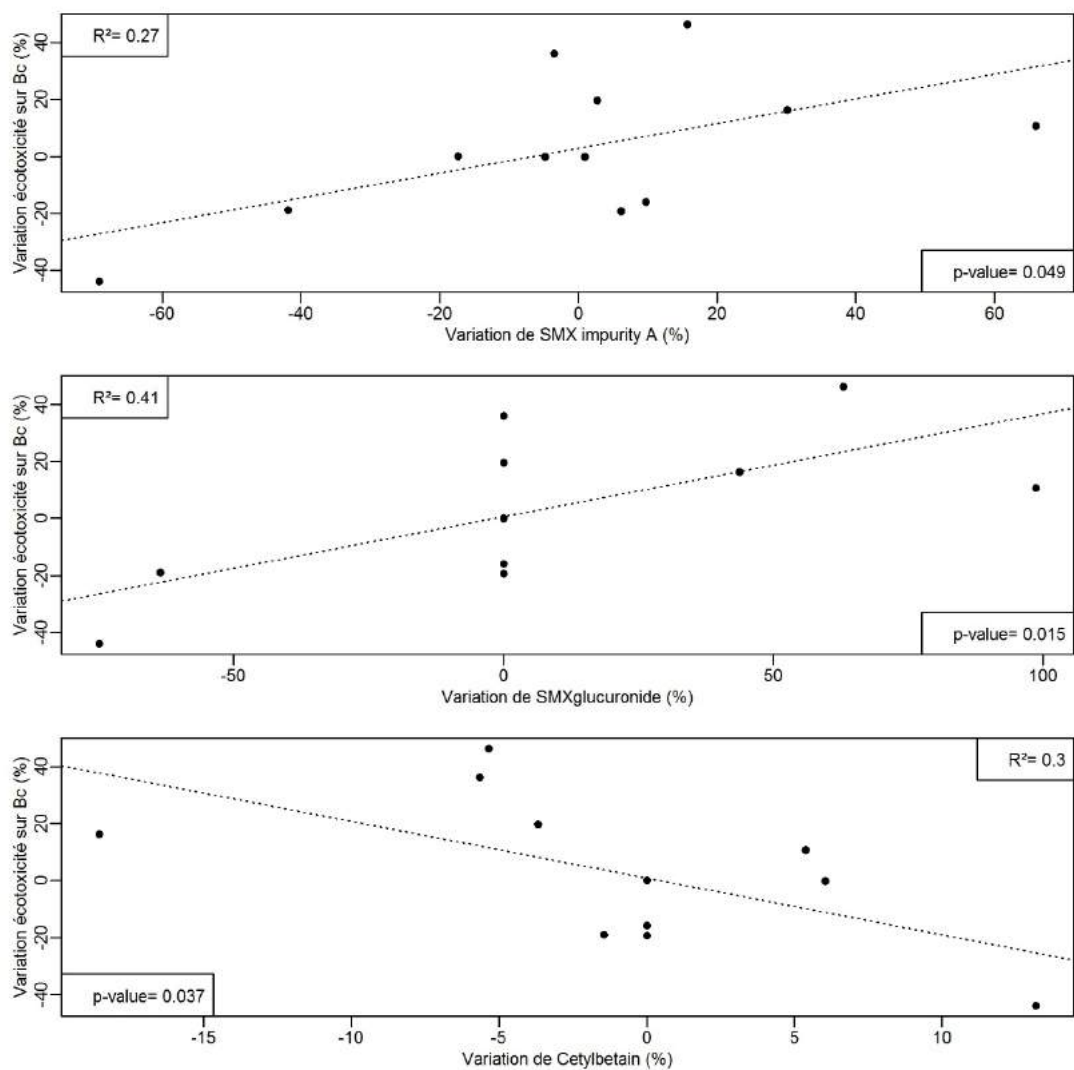
Valeurs des CE<sub>20</sub> du test de croissance des algues en fonction des concentrations de différents paramètres, pour tous les échantillons urbains.



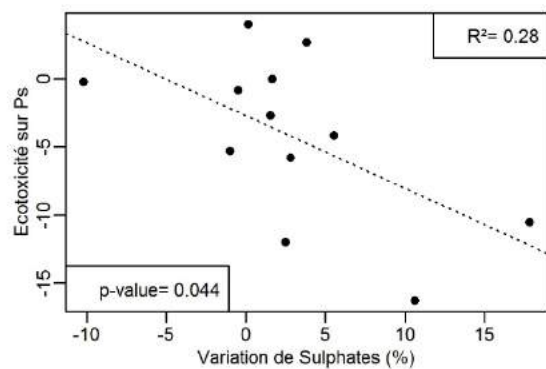
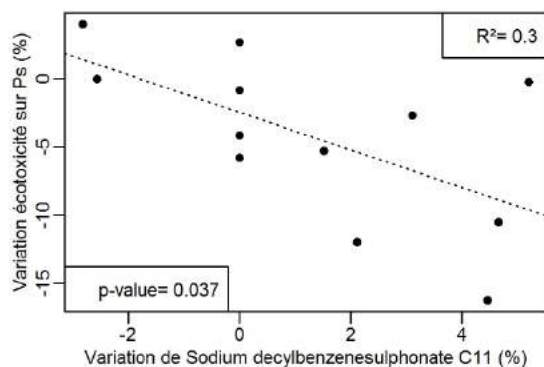
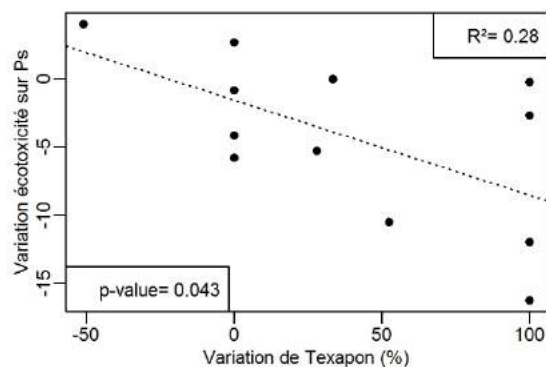
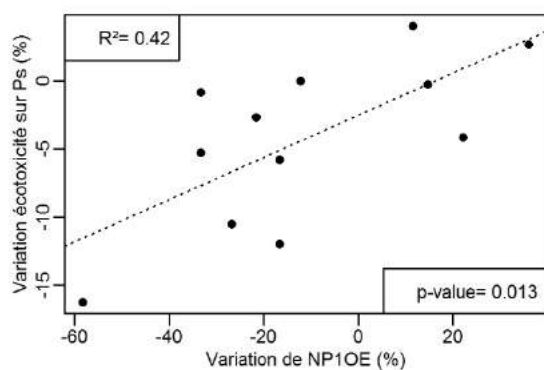
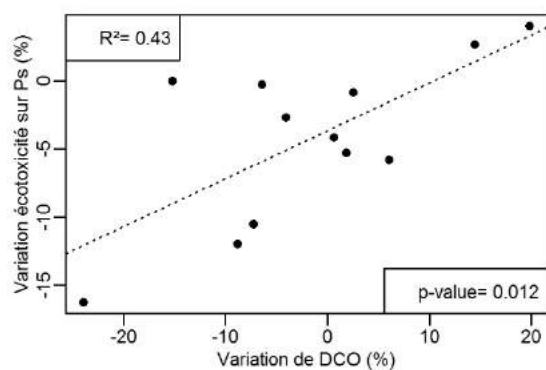
### Analyse dynamique



Variation des valeurs de  $CE_{50}$  du bioessai de mobilité des daphnies en fonction des variation de concentration du Stepanquat GA90, pour les campagnes urbaines.



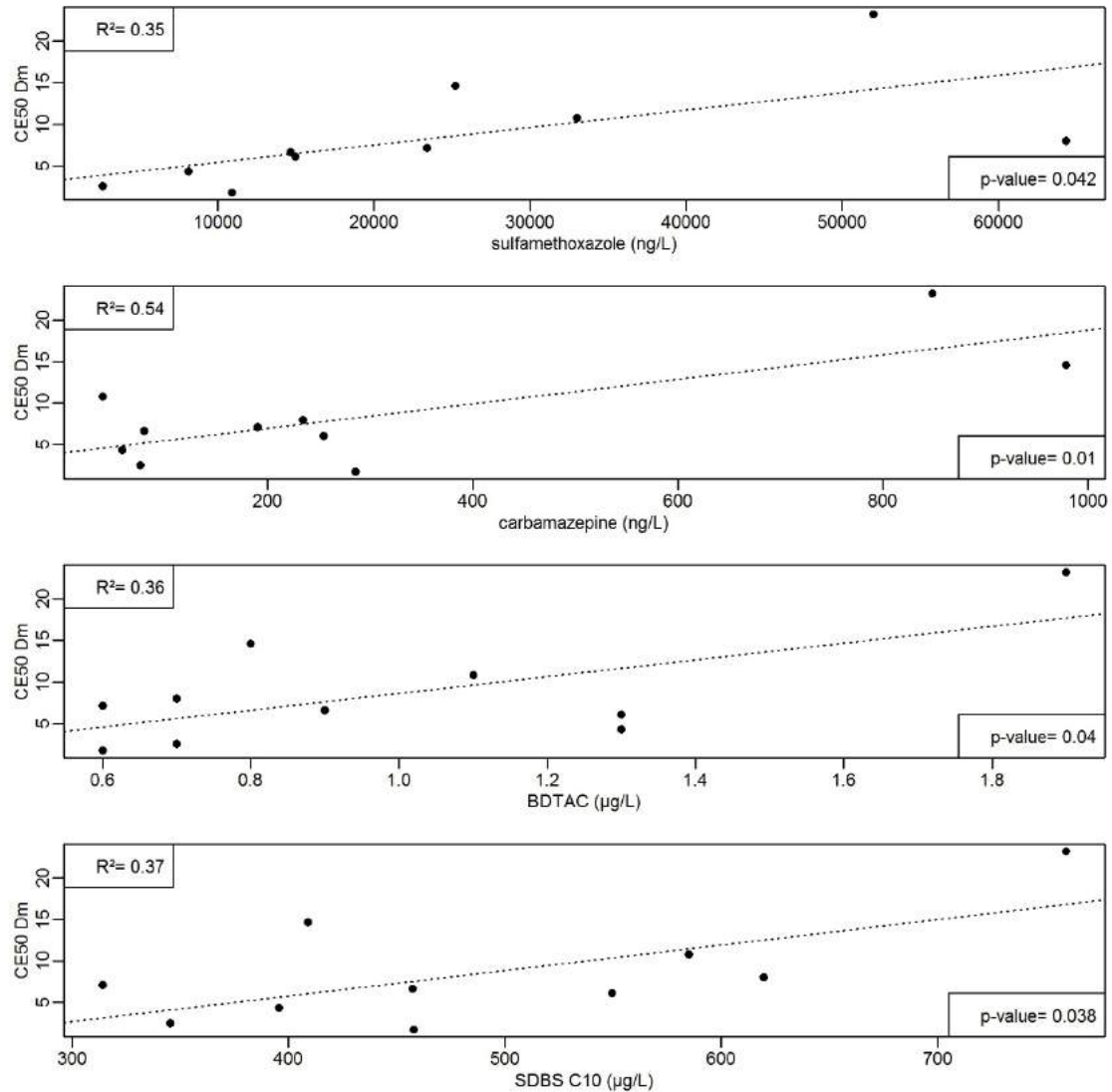
Variation des valeurs de  $CE_{20}$  du bioessai de reproduction des rotifères en fonction des variation de certains paramètres, pour les campagnes urbaines.



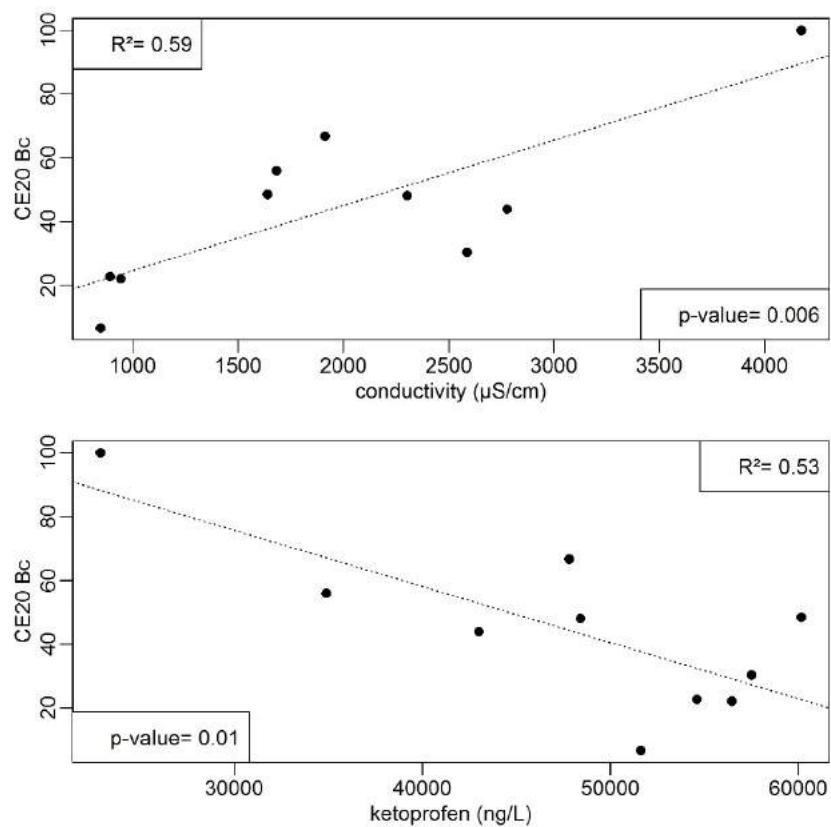
Variation des valeurs de  $CE_{20}$  du bioessai de croissance des algues en fonction des variation de certains paramètres, pour les campagnes urbaines.

## Réseau hospitalier

### Analyse statique

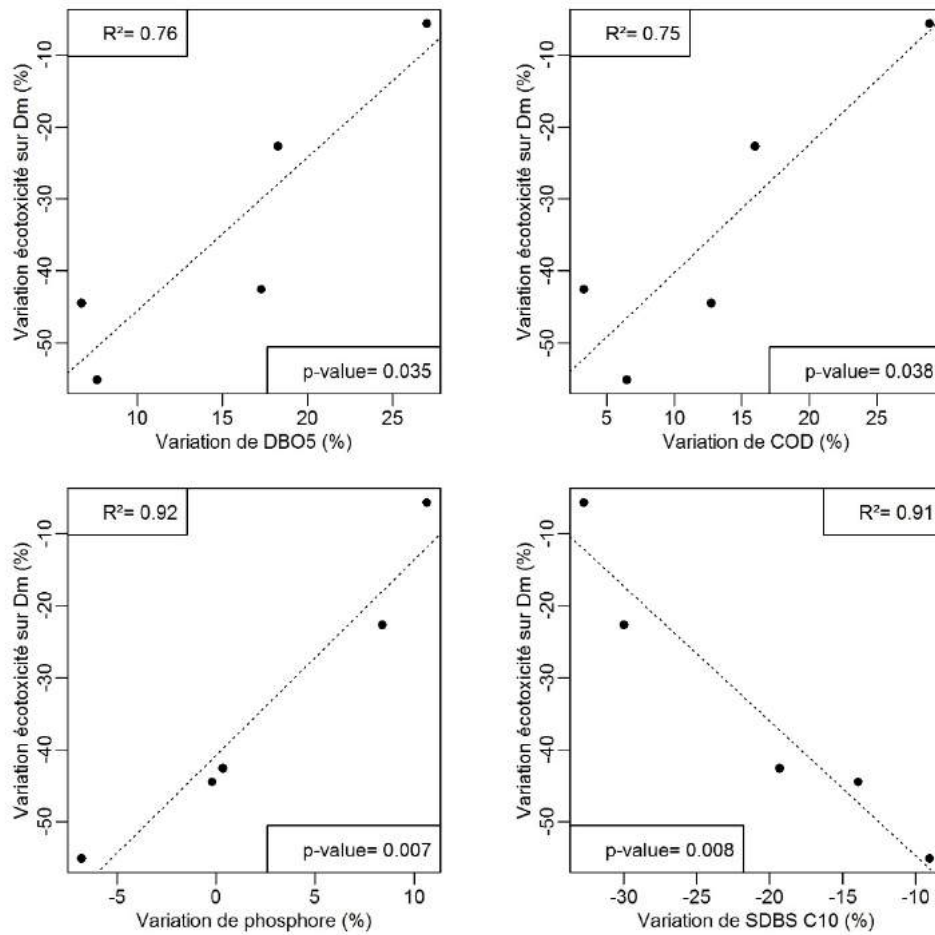


Valeurs des  $CE_{50}$  du bioessai de mobilité des daphnies en fonction des concentrations de différents paramètres, pour tous les échantillons hospitaliers.

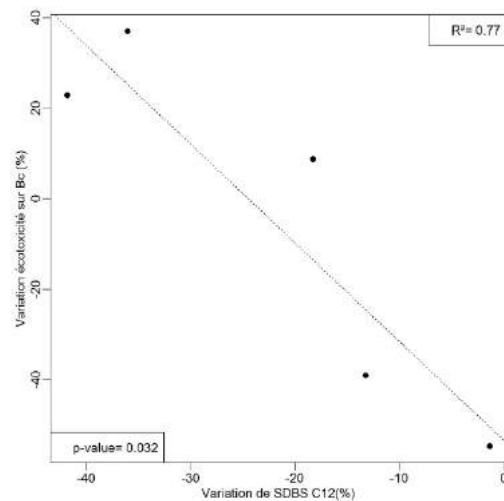


Valeurs des CE<sub>20</sub> du bioessai de reproduction des rotifères en fonction de la conductivité et des concentrations de kétoprofène, pour tous les échantillons hospitaliers.

### Analyse dynamique



Variation des valeurs de  $CE_{50}$  du bioessai de mobilité des daphnies en fonction des variation de certains paramètres, pour les campagnes hospitalières.

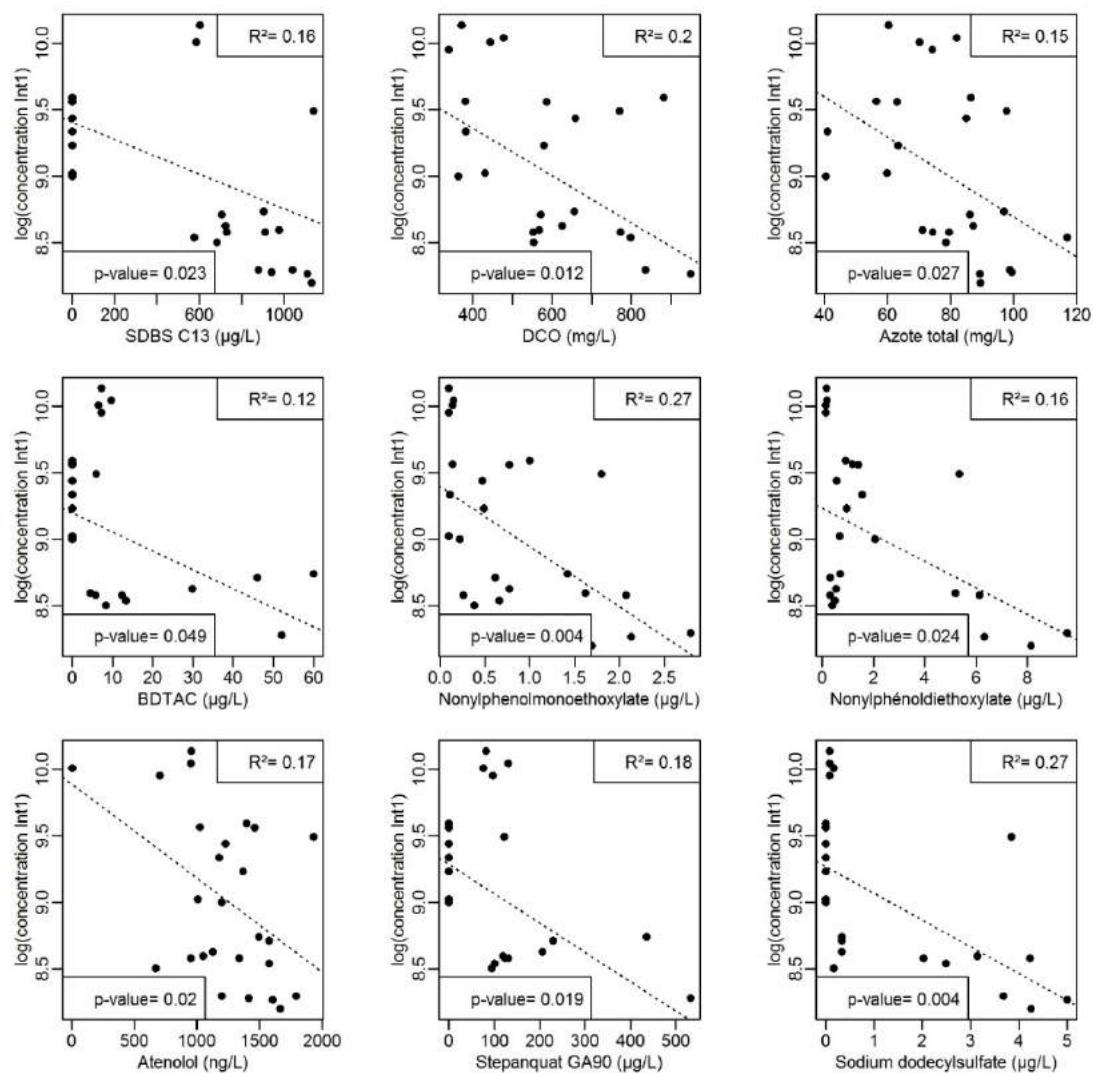


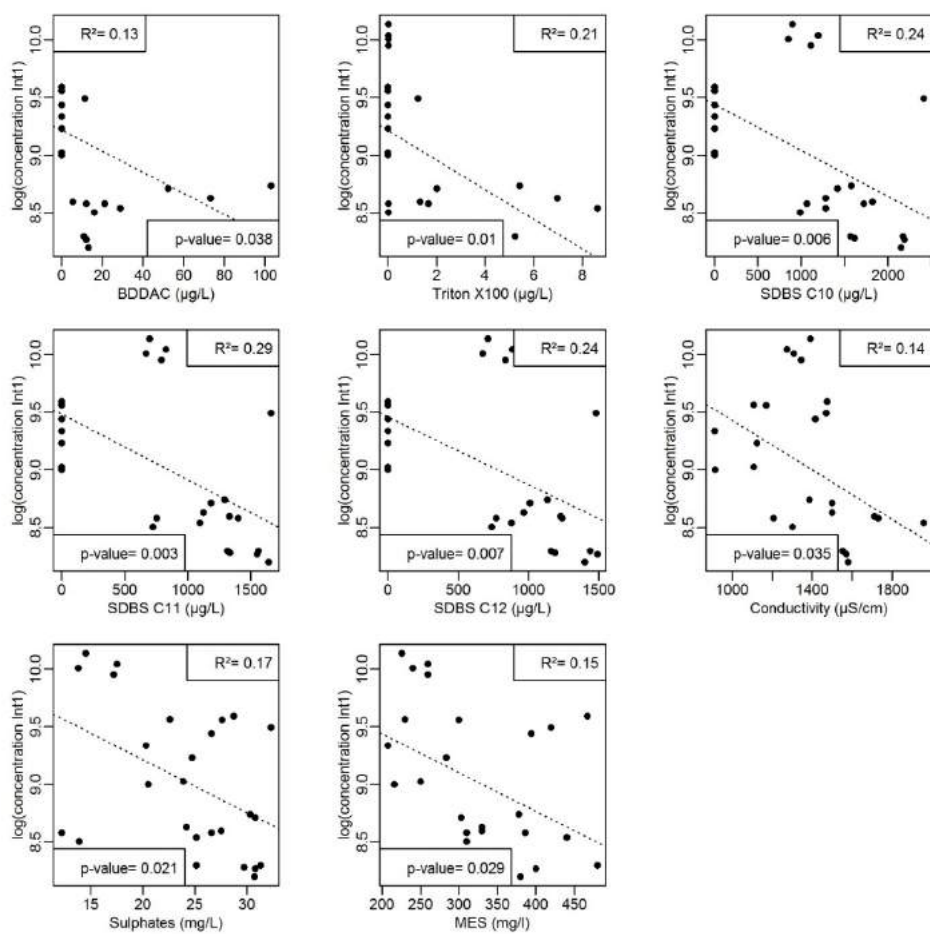
Variation des valeurs de  $CE_{20}$  du test de reproduction des rotifères en fonction des variation de concentrations du SDBS C12, pour les campagnes hospitalières.

## Annexe « antibiorésistance »

### Réseau urbain

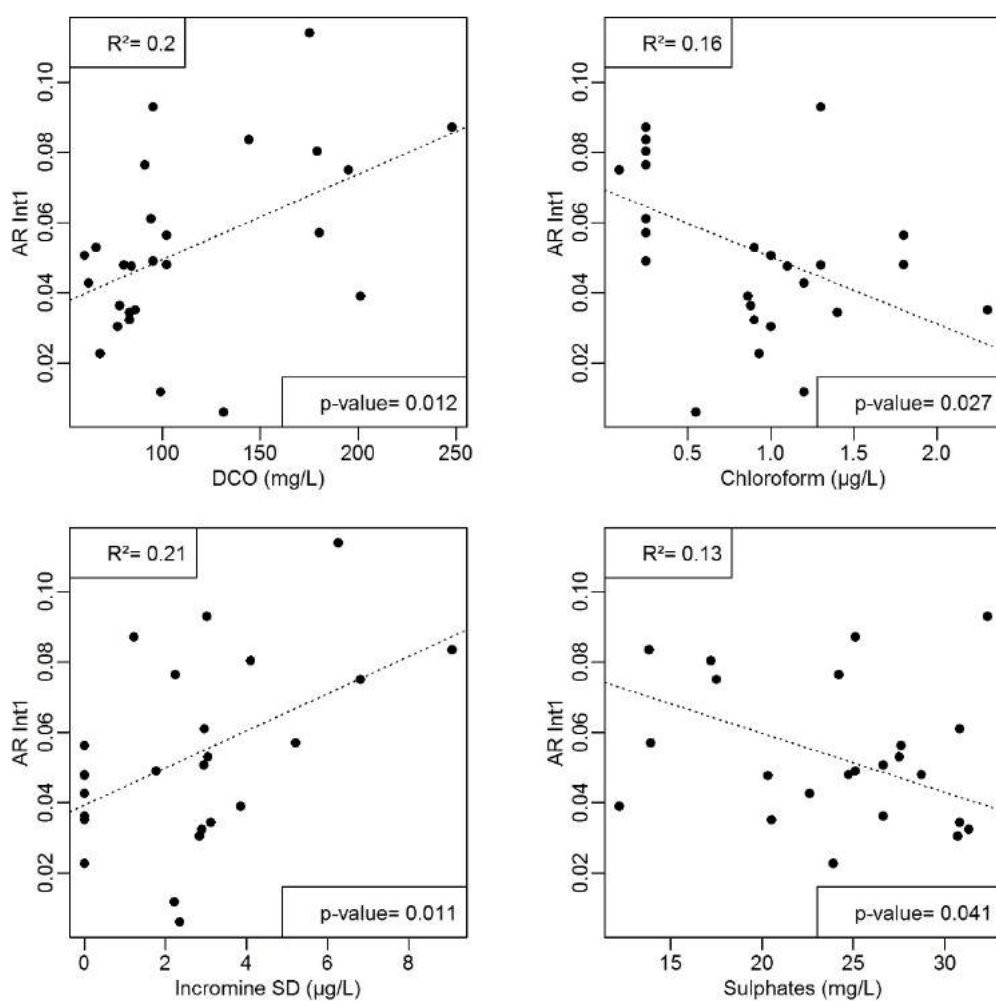
#### Analyse statique



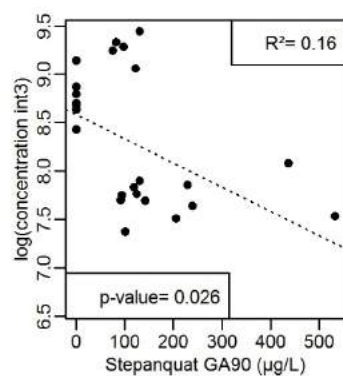
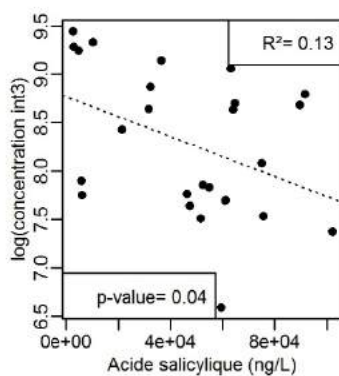
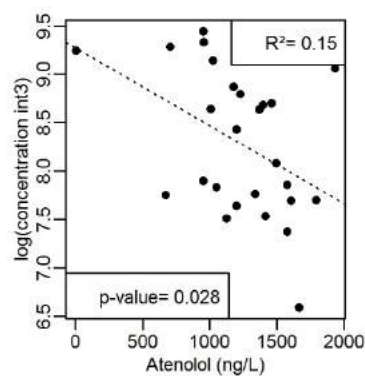
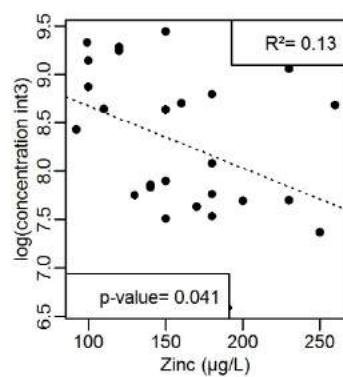
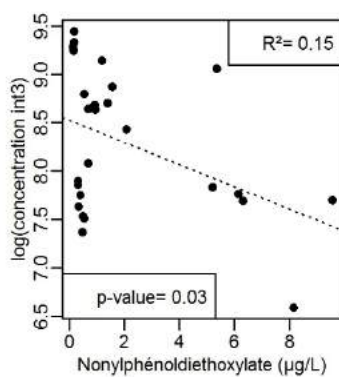
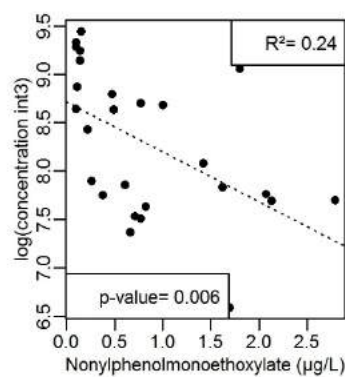
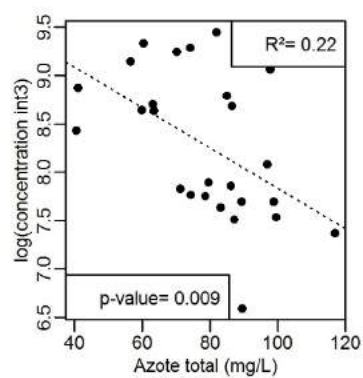
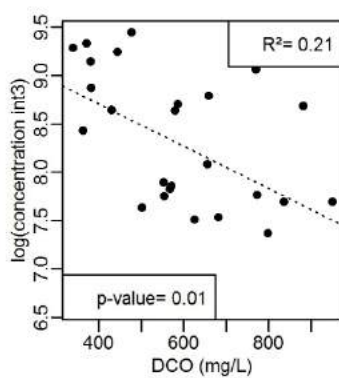
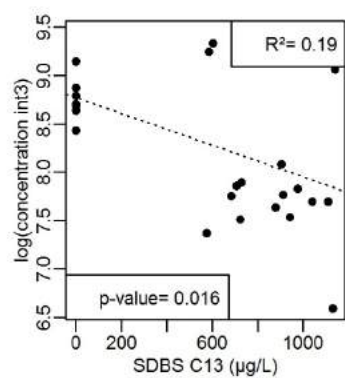


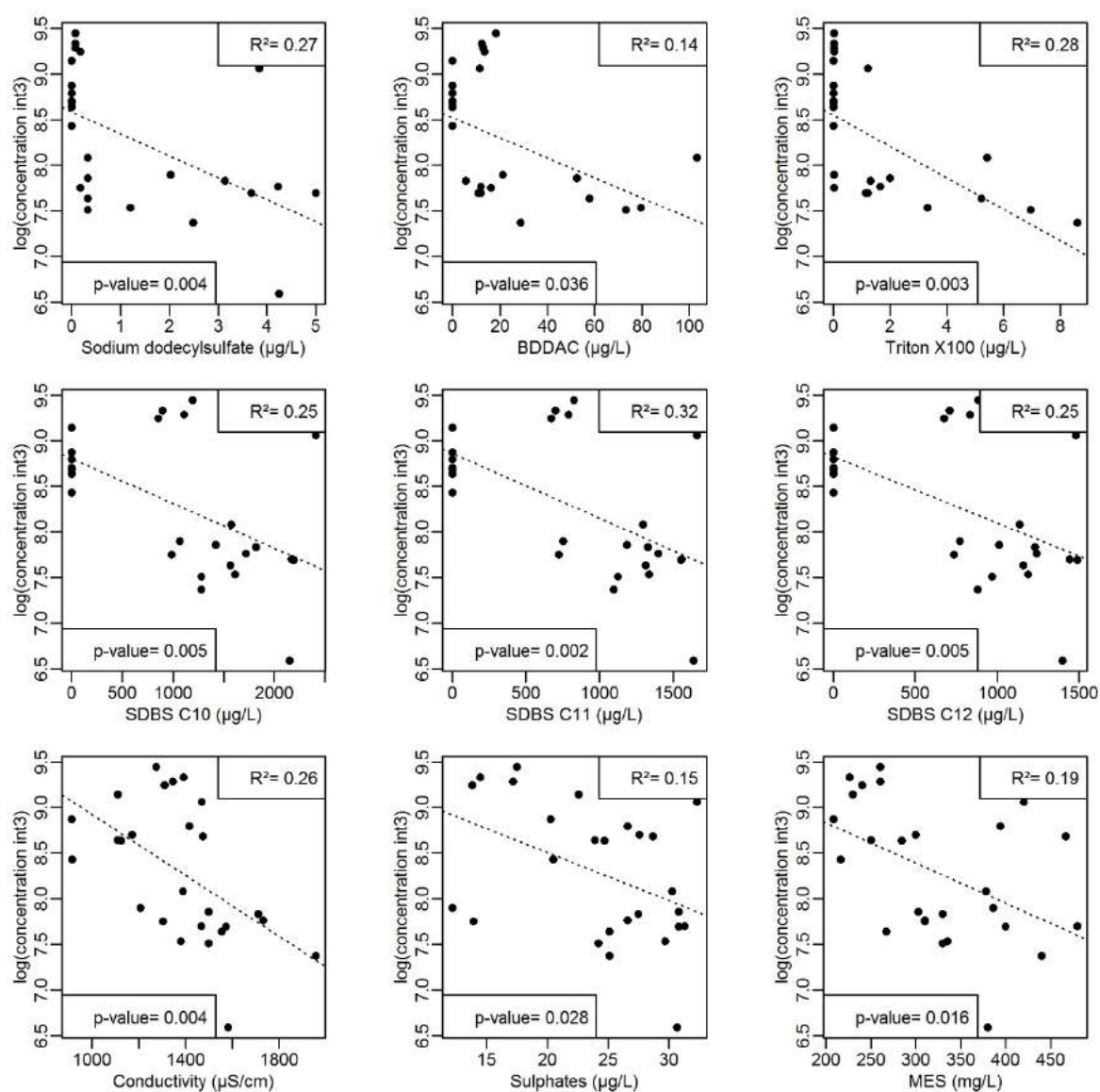
Valeurs des concentrations des intégrons de classe 1 (en log) en fonction des concentrations de différents paramètres, pour tous les échantillons urbains.



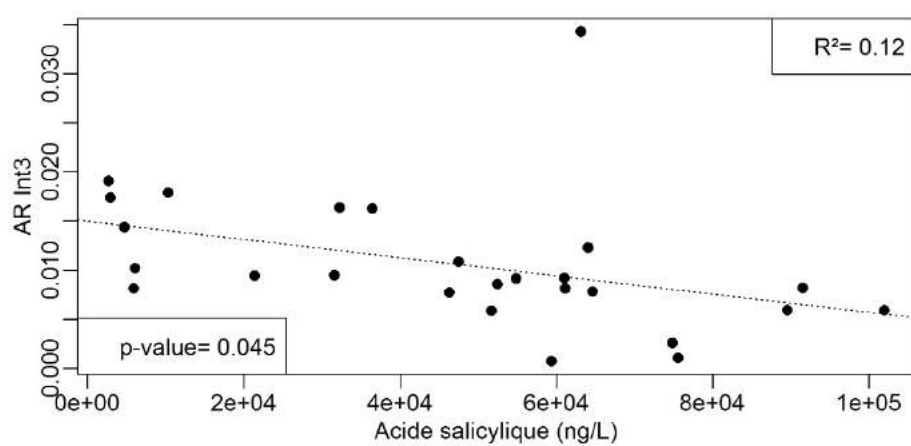
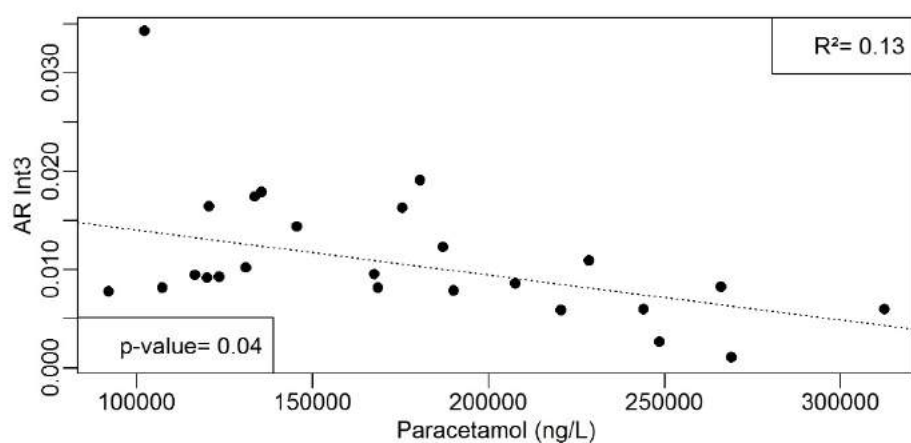


Valeurs des abondances relatives des intégrons de classe 1 en fonction des concentrations de différents paramètres, pour tous les échantillons urbains.

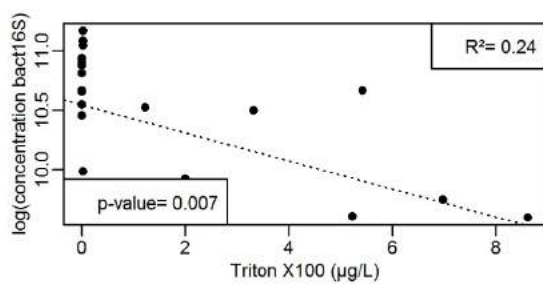
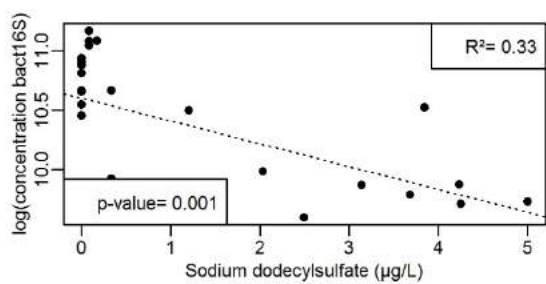
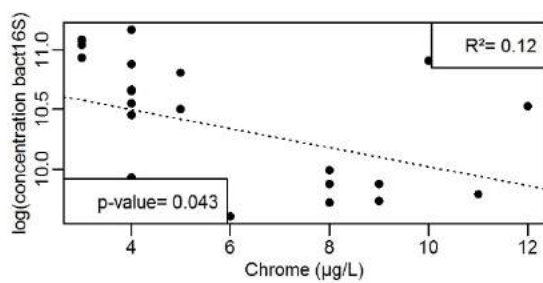
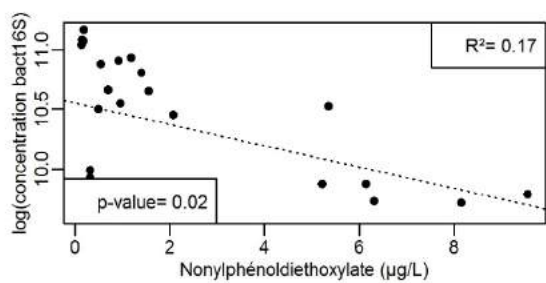
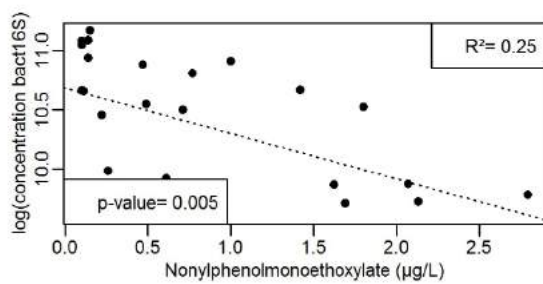
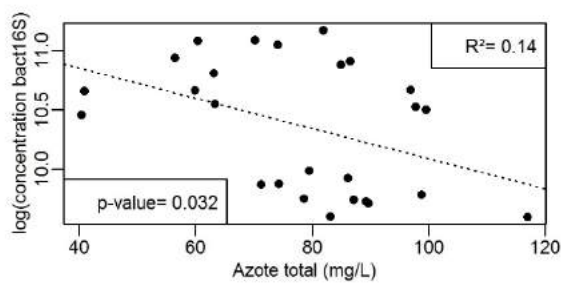
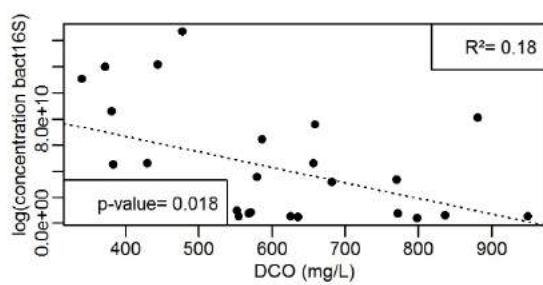
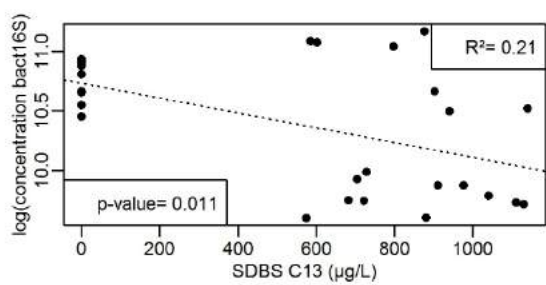


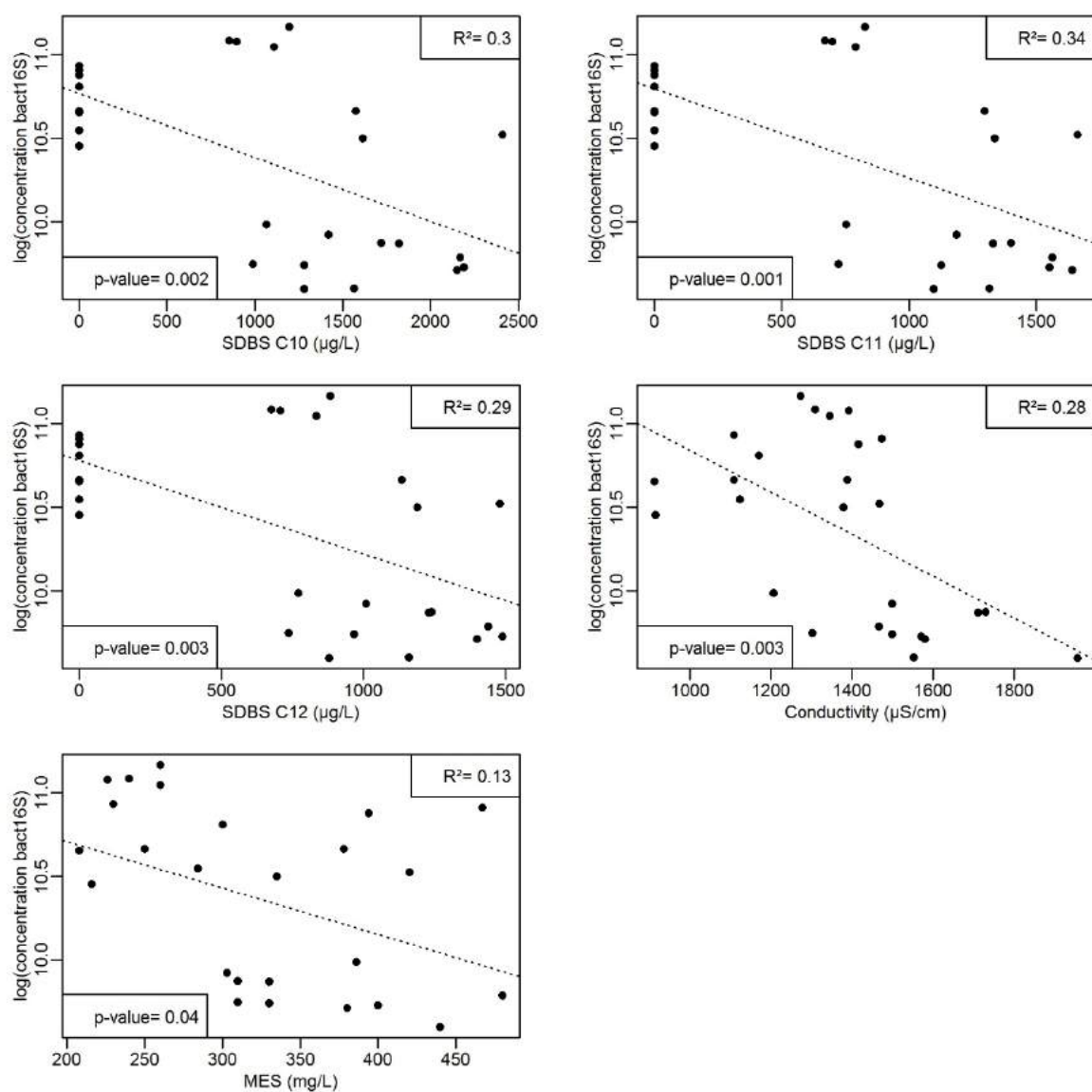


Valeurs des concentrations des intégrons de classe 3 (en log) en fonction des concentrations de différents paramètres, pour tous les échantillons urbains.



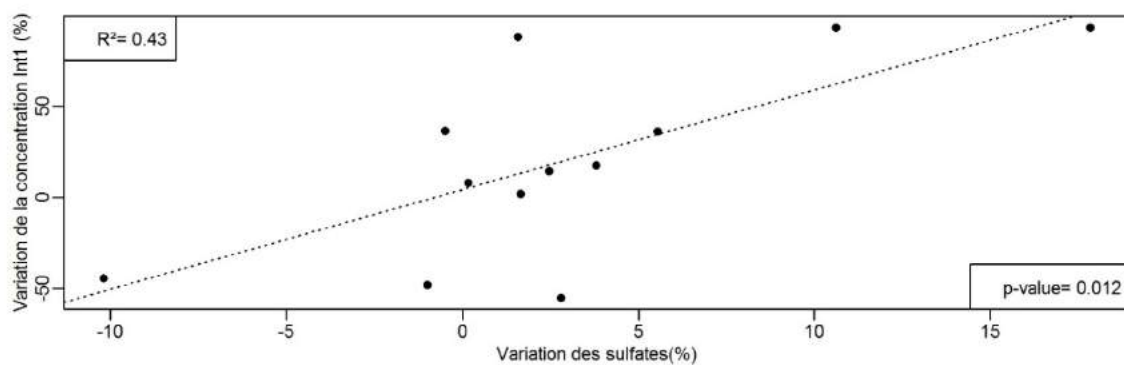
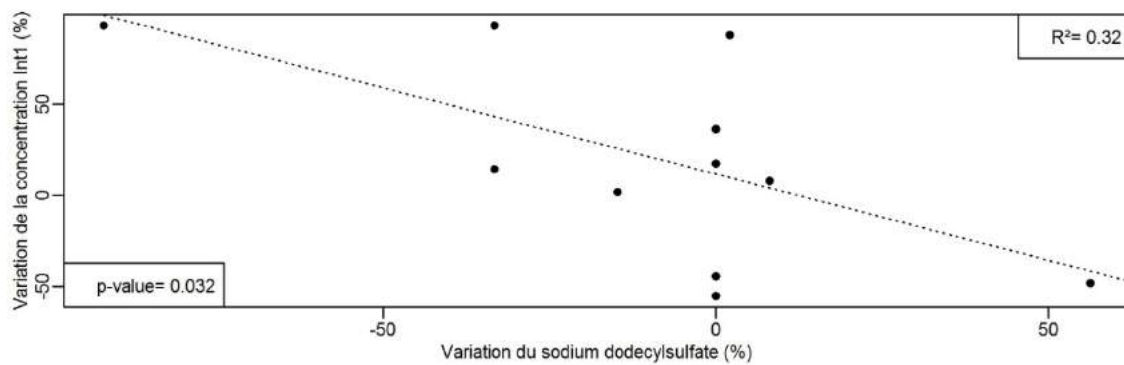
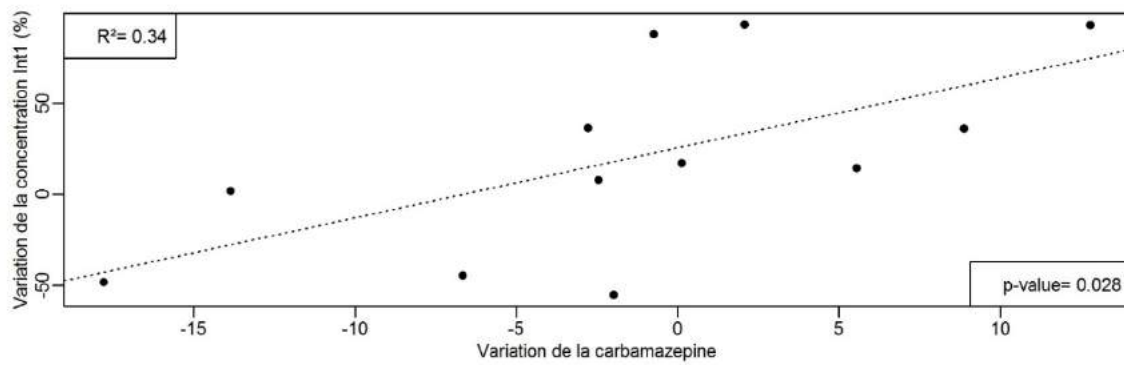
Valeurs des abondances relatives des intégrons de classe 3 en fonction des concentrations de paracétamol et d'acide salicylique, pour tous les échantillons urbains.



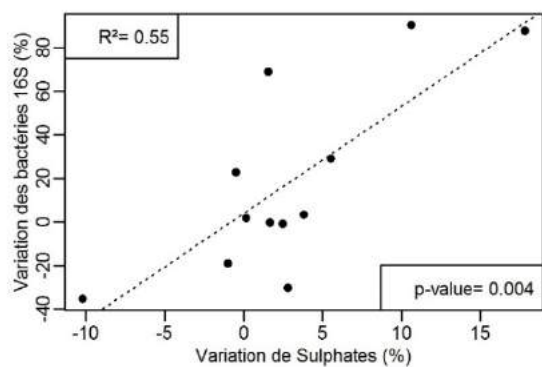
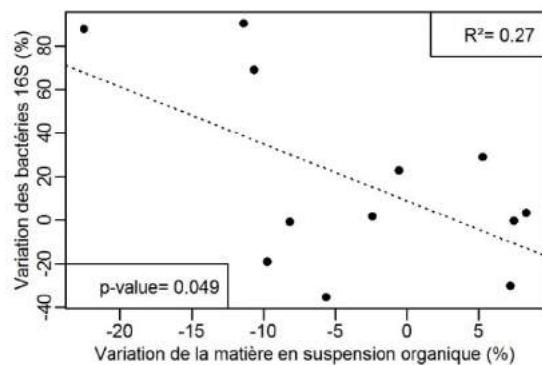
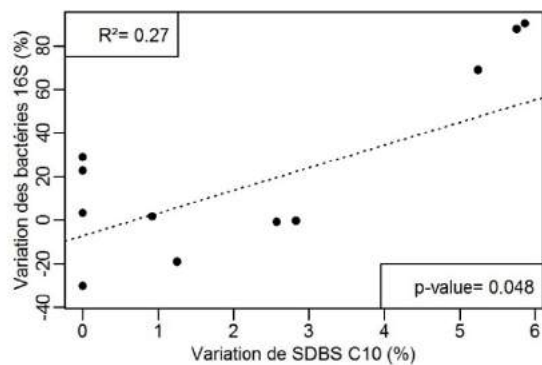
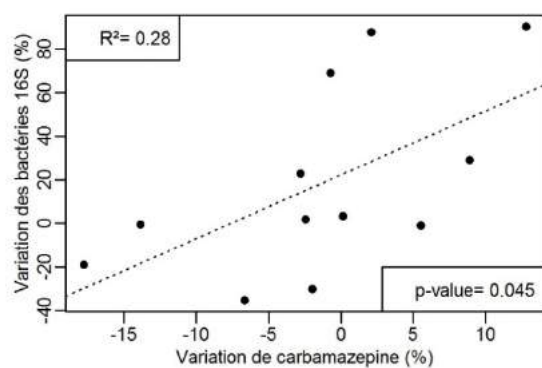
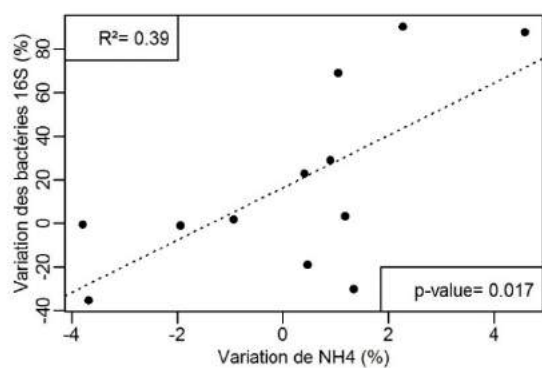


Valeurs des abondances bactériennes (en log) en fonction des concentrations de certains paramètres, pour tous les échantillons urbains.

### Analyse dynamique



Variation de concentration des intégrons de classe 1 en fonction de la variation de la concentration de carbamazépine, de sodium dodecylsulfate et de sulfates dans les échantillons urbains.

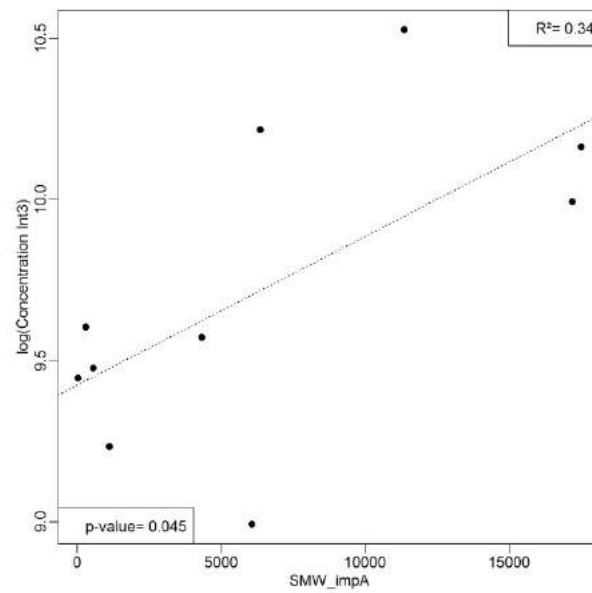


Variation de l'abondance bactérienne en fonction de la variation certains paramètres dans les échantillons urbains.

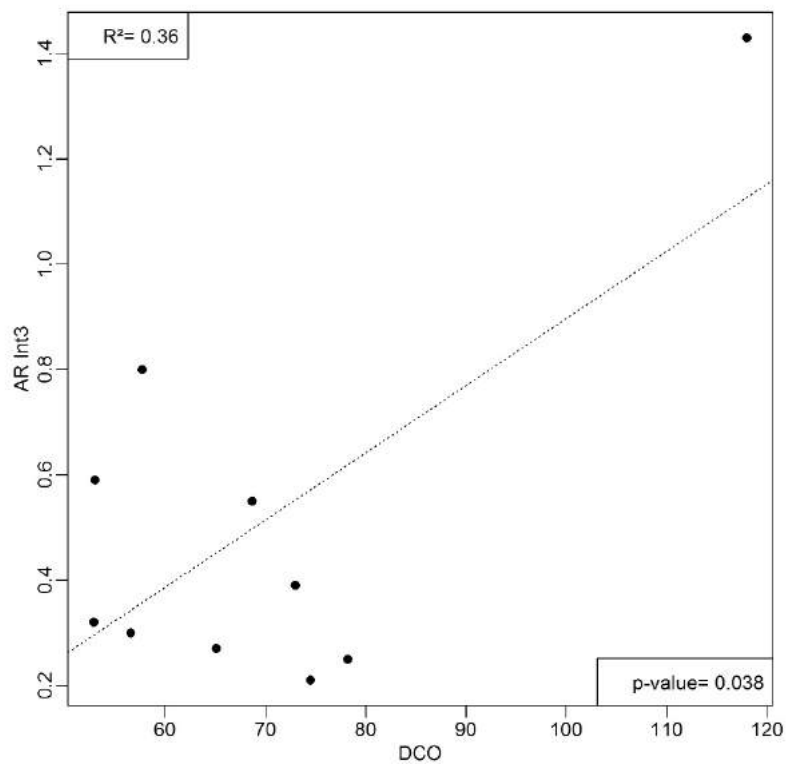


## Réseau hospitalier

### Analyse statique

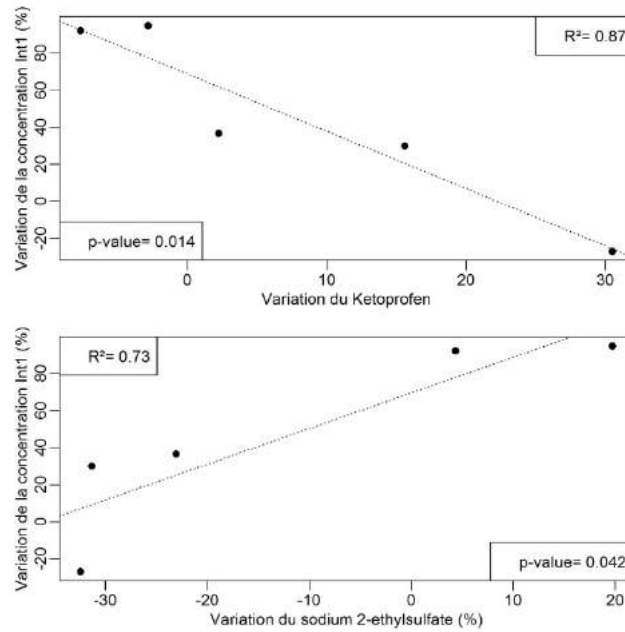


Valeurs des concentrations des intégrons de classe 3 (en log) en fonction des concentrations de différents paramètres, pour tous les échantillons hospitaliers.

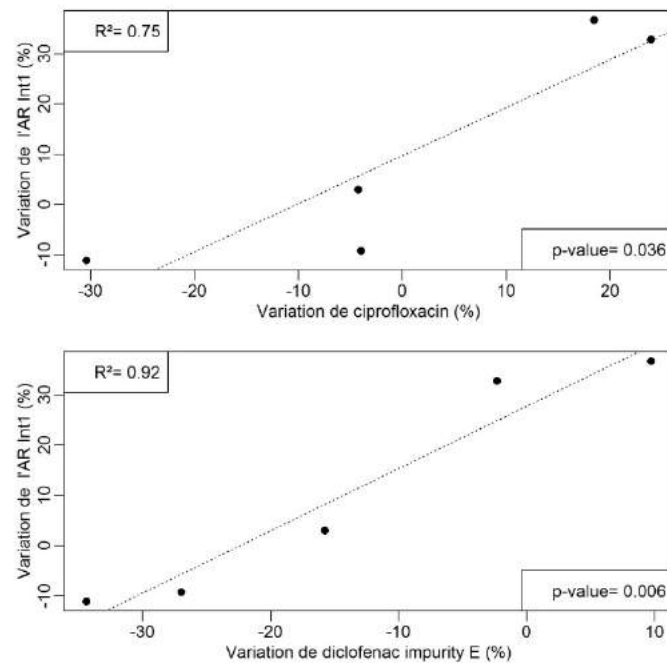


Valeurs des abondances relatives des intégrons de classe 3 en fonction des concentrations de paracétamol et d'acide salicylique, pour tous les échantillons hospitaliers.

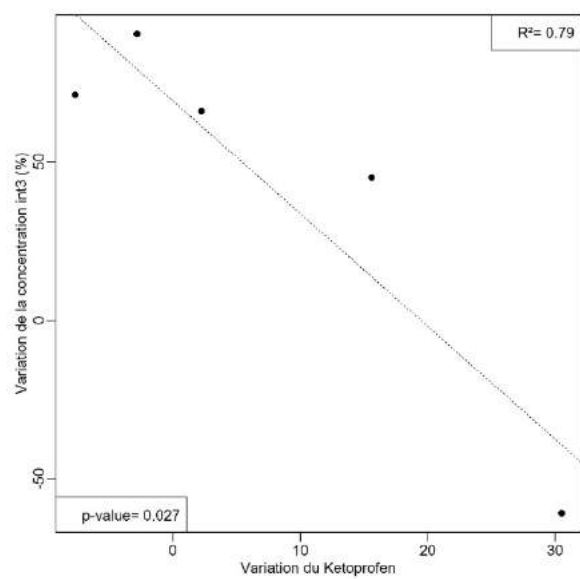
### Analyse dynamique



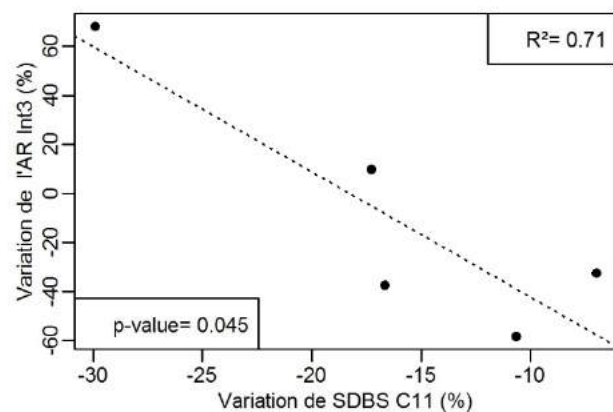
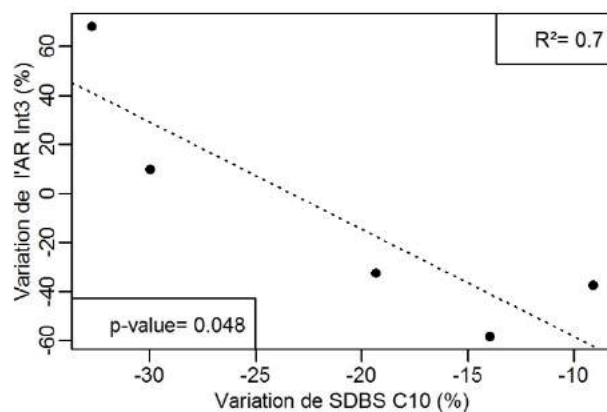
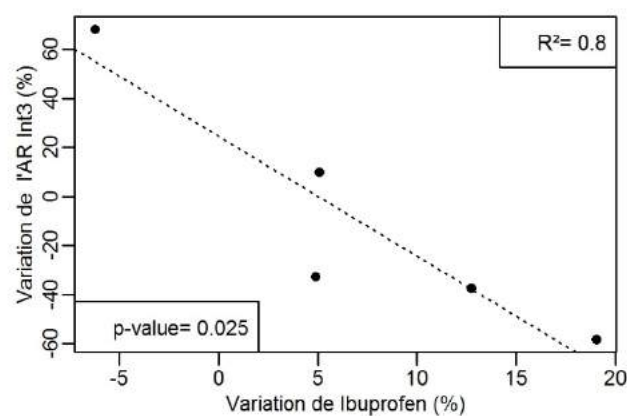
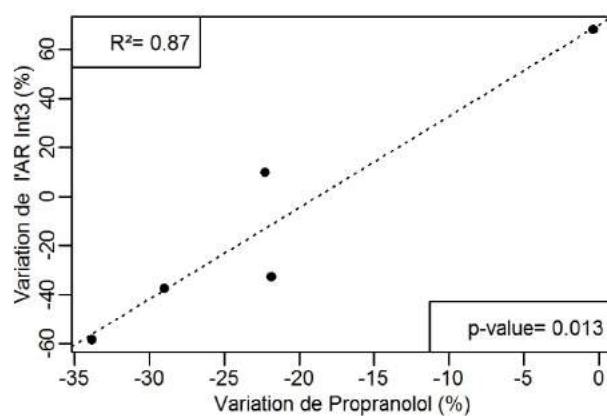
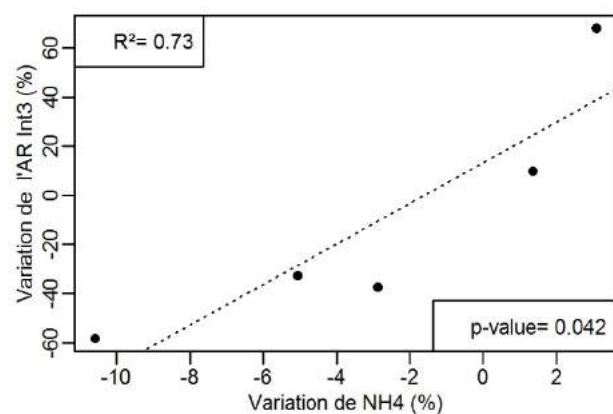
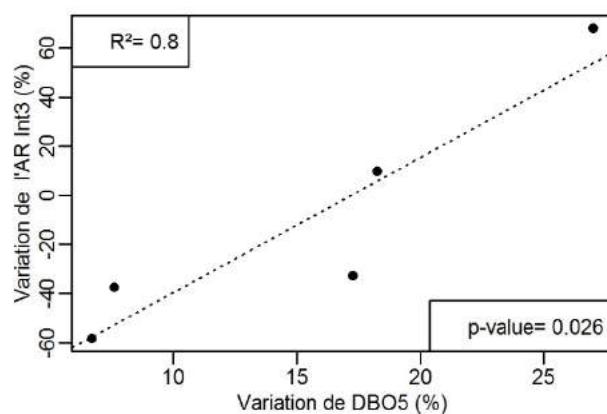
Variation de concentration des intégrons de classe 1 en fonction de la variation de la concentration de kétoprofène et de sodium 2-éthylsulfate dans les échantillons hospitaliers.



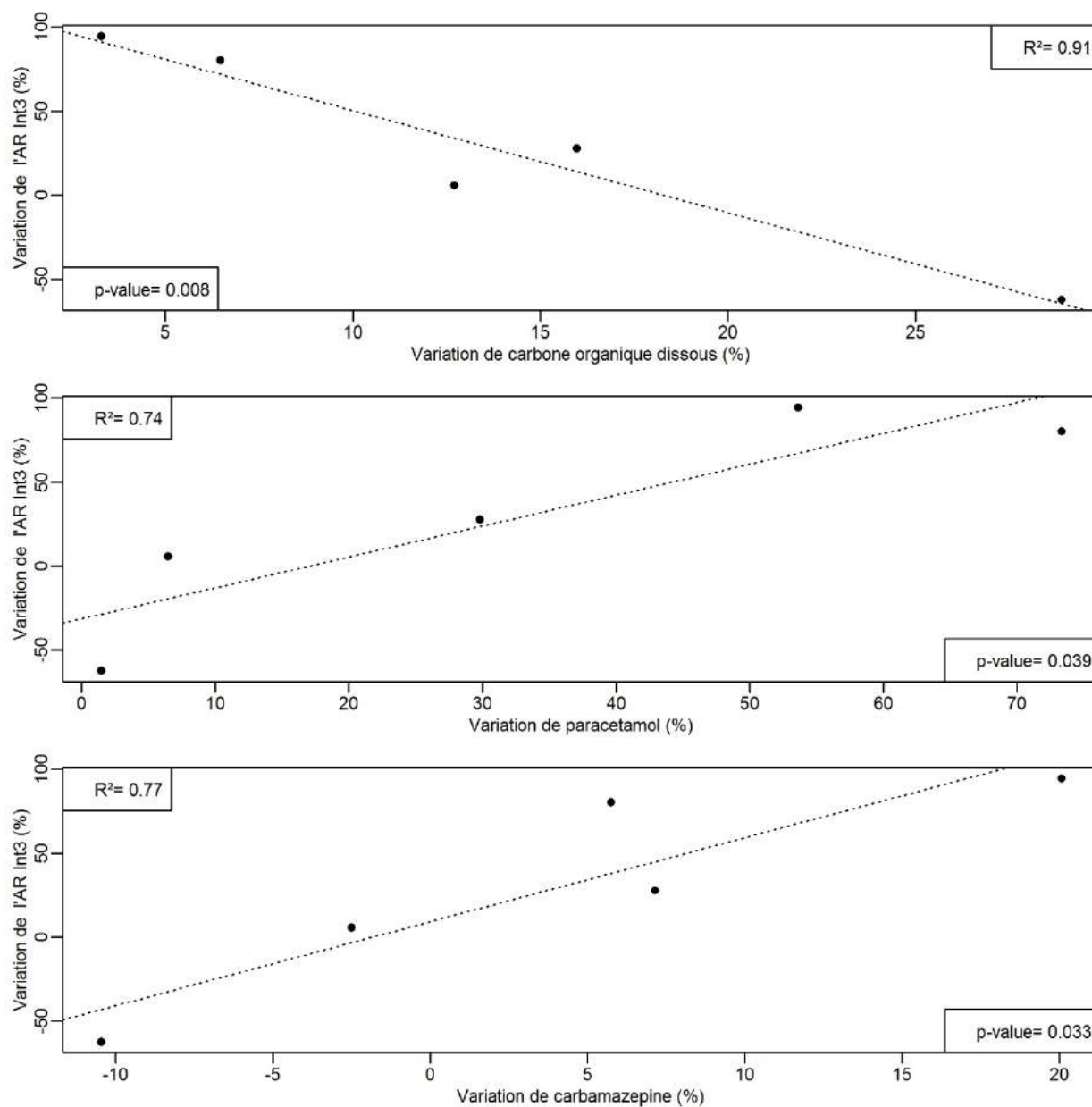
Variation de l'abondance relative des intégrons de classe 1 en fonction de la variation de la concentration de ciprofloxacin et de diclofénac impurity E (métabolite du DCF) dans les échantillons hospitaliers.



Variation de concentration des intégrons de classe 3 en fonction de la variation de la concentration de kétoprofène dans les échantillons hospitaliers.



Variation de l'abondance relative des intégrons de classe 3 en fonction de la variation de DBO<sub>5</sub>, de la concentration de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, de propranolol, d'ibuprofène, de SDBS C10 et de SDBS C11 dans les échantillons hospitaliers.



Variation de l'abondance bactérienne en fonction de la variation de la concentration de Carbone Organique Dissous, de paracétamol et de carbamazépine dans les échantillons hospitaliers.

## Annexes « perturbateurs endocriniens » et « génotoxicité »

Liste des paramètres physico-chimiques utilisés pour l'étude des corrélations.

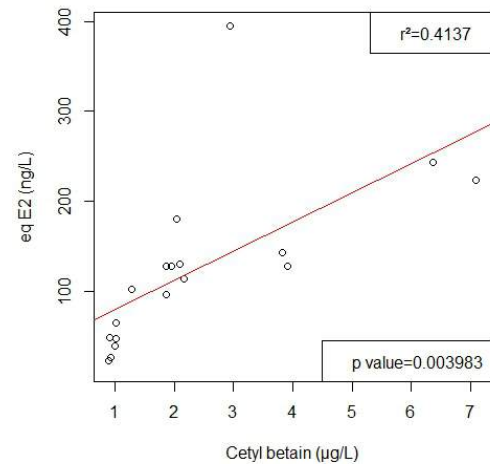
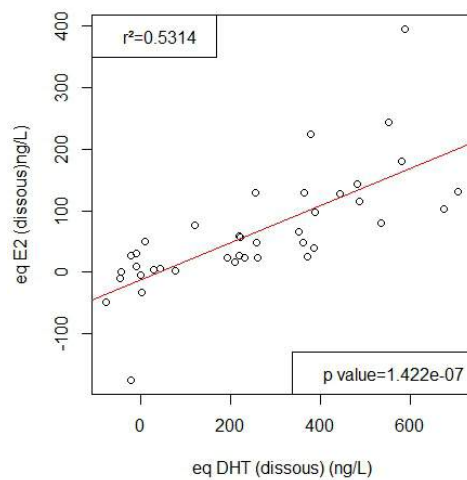
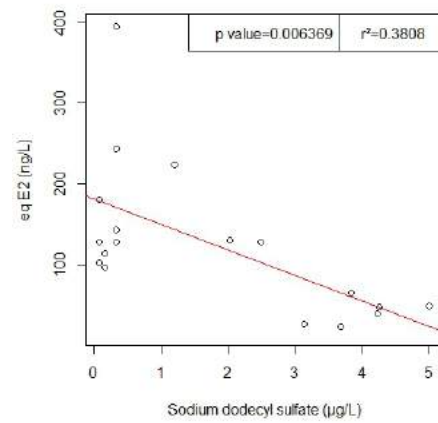
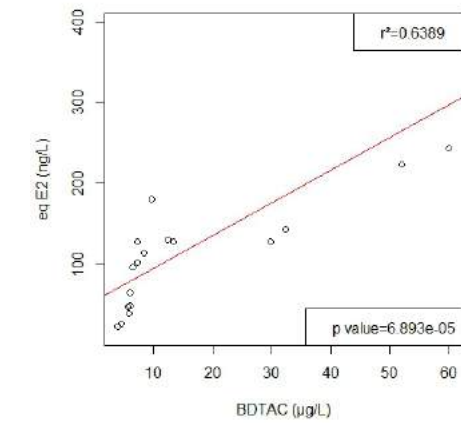
| Paramètre                      | Échantillon entier | Phase liquide | Phase particulaire |
|--------------------------------|--------------------|---------------|--------------------|
| Residual COD                   | X                  |               |                    |
| Residual NTK                   | X                  |               |                    |
| 1,2-dichloroethane             | X                  |               |                    |
| 1,1-dichloroethane             | X                  |               |                    |
| 1,1-dichloroethylene           | X                  |               |                    |
| 1,2-dichloroethylene (trans)   | X                  |               |                    |
| 1,2-dichloroethylene (cis)     | X                  |               |                    |
| Hexachloroethane               | X                  |               |                    |
| 1,1,2,2-tetrachloroethane      | X                  |               |                    |
| 1,1,2-trichlorotrifluoroethane | X                  |               |                    |
| 1,1,1-trichloroethane          | X                  |               |                    |
| 1,1,2-trichloroethane          | X                  |               |                    |
| Chlorure de vinyl              | X                  |               |                    |
| 1,2-dibromoethane              | X                  |               |                    |
| 1,2-dichloropropane            | X                  |               |                    |
| Bromochloromethane             | X                  |               |                    |
| Chloroforme                    | X                  |               |                    |
| Bromoforme                     | X                  |               |                    |
| Methyl chloride                | X                  |               |                    |
| 3-chloropropene                | X                  |               |                    |
| 2,3-dichloropropene            | X                  |               |                    |
| 2-chlorotoluene                | X                  |               |                    |
| 3-chlorotoluene                | X                  |               |                    |
| 4-chlorotoluene                | X                  |               |                    |
| Monochlorobenzene              | X                  |               |                    |
| 1,2-dichlorobenzene            | X                  |               |                    |
| 1,3-dichlorobenzene            | X                  |               |                    |
| 1,4-dichlorobenzene            | X                  |               |                    |
| Cis-1,3-dichloropropylene      | X                  |               |                    |
| Trans-1,3-dichloropropylene    | X                  |               |                    |
| Dibromochloromethane           | X                  |               |                    |
| Dichloromethane                | X                  |               |                    |
| Dichlorobromomethane           | X                  |               |                    |
| Tetrachloroethylene            | X                  |               |                    |
| Carbon tetrachloride           | X                  |               |                    |
| Trichloroethylene              | X                  |               |                    |
| Trichlorofluoromethane         | X                  |               |                    |

|                                    |   |   |   |
|------------------------------------|---|---|---|
| 1,2,3-trimethylbenzene             | X |   |   |
| Methyl tert-butyl ether (MTBE)     | X |   |   |
| Isopropylbenzene (cumene)          | X |   |   |
| 4-isopropyltoluene (cymene)        | X |   |   |
| Tert-butylbenzene                  | X |   |   |
| n-butylbenzene                     | X |   |   |
| 1,3,5-trimethylbenzene             | X |   |   |
| 1,2,4-trimethylbenzene             | X |   |   |
| Xylenes                            | X |   |   |
| Ethylbenzene                       | X |   |   |
| Benzene                            | X |   |   |
| Toluene                            | X |   |   |
| Styrene                            | X |   |   |
| Non-ionic surfactant               | X |   |   |
| 4-tert-octylphenol                 | X |   |   |
| 4-n-nonylphenol                    | X |   |   |
| Nonylphenol monoethoxylate (NP1OE) | X |   |   |
| Nonylphenol diethoxylate (NP2OE)   | X |   |   |
| AOX                                | X |   |   |
| Zinc                               | X | X |   |
| Copper                             | X | X |   |
| Nickel                             | X | X |   |
| Lead                               | X | X |   |
| Chrome                             | X | X |   |
| Gadolinium                         | X | X |   |
| Mercury                            | X | X |   |
| Arsenic                            | X | X |   |
| Cadmium                            | X | X |   |
| Paracetamol                        |   | X | X |
| Atenolol                           |   | X | X |
| Ciprofloxacin                      |   | X |   |
| Sulfamethoxazole                   |   | X | X |
| Propranolol                        |   | X | X |
| Carbamazepine                      |   | X | X |
| Ketoprofen                         |   | X | X |
| Econazole                          |   | X | X |
| Diclofenac                         |   | X | X |
| Salicylic acid                     |   | X | X |
| Ibuprofen                          |   | X | X |
| Ethinylestradiol                   |   | X | X |
| Meropenem                          |   | X |   |
| Aztreonam                          |   | X |   |
| Vancomycin                         |   | X |   |
| Sulphides                          |   | X |   |
| Anionic surfactant                 |   | X |   |

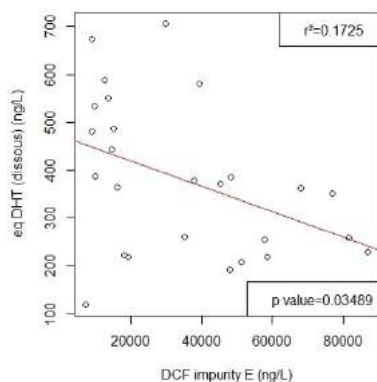
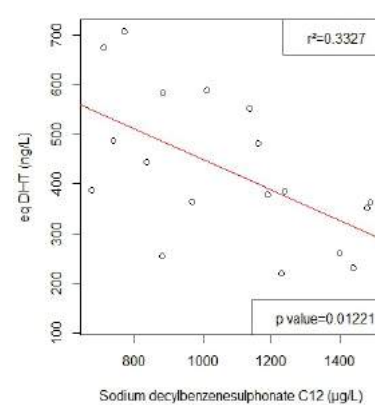
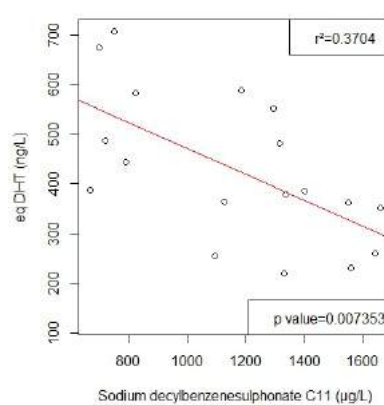
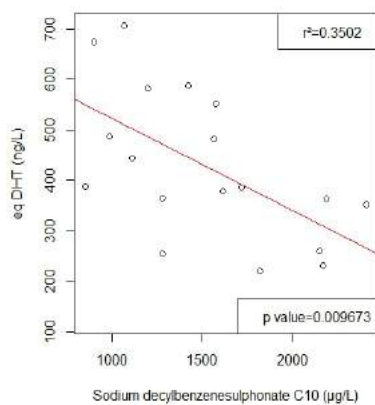
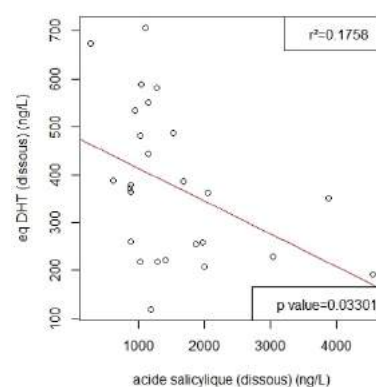
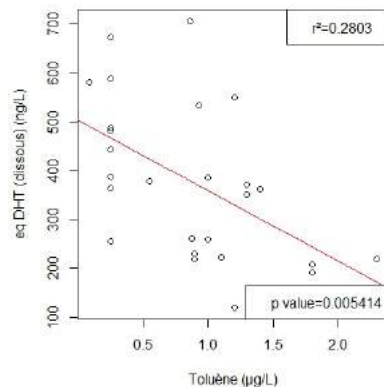
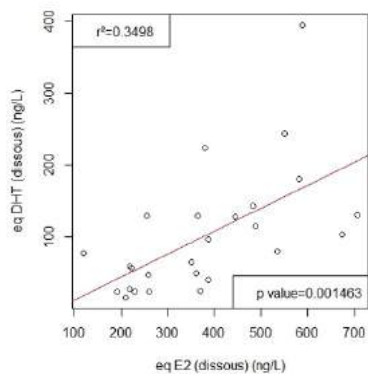
|                                                                      |  |   |   |
|----------------------------------------------------------------------|--|---|---|
| Cationic surfactant                                                  |  | X |   |
| N4-acetyl-sulfaméthoxazole (SMX impurity A)                          |  | X |   |
| Sulfamethoxazole B-D-Glucuronide (SMX glucuronide)                   |  | X |   |
| 4-Amino-N-(3-methyl-5-isoxazolyl)benzenesulfonamide (SMX impurity F) |  | X |   |
| 4-Nitro-sulfaméthoxazole (SMX-NO2)                                   |  | X |   |
| 4-hydroxy diclofénac (DCF 4HO)                                       |  | X |   |
| 5-hydroxy diclofénac (DCF 5HO)                                       |  | X |   |
| Diclofénac carboxylic acid (DCF COOH)                                |  | X |   |
| Diclofénac acyl-B-D-glucuronide (DCF glucuronide)                    |  | X |   |
| 2-[(2-chlorophenyl)-amino] benzaldehyde (DCF CPAB)                   |  | X |   |
| 2-[(2,6-Dichlorophenyl)amino]benzaldehyde (DCF impurity B)           |  | X |   |
| 1-(2,6-Dichlorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one (DCF lactam)       |  | X |   |
| [2-[(2,6-Dichlorophenyl)amino]phenyl]methanol (DCF impurity C)       |  | X |   |
| 1,3-Dihydro-2H-indol-2-one (DCF impurity E)                          |  | X |   |
| Texapon N701 S                                                       |  | X | X |
| Stepanquat GA 90                                                     |  | X | X |
| Sodium dodecyl sulfate                                               |  | X | X |
| Incromine SD                                                         |  | X | X |
| Comperlan 100                                                        |  | X | X |
| Benzyltrimethylammonium chloride (BDDAC)                             |  | X | X |
| Benzyltrimethyltetradecylammonium chloride (BDTAC)                   |  | X | X |
| Cetyl betain                                                         |  | X | X |
| Lauryl pyridinium chloride                                           |  | X | X |
| Sodium 2-ethylhexyl sulfate                                          |  | X | X |
| Triton X100                                                          |  | X | X |
| Benzotriazole                                                        |  | X |   |
| Sodium decylbenzenesulphonate C10                                    |  | X | X |
| Sodium decylbenzenesulphonate C11                                    |  | X | X |
| Sodium decylbenzenesulphonate C12                                    |  | X | X |
| Sodium decylbenzenesulphonate C13                                    |  | X | X |
| DOC (Dissolved Organic Carbon)                                       |  | X |   |
| NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>                                         |  | X |   |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>                                         |  | X |   |
| PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>                                        |  | X |   |
| Soluble COD (Chemical Oxygen Demand)                                 |  | X |   |
| Sulfates                                                             |  | X |   |



Régressions entre certains contaminants et les réponses œstrogénomimétique exprimées en équivalent 17- $\beta$ -œstradiol (E2), issues des échantillons prélevés dans le tronçon de Chouilly sans distinction amont et aval



Régressions entre certains contaminants et les réponses androgénomimétiques exprimées en équivalent dihydrotestostérone (DHT), issues des échantillons prélevés dans le tronçon de Chouilly sans distinction amont et aval



Régression entre les réponses androgénomimétiques phase dissoute et MES exprimées en équivalent dihydrotestostérone (DHT), issues des échantillons prélevés dans le tronçon de Chouilly sans distinction amont et aval

