



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

RAPPORT D'ANALYSES DES PREMIÈRES CAMPAGNES DE MESURES EN RÉSEAU D'ASSAINISSEMENT

Tâche 3.1 Effets biologiques en réseau. – Livrable L1 (rapport intermédiaire)

Claire Barraud¹, Christophe Dagot², Marine Laquaz²⁻³, Yves Lévi¹ Yves Perrodin³

1-Université Paris Sud, 2- Université de Limoges, 3-ENTPE



Avec le soutien de :



Février 2017

Dans le cadre d'une caractérisation des modifications liées au transport des eaux usées urbaines en réseau d'assainissement, des analyses physico-chimiques sont généralement employées pour 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 de certains phénomènes. L'étude des effets biologiques offre un regard complémentaire et intégrateur sur ces phénomènes en observant les impacts des potentielles évolutions au sein des eaux usées sur des paramètres biologiques.

L'étude de l'antibiorésistance des populations bactériennes des eaux et des biofilms du réseau peut mettre en évidence le devenir des éléments génétiques mobiles porteurs de ces gènes et le type de résistance présente. D'autre part, l'écotoxicité, la génotoxicité et l'étude d'effets perturbateurs endocriniens sont des indicateurs intégrateurs des effets biologiques engendrés par les mélanges complexes en présence et permettent d'observer leur évolution en fonction du temps de séjour dans le réseau. Des analyses dirigées par les bioessais complètent cette étude et permettent d'identifier des molécules responsables des effets biologiques observés *in vitro* sur les modèles biologiques grâce à un fractionnement par CLHP.

Le présent rapport détaille les résultats des analyses des effets précédemment cités, menées sur des échantillons d'eau et de biofilm.

Ces échantillons ont été prélevés à l'amont et à l'aval d'une portion de réseau d'assainissement urbain à l'occasion de trois campagnes menées en 2016 avec le partenariat de la Communauté de Communes du Pays de Gex, Suez, les Services Industriels de Genève (SIG) et l'Etat de Genève.



Sommaire

1. CAMPAGNES DE PRÉLÈVEMENTS.....	4
1.1. Site d'étude	4
1.2. Déroulement des campagnes.....	4
2. ANTIBIORÉSISTANCE	6
2.1. Matériels et méthodes.....	6
2.2. Résultats.....	6
2.2.1. Galerie de Chouilly	6
2.2.2. Autres résultats	10
3. BIO-ESSAIS.....	11
3.1. Matériels et méthodes.....	11
3.1.1. Bioessais réalisés.....	11
3.1.2. Traitement des échantillons.....	12
3.2. Résultats.....	14
3.2.1. Écotoxicité	14
3.2.2. Génotoxicité	16
3.2.3. Effets perturbateurs endocriniens	17
3.2.4. Développement du protocole d'analyses dirigées par les bioessais (Effect Directed Analysis)	18
CONCLUSIONS PROVISOIRES	20

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, Boussioux 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.
- 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 P., Hofnung M. (1985) The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures, *Mutation Research* 147, 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
- White P., Rasmussen J., Blaise C. (1996) A semi-automated, microplate version of the SOS Chromotest for the analysis of complex environmental extracts, *Mutation Research* 360, 51-74.

1. CAMPAGNES DE PRÉLÈVEMENTS

1.1. Site d'étude

Le site choisi est la galerie de Chouilly, un tronçon de réseau continu sans apport extérieur de 2,7 km situé à la frontière franco-suisse au niveau de Saint-Genis Pouilly (01). Le point de prélèvement situé en entrée de la galerie est appelé « Amont » et celui situé en aval est intitulé « Aval ». Le temps de trajet de l'effluent entre les deux points a été calculé grâce à des campagnes de traçage, il est en moyenne de 45 minutes environ.



Figure 1 : Point amont



Figure 2 : Point aval

1.2. Déroulement des campagnes

Trois campagnes ont été réalisées les 6 juillet, 15 novembre et 8 décembre 2016, toutes suivant le même protocole. Chaque campagne a consisté à prélever 3 échantillons ponctuels d'eau à l'amont et trois échantillons ponctuels à l'aval en respectant le temps de trajet des eaux usées dans le réseau (cf. Tableau I). Ce temps a pu être déterminé grâce à une campagne de traçage à la rhodamine et à partir des données fournies par un débitmètre placé au niveau du point amont et exploité par Suez. Les prélèvements ont été réalisés à trois moments de la matinée à l'aide de préleveurs portables puis sous-échantillonnés sur place et envoyés aux différents laboratoires.

Concernant le biofilm, les prélèvements de la première campagne ont consisté à gratter directement la surface du tuyau ou de la cunette pour récupérer le biofilm en place. Pour les deux campagnes suivantes, un système de support artificiel a été immergé pour éviter les biais liés à la différence de nature du support en place (béton contre PVC) et d'âge du biofilm résident et pour faciliter la collecte du biofilm. Le support choisi a été constitué de « guirlandes » de tubes et de boules plastiques ajourées utilisées en assainissement non collectif, placées pendant une période de 3 semaines à un mois dans le réseau en Amont et en Aval avant d'être retirées et remplacées.

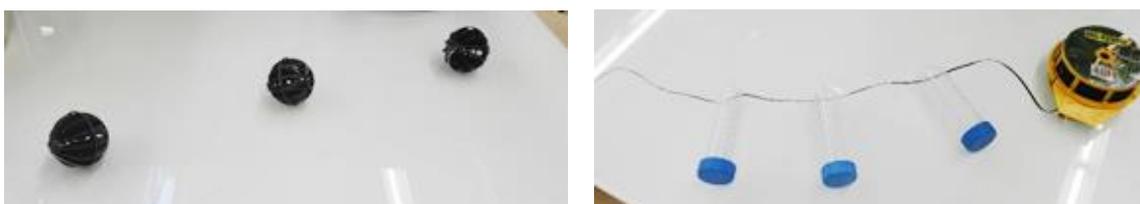


Figure 3 : Supports composant la "guirlande" pour le développement du biofilm

**Tableau I Dates, heures de prélèvement au point amont, temps de trajet de l'effluent et débits
pour les 3 campagnes de prélèvement menées sur la galerie de Chouilly**

	Date	Heure de prélèvement au point amont	Temps de trajet de l'effluent (min)	Débit (m³/j)
1	6 juillet 2016	09h22	45,63	7 368
2		10h23	46,43	7 416
3		10h45	45,84	7 728
1	15 novembre 2016	08h35	42,92	9 024
2		09h32	36,54	11 776
3		10h30	42,51	9 683
1	8 décembre 2016	08h40	44,25	5 646
2		09h30	43,42	7 374
3		10h30	44,99	6 977

2. ANTIBIORÉSISTANCE

2.1. Matériels et méthodes

L'acquisition de gènes d'antibiorésistance par les bactéries peut être liée à différents mécanismes comme le transfert horizontal de gènes (entre les bactéries d'un milieu). Celui-ci est rendu possible grâce à des éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les transposons et les intégrons. Les intégrons sont capables d'acquérir, d'échanger et d'exprimer des gènes, leur rôle dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques est étudiée depuis la fin des années 80. En tant que vecteur potentiel de gènes de résistance aux antibiotiques, ils sont considérés comme un **marqueur** de cette antibiorésistance au sein des populations bactériennes (Amos, 2015, Gillings, 2015) et c'est pour cette raison qu'ils sont étudiés ici. Il existe plusieurs classes d'intégrons selon la nature du gène codant pour l'intégrase, la protéine capable d'intégrer les gènes de résistance. Trois de ces classes sont bien connues et sont quantifiées dans cette étude (classe 1, 2 et 3).

L'extraction de l'ADN bactérien et la quantification des intégrons de classe 1, 2 et 3 par qPCR ont été réalisées selon la méthode décrite dans l'article de Barraud (2010) et la thèse de Stalder (2012) sur des eaux et des biofilms. 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. L'abondance relative des intégrons dans les bactéries est calculée en divisant la concentration en intégrons à la concentration de Bact_16S dans un même extrait d'ADN.

Les quantifications ont été réalisées sur deux types de matrices : eau usée et biofilm, prélevés tel que décrit en 1.2.

2.2. Résultats

Les résultats présentés ci-dessous sont basés sur les analyses des concentrations d'intégrons de type 1, 2 et 3 et des ratios de ces intégrons par rapport à la concentration en bactéries Bact_16S réalisées dans les échantillons d'eau et de biofilm prélevés dans la galerie de Chouilly.

Une analyse statistique de ces résultats a été menée pour déterminer s'il existe une différence significative entre les résultats amont et aval. Le test statistique utilisé est un test de comparaison des moyennes (test de Student). Les différences significatives sont symbolisées sur les figures ci-dessous avec des étoiles.

2.2.1. Galerie de Chouilly

2.2.1.1. Résultats dans les échantillons d'eau

Sur les figures 4 et 5, seuls les intégrons de type 1 et 3 sont présentés car les intégrons de type 2 ne sont jamais en quantité suffisante pour être quantifiés (ils sont détectés mais non quantifiés).

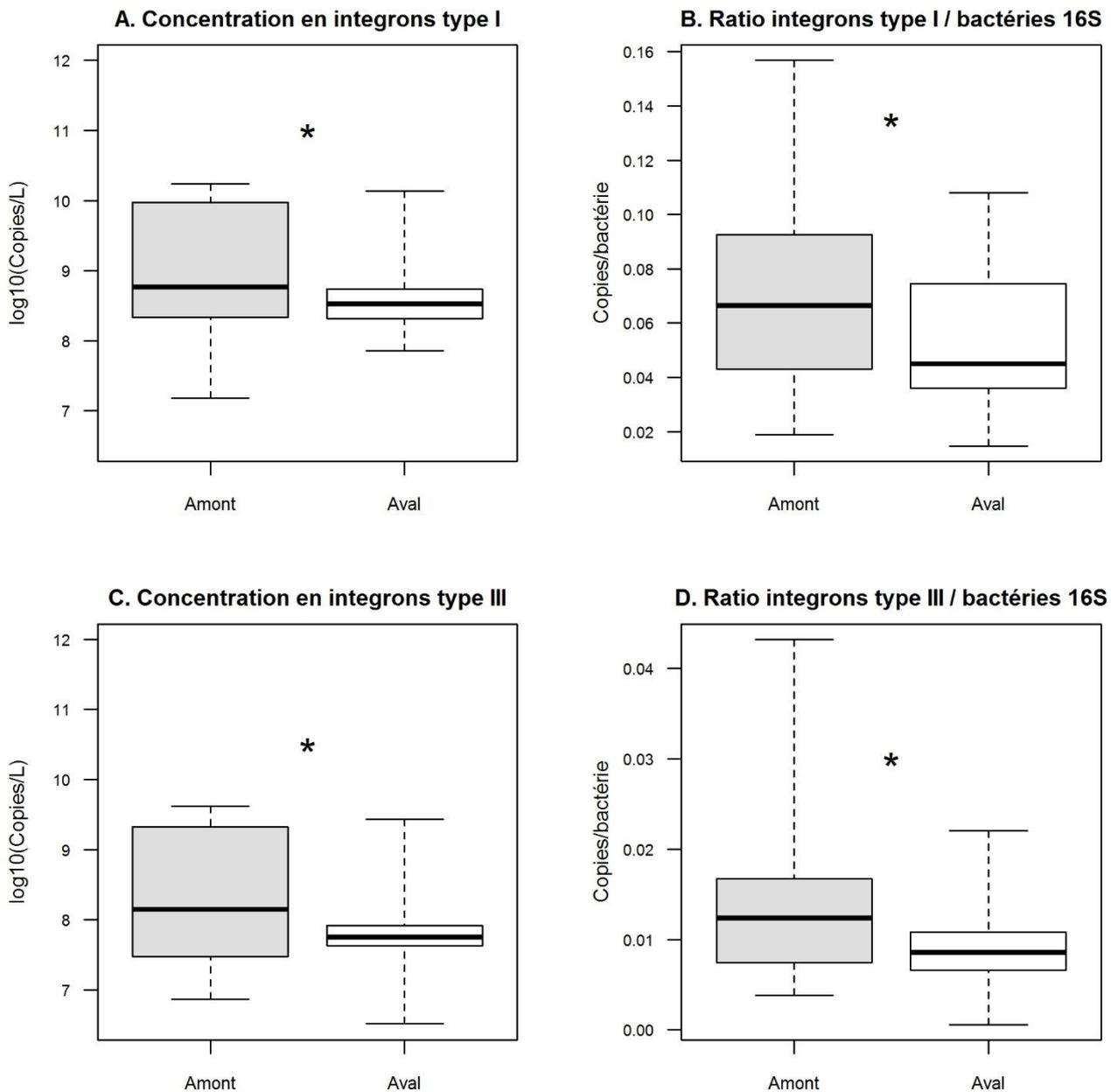


Figure 4 : Comparaison des résultats de concentration et de ratio d'intégrons de type 1 et 3 entre les échantillons d'eau prélevés en amont et en aval de la galerie. Les étoiles indiquent les différences significatives (test de comparaison des moyennes, Student, $p < 0,05$)

Les résultats pour les deux types d'intégrons quantifiables montrent des différences significatives entre l'eau prélevée en amont et celle prélevée en aval de la galerie.

Les concentrations en intégrons chutent entre l'amont et l'aval de la galerie, ainsi que les ratios par rapport au nombre de bactéries 16S correspondant. Les résultats sont cohérents avec les valeurs mesurées dans l'observatoire SIPIBEL sur les eaux urbaines.

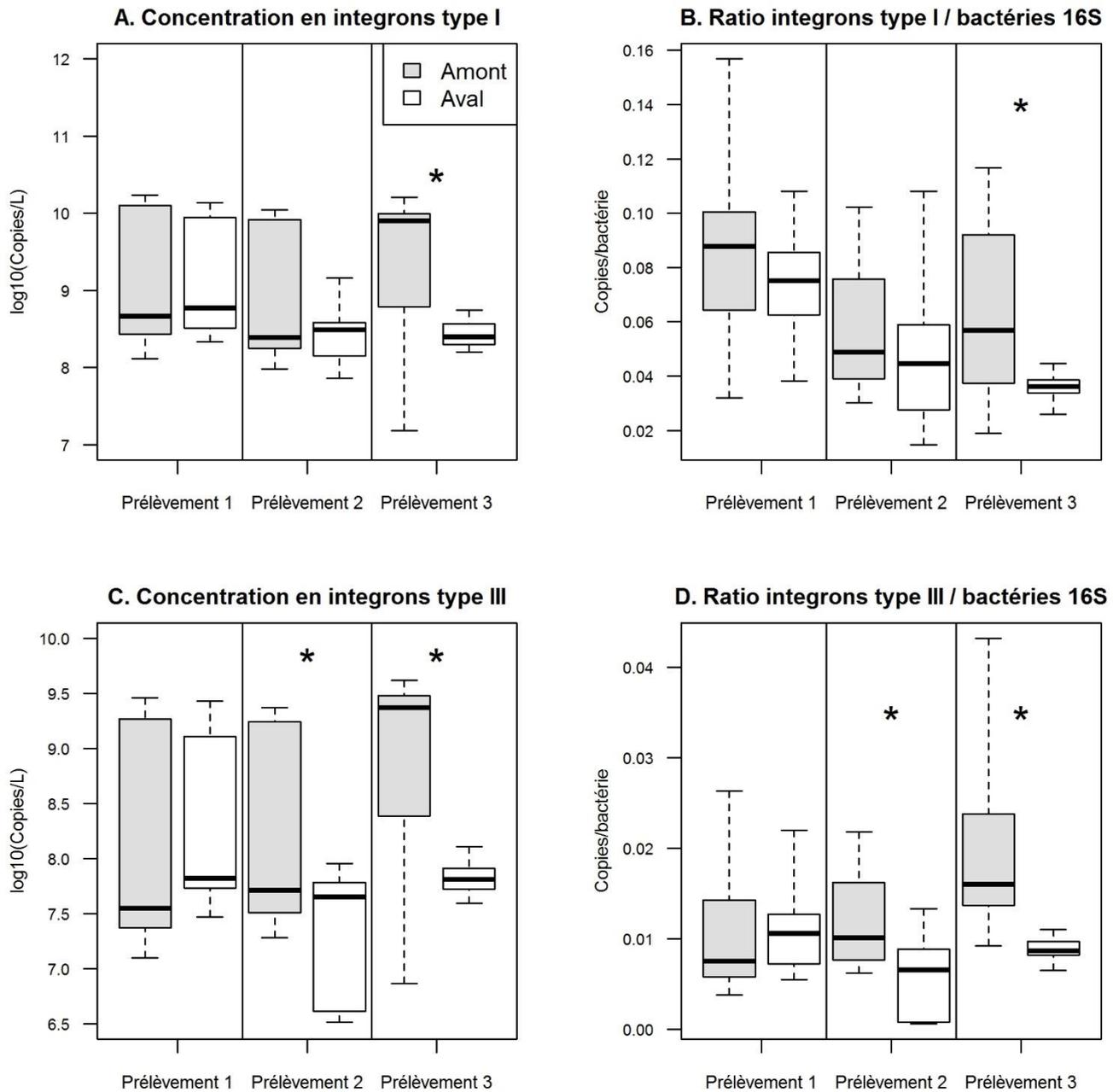


Figure 5 : Comparaison des résultats de concentration et de ratio d'intégrons de type 1 et 3 entre les échantillons d'eau prélevés pendant chacun des trois prélèvements réalisés pendant chaque campagne en amont et en aval de la galerie. Les étoiles indiquent les différences significatives (test de comparaison des moyennes, Student, $p < 0,05$)

En examinant plus finement au cours de la matinée, il apparait que la différence entre l'antibiorésistance en amont et celle en aval est surtout marquée en fin de matinée.

2.2.1.2. Résultats dans les échantillons de biofilm

Sur la figure 6, les trois types d'intégrons sont présentés car en quantité suffisante dans le biofilm pour être détectés et quantifiés.

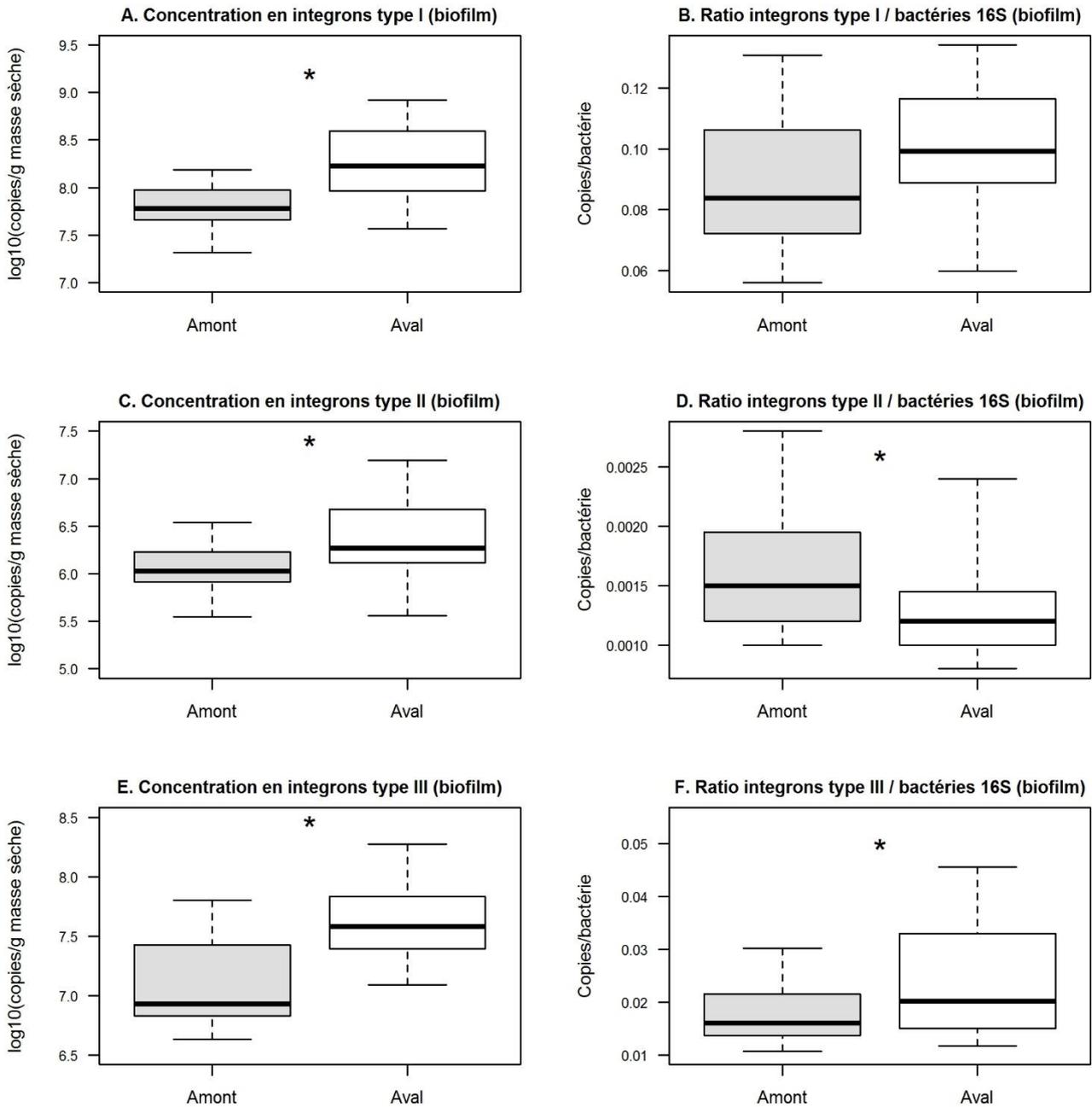


Figure 6 : Comparaison des résultats de concentration et de ratio d'intégrons de type 1, 2 et 3 entre les échantillons de biofilm prélevés en amont et en aval de la galerie. Les étoiles indiquent les différences significatives (test de comparaison des moyennes, Student, $p < 0,05$).

Des différences significatives sont mises en évidence entre le biofilm amont et aval pour les trois types d'intégrons.

L'antibiorésistance a tendance à augmenter dans le biofilm, tant en concentration par gramme de matière sèche qu'en ratio par rapport au nombre de bactéries.

BILAN INTERMÉDIAIRE

Les mesures d'antibiorésistance, approchée via la quantification des intégrons de type 1, 2 et 3, dans les eaux et le biofilm prélevés en amont et en aval de la galerie de Chouilly indiquent des différences :

- une tendance à diminuer dans les eaux dans le réseau,
- une tendance à augmenter dans le biofilm entre l'amont et l'aval de la galerie, sur du biofilm installé sur support artificiel donc ayant crû dans les mêmes conditions.

Il convient de chercher à confirmer cette tendance reposant sur un nombre limité d'échantillons. Elle correspondrait à un enrichissement du biofilm par les bactéries des eaux.

2.2.2. Autres résultats

En parallèle avec les études menées sur la galerie de Chouilly, deux études sont en cours :

- **Une analyse génomique** est menée par séquençage, en collaboration avec l'Université d'Idaho (Institute for Bioinformatics and Evolutionary Studies (IBEST)) via l'INSERM de Limoges (UMR 1092). Elle vise à caractériser les populations bactériennes grâce aux ARN 16S et concerne l'intégralité des échantillons de l'Observatoire SIPIBEL de janvier 2011 à novembre 2015. De plus, 95 gènes d'intérêt sont recherchés dans ces mêmes échantillons : résistances aux métaux, antibiotiques et biocides, intégrons et éléments génétiques mobiles.
- **Une étude en laboratoire** menée dans le cadre d'un programme Marie Curie pour caractériser les biofilms bactériens issus d'effluents hospitalier, urbain et « naturel » (un site peu anthropisé). Un montage expérimental a été conçu pour faire se développer du biofilm sur des lames de polystyrène plongées dans l'effluent étudié. Le même support est positionné en parallèle sur les sites où les échantillons sont prélevés en vue de comparer les résultats. Les mêmes analyses et exploitations des données que citées précédemment seront effectuées sur ces biofilms. L'objectif est de comparer les résultats à ceux obtenus 1) pour les échantillons de SIPIBEL dans le cadre de l'anthropisation des milieux et 2) pour les échantillons prélevés dans le réseau (galerie de Chouilly).



Figure 7 : Dispositif pilote de développement de biofilm.

3. BIO-ESSAIS

3.1. Matériels et méthodes

3.1.1. Bioessais réalisés

Ces essais sont réalisés dans le cadre d'une collaboration entre le LEHNA (UMR 5023, Université de Lyon, CNRS, ENTPE), l'UMR 8079 (Université Paris-Sud, CNRS, AgroParisTech), PROVADEMSE (INSAVALOR) et TOXEM.

Tableau II : Liste des bioessais réalisés dans le cadre du projet RILACT tâche 3.1.

Famille de bioessais	Bioessais	Traitement de l'échantillon
<i>Essai d'écotoxicité aiguë</i>	Inhibition de la mobilité de <i>Daphnia magna</i> Norme ISO 6341 Après 24 et 48 h, un dénombrement est effectué des daphnies encore mobiles exposées à une gamme de concentration de la matrice étudiée.	Frais et congelé, non filtré
<i>Essais d'écotoxicité chronique</i>	Inhibition de la croissance de l'algue <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> Norme NF T90-375 Mesure, après 72 h, de l'inhibition de la croissance d'une population algale exposée à une gamme de concentration de la matrice étudiée.	Congelé, filtré à 0.45 µm
	Inhibition de la reproduction du rotifère <i>Brachionus calyciflorus</i> Norme NF ISO 20666 Mesure, après 48 h, de l'inhibition de la reproduction de rotifères exposés à une gamme de concentration de la matrice étudiée.	Congelé, filtré à 0.45 µm
	Inhibition de la croissance de l'ostracode <i>Heterocypris incongruens</i> selon protocole du concepteur du Toxkit® à 95 % Norme ISO 14371 Mesure, après 6 jours, de l'inhibition de la croissance des ostracodes exposés à la matrice étudiée.	Congelé, non filtré
<i>Essais de génotoxicité</i>	SOS chromotest, sur extrait Quillardet <i>et al.</i> , 1985; White <i>et al.</i> , 1996	Sur extrait en colonne (voir paragraphe suivant)
<i>Détection d'effets perturbateurs endocriniens</i>	Perturbation de la transcription des récepteurs aux estrogènes sur lignée cellulaire MELN et des récepteurs aux androgènes sur lignée cellulaire AIZ-AR, sur extrait Jugan <i>et al.</i> , 2009	Sur extrait en colonne (voir paragraphe suivant)

3.1.2. Traitement des échantillons

3.1.2.1. Écotoxicologie

Les échantillons, nommés Amont 1, Aval 1, Amont 2, Aval 2 et Amont 3, Aval 3, ont été utilisés frais ou congelés et filtrés à 0,45 µm ou non filtrés, selon les besoins du test.

3.1.2.2. Génotoxicité et effets perturbateurs endocriniens

Le sous-échantillonnage est réalisé dans 4 bouteilles en verre ambré de 1L propre et autoclavées, avec bouchon en téflon. Les échantillons sont conservés à + 4°C et envoyés au laboratoire par transporteur, pour une réception le lendemain matin.

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). Deux cent cinquante mL d'eau sont filtrés sur des filtres préalablement et postérieurement séchés à 105°C pendant 2 heures, pour mesurer les 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). Les cartouches sont 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.

Modèles cellulaires pour l'évaluation des perturbations endocriniennes

Deux modèles biologiques bioluminescents, MELN (Balaguer *et al.*, 1999) et AIZ-AR (Bartonkova *et al.*, 2015), ont été utilisés pour mesurer les perturbations œstrogéniques et androgéniques des extraits. Ces cellules ont été transfectées avec le gène de la luciférase, placé sous le contrôle d'un élément de réponse respectivement aux œstrogènes ou aux 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 antagoniste des extraits sur la transcription des récepteurs est mesuré par l'ajout simultané de l'hormone de référence (17 β œstradiol ou dihydrotestostérone) à une dose correspondante à l'EC50 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*10⁴ 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 16 h en présence et en absence des extraits repris dans du DMSO et dilués au 1/1000 dans le milieu de culture.

Les cellules AIZ-AR ont étéensemencés dans des plaques 96 puits blanches à une densité de 2*10⁴ cellules/puits avec un milieu RPMI sans rouge de phénol, supplémenté par 10 % de SVF déprivé, 1 % de glutamine, 1 % d'antibiotiques et cultivé 24 heures avant utilisation. Les cellules sont ensuite incubées 24 h en présence et en absence des extraits repris dans du DMSO et dilués au 1/1000 dans le milieu de culture. L'effet antagoniste sur le modèle AIZ-AR est mesuré en équivalent de flutamide.

Test de cytotoxicité au bleu alamar sur les cellules de mammifères

Après la durée d'incubation des cellules des lignées déjà décrites, le milieu est changé pour un milieu similaire supplémenté avec 0,1 % de bleu alamar à la concentration de 1 μ M. Une lecture de la fluorescence à 590 nm après une excitation à 530 nm est réalisée à t0 puis après 2 heures d'incubation.

Évaluation in vitro des effets perturbateurs de la transcription des récepteurs aux hormones

Après incubation, les cellules sont lavées au 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 réplicats. En parallèle, une courbe dose-réponse de l'hormone naturelle principale est mesurée pour quantifier l'activité en ng/L équivalent en 17 β œstradiol (E2) pour le modèle MELN et équivalent en dihydrotestostérone (DHT) pour le modèle AIZ-AR.

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 β -galactosidase exprime l'activation du système SOS. Les résultats sont formulés selon 2 variables distinctes, permettant d'exprimer de manières différenciées, d'une part, le facteur d'induction de génotoxicité à la concentration de 500X et d'autre part, la première concentration significativement différente du blanc d'extraction.

La souche PQ37 est cultivée en milieu LB supplémenté avec 20 μ g/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 $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,4, signifiant une phase exponentielle de croissance. Cette dernière culture est diluée au 1/10, soit en milieu LB, soit avec un mélange d'activateurs métaboliques (S9mix). Une fraction bactérienne (145 μ L) est distribuée dans des tubes Eppendorf contenant 5 μ L d'extrait et incubée 2 h à 37°C puis, les activités β -galactosidase et phosphatase alcaline sont réalisées en 3 réplicats. En parallèle, une courbe dose-réponse d'un génotoxique direct connu (4NQO) est mesurée pour vérifier le bon déroulement du test.

Fractionnement CLHP

La chaîne CLHP JASCO utilisé pour cette étude comprend un auto échantillonneur AS-1550/1555, une pompe PU-1580 équipée de détecteurs UV et à fluorescence. Les séparations chromatographiques ont été réalisées sur une colonne Zorbax extend C18 de 4,6 mm x 150 mm, 5 μ m (Agilent, Massy , France).

3.2. Résultats

3.2.1. Écotoxicité

3.2.1.1. Croissance de *Heterocypris incongruens*

Ce bioessai a été réalisé uniquement sur la première campagne et abandonné par la suite car il s'est révélé trop peu sensible sur ce type de matrice : la mortalité des organismes exposés a été très faible et aucune inhibition de leur croissance n'a été observée.

3.2.1.2. Inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*

Pour la première campagne ce test a été réalisé sur les échantillons frais non filtrés puis sur les échantillons congelés non filtrés. Par la suite, ce bioessai a été réalisé uniquement sur des échantillons congelés filtrés ou non filtrés. Dans les tableaux ci-dessous, sont présentés les CE50 obtenues pour chaque échantillon, Amont 1, 2 et 3 et Aval 1, 2 et 3.

CE50 : concentration en matrice étudiée qui inhibe à 50% l'effet biologique observé. Plus la CE50 est faible plus l'échantillon est toxique.

Tableau III : Résultats du bioessai de mobilité des daphnies réalisé sur échantillons frais, non filtrés :

		Prélèvement n°1		Prélèvement n°2		Prélèvement n°3	
		Amont 1	Aval 1	Amont 2	Aval 2	Amont 3	Aval 3
Campagne 06/07	CE50 48h =	> 90	> 90	75,9	> 90	62,5	88,8

Tableau IV : Résultats du bioessai de mobilité des daphnies réalisé sur échantillons congelés, non filtrés :

		Prélèvement n°1		Prélèvement n°2		Prélèvement n°3	
		Amont 1	Aval 1	Amont 2	Aval 2	Amont 3	Aval 3
Campagne 06/07	CE50 48h =	> 90	84,2	79	71,3	65,3	> 90
Campagne 15/11	CE50 48h =	> 90	> 90	74,4	54,4	73,6	77,6
Campagne 08/12	CE50 48h =	34,7	64,0	69,5	66,7	51,5	67,5

Tableau V : Résultats du bioessai de mobilité des daphnies réalisé sur échantillons congelés, filtrés :

		Prélèvement n°1		Prélèvement n°2		Prélèvement n°3	
		Amont 1	Aval 1	Amont 2	Aval 2	Amont 3	Aval 3
Campagne 15/11	CE50 48h =	60,7	51,7	44,3	73,5	53,6	> 90
Campagne 08/12	CE50 48h =	70,7	75,2	> 90	> 90	40 < CE50 < 60	83,6

Les valeurs de CE50 indiquent une faible toxicité des échantillons testés (les CE50 sont toujours supérieures à 30 %). Les valeurs obtenues sont cohérentes avec celles obtenues pour les effluents urbains testés dans le cadre de l'observatoire SIPIBEL au niveau de la STEP de Bellecombe.

La comparaison des résultats sur échantillon frais ou congelé indique peu de différence dans les valeurs de CE50 obtenues, ce qui confirme la pertinence de continuer les bioessais sur échantillons congelés. La filtration ou l'utilisation

de l'échantillon brut modifie la toxicité mesurée mais de façon non homogène (parfois elle augmente, parfois elle diminue), cependant cette différence n'est pas très marquée et s'applique à des toxicités faibles.

Pour certains couples d'échantillons Amont/Aval, il apparaît des écarts de valeurs des CE50 mais les différences ne vont pas toutes dans le même sens :

- Dans environ 44 % des cas, cette différence indique une augmentation de l'écotoxicité entre l'amont et l'aval,
- Dans environ 11 % des cas, il s'agit d'une diminution de cette toxicité,
- Dans les cas restants, il n'y a pas de différence.

3.2.1.3. *Reproduction de Brachionus calyciflorus*

Ce bioessai a été réalisé au sein du laboratoire PROVADEMSE (INSAVALOR). Les échantillons ont été congelés et filtrés.

CE50 : concentration en matrice étudiée qui inhibe à 50% l'effet biologique observé. Plus la CE50 est faible plus l'échantillon est toxique.

Tableau VI : Résultats du bioessai de reproduction des rotifères réalisé sur échantillons congelés, filtrés (NT = non toxique, NR = non réalisé)

		Prélèvement n°1		Prélèvement n°2		Prélèvement n°3	
		Amont 1	Aval 1	Amont 2	Aval 2	Amont 3	Aval 3
Campagne 06/07	CE20 48h =	84,4	56,6	72	33,8	75,8	76
Campagne 15/11	CE20 48h =	NT	NR	95,7	35,1	68,2	NT
Campagne 08/12	CE20 48h =	58,0	62,4	29,3	75,2	50,7	40,9

Les résultats indiquent une faible toxicité des échantillons testés et quelques écarts de CE20 entre amont et aval mais avec une certaine variabilité.

3.2.1.4. *Croissance de Pseudokirchneriella subcapitata*

CE50 : concentration en matrice étudiée qui inhibe à 50% l'effet biologique observé. Plus la CE50 est faible plus l'échantillon est toxique.

Tableau VII : Résultats du bioessai de croissance algale réalisé sur échantillons congelés, filtrés (NR = non réalisé)

		Prélèvement n°1		Prélèvement n°2		Prélèvement n°3	
		Amont 1	Aval 1	Amont 2	Aval 2	Amont 3	Aval 3
Campagne 06/07	CE20 72h =	> 80	> 80	55,89	51,55	46,7	49,28
Campagne 15/11	CE20 72h =	41,2*	52,4*	35,0*	NR	28,5*	35,2*
Campagne 08/12	CE20 72h =	44,9*	35,3*	NR	NR	35,8*	39,8*

Les astérisques concernent des résultats obtenus dans des conditions non normalisées en raison de problèmes techniques.

Il n'apparaît pas de différences entre amont et aval pour ce bioessai, les résultats montrent peu de toxicité sur cet organisme.

BILAN INTERMÉDIAIRE

Les résultats des bioessais réalisés sur les échantillons d'eau urbaine sont complémentaires car chaque organisme réagit à des polluants et des conditions spécifiques. **La toxicité mesurée est peu importante** pour les trois bioessais ce qui rend difficile de conclure sur des différences amont/aval. **Les différences de toxicité entre amont et aval ne sont pas très marquées** et varient dans le sens d'une augmentation ou d'une diminution de la toxicité selon les cas.

Ces résultats pourront être confrontés aux données chimiques pour trouver des liens entre la présence de molécules et la toxicité observée.

Un nouveau test pourrait permettre d'aller plus finement sur une différenciation d'un couple Amont/Aval : il s'agit d'un test chronique de reproduction de *Ceriodaphnia dubia* sur une semaine (7 jours). Un test préliminaire sur des échantillons de la campagne du 15/11/16 est en cours au moment de la rédaction de ce rapport.

3.2.2. Génotoxicité

Les analyses ont été réalisées pour chaque extrait sur la partie dissoute des échantillons.

Le tableau VIII présente, pour chaque extrait, la première concentration significativement différente du blanc d'extraction et le facteur d'induction à la concentration de 500 X (FI₅₀₀).

Tableau VIII : Première concentration significativement différente du témoin (Début Sign) et facteur d'induction du SOS chromotest (FI500) pour les prélèvements réalisés en amont et en aval du réseau d'assainissement, avec et sans activateur métabolique (S9). Rouge -> effets importants. Orange-> effets intermédiaires. Vert-> peu d'effets

		Prélèvement n°1				Prélèvement n°2				Prélèvement n°3			
		Amont		Aval		Amont		Aval		Amont		Aval	
		Début Sign	FI ₅₀₀	Début Sign	FI ₅₀₀	Début Sign	FI ₅₀₀	Début Sign	FI ₅₀₀	Début Sign	FI ₅₀₀	Début Sign	FI ₅₀₀
Sans S9	Campagne 06/07	500X	1,26	500X	1,47	100X	3,58	100X	2,99	10X	3,67	10X	3,87
	Campagne 15/11	500X	1,64	500X	2,63	100X	3,76	100X	3,32	100X	3,36	100X	3,55
	Campagne 08/12	500X	1,14	500X	1,19	1X	2,47	100X	1,38	10X	2,10	1X	2,12
Avec S9	Campagne 06/07	500X	1,38	100X	1,56	10X	4,77	100X	3,40	10X	3,88	10X	3,75
	Campagne 15/11	500X	1,26	500X	1,45	500X	2,61	500X	1,59	100X	3,09	10X	2,09
	Campagne 08/12	500X	3,69	500X	3,79	500X	3,44	500X	5,29	100X	7,23	100X	3,87

Les échantillons montrent tous un signal de génotoxicité. Les échantillons de la campagne de décembre, sans S9, en amont n°2 et en aval n°3 présentent une génotoxicité significative qui serait perceptible dans l'eau non concentrée.

Concernant l'évolution dans le réseau :

- la campagne de juillet sans S9, ne montre pas de tendance. Avec S9, les évolutions sont contradictoires selon les échantillons,
- la campagne de novembre, sans S9, ne montre pas de tendance. Avec S9, apparaît une légère diminution du signal. Le prélèvement n°3 est plus génotoxique que les autres,-

- la campagne de décembre, sans S9, montre des signaux contradictoires. Avec S9, la campagne de décembre ne montre pas d'évolution significative et des signaux contradictoires.

Aucune conclusion significative d'évolution dans le réseau ne peut être dégagée des résultats.

3.2.3. Effets perturbateurs endocriniens

Les analyses ont été réalisées sur chaque extrait de la phase dissoute des échantillons.

- Toxicité cellulaire : aucun effet toxique sur la survie des deux lignées cellulaires n'a été détecté pour l'ensemble des échantillons aux concentrations dosées.

3.2.3.1. Perturbation de la transcription des récepteurs aux œstrogènes

- Aucun effet antagoniste n'a été observé pour les extraits des différents échantillons.
- Effets agonistes :

Les échantillons montrent tous une activité œstrogénomimétique. L'échantillon du 6 juillet a montré une activité extrêmement et anormalement importante sans que nous ne puissions l'expliquer.

Les campagnes de novembre et décembre montrent des niveaux élevés mais plus proches de ce qui est habituellement observé dans des eaux usées brutes.

Concernant l'évolution dans le réseau : la campagne de juillet montre des évolutions à la hausse et à la baisse selon les échantillons, ne permettant pas de conclure. La campagne de novembre ne montre pas d'évolution pour les prélèvements n°1 et 2 et une faible diminution pour le n°3. La campagne de décembre ne montre pas d'évolution pour le prélèvement n°1 une augmentation pour le 2 et une faible diminution pour le 3.

Tableau IX : Effets œstrogénomimétiques observés en entrée et en sortie du réseau lors des trois campagnes de prélèvement.
Rouge -> effets importants. Vert-> absence d'effet.

	blanc échantillon	Prélèvement n°1		Prélèvement n°2		Prélèvement n°3	
		Amont	Aval	Amont	Aval	Amont	Aval
Campagne 06/07	agoniste eq E2 (ng/L)	vert	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
Campagne 15/11		rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge
Campagne 08/12		rouge	rouge	rouge	rouge	rouge	rouge

Conclusion : **aucun signal clair** ne peut être conclu des évolutions observées dans le réseau.

3.2.3.2. Perturbation de la transcription des récepteurs aux androgènes :

- Effet antagoniste

Seul l'extrait du prélèvement n°3 de la campagne de juillet présente une activité antagoniste quantifiable sans évolution dans le réseau.

Tableau X : Effets androgénomimétiques en entrée et en sortie du réseau lors des trois campagnes de prélèvement.
 Rouge -> effets importants. Orange-> effets intermédiaires. Vert-> absence d'effet.

		blanc échantillon	Prélèvement n°1		Prélèvement n°2		Prélèvement n°3	
			Amont	Aval	Amont	Aval	Amont	Aval
Campagne 06/07	agoniste eq E2 (ng/L)	négatif	340	370	280	280	240	210
	antagoniste eq flutamide (µg/L)	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	20	15
Campagne 15/11	agoniste eq E2 (ng/L)	négatif	730	800	650	650	530	320
	antagoniste eq flutamide (µg/L)	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif
Campagne 08/12	agoniste eq E2 (ng/L)	négatif	340	340	560	520	450	530
	antagoniste eq flutamide (µg/L)	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif	négatif

➤ Effets agonistes

Les échantillons montrent tous une activité androgénomimétique avec des niveaux légèrement supérieurs à ce qui est habituellement constaté dans des eaux usées brutes.

Concernant l'évolution dans le réseau : la campagne de juillet ne montre pas d'évolutions selon les prélèvements. La campagne de novembre ne montre pas d'évolution pour les prélèvements n°1 et 2 et une diminution pour le n°3. La campagne de décembre ne montre pas d'évolution pour les prélèvements n°1 et 2 et une augmentation pour le n°3.

Conclusion : aucune conclusion significative d'évolution dans le réseau ne peut être dégagée des résultats.

3.2.4. Développement du protocole d'analyses dirigées par les bioessais (Effect Directed Analysis)

Dans un premier temps, un fractionnement primaire a été réalisé afin de connaître les fractions contenant les perturbateurs endocriniens. La phase mobile utilisée est constituée par de l'eau avec un gradient d'acétonitrile entre 5 % et 100 % et un débit de 0,5 mL/min.

Les fractions (arbitrairement au nombre de 15) sont ensuite évaporées et reprises dans du DMSO pour réaliser les essais biologiques. L'analyse biologique de l'ensemble de ces fractions a révélé la présence des composés perturbateurs endocriniens dans les fractions 10 à 12, soit des composés élués avec un gradient de phase mobile compris entre 70 % et 100 % d'acétonitrile. Ceci signifie que la majorité de l'activité est centrée sur une part du gradient correspondant à des molécules moyennement apolaires et permet déjà d'éliminer les autres contaminants présents dans les fractions négatives et ainsi de commencer la purification des extraits.

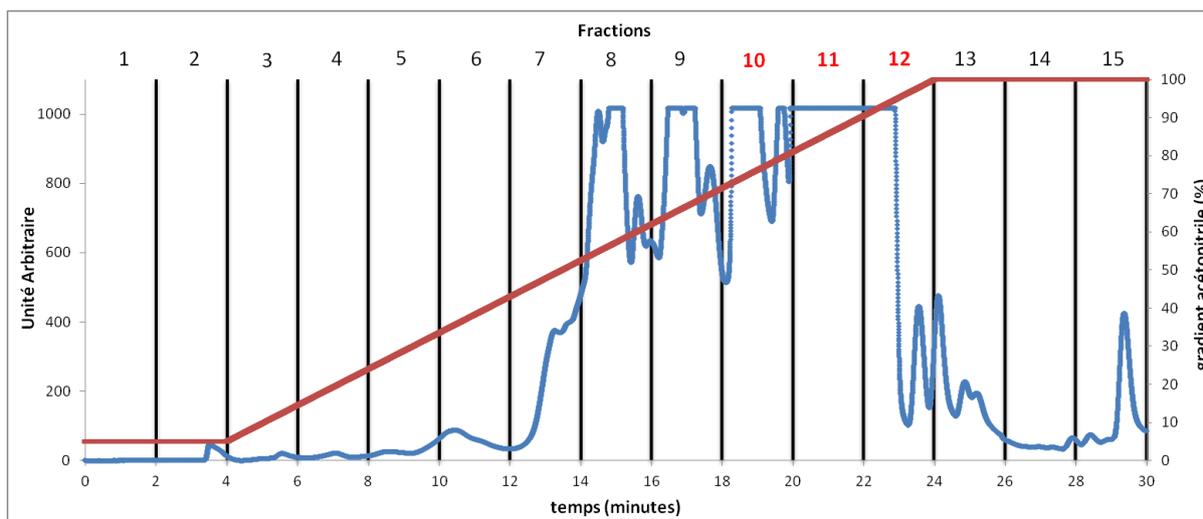


Figure 8 : Exemple de chromatogramme CLHP, avec détection par fluorescence, obtenu à partir d'un extrait de la première campagne couplé au gradient de phase mobile (en rouge). Les fractions contenant des substances œstrogénomimétiques sont notées en rouge.

Afin d'optimiser et de sélectionner au mieux les fractions intéressantes, un deuxième fractionnement a été réalisé avec un gradient de phase mobile compris entre 40 % et 100 % d'acétonitrile et un débit de 1 mL/min. L'analyse biologique de l'ensemble de ces fractions a révélé la présence des composés perturbateurs endocriniens dans les fractions 2, 3, 4, 6 et 7.

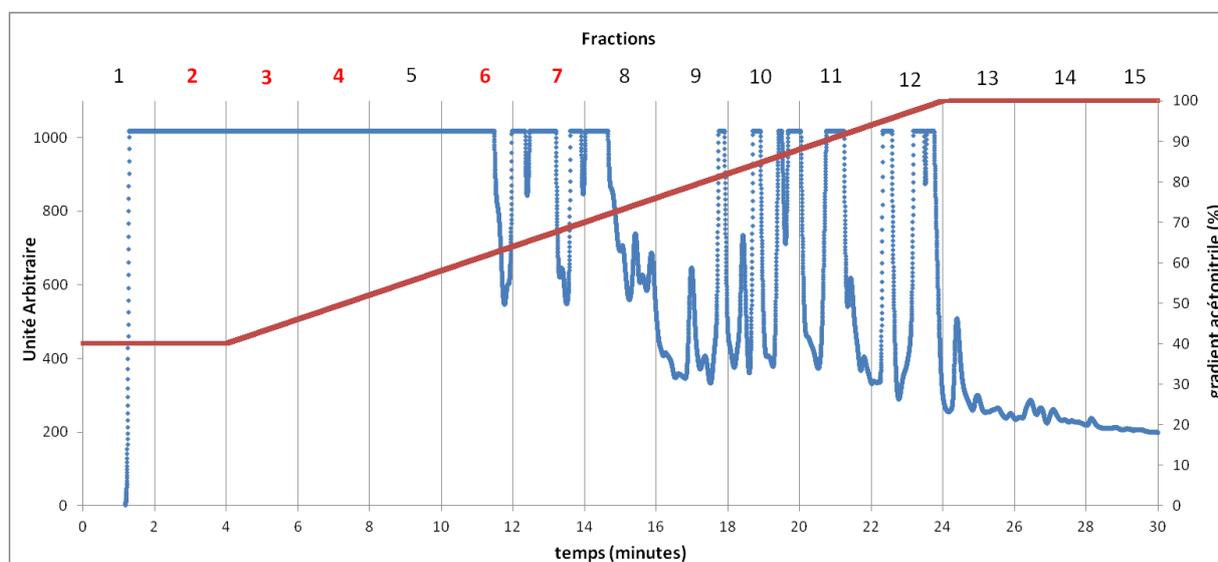


Figure 9 : Exemple de chromatogramme CLHP obtenu lors du deuxième essai de fractionnement à partir d'un extrait de la première campagne couplé au gradient de phase mobile (en rouge). Les fractions contenant des substances œstrogénomimétiques sont notées en rouge.

De nouveaux gradients de fractionnements sont en réalisation pour améliorer la séparation des fractions actives avant de procéder à l'examen des échantillons les plus significatifs.

CONCLUSIONS PROVISOIRES

L'étude des effets biologiques des échantillons prélevés en réseau d'assainissement urbain à l'occasion de trois campagnes ne permet pas de mettre en évidence de conclusions claires.

Les bio-essais utilisés montrent que ces échantillons sont peu écotoxiques, il est donc difficile de faire ressortir des différences marquées entre l'amont et l'aval. Ces mêmes bio-essais avaient pourtant montré, lors des travaux SIPIBEL sur les effluents urbains, que leur sensibilité était suffisante pour distinguer les effluents urbains bruts et traités. Ils pourraient s'avérer ici insuffisamment sensibles pour distinguer des effluents en deux points du réseau, soit parce qu'ils sont déjà partiellement dégradés dès le point amont, soit parce qu'ils sont moins toxiques que ceux de la station de SIPIBEL, soit les deux à la fois. Dans ces conditions, comme pour le suivi de l'écotoxicité des effluents après différentes étapes du traitement du site SIPIBEL (Projet TRIUMPH), il pourrait être proposé de mettre en œuvre un bio-essai d'écotoxicité plus sensible (mais plus coûteux), tel que le test de reproduction sur *Ceriodaphnia Dubia* (à valider toutefois par un essai préliminaire sur l'effluent).

Les effets génotoxiques et perturbateur endocrinien ne montrent pas de dynamique marquée dans le réseau. Les données d'antibiorésistance semblent montrer un phénomène d'enrichissement des biofilms en intégrons parallèlement à un appauvrissement dans les eaux mais il n'est pas possible de conclure sur la base des résultats actuels.

Les équipes de recherches impliquées dans la tâche 3.1 mènent désormais une réflexion sur la suite des expérimentations à mener pour répondre aux objectifs du projet RILACT.

La poursuite des campagnes de prélèvement sur la galerie de Chouilly pourrait permettre de consolider ces premières conclusions : le protocole de prélèvement devra néanmoins être modifié, avec par exemple la réalisation de prélèvements intégratifs de plusieurs heures, à la place des prélèvements ponctuels réalisés jusqu'ici.

Le réseau étudié se situe néanmoins loin du point d'émission et les phénomènes dynamiques, s'ils existent, ont peut-être déjà eu lieu avant le point amont de la galerie. Il pourrait ainsi être intéressant de mener des campagnes de mesures sur une autre typologie de réseau, tel qu'un réseau hospitalier. En effet, le choix d'un réseau hospitalier permettrait d'être plus proche de l'émission de l'effluent et les effets biologiques seraient potentiellement plus importants donc plus facilement discriminables.