



Année de programmation 2015 – **Domaine Risques liés aux contaminants aquatiques- Action224**

# Développement d'un outil biologique simplifié pour caractériser la toxicité d'eaux usées : l'InSiKit

## Livrable 1.4.d du projet LUMIEAU-STR

Anthony MARCONI (Tronico Vigicell)

Juin 2019

Document élaboré dans le cadre de l'appel à projets « Innovations et changements de pratiques: lutte contre les micropolluants des eaux urbaines »



En partenariat avec :



« Avec le soutien de »





- **AUTEURS**

**Anthony MARCONI**, Directeur Innovation (Tronico Vigicell), [anthony.marconi@vigicell.fr](mailto:anthony.marconi@vigicell.fr)

- **CORRESPONDANTS**

**AFB : Pierre-François STAUB**, Interlocuteur Projet, [pierre-francois.staub@afbiodiversite.fr](mailto:pierre-francois.staub@afbiodiversite.fr)

**AERM : Claire RIOU**, Interlocuteur Projet, [claire.riou@eau-rhin-meuse.fr](mailto:claire.riou@eau-rhin-meuse.fr) et **Roger FLUTSCH**, Interlocuteur Projet, [roger.flutsch@eau-rhin-meuse.fr](mailto:roger.flutsch@eau-rhin-meuse.fr)

- **AUTRES CONTRIBUTEURS**

**Maxime POMIES**, chef de Projet (Eurométropole de Strasbourg), [macxime.pomies@strasbourg.eu](mailto:macxime.pomies@strasbourg.eu)

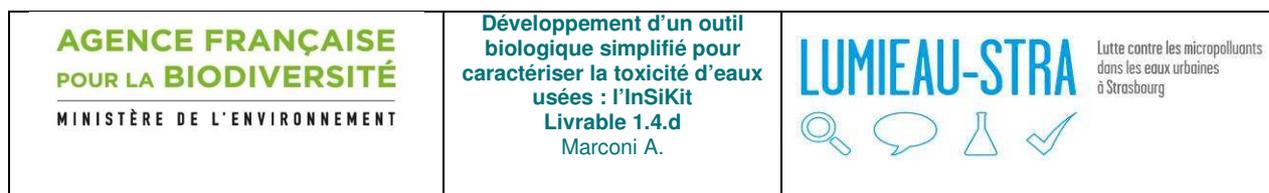
**Laurent PAULIC**, Directeur Etude (Tronico Vigicell), [laurent.paulic@vigicell.fr](mailto:laurent.paulic@vigicell.fr)

**Droits d'usage** : libre accès

**Niveau géographique** : national

**Couverture géographique** : Eurométropole de Strasbourg

**Niveau de lecture** : professionnels, experts



## • RESUME

Dans le cadre de la tâche 1.4.d du projet Lumieau-Stra piloté par l'Eurométropole de Strasbourg, l'entreprise Tronico Vigicell a conduit des travaux de R&D visant à mettre au point un kit de bioessais simple et rapide permettant de hiérarchiser des effluents selon leurs impacts toxiques dans une optique de cartographie des réseaux d'assainissement.

Les réflexions et les travaux ont été menés à partir des concepts défendus par l'entreprise depuis 20 ans et sur la base de son expérience dans le domaine des bioessais. Ainsi, la voie d'un panel de bioessais assorti d'un différentiel d'organismes a été privilégiée. De la même façon, un contexte d'utilisation et une typologie d'utilisateur ont été peu à peu circonscrits.

Divers travaux de recherche ont été conduits, pour aboutir au schéma suivant :

- ▶ Kit à usage unique en microplaque 96 puits,
- ▶ A destination d'opérateurs de laboratoires terrains disposant d'un luminomètre adapté au format microplaques,
- ▶ Kit fondé sur la mise en œuvre de 3 bactéries naturellement bioluminescentes conditionnées sous forme lyophilisée,
- ▶ Applicable sur des eaux usées filtrées ou non, sans prétraitement, dans un but de hiérarchisation des impacts toxiques.

Le prototype du Kit ainsi défini, a été mis en œuvre sur des eaux de réseau d'assainissement prélevées dans le cadre du projet LUMIEAU-Stra. Parallèlement, des travaux de caractérisation physico-chimique ainsi que par d'autres bioessais ont été conduits sur ces mêmes échantillons.

6 échantillons dûment documentés ont été mis en contact avec le Kit en aveugle.

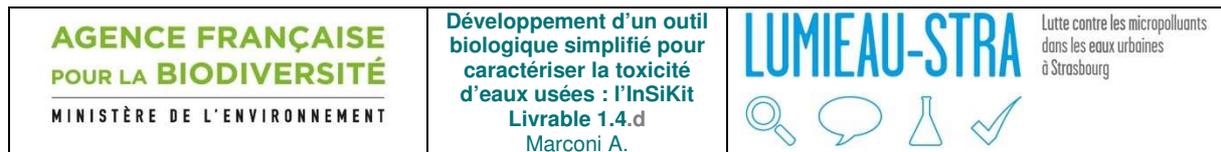
Dans le cadre de cette démonstration, il résulte que le prototype produit a permis de hiérarchiser 5 de ces 6 échantillons, selon un gradient de toxicité compatible avec les éléments connus et mesurés caractérisant les échantillons.

Cette démonstration réalisée, en condition d'usage il revient à l'opérateur de choisir l'information qu'il veut obtenir au final et donc la pertinence de hiérarchiser tel ou tel échantillons l'un par rapport à l'autre

Bien qu'encore imparfait et nécessitant divers travaux complémentaires, dont une validation sur une plus grande quantité d'échantillons et un travail sur la formalisation simplifiée des résultats, ces premiers résultats laissent penser que ce Kit est à même de répondre dès maintenant à l'usage pour lequel il a été conçu.

## • MOTS CLÉS

Eaux usées, rejets, diagnostic, bioessais, kit, bioluminescence, bactéries, panel, toxicité, hiérarchisation, outil, opérationnel



- **DEVELOPMENT OF A SIMPLIFIED BIOLOGICAL TOOL TO CHARACTERIZE WASTEWATER TOXICITY**

- **ABSTRACT**

In frame of the spot 1.4.d of the Lumieau-Stra project piloted by the Eurometropole of Strasbourg, the Tronico Vigicell company led works of R&D to finalize a simple and fast bioassay kit allowing to rank effluents according to their toxic impacts in an optics of mapping of sewer systems.

The reflections and the works were led from the concepts defended by the company for 20 years and on the basis of its experience in the field of the bioassays. So, the way of a bioassays panel matched of a cells variant was favored. In the same way, a context of use and a typology of user were confined little by little.

Various research works were led, to end in the following plan :

- ▶ Single-use 96-well microplate kit,
- ▶ For field laboratory operators with a luminometer adapted to the microplate format,
- ▶ Kit based on the implementation of 3 naturally bioluminescent bacteria packaged in lyophilized form,
- ▶ Applicable to filtered or unfiltered wastewater, without pretreatment, for the purpose of prioritizing toxic impacts.

The prototype of the Kit thus defined, was implemented on wastewater system water taken as part of the LUMIEAU-Stra project. At the same time, physico-chemical characterisation work and other bioassays were carried out on these same samples.

6 documented samples were brought into contact with the Kit in blind conditions.

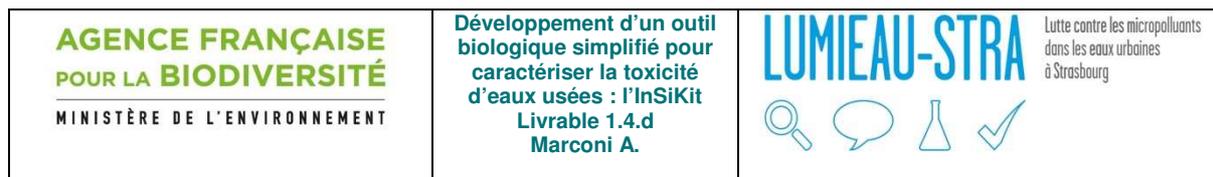
As part of this demonstration, it follows that the prototype produced allowed the prioritization of 5 of these 6 samples, according to a toxicity gradient compatible with the known and measured elements characterizing these samples.

This demonstration carried out, in condition of use, it is up to the operator to choose the information he wants to obtain at the end and therefore the relevance of prioritizing such or such samples in relation to the other.

Although still imperfect and requiring various complementary work, including validation on a larger number of samples and work on the simplified formalisation of results, these initial results suggest that this Kit is able to respond immediately to the use for which it was designed.

- **KEY WORDS**

Wastewater, discharge, diagnosis, bioassay, panel, toxicity, prioritization, tool, operational



- **SYNTHÈSE POUR L'ACTION OPÉRATIONNELLE**

### **Contexte**

La caractérisation des pollutions des eaux repose aujourd'hui sur les analyses physico-chimiques. Cette approche classique d'évaluation de la pollution présente des limites. La diversité croissante des substances chimiques mises sur le marché, au final retrouvées dans les divers milieux aquatiques, pose des défis analytiques évidents : les listes de suivi s'accroissent sans pour autant rester à jour (échelles de temps de la réglementation, question délicate de la substitution) alors que les inconnues quant au devenir des divers composés (dégradation ou persistance, formation de métabolites etc.) s'accumulent. Les analyses sont donc de plus en plus complexes et coûteuses. De plus, les substances mises sur le marché sont dans la grande majorité des cas conçues et vendues sur la base de leur réactivité chimique et/ou biologique : elles sont donc rarement inertes. Elles soulèvent naturellement la question des effets de leur présence dans les eaux, isolément ou à plus forte raison dans les mélanges complexes que constituent les pollutions actuelles. Un consensus européen émerge quant à l'inadéquation des stratégies actuelles de suivi et de gestion : les objectifs de bon état de la Directive Cadre Eau de 2027 sont d'ores et déjà considérés comme inatteignables et divers groupes experts comme le Joint Research Center, le projet SOLUTIONS ou la branche Européenne du Réseau International des Organismes de Bassin enjoignent à l'introduction rapide des méthodes biologiques (ou bioessais ou EBM pour « Effect-Based Methods ») dans les programmes de mesure et de gestion. Pour autant, les bioessais restent d'un abord délicat pour les opérationnels du monde de l'eau : que ce soit le manque d'usage et de familiarité, la nécessité d'acquisition de compétences ou d'équipement particuliers et surtout la potentielle complexité à interpréter la réponse biologique dans un cadre réglementaire encore peu mûr à cet égard. Les barrières à l'inclusion pourtant salutaire des EBM dans leurs problématiques sont encore nombreuses.

### **Proposition**

Le présent projet vise à s'attaquer à ces verrous, en proposant la conception et la démonstration d'un kit simple d'évaluation de la qualité des eaux, intégralement basé sur la détection de réponses biologiques pertinentes mais utilisable facilement par tout-un-chacun, sans compétence particulière sous réserve de la disponibilité d'un équipement abordable pour la mesure ou la conservation. Ce kit, dénommé provisoirement « InSiKit », prend la forme de plaques de culture cellulaire au format dit 96 puits, très répandu, dans lesquelles sont incorporées des bactéries naturellement bioluminescentes, non invasives et non pathogènes. Le but est de mettre à portée de tout opérateur, gestionnaire, responsable du monde de l'eau la pertinence et les apports démontrés des tests biologiques, sans pour autant requérir des compétences spécifiques ou des changements d'équipements et de pratiques. InSiKit a vocation à venir enrichir et éclairer les mesures et campagnes existantes de manière rapide, accessible et utile. Qui plus est, si InSiKit est une transposition nécessairement simplifiée d'une expertise de laboratoire de biotechnologie pour remplir ces objectifs, il n'en reste pas moins compatible avec l'état de l'art le plus actuel. En particulier, les études récentes invitent à l'utilisation non plus de méthodes avec des organismes et des effets biologiques uniques, mais bien à l'implémentation de panels de divers organismes et effets pour tenir compte des questions de sensibilités et réactions diverses du vivant. InSiKit a été envisagé dès le début en accord avec ces recommandations, en introduisant une diversité biologique et de réactivité dès sa conception : une des bactéries luminescentes du kit est *Aliivibrio fischeri*, bien documentée et bien connue des parties-prenantes du monde de l'eau. Elle y constitue une

référence reconnue et éprouvée. Mais InSiKit va plus loin en l'accompagnant de deux autres bactéries lumineuses cousines (un autre vibrio et photobacterium marin) avec des sensibilités différentes, constituant donc un panel « miniaturisé » d'organismes et de sensibilités à l'intérieur d'une même plaque. La luminescence des microorganismes abrités dans les plaques est en effet un reflet de la charge toxique - ou non - des eaux testées : l'intensité du signal lumineux témoigne de processus métaboliques et énergétiques des cellules, potentiellement altérés par les polluants dissous des eaux testées. Certaines variations de l'émission de lumière peuvent ainsi mettre en évidence des stress sub-létaux et/ou létaux subits par lesdites bactéries lors de leur exposition à l'échantillon test.

- Pour réaliser l'expérimentation, il suffit d'introduire les eaux à tester par simple pipetage (seulement 100µL sont nécessaires), à plusieurs niveaux de dilution, incubé la plaque à 30°C et suivre la cinétique d'émission lumineuse durant 10 heures des diverses bactéries pour récupérer une donnée pertinente de la toxicité des eaux permettant de qualifier et hiérarchiser en dangerosité, à but de gestion/prise de décision, divers types de matrices allant d'une eau de boisson à un rejet industriel. Des eaux dites de référence, contrôlées, sont fournies avec le produit.
- Le suivi de cette luminescence et l'incubation sont effectués grâce à un luminomètre de paillasse dit « lecteur de plaques », matériel extrêmement répandu et donc facile à acquérir ; les données obtenues à l'issue de l'expérience sont transcrites de manière manuelle (fonction copier/coller à partir du fichier RAWDATA de la machine) ou semi-automatisée (selon la configuration logicielle choisie) dans un fichier d'interprétation type fichier excel avec macro lui aussi fourni avec le produit.
- Après intégration des données pour chaque point/puit contenant les diverses souches et pour chaque échantillon, le fichier d'interprétation renverra un score de toxicité global agrégeant les scores des 3 souches, ainsi que le score de toxicité de chaque souche et affectera ainsi à chaque point expérimental un code couleur allant du vert au noir, illustration visuelle de l'intensité du stress mesuré pour chaque échantillon.
- Sur la base de ces données et de leur traitement par le soft, l'opérateur sera alors à même de facilement hiérarchiser ses échantillons en fonction de l'intensité de leur impact toxique.

### Synthèse des caractéristiques techniques et des objectifs poursuivis

Le tableau ci-dessous synthétise les divers aspects et propriétés évoquées pour InSiKit :

Élément	Caractéristiques
Modèle biologique	3 bactéries non OGM, non pathogènes, émettant naturellement de la lumière - panel incluant <i>Aliivibrio fischeri</i>
Support	Plaque 96 puits, blanches à fond transparent spéciales luminescence abritant les bactéries sous forme lyophilisée, conditionnée sous blister aluminé sous vide
Mesure	Bioluminescence naturellement émise par les bactéries du kit
Principe	La variation de l'intensité lumineuse des bactéries renseigne sur la toxicité des eaux testées (mortalité cellulaire ou altération de métabolismes énergétiques notamment)
Déroulement	Les eaux à tester sont pipetées directement dans les puits de la plaque. Cette dernière est mise à incuber à 30°C en parallèle de quoi les mesures sont effectuées sur des pas de temps déterminés pendant quelques heures (fonctions incubation lecture idéalement présentes en automatisme sur le matériel de mesure) pour obtenir l'intégralité de la courbe de réponse.
Données	Traitement et interprétation des mesures (intensité lumineuse en fonction du temps) par feuille de calcul tableur standard : score calculé par l'algorithme sur la base de chaque courbe de réponse obtenue le long de la mesure, transcrit en un code couleur reflétant l'intégration des réponses du panel de microorganismes.

Apport opérationnel	Mesure effective de l'impact des polluants de l'eau sur du vivant constituant une donnée nouvelle et pertinente dans la prise de décision. Gradation/hierarchisation aisée de la toxicité des eaux testées à buts de qualification, suivi etc.
Matrices	Eaux de tous types (y compris rejets), sous réserve d'un pH compris entre 6 et 8 après éventuelle correction
Matériel	Luminomètre à plaques pour la lecture (capacités d'incubation et mesures autonomes préférées pour ne pas mobiliser les opérateurs), congélateur -20°C ou réfrigérateur 4°C de base pour la conservation, pipette 100µL pour la dispense des échantillons et la réalisation des dilutions
Utilisateur	Personnel brièvement formé à l'emploi du kit mais non spécialiste, aucune compétence particulière requise au-delà
Installations	En intérieur, locaux techniques, laboratoires, sous réserve d'accès à du courant alternatif 220V de distribution commune

## Résultats et retours d'expérience du projet

Un prototype a été conçu sur la base des éléments précédents afin de servir les enjeux évoqués. Bien que sujet à améliorations, il s'est d'ores et déjà avéré en mesure d'apporter une réponse aux objectifs adoptés. Plus particulièrement :

- Un protocole de préparation des plaques par lyophilisation des 3 souches bactériennes (une souche par puit, pas de mélange de souches dans un même puit) a été testé et validé. Ce protocole permet de réaliser la mesure après simple adjonction des eaux à tester directement dans les puits avant incubation ainsi que désiré. Cette caractéristique n'est en rien triviale et constitue un facteur important de différenciation/innovation pour le kit, sans compter les difficultés techniques qu'il a fallu surmonter pour rendre possible cette formulation.
- Si la répartition des souches au sein de chaque plaque ne peut bien évidemment pas être modifiée, l'occupation de chaque puit peut rester à la discrétion de l'opérateur, qui peut décider du nombre de réplicats et de dilutions à mettre en œuvre pour la mesure (plus d'échantillons peuvent être passés au prix de moins de dilution ou réplification de chaque, par exemple). Dans le cadre du projet, une configuration de 3 échantillons d'eaux à tester, en triplicats et à 4 dilutions différentes a été favorisée afin d'assurer la collecte d'informations de caractérisation pertinentes, mais d'autres configurations pourront être suggérées en fonction de divers usages finaux ou contraintes dans le kit définitif.
- Les aspects de durée de vie/date limite de consommation/date limite de vente restent à mieux caractériser, mais en l'état les plaques préparées n'ont pas fait preuve de perte d'activité, ou en tous cas non mesurable, sur une durée de 2 mois en conservation à -20°C.
- Des tests de performances préliminaires ont été réalisés sur des gammes de concentration de dichlorophénol, norfloxacine et cuivre afin de faire la preuve du concept du différentiel de sensibilité et du panel de réponse. Ces tests se sont avérés pleinement satisfaisants et ont aussi permis la proposition - à perfectionner toutefois - d'un premier algorithme de synthèse des résultats intégrés du panel, qui livre un score d'impact associé à une transcription en code couleur.
- En l'état actuel des choses, le test nécessite un temps de mesures ponctuelles effectuées sur plusieurs heures afin d'être pleinement exploitable ; raison en est la nécessité de collecter les données des courbes de réponse pour le calcul du score d'impact. Deux voies sont possibles pour raccourcir le temps du test : des modifications de la préparation des microorganismes leur permettant une phase de réveil en solution plus rapide (existence d'un temps de latence avant que l'émission de bioluminescence ne se remette en place), voie la plus complexe, ou traitement de courbes permettant de ne pas avoir à collecter l'ensemble de la réponse (modélisations une fois le pic maximal passé, par exemple). Dans tous les cas il est important de noter que si le test dure ici plusieurs heures, dès lors que le luminomètre utilisé est un modèle thermostaté

et motorisé il se réalise de manière totalement autonome et sans requérir l'attention d'un quelconque utilisateur, n'alourdissant donc aucunement les opérations. En outre, en l'état actuel des choses la durée maximum du test (10 heures) est déjà largement inférieure, d'une part, au délai logistique si l'échantillon devait être envoyé en laboratoire (24 heures) et, d'autre part, à la durée de traitement par lesdits laboratoires entre la réception de l'échantillon et la restitution des résultats (plusieurs jours).

- 6 eaux réelles ont pu être testées (en aveugle) pour qualifier InSiKit plus avant en conditions totalement représentatives de son usage final. Ces échantillons ont été prélevés dans le cadre d'autres travaux du présent projet LUMIEAU-Stra en divers points de son réseau d'assainissement. En parallèle, des mesures de physico-chimie ont été réalisées ainsi que des tests plus poussés en laboratoire en utilisant le panel expert VigiWater de l'entreprise pour comparaison (avec les précautions d'usage quant au travail en aveugle pour la caractérisation). Les tests sont réalisés en contraste avec des eaux de référence contrôlées (qui seront fournies avec le kit).

Le prototype s'est avéré satisfaisant au regard des objectifs de R&D : il a permis une hiérarchisation rapide et sans ambiguïté des eaux testées selon leur impact, hiérarchisation confirmée par l'utilisation des panels de laboratoire VigiWater. Les résultats obtenus sont aussi corroborés par les mesures en physico-chimie : les scores de toxicités sont bien corrélés avec la diversité des substances détectées ou leurs concentrations mesurées en solution. Les expériences conduites ont mis en évidence la nécessité d'affiner l'algorithme de mesure initialement proposé, la complexité des eaux réelles étant sans commune mesure avec celle des solutions de contrôlées de substances isolées. Néanmoins, même en l'état, la richesse de l'approche panel s'est pleinement manifestée au travers de différentiels de réponses très informatifs et significatifs dans la caractérisation des eaux testées.

### **Contact**

Pour toutes questions relatives aux travaux et résultats du projet, d'InSiKit ou l'utilisation des bioessais/EBM dans l'évaluation de la qualité de l'eau :

- Laurent Paulic, Directeur des Etudes de Tronico VigiCell (nouvellement Tame-Water) : [laurent.paulic@vigicell.fr](mailto:laurent.paulic@vigicell.fr)
- Anthony Marconi, Directeur Innovation de Tronico VigiCell (nouvellement Tame-Water) : [anthony.marconi@vigicell.fr](mailto:anthony.marconi@vigicell.fr)

Site web : [www.tame-water.com](http://www.tame-water.com)

- SOMMAIRE

<b>1. Introduction .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Le principe de l’outil biologique simplifié et mise en œuvre opérationnelle 11</b>	
2.1. Les orientations générales pour le choix de l’outil .....	11
2.2. Les principes généraux du protocole de mesure .....	12
<b>3. Développements techniques.....</b>	<b>15</b>
3.1. Résultats initiaux .....	17
3.1.1. Réponse des souches au DCP (Dichlorophénol).....	18
3.1.2. Réponse des souches à la Norfloxacin .....	19
3.1.3. Réponse des souches au Cuivre (Cu).....	20
3.1.4. Interprétation des réponses des 3 souches .....	20
<b>4. Expérimentation sur des effluents.....</b>	<b>21</b>
4.1. Mesure en utilisant le Kit .....	22
4.1.1. Profil d’émission de l’échantillon 17037 .....	23
4.1.2. Profil d’émission de l’échantillon 17041/2 (Amont) .....	24
4.1.3. Profil d’émission de l’échantillon 17041/3 (Milieu) .....	25
4.1.4. Profil d’émission de l’échantillon 17041/1 (Aval) .....	26
4.1.5. Profil d’émission de l’échantillon 18014 .....	27
4.2. Bioessais .....	27
<b>5. Interprétations des tests.....</b>	<b>29</b>
5.1. 17037.....	29
5.2. Série 17041 .....	30
5.2.1. 17041/2.....	31
5.2.2. 17041/1.....	32
5.3. Série 18014.....	33
<b>6. Bilan de développement de l’outil .....</b>	<b>34</b>
<b>7. Conclusion.....</b>	<b>35</b>
<b>8. Sigles &amp; Abréviations .....</b>	<b>37</b>
<b>9. Bibliographie .....</b>	<b>38</b>
<b>10. Table des illustrations .....</b>	<b>39</b>
<b>11. Annexe 1 : Bioessais réalisés sur les échantillons d’eaux réelles .....</b>	<b>40</b>
<b>12. Annexe 2 : Conditions de réalisations des bioessais .....</b>	<b>41</b>
<b>13. Annexe 3 : Clé d’interprétation des PÉPIT .....</b>	<b>42</b>
<b>14. Annexe 4 : Seuil de coupure pour la classification de l’intensité des signaux.....</b>	<b>42</b>
<b>15. Annexe 5 : Valeur relative des aires sous la courbe (% de signal sur eaux de référence) des signaux d’impact toxique mesurés sur chaque bioessai pour chaque échantillon d’eau réelle .....</b>	<b>43</b>
<b>16. Annexe 6 : Synthèse des valeurs en µg/l des concentrations de substances mesurées pour chaque échantillon d’eau réelle.....</b>	<b>44</b>

- **DÉVELOPPEMENT D'UN OUTIL BIOLOGIQUE SIMPLIFIÉ POUR CARACTÉRISER LA TOXICITÉ D'EAUX USÉES**
- **LIVRABLE 1.4.D DU PROJET LUMIEAU-STRA**

## **1. Introduction**

Le projet LUMIEAU-Stra a été sélectionné dans le cadre de l'appel à projets national "Innovation et changement de pratiques – Lutte contre les micropolluants des eaux urbaines", initié par le Ministère en charge de l'environnement, l'Agence Française pour la Biodiversité (AFB), les Agences de l'eau. Il regroupe un consortium des 8 partenaires, piloté par l'Eurométropole de Strasbourg. Ce projet a pour but de proposer une approche à l'échelle de la collectivité, intégrant les enjeux environnementaux, les impacts économiques et sociétaux, pour réduire les rejets en micropolluants. Ce projet, labellisé par le pôle de compétitivité de l'eau Hydreos, a débuté en janvier 2015 pour une durée de 4 ans.

Le volet Diagnostic du projet propose notamment de tester des outils innovants pour aider la recherche et à la réduction des rejets en micropolluants en réseau d'assainissement. L'approche classique de caractérisation de la pollution s'appuie sur des analyses physico chimiques. Les outils biologiques sont de plus en plus utilisés en complément car ils permettent de caractériser l'ensemble de la pollution d'un effluent. Cependant ces outils peuvent être lourds à mettre en place (bioessais in situ) ou manquer de réactivité à cause du temps d'analyse nécessaire.

La présente étude concerne le développement et les conditions de mise en œuvre d'un dispositif métrologique innovant basé sur des outils biologiques. Il s'agit donc de proposer un outil qui, s'appuyant sur des tests biologiques, soit facile à mettre en œuvre et facilite les prises de décision opérationnelles.

## **2. Le principe de l'outil biologique simplifié et mise en œuvre opérationnelle**

### **2.1. Les orientations générales pour le choix de l'outil**

Tronico Vigicell développe et déploie des outils biologiques (bioessais) d'évaluation de la qualité des eaux depuis 20 ans.

Ces outils reposent sur deux concepts complémentaires, le concept de panel et le concept de différentiel cellulaire. Brièvement, le concept de panel tient compte du fait que la toxicité n'est pas une donnée absolue mais relative, et qu'ainsi différents organismes ou cibles biologiques auront des sensibilités différentes à divers polluants ainsi qu'à diverses doses d'un même polluant. Il est donc important de mettre en place une diversité biologique dans les tests afin de leur conférer une pertinence à cet égard. Le concept de différentiel cellulaire procède de la même idée, se basant cette fois sur les contrastes de réaction entre deux modèles biologiques similaires qui ne diffèrent l'une de l'autre que par leur expression - ou non - de mécanismes de résistance naturels. Ainsi, le différentiel cellulaire permet d'introduire de la nuance et de la gradation dans l'interprétation des résultats d'un test.

Cependant, ces méthodes se déploient actuellement en laboratoire et, surtout, nécessitent du personnel qualifié, du matériel lourd et la mise en place d'une logistique dédiée au transport d'échantillon qui s'opère généralement au minimum sur une période de 24h en conditions réfrigérées.

Afin de palier à ces contraintes et de permettre une qualification et une hiérarchisation d'eaux aux caractéristiques inconnues, au plus tôt après leur prélèvement et le plus simplement possible, Tronico Vigicell s'est proposée de concevoir et de tester un kit de qualification des eaux usées fondé sur les concepts d'organismes à sensibilités différentielles préalablement évoqués.

La réflexion soutenue tout au long des travaux et particulièrement tournée sur l'application et l'usage du Kit a permis de définir que celui-ci :

- constituera un outil de caractérisation et de hiérarchisation préliminaire des eaux usées sous l'angle de leur qualité chimique mesurée à l'aune de l'intensité de leur impact sur le vivant,
- doit permettre de tester en parallèle plusieurs échantillons,
- ne doit pas nécessiter de compétences pointues en biologie pour sa mise en œuvre et son interprétation,
- ne doit recourir qu'à un minimum d'appareillage, qui doit être le plus généraliste possible

En sus de la volonté de concevoir le produit selon les concepts de pertinence de cibles biologiques évoqués précédemment, les notions de sécurité des opérateurs, de l'environnement et l'impératif de coût le plus réduit possible ont été pris en considération pour orienter les décisions.

Sur cette base, les caractéristiques suivantes du produit ont émergé (Tableau 1).

**Tableau 1 : Principes généraux de conception du Kit**

Élément	Caractéristiques	Qualités
Modèle biologique	3 bactéries non OGM, non pathogènes, émettant naturellement de la lumière	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sécurité, robustesse et simplicité à la mise en œuvre</li> <li>• Différentiel d'organisme</li> </ul>
Support	Plaque 96 puits	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 2 à 6 échantillons en parallèle</li> <li>• Format standard en biotechnologies</li> </ul>
Mesure	Bioluminescence	Appareillage de base au format plaque 96
Utilisateur	Personnel brièvement formé mais non spécialiste	Simplicité de mise en œuvre et d'interprétation
Usage	En intérieur, locaux techniques, laboratoires	Installations de base sous réserve d'approvisionnement en courant alternatif 220V

## 2.2. Les principes généraux du protocole de mesure

Le Kit se présente sous la forme d'une plaque 96 puits blanche à fond transparent (optimisée pour les lectures de luminescence) conditionnée sous blister aluminé sous vide.

Chacun des puits de cette plaque contient un mélange de milieux de culture, de cryoprotecteur et une des trois souches bactériennes. L'ensemble se présente sous forme de culots lyophilisés.

Le principe du test est de mesurer la variation d'intensité de la lumière naturellement émise par chacune des bactéries. L'intensité du signal lumineux témoigne de processus métaboliques et énergétiques des cellules, potentiellement altérés par les polluants dissous des eaux testées. Certaines variations de l'émission de lumière peuvent ainsi mettre en évidence des stress sub-létaux et/ou létaux subits par lesdites bactéries lors de leur exposition à l'échantillon test.

L'opérateur souhaitant utiliser la plaque, ouvre simplement le blister et remplit chaque puit avec 100 microlitres ( $\mu\text{l}$ ) d'eau à tester, 100  $\mu\text{l}$  des dilutions (50, 25, 12%) de l'eau à tester avec de l'eau de référence ou 100  $\mu\text{l}$  d'eau dite de référence, en respectant le plan de plaque fournis avec le produit (les eaux de référence, « propres » et à composition contrôlée, seront fournies avec le produit).

La plaque est incubée à 30 degrés Celsius et lue à différents temps à l'aide d'un luminomètre de paillasse.



**Figure 1 : Luminomètre de paillasse**

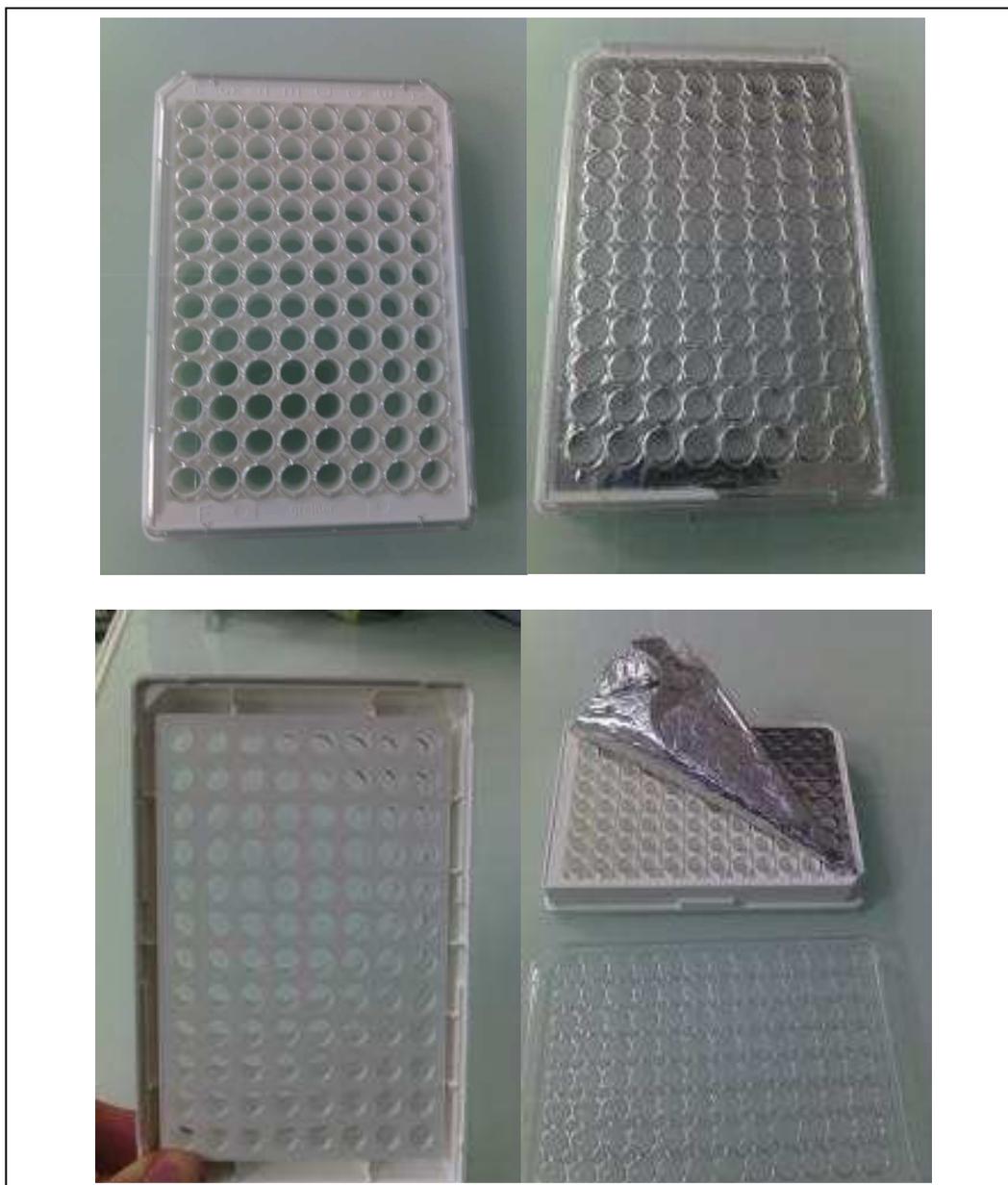
Les luminomètres de paillasse sont utilisés couramment en biologie ou en chimie afin de mesurer une intensité lumineuse hors application de fluorescence (notamment réactions de bioluminescence ou technique classique d'ATPmétrie). Ces appareils se composent d'un détecteur de lumière qui va compter les photons, généralement un tube photomultiplicateur ou plus rarement des photodiodes, ainsi que d'une chambre de mesure étanche à la lumière extérieure, dans laquelle sera placée la plaque après sa préparation. Une suite logicielle permettant de convertir et d'afficher la mesure de photons réalisée en Unités Relatives de Lumière (ou RLU) ou en coups par seconde (CPS) vient compléter le système. Idéalement l'appareil permet l'incubation au sein d'une enceinte dédiée thermorégulée et une mesure automatisée à chaque temps, mais, des appareils plus simples, sans chambre d'incubation/motorisation, sont aussi utilisables, sous réserve de disposer par ailleurs d'un incubateur thermorégulé et qu'un opérateur réalise manuellement la mesure par la mise en place itérative de la plaque dans la chambre de lecture.

Les données obtenues à l'issue de l'expérience sont transcrites de manière manuelle ou semi-automatisée (selon la configuration logicielle) dans un fichier d'interprétation type fichier excel avec macro lui aussi fourni avec le produit. Après intégration des données pour chaque réplicat de chaque souche et pour chaque échantillon, le fichier d'interprétation renverra la moyenne et l'écart-type des scores obtenus pour chaque

paramètre de la cinétique d'émission lumineuse (aire sous la courbe,...) pour les réplicats d'un même point et affectera ainsi, en comparaison avec les réplicats des eaux de référence, à chaque point expérimental un code couleur allant du vert au noir, illustration visuelle de l'intensité du stress mesuré pour chaque couple souche/échantillon.

Sur la base de ces données, l'opérateur sera alors à même de facilement hiérarchiser ses échantillons en fonction de l'intensité de leur impact toxique.

La Figure 2 illustre l'aspect de la plaque du Kit.



**Figure 2 : Photographies du support Kit : plaque 96 puits, blanche à fond transparent et film aluminium (Tronico Vigicell).**

Le Tableau 2 représente un exemple de plan de plaque possible incluant 3 échantillons (notés E1 à E3) testés à 4 dilutions sur les 3 souches (illustrées par les couleurs rouge,

bleu, jaune). A noter que ce plan de plaque suggéré n'est en rien figé et peut être adapté à loisir pour des combinaisons multiples de nombres d'échantillons, dilutions, réplicats expérimentaux etc.

**Tableau 2 : Exemple de plan de plaque en duplicats pour 3 échantillons à 4 dilutions.**

100 E1	50 E1	25 E1	12 E1	6 E1	Réf
100 E2	50 E2	25 E2	12 E2	6 E2	Réf
100 E3	50 E3	25 E3	12 E3	6 E3	Réf
100 E1	50 E1	25 E1	12 E1	6 E1	100 E3
100 E2	50 E2	25 E2	12 E2	6 E2	50 E3
100 E3	50 E3	25 E3	12 E3	6 E3	25 E3
100 E1	50 E1	25 E1	12 E1	6 E1	12 E3
100 E2	50 E2	25 E2	12 E2	6 E2	6 E3

■ Souche N°1 
 ■ Souche N°2 
 ■ Souche N°3 
 100-50-25-12 = Dilution en %  
 Ex = échantillon N°x Réf = Eau de référence

### 3. Développements techniques

Synthétiquement, les axes de travaux furent :

- Le choix des modèles biologiques à inclure dans la construction d'un panel pertinent pour des évaluations innovantes tout en restant compatible avec les contraintes d'un kit aisé d'utilisation,
- La procédure de conditionnement de ces modèles biologiques, précisée après arbitrage sur les différentes options disponibles (immobilisation, lyophilisation etc.),
- La caractérisation des plaques ainsi préparées avec tests de gammes de concentrations de substances pures présentant des modes d'actions variables,
- La mise en œuvre des bioessais du panel de Toxicité Générale en laboratoire de l'entreprise, bien plus complexe et spécifique (cf § 4 et Annexes) afin d'établir des comparatifs fonctionnels,
- Plus globalement, une réflexion de fond/transverse sur l'usage, l'opérateur et le contexte, pour la définition de la procédure d'utilisation et du service attendu au final dans l'utilisation proposée.

Dans le cadre de ses recherches et développements antérieurs et partant de la souche de référence du test OCDE *Allivibrio fischeri* (ci-après notée AFI), l'entreprise a réalisé une bibliographie visant à identifier d'autres souches naturellement bioluminescentes aptes à former de concert un panel à la sensibilité étendue et avec une large spécificité de réponse (grande variété de toxiques). Seules des souches non pathogènes, non OGM et non invasives (particulièrement dans les conditions d'utilisation visées) ont été sélectionnées afin de s'affranchir de risques environnementaux et sanitaires pour les opérateurs.

Ainsi, les souches *Vibrio harveyi* (VHA) et *Photobacterium leiognati* (PLE) ont été retenues en plus de la souche de référence (AFI) à l'issue de ces investigations.

Les premières investigations de faisabilité ont été conduites sur cultures fraîches, c'est-à-dire par des mises en contact des cultures bactériennes fraîches avec des eaux usées réelles et/ou complétées avec des doses de toxiques (sulfate de zinc et dichromate de potassium utilisés en référence OCDE notamment, résultats non montrés ici). Parallèlement, un travail de définition plus orienté a été conduit via des entretiens clients, comparatifs de solutions préexistantes et des simulations d'usage ; les questions et observations qui se sont faites jour à l'occasion de ce travail ont été précieuses dans la définition du concept, ses limites et les verrous techniques et financiers de son développement. Elles ont surtout porté sur les enjeux du format kit :

- Quel format d'utilisation à retenir : flacons, plaque 96 puits, bandelettes papiers ?
- Quel choix technique à privilégier : microbilles d'alginate, immobilisation en masse sur gel, congélation, lyophilisation ?
- Quelle influence éventuelle de la turbidité des échantillons et potentielle nécessité de filtration stérilisante ?

Compte tenu des contraintes contextuelles (mesure en laboratoire ou en atelier par du personnel technique formé non spécialiste) et des scénarii d'usage, la praticité, le coût et l'ubiquité de la plaque 96 puits ont été les facteurs qui ont prévalu au choix de ce format.

De la même façon, bien que ce ne soit pas l'option technique la plus facile à maîtriser dans nos conditions précises - comme cela sera évoqué plus bas - le choix de la lyophilisation s'est imposé comme le meilleur compromis entre la facilité et la robustesse d'usage et la durée et les conditions de conservation du produit final.

Ce choix de la lyophilisation présente des verrous techniques qui tiennent principalement aux choix complémentaires visant à simplifier au maximum l'emploi du produit, en ne déléguant à l'utilisateur que l'introduction du seul échantillon par une opération de pipetage simple, ce qui confère un avantage évident en termes de mise en œuvre.

Il est de fait important de souligner qu'à valeur égale des autres kits commercialisés par ailleurs, dans le cas de la solution proposée ici, l'opérateur n'a pas à manipuler de réactifs, de compléments nutritionnels ou de solutions de révélation pour mener à bien l'intégralité de la mesure.

Le corollaire de ce choix est que la procédure de lyophilisation doit être optimisée pour permettre la revivification de cellules dans une solution complexe incluant tous les éléments nécessaires au bon déroulement du test, depuis le cryoprotecteur jusqu'aux facteurs d'expression du signal, le tout dans un milieu compatible avec chaque souche et leur physiologie. Au fur et à mesure des travaux de mise au point de la procédure de lyophilisation, des investigations sur gammes de concentration de substances toxiques en solution dans de l'eau pure ont été conduites avec pour objectif d'orienter au fur et à mesure les choix en matière de protocole de lyophilisation en fonction des réponses des bactéries. A noter que le protocole final retenu nécessite un lyophilisateur haut de gamme capable de performances élevées.

Brièvement, l'ensemble des travaux d'investigation et de recherche qui ont été conduits ont eu pour but d'entériner les enjeux cruciaux du passage de cryotubes conservés à -80°C (mode classique de bancarisation de bactéries) à des lyophilisats

prêts à l'emploi en plaques dont la formulation générale constitue un kit de mesure performant et novateur :

- Identification des milieux de culture parmi une multitude de milieux possibles/disponibles (Photobacterium, Lennox, Terrific, Boss etc.),
- Identification de la nature et de l'impact éventuel des étapes préparatoires concernant les centrifugations, lavages, choix des cryoprotecteurs et des conditions initiales d'ensemencement,
- Identification des températures et durées d'incubation en fonction de l'indicateur considéré (rapports entre l'émission de lumière et les phases de croissance, phase de réveil etc.), tant sur la culture que sur la pré-culture et ce pour chacune des souches,
- Identification des variables de la mesure (déploiement du signal en temps et en intensité, qualification des paramètres caractérisant la réponse etc.)

### **3.1. Résultats initiaux**

Les premiers résultats représentatifs des travaux de caractérisation sur gamme étalon de toxiques, conduits au cours des diverses expérimentations de mise au point évoquées précédemment, sont présentés ici.

Les graphiques ci-dessous expriment l'intensité des signaux lumineux en CPS (coups par seconde) émis par chacune des 3 souches lyophilisées (AFI, PLE, VHA) du panel en fonction du temps, lorsque lesdites souches sont exposées à des doses croissantes de l'un ou l'autre de 3 toxiques, à savoir Dichlorophénol (DCP), Norfloxacin et Cuivre (Cu). Le DCP est un agent découplant des chaînes électroniques impliquées notamment dans les processus de respiration/énergie cellulaire. La Norfloxacin est un antibiotique à large spectre inhibant la réplication du matériel génétique bactérien. Enfin, le cuivre a un effet bactériostatique par perturbation, suite à son accumulation, de nombreux processus cellulaires reposant sur d'autres métaux divalents. L'échantillon témoin est de l'eau de référence (pure stérile apyrogène injectable de marque Versol).

### 3.1.1. Réponse des souches au DCP (Dichlorophéno)

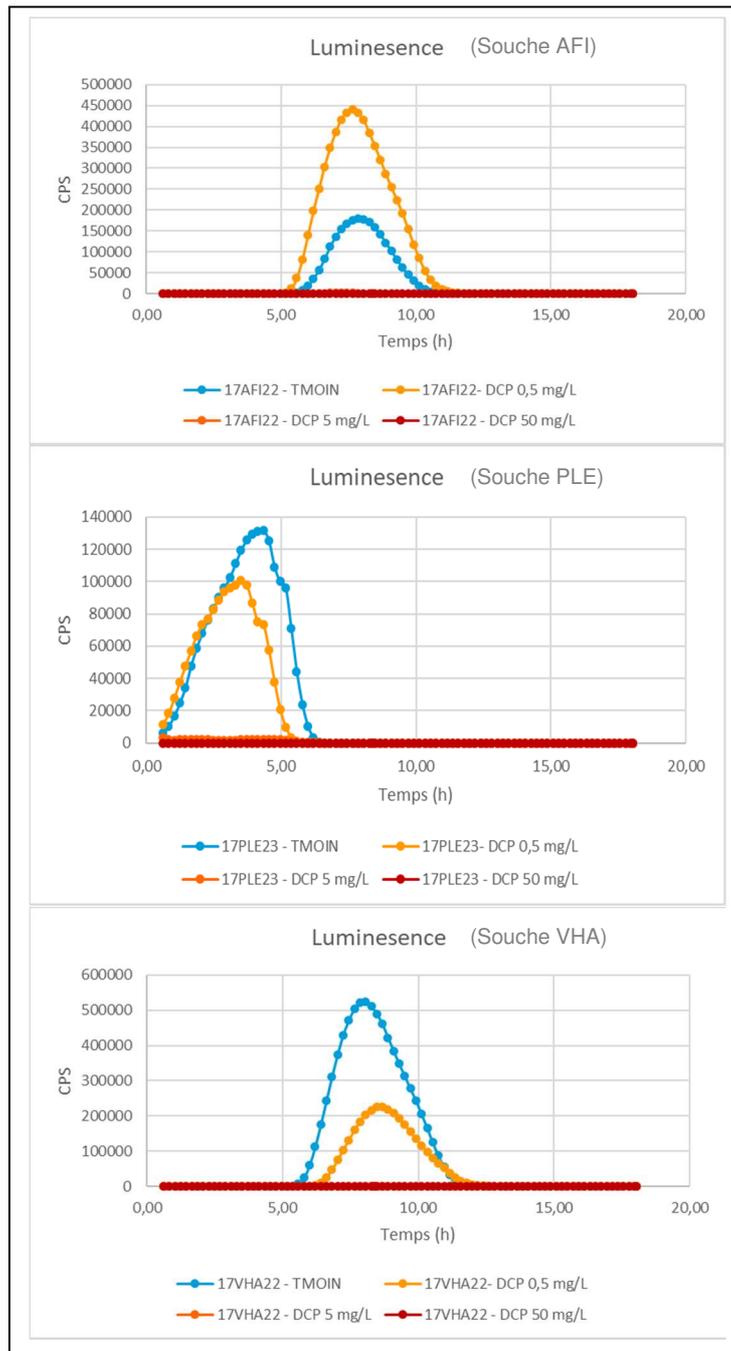


Figure 3 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de DCP (respectivement AFI, VHA, PLE).

### 3.1.2. Réponse des souches à la Norfloxacine

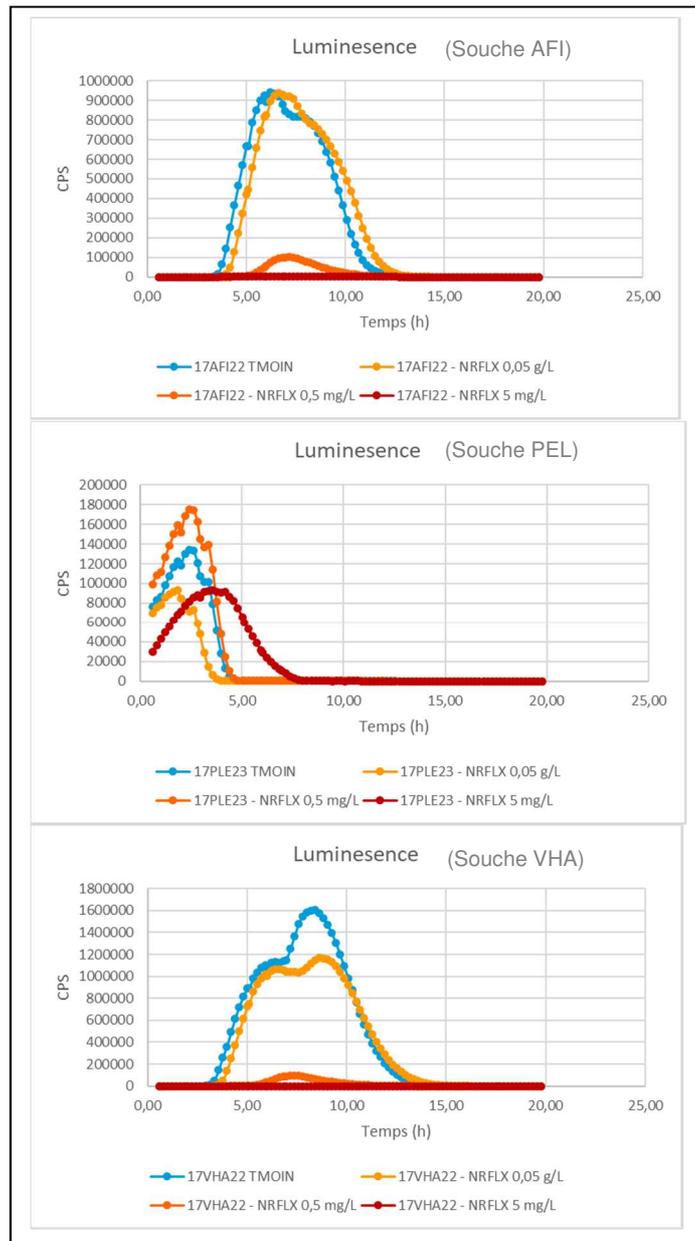
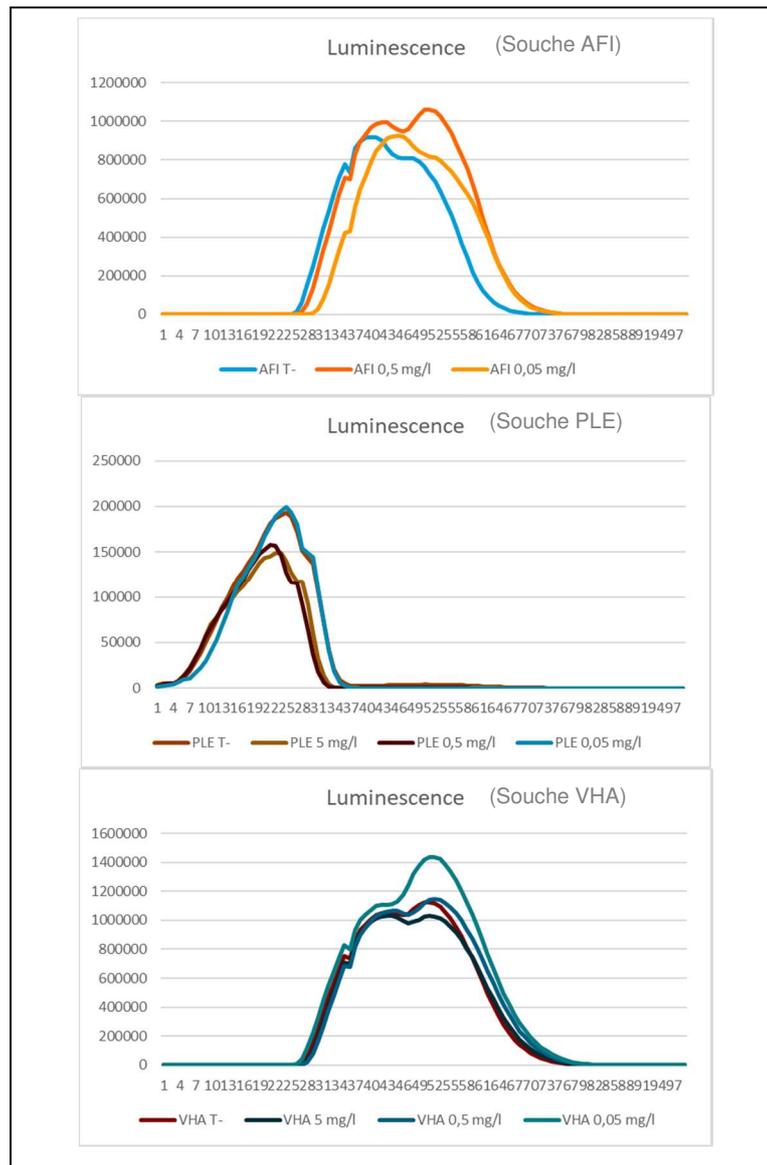


Figure 4 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de Norfloxacine (respectivement AFI, VHA, PEL).

### 3.1.3. Réponse des souches au Cuivre (Cu)



**Figure 5 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de Cuivre (respectivement AFI, VHA, PLE).**

### 3.1.4. Interprétation des réponses des 3 souches

Ces résultats permettent de tirer divers enseignements importants relatifs au fonctionnement et au concept du produit.

En l'état des travaux de lyophilisation, il apparait que nous mesurons des signaux lumineux sur toutes les souches en présence d'eau de référence. Cela signifie que les conditions de leur lyophilisation ne leur ont pas été létales.

En outre, en présence de toxique, il apparait que les signaux lumineux sont alternativement plus intenses que le signal témoin ou, au contraire, réduits par rapport à celui-ci. Il est donc permis de postuler que les souches ont conservé leur capacité à réagir à leur environnement en s'adaptant à des doses sub-létales de toxiques.

De manière importante, pour une même concentration d'un même toxique les différentes souches expriment des signaux bien distincts. Le bénéfice de l'approche panel (sensibilité, spécificité) est donc de toute évidence maintenu malgré le processus non trivial de préparation ainsi que les défis de l'utilisation simplifiée sans qualification particulière.

L'analyse plus détaillée des cinétiques met en évidence qu'aux fortes concentrations de toxiques, les signaux s'atténuent massivement, alors qu'aux faibles concentrations les cinétiques se superposent plus ou moins au signal témoin. (Exemple AFI sur Norfloxacin à 0.5 et 5 mg/l et à 0.05 mg/l, Figure 4)

Dans certains cas de concentrations intermédiaires ou faibles, le signal peut même s'avérer, contre-intuitivement, beaucoup plus intense que le signal témoin. (Exemple AFI sur DCP à 0.5mg/l, Figure 3). Ces observations, bien qu'inattendues, ne sont pas nouvelles et la toxicologie admet maintenant que les courbes de dose-réponse à des toxiques ne sont pas nécessairement monotones (phénomènes d'hormèse par exemple). Surtout, des travaux antérieurs de l'entreprise (Bittel, 2017) corroborent que dans les conditions de production/implémentation retenues, l'accroissement du signal lumineux apparaît lié à une accélération du métabolisme (respiratoire notamment) dépendant du processus d'adaptation des bactéries aux stress d'intensité faibles à modérées. Lorsque le stress s'accroît au-delà d'un certain seuil, une mortalité cellulaire apparaît alors naturellement et l'émission de lumière décroît en conséquence.

En revanche, l'exposition à des stress métalliques (cuivre) même relativement forts ne semble pas engendrer de réponses significativement importantes dans ces conditions et quelle que soit la souche considérée. Les effets bactériostatiques du cuivre sont bien connus, mais la durée du test n'est sans doute pas assez longue pour pouvoir les observer, à moins que ce ne soit un problème de dose tout simplement encore pas assez forte.

Quoi qu'il en soit, en combinant toutes ces observations force est de constater que les incertitudes liées à la mise au point d'un processus de lyophilisation adapté à l'objectif du Kit (hiérarchiser simplement des eaux en fonction d'un gradient de toxicité couvrant une vaste gamme de polluants organiques et de sensibilités) apparaissent assez importantes pour le moment.

#### **4. Expérimentation sur des effluents**

Une fois le principal verrou des aspects de formulation du Kit levés, les premiers travaux sur des échantillons d'eaux usées réelles ont pu être conduits au laboratoire de Tronico Vigicell.

Ces échantillons ont été prélevés à l'aide d'échantillonneurs automatiques asservi au débit ou au temps sur une période de 24 heures en divers points du réseau d'assainissement de l'Eurométropole de Strasbourg dans le cadre du présent projet LUMIEAU-Stra (se référer aux Livrables 1.4.a et 1.4.e du projet pour plus de détails).

Le Tableau 3 regroupe des données de logistique et descriptives des 6 échantillons étudiés.

**Tableau 3 : Descriptifs des échantillons terrains.**

Désignation	N° d'affectation	Date de réception	pH	Aspect	Caractéristiques
Zone 2 (aval)	17037	05/10/17	6.4	Trouble jaunâtre	Aval zone exclusivement industrielle
Zone 3 Niveau 1 (aval)	17041/1	5/12/17	6.4	Trouble MES	Niveau 1 de la zone 3 (point aval de l'ensemble de la zone). Vaste et mixte, regroupant des industrielles, résidentielles et domestiques
Zone 3 Niveau 1 (partie sud)	17041/2	5/12/17	6.4	Trouble MES sédimenté	Niveau 1 de la zone 3 (point représentatif des apports de la partie sud uniquement de la zone). Vaste et mixte, regroupant des industrielles, résidentielles et domestiques
Zone 3 Niveau 1 (milieu)	17041/3	6/12/17	6.4	Trouble MES	
Zone 3 Niveau 2 (zone industrielle)	18014/1	31/07/18	7.3	Marron, MES, MES sédimenté	Aval d'une zone industrielle, (avec un gros industriel)
Zone 3 Niveau 2 (résidentielle)	18014/2	31/07/18	7.3	Marron, MES, MES sédimenté	Zone résidentielle

Parallèlement aux travaux conduits sur le Kit diagnostic, ces échantillons ont subi des analyses physico-chimiques (réalisées par un autre laboratoire). De plus, des bioessais plus poussés ont été réalisés par Tronico Vigicell pour mieux éclairer leur plein potentiel toxique. Les analyses physico-chimiques ont naturellement visé à quantifier une liste de substances appartenant à différentes catégories, parmi lesquelles des métaux, des composés organiques volatils et semi-volatils incluant des alkylphénols, des chlorophénols, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, des solvants, des phtalates et des pesticides. Un bilan synthétique de ces analyses est repris dans les annexes. Pour ce qui est des bioessais d'expertise laboratoire, se référer ci-après au paragraphe 4.2.

#### 4.1. Mesure en utilisant le Kit

Les travaux sur le Kit à partir de ces échantillons réels ont été conduits sur les 3 souches (AFI, VHA, PLE), en triplicat, et sur une gamme de dilution 100 (échantillon non dilué), 50, 25 et 12 %.

Les graphiques ci-dessous expriment l'intensité des signaux lumineux en CPS (coups par seconde) émis par chacune de ces 3 souches en fonction du temps lorsque lesdites souches sont exposées à des doses croissantes d'échantillons (proportion de chacun dans le volume réactionnel total). L'échantillon témoin est de l'eau pure stérile apyrogène injectable de marque Versol. (Eau de référence).

#### 4.1.1. Profil d'émission de l'échantillon 17037

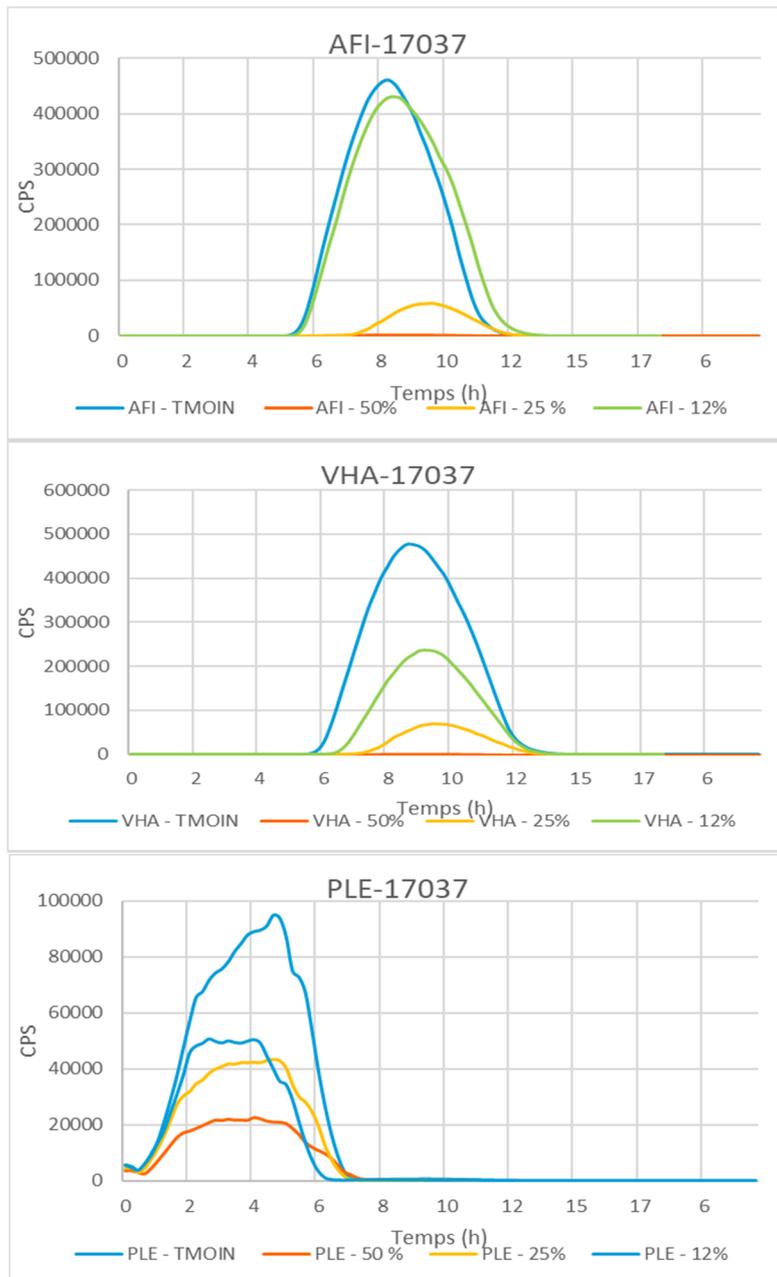
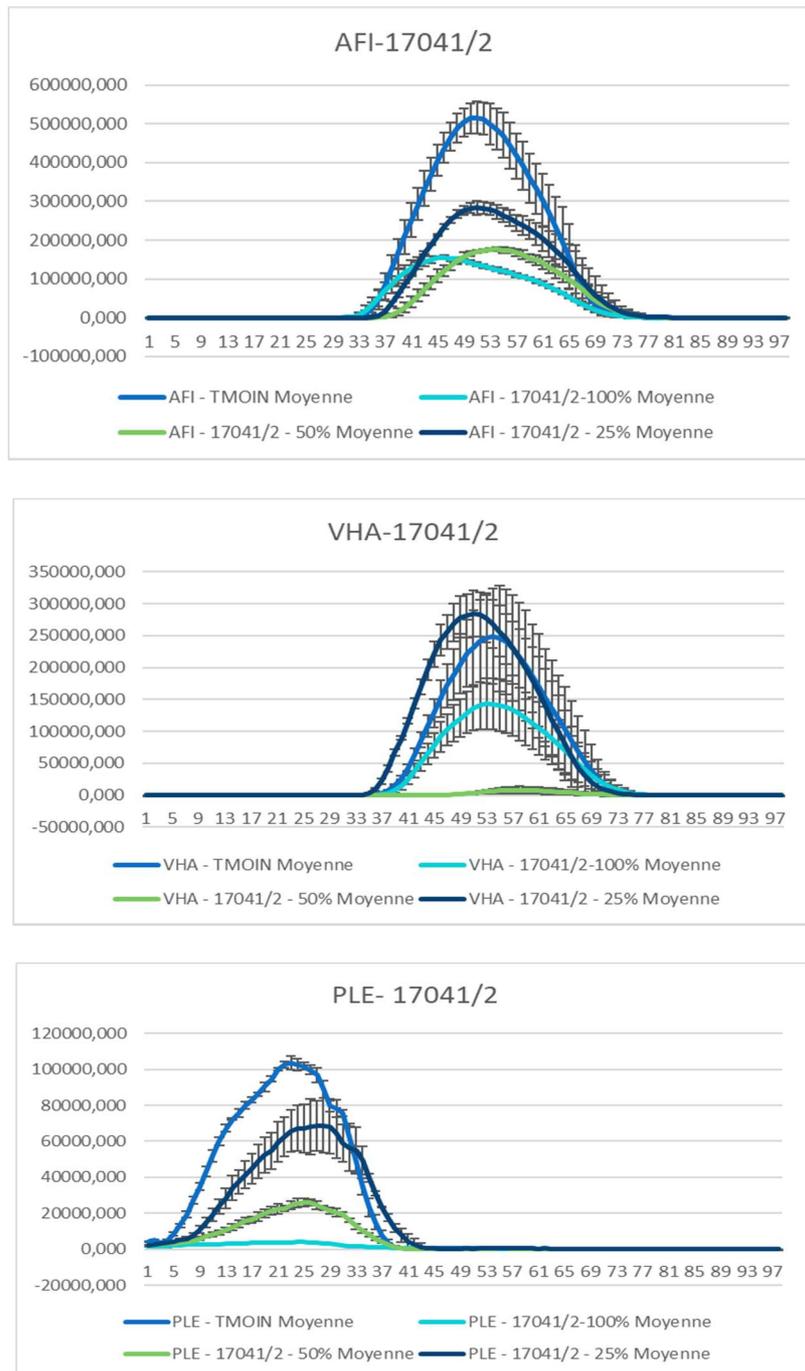


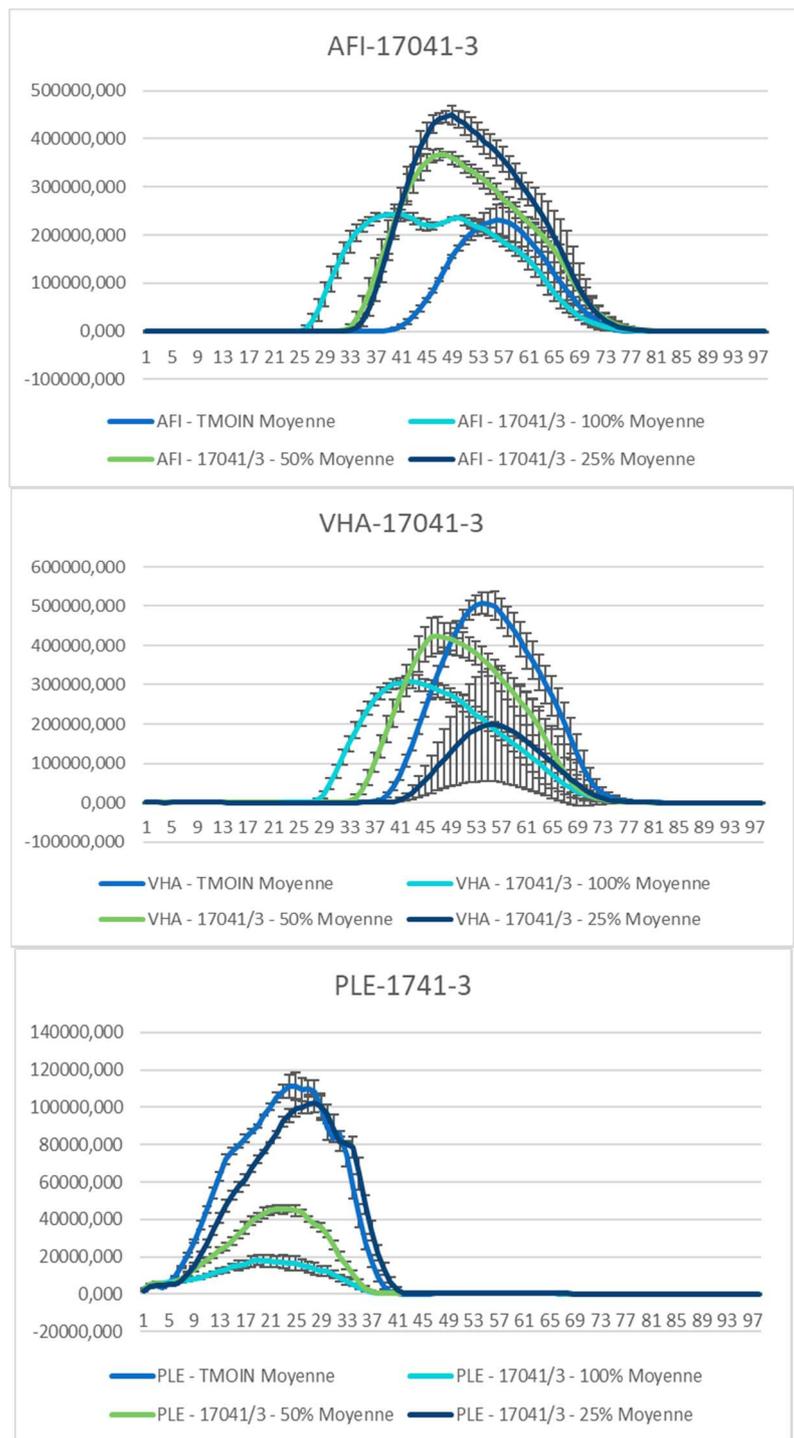
Figure 6 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de l'échantillon 17037.

#### 4.1.2. Profil d'émission de l'échantillon 17041/2 (Amont)



**Figure 7 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de l'échantillon 17041/2.**

#### 4.1.3. Profil d'émission de l'échantillon 17041/3 (Milieu)



**Figure 8 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de l'échantillon 17041/3**

#### 4.1.4. Profil d'émission de l'échantillon 17041/1 (Aval)

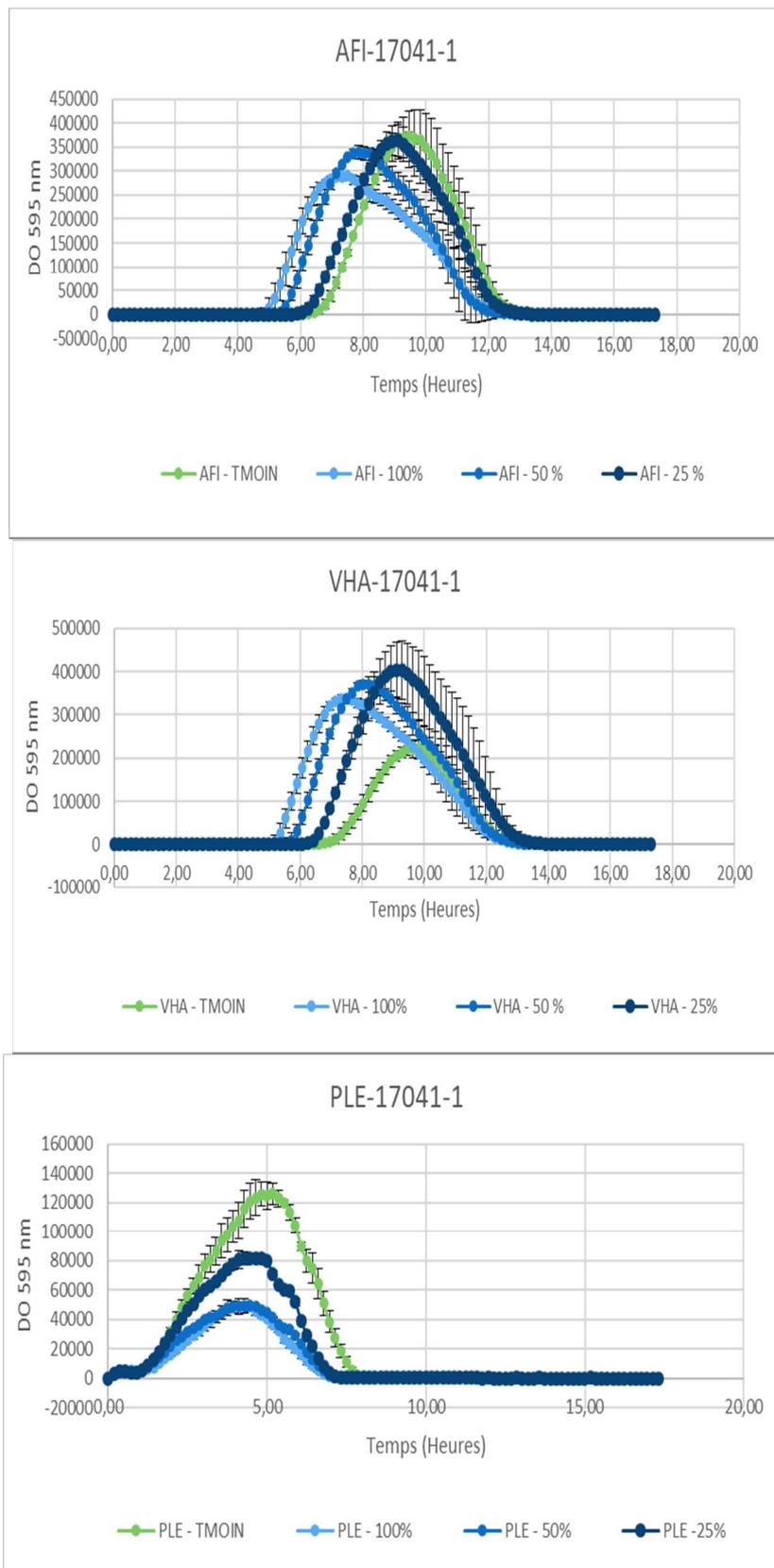


Figure 9 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de l'échantillon 17041/1.

#### 4.1.5. Profil d'émission de l'échantillon 18014

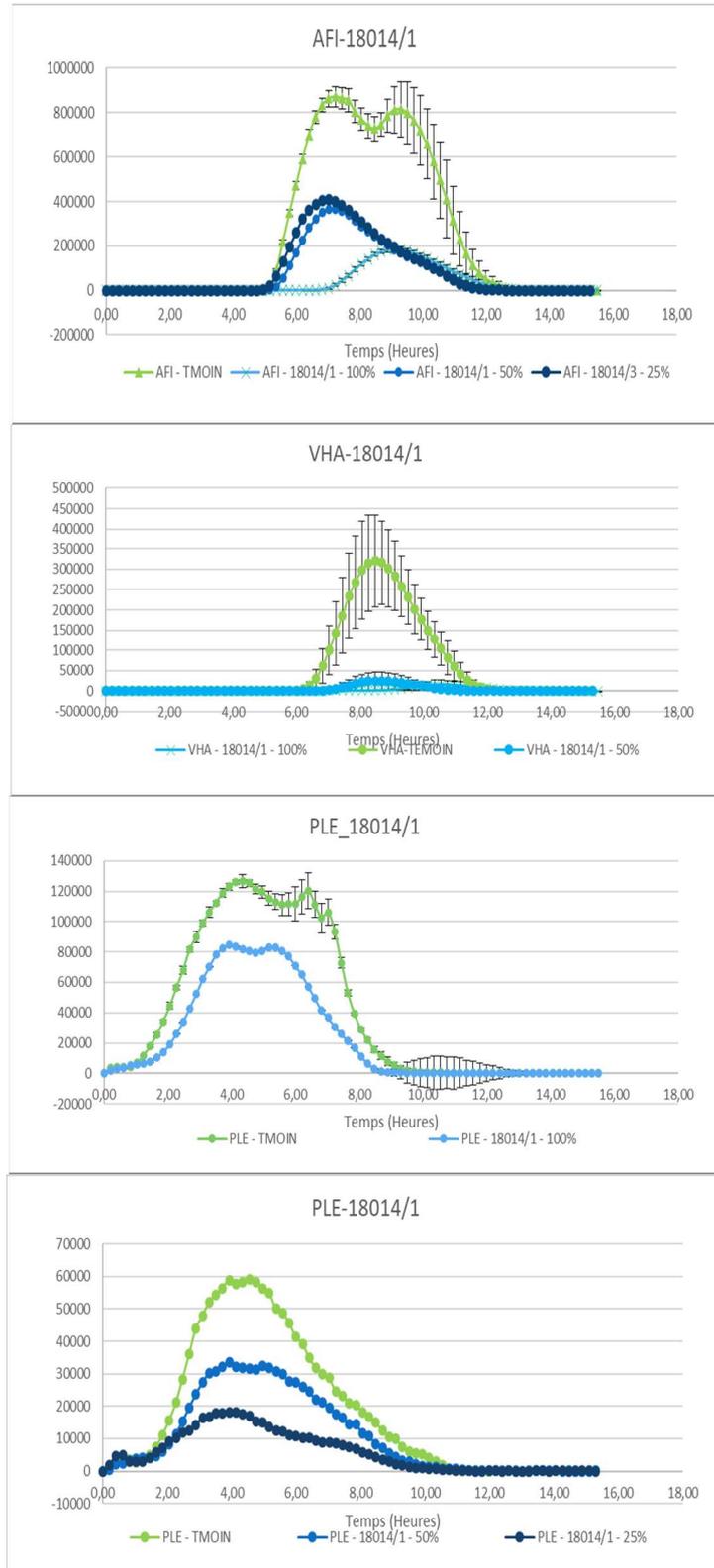


Figure 10 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de l'échantillon 18014.

#### 4.2. Bioessais

Des mesures d'impact sur le vivant ont été conduites en mobilisant des bioessais du panel de Toxicité Général du Pack VigiWater. Ces bioessais, mis en œuvre depuis de nombreuses années par l'entreprise sur de nombreux types d'eaux (eaux usées

industrielles, effluents de STEU, eaux brutes urbaines, eau de ressources, eaux de process etc.), reposent sur la comparaison de la croissance de bactéries et de levures, ainsi que sur la viabilité de cellules humaines exposées soit à l'eau de référence Versol, soit aux échantillons.

Fidèle au concept de différentiel cellulaire, les bioessais sur bactéries et levures s'organisent autour de la mise en œuvre en parallèle d'expérimentations sur une souche sauvage et sur cette même souche privée naturellement de ses systèmes de défenses, souche dite sensible.

Les résultats de ces travaux sont exprimés en pourcentage du signal du bioessai (généralement relié à l'aire sous la courbe de réponse) exposé à l'échantillon, par rapport au signal mesuré sur l'eau de référence ; ils sont traduits en un code couleur découlant de l'application de seuils définis à partir de calibrages sur gammes de substances toxiques (en eau de référence et/ou en eaux réelles dopées) et de la prise en compte des concentrations environnementales connues ou suspectées. La représentation graphique résultante permet un abord rapide d'un grand nombre de tests en parallèle afin de faciliter et accélérer les interprétations et la prise de décision. Elle est dénommée « PÉPIT » pour « Profil de Potentiel d'Impact Toxique ».

Les échantillons ont été filtrés sous vide à 0,22 micromètre (filtration stérilisante pour éliminer les risques de contamination bactérienne) sur des membranes synthétiques en PES (réf SCGPU10RE). En outre, les échantillons étant dans la gamme autorisant l'application des bioessais, aucun ajustement du pH n'a été nécessaire.

Dans le respect de la procédure en aveugle et compte tenu du contexte défini de l'étude, il a été décidé de ne pas réaliser de gamme de dilution. Les échantillons ont donc été mis en œuvre au maximum de concentration possible dans la limite des conditions expérimentales de chaque bio-essais (voir Annexes).

Les PÉPIT ci-dessous illustrent les résultats d'impacts toxiques obtenus pour chaque échantillon (en ordonnée de chaque lot de réception répertorié par date), relativement aux bioessais réalisés (en abscisse de chaque lot de réception répertorié par date) :

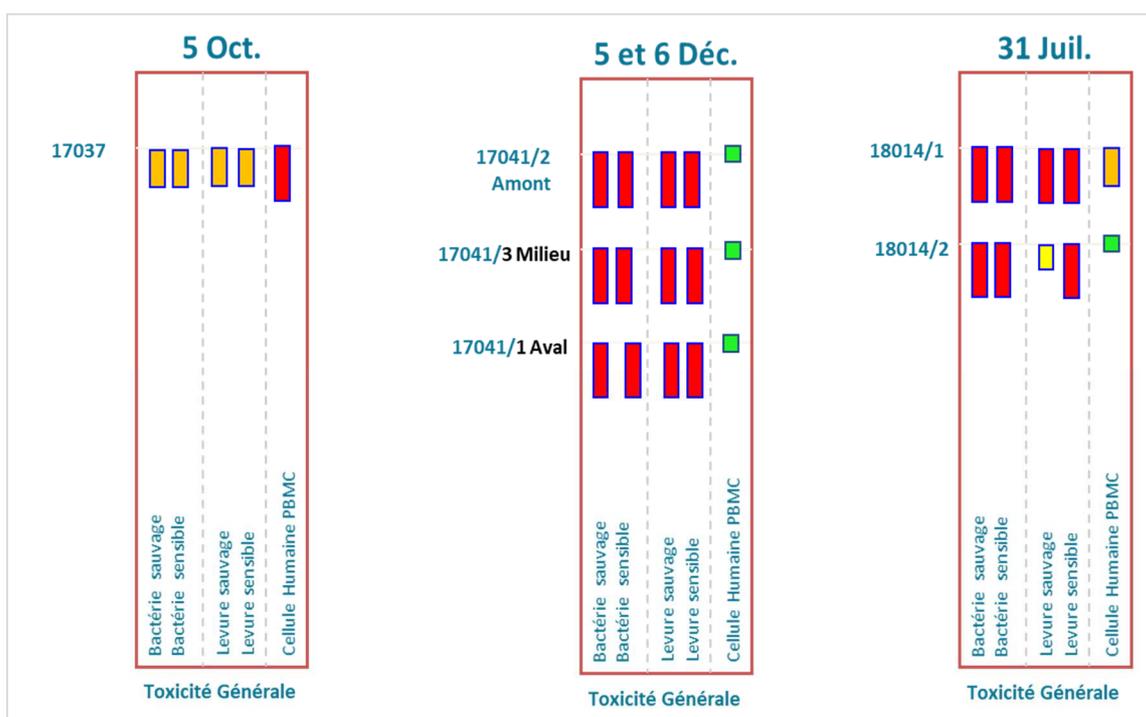


Figure 11 : Profil de Potentiel d'Impact Toxique de tous les échantillons d'eau réelle par date de réception.

## 5. Interprétations des tests

En première approximation, au vu des PÉPIT de bioessais nous constatons que tous les échantillons sont assez agressifs. Des différences existent néanmoins entre eux : les échantillons du 5 et 6 décembre et du 31 juillet se caractérisent par une agressivité plus marquée que l'échantillon du 5 octobre sur les bactéries et les levures.

A l'inverse, ce dernier est plus toxique pour les cellules humaines que ne les sont les autres échantillons.

Il apparaît donc que les échantillons sont assez distincts du point de vue du type des toxicités, mais que du point de vue de l'intensité des impacts toxiques, ils sont assez similaires.

Les travaux sur le trio de bactéries du Kit visent à hiérarchiser simplement les impacts en termes d'intensité et de sévérité, la sévérité/gravité s'entendant ici comme la combinaison de l'intensité des signaux des 3 bactéries.

### 5.1. 17037

L'échantillon 17037 (Figure 6), mis en œuvre en monoplicat sur une gamme de dilution allant de 50 à 12 % se caractérise par plusieurs éléments :

- A 50% de dilution, les cinétiques d'émission de lumière sur AFI et VHA sont à zéro alors qu'avec l'eau de référence, elles plafonnent entre 450000 et 500000 unités. Cela témoigne de la mortalité cellulaire induite par l'échantillon d'eaux usées.
- En revanche la souche PLE résiste mieux et exprime un signal faible mais toujours significatif à 50%.
- A 25 % les signaux d'AFI et de VHA redeviennent significativement différents de zéro et illustrent une meilleure survie des cellules liée à l'atténuation de l'intensité du stress.
- A 12 % une différence de réponse entre AFI et VHA apparaît nettement, la cinétique du signal d'AFI se superposant quasiment à celui de l'eau de référence alors que celle de VHA illustre la persistance d'un stress altérant la survie de la bactérie.
- Le signal de PLE met en lumière une atténuation de l'intensité du stress entre 50 % et 25 % de dilution mais une quasi-stagnation de la réduction de ce stress entre 25 et 12 %. Dans ces deux cas, le signal restant largement inférieur à celui de l'eau de référence.
- Les mesures d'aire sous la courbe dans chacun de ces cas quantifient et étayent ces observations.

On constate donc, en premier lieu, que l'échantillon présente une toxicité notable, à l'instar de celle mesurée par le PÉPIT, et que les 3 souches répondent différemment à cette toxicité. Ces constatations confirment le fondement de la démarche initiée pour la mise au point de ce Kit.

En s'appuyant sur le même concept de code couleur que les PÉPIT et sur les aires sous courbe, il est possible de résumer et d'illustrer ces éléments selon le tableau suivant :

**Tableau 4: Valeur de l'aire sous la courbe (unités arbitraires) des cinétiques de bioluminescence mesurée sur chaque souche sur toute la gamme de dilution pour l'échantillon 17037.**

17037	AFI	VHA	PLE
50 %	3 198	4 032	110 504
25 %	181 739	232 247	200 604
12 %	1 748 697	868 496	209 303
Témoin	1 690 181	1 924 632	394 993

En l'état d'avancement du projet, les seuils de coupure d'une couleur à l'autre sont, pour le moment, déterminés empiriquement selon le principe suivant :

- ▶ AUC (aire sous la courbe) test < AUC témoin → Rouge
- ▶ AUC test > AUC témoin → Jaune
- ▶ AUC test = AUC témoin → Vert / Orange en fonction de l'évolution du signal en gamme.

## 5.2. Série 17041

Les échantillons 17041, testés en triplicats sur des gammes de dilution, se résument selon la même modalité d'interprétation de la façon suivante :

**Tableau 5: Valeur moyenne de l'aire sous la courbe (unité arbitraire) des cinétiques de bioluminescence mesurée sur chaque souche sur toute la gamme de dilution pour les trois échantillons de la série 17041.**

17041/2	AFI	VHA	PLE
100 %	671 112	533 000	19 899
50 %	702 716	22 796	94 587
25 %	1 155 569	1 046 521	272 218
Témoin	1 974 696	877 722	400 454

17041/3	AFI	VHA	PLE
100 %	1 371 177	1 434 653	75 765
50 %	1 634 110	1 707 107	166 467
25 %	1 899 978	665 870	389 360
Témoin	785 063	1 865 473	433 969

17041/1	AFI	VHA	PLE
100 %	1 276 887	1 484 817	175 135
50 %	1 335 402	1 521 693	197 054
25 %	1 343 136	1 572 137	311 499
Témoin	1 332 951	737 283	506 129

L'étude des cinétiques et le résumé des caractéristiques de cette série d'échantillon soulignent plusieurs choses :

- Tout d'abord, il apparait que la souche VHA est, dans certain cas (17041/2 témoin et 17041/3 25%), sujette à une incertitude de mesure importante. Ces variations importantes au sein des triplicats de mesure rendent l'interprétation ponctuellement difficile.

- De la même façon, le signal sur eau de référence de la souche AFI dans le cas de l'échantillon 17041/3 est de faible intensité et, donc, sujet à suspicion quant à sa représentativité.
- Quoi qu'il en soit, l'observation des cinétiques témoigne bien de variations de réponses des souches d'un échantillon à l'autre.
- Les seuils de coupure entre indicateurs colorés, postulés avant toute investigation et appliqués ici sans nuance, ne permettent pas de rendre compte de façon satisfaisant des variations de réponse des souches d'un échantillon à l'autre. La matrice des seuils doit être revue pour mieux illustrer les différences entre les résultats.

In fine, les résultats obtenus sur l'échantillon 17041/3 (Figure 8) confirment que les travaux comparatifs doivent être, idéalement, réalisés à partir de plaques appartenant à un même lot de production, c'est-à-dire, fabriquées à partir d'une même culture bactérienne ou, à *mimima*, sur des plaques présentant des signaux témoins (produit en présence d'eau de référence) comparables. Vérification faite, il s'avère que ce ne fût pas le cas ici : l'échantillon 17041/3 a été mis en œuvre sur un batch de production différent de celui des deux autres. Ce point rend l'exploitation relative sujette à caution. Aussi ne nous attarderons-nous pas outre mesure sur les résultats obtenus sur cet échantillon, même s'ils s'avèrent intéressants à de nombreux égards, et observons les données sur le reste de la série 17041.

#### 5.2.1. 17041/2

L'échantillon 17041/2 (Figure 7) exprime tant sur AFI que sur PLE une toxicité forte. Cette toxicité, anticipée au niveau des bioessais du PÉPIT, apparaît partiellement réversible par dilution.

Ainsi, la souche AFI exposée à l'échantillon non dilué présente une émission de lumière faible mais non nulle : l'action délétère marquée de l'échantillon sur la souche AFI n'est cependant pas suffisamment létale pour engendrer une inhibition complète de l'émission lumineuse. La dilution par deux n'entraîne pas un allègement de l'intensité du stress imposé au modèle. En revanche, une dilution par quatre, sans gommer complètement l'effet délétère, accroît significativement l'intensité du signal émis par la souche, signalant ainsi une meilleure survie et donc un allègement du stress.

Cette évolution n'est pas encore bien mise en valeur par la codification couleur retenue en première approximation. Pour autant, il est bon de rappeler que l'objectif final n'est pas ici de dresser un profil toxique fin de chaque échantillon mais en premier lieu de hiérarchiser celles-ci ; ce codage couleur peu au moins initialement suffire (ce point sera débattu ultérieurement).

La souche PLE exprime une évolution comparable à celle de la souche AFI. Cependant, elle semble témoigner d'une plus grande sensibilité initiale puisqu'au lieu d'une émission résiduelle sur échantillon non dilué, la souche PLE exprime une inhibition qui confine à une mortalité massive. C'est aussi ce dont témoigne le code couleur. Diluée par 2 puis par 4, cette cytotoxicité massive s'atténue et le signal, sans retrouver un niveau nominal, reprend de l'amplitude - témoignant ainsi d'un allègement relatif de l'intensité du stress.

La souche VHA exprime des signaux caractérisés par une certaine ambiguïté. D'une part les cinétiques, quelle que soit la dilution, présentent des écart-types étrangement importants. D'autre part, l'évolution des signaux, notamment à la dilution 50%, ne

semble pas forcément cohérente avec ceux obtenus à 100 et 25 % (à 50 % on peut observer une chute du signal à un niveau caractéristique d'une cytotoxicité massive). En conséquence, si l'on ne considère que les cas extrêmes, et sous réserve de la question des écart-types, les cinétiques de VHA montrent un effet toxique important à 100 % mais pas une cytotoxicité massive. Cet impact évolue vers un allègement avec une dilution par 4.

En résumé, s'il est difficile d'être parfaitement conclusif sur ce point, ce qui justifie l'absence du codage couleur, il semble toutefois que les signaux VHA illustrent au final un effet comparable à celui documenté sur AFI.

#### 5.2.2. 17041/1

Les propriétés des signaux exprimés par la souche AFI pour cet échantillon (Figure 9) sont à nouveau assez mal rendues par les règles de la proposition préliminaire du codage couleur (Tableau 5). Exposée à différentes dilutions et donc à des stress d'intensité variée, la souche n'exprime pas seulement ces stress via une diminution de l'intensité du signal lumineux mais aussi, notamment, par un décalage de son émission. Cette propriété biaise ainsi la mesure de l'aire sous la courbe dans l'interprétation expérimentale proposée ici sur la base l'application du code couleur. Le soft final prenant en compte de multiples indicateurs d'évolution de la cinétique, cette limitation n'est que contextuelle.

L'analyse des cinétiques montre qu'à 100% le stress perçu par la souche, bien qu'important, n'est pas un stress massivement létal. De surcroît, on constate que les cinétiques témoignent d'une tendance à la « normalisation » par rapport à la cinétique de référence à mesure que la dilution de l'échantillon augmente (*ie.* que sa proportion dans le volume réactionnel diminue).

L'étude du signal de la souche PLE met lui aussi en valeur l'existence d'un stress suffisamment important pour se traduire par une réduction de l'intensité du signal émis sans pour autant être un signal indiquant une létalité particulière.

Au fil des dilutions croissantes de l'échantillon, le stress observé s'atténue sans pour autant se normaliser par rapport au témoin, du moins jusqu'à 25 %. Le signal exprimé par VHA souligne ainsi l'existence d'un stress modéré (qui se traduit par un signal accru par rapport au témoin) quelle que soit la dilution considérée. Ce stress basal apparaît relativement insensible à l'effet dilution.

Sur la base de ces observations, l'interprétation comparative des signaux entre l'échantillon 17041/1 (aval d'une zone du réseau d'assainissement) et l'échantillon de sortie 17041/2 (partie sud de la zone caractérisée par l'échantillon 17041/1), nous conduit à constater des divergences notables de l'impact de ces eaux sur les modèles : tant du point de vue de la souche AFI que de la souche PLE, l'eau d'aval (17041/1) apparaît à tout le moins différente - et il est aisé de la considérer plus agressive - que l'eau de sortie de la partie sud.

Ce constat est aussi valable du point de vue de la souche VHA mais, compte tenu des précautions évoquées antérieurement, ces résultats sont moins robustes.

Dans le cadre de lot d'échantillon, il apparaît donc que le Kit permet, en l'état, de distinguer l'échantillon 17041/2 de l'échantillon 17041/1 du point de vue de leur toxicité et de hiérarchiser ceci selon le schéma suivant :

17041/2 > 17041/1

L'analyse des résultats physico-chimiques (cf. annexes) de ces deux échantillons met en évidence la présence plus importante, en nombre et en quantité, de substances micropolluantes dans l'échantillon 17041/2 par rapport à l'échantillon 17041/1. Bien que toutes les substances identifiées ne soient pas communes aux deux échantillons, cette observation semble étayer la hiérarchisation établit par le Kit.

### 5.3. Série 18014

Dans le cadre d'un usage relatif des outils biologiques, les résultats des échantillons 18014 (Figure 10) fournissent l'illustration parfaite de l'intérêt d'une approche par panel en contraste avec les approches mono bioessais isolés souvent implémentées dans les explorations classiques et les mesures réglementaires.

**Tableau 6 : Valeur moyenne de l'aire sous la courbe (unité arbitraire) des cinétiques de bioluminescence mesurée sur chaque souche sur toute la gamme de dilution pour les échantillons de la série 18014.**

18014/2	AFI	VHA	PLE
100%	992 204	762 068	445 411
50%	1 614 821	1 603 749	654 420
25%	1 908 987	1 934 092	727 603
Témoin	4 114 982	2 750 840	810 446

18014/1	AFI	VHA	PLE
100%	605 620	46 380	387205 /
50%	1 268 225	66 090	/ 174396
25%	1 452 050		/ 94273
Témoin	4 162 996	968 016	671690 / 292845

Si du point de vue des réponses de la souche AFI, utilisée comme souche de référence dans les préconisations et les normes, les deux échantillons sont indiscernables tant à 50% qu'à 25 % de dilution et quasiment indiscernables sans dilution, il n'en est absolument pas de même du point de vue des réponses des deux autres souches.

Ainsi pour la souche AFI, considérant les cinétiques ou les aires sous la courbe du signal dans les présentes données, il n'apparaît pas de différence de réponse d'un échantillon à l'autre. En revanche, dans le cas des souches VHA et PLE, les échantillons 18014 /1 et 18014/2 apparaissent très différents.

De fait, si dans le cas de la souche VHA exposée à l'échantillon 18014/1 on note une mortalité à 100% et à 50% (une erreur de manipulation ayant invalidé les mesures à la dilution 25 %, aucun résultat n'est disponible pour celle-ci), l'exposition de la même souche à l'échantillon 18014/2, se traduit par un stress moins intense : que ce soit à 100% ou à 50% les stress observés restent marqués mais pas aussi létaux que dans le cas précédent ; il en va de même à 25 %. En outre, ce stress décroît avec la dilution même s'il reste notable.

Les signaux délivrés par la souche PLE sont tout aussi informatifs : suite à son exposition à l'échantillon 18014/1 nous constatons à nouveau l'expression d'un stress

marqué à toutes les dilutions considérées<sup>1</sup>. En comparaison, si les signaux de la souche exposée à l'échantillon 18014/2 mettent en lumière un effet toxique à 100%, celui-ci s'atténue avec la dilution au point que le signal fini par se superposer à celui de référence. Ceci dit, compte tenu des propriétés de la réponse cellulaire cette superposition des signaux pour 50 et 25 % ne signifie pas obligatoirement l'élimination de toute toxicité mais, plus probablement, un allègement significatif de celle-ci au point de ne plus engendrer qu'un stress de type accélération métabolique consécutif à une démarche d'adaptation ; ceci explique la persistance de la couleur orange dans l'interprétation. Dans tous les cas, les signaux collectés se distinguent très significativement de ceux obtenus pour l'échantillon 18014/1.

A noter que les bioessais du panel de Toxicité Générale (PéPiT) illustrent aussi nettement cette différence et viennent donc corroborer ces observations, à savoir une toxicité plus marquée de l'échantillon 18014/1 par rapport à celle de l'échantillon 18014/2. Une différence que l'on peut résumer dans le cadre de l'objectif d'usage déterminé pour cet outil (permettre une classification rapide des eaux) par l'équation de hiérarchisation suivante :

$$18014/1 > 18014/2$$

## 6. Bilan de développement de l'outil

Compte tenu de l'ensemble des résultats obtenus (gammes de toxiques, eaux réelles, corrélations avec les données d'impact toxique en laboratoire, analyses physico-chimiques), le produit ainsi prototypé - dénomination proposée « InSiKit », à confirmer ultérieurement - semble en l'état apte à être mis en œuvre sur des eaux usées des réseaux d'assainissement communautaires. Jetable et sans danger pour l'environnement comme pour les opérateurs, l'InSiKit apparaît d'ores et déjà adapté à la mesure de la toxicité des polluants chimiques contenus dans les eaux.

L'exploitation des signaux de 3 bactéries bioluminescentes présentant des spectres de sensibilité différents et complémentaires vis-à-vis d'une large gamme de polluants chimiques permet des analyses enrichies éclairant le processus d'évaluation et la prise de décision d'une manière novatrice.

InSiKit présente l'avantage de permettre le test de 2 à 6 échantillons différents en parallèle (selon les réplicats statistiques désirés) sur une gamme de concentration allant jusqu'à 5 niveaux de dilution. Bien que sa mise en œuvre requière l'usage d'un luminomètre thermorégulé à plaque et d'une micropipette pour la dispense des échantillons, la robustesse de ces matériels et leurs coûts modérés (5 à 6 k€ pour un luminomètre thermorégulé) augure d'une dissémination possible jusque dans les laboratoires et les ateliers les plus modestes, promouvant au final un usage ubiquitaire du produit. Si le Kit nécessite bien évidemment le recours à la prise d'échantillon, le nombre qu'il est possible d'en tester par plaque semble en bonne adéquation avec les pratiques courantes des utilisateurs et leur capacité d'actions de prélèvements par jour. Sous cet angle, un usage du Kit dans les ateliers ou les laboratoires proches du terrain permettrait donc d'obtenir, sous une dizaine d'heure incluant incubation et analyse, une mesure de toxicité le jour même de la réalisation des prélèvements.

D'autre part, bien que le Kit ne nécessite pas une expertise particulièrement développée pour sa mise en œuvre (aucun ajout de réactif) ou son interprétation (notamment grâce au logiciel qui l'accompagnera), il conviendra néanmoins d'effectuer quelques

---

<sup>1</sup> A noter toutefois que des difficultés expérimentales nous ont contraints à conduire les travaux sur cet échantillon en plusieurs étapes, ce qui explique la présentation de deux cinétiques et des enchaînements de dilutions sujets à raisonnable caution.

vérifications préalables à sa mise en œuvre. Ainsi, il faut par exemple, prévoir une mesure sommaire du pH des échantillons en amont du test afin que celui-ci reste inclus dans la plage fonctionnelle validée pour les microorganismes du test (de 6 à 8 unités pH idéalement). Si c'est le cas, les échantillons ne pourront pas être testés sans correction du pH avec des acides et bases fortes dans la mesure des possibilités de l'environnement de travail considéré. Enfin, le format lyophilisé sous vide du Kit autorise une durée de conservation assez longue (de 1 à 6 mois) et un stockage simple possible aussi bien T°C ambiante, qu'à 4°C ou -20°C en fonction des installations et du délai d'usage prévu par l'opérateur.

L'InSiKit reste toutefois en l'état en phase prototypique et divers points restent à investiguer et améliorer. Parmi ces points, on peut évoquer des travaux d'optimisation pour réduire la durée d'expression du signal par les bactéries et donc accélérer l'obtention de résultats. Des investigations relatives à d'autres limites potentielles d'usage du Kit (en fonction par exemple de la charge en MES, COT, polluants type éventuellement) sont aussi envisageables, sans oublier les aspects de productions qui doivent être mieux circonscrits afin de réduire au mieux la variabilité intrinsèque d'une plaque à l'autre et la variance entre les réplicats d'une même plaque. Un dernier point, mais non le moindre, concerne la nécessaire multiplication des essais sur eaux réelles qualifiées (physico-chimie et impact toxique en laboratoire) de natures variées. Sont également à approfondir : test de conservation des plaques selon les différentes conditions de stockage (Température ambiante, 4°C et -20°C) afin de définir la durée de vie des plaques en fonction du mode de stockage (si pas fait lors du projet), test pour l'eau de référence (date de péremption selon les conditions de stockage).

Ce n'est en effet qu'avec l'accroissement du recul expérimental sur l'InSiKit que l'on pourra circonscrire son plein potentiel et ses limites d'usage. Enfin, un travail spécifique devra être conduit pour déterminer un prix de commercialisation convenable en rapport avec la taille et les besoins du marché potentiel, élément intégral de l'adoption et la dissémination de la solution ainsi proposée.

Le dernier aspect à améliorer repose sur l'interprétation et sur la facilité avec laquelle un opérateur pourra interpréter les résultats.

## 7. Conclusion

Le projet initial proposait la conception, production et qualification d'une solution biologique simple d'évaluation de la qualité des eaux à la fois accessible et fondée sur les concepts à la pointe de l'état de l'art de la mesure par méthodes basées sur les effets (bioessais).

L'enjeu ultime est de permettre aux opérateurs de hiérarchiser rapidement des eaux en fonction de leur toxicité. Cet objectif vise à répondre à un besoin de cartographie des réseaux d'eaux usées, par exemple dans le cadre d'un diagnostic amont en permettant d'identifier une source d'émission, de hiérarchiser des zones d'actions prioritaires ou de localiser des points noirs d'effluents toxiques. Modulo les difficultés et les limites des travaux qui ont été conduits durant ce projet, il s'avère que l'outil proposé aujourd'hui semble à même de remplir ces objectifs.

En conséquence, même si InSiKit demande à être amélioré notamment du point de vue de la traduction des réponses obtenues (code couleur) et d'une caractérisation plus conséquente, incluant les conditions de production, il apparaît que nous pouvons

proposer une hiérarchie initiale de toxicité pour la quasi-totalité des échantillons réels testés dans le cadre de ce développement. Ainsi, tenant compte des résultats des mesures physico-chimiques, des résultats des bioessais VigiWater conduits en parallèle et des données des sites de prélèvement dont les spécificités sont assez bien documentées, apparaît la catégorisation suivante :

- Groupe d'échantillon les plus toxiques : 17037 ; 18014/1 et 17041/2 (les 2 premiers concernent des échantillons prélevés en aval des zones à dominante industrielle),
- Groupe d'échantillon les moins toxiques : 18014/2 et 17041/1.

Modulo des incertitudes accrues mais toujours avec une confiance acceptable, nous proposons sur la base des résultats des travaux sur le Kit, la hiérarchisation individuelle suivante :

$$17037 > 18014/1 \geq 17041/2 > 17041/1 \geq 18014/2$$

Il est important de souligner que cette hiérarchisation est en cohérence avec les données des bioessais réalisés en laboratoire avec des méthodes expertes. Pour conclure, il va de soi qu'en fonction des objectifs des opérateurs la hiérarchisation peut se décliner sous d'autres modalités fonctionnelles :

- Temporelle (saisonnalité, activités exceptionnelles ou routinières),
- Géographique (amont/aval, cartographie de bassin, lieux sensibles etc.)
- Typologie d'effluents (zone industrielle/zone résidentielle par exemple),

## 8. Sigles & Abréviations

**AFI** : *Aliivibrio fischeri*. Bactérie marine bioluminescente souvent symbiotiques d'organismes marins.

**AUC** : Area Under Curve. Unité arbitraire résultant du calcul Intégral de l'aire sous la courbe d'une cinétique

**CFIS** : Continuous Flow Integrative Sampler. Dispositif d'échantillonnage passif des micropolluants dans l'eau. Echantillonneur à débit continu et constant.

**COT** : Carbone Organique Total. Paramètres de mesure composites incluant tous les composés carbonés en une seule masse, il est exactement défini et représente une quantité absolue.

**DCP** : DiChloroPhénol. De la famille des chlorophénols, font partie de la composition de nombreux produits de notre quotidien, comme les dentifrices ou les savons antiseptiques.

**MES** : Matière en suspension. Désigne l'ensemble des matières solides insolubles visibles à l'œil nu présentes en suspension dans un liquide.

**mg/l** : Milligramme par litre. Unité de concentration massique

**OGM** : Organisme génétiquement modifié. Organisme vivant dont le patrimoine génétique a été modifié par l'intervention humaine

**PéPIT** : Profil de Potentiel d'Impact Toxique. Nom d'une représentation synthétique de résultats de test de toxicité

**pH** : Potentiel hydrogène. Grandeur sans unité permettant de quantifier l'activité des ions hydrogène

**PLE** : *Photobacterium leiognati*. Bactérie marine bioluminescente souvent symbiotiques d'organismes marins.

**PREBIO** : Echantillonneur passif maillé, contenant un manchon en mousse, sur lesquels se développe du biofilm

**R&D** : Recherche et Développement. Désigne des activités d'investigation et d'expérimentation.

**STEU** : Station de Traitement des Eaux Usées. Installations collectives d'épurations des eaux.

**VHA** : *Vibrio harveyi*. Bactérie marine bioluminescente souvent symbiotiques d'organismes marins.

## 9. Bibliographie

**Bittel, M.** : Détection de polluants chimiques par biocapteurs bactériens couplés à la spectroscopie Raman (2017). Thèse de doctorat.

**Chi-Ying Hsieh , Meng-Hsiun Tsai, Ryan D. K , Pancorbo O. C.** : Toxicity of the 13 priority pollutant metals to *Vibrio fischeri* in the Microtox\_ chronic toxicity test. *The Science of the Total Environment* 320 (2004) 37–50

**Jennings V.L.K., Rayner-Brandes M.H. and Bird D.J.** : ASSESSING CHEMICAL TOXICITY WITH THE BIOLUMINESCENT PHOTOBACTERIUM (*VIBRIO FISCHERI*): A COMPARISON OF THREE COMMERCIAL SYSTEMS. *Wat. Res. Vol. 35, No. 14*, pp. 3448–3456, 2001

**Klaus L.E. Kaiser** : Correlations of *Vibrio fischeri* Bacteria Test Data with Bioassay Data for Other Organisms. *Environmental Health Perspectives* \* Vol 106, Supplement 2 \* April 1998

**Tatsuya Nakayama, Emi Ito, Nakao Nomura, Nobuhiko Nomura & Masatoshi Matsumura** : Comparison of *Vibrio harveyi* strains isolated from shrimp farms and from culture collection in terms of toxicity and antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Lett* 258 (2006) 194–199

**Teresa Peinado M, Mariscal A, Carnero-Varo M, and Fernandez-Crehuet J** : Correlation of Two Bioluminescence and One Fluorogenic Bioassay for the Detection of Toxic Chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 170–177 (2002) *Environmental Research, Section B*  
doi:10.1006/eesa.2002.2177

**Vvan de Merwe J. P. and Leusch F.D.L** : A sensitive and high throughput bacterial luminescence assay for assessing aquatic toxicity – the BLT-Screen . *Environmental Science Processes & Impacts*

## 10. Table des illustrations

Figure 1 : Luminomètre de paillasse .....	13
Figure 2 : Photographies du support Kit : plaque 96 puits, blanche à fond transparent et film aluminium (Tronico Vigicell).....	14
Figure 3 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de DCP (respectivement AFI, VHA, PLE).....	18
Figure 4 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de Norfloxacine (respectivement AFI, VHA, PLE).....	19
Figure 5 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de Cuivre (respectivement AFI, VHA, PLE).....	20
Figure 6 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de l'échantillon 17037.....	23
Figure 7 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de l'échantillon 17041/2.....	24
Figure 8 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de l'échantillon 17041/3.....	25
Figure 9 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de l'échantillon 17041/1.....	26
Figure 10 : Cinétiques de réponse de chaque souche exposée à des doses croissantes de l'échantillon 18014.....	27
Figure 11 : Profil de Potentiel d'Impact Toxique de tous les échantillons d'eau réelle par date de réception.....	28
Tableau 1 : Principes généraux de conception du Kit.....	12
Tableau 2 : Exemple de plan de plaque en duplicats pour 3 échantillons à 4 dilutions.....	15
Tableau 3 : Descriptifs des échantillons terrains.....	22
Tableau 4: Valeur de l'aire sous la courbe (unités arbitraires) des cinétiques de bioluminescence mesurée sur chaque souche sur toute la gamme de dilution pour l'échantillon 17037. ....	30
Tableau 5: Valeur moyenne de l'aire sous la courbe (unité arbitraire) des cinétiques de bioluminescence mesurée sur chaque souche sur toute la gamme de dilution pour les trois échantillons de la série 17041. ....	30
Tableau 6 : Valeur moyenne de l'aire sous la courbe (unité arbitraire) des cinétiques de bioluminescence mesurée sur chaque souche sur toute la gamme de dilution pour les échantillons de la série 18014. 33	33

## 11. Annexe 1 : Bioessais réalisés sur les échantillons d'eaux réelles

Les bioessais suivants ont été mis en œuvre sur les échantillons d'eau dans des conditions contrôlées et de moindre dilution (cf ci-dessous) :

Toxicité générale sur panel d'organismes			
Modèles biologiques	Effets observés	Nombre de tests	Réalisation
Bactéries (2 souches <i>Escherichia coli</i> Sauvage + Sensible)	<i>Croissance (DO)</i>	2	oui
Cryptogames eucaryotes (2 souches <i>Saccharomyces cerevisia</i> Sauvage + Sensible)	<i>Croissance (DO)</i>	2	oui
Cellules eucaryotes humaines (PBMC)	<i>Viabilité (ATPmétrie)</i>	1	oui
<b>Nombre total d'informations</b>		<b>5</b>	<b>5</b>

## 12. Annexe 2 : Conditions de réalisations des bioessais

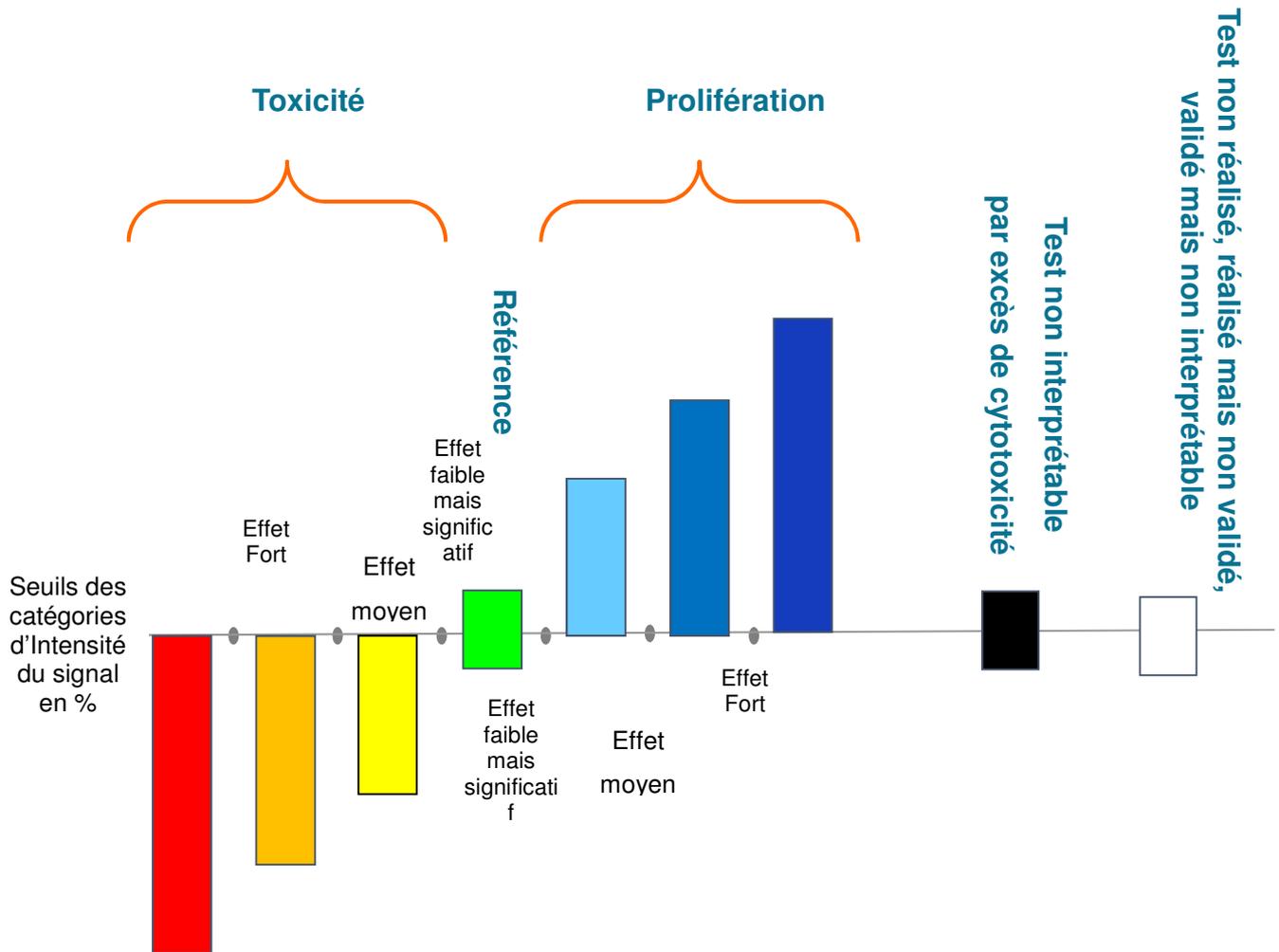
Pour les résultats rapportés dans ces travaux, les conditions d'exposition des modèles dans les bio-essais contractualisés sont les suivantes :

Panel de tests	Modèle biologique	Condition d'exposition des modèles, en % d'échantillon dans le volume final de test
<b>Toxicité Générale</b>	Bactéries	90 %
	Levures	90 %
	Cellules eucaryotes humaines	74 %

*Ce tableau donne les dilutions minimales imposées par les conditions techniques de réalisation des bio-essais. Nous ne les considérons pas comme des dilutions mais comme les conditions nominales des tests.*

### 13. Annexe 3 : Clé d'interprétation des PéPIT

Les résultats des bio essais sont présentés sous forme de data qualifiés (%) et sous forme graphique (profils) selon les conventions suivantes :



### 14. Annexe 4 : Seuil de coupure pour la classification de l'intensité des signaux

Le tableau ci-dessous décrit les seuils de passage d'une classe de couleur à une autre en fonction du bio-essais considéré.

		Effet fort	Effet moyen	Effet faible mais significatif	Pas d'effet significatif	Effet faible mais significatif	Effet moyen	Effet fort
Bactéries	Sauvage	Au delà de -90%	de -30 à -90 %	de -15 à -30 %	de -15 à +15 %	de 15 à 30 %	de 30 à 90 %	Au delà de 90 %
	Sensible	Au delà de -90%	de -60 à -90 %	de -30 à -60 %	de -30 à +30 %	de 30 à 60 %	de 60 à 90 %	Au delà de 90 %
Levures	Sauvage	Au delà de -90%	de -60 à -90 %	de -30 à -60 %	de -30 à +30 %	de 30 à 60 %	de 60 à 90 %	Au delà de 90 %
	Sensible	Au delà de -90%	de -30 à -90 %	de -15 à -30 %	de -15 à +15 %	de 15 à 30 %	de 30 à 90 %	Au delà de 90 %
Cellules humaines	PBMC	Au delà de -90%	de -50 à -90 %	de -20 à -50 %	≥ -20 %			

**15. Annexe 5 : Valeur relative des aires sous la courbe (% de signal sur eaux de référence) des signaux d'impact toxique mesurés sur chaque bioessai pour chaque échantillon d'eau réelle**

Ech	Bactérie sauvage	Bactérie sensible	Levure Sauvage	Levure Mutée	PBMC
17037	-60	-85	-76	-61	-92

Ech	Bactérie sauvage	Bactérie sensible	Levure Sauvage	Levure Mutée	PBMC
17041/2 Amont	-98	-98	-100	-100	-11
17041/3 Milieu	-98	-98	-100	-100	-5
17041/1 Aval	-95	-98	-96	-97	-20

Ech	Bactérie sauvage	Bactérie sensible	Levure Sauvage	Levure Mutée	PBMC
18014/1	-92	-97	-97	-96	-60
18014/2	-96	-98	-44	-95	20

**16. Annexe 6 : Synthèse des valeurs en µg/l des concentrations de substances mesurées pour chaque échantillon d'eau réelle**

[ ] en µg/l	17041/2 amont	17041/1 aval
MONOBUTYL ETAIN CATION	0,025	0,025
TETRACHLORETHYLENE		2,45
BENZO_B_FLUORANTHENE		0,02
BENZO_GHI_PERYLENE		0,02
FLUORANTHENE		0,01
ANTHRACENE		0,03
PHENANTHRENE	0,3	0,08
DEHP		2,04
NONYLPHENOLS	4,09	0,4
NP10E	2,12	0,2
NP20E	1,96	0,2
BISPHENOL_A		0,5
FORMALDEHYDE	19	5
24-DICHLOROPHENOL		0,66
4-CHLORO-3-METHYLPHENOL		0,14
CARBENDAZIME		0,005
DIURON		0,032
DICLOFENAC	1,6	0,9
KETOPROFENE	1,6	0,9
SULFAMETHOXAZOLE		0,4
OXAZEPAM	0,7	0,6
DIETHYL PHTALATE		1,43
TOLUENE	5,32	
TRIBUTYLPHOSPHATE	0,12	
CARBAMAZEPINE	0,2	

(Substances organiques mesurées au-delà de la LQ)

AFB

Hall C – Le Nadar  
5, square Félix Nadar  
94300 Vincennes

01 45 14 36 00

<http://www.afbiodiversite.fr>

TRONICO VIGICELL / TAME-  
WATER

3, rue Jean Jaurès  
85000 La Roche sur Yon

09 72 29 42 03

[www.tame-water.com](http://www.tame-water.com)