

**Projet MICROPOLIS Indicateurs
Livraison N°01 (rev3)**

Caractérisation de la toxicité des eaux usées à Sophia Antipolis

**Ywann PENRU, Amélie GUILLON (SUEZ),
Selim AIT AISSA (INERIS),
Jérôme COUTEAU (TOXEM)**

Juin 2018



**AGENCE FRANÇAISE
POUR LA BIODIVERSITÉ**
MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT

Document élaboré dans le cadre de l'appel à projet
Innovation et changement de pratiques : *Lutte contre les micropolluants des eaux urbaines*
Avec le soutien de l'Agence Française pour la Biodiversité et de l'Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse

Titre :

Caractérisation de la toxicité des eaux usées à Sophia Antipolis
Livrable N°01 – Projet MICROPOLIS Indicateurs

Date: Juin 2018

Auteurs :

Ywann PENRU, Amélie GUILLON (SUEZ), Selim AIT AISSA (INERIS), Jérôme COUTEAU (TOXEM)

Contributeurs à l'étude

Entité, institution de rattachement	Contributeurs
SUEZ	Ywann Penru, Amélie Guillon, Mar Esperanza, Jean Claude Alibar
INERIS	Sélim Ait-Aissa, Nicolas Creusot
TOXEM	Jérôme Couteau

Remerciement :

Les auteurs remercient Mmes Bertoni et Pumareda (syndicat des Bouillides) pour leur collaboration au sein du projet MICROPOLIS Indicateurs ainsi que Mmes Brault, Belloi et Noble et M. Gamberi (Suez Eau France) pour leur contribution à l'organisation et à la réalisation des campagnes de prélèvement.

Résumé

Le projet MICROPOLIS Indicateurs a été retenu à l'appel à projets intitulé « Innovation et changements de pratiques – Lutte contre les micropolluants des eaux urbaines » lancé par l'Onema, les agences de l'eau et le Ministère de l'Ecologie, pour répondre à la problématique croissante des micropolluants urbains dans les eaux.

La première phase de ce projet, menée sur le territoire du Syndicat des Bouillides, vise la caractérisation de la toxicité des eaux usées en différents points du réseau de collecte des eaux usées jusqu'à la sortie de la station de traitement (STEU) des Bouillides, objet de ce rapport. La stratégie d'évaluation employée se base sur :

- 1) une batterie de bioessais *in vitro* spécifiques du mode d'action des contaminants en visant à dresser des profils d'activités de type perturbateurs endocriniens hormone-like (œstrogénique, androgénique, glucocorticoïde, progestagène et minéralo-corticoïde) et récepteur de xénobiotiques (récepteur X des prégnanes et dioxin-like) et d'activité génotoxiques,
- 2) des bioessais d'écotoxicité (test Daphnies, cytotoxicité sur cellules de poisson) pour renseigner la toxicité globale des échantillons.

En termes de méthodologie, les activités mesurées ont été comparées à des valeurs seuils issues de la littérature permettant d'appréhender le risque écotoxicologique. Si le seuil proposé pour les activités œstrogéniques fait consensus (environ 0,4 ng E2-eq/L), ce n'est pas le cas pour les autres activités (valeurs isolées déterminées pour un seul bioessai). Cela met en évidence une des limites à l'utilisation des bioessais pour la caractérisation de la toxicité des eaux.

Cette étude a permis de caractériser les différents types d'activité et de toxicité de l'eau usée en entrée de la STEU des Bouillides et de son évolution le long de la filière de traitement. Parmi les effets notables *in vitro*, on peut noter en particulier :

- l'activité œstrogénique peut présenter des niveaux (très) élevés en entrée de STEU (17 – 864 ng E2-eq/L). En sortie, un dépassement occasionnel du seuil de 0,4 ng E2-eq/L (Kunz et al., 2015 ; bioessai ER sur culture cellulaire) indique un risque potentiel envers les organismes aquatiques malgré une forte élimination par la STEU (> 90%, traitement par ozonation tertiaire inclus).
- l'activité glucocorticoïde, bien que non détectée systématiquement en entrée de STEU, est toujours quantifiée dans l'effluent secondaire (activité supérieure à 0,1 µg Dex-eq/L, valeur seuil proposée par van der Oost et al., 2016). Le traitement tertiaire par ozonation (faible dose d'ozone) permet une réduction de l'activité mais néanmoins de manière insuffisante pour la supprimer totalement en sortie de STEU.
- l'activité PXR-like présente une activité similaire à celles reportées dans la littérature (gamme haute). Elle est partiellement éliminée par le traitement primaire et secondaire de la STEU (activité supérieure à 0,4 µg SR-eq/L, valeur seuil proposée par van der Oost et al., 2016). Le traitement tertiaire par ozonation contribue à la réduction de l'activité avant rejet et permet de passer sous cette valeur pour 1 campagne (sur un total de 5) et de s'en approcher fortement pour une autre.
- L'activité génotoxique particulièrement élevée en entrée de STEU apparaît ponctuellement dans l'effluent secondaire, ainsi qu'en sortie de STEU, ce malgré la réduction complémentaire apportée par le traitement tertiaire.

Les tests de cytotoxicité et de toxicité aiguë confirment la toxicité globale de l'eau usée brute ainsi que sa réduction entre l'entrée de la STEU et l'effluent secondaire. Les activités et toxicités résiduelles sont aussi dues à des niveaux élevés d'activité et de toxicité observés en entrée de STEU. Ces résultats incitent donc à compléter l'effet d'atténuation de la filière de traitement de la STEU par une action de recherche des sources (de polluants) à l'origine de ces différents types de toxicité afin de limiter les rejets dans le réseau de collecte des eaux usées et, *in fine*, dans le milieu récepteur.

L'eau usée, selon les points de prélèvement du réseau, présente des profils assez différents en termes d'activités PE, suggérant des contaminations multiples et contrastées d'un point du réseau à un autre. Parmi les différents points de prélèvement, des profils d'intérêt ont été identifiés du fait de la mise en évidence d'activités particulièrement élevées et/ou atypiques, notamment les activités « perturbateurs endocriniens » glucocorticoïde et récepteur X des prégnanes. Des niveaux élevés d'activité génotoxique, de cytotoxicité et de toxicité aiguë ont aussi permis d'identifier un point d'intérêt dans le réseau pour la mise en œuvre de la démarche EDA (Effect-Directed Analysis) afin d'identifier les polluants potentiellement responsables des effets observés.

Mots clés : Micropolluants, Bioessais, Toxicité, Réseau de collecte des eaux usées, STEU

TABLE DES MATIÈRES

1	CONTEXTE ET OBJECTIFS	8
1.1	Contexte.....	8
1.2	Objectif de l'étude	9
2	MATERIELS ET METHODES	10
2.1	Le système d'assainissement de Sophia Antipolis	10
2.1.1	Le réseau de collecte des eaux usées	10
2.1.2	La STEU des Bouillides.....	11
2.1.3	Le traitement complémentaire par ozonation	11
2.2	Description des campagnes d'étude	12
2.2.1	Étude réseau	12
2.2.2	Prélèvements sur la STEU des Bouillides	13
2.3	Préparation des échantillons et bioessais	14
2.3.1	Liste des analyses biologiques.....	14
2.3.2	Préparation des échantillons par extraction et concentration	16
2.4	Bioessais <i>in vitro</i> – Activités perturbateurs endocriniens	17
2.4.1	Principe général.....	17
2.4.2	Bioessais sur levure	17
2.4.3	Bioessais sur cultures cellulaires	18
2.4.4	Proposition d'interprétation au regard de valeurs guide reportées dans la littérature ...	19
2.5	Bioessais <i>in vitro</i> de génotoxicité et de cytotoxicité	21
2.5.1	Génotoxicité, SOS Chromotest	21
2.5.2	Test de cytotoxicité.....	23
2.6	Bioessai <i>in vivo</i>	23
2.6.1	Test de toxicité aigüe d'immobilisation des daphnies	23
3	CARATERISATION DE LA TOXICITE DES EAUX USEES PRELEVES DANS LE RESEAU DE COLLECTE	24
3.1	Profils d'activités perturbateurs endocriniens	24
3.1.1	L'activité œstrogénique (YES et ER).....	25
3.1.2	Les activités androgéniques (YAS et AR) et glucocorticoïde agoniste (GR)	27
3.1.3	Les activités des récepteurs xénobiotiques, PXR et AhR	29
3.1.4	L'activité progestagène (PR et anti-PR) et minéralocorticoïde (MR et anti-MR).....	30
3.2	Génotoxicité, cytotoxicité et toxicité aigüe sur daphnies	33
3.2.1	SOS Chromotest	33
3.2.2	Test de cytotoxicité.....	35
3.2.3	Test de toxicité aigüe sur daphnies.....	36
4	CARATERISATION DE LA TOXICITE DE L'EAUX USEES TOUT AU LONG DE LA FILIERE DE TRAITEMENT DE LA STEU ET PERFORMANCES	37
4.1	Profils d'activités perturbateurs endocriniens <i>in vitro</i>	37
4.1.1	Eaux usées brutes et effluent secondaire	37
4.1.2	Focus sur le traitement complémentaire	42

4.2	Génotoxicité, cytotoxicité et toxicité aigüe sur daphnies	44
4.2.1	Génotoxicité, SOS Chromotest	44
4.2.2	Test de cytotoxicité.....	46
4.2.3	Test d'immobilisation des daphnies	47
4.3	Synthèse sur la caractérisation des effluents de la STEU.....	49
4.3.1	Caractérisation des effluents et performances de traitement de la STEU	49
4.3.2	Conclusions sur le traitement complémentaire par ozonation	49
5	PROFILS DE TOXICITE DES EAUX USEES DE SOPHIA ANTIPOLIS.....	51
5.1	Méthode de représentation des résultats de chaque bioessai par code couleur	51
5.2	Profils de toxicité de la source jusqu'en sortie de STEU (Tableau 13).....	52
5.3	Cartographie des profils de toxicité dans le réseau	52
5.4	Sélection des points de prélèvement pour la mise en œuvre de la démarche EDA.....	55
6	LA CARACTERISATION DES EAUX USEES PAR UNE DEMARCHE BIO-ANALYTIQUE ET SES LIMITES.....	56
7	REFERENCES	58
8	ANNEXE.....	61
8.1	Annexe 1	62
8.2	Annexe 2	64
8.3	Annexe 3 – Liste des figures et des tableaux.....	65
8.3.1	Liste des Figures	65
8.3.2	Liste des Tableaux	67

Glossaire

AhR	Récepteur des dioxines
Ald	Aldostérone
AR	Récepteur des androgènes (en anglais)
B[a]P	Benzo[a]pyrène
Dex	Dexaméthasone
DHT	Dihydrotestostérone
E2	17 β -estradiol
ER	Récepteur des oestrogènes (en anglais)
GR	Récepteur des gluco-corticoïdes
ICPE	Installation Classée Pour l'Environnement
MICROPOLIS	Projet de R&D "Elimination des MICROPolluants à sophia-antiPOLIS"
MR	Récepteur des minéralo-corticoïdes
PE	Perturbateur endocrinien
PR	Récepteur de la progesterone
PreI	Poste de relevage
PXR	récepteur X des prégnanes
R5020	Promegestone
REF	facteurs d'enrichissement relatif (Relative Enrichment Factor)
RU486	Mifepristone
Spi	Spironolactone
SR12813	Tetraethyl 2-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)ethenyl-1,1-bisphosphonate
STEU	Station de traitement des eaux usées

1 CONTEXTE ET OBJECTIFS

1.1 Contexte

Des études récentes (Brack et al., 2017; Malaj et al., 2014) montrent que les micropolluants sont présents dans les milieux aquatiques parfois à des concentrations très faibles, à l'état de mélanges plus ou moins complexes. Pour répondre aux objectifs d'atteinte du bon état des eaux et en garantir les usages, la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) impose une réduction, voire une suppression des émissions des substances dangereuses pour l'eau. La Conférence Environnementale de septembre 2012 a également mis en avant l'importance de s'intéresser aux micropolluants présents dans l'eau, dans le cadre de la prévention des risques sanitaires et environnementaux.

Depuis 2010, le Ministère de l'Ecologie (MEEM) a notamment piloté l'élaboration et la mise en œuvre du plan national de "Lutte contre les Micropolluants Aquatiques", ainsi que celui consacré aux résidus de médicaments dans les eaux (en partenariat avec le Ministère de la Santé), qui préconisent tous deux le recours à des expérimentations territorialisées pour éprouver et valider les méthodes et outils de gestions en rapport avec ces catégories de contaminants.

Pour répondre à la problématique croissante en lien avec la présence des micropolluants dans les eaux urbaines, l'Onema, les agences de l'eau et le Ministère de l'Ecologie, en concertation avec le Ministère de la Santé, ont lancé conjointement un appel à projets intitulé « Innovation et changements de pratiques – Lutte contre les micropolluants des eaux urbaines ». Cet appel à projets, lancé en juin 2013, s'est déroulé en deux phases: un appel à manifestations d'intérêt suivi d'une phase finale de sélection. Il a permis de sélectionner 13 projets collaboratifs composés de différents partenaires (collectivités, laboratoires de recherche, entreprises) sur 34 projets candidats. Chacun des projets de Recherche, Développement et Innovation retenus est ancré dans un territoire. Ces projets sont aidés grâce à une enveloppe financière de 10 millions d'euros par l'Onema et les agences de l'eau.

L'identification des flux de micropolluants vers les milieux aquatiques et le développement de solutions pour leur réduction se heurtent à plusieurs problèmes techniques. D'une part, la quantification de l'ensemble des substances est rendue difficile par l'hétérogénéité des micropolluants et nécessite donc la mise en place d'un arsenal de méthodes analytiques à la fois coûteux et complexe. Cette solution ne saurait être suffisante au regard du nombre de molécules (et de l'existence de produits de dégradation) qui peuvent potentiellement se retrouver dans les eaux usées urbaines et industrielles, voies principales de rejet de ces micropolluants vers le milieu récepteur. D'autre part, la quantification de quelques dizaines de molécules réglementées ne permet pas d'évaluer le potentiel toxicologique et écotoxicologique de ces flux de micropolluants, pour lesquels les effets de mélange peuvent parfois conduire à un potentiel de toxicité supérieur à la somme des toxicités de chacune des substances.

Le projet MICROPOLIS Indicateurs propose une approche innovante de recherche et détection des micropolluants sur la base de leur toxicité en s'appuyant sur une batterie de test biologiques (bioessais) connus ou récemment développés.

Cette approche est pour la première fois appliquée de la source d'émission des micropolluants (eaux usées industrielles et réseau de collecte des eaux usées urbaines) jusque dans le milieu récepteur. L'objectif de ce projet est de définir un ensemble cohérent d'outils pour l'identification des sources des micropolluants, pour l'évaluation de l'efficacité des procédés de traitement et pour l'évaluation de l'impact de ces flux de micropolluants sur le milieu aquatique récepteur.

1.2 Objectif de l'étude

La tâche 2A du projet MICROPOLIS Indicateurs (objet de ce livrable L1) a pour objectif de caractériser la toxicité des eaux usées du territoire de Sophia-Antipolis, depuis le réseau de collecte des eaux usées à la sortie de la station de traitement des Bouillides. Pour cela, la stratégie employée se base sur les réponses d'un ensemble de bioessais complémentaires, incluant :

- des **bioessais *in vitro* spécifiques du mode d'action** des contaminants permettant de dresser des profils de contamination sur la base d'activités de type perturbateurs endocriniens (PE, approche multi-récepteurs), dioxin-like et génotoxicité. Ces outils *in vitro* permettent de renseigner sur le type d'activité et la quantité (en équivalents-toxiques) de contaminants présents dans l'échantillon.
- des **bioessais d'écotoxicité** aiguë *in vivo* (bioessai sur Daphnies) et *in vitro* (cytotoxicité sur gonade de truites), pour renseigner de la toxicité globale associée aux échantillons.

Cette étape de caractérisation des eaux usées doit permettre de contribuer à la définition d'indicateurs biologiques innovants pour :

- le suivi et la recherche des sources de micropolluants depuis la collecte des eaux usées brutes jusqu'au rejet des eaux usées traitées. Ceci afin de mettre en place les solutions de réduction à la source les plus pertinentes
- l'évaluation des performances des procédés de traitement (dont le traitement par ozonation tertiaire ciblant spécifiquement les micropolluants).

2 MATERIELS ET METHODES

2.1 Le système d'assainissement de Sophia Antipolis

2.1.1 Le réseau de collecte des eaux usées

Le système assainissement de l'« agglomération d'assainissement de Valbonne-Sophia-Antipolis » est composé de plusieurs réseaux de collecte répartis sur les communes de Valbonne, Biot, Roquefort les Pins, Opio, Mougins, Le Rouret et Villeneuve Loubet (06), qui sont gérés soit en régie soit par SUEZ Eau France (Figure 1).

Le *Syndicat pour la réhabilitation et l'extension de la station d'épuration des Bouillides* (Syndicat des Bouillides) est responsable des grands collecteurs et du transfert vers la station de traitement des eaux usées (STEU) de Sophia Antipolis « Les Bouillides ».

Le réseau de collecte mesure près de 116 km avec une distribution inégale suivant les communes (plus de 60 km sur la commune de Valbonne Sophia Antipolis). Il possède 16 postes de relevage, dont 10 considérés comme des points de déversement au milieu en cas de trop-plein. Il comprend aussi 14 postes de comptage. Les débits mesurés en entrée de STEU oscillent entre 4 300 et 5 000 m³/j (temps sec), dont plus de 80% provient de la branche D (mesuré au point 8, Figure 1). Pour cette branche, les contributions mesurées aux points 6 et 7 représentent autour de 20% chacune du débit mesuré au point 8. La contribution de la branche Dm, mesurée au point 1, correspond aussi à 20% du débit de la branche D. Cela représente autour de 15 à 17% du débit entrant à la STEU pour chacun de ces points.

Les eaux collectées sont principalement des eaux usées urbaines, mais la station de traitement des eaux usées étant installée au cœur du technopôle de Sophia Antipolis, une part des eaux usées collectées est d'origine industrielle, notamment du secteur de la transformation (chimie, pharmacologie, cosmétologie...). Il est à noter la présence de plusieurs ICPE sur ce territoire.

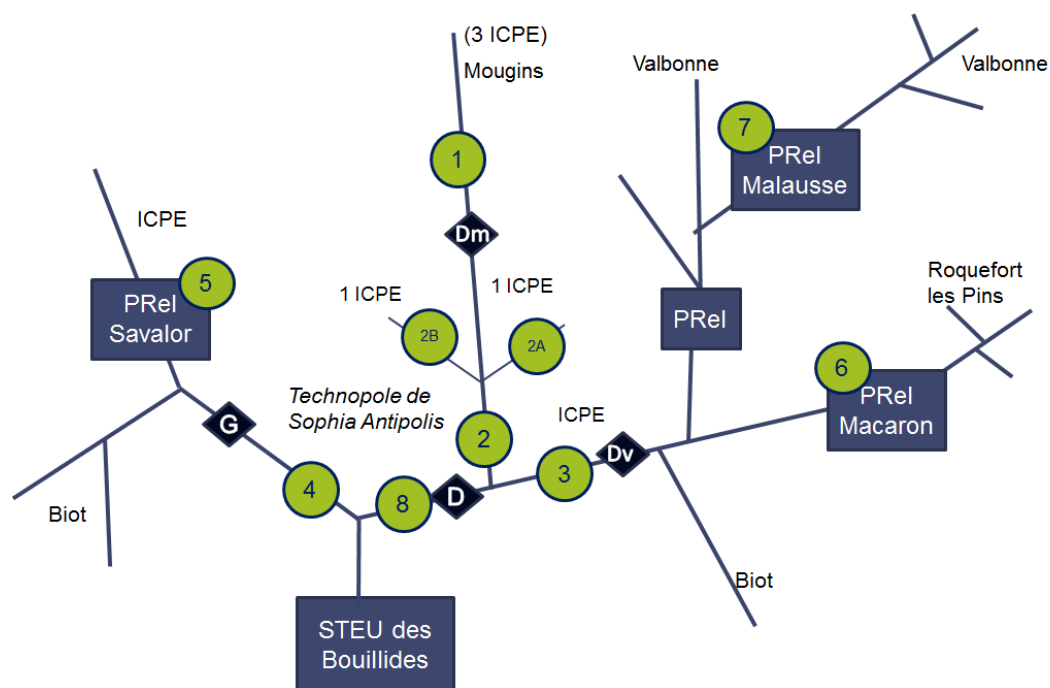


Figure 1. Localisation des points de prélèvements (numéros) sur le réseau de collecte des eaux usées sur le territoire du Syndicat des Bouillides (PReL : poste de relevage ; ICPE : Installation Classée Pour l'Environnement)

2.1.2 La STEU des Bouillides

La station de traitement des eaux usées (STEU) de Sophia Antipolis « Les Bouillides », du nom du cours d'eau dans lequel sont rejetées les eaux usées traitées, est une station compacte qui reçoit partie ou totalité des eaux résiduaires urbaines des communes de Valbonne, Biot, Roquefort les Pins, Opio, Mougins, Le Rouret et Villeneuve Loubet (06). Le maître d'ouvrage de la STEU est le *Syndicat des Bouillides* et son exploitation est réalisée par SUEZ Eau France.

La capacité de traitement actuelle de la STEU est de 30 000 EH. La filière de traitement de la station est composée d'un traitement primaire par décantation lamellaire puis d'un traitement secondaire biologique du carbone et de l'azote (nitrification et dénitrification) par biofiltration (Figure 2).

Une description plus détaillée de la filière de traitement de la STEU, des conditions de fonctionnement et des objectifs de traitement est disponible dans le rapport du projet MICROPOLIS Procédés (Choubert et al., 2017).

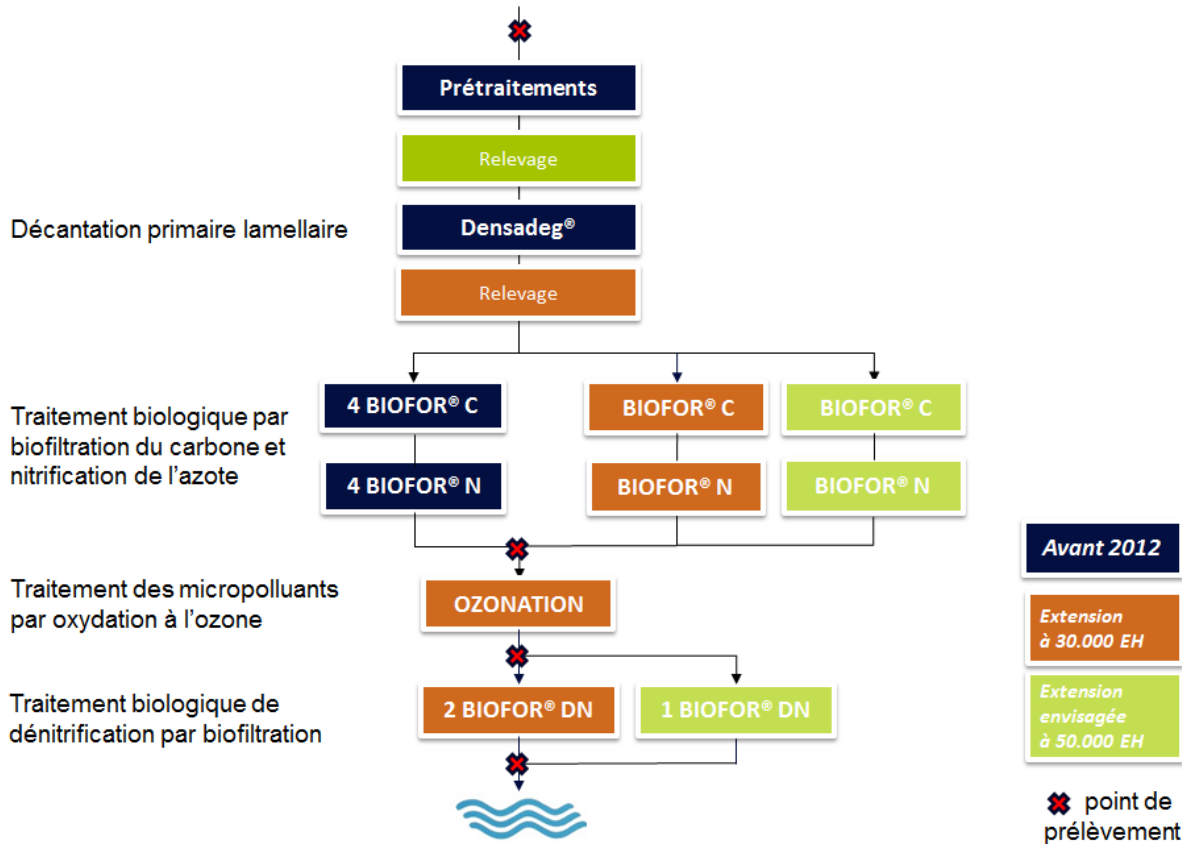


Figure 2. Représentation schématique de la filière de traitement des eaux de la station de Sophia Antipolis « Les Bouillides »

2.1.3 Le traitement complémentaire par ozonation

En 2012, un traitement complémentaire par ozonation pour l'élimination des micropolluants a été installé lors de l'extension de la capacité de traitement de la STEU à 30 000 EH (Figure 3). Il est inséré entre les biofiltres nitrifiants et dénitrifiants (Biofor DN).

L'implantation de ce traitement complémentaire par ozonation sur la STEU des Bouillides avait pour objectifs de mieux protéger le milieu récepteur et la ressource en eau potable de la ville d'Antibes, et de préserver le cadre naturel du bassin de Sophia-Antipolis. C'est la première réalisation en France à offrir des garanties d'élimination d'une sélection de substances prioritaires vis-à-vis du maître d'ouvrage (prévues lors du contrat de construction).

Une description détaillée de ce traitement complémentaire et de ses performances d'élimination des micropolluants émergents (pharmaceutiques, hormones, pesticides) est disponible dans le rapport du projet MICROPOLIS Procédés (Choubert et al., 2017).

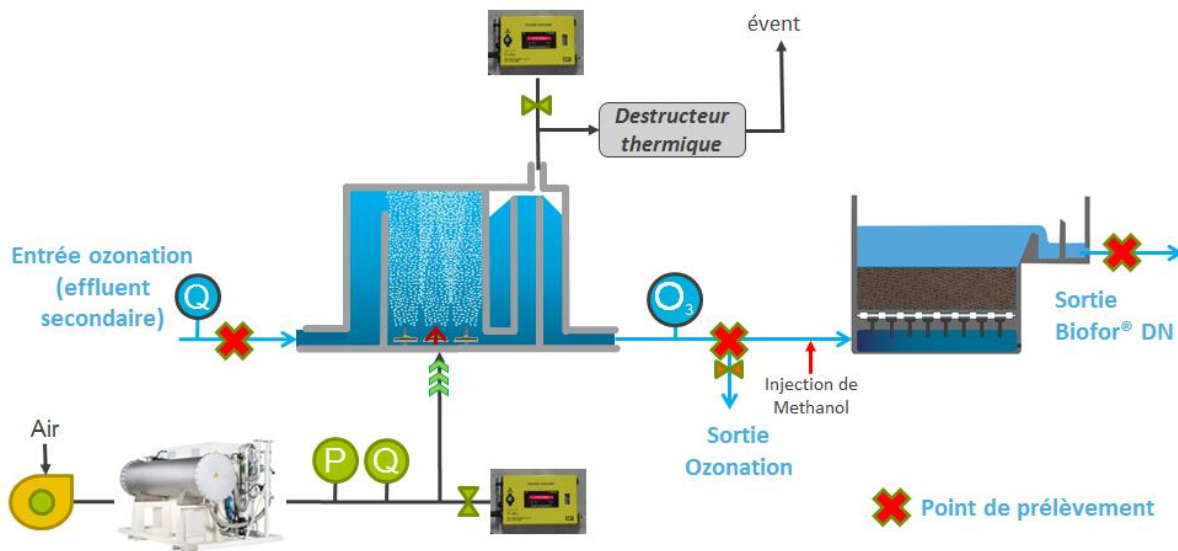


Figure 3: Représentation schématique du traitement complémentaire par ozonation de la STEU des Bouillides

2.2 Description des campagnes d'étude

L'étude s'est déroulée en deux étapes. Une première campagne de criblage a eu lieu en mars 2015, elle avait pour objectif de valider les protocoles de prélèvement et d'analyse mais aussi d'avoir une première information sur les différents types de toxicité des eaux usées du réseau afin d'optimiser la stratégie d'acquisition des données (nombre de points d'étude) et de déploiement des outils (nombre et type de bioessais). Ensuite, plusieurs campagnes de prélèvement ont été réalisées sur le réseau de collecte des eaux usées et sur la STEU (juin, septembre et novembre 2015).

2.2.1 Étude réseau

Au cours de cette étude, 10 points, répartis sur les différentes branches du réseau de collecte des eaux usées, ont fait l'objet d'un ou plusieurs prélèvements (Figure 1). Ces points de prélèvements sont situés sur des postes de relevage des eaux usées mais aussi au niveau de regards sur la partie gravitaire du réseau à proximité de la STEU.

Lors de la campagne de criblage (mars 2015), des prélèvements ponctuels ont été réalisés en 6 points du réseau (Tableau 1). Le point 1 a fait l'objet d'un prélèvement complémentaire d'un échantillon moyen 24h afin de le comparer au prélèvement ponctuel.

Suite aux résultats obtenus pour cette première campagne, certains points de prélèvement ont été ajoutés en substitution ou en complément d'autres points (points 2, 3 et 8) lors des campagnes de septembre et novembre 2015. Le point 7, ne présentant pas de spécificité (et étant difficile d'accès), n'a pas été conservé après la campagne de criblage. Lors de ces 2 dernières campagnes, les prélèvements ont été réalisés sur 24h (avec asservissement au débit) lorsque cela était techniquement possible (Tableau 1).

Chaque échantillon d'eau est stocké à 4°C pendant au maximum 24 h avant extraction. L'extrait organique est ensuite conservé à -20 °C avant envoi aux partenaires pour analyse.

Tableau 1. Points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées par campagnes et mode d'échantillonnage

Date	Mars 2015	Sept. 2015	Nov. 2015	n	Description du point de prélèvement	
Point 8		moyen 24h*	-	1	Regard (périmètre STEU)	Branche D
Point 2	-	-	ponctuel	1	Regard	Branche Dm
Point 2a	-	-	ponctuel	1	Regard	
Point 2b	-	-	ponctuel	1	Regard	
Point 1	ponctuel & moyen 24h	moyen 24h	moyen 24h	4	Regard avec mesure de débit	
Point 3	ponctuel	-	ponctuel	2	Regard	Branche Dv
Point 6	ponctuel	moyen 24h	moyen 24h	3	Poste de relevage	
Point 7	ponctuel	-	-	1	Poste de relevage	
Point 4	ponctuel	moyen 24h*	moyen 24h*	3	Regard (périmètre STEU)	Branche G
Point 5	ponctuel		moyen 24h	2	Poste de relevage	

*reconstitué en fonction du débit (à partir de prélèvement horaire, 24 flacons)

2.2.2 Prélèvements sur la STEU des Bouillides

Au cours des différentes campagnes, des prélèvements ont pu être réalisés en 4 points de la STEU des Bouillides (Figure 2, Tableau 2) :

- en entrée de STEU (nommé *entrée STEU*, n = 4)
- en entrée d'ozonation (*effluent secondaire*, n = 5)
- en sortie de l'étape d'ozonation (*sortie ozonation*, n = 3)
- en sortie de l'étape de dénitrification par biofiltration (*sortie STEU*, n = 5)

Tableau 2. Points de prélèvement sur la STEU par campagnes et mode d'échantillonnage

Date	Mars 2015	Juillet 2015	Sept. 2015	Nov. 2015	Nov. 2015	n
Type de prélèvement	Moyen 3h	Moyen 24h*	Moyen 24h*	Moyen 24h*	Moyen 24h*	
Entrée STEU	X		X	X	X	4
Sortie secondaire	X	X	X	X	X	5
Sortie ozonation	X	X	X			3
Sortie STEU	X	X	X	X	X	5

*reconstitué en fonction du débit.

Lors de la première campagne de criblage, les prélèvements ont été réalisés en parallèle d'une campagne d'étude des performances d'élimination des micropolluants du traitement complémentaire de la STEU tertiaire, menée dans le cadre du projet MICROPOLIS Procédés¹. Par conséquent, lors de cette campagne, des échantillons moyens 3h ont été prélevés proportionnellement au temps (débit constant).

Lors des 4 campagnes suivantes sur la STEU des Bouillides, l'ensemble des échantillons a été prélevé sur une période de 24h et de façon proportionnelle au débit. Pour deux campagnes (juillet et septembre 2015), coordonnées avec le projet MICROPOLIS Procédés, les échantillons du traitement complémentaire ont fait l'objet d'analyse de micropolluants.

Chaque échantillon d'eau est stocké à 4°C pendant au maximum 24 h avant extraction. L'extrait organique est ensuite conservé à -20 °C avant envoi aux partenaires pour analyse.

2.3 Préparation des échantillons et bioessais

2.3.1 Liste des analyses biologiques

Sur la base d'une étude bibliographique (préalable au projet) et des connaissances acquises lors de plusieurs projets de R&D (notamment ANR ECHIBIOTEB²) par les différents partenaires du projet, un ensemble de bioessais a été présélectionné pour être appliqué dans le cadre du projet MICROPOLIS Indicateurs sur la base de plusieurs critères.

D'une part, ces analyses biologiques sont sensibles et spécifiques. En effet, elles permettent d'évaluer les effets potentiels de micropolluants en mélange et couvrent un large spectre d'activités/effets biologiques : multiples activités « perturbateurs endocriniens », génotoxicité, cytotoxicité, écotoxicité aiguë (Tableau 3). Ce point est particulièrement important pour intégrer au maximum la diversité de micropolluants présents dans les eaux usées. D'autre part, ces bioessais sont en partie disponibles commercialement ou pourraient l'être rapidement.

Le choix d'une partie de ces bioessais a été aussi dirigé par leur compatibilité avec la démarche EDA (effect-directed analysis) qui sera appliquée dans la tâche 3 du projet sur la base des résultats de cette étude de caractérisation des eaux usées de Sophia Antipolis.

Ce projet était aussi l'opportunité de comparer la réponse de bioessais visant les mêmes activités « perturbateurs endocriniens » (œstrogénique et androgénique) mais pour lesquels des réponses variées ont pu être reportées dans la littérature pour des échantillons d'eau usées traitées (Jarošová et al., 2014; Leusch et al., 2017, 2010). En effet, deux tests sont proposés pour ces deux activités s'appuyant sur la mise en œuvre soit de levures soit de lignées cellulaires. Les tests sur levures sont réputés plus sélectifs mais plus facile à mettre en œuvre.

L'ensemble de ces différents bioessais est résumé dans le Tableau 3. Ils font l'objet d'une description plus détaillée dans les paragraphes suivants. Certains de ces bioessais sont directement appliqués aux échantillons prélevés mais pour la plupart d'entre eux une étape d'extraction/concentration, décrite ci-après, est nécessaire.

¹ MICROPOLIS Procédés, projet de R&D mené par IRSTEA en collaboration avec SUEZ avec le soutien financier de l'Agence de l'Eau Rhône Méditerranée Corse, ayant pour objectif d'évaluer les performances techniques, économiques et environnementales du traitement complémentaire de la STEU des Bouillides pour le traitement des micropolluants (résidus médicamenteux, hormones, pesticides).

² <https://echibioteb.irstea.fr/>

Tableau 3. Récapitulatif des bioessais appliqués pour la caractérisation des eaux usées (tâche 2A du projet MICROPOLIS Indicateurs).

Bioessai	Nom du bioessai	Type de toxicité	Mode d'action		Cellules / Organismes	Analyse sur	Laboratoire	Exemples de molécules ciblées	
<i>In vitro</i>	YES	Activités « perturbations endocriniennes »	Récepteurs stéroïdiens	Œstrogènes	Levure - Saccharomyces cerevisiae	Extrait organique	SUEZ (CIRSEE)	Hormones oestrogéniques	
	YAS			Androgènes				Hormones androgéniques	
	ER			Œstrogènes	Lignée cellulaire MELN (humaine)		Œstrogènes naturels et synthétiques, alkylphénols, produits cosmétiques, bisphénols, phtalates		
	AR			Androgènes	Lignée cellulaire MDA-kb2 (humaine)		Stéroïdes naturels et synthétiques, pesticides, médicaments, bisphénols		
	GR			Glucocorticoïdes	Lignée cellulaire MDA-kb2 (humaine)				
	MR et anti-MR			Minéralo-corticoïdes	Lignée cellulaire HG5LN-hMR (humaine)*		Corticoïdes naturels et de synthèse (pharmaceutiques)		
	PR et anti-PR			Progestagène	Lignée cellulaire HELN-PRB (humaine)*		Progestagènes naturels et de synthèse (pharmaceutiques)		
	AhR			Récepteurs de xénobiotiques	HAP-like (<i>Aryl hydrocarbon</i>)		Lignée cellulaire PLHC-1 (poisson)	Produits de combustions, composées organiques volatils : HAP, PCB, dioxine	
	PXR		Prégnane et xénobiotiques		Lignée cellulaire HG5LN-hPXR (humaine)		Médicaments, pesticides, stéroïdes, plastifiants, surfactants		
	SOS Chromotest		Génotoxicité	Dommages primaires à l'ADN			E. coli génétiquement modifiée (PQ37)	TOXEM	HAP, PCB,...
	Test de cytotoxicité		Cytotoxicité	Mortalité de cellules en culture			Lignée cellulaire RTG2 (poisson)	Echantillon brut	TOXEM
<i>In vivo</i>	Test Daphnies	Ecotoxicité	Immobilisation		<i>Daphnia Magna Straus</i>	ANALY-CO	Métaux,...		

* bioessais réalisés à l'unité INSERM U1194 (sous-traitance)

2.3.2 Préparation des échantillons par extraction et concentration

Pour éviter les biais et favoriser la comparaison des réponses aux différents bioessais, il a été opté que tous les échantillons soient pré-concentrés selon un seul et même protocole pour l'ensemble des bioessais *in vitro* et par un seul laboratoire (SUEZ CIRSEE). Le protocole retenu est classiquement utilisé en bioanalyse *in vitro* ; il a été développé par Creusot (2011) et permet l'extraction optimale de divers contaminants organiques représentant une gamme large en termes de polarité et d'hydrophobicité. L'extrait ainsi obtenu a ensuite été aliquoté et fourni aux laboratoires en charge de la réalisation des bioessais.

Etape 1 : Filtration

Les filtrations sont réalisées le lendemain du prélèvement sur des filtres en fibre de verre 0,7 µm de type GF/F.

Etape 2 : Extraction sur phase solide

Toutes les extractions sont réalisées sur des cartouches, de marque Oasis HLB, 200 mg, 6 cc, qui sont conditionnées avec 5 mL dichlorométhane, puis 5 mL méthanol, et enfin 5 mL eau ultra-pure. Tous les points sont traités de la même façon, soit 1 L d'effluent par cartouche. Le débit de percolation est de 10 mL/min. L'élution est réalisée avec 3 solvants : méthanol, méthanol/dichlorométhane (50/50, v/v), dichlorométhane. Les volumes d'élution sont de 10 mL.

Afin d'optimiser la sensibilité de détection par les bioessais *in vitro*, le volume d'échantillon utilisé lors de l'étape d'extraction a été adapté en fonction du type d'échantillon (Tableau 4).

Tableau 4. Volume d'échantillon filtré par type d'échantillon et point de prélèvement

Type d'échantillon	Eaux usées brutes	Effluent secondaire	Effluent tertiaire
Point de prélèvement	Entrée STEU, Réseau	Entrée ozonation	Sortie ozonation, Sortie STEU
Volume filtré	3 L	5 L	7 L

Etape 3 : Re-concentration

La re-concentration est réalisée sous flux d'azote jusqu'à un volume de 0,5 mL environ, puis l'ensemble des éluats concentrés est regroupé pour assurer l'homogénéité de l'échantillon entre les différents partenaires, responsables de différents bioessais.

Lors de cette étape, les tubes seront rincés avec un mélange méthanol/dichlorométhane (50/50, v/v) pour limiter les pertes. Chaque extrait est ensuite aliquoté selon le volume demandé par chaque laboratoire.

Avant envoi, chaque extrait est reconcentré à sec, sous flux d'azote, pour permettre une homogénéité de cette étape de préparation entre les divers partenaires. La même méthodologie est appliquée sur des blancs Evian pour chaque partenaire.

2.4 Bioessais *in vitro* – Activités perturbateurs endocriniens

2.4.1 Principe général

Les bioessais *in vitro* décrits dans cette section reposent tous sur le même principe : l'utilisation d'un modèle cellulaire (levures ou cellules humaines ou ichtyennes) intégrant de façon stable un gène rapporteur dont l'expression est induite par l'activation (fonction agoniste) ou l'inhibition (fonction antagoniste) d'un récepteur nucléaire après liaison à un ligand chimique (Figure 4-a). Ce récepteur fonctionne comme un facteur de transcription et induit la transcription du gène rapporteur dont l'expression est facilement détectable par spectrophotométrie, luminométrie ou fluorescence, selon le bioessai. Ce récepteur joue un rôle de bio-détecteur au sein d'un échantillon complexe et la réponse mesurée est directement proportionnelle à la concentration en ligand effecteur (Figure 4-b ; Aït-Aïssa 2009).

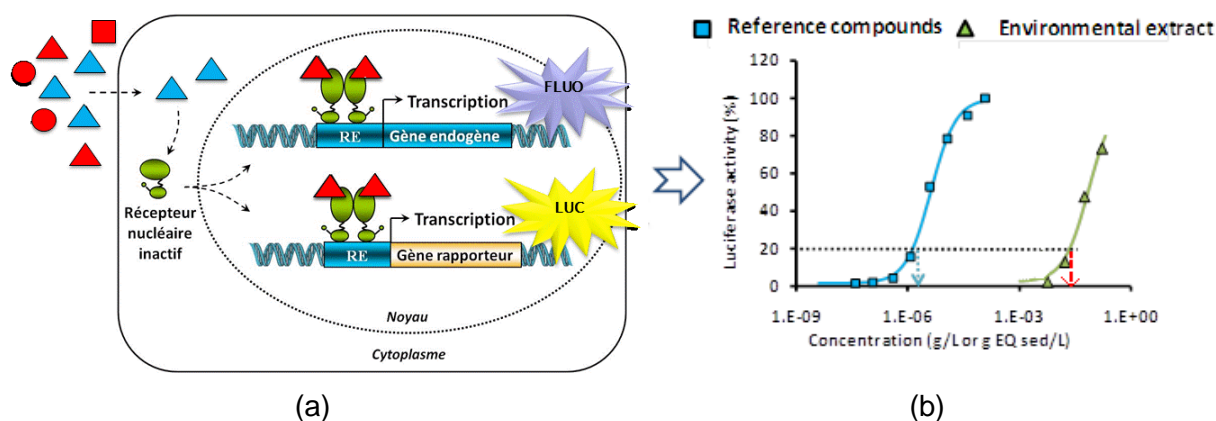


Figure 4. (a) Principe des bioessais *in vitro* utilisés pour la bio-détection des activités PE et HAP-like dans le projet MICROPOLIS et (b) exemple de courbes dose-réponses obtenues.

Pour un échantillon donné, l'établissement d'une courbe dose-réponse permet de déterminer une concentration induisant x % d'effet (EC_x)³. L'activité biologique de l'échantillon est ensuite quantifiée à travers le calcul de l'équivalent toxique biologique (Bio-TEQ) défini comme étant le rapport de l' EC_{20} du composé de référence sur l' EC_{20} de l'extrait (Figure 4-b ; Creusot et al., 2010) :

$$\text{Bio-TEQ (en référence-eq/L)} = \frac{EC_{20_{\text{Référence}} \text{ (en g/L)}}}{EC_{20_{\text{Echantillon}} \text{ (en L-eq/L)}}$$

Pour un bioessai donné, l' EC_{10} et l' EC_5 de la substance de référence est utilisée pour déterminer, respectivement, les limites de quantification (LQ) et de détection (LD).

2.4.2 Bioessais sur levure

Description et principe de mise en œuvre

Les bioessais YES et YAS, sont appliqués pour quantifier respectivement les activités agonistes œstrogénique et androgénique.

Ces bioessais reposent sur l'utilisation de levures (*Saccharomyces Cerevisia*) génétiquement modifiées, permettant d'identifier les composés interagissant avec les récepteurs humains des œstrogènes (hER α) et androgènes (hAR). Les séquences génomiques hER α et hAR ont été introduites dans le chromosome principal des levures avec un plasmide d'expression portant le gène rapporteur lacZ codant pour l'enzyme β -gal. Dès la liaison au ligand, les récepteurs

³ Modélisation des courbes selon le modèle de Hill et dérivation des EC_x à l'aide de la macro Excel™ REGTOX, disponible gratuitement en ligne à http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html

interagissent avec le domaine de liaison présent sur le plasmide et déclenchent la transcription du gène rapporteur lacZ. La β -gal est sécrétée dans le milieu et convertit le substrat jaune (le chlorophenol red β -D-gala CPRG) en produit de dégradation rouge (chlorophénol rouge). La densité optique (DO), mesurée à 570 nm, est directement proportionnelle à la quantité de β -gal sécrétée et aux substances ayant réagi avec les récepteurs correspondants.

Les tests YES et YAS sont réalisés à partir de kits fournis par la société Xenometrix. Les essais sont réalisés selon les recommandations du fournisseur. Les levures *S. cerevisiae* sont mises en culture de 2 à 4 jours à 31 °C dans des microplaques 96 puits. L'échantillon extrait est ensuite ajouté à différentes concentrations. Les microplaques sont incubées pendant 48 h à 32°C en présence d'un substrat de la β -gal. L'expression de la β -gal est proportionnelle à la présence de composés agonistes (passage du substrat jaune au substrat rouge). Cet effet est quantifié par spectrophotométrie à 570 nm. Un contrôle de la densité cellulaire est effectué par la mesure de la densité optique à 690 nm, elle permet de vérifier la non-cytotoxicité de l'extrait et la validité de la mesure.

Analyse des résultats

Une microplaque est utilisée pour chaque type d'activité, soit une activité agoniste œstrogénique ou androgénique. L'extrait à tester est ajouté au milieu réactionnel à des facteurs de dilutions décroissants (8 puits verticaux), les essais sont réalisés en duplicata (2 puits par échantillons) afin de s'assurer de la répétabilité des tests. Pour chacune des activités, est introduit un contrôle de référence. Il est aussi utilisé pour la quantification des activités des échantillons (Tableau 5).

Tableau 5. Synthèse des bioessais YES et YAS

Activité		Bioessai	Mesure, Unité / expression du résultat	
Œstrogénique	Agoniste	YES	Activité œstrogénique de l'échantillon, exprimée en équivalent 17 β -œstradiol (E2)	ng E2-eq/ L
Androgénique		YAS	Activité androgénique de l'échantillon, exprimée en équivalent 5 α -dihydrotestostérone (DHT)	ng DHT-eq/ L

2.4.3 Bioessais sur cultures cellulaires

Description et principe de mise en œuvre

Si les récepteurs des hormones sexuelles (œstrogènes, androgènes) ont été bien identifiés comme la cible de contaminants chimiques environnementaux, d'autres récepteurs (e.g. récepteurs des corticostéroïdes, des xénobiotiques, de la progestérone) peuvent également être la cible de micropolluants et induire des altérations du développement et de la reproduction *in vivo*. Des travaux récents ont montré la présence de ce type de contaminants dans des eaux usées (Bellet et al., 2012; Creusot et al., 2010) ou dans des rejets industriels (Creusot et al., 2014). Dans une démarche de bio-diagnostic des PE au sein de mélanges aussi complexes que les eaux usées, et eu égard aux sources d'origines domestiques au sein du réseau, il convient donc de prendre en compte cette diversité de mécanismes d'actions.

En complément des tests commerciaux sur levures, un panel de lignées cellulaires avec gène rapporteur a donc été utilisé pour dresser des profils d'activités sur la base de multiples récepteurs (Tableau 6). Ces bioessais permettent la détection d'activités relayées par différents récepteurs hormonaux de type stéroïdiens (œstrogène (ER), androgène (AR), glucocorticoïde (GR), minéralo-corticoïde (MR) et progestagène (récepteur de la progestérone, PR). Pour étendre le diagnostic, deux autres récepteurs, impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et bien caractérisés vis-à-vis d'un large panel de xénobiotiques, ont été utilisés. Le récepteur de la dioxine (AhR) permet de détecter les composés de type dioxin-like (e.g. dioxines, furanes, PCB-DL, HAP-DL). Le récepteur X des prégnanes (PXR) qui induit notamment l'expression du cytochrome P450

3A4 chez l'Homme, impliqué dans le métabolisme de 60% des médicaments (Mnif et al., 2007). L'ensemble de ces bioessais a déjà été utilisé pour la bio-analyse d'échantillons environnementaux dans le cadre d'études précédentes (Baig et al., 2015; Bellet et al., 2012; Creusot et al., 2014).

Tableau 6 : Bioessais *in vitro* sur cultures cellulaires pour la détection de contaminants ligands de récepteurs nucléaires et de xénobiotiques.

Activité ciblée		Nom	Lignée cellulaire	Composé de référence	unité
Œstrogène	Agoniste	ER	MELN	17β-œstradiol (E2)	ng E2-eq/L
Androgène	Agoniste	AR	MDA-kb2	5α-dihydrotestostérone (DHT)	ng DHT-eq/L
Glucocorticoïde	Agoniste	GR	MDA-kb2	dexaméthasone (Dex)	μg Dex-eq/L
Minéralo-corticoïde*	Agoniste	MR	HG5LN-hMR	aldosterone (Ald)	μg Ald-eq/L
	Antagoniste	Anti-MR		spironolactone (Spi)	μg Spi-eq/L
Progestagène*	Agoniste	PR	HELN-PRB	promegestone (R5020)	ng R5020-eq/L
	Antagoniste	Anti-PR		mifepristone (RU486)	μg RU486-eq/L
HAP-like	Agoniste	AhR	PLHC-1	benzo[a]pyrène (B[a]P)	μg B[a]P-eq/L
Prégnane X	Agoniste	PXR	HG5LN-PXR	SR12813	μg SR-eq/L

*Bioessais réalisés à l'INSERM U1194 (Dr P. Balaguer)

Dans le cas spécifique de la lignée cellulaire MDA-kb2 qui co-exprime GR et AR, le gène rapporteur luciférase présent dans cette lignée peut être activé par les deux récepteurs (Wilson et al., 2002). Dans le cas d'une détection d'une activité agoniste par un échantillon (induction de luciférase), un test complémentaire utilisant un inhibiteur spécifique du AR (la flutamide) ou du GR (RU486) est réalisé afin d'identifier le récepteur impliqué dans la réponse à l'échantillon. Toutefois, dans le cas particulier d'une activité mixte (co-présence d'activateurs des deux récepteurs), le manque de spécificité du test peut être limitant dans l'interprétation finale du résultat. Ce point est discuté dans la partie résultats.

Les bioessais ont été réalisés en microplaques de 96 puits. Les cellules sont exposées à une gamme de dilution de chaque extrait (quatre réplicats par concentration) à l'aide d'un automate de pipetage (TECAN Evo75™). Chaque test inclut des témoins négatifs (cellules seules et en présence du solvant DMSO) et positif (gamme dose-réponse du ligand de référence). Après 4 h à 24 h d'exposition, selon le bioessai, l'activité de la luciférase est mesurée au luminomètre. Un test est considéré comme valide si l'EC50 du ligand de référence et le facteur d'induction maximal (ratio témoin positif sur témoin solvant) sont dans la gamme de réponse attendue (dépendant de chaque bioessai).

2.4.4 Proposition d'interprétation au regard de valeurs guide reportées dans la littérature

Il est proposé dans cette étude de compléter la caractérisation des effluents par une comparaison des activités perturbateurs endocriniens mesurées à d'une part celles reportées dans la littérature (par exemple. Baig et al., 2015; Jálková et al., 2013; Margot et al., 2013; Stalter et al., 2011; van der Linden et al., 2008 ; annexe 1) mais aussi à des valeurs guides proposées récemment dans la littérature par plusieurs auteurs (Brand et al., 2013; Escher et al., 2015; Jarošová et al., 2014; Kunz et al., 2015; van der Oost et al., 2016 ; annexe 2). Ces valeurs « guide » ou *trigger values*

ont pour objectif de définir un seuil au-dessus duquel il existerait un risque pour la qualité des écosystèmes aquatiques et/ou pour la santé humaine. Les valeurs seuil retenues pour cette étude sont compilées dans le Tableau 7.

Tableau 7. Valeurs seuils sélectionnées pour différentes activités « PE » du projet MICROPOLIS Indicateurs

Activité agoniste ciblée	Seuil	Unité	Bioessai	Cible du seuil	Références	Seuil exprimée dans l'unité des bioessais utilisés dans ce projet	
ER	0,2-0,4 0,4	ng E2eq/L	YES & MELN NQE (chimie)	Ecosystèmes aquatiques	Jarošová et al. (2014) Kunz et al. (2015)	0,4	ng E2-eq/L
AR	11	ng DHTeq/L	AR CALUX	Santé humaine	Brand et al. (2013)	11	ng DHT-eq/L
GR	100	ng Dexeq/L	GR CALUX	Ecosystèmes aquatiques	van der Oost et al. (2016)	0,10	µg Dex-eq/L
PR	333	ng Org2058eq/L	PR CALUX	Santé humaine	Brand et al. (2013)	(333)*	ng R5020-eq/L
PXR-like	3	µg N1eq/L	PXR CALUX	Ecosystèmes aquatiques	van der Oost et al. (2016)	0,4**	µg SR-eq/L
HAP-like	150	ng B[a]Peq/L	PHA CALUX	Ecosystèmes aquatiques	van der Oost et al. (2016)	0,15	µg B[a]P-eq/L

*équivalence non vérifiée expérimentalement

** conversion faite sur la base d'un ratio Nicarpidine/SR12813 de 7.3 (valeur communiquée par l'INSERM U1194)

L'activité œstrogénique est l'activité PE la plus largement étudiée parmi les différentes activités spécifiques aux perturbateurs endocriniens. De nombreuses études ont permis d'aboutir à une valeur guide, pour définir un seuil de qualité environnemental, de 0,4 ng E2-eq/L. Cette valeur fait encore l'objet de travaux pour sa validation mais elle fait déjà l'objet d'un consensus scientifique large.

Contrairement aux autres valeurs guide retenues pour cette étude, les valeurs seuils utilisées pour les activités androgénique et progestagène, respectivement 11 ng DHT-eq/L et 333 ng Org2058-eq/L, ont été définies sur la base de protection de la santé humaine via la consommation d'eau potable. Cette approche « santé humaine » conduit souvent à des valeurs seuils supérieures à celles requises pour un objectif de protection des écosystèmes aquatiques comme illustré par le seuil proposé par Brand et al. (2013) pour l'activité œstrogénique de 3,8 ng E2-eq/L (vs. 0.4 ng E2-eq/L pour un objectif de protection environnementale). Pour l'activité PR, nous sommes confrontés au problème du composé de référence qui n'est pas le même pour tous les bioessais, en l'occurrence PR CALUX et HELN PRB pour cette activité. Toutefois, ces deux composés possèdent une affinité pour le PR assez similaires (Kelder et al., 2010). D'une manière générale, les ordres de grandeur des activités PR restent comparables que l'on utilise l'un ou l'autre composé en tant que référence (Leusch et al., 2017).

Il est à noter que les valeurs seuils de ces deux activités ont été définies pour les bioessais AR-CALUX et PR-CALUX (bioessais de type MDA-kB2 et HELN-PRB dans cette étude) or il a été mis en évidence qu'il est préférable d'avoir des valeurs seuil propres à chaque bioessai du fait de possibles différences de sélectivité et sensibilité des différents types de bioessais et récepteurs employés.

Cette remarque est aussi valable pour les valeurs seuils retenues pour les activités GR, PXR et HAP-like, qui ont toute été définies pour des bioessais basés sur les lignés cellulaires CALUX. Cela est particulièrement important pour l'activité GR car, comme détaillé précédemment (§2.4.3), la souche MDA-kB2 présente une spécificité d'avoir des récepteurs AR et GR, ce qui incite à une plus grande prudence pour la généralisation d'une valeur seuil développé pour une souche spécifique de l'activité GR (GR-CALUX).

2.5 Bioessais *in vitro* de génotoxicité et de cytotoxicité

2.5.1 Génotoxicité, SOS Chromotest

Principe

Le SOS Chromotest est un test colorimétrique qui met en œuvre une souche génétiquement modifiée d'*E. Coli* (PQ37), chez laquelle a été réalisée une délétion partielle de la région portant le gène lacZ de la β -galactosidase ainsi qu'une fusion entre le gène *sfiA* et un gène lacZ rapporté. Chez *E. coli*, le système dit « SOS » est mis en action lors de dommages à l'ADN. Ainsi, si un défaut sur l'ADN entraîne un blocage de la fourche de réplication, la protéine RecA se lie à la zone monocaténaire bloquée et passe à l'état activé. A l'état activé, RecA déclenche l'hydrolyse de la protéine LexA qui est le répresseur de toute une batterie de gènes intervenant dans la réparation d'ADN dont le gène *sfiA*. De ce fait, le principe du SOS Chromotest est le suivant : plus un composé est génotoxique, plus le taux d'altérations de l'ADN de la souche sera élevé, plus le système de réparation « SOS » sera induit et plus l'activité enzymatique β -galactosidase de la bactérie sera importante (Figure 5). Ainsi, à l'aide de réactifs spécifiques l'induction de cette activité enzymatique est mesurée et relativisée par rapport à celle de l'alkaline phosphatase (contrôle de l'expression protéique) afin de déterminer le SOS Induction Factor (SIF) (Quillardet and Hofnung, 1985). L'évaluation de la génotoxicité à l'aide du SOS Chromotest a été réalisée sans et avec activation métabolique (S9). L'activation métabolique permettant d'évaluer la génotoxicité de molécules nécessitant une bio-activation par les enzymes de détoxification.

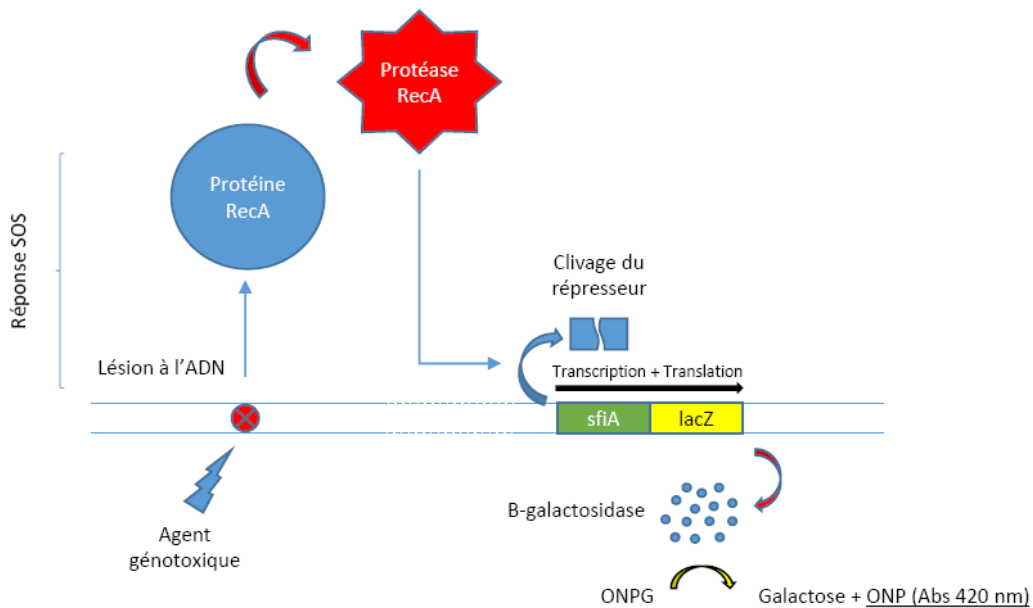


Figure 5. Principe du SOS Chromotest

Mode opératoire

L'extrait évaporé à sec est remis en suspension de manière à obtenir un facteur d'enrichissement de 2000X. Dans le cadre de cette étude d'induction de la réponse SOS dans les bactéries, la souche PQ37 d'*E. coli* a été exposée en triplicat à 3 concentrations différentes d'extraits (500, 2 500 et 25 000 ppm) en présence et en l'absence d'une activation métabolique mammalienne (mix-S9). Ces concentrations correspondent à des facteurs d'enrichissement relatif (REF) par rapport à l'échantillon brut de 1x, 5x et 50x. Parallèlement, l'analyse de témoins positifs et négatifs est réalisée. Un test statistique (test de STUDENT) a été réalisé pour déterminer les différences significatives entre les SIF obtenus pour chaque concentration d'extrait testée et les témoins négatifs (DMSO avec ou sans S9). Les valeurs significativement différentes au risque 0,05 sont annotées d'un astérisque.

Analyse et interprétation

Comme décrit précédemment, le bioessai SOS Chromotest a été conduit à plusieurs facteurs de concentration : 1x, 5x et 50x. Ces différents facteurs permettent d'approcher de plusieurs manières la génotoxicité de l'échantillon. Le test réalisé au facteur de concentration 1x permet d'estimer la génotoxicité de l'échantillon en conditions environnementales (sans facteur de concentration) tandis que les tests réalisés à des facteurs de concentrations de 5x et 50x visent à rechercher la présence de composés génotoxiques plus faiblement concentrés, mais pouvant potentiellement conduire mais de manière plus insidieuses à des processus de cancérogenèses en cas de bioaccumulation et/ou d'exposition chronique

Il n'existe pas, à proprement parler, de valeurs seuil concernant la génotoxicité. Pour le test SOS Chromotest, Jolibois et Guerbet (2006) considèrent qu'un échantillon est génotoxique lorsque le facteur d'induction SOS (SIF) est supérieur à 1,5. Cette valeur de 1,5 provenant d'une publication de Mersch-Sundermann et al. (1992) se rapporte à des travaux réalisés sur différentes molécules pures. Pour le projet MICROPOLIS, qui concerne des matrices complexes, nous proposons une grille de cotation du potentiel génotoxique associant à la fois le SIF et le niveau de contamination retranscrit par les différents facteurs de concentrations testés dans cette étude : 1x, 5x et 50x.

Le potentiel génotoxique est classé dans des catégories allant de 0 à 5, 5 étant la catégorie présentant le potentiel génotoxique le plus élevé (SIF > 2 à 1x ou > 2,9 à 5x) et 1 la catégorie pour laquelle le potentiel détecté est le plus faible (SIF statistiquement différent du témoin à 5x et 50x). A noter que lorsque le SIF obtenu n'est pas statistiquement différent du témoin, celui est considéré comme négligeable (niveau 0). Selon le facteur de concentration utilisé pour la détermination du SIF une cotation du potentiel génotoxique a été réalisée selon la grille suivante (Figure 6) :

	SIF (sans S9)				SIF (avec S9)		
	@1X	@5X	@50X		@1X	@5X	@50X
5	> 2	> 2,9		5	> 2	> 2,75	
4	> 1,5	> 2,4		4	> 1,5	> 2,25	
3	> 1,15	> 2,1	> 3,4	3	> 1,25	> 2	> 3
2		> 1,5	> 2,8	2		> 1,5	> 2,5
1		≠ témoin	≠ témoin	1		≠ témoin	≠ témoin
0		eq. témoin	eq. témoin	0		eq. témoin	eq. témoin

Figure 6. Grille de cotation pour le SOS Chromotest sans S9 (à gauche) et avec S9 (à droite)

L'analyse de différents facteurs de concentration permet donc de renseigner sur le niveau de contamination des différents extraits mais également d'estimer la génotoxicité d'échantillons ayant une forte toxicité.

2.5.2 Test de cytotoxicité

L'analyse de la cytotoxicité est effectuée à l'aide d'un test *in vitro* qui permet de déterminer rapidement si des composés présents dans un effluent ont la capacité d'altérer les cellules vivantes. Dans le cadre de cette étude, la toxicité des effluents a été évaluée sur des cellules de gonades de truite (lignée cellulaire RTG-2). Après décongélation, les cellules ont été amplifiées afin d'obtenir une quantité suffisante de cellules pour l'expérimentation. Les cellules ont été ensuite ensemencées en plaque 96 puits à une concentration de 5000 cellules/puits dans 100 µL de milieu complet (3 puits/concentration), puis incubées 24h à 21°C. Après cette incubation, les cellules ont été exposées pendant 4 jours à différentes concentrations d'échantillons bruts (3 puits/concentration, 7 concentrations par échantillon testé). La viabilité cellulaire a ensuite été mesurée à l'aide du CellTracker Green CMFDA (1,5 µM). Les cellules ont ensuite été incubées 45 minutes à 21°C et après cette incubation, la fluorescence a été mesurée (excitation 485 nm ; émission 528 nm). La fluorescence est présente uniquement dans les cellules vivantes.

Le pourcentage de viabilité a été calculé de la manière suivante :

$$\% \text{ de viabilité} = \frac{\text{Fluorescence dans le puits traité}}{\text{Fluorescence dans le puits contrôle}} \times 100$$

Selon la toxicité des échantillons, les résultats correspondent à :

- la DL₅₀ (dose induisant 50% de mortalité cellulaire, déterminée à l'aide du logiciel Sigmaplot®),
- au taux de viabilité mesurée à la plus forte concentration testée.

2.6 Bioessai *in vivo*

2.6.1 Test de toxicité aiguë d'immobilisation des daphnies

L'écotoxicité de l'effluent a été déterminée suivant le protocole décrit dans la norme ISO 6341 « Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) -- Essai de toxicité aiguë ». Ce test permet de mettre en évidence la toxicité aiguë de substances chimiques, la substance de référence étant le dichromate de potassium. Ce bioessai a été réalisé sur l'échantillon brut après une décantation de 2h, la durée d'exposition est de 24h.

Afin d'évaluer la toxicité de l'effluent, sont déterminées les concentrations suivantes :

- concentration pour 50% d'immobilisation : CI_{50-24h}
- concentration minimale (ou taux de dilution) pour 100% immobilisation
- concentration maximale (ou taux de dilution) pour 0% d'immobilisation

L'équitox est défini comme le nombre de dilution à réaliser sur l'eau brute polluée pour obtenir l'immobilisation, au bout de 24 heures, de 50 % des daphnies initialement présentes. L'équitox est, par définition, affecté à 1 m³ d'eau. La toxicité d'un échantillon est calculée suivant la formule suivante (1) et est exprimée en unité de toxicité ou « Equitox/m³ ».

$$(1) TU_{50}(24 h) = \frac{100}{EC_{50}(24 h)}$$

Le flux d'Equitox rejeté par équivalent-habitant est fixé par arrêté ministériel à 0,20 Equitox/j par habitant, soit pour un volume de 150 à 200 l/j par équivalent.habitant, ce qui correspond à une concentration de 1 à 1,3 Equitox/m³. Par conséquent, cette dernière valeur a été retenue comme valeur de référence dans l'interprétation des résultats d'analyse des échantillons de cette étude

3 CARATERISATION DE LA TOXICITE DES EAUX USEES PRELEVES DANS LE RESEAU DE COLLECTE

Dans ce chapitre, les bioessais sont appliqués pour étudier la toxicité des eaux usées prélevées en différents points et branches du réseau de collecte. Très peu de ces bioessais avaient déjà été appliqués à des échantillons d'eaux usées brutes prélevés directement dans un réseau de collecte d'eaux usées urbaines ou industrielles.

Un regard plus attentif a aussi été porté sur les bioessais présentant une toxicité résiduelle dans l'effluent secondaire et en sortie de STEU, principalement des activités PE (voir résultats présenté au chapitre 4).

L'objectif de cette analyse croisée est d'identifier des points sources de contamination et de sélectionner les échantillons, du réseau de collecte des eaux usées, les plus pertinents pour la mise en œuvre de la démarche EDA (Effect-Directed Analysis) en vue de l'identification de polluants responsables des toxicités résiduelles identifiées dans l'effluent secondaire et en sortie de STEU (tache 3 du projet).

3.1 Profils d'activités perturbateurs endocriniens

Une vision globale des résultats *in vitro* PE est donnée par les fréquences de quantification des principales activités dans les échantillons prélevés aux points 1, 3, 6 4 et 5 du réseau (Figure 7). Les autres points étudiés (2A, 2B, 7 et 8) n'ont pas été représentés car ils n'ont fait l'objet que d'un seul prélèvement sur l'ensemble des campagnes d'étude.

On remarque que pour les points les plus éloignés de la STEU et localisés en dehors du technopôle de Sophia Antipolis (point 1 & 6), les fréquences de quantification sont les plus faibles pour la moitié des activités « PE » étudiées. Pour les activités oestrogéniques (YES et ER) et androgénique (YAS uniquement), les fréquences de quantification sont de 100% pour l'ensemble des points étudiés ce qui démontre le caractère ubiquiste des polluants générant ces activités (principalement des hormones naturelles et de synthèse pour ces deux types d'activité, mais aussi des polluants de sources industrielles ou domestiques de type phtalates et alkylphénols).

Le point 3 est le seul point pour lequel il a été possible de quantifier pour chaque échantillon une activité GR par les cellules MDA-kb2 (2 échantillons sur 2, prélèvements ponctuels le matin) tandis que pour les autres points étudiés, les fréquences de quantification sont inférieures à 50%. A l'opposé, le point 3 ne présente aucune activité androgénique avec le bioessai sur culture cellulaire (AR) alors que l'on observe une quantification de 100% des échantillons par le test YAS. Comme expliqué précédemment, l'activité AR dans les cellules MDA-kb2 est probablement masquée par la présence de glucocorticoïdes dans cet échantillon. Des tests complémentaires d'activités AR et GR, réalisés sur des souches spécifiques (HGLN-hAR et HGLN-hGR), ont montré que des échantillons prélevés aux points 1, 8 et 6 (septembre 2015) présentaient ces deux activités. Cela confirme la difficulté à détecter la présence en mélange d'activités AR et GR avec la souche MDA-kb2.

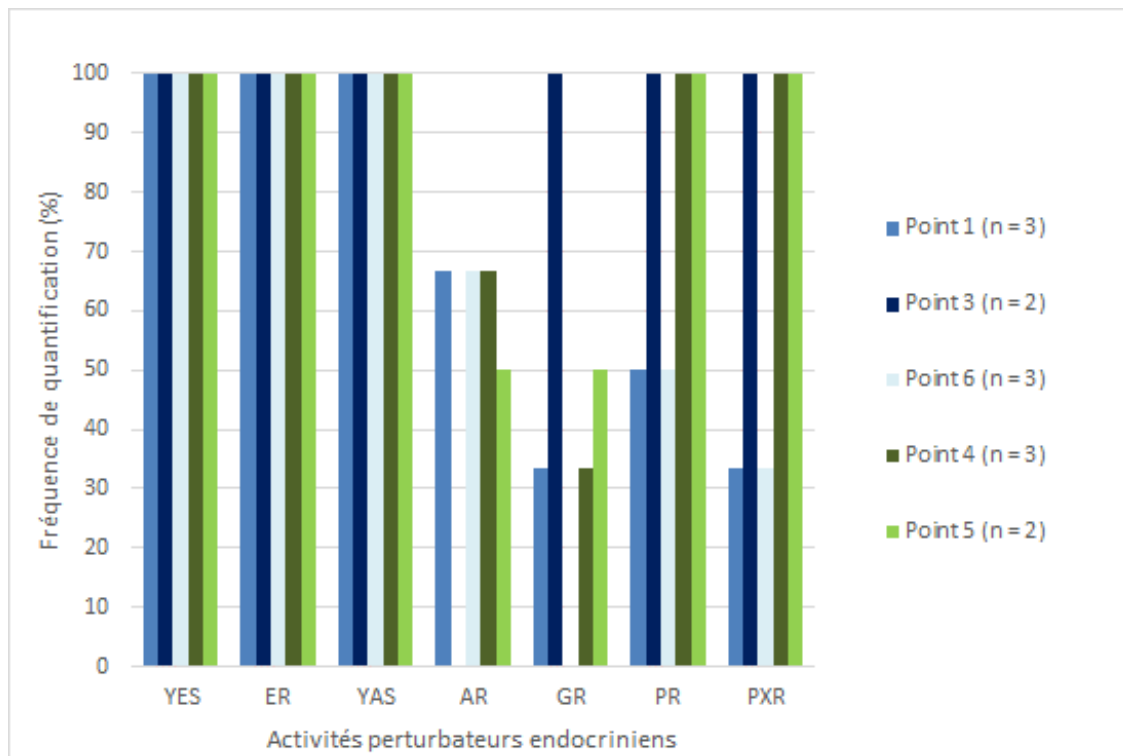


Figure 7. Fréquence de quantification (f) des principales activités PE (YES, ER, YAS, AR, GR, PR, PXR) dans les échantillons prélevés en différents points du réseau (n > 1).

3.1.1 L'activité œstrogénique (YES et ER)

L'activité œstrogénique a été quantifiée pour l'ensemble des échantillons avec les deux bioessais sur levure et culture cellulaire, ce qui est cohérent avec la fréquence de quantification observée en entrée de STEU. Les activités pour le bioessai sur levure (YES, Figure 8) sont comprises dans une gamme de valeurs assez restreinte, de 10 à 65 ng E2-eq/L, comparées aux activités de 10 à 864 ng E2-eq/L, mesurées par le bioessai sur culture cellulaire MELN (ER, Figure 9). Pour le bioessai YES, la branche D (points 8, 2, 3, 1, 6) semble apporter une contribution supérieure à celle de la branche G. Le bioessai ER ne permet pas de distinguer clairement une branche plus contaminée que l'autre. Toutefois, lors de la campagne de criblage de mars 2015, l'échantillon prélevé au point 4 (613 ng E2-eq/L) possédait une activité particulièrement élevée comme cela a été aussi observé en entrée de STEU (864 ng E2-eq/L). Ces (très) fortes concentrations n'ont pas été observées lors des campagnes ultérieures.

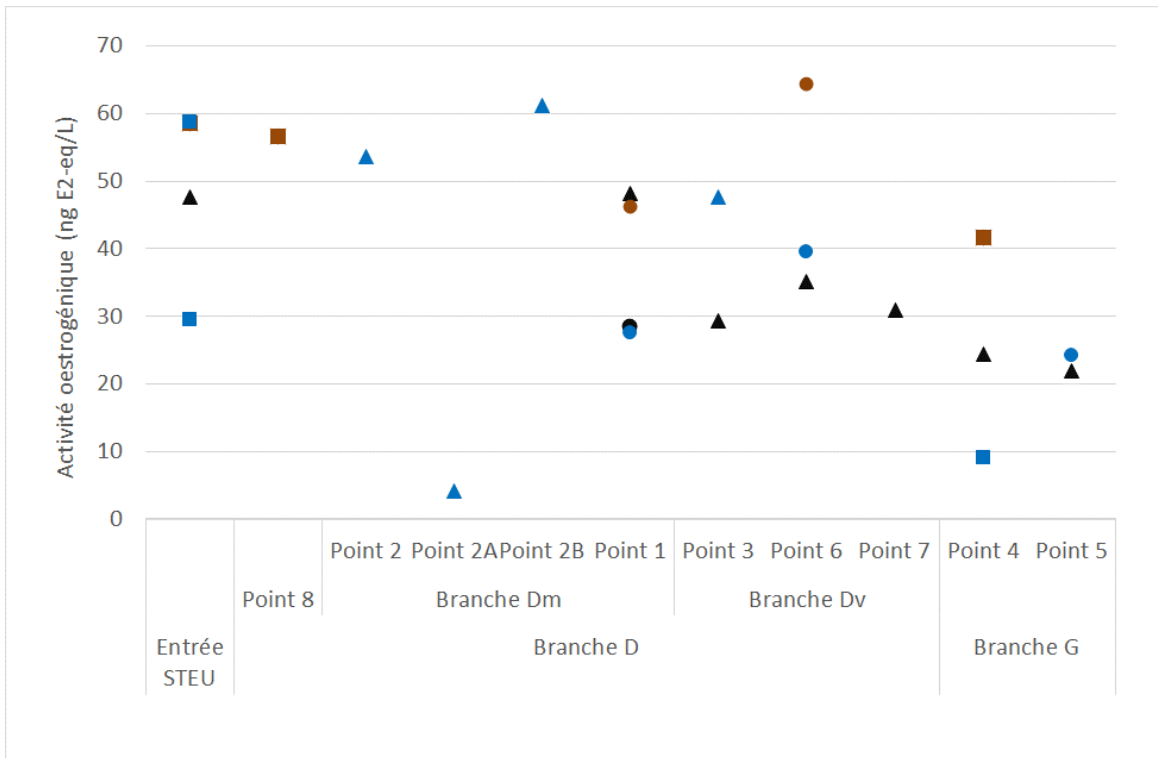


Figure 8. Activité œstrogénique agoniste (YES) pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (\circ) avec asservissement au débit (\square).

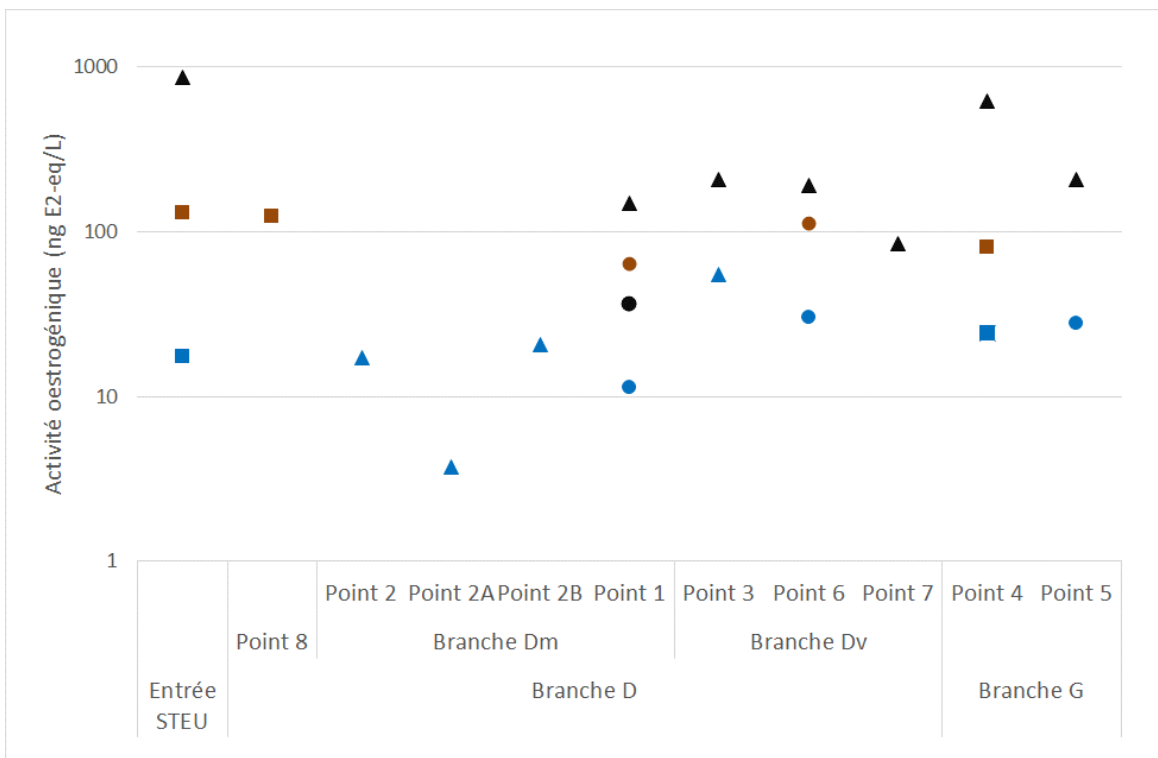


Figure 9. Activité œstrogénique agoniste (ER, culture cellulaire MELN) pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (\circ) avec asservissement au débit (\square).

3.1.2 Les activités androgéniques (YAS et AR) et glucocorticoïde agoniste (GR)

Bien que l'activité androgénique agoniste (YAS et AR) n'ait pas été observée dans l'effluent secondaire, l'étude de la réponse de ces bioessais dans les eaux usées brutes apparaît comme pertinente pour plusieurs raisons.

D'abord, les valeurs mesurées pour ces deux bioessais YAS et AR, 500 à 2500 ng DHT-eq/L et de 50 à > 200 ng DHT-eq/L respectivement, sont très élevées au regard de la valeur seuil de 11 ng DHT-eq/L proposée par Brand et al. (2013) pour l'eau potable (Figure 10, Figure 11). Ces valeurs élevées laissent à penser qu'en cas de débordement des réseaux de collecte par temps de pluie, ces eaux usées (même fortement diluées) pourraient présenter des activités androgéniques supérieures à la valeur seuil et donc avoir potentiellement un impact sur le milieu récepteur.

Pour le bioessai YAS, les branches G et Dv présentent les concentrations les plus fortes. Il s'agit donc des branches qui doivent faire l'objet d'une vigilance particulière, notamment à l'aval du réseau à proximité de la STEU. Le bioessai AR confirme l'activité élevée de la branche G.

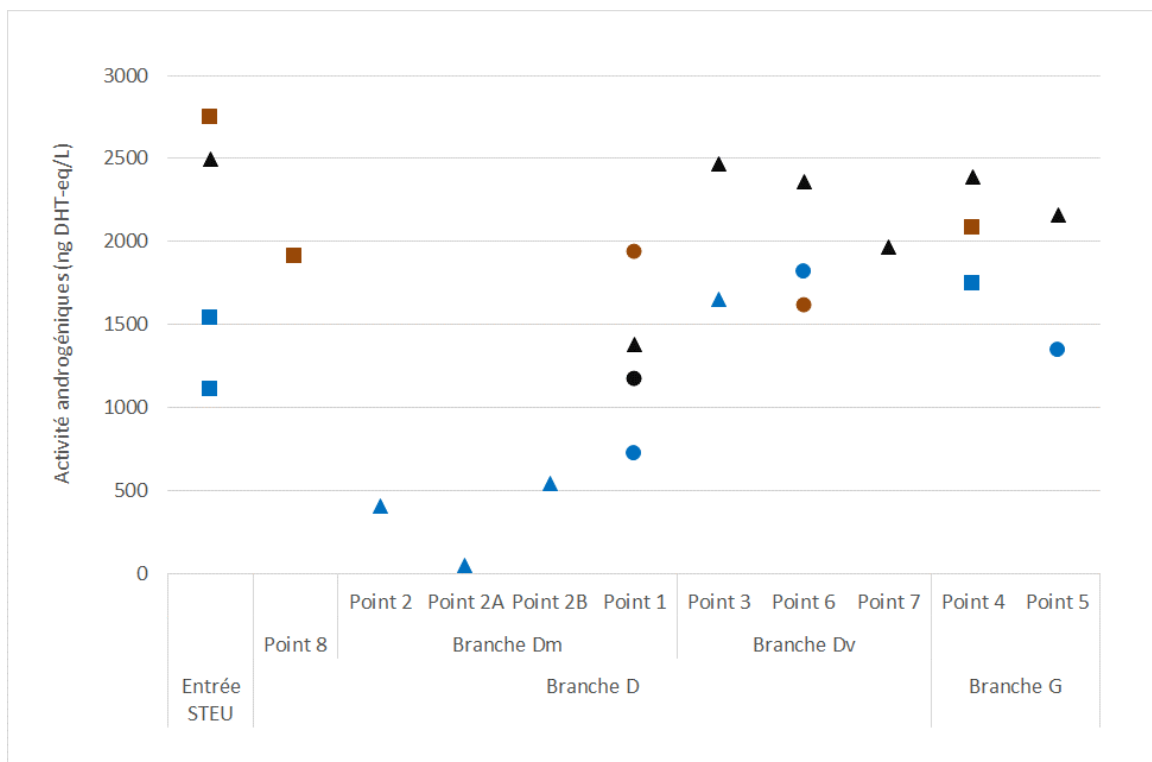


Figure 10. Activité androgénique agoniste (YAS) pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (\circ) avec asservissement au débit (\square).

Ensuite, l'activité androgénique via le bioessai AR doit aussi être étudiée au regard de l'activité glucocorticoïde (bioessai GR) car, comme discuté au §2.4.4, la lignée cellulaire MDA-kb2 permet la co-détection de ligands du AR et du GR. En entrée de STEU, l'activité GR et l'activité AR ont été quantifiées dans la moitié des échantillons. Toutefois, il est intéressant de noter que, pour la campagne de septembre, même si l'entrée de STEU présente une activité définie comme GR par le bioessai sur cellule MDA-kb2, des analyses complémentaires réalisés sur des cellules spécifiques aux activités AR et GR ont permis de démontrer la présence d'activité AR et GR dans cet échantillon. Cette information est d'autant plus intéressante que, lors de cette même campagne, les échantillons prélevés aux points 1, 8 et 6 ne présentaient qu'une activité AR au bioessai réalisé avec MDA-kb2.

Parmi les points de prélèvement du réseau, l'activité GR n'a été quantifiée (avec MDA-kb2) que pour les points 1, 3, 4 et 5 (Figure 12). Parmi eux, les points 1, 4 et 5 présentent une activité GR

(avec MDA-kb2) pour 1 échantillon sur 3 et les deux autres présentant une activité AR. A l'opposé, seule l'activité GR a été quantifiée pour le point 3 (branche Dv, n = 2).

Au vu de la persistance de l'activité GR (réduite) dans l'effluent secondaire et en sortie de STEU, il semble particulièrement pertinent de s'intéresser plus spécifiquement au point 3 afin d'identifier de possibles composés responsables de cette activité et d'en retrouver la (ou les) origine(s).

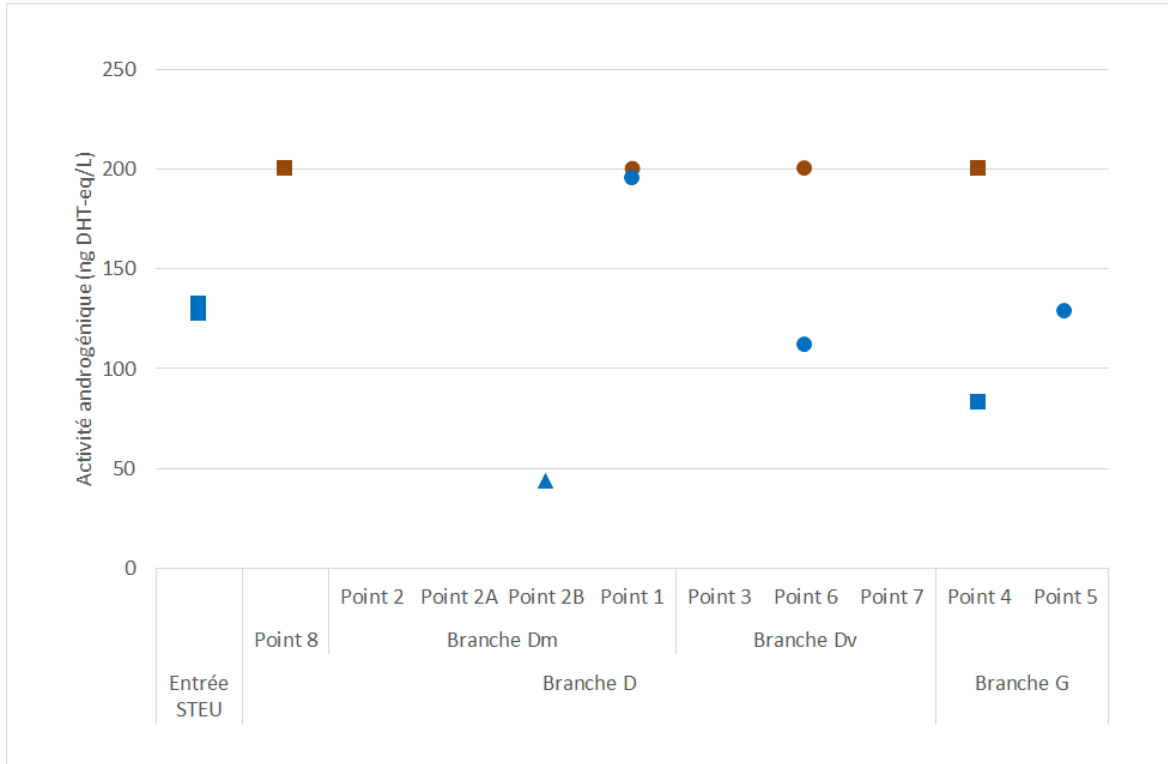


Figure 11. Activité androgénique agoniste (AR, souche MDA-kb2) pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (\circ) avec asservissement au débit (\square).

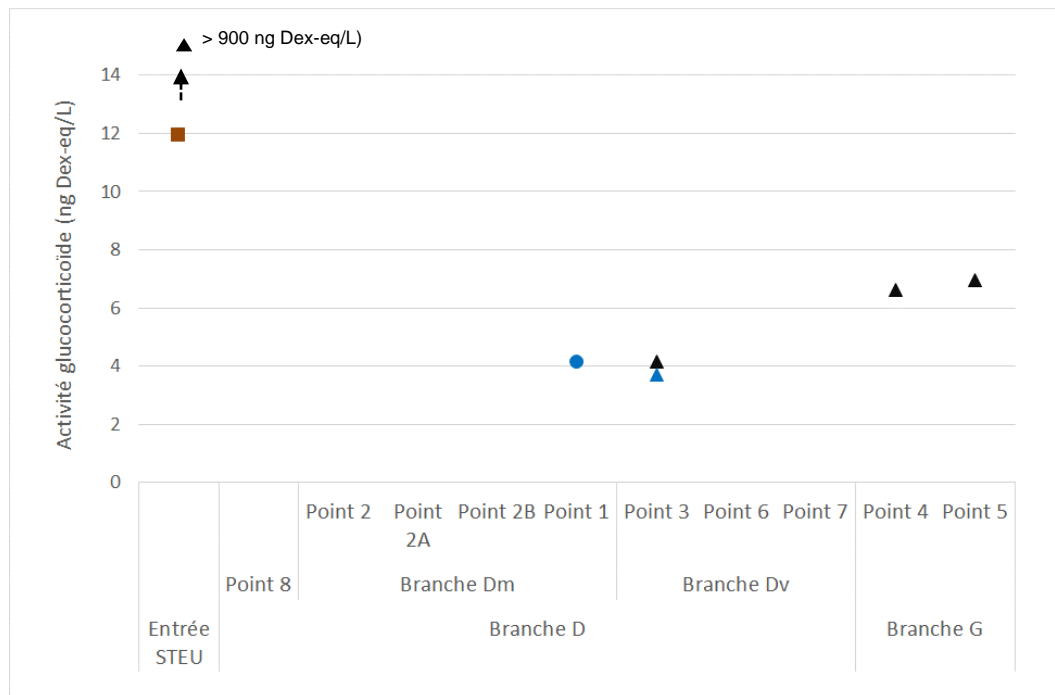


Figure 12. Activité glucocorticoïde agoniste (GR, lignée MDA-kb2) pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (\circ) avec asservissement au débit (\square).

3.1.3 Les activités des récepteurs xénobiotiques, PXR et AhR

PXR

Comme présenté dans la Figure 7 plus haut, l'activité PXR-like n'est pas quantifiée systématiquement pour tous les points de prélèvement, en particulier aux points 1 et 6 (fréquence < 35%, branche D). On remarque cependant que lors de la campagne de septembre 2015 (Figure 13) la concentration observée au niveau de la branche D (point 8) est largement supérieur à celui de la branche G (point 4). De plus, il faut rappeler que les eaux usées provenant de la branche D représentent plus de 80% du flux d'eaux usées en entrée de STEU. Les activités relativement élevées obtenues au point 3 appuient cette observation.

Les fortes valeurs observées dans le réseau et en entrée de STEU (de 10 à 35 ng SR12813-eq/L) demandent un rendement d'élimination, par la STEU, de minimum 90% et jusqu'à 97% afin d'atteindre la valeur seuil de 0,4 μ g SR12813-eq/L, proposée par van der Oost et al. (2016) (§2.4.4, Tableau 7). Par conséquent, il apparait pertinent de travailler à l'identification de sources de cette activité PE afin d'envisager des actions de réduction à la source et ainsi réduire la charge entrante sur la STEU.

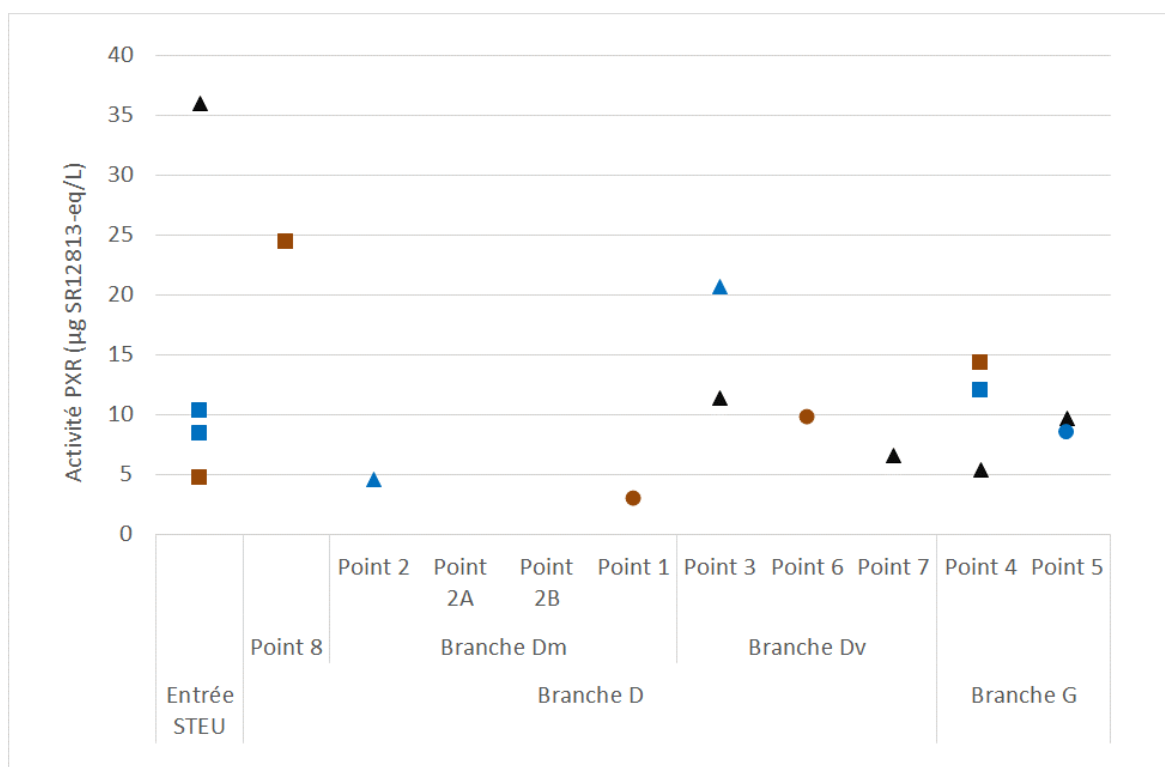


Figure 13. Activité PXR agoniste pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (▲), moyen 24h (○) avec asservissement au débit (□).

AhR

Contrairement l'activité PXR, l'activité AhR (ou HAP-like) n'a été détectée que sur la branche G du réseau, aux points 4 et 5, avec des valeurs de 16,4 et 4,1 µg B[a]P-eq/L, respectivement. Toutefois cette analyse n'a pas été conservée pour la suite de l'étude car considérée comme non-pertinente du fait de l'analyse de la partie dissoute des échantillons.

3.1.4 L'activité progestagène (PR et anti-PR) et minéralocorticoïde (MR et anti-MR)

Les activités PR et anti-PR

L'activité PR a été quantifiée pour l'ensemble des échantillons prélevés en entrée de STEU et dans le réseau de collecte des eaux usées (3 à 16 ng R5020-eq/L) excepté lors de la campagne de septembre 2015 aux points 1 et 6 (Figure 14, haut). Il est à noter que pour ces deux échantillons, l'activité anti-PR est la plus élevée de cette campagne (Figure 14, bas). Cela est cohérent avec les observations faites pour d'autres points de prélèvement, où l'on observe que plus l'activité anti-PR est forte plus l'activité PR est réduite (Entrée STEU, point 4). Les valeurs observées pour les échantillons prélevés dans le réseau de collecte des eaux usées restent toutefois très faibles comparées à la valeur seuil de 333 ng Org2058-eq/L.

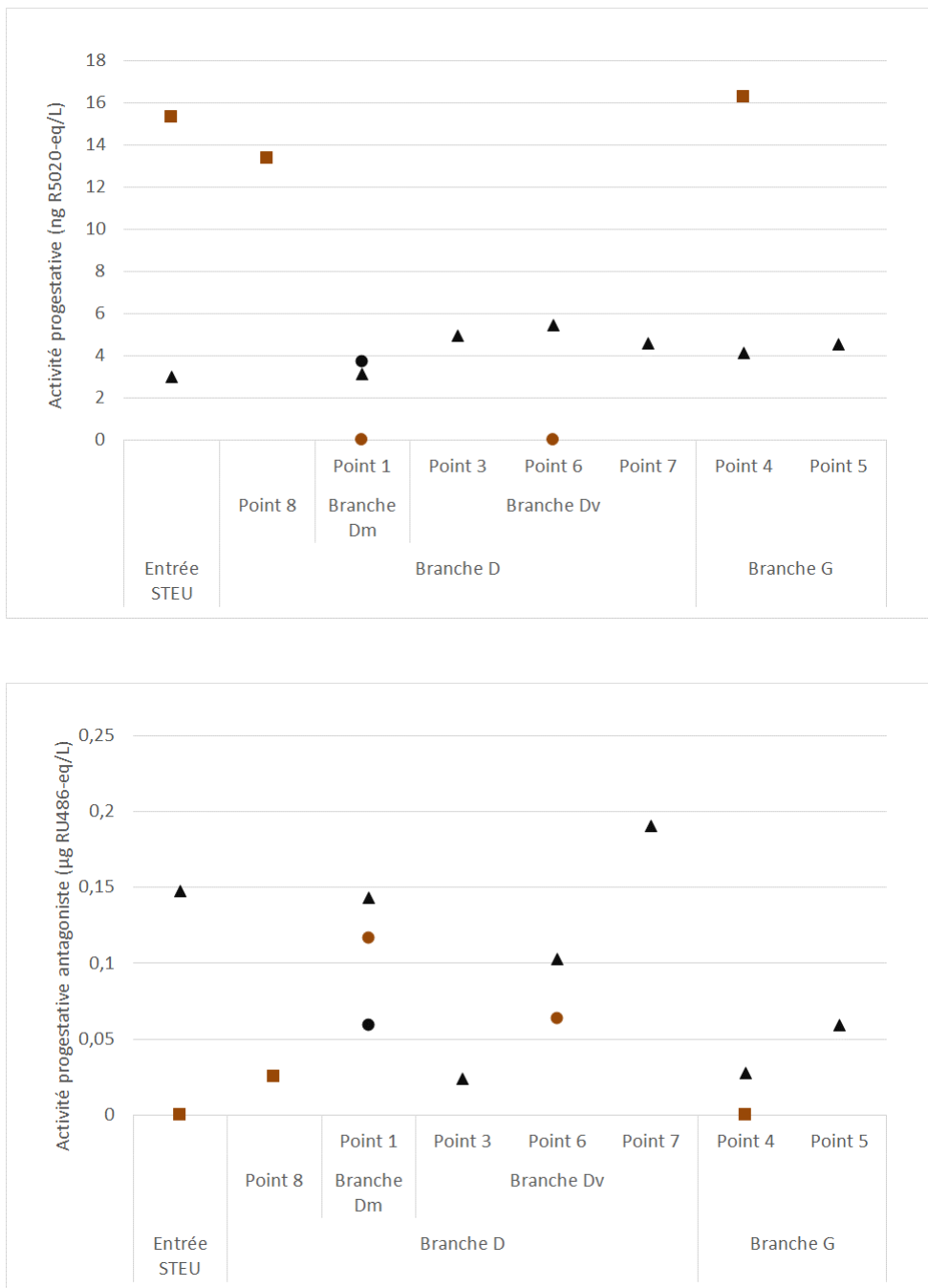


Figure 14. Activité progestagène agoniste (PR, en haut) et antagoniste (anti-PR, en bas) pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir) et septembre (marron). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (\circ) avec asservissement au débit (\square).

Les activités MR et anti-MR

L'activité anti-MR a été quantifiée pour l'ensemble des échantillons prélevés en entrée de STEU et dans le réseau de collecte des eaux usées (0,2 à 2 ng Spi-eq/L) excepté lors de la campagne de mars 2015 aux points 3 et 4 (Figure 15). Les valeurs observées sont assez homogènes entre elles et aucun point n'apparaît plus contaminé qu'un autre. L'activité semble même diminuer au fur et à mesure que l'on se rapproche de la STEU (point 3 < point 6 ; point 4 < point 5 ; point 8 < point 1). Des explications possibles sont soit la décomposition/désactivation des composés actifs, responsables de cette activité (hormones ?) soit l'apport d'eaux usées (entre l'amont du réseau et l'entrée STEU) contenant des composés ayant une activité MR qui viendraient compenser l'activité anti-MR observée. L'activité MR n'a jamais été quantifiée dans cette étude.

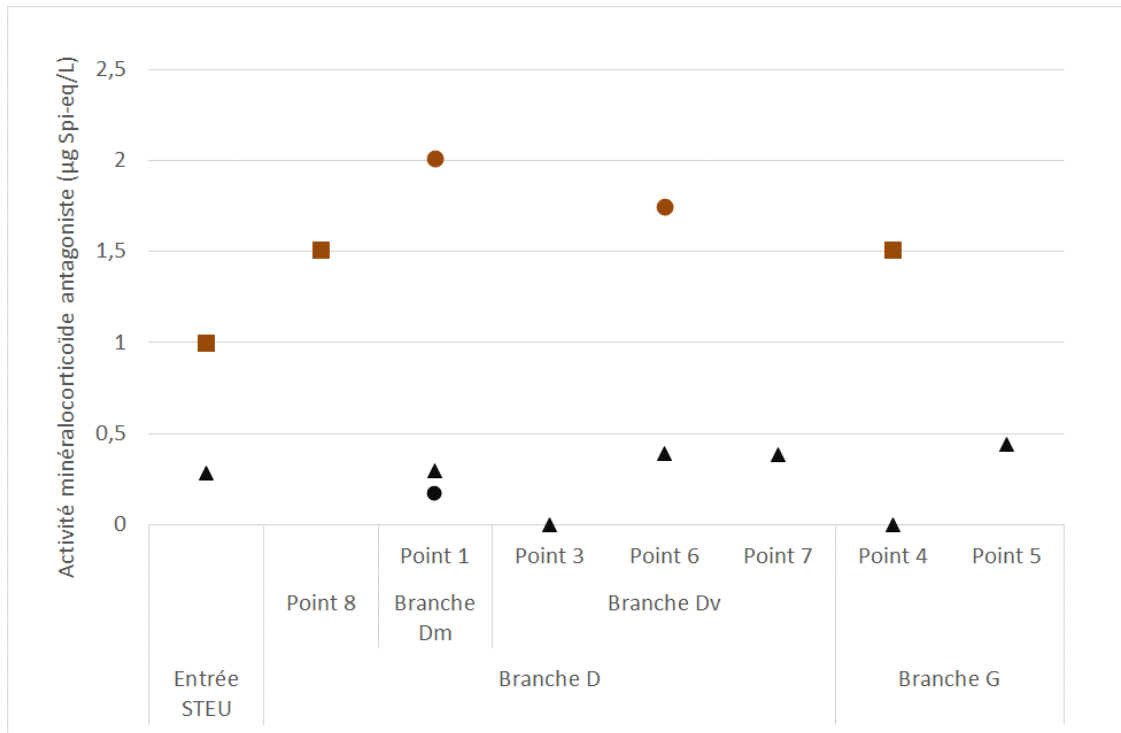


Figure 15. Activité minéralo-corticoïde antagoniste (anti-MR) pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir) et septembre (marron). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (○) avec asservissement au débit (□).

3.2 Génotoxicité, cytotoxicité et toxicité aigüe sur daphnies

3.2.1 SOS Chromotest

SOS Chromotest, sans activation métabolique S9

Lors de la campagne de criblage de mars 2015, selon la grille de cotation du potentiel génotoxique décrite précédemment (§2.5.1), le point 1 de la branche Dm présente un potentiel génotoxique de niveau 3 pour l'échantillon moyen 24h et de niveau 5 pour l'échantillon ponctuel.

Les points 4 et 5 situés sur la branche G présentent un potentiel génotoxique respectif de 2 et 4. Le point 5 en amont du point 4 présente le niveau de toxicité le plus élevé des deux points, on peut conclure de cette observation à un apport sur la branche G, entre le point 5 et le point 4, d'eaux usées ayant un potentiel de génotoxicité plus faible conduisant à une dilution de la toxicité observée au point 5.

Sur la branche Dv, le points 6 et 7 en amont du technopôle de Sophia Antipolis présente un potentiel génotoxique de niveau 1 selon la grille de cotation utilisée alors que le point 3 en aval du technopôle (proche de la STEU) présente un potentiel de 3.

Les campagnes de septembre et novembre confirment pour le point 1, un potentiel génotoxique assez élevé de niveau 2 et 3. Le potentiel génotoxique des points 4 et 5 semble plus variable dans la mesure où celui-ci descend à 1 pour la campagne de novembre.

SOS Chromotest, avec activation métabolique S9

Les niveaux d'activité génotoxique observés avec activation métabolique lors de la campagne de Mars 2015, sont très proches de ceux observés sans activation métabolique. Ces résultats mettent aussi en avant le point 1 et le point 5. Toutefois, l'ensemble des échantillons présentaient un potentiel d'activité génotoxique élevé :

- Point 1 (branche Dm) : potentiel génotoxique de 5 (ponctuel et moyen 24h),
- Point 4 et 5 (branche G) : potentiel génotoxique de 4 et 5
- Point 3, 6 et 7 (branche Dv) : potentiel génotoxique de 5, 3 et 3.

Lors des campagnes suivantes de septembre et novembre, l'activité génotoxique du point 1 est de niveau 2 et 3 ce qui confirme le potentiel génotoxique assez élevée observé en mars bien que légèrement atténué.

A contrario, le potentiel génotoxique du point 5 descend à un niveau 1 lors de la campagne de novembre (point 5 non échantillonné en septembre). Cela est cohérent avec la réduction de l'activité génotoxique (de niveau 4 vers niveau 1) observée au point 4, situé en aval du point 5.

Les campagnes de septembre et novembre confirment également le potentiel génotoxique du point 6 où il est égal à 1 et 2. De même pour le point 3, qui présente une toxicité de niveau 3 en novembre (point 3 non échantillonné en septembre).

La campagne de novembre met également en évidence un potentiel génotoxique pour l'échantillon du point 2B (note de 4) alors que la toxicité du point 2A est seulement de 1.

Ainsi, certains points de prélèvements révèlent la possible contribution de certaines sources industrielles aux activités génotoxiques des eaux usées : point 1, 3 et 2B (et 5).

Comparaison des SIF pour un facteur de concentration de 5x

La comparaison des SIF mesuré à 5x confirme les tendances observées par le système de notation défini pour le projet MICROPOLIS. Dans les Figure 16 et Figure 17, le point 1 apparait clairement comme celui présentant l'activité génotoxique la plus élevée.

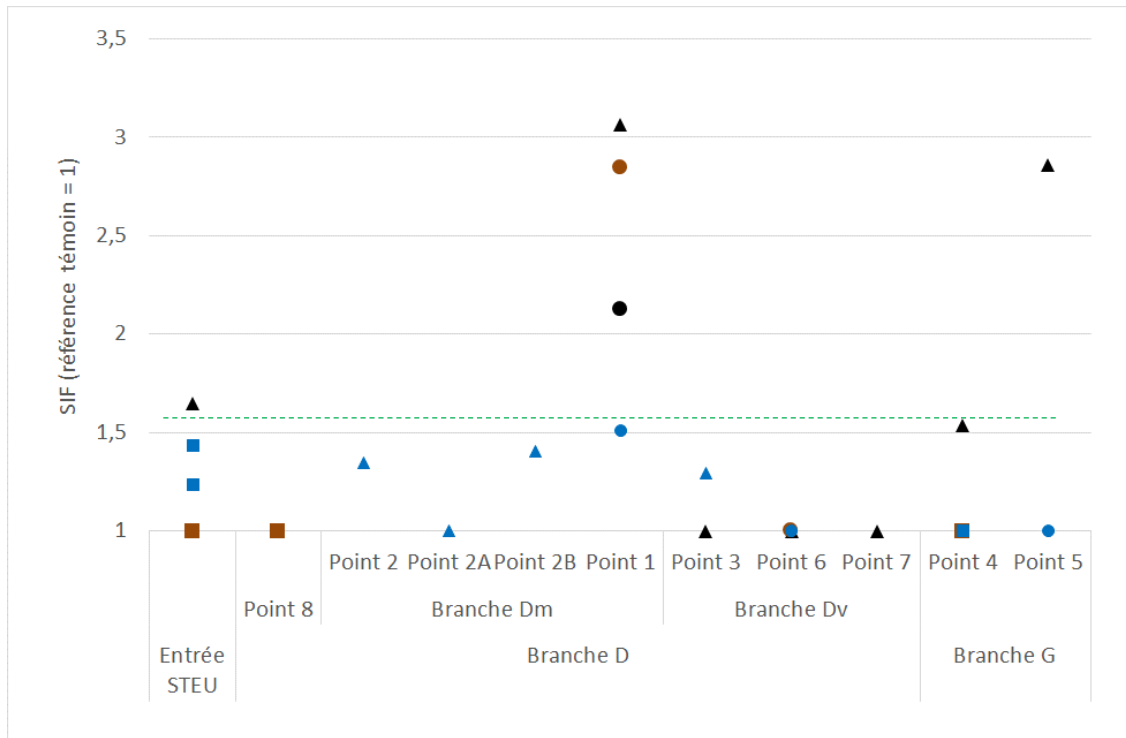


Figure 16. Résultats SOS Chromotest (SIF) pour les différents points de prélèvement du réseau de collecte des eaux usées (sans activation S9, REF = 5X). Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (\square).

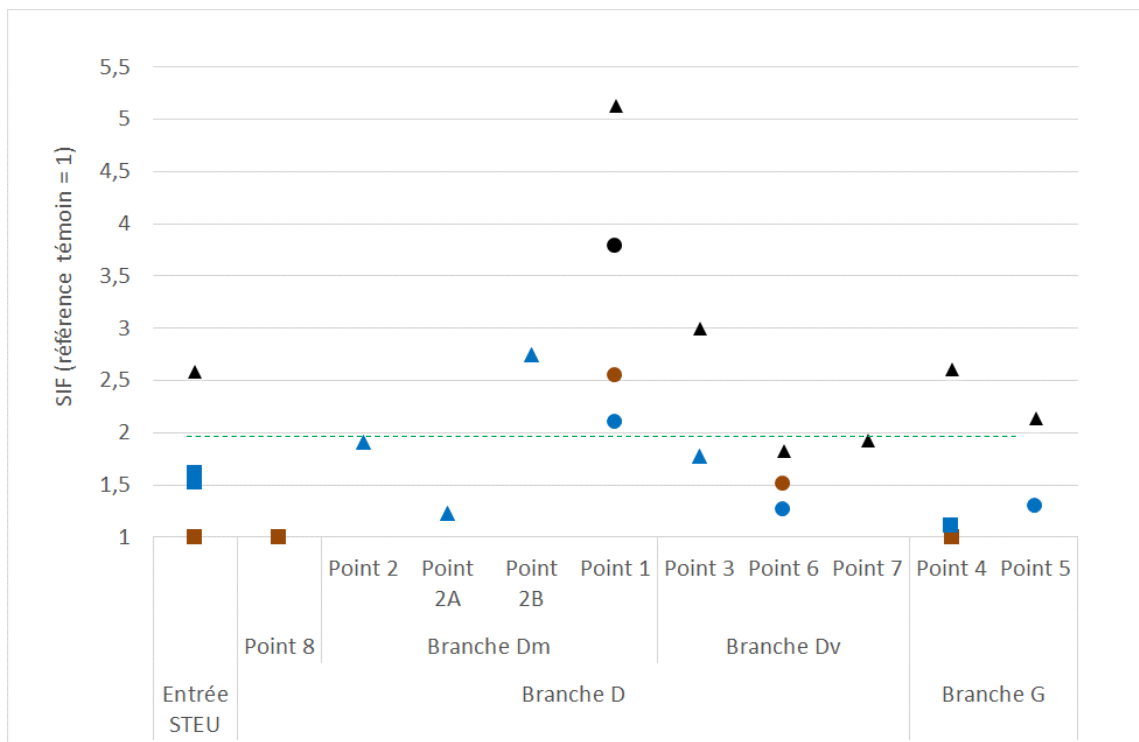


Figure 17. Résultats SOS Chromotest (SIF) pour les différents points de prélèvement du réseau de collecte des eaux usées (sans activation S9, REF = 5X). Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (\square).

3.2.2 Test de cytotoxicité

Comme décrit en 2.5.2, suivant la toxicité de l'échantillon, les résultats du test correspondent, à :

- la DL₅₀ (taux de concentration de l'échantillon induisant 50% de mortalité, exprimé en %)
- au taux de viabilité mesurée à la plus forte concentration testée (100%, échantillon non dilué), exprimé en %.

Pour l'eau usée prélevée en entrée de STEU, il a été possible de calculer une DL50 pour 3 échantillons (sur 4) avec une valeur minimum de 60% pour la campagne de septembre 2015 (Figure 18). Contrairement aux résultats du SOS Chromotest, les échantillons de la campagne de septembre présentent les plus fortes cytotoxicités alors qu'ils ne présentaient pas (ou peu) de génotoxicité (§3.2.1). A l'opposé, les échantillons de la campagne de mars ne présentent qu'une très faible cytotoxicité (et la plus forte génotoxicité).

Comme pour le SOS Chromotest, la branche D, et en particulier la sous-branche Dm (point 1), présente une plus forte toxicité que la branche G. Ce résultat est confirmé par l'analyse du taux de viabilité à la concentration 100% (Figure 19).

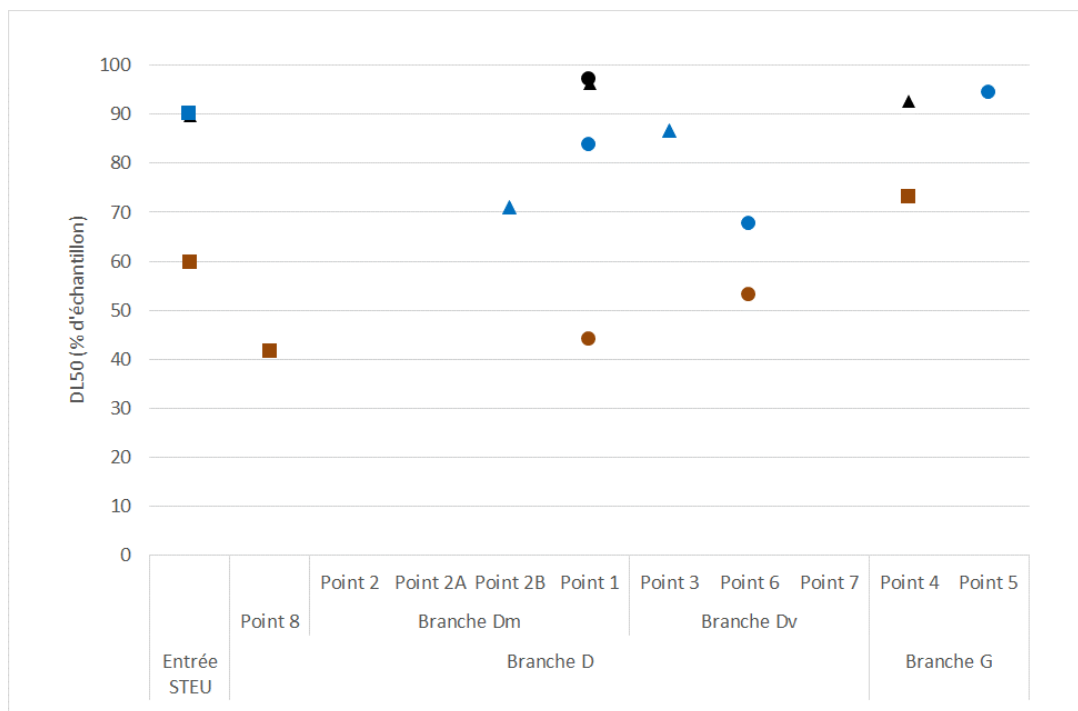


Figure 18. DL50 (% , taux de concentration de l'échantillon) pour les différents points de prélèvement du réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (○) avec asservissement au débit (□).

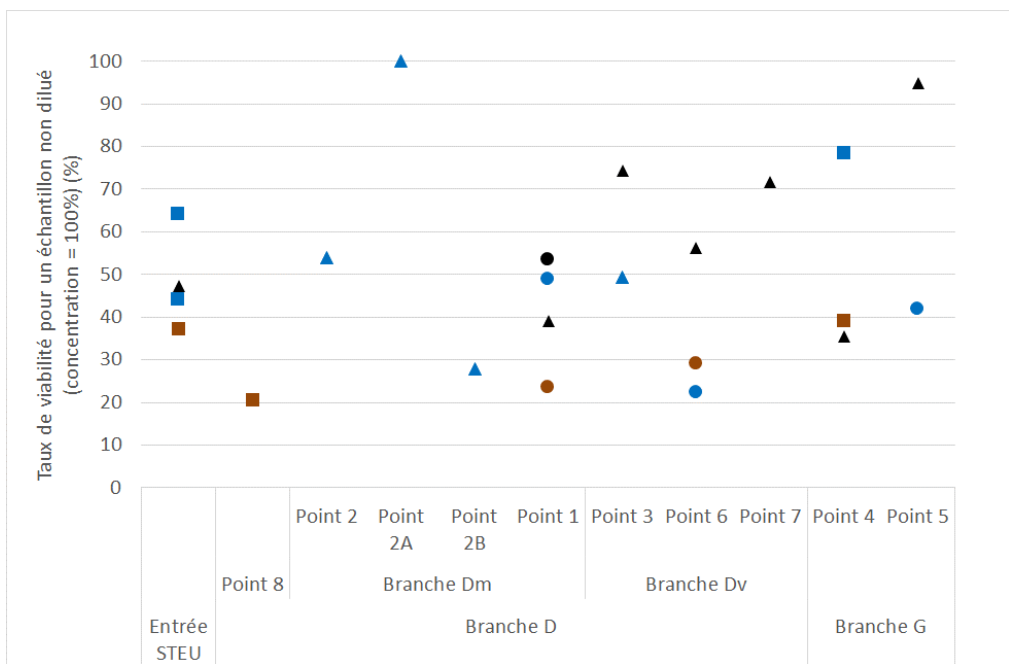


Figure 19. Taux de viabilité à une concentration de l'échantillon de 100% (non dilué) pour les différents points de prélèvement du réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (□).

3.2.3 Test de toxicité aiguë sur daphnies

Comme décrit au paragraphe 2.6.1, nous considérons 1,3 equitox/m³, comme valeur de référence pour la toxicité des eaux usées. Comme indiqué au paragraphe 4.2.3, l'eau usée brute prélevée en entrée de STEU présente une toxicité aiguë pour les 3 échantillons analysés, avec des valeurs allant de 1,8 à 3,2 equitox/m³, ce qui est supérieure à la concentration référence de 1,3 equitox/m³.

Les points de prélèvement de la branche D présentent des valeurs supérieures à celle de la branche G. Le point 1 (branche Dm) présente (pour un échantillon) une toxicité particulièrement élevée avec une valeur de 9,5 equitox/m³ (soit 3 fois plus que l'eau usée en entrée de STEU).

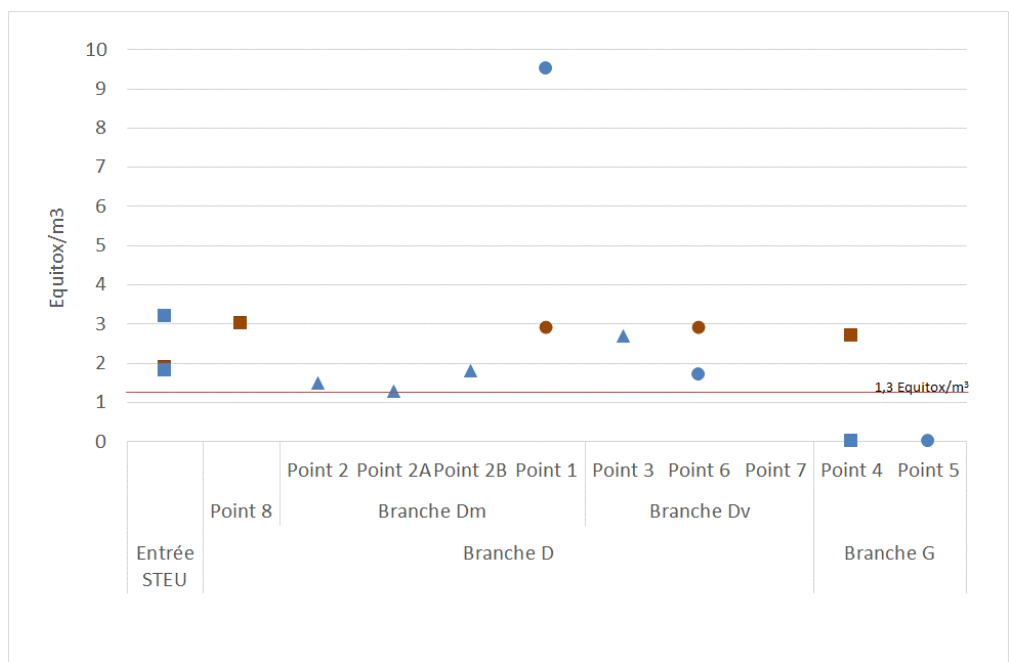


Figure 20. Toxicité aiguë mesurée par le test « Daphnie » (equitox/m³) en différents points de prélèvement du réseau de collecte des eaux usées. Campagne de septembre (marron) et novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (□).

4 CARATERISATION DE LA TOXICITE DE L'EAUX USEES TOUT AU LONG DE LA FILIERE DE TRAITEMENT DE LA STEU ET PERFORMANCES

Dans ce chapitre, la toxicité de l'eau usée est étudiée tout au long de la filière de traitement de la STEU de Sophia Antipolis. Une attention particulière est portée à l'analyse de la toxicité de l'eau usée brute et surtout de l'effluent secondaire, car il s'agit de la configuration que l'on retrouve le plus fréquemment sur les STEU en France (élimination biologique du carbone et nitrification de l'azote ammoniacal). Cette STEU possède un traitement complémentaire de l'effluent secondaire, cette première analyse est ainsi complétée par une étude des performances de l'ozonation et de la dénitrification par biofiltration DN.

Dans un premier temps, les résultats des bioessais, en entrée de STEU et de l'effluent secondaire, sont analysés et discutés au regard des profils d'activité obtenus, à la fois en termes de fréquence de détection et des niveaux quantifiés. Lorsque cela est possible, il a été établi une comparaison avec les valeurs seuils en équivalents-toxiques reportés dans la littérature, qui ont été définie pour évaluer l'impact potentiel sur les écosystèmes aquatiques ou la santé humaine des eaux usées traitées rejetées dans le milieu récepteur (cf. §2.4.4).

Ensuite, les valeurs obtenues en ces deux points de la STEU sont analysées afin d'évaluer (et de quantifier quand cela est possible) la performance épuratoire du traitement primaire et secondaire de la STEU.

Enfin, les valeurs obtenues aux différents points du traitement tertiaire sont analysées afin :

- 1) d'évaluer la performance épuratoire du traitement tertiaire,
- 2) d'évaluer l'impact potentiel de l'effluent rejeté (sortie STEU) sur le cours d'eau *la Bouillide*, milieu récepteur des eaux usées traitées
- 3) d'identifier les toxicités potentiellement problématiques toujours présentes dans l'effluent rejeté par la STEU. En effet, cette caractérisation doit permettre d'orienter l'analyse de la toxicité des eaux usées prélevées dans le réseau (chapitre 3) afin d'identifier des « hot spots ». Cette analyse croisée est essentielle pour l'identification, via la démarche EDA, des sources d'émissions des polluants les plus problématiques et *in fine* la mise en place d'actions de réduction à la source.

4.1 Profils d'activités perturbateurs endocriniens *in vitro*

D'une manière générale, les bioessais *in vitro* montrent la présence de multiples activités PE en entrée et tout au long de la filière de traitement, démontrant l'intérêt de l'approche multi-bioessais mise en œuvre. Si les activités oestrogéniques (ER, YES) et androgénique (YAS, AR) sont, comme attendu, toujours retrouvées, nos résultats montrent l'occurrence d'autres types d'activités hormonales (GR, PR, anti-PR, anti-MR) et de récepteur de xénobiotiques (AhR, PXR).

4.1.1 Eaux usées brutes et effluent secondaire

Fréquence de quantification

Sur les 9 activités *in vitro* testées (11 bioessais), les échantillons d'eaux usées brutes (prélevés en entrée de STEU) présentent, pour 6 activités, des fréquences de quantification de 100% (soit pour les 4 échantillons testés, Tableau 8). Seule l'activité MR n'a jamais été quantifiée en entrée de STEU, et les activités anti-PR et GR pour seulement 50% des échantillons (pour n = 2 et 4 respectivement).

Dans l'effluent secondaire, 6 activités sont aussi quantifiées dans 100% des échantillons. Toutefois, à la différence de l'eau usée brute, il n'est plus mesuré d'activité androgénique agoniste dans l'effluent secondaire, ni par le bioessai sur levure (YAS), ni par celui sur culture cellulaire (AR). De même, l'activité anti-PR n'est plus détectée dans l'effluent secondaire. Ces deux activités

(androgénique agoniste et progestagène antagoniste) seraient donc dues à des micropolluants qui sont éliminés de la phase liquide lors des étapes de traitement primaire et/ou secondaire des eaux usées (possiblement via des mécanismes de biodégradation, et/ou de transfert vers les boues).

Il est intéressant de noter que l'activité GR est quantifiée pour 100% des échantillons de l'effluent secondaire ($n = 5$), alors qu'elle n'est quantifiée que dans 50% des échantillons « Entrée STEU ». Cette observation s'explique par la spécificité des cellules MDA-kb2. L'activité GR dans les eaux usées brutes est masquée par la forte activité androgénique, qui elle est révélée par ailleurs par le test YAS. En effet, la lignée cellulaire MDA-kb2 permet la co-détection de ligands des récepteurs AR et GR (§2.4.3) et dans le cas d'échantillons présentant les deux types d'activité, il est difficile de distinguer clairement la part de l'une et de l'autre dans la réponse. Nous avons néanmoins pu confirmer, du point de vue qualitatif, la présence d'activité GR en entrée de STEU à l'aide d'une lignée cellulaire spécifique (HG5LN-hGR) (tests ponctuels complémentaires sur un nombre restreint d'échantillons menés dans le laboratoire de P. Balaguer, Inserm Montpellier), ce qui va dans le sens de notre diagnostic basé sur les cellules MDA-kb2. Au bilan, si les activités GR sont clairement quantifiées dans l'effluent secondaire, la co-occurrence de composés androgéniques et glucocorticoïdes en entrée de STEU ne permet pas de conclure avec précision sur les valeurs de concentrations en Dex-eq et, par conséquent, sur les rendements d'élimination pour cette activité.

Discussion sur les concentrations de Bio-TEQ au regard de la littérature

Afin de compléter la caractérisation de l'effluent secondaire et d'évaluer son impact potentiel sur le milieu récepteur, les résultats obtenus pour chacune des activités ont été comparés aux données disponibles dans la littérature (Annexe 1) ainsi qu'à des valeurs guide (Tableau 7 ; §2.4.4) définissant des seuils de qualité pour la protection des écosystèmes aquatiques ou de la santé humaine.

L'activité œstrogénique (YES et ER), un indicateur de référence

L'activité œstrogénique a été **quantifiée pour l'ensemble des échantillons** testés avec les deux bioessais sur levure et culture cellulaire réalisés respectivement par SUEZ et INERIS. Cette cible est la plus largement étudiée parmi les différentes activités spécifiques aux perturbateurs endocriniens.

Dans l'effluent secondaire, les valeurs observées sur la STEU des Bouillides sont dans la gamme de valeurs reportées dans littérature. Pour le bioessai YES, elles se situent plutôt dans une gamme basse par rapport aux valeurs observées sur d'autres sites en Europe ou au Japon ($< 0,1$ à 98 ng E2-eq/L, Annexe 1). Pour le bioessai MELN, les valeurs restent aussi dans les valeurs rapportées dans la littérature ($0,1$ à 24 ng E2-eq/L) excepté pour un échantillon qui présente une activité particulièrement élevée de 50 ng E2-eq/L. La plage de valeurs obtenue pour le bioessai YES est plus faible que pour le bioessai MELN, probablement du fait d'une plus grande sélectivité et d'une plus faible sensibilité du modèle levure. En effet certaines molécules ne sont pas détectées par le YES alors qu'elles le sont en MELN.

L'ensemble des activités œstrogéniques de l'effluent secondaire quantifiées via les deux bioessais YES et ER, est **au-dessus de la valeur guide** environnementale de **0,4 ng E2-eq/L**. Cette observation s'explique en partie par les valeurs particulièrement élevées, observées pour l'eau usée brute en entrée de STEU. Ce dépassement incite donc à évaluer les performances de traitement de la STEU (et en particulier du traitement d'ozonation complémentaire) mais aussi à travailler à l'identification du/des composé(s) responsable(s) de cette activité afin d'envisager des actions de réduction à la source.

Tableau 8. Fréquence et résultats (médiane, minimum et maximum) de quantification pour les bioessais *in vitro* PE, et évolution entrée STEU / effluent secondaire.

Bioessai	Unité	LoQ max	Entrée STEU (<i>Eaux usées brutes</i>)						Effluent secondaire						Rendement d'élimination : entrée STEU / effluent secondaire
			n	q	f	Med.	Max	Min	n	q	f	Med.	Max	Min	%
YES	ng E2-eq/L	0,2	4	4	100 %	53	59	29	5	5	100%	0,86	2,1	0,49	> 90 %
ER	ng E2-eq/L	0,04	4	4	100 %	73	864	17	5	5	100%	1,9	50,6	0,5	> 70 %
YAS	ng DHT-eq/L	4,0	4	4	100 %	2018	2747	1106	5	0	0%	ND	ND	ND	> 90 %
AR	ng DHT-eq/L	0,4	4	2	50%	130	132	127	5	0	0%	ND	ND	ND	> 90 %
GR	µg Dex-eq/L	0,2	4	2	50%	248	978	<LoQ	5	5	100%	2,8	11,8	0,8	NC
MR	µg Ald-eq/L	0,003	2	0	0%	<LoQ	<LoQ	<LoQ	3	0	0%	ND	ND	ND	NC
Anti-MR	µg Spi-eq/L	0,014	2	2	100%	0,64	0,28	1	3	3	100%	0,24	0,35	0	> 70 %
PR	ng R5020-eq/L	0,002	2	2	100%	9	15	3	3	3	100%	9,0	10,5	1,8	30 à 50%
Anti-PR	µg RU486-eq/L	0,003	2	1	50%	0,15			3	0	0%	ND	ND	ND	> 90 %
AhR	µg B[a]P-eq/L	0,1	1	1	100 %	11,2	-	-	1	1	100%	0,11	-	-	> 90 %
PXR	µg SR-eq/L	0,5	4	4	100%	9,4	36	5	5	5	100%	3,9	9,6	2,1	30 à 50%

n : nombre d'échantillons analysés. q : nombre d'échantillons avec une valeur supérieure à la limite de quantification. f = q / n : fréquence de quantification. Catégories de rendement : ● < 30%, ● 30 à 70%, ● 70 à 90% et ● > 90%. NC : Non Calculable. ND : Non Détecté. <LoQ : inférieur à la limite de quantification.

L'activité androgénique agoniste (YAS et AR)

Cette activité n'a pas été observée dans l'effluent secondaire ce qui est cohérent avec la faible proportion d'étude ayant pu quantifier ce type d'activité en sortie de station de traitement des eaux usées. Pour le test YAS, les seules valeurs reportées dans la littérature (Stalter et al., 2011; Svenson and Allard, 2004) sont légèrement inférieures à la limite de quantification de 4 ng DHT-eq/L obtenue pour cette étude. De plus, ces valeurs sont aussi inférieures à 11 ng DHT-eq/L, valeur seuil (cible santé humaine) proposée pour l'activité androgénique agoniste par Brand et al. (2013).

L'activité glucocorticoïde agoniste (GR)

Dans le cadre du projet MICROPOLIS Indicateurs, l'activité GR a été quantifiée dans l'ensemble des échantillons d'effluent secondaire. A titre de comparaison, lors du projet ANR ECHIBIOTEB, ce même bioessai (avec la souche MDA-kb2) a été appliqué sur 6 STEU (21 échantillons) mais l'activité GR n'a été quantifiée que pour les échantillons de la STEU ayant la plus grande capacité (300 000 EH). Les valeurs observées pour ce site (0,5 à 1 µg Dex-eq/L) restent inférieures à celles obtenues pour les échantillons du projet MICROPOLIS Indicateurs (0,8 à 11,8 µg Dex-eq/L). Des niveaux similaires d'activité GR (avec la souche MDA-kb2), de 0,3 à 0,7 µg Dex-eq/L ont aussi été observés dans des effluents secondaires provenant de STEU de grande taille et/ou recevant une part d'effluent d'origine industrielle et/ou hospitalière (Baig et al., 2015; Creusot et al., 2014; Gonzalez Ospina et al., 2016) En effet, l'activité GR est considérée comme caractéristique de la présence de sources industrielles et/ou hospitalières sur le réseau de collecte des eaux usées (van der Linden et al., 2008), ce qui est cohérent avec les sites où elle a pu être mise en évidence.

Pour l'effluent secondaire de Sophia Antipolis, les valeurs obtenues sont supérieures à celles mesurées sur les autres sites avec la lignée cellulaire (MDA-kb2), ainsi qu'à celles reportées dans la littérature pour d'autres bioessais visant cette activité glucocorticoïde (GR-CALUX et GR-GeneBLAzer ; <3 – 188 ng Dex-eq/L ; Leusch et al. (2017).

Les valeurs obtenues pour cet effluent secondaire (ainsi que pour tous ceux dont une activité GR a été quantifiée avec le bioessai MDA-kb2) sont toujours supérieures à la valeur seuil (environnementale) de 100 ng Dex-eq/L, proposée par van der Oost et al. (2016) et développée pour le bioessai GR-CALUX. Cette comparaison doit toutefois être relativisée car les valeurs seuils sont définies pour un bioessai. Leur généralisation et leur transposition à d'autres bioessais visant les mêmes activités doivent être appliquées avec prudence. De plus, il est à noter que la souche MDA-kb2, présente une spécificité d'avoir des récepteur AR et GR, ce qui incite à une plus grande prudence pour la généralisation d'une valeur seuil développé pour une souche spécifique de l'activité GR (GR-CALUX).

Toutefois, ces valeurs relativement élevées au regard des autres sites d'études, invitent à évaluer les performances du traitement (d'ozonation) tertiaire de la STEU et à travailler à l'identification du/des composé(s) responsable(s) de cette activité afin d'envisager des actions de réduction à la source.

L'activité progestagène agoniste (PR)

L'activité PR a été mesurée pour l'ensemble des échantillons d'effluent secondaire avec des niveaux d'activité allant de 1,8 à 10,5 ng R5020-eq/L. Dans la littérature, cette activité n'a pas été détectée lorsqu'elle a été recherchée dans les eaux usées traitées avec la lignée cellulaire HELN-PRB (Bellet et al., 2012).

Toutefois, la revue bibliographique faite par Leusch et al. (2017) a permis d'identifier plusieurs publications pour lesquelles des valeurs d'activités PR ont été mesurées en sortie de STEU. Les niveaux d'activité se situent autour de 0,1 à 3 ng Org2058-eq/L ce qui est bien en-dessous de la valeur seuil (santé humaine) de 333 ng Org2058-eq/L proposée par Brand et al. (2013) pour le bioessai PR CALUX. Les activités PR restent du même ordre de grandeur que l'on utilise l'un ou l'autre composé en tant que référence (Leusch et al., 2017). Cette similarité avec les données de la littérature permet de considérer que les niveaux d'activité observés pour l'effluent secondaire de la STEU de Sophia Antipolis ne présentent pas une particularité qu'il conviendrait d'étudier spécifiquement.

Les activités des récepteurs xénobiotiques, AhR et PXR

AhR

L'activité AhR n'a été détectée que pour 1 échantillon d'effluent secondaire (sur deux analysés). Le nombre réduit d'analyses tient au fait que cette activité bien qu'initialement intégrée dans le panel de bioessais n'a pas été retenue pour la suite de l'étude.

En effet, cette activité est associée aux composés organiques hydrophobes, principalement présents dans la phase particulaire et généralement bien retenus dans les boues lors des traitements primaires et secondaires (fortes activités dans les boues détectées dans le projet ECHIBIOTEB). De plus, dans le projet MICROPOLIS Indicateurs, seule la phase dissoute a été analysée.

L'activité mesurée pour le récepteur HAP-like (AhR) de 0,11 µg B[a]P-eq/L, est en accord avec les gammes de valeurs pour des effluents secondaires de STEU urbaines reportés dans la littérature, 0,02 – 1 µg B[a]P-eq/L pour AhR (ECHIBIOTEB, 2015; Baig et al., 2015; Jálová et al., 2013). Ces valeurs sont souvent proches de la limite de quantification (0,02 – 0,1 µg B[a]P-eq/L) et peuvent parfois être au-dessus de la valeur guide (cible environnementale) de 0,15 µg B[a]P-eq/L proposée par van der Oost et al. (2016). Toutefois, ce n'était pas le cas pour l'effluent secondaire de la STEU des Bouillides ce qui justifie le fait que ce test n'ait pas été conservé pour la suite de l'étude.

PXR

Dans cette étude, l'activité PXR-like est détectée pour l'ensemble des échantillons d'effluent secondaires avec des niveaux d'activité allant de 2,1 à 9,6 µg SR-eq/L, qui sont dans la gamme de valeurs des quelques références disponibles dans la littérature pour les rejets de STEU, à savoir 1,6 - 3,1 µg SR-eq/L (Baig et al., 2015) et 0,7 – 10 µg SR-eq/L (Creusot et al., 2010; Mnif et al., 2010).

L'activité PXR-like de l'effluent secondaire, bien que partiellement éliminée par le traitement primaire et secondaire de la STEU, **reste systématiquement supérieure à la valeur seuil de 0,4 µg SR-eq/L** proposée par van der Oost et al. (2016). Toutefois, ce seuil a été développé pour le bioessai PXR CALUX peu décrit dans la littérature et pour lequel il n'existe pas d'étude comparative avec le bioessai sur culture cellulaire HG5LN-hPXR. Dans le cas du bioessai PXR utilisant la lignée HG5LN-hPXR, ce seuil est proche de la limite de quantification de ce bioessai ce qui peut augmenter l'incertitude sur les résultats.

Rendement d'élimination du traitement primaire et secondaire

Les résultats obtenus ont permis de quantifier l'évolution de ces activités entre l'entrée de la STEU et la sortie du traitement biologique de nitrification (effluent secondaire). Des rendements d'élimination des activités PE dans l'eau (Rw) ont été calculés et sont présentés selon la méthode proposée par Besnault et al. (2015) adaptée de Choubert et al. (2011). Ils sont donc présentés en gammes de rendement : rouge pour $Rw < 30\%$ (très faible), jaune pour $30\% < Rw < 70\%$ (intermédiaire), vert pour $70\% < Rw < 90\%$ (bon) et bleu pour $Rw > 90\%$ (très bon).

On remarque que la plupart des activités mesurées en entrée de STEU sont bien (ER, anti-MR) à très bien (YES, YAS, AR, anti-PR et AhR) éliminées par les étapes de traitements primaire et secondaire (Tableau 8). On notera que les résultats pour AhR et anti-PR sont à prendre avec plus de précaution étant donné que nous ne disposons de résultats quantifiés que pour une seule campagne de prélèvement (de surcroît pour des échantillons « moyen 3h » et non « moyen 24h »).

Les activités PR et PXR sont aussi partiellement éliminées après traitement mais dans de plus faibles proportions que les autres activités, entre 30% et 50% suivant les campagnes.

Finalement, pour l'activité GR, les rendements ne sont pas reportés du fait d'une incertitude sur les valeurs de DEX-Eq reportées en entrée de STEU (cf. paragraphe ci-dessus).

4.1.2 Focus sur le traitement complémentaire

Pour rappel, le traitement complémentaire est composé d'une étape d'ozonation (avec un objectif de traitement des micropolluants) et d'une dénitrification (conversion des nitrates en azote gazeux par biofiltration).

Rendement d'élimination du traitement complémentaire

Les performances d'élimination des activités PE par le traitement complémentaire ont été évaluées pour une campagne ponctuelle (mars 2015) et quatre campagnes sur 24h (juillet, septembre et 2 en novembre 2015). Pour la majorité des campagnes, la réduction de l'activité des bioessais PE est globalement élevée (>70%). Toutefois, pour certains bioessais et/ou certaines campagnes, les rendements d'élimination ont pu être limités (Tableau 9), notamment pour la campagne de septembre pour laquelle il a été démontré que les performances d'élimination des micropolluants étaient limitées par la possible présence de nitrites (Choubert et al., 2017). De même, lors de la première campagne de novembre 2015 (Nov. a), on observe des rendements (pour l'ensemble « ozonation plus biofiltration DN ») plus faibles que pour la seconde de novembre 2015 (Nov. b) pour les activités ER (YES et MELN) et GR. A contrario, l'activité PXR est très bien éliminée (> 90%) pour ces deux campagnes de novembre 2015 alors qu'elle ne l'était que partiellement pour les campagnes de mars, juillet et septembre.

L'activité œstrogénique agoniste (YES et ER)

Pour 2 campagnes sur 3 (excepté septembre 2015), l'étape d'ozonation permet de réduire l'activité œstrogénique à des valeurs sous le seuil de 0,4 ng E2-eq/L. Cet objectif environnemental n'est pas atteint lors de la campagne de septembre pour laquelle l'activité œstrogénique en entrée d'ozonation était particulièrement élevée (ER : 50 ng E2-eq/L ; YES : 2,1 ng E2-eq/L). Cette forte activité peut s'expliquer par une possible dégradation de la qualité de traitement biologique secondaire du fait d'une surcharge ponctuelle de la STEU. Cette hypothèse est consolidée par la présence suspectée de nitrites dans l'effluent secondaire (Choubert et al., 2017). La consommation d'ozone par les nitrites a aussi dû contribuer à altérer la performance de traitement conduisant à la non-atteinte de ce seuil environnemental.

On observe que le rendement obtenu pour le traitement complémentaire complet (ozonation + biofiltration DN) est inférieur à celui pour l'ozonation seul pour les campagnes de juillet et de septembre (-20%, Tableau 9). Cette différence est probablement due à une augmentation de l'activité œstrogénique durant l'étape de dénitrification par biofiltration de l'effluent ozoné. Cela pourrait s'expliquer par la conversion biologique de produits de transformation issus de l'étape d'ozonation en composés ayant une activité œstrogénique supérieure. Ceci n'a toutefois pas été observé pour le bioessai YES, peut-être du fait de la plus grande sélectivité de ce bioessai sur levure.

Pour la campagne de juillet 2015, même si l'ozonation permet d'atteindre une activité œstrogénique inférieure au seuil de 0,4 ng E2-eq/L, l'augmentation après l'étape de biofiltration DN conduit à une valeur légèrement supérieure à ce seuil (0,45 ng E2-eq/L).

**Tableau 9. Catégories de rendement d'élimination des activités « perturbateurs endocriniens » après ozonation seule et après traitement complémentaire (ozonation + biofiltration DN).
Catégories de rendement : ● < 30%, ● 30 à 70%, ● 70 à 90% et ● > 90%.**

Campagne		Mars 2015	Juillet 2015	Sept. 2015	Nov. 2015 (a)	Nov. 2015 (b)
		Ponctuelle	24h	24h	24h	24h
Dose d'ozone transférée	gO ₃ /m ³	3,7*	6,4	5	4,8	4,5
Rendement ozonation	YES				Non calculable car pas d'échantillon « sortie ozonation »	
	ER					
	GR					
	PXR					
	anti-MR					
	PR					
Rendement traitement complémentaire (ozonation + biofiltration DN)	YES					
	ER					
	GR					
	PXR					
	anti-MR				NA	NA
	PR				NA	NA

* Dose d'ozone corrigée par les nitrites

NA : non analysé

Tableau 10. Résultats des bioessais activités "perturbateurs endocriniens" pour l'effluent en sortie de STEU.

Bioessai	Unité	LoQ max	Sortie STEU					
			n	q	f	médiane	max	min
YES	ng E2-eq/L	0,2	5	3	60%	0,3	1,1	0,2
ER	ng E2-eq/L	0,04	5	5	100%	0,4	23,6	0,2
YAS	ng DHT-eq/L	4	5	0	0%	-	-	-
AR	ng DHT-eq/L	0,4	5	0	0%	-	-	-
GR	µg Dex-eq/L	0,2	5	5	100%	2,1	3,4	0,2
MR	µg Ald-eq/L	0,003	3	0	0%	-	-	-
Anti-MR	µg Spi-eq/L	0,014	3	1	33%	0,1	-	-
PR	ng R5020-eq/L	0,002	3	3	100%	3,5	5,7	1,0
anti-PR	µg RU486-eq/L	0,003	3	0	0%	-	-	-
AhR	µg B[a]P-eq/L	0,1	2	0	0%	-	-	-
PXR	µg SR-eq/L	0,5	5	5	100%	1,4	3,6	0,6

Les bioessais GR, PR, anti-MR et PXR

Parmi les autres activités PE, on distingue deux types de comportement. Un premier groupe, composé des activités GR, PR et PXR, pour lequel l'étape d'ozonation contribue à la réduction de l'activité à hauteur de 80 à 100%, et un second groupe (comprenant la seule activité anti-MR) pour lequel l'étape de biofiltration possède une contribution non-négligeable (autour de 40%) à l'élimination de cette activité par le traitement tertiaire. Ces différents comportements lors de

l'étape biologique sont cohérents avec ceux observés pour les traitements primaire et secondaire (Tableau 8).

Dans le premier groupe, l'activité GR semble la plus sensible à la dose d'ozone, avec une diminution du rendement d'élimination observée pour la campagne septembre 2015 comparée aux campagnes mars et juillet. Dans l'ensemble, les rendements restent assez élevés (de 50 à 80%) excepté pour la campagne de novembre-(a) pour laquelle le rendement est négatif.

Cette observation semble cohérente avec l'apparition de l'activité GR dans l'effluent secondaire alors que cette dernière n'est pas détectée en entrée de STEU. En effet, le traitement biologique conduit possiblement à la déconjugaison d'hormones glucocorticoïdes ou à la dégradation de certaines substances faiblement actives en d'autres plus actives. Malgré l'apport additionnel du traitement tertiaire, l'activité GR reste assez élevée en sortie de STEU. Elle est notamment supérieure à la valeur seuil de 100 ng Dex-eq/L, avec les limites déjà évoqués concernant l'utilisation de cette valeur seuil pour la souche MDA-kb2.

Les rendements d'élimination de l'activité PR par le traitement complémentaire sont moyens (de 30 à 60%) et semblent liés à la dose d'ozone même s'il est difficile de conclure sur 3 échantillons. Concernant l'activité PXR, les rendements du traitement tertiaire vont de 12 à >98% sans aucune relation directe et claire avec la dose d'ozone transférée. Il est toutefois intéressant de noter que le traitement complémentaire permet de passer sous la valeur seuil de 0,4 µg SR-eq/L, pour 1 campagne sur 5 (novembre-(a)) et de s'en approcher fortement pour une autre (novembre(b), Tableau 10). Cela confirme l'intérêt de l'ozonation (tertiaire) pour réduire ce type d'activité mais suivant les niveaux d'activité qui peuvent être plus ou moins élevés, cette solution demande à être complétée d'une action de réduction des émissions à la source pour réduire la charge reçue par la STEU.

4.2 Génotoxicité, cytotoxicité et toxicité aigüe sur daphnies

4.2.1 Génotoxicité, SOS Chromotest

Comme décrit en §2.5.1, le potentiel génotoxique est classé dans des catégories allant de 0 à 5, 5 étant la catégorie présentant le potentiel génotoxique le plus élevé et 1 la catégorie pour laquelle le potentiel détecté est le plus faible. A noter que lorsque le SIF obtenu n'est pas statistiquement différent du témoin, celui est considéré comme négligeable (niveau 0).

Sans Activation métabolique (-S9)

Le SOS Chromotest sans activation métabolique met en évidence, selon la grille de cotation, un potentiel génotoxique en entrée de STEU oscillant entre 1 et 3 suivant les campagnes. Les traitements primaire et secondaire permettent d'atteindre une faible réduction du potentiel génotoxique pour certaines campagnes (baisse d'un point).

Le traitement complémentaire (ozonation + biofiltration DN) permet de réduire de manière plus significative le potentiel génotoxique de l'ensemble des effluents (deux échantillons de niveau 0, deux de niveau 1 et un de niveau 3). Cette réduction est principalement due à l'étape d'ozonation pour laquelle le potentiel de génotoxicité est réduit à un niveau 0 pour deux échantillons (sur 3). La campagne pour laquelle l'effluent en sortie d'ozonation et celui en sortie de STEU présentent un potentiel génotoxique de niveau 3 n'a pas fait l'objet d'un prélèvement en entrée de STEU (juillet 2015).

Avec Activation métabolique (+S9)

Le SOS Chromotest avec activation métabolique met en évidence selon la grille de cotation, un potentiel génotoxique en entrée de STEU de niveau 2 à 4 pour l'ensemble des campagnes (un niveau 4, deux de niveau 3 et un de niveau 2). Pour ces 3 campagnes, les traitements primaire et secondaire semblent avoir un effet plus marqué sur le potentiel génotoxique avec activation métabolique, dans la mesure où une réduction d'un à trois points est observée sur l'ensemble des campagnes. Les échantillons prélevés en sortie de STEU sont de niveaux 0 à 3 (un de niveau 0, deux de niveau 1, deux de niveau 3) mettant ainsi en évidence une efficacité complémentaire du

traitement sans pour autant permettre l'atteinte d'un potentiel de niveau 0 (équivalent à un potentiel génotoxique non significatif).

Comme précédemment, l'étape d'ozonation semble apporter une forte contribution à cette réduction vers des potentiels de génotoxicité de niveau 0 (2 fois) et 1 (1 fois). Il semblerait donc que l'efficacité des traitements primaire et secondaire soit plus marquée vis-à-vis des molécules génotoxiques nécessitant une activation métabolique (par exemple les HAP tel que le benzo[a]pyrène). Dans les deux cas, le traitement complémentaire, et en particulier l'étape d'ozonation, apporte une contribution complémentaire à l'élimination des molécules génotoxiques nécessitant ou pas une activation métabolique.

Comparaison des SIF pour un facteur de concentration de 5x

L'analyse des SIF obtenus pour un facteur de concentration de 5x permet une comparaison plus fine des potentiels de génotoxicité qu'il n'est possible de le faire à 1x, du fait de la faible réponse observée. Ce facteur permet aussi de s'affranchir de la cytotoxicité potentiellement observée à 50x, notamment pour les échantillons prélevés en entrée de STEU, ou dans le réseau de collecte des eaux usées.

SOS Chromotest, sans activation métabolique S9 (REF = 5x)

Sans activation métabolique, l'eau usée en entrée de STEU présente un SIF supérieur à 1,5 pour un seul échantillon sur 4 (Figure 21). Après traitement secondaire, le SIF passe sous le seuil de 1,5 et est pour 3 échantillons sur 5 égale à 1 (soit pas de différence avec le témoin). Pour les échantillons prélevés après ozonation et en sortie de STEU, le SIF est aussi égal à 1 dans la majorité des cas, à l'exception d'une campagne. Pour cette campagne, l'effluent secondaire présente une forte génotoxicité (SIF = 2,5) et le traitement complémentaire permet de fortement réduire le SIF à 1,7, toutefois cette valeur reste supérieure au seuil de 1,5. Malheureusement, pour cette campagne, aucun échantillon en entrée de STEU n'a été prélevé.

SOS Chromotest, avec activation métabolique S9 (REF = 5x)

Avec activation métabolique, l'eau usée en entrée de STEU présente un SIF supérieur ou égal à 1,5 pour 3 échantillons sur 4, soit beaucoup plus que sans activation S9. Après les traitements primaire et secondaire, l'effluent secondaire ne présente aucun SIF au-dessus du seuil de 1,5, ce qui confirme une efficacité de la filière de traitement pour ce paramètre, comme observé sans activation S9. Le traitement complémentaire (ozonation et biofiltration DN) ne modifie pas ce paramètre, le maintenant sous le seuil de 1,5.

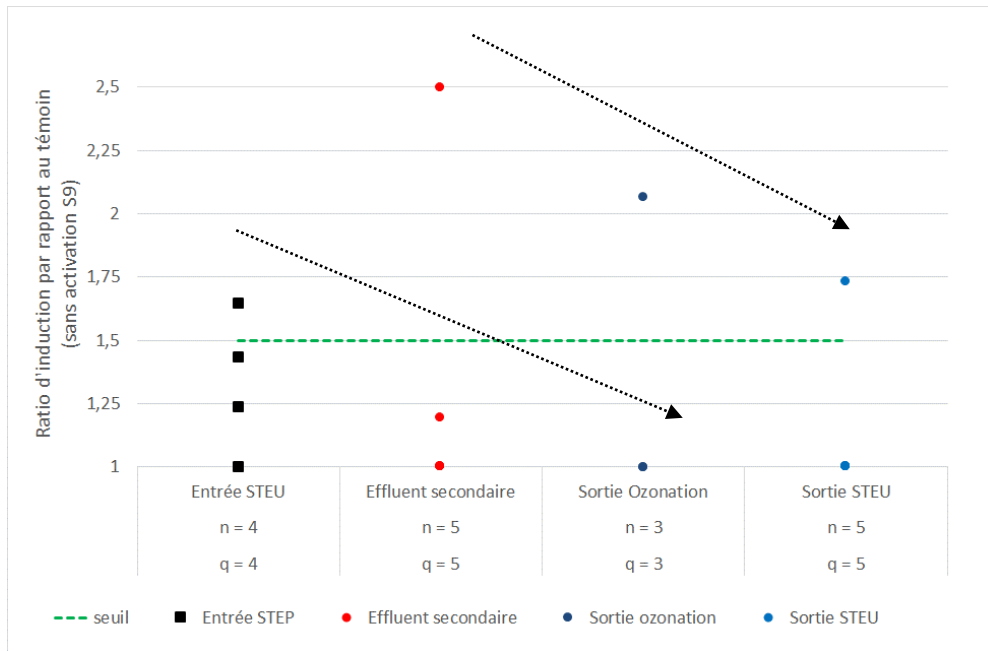


Figure 21. SOS Chromotest en différents points de la STEU, sans activation S9, REF = 5X.

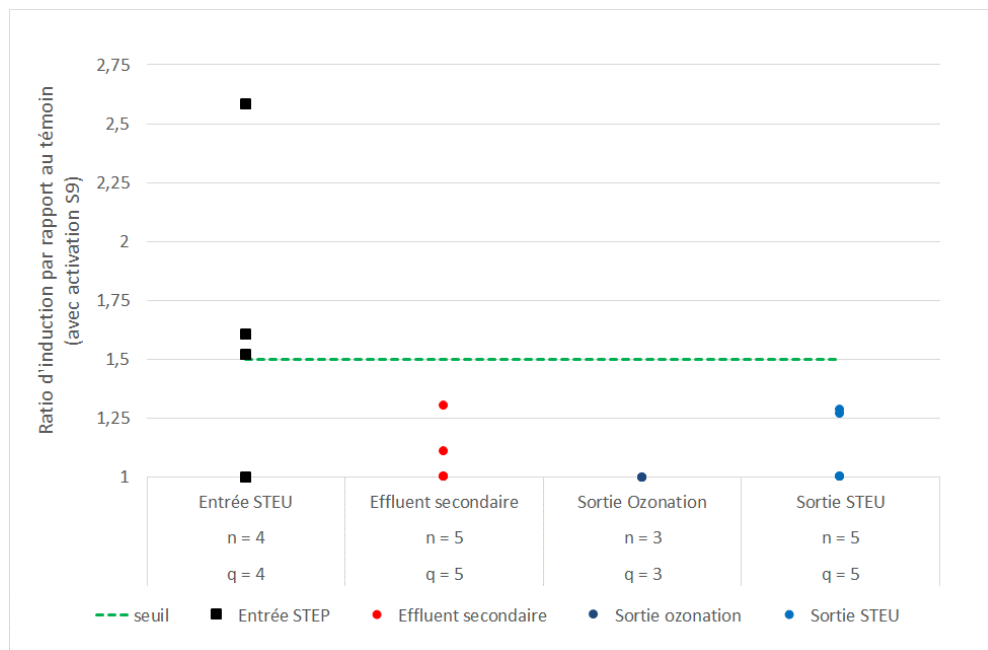


Figure 22. SOS Chromotest en différents points de la STEU, avec activation S9, REF = 5x.

4.2.2 Test de cytotoxicité

Comme décrit en 2.5.2, suivant la toxicité de l'échantillon, les résultats du test correspondent à :

- la DL₅₀ (concentration de l'échantillon induisant 50% de mortalité cellulaire, exprimée en %)
- au taux de viabilité mesurée à la plus forte concentration testée (100%, échantillon non dilué), exprimé en %.

DL50

L'eau usée prélevée en entrée de STEU présente une cytotoxicité élevée. Les DL50 ont été atteintes pour des concentrations allant de 60% à 90% d'eaux usées (soit une dilution de 10 à 40% de l'échantillon). Pour le reste des échantillons prélevés sur la STEU (effluent secondaire,

sortie ozonation et sortie STEU), aucune DL50 n'a pu être déterminée traduisant ainsi une toxicité moindre. Ceci démontre donc une certaine capacité de réduction de la cytotoxicité de l'eau usée brute par la filière de traitement.

Taux de viabilité à la concentration 100% (échantillon non dilué)

Pour les échantillons d'effluent secondaire, de sortie ozonation et de sortie STEU dont la toxicité moindre ne permet pas de calculer une DL50, l'étude du taux de viabilité des cellules RTG2 exposées à 100% d'échantillon permet de comparer leurs toxicités.

Dans la Figure 23, il apparaît clairement que l'eau usée en entrée de STEU est plus cytotoxique que les échantillons prélevés après traitement, avec des taux de viabilité allant de 37 à 64%. Les taux de viabilité pour les échantillons prélevés après traitement sont, pour une majorité, égaux à 100% (ce qui équivaut à une absence de cytotoxicité) et dans leur totalité supérieurs ou égaux à 90%, excepté pour un échantillon prélevé en sortie d'ozonation où ce taux chute à 50%. Le traitement par biofiltration DN permet de revenir à un taux de viabilité supérieur à 90%.

Ce test de cytotoxicité, comme il a été conduit dans cette étude (à savoir sur la fraction dissoute de l'échantillon « brut » sans étape préalable d'extraction et de concentration) ne permet pas d'identifier de toxicité résiduelle en sortie de STEU. Ceci est cohérent avec les résultats observés pour le test SOS Chromotest. Toutefois cela ne donne pas d'indication sur la toxicité éventuellement portée par les matières en suspension.

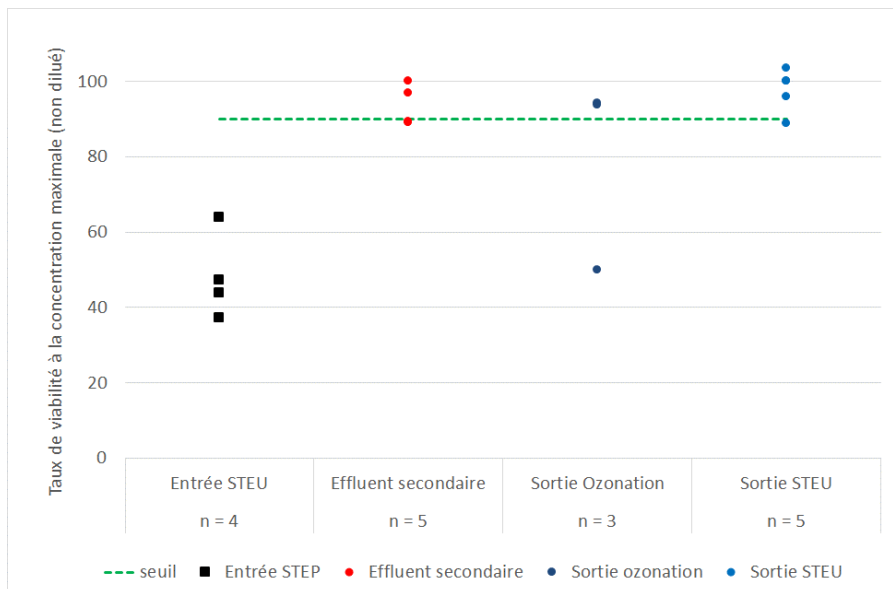


Figure 23. Taux de viabilité des cellules de truite pour les différents échantillons prélevés sur la STEU (en condition non diluée)

4.2.3 Test d'immobilisation des daphnies

Comme évoqué au paragraphe 2.6.1, le flux d'équitox rejeté par équivalent-habitant est fixé par arrêté ministériel à 0,20 Equitox/j par habitant, soit pour un volume de 150 à 200 l/j par équivalent.habitant, ce qui correspond à une concentration de 1 à 1,3 equitox/m³. Par conséquent, cette dernière valeur a été retenue comme valeur de référence dans l'interprétation des résultats d'analyse des échantillons de cette étude (Figure 24).

L'eau usée brute prélevée en entrée de STEU présente une toxicité aiguë pour les 3 échantillons analysés, avec des valeurs allant de 1,8 à 3,2 equitox/m³, ce qui est supérieure à la concentration de référence de 1,3 equitox/m³. Dans l'effluent secondaire, cette toxicité aiguë n'a pu être quantifiée que pour un seul échantillon, ce qui démontre sa réduction du fait des différentes étapes (primaire et secondaire) de traitement des eaux usées. Pour une campagne, les valeurs de toxicité aiguë sont très proches en entrée de STEU et pour l'effluent secondaire (1,8 et 2 equitox/m³), toutefois le traitement complémentaire a permis d'éliminer cette toxicité qui n'a jamais été détectée ni après ozonation ni dans le rejet de la STEU.

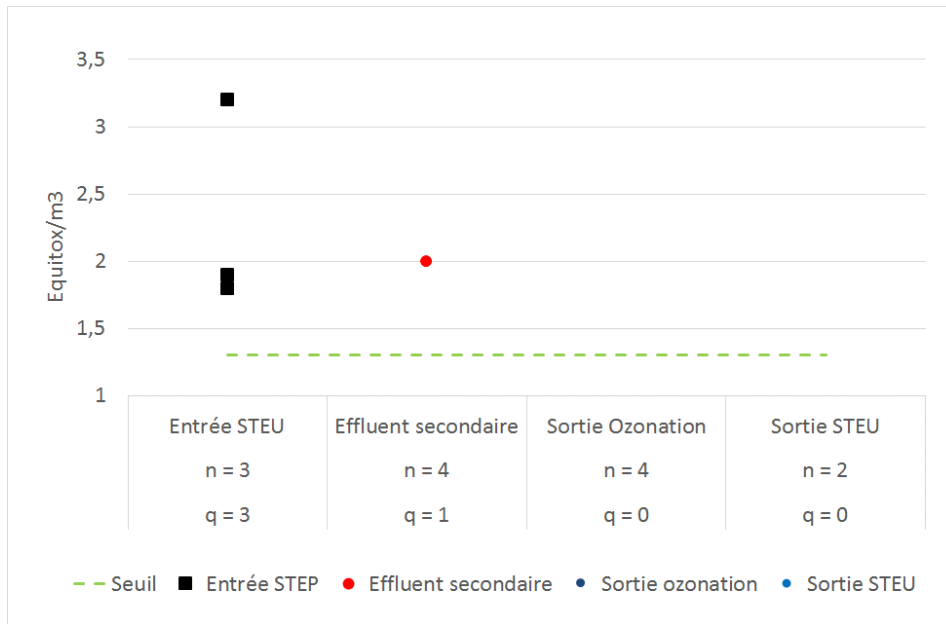


Figure 24. Toxicité aiguë mesurée par le test « Daphnie » (equitox/m³) en différents points de la STEU

4.3 Synthèse sur la caractérisation des effluents de la STEU

4.3.1 Caractérisation des effluents et performances de traitement de la STEU

Cette étude a permis de caractériser les différents types de toxicité de l'eau usée en entrée de la STEU des Bouillides et de son évolution le long de la filière de traitement.

Les bioessais *in vitro* attestent de la présence de micropolluants organiques multiples capables d'interférer avec différentes cibles (récepteurs) des PE. Pour certaines activités *in vitro*, les niveaux mesurés dans l'effluent s'avèrent supérieurs aux valeurs seuils récemment proposées dans la littérature :

- l'activité œstrogénique peut présenter des niveaux de contamination (très) élevés en entrée de STEU avec en sortie un dépassement potentiel de la valeur guide environnementale de 0,4 ng E2-*eq*/L malgré une forte élimination par la STEU (> 90%, traitement par ozonation tertiaire inclus).
- l'activité glucocorticoïde, bien que non détectée systématiquement en entrée de STEU (avec la souche MDA-kb2), est toujours quantifiée dans l'effluent secondaire à des valeurs relativement élevées par rapport à celles reportées dans la littérature. Le traitement tertiaire (par ozonation) permet une réduction de cette activité mais pas une élimination totale. Elle est donc encore présente dans le rejet de la STEU.
- l'activité PXR présente une activité similaire à celles référencées dans la littérature (gamme haute). Bien que partiellement éliminée par le traitement primaire et secondaire de la STEU, elle reste systématiquement supérieure à la valeur seuil de 0,4 µg SR-*eq*/L (van der Oost et al., 2016). Le traitement tertiaire par ozonation contribue à la réduction de l'activité avant rejet et permet de passer sous la valeur seuil pour 1 campagne sur 5 et de s'en approcher fortement pour une autre.

Les résultats du SOS Chromotest (avec et sans activation métabolique S9) montrent que l'eau usée brute est génotoxique. Cette génotoxicité décroît au long du traitement de la STEU et du traitement complémentaire et passe sous le seuil de 1,5 (à un REF de 5x) dès la sortie secondaire.

Les tests de cytotoxicité et d'écotoxicité confirment la toxicité de l'eau usée brute ainsi que l'effet d'atténuation de cette dernière apporté par l'ensemble des traitements de la STEU. Ponctuellement, des toxicités résiduelles ont été mesurées dans l'effluent secondaire (cytotoxicité, écotoxicité et génotoxicité) ainsi qu'en sortie de STEU (génotoxicité) malgré la réduction complémentaire apportée par le traitement tertiaire. Celles-ci sont fort probablement dues à une très forte charge toxique en entrée de STEU et invite donc à compléter l'effet positif de la filière de traitement de la STEU par une action de recherche des sources de polluants.

Les effluents de la STEU des Bouillides présentent un profil de toxicité assez atypique, notamment d'activité PE, avec des niveaux particulièrement élevés pour certaines activités PE caractéristiques des eaux usées urbaines (ER, AR) et la quantification d'une activité GR considérée comme spécifique des eaux usées d'origines industrielle et/ou hospitalière. Ces observations sont cohérentes avec les différentes origines (urbaines, industrielles, hospitalières) des eaux usées alimentant la STEU.

4.3.2 Conclusions sur le traitement complémentaire par ozonation

Le traitement par ozonation de la STEU de Sophia Antipolis a fait l'objet d'une évaluation technique, énergétique et environnementale pour l'élimination des micropolluants prioritaires et émergents lors du projet MICROPOLIS-Procédés (Choubert et al., 2017). L'étude menée dans le cadre de la tâche 2A du projet MICROPOLIS-Indicateurs (chapitre 4 de ce rapport) a permis de compléter cette évaluation en proposant une vision complémentaire de ces performances par l'utilisation d'une batterie de test biologiques (bioessais) permettant l'analyse de différents types de toxicité (activités « perturbateurs endocriniens », génotoxique et cytotoxique). Les résultats de cette étude confirment la forte réduction des toxicités résiduelles présentes dans l'effluent secondaire de la STEU par l'étape d'ozonation. Les résultats obtenus pour ces bioessais indiquent

aussi que les produits de dégradation de l'ozonation des micropolluants ne conduisent pas à une augmentation de la toxicité après traitement.

Comme discuté dans le rapport du projet MICROPOLIS-Procédés, il convient d'ajuster la dose d'ozone à la qualité de l'effluent à traiter. Cela permet d'assurer un maintien des performances de traitement que l'on vise un rendement d'élimination (ex : 80%) ou l'atteinte de valeurs seuil (ex : NQE). Toutefois, ces valeurs guides ne faisant pas l'objet de consensus scientifique (excepté pour l'activité œstrogénique), ces objectifs restent encore aujourd'hui à préciser afin d'établir des conclusions sur les doses d'ozone requises à leur atteinte.

5 PROFILS DE TOXICITE DES EAUX USEES DE SOPHIA ANTIPOLIS

Cette étude a permis de caractériser les différents types de toxicité de l'eau usée en différents points du réseau de collecte des eaux usées alimentant la STEU des Bouillides ainsi qu'en différents points de cette STEU. Afin de compléter cette caractérisation et de dresser un profil de toxicité par point de suivi (et par campagnes), les activités/effets observés ont été retranscrits dans une grille de lecture commune afin d'être répartis en 6 catégories allant de 0 à 5.

5.1 Méthode de représentation des résultats de chaque bioessai par code couleur

Pour les bioessais évaluant les activités des « perturbateurs endocriniens », la grille de cotations des résultats (Tableau 11) a été construite sur la base de la limite de quantification la plus élevée obtenue pour chaque activité (Tableau 8, p. 39). Pour les bioessais mesurant l'activité œstrogénique, la valeur seuil environnementale de 0,4 ng E2-eq/L a aussi été considérée dans la grille de cotation (Tableau 11). Pour les autres activités PE, les valeurs guide n'ont pas été retenues car il n'existe pas aujourd'hui de consensus scientifique. Par ailleurs, ces seuils développés pour les bioessais CALUX semblent moins pertinents pour cette étude où d'autres types de bioessais sont testés.

Tableau 11. Valeurs utilisées pour le code couleur des bioessais PE

	Bioessais "activité oestrogénique"		Autres bioessais PE	
	VS = Valeur seuil de 0,4 ng E2/L	YES	ER	YAS, AR, GR, PXR, AhR, (anti-)PR, (anti-)MR
		ng E2-eq/L		
5	> 1000 * VS	400	400	> 1000 * LoQ max
4	< 1000 * VS	400	400	< 1000 * LoQ max
3	< 100 * VS	40	40	< 100* LoQ max
2	< 10 * VS	4	4	< 10 * LoQ max
1	< valeur seuil	0,4	0,4	< 5 * LoQ max
0	< LoQ	0,2	0,04	< LoQ max

Pour le SOS Chromotest, une cotation du potentiel génotoxique a été réalisée selon la valeur du SIF et le facteur de concentration utilisé pour la détermination du SIF (Figure 25) :

	SIF (sans S9)			SIF (avec S9)		
	@1X	@5X	@50X	@1X	@5X	@50X
5	> 2	> 2,9		> 2	> 2,75	
4	> 1,5	> 2,4		> 1,5	> 2,25	
3	> 1,15	> 2,1	> 3,4	> 1,25	> 2	> 3
2		> 1,5	> 2,8		> 1,5	> 2,5
1		≠ témoin	≠ témoin		≠ témoin	≠ témoin
0		eq. témoin	eq. témoin		eq. témoin	eq. témoin

Figure 25. Code couleur pour le SOS Chromotest sans S9 (à gauche) et avec S9 (à droite)

Pour les bioessais de toxicité aiguë d'immobilisation des daphnies et de cytotoxicité sur cellules de gonades de truite, une grille d'interprétation des résultats a été élaborée de façon arbitraire afin de distribuer les échantillons dans 6 catégories (Tableau 12).

Tableau 12. Grille de cotation pour les bioessais de toxicité aiguë « Daphnie » et de cytotoxicité

		Test Daphnie	Test de cytotoxicité
		equitox/m3	% viabilité à 100%
5	-	> 13	< 35%
4	seuil 4	< 13	> 35%
3	seuil 3	< 6,5	> 50%
2	seuil 2	< 2,6	> 65%
1	seuil 1	< 1,3	> 80%
0	Non toxique	< 0,5	> 95%

5.2 Profils de toxicité de la source jusqu'en sortie de STEU (Tableau 13)

L'analyse des profils depuis la source (réseaux de collecte des eaux usées) jusqu'à la sortie de la STEU montre une réduction des différents types de toxicité comme cela a pu être détaillé au chapitre 3.

L'activité génotoxique résiduelle mesurée en sortie de STEU (SOS Chromotest) est à mettre en regard des niveaux élevés de toxicité observés au point 1, 5 et 6. Pour le **point 1**, cette toxicité est confirmée par les niveaux élevés observés pour le test de cytotoxicité et de toxicité aiguë d'immobilisation des daphnies.

Pour les activités « perturbateurs endocriniens », les différents points de prélèvement présentent des profils assez différents notamment pour les activités GR, PXR. Parmi ces différents profils, celui du point 3 apparaît comme un des plus intéressants du fait de la détection d'une activité GR pour les échantillons des campagnes de mars et novembre. Il s'agit aussi d'un des points qui présente l'activité PXR la plus élevée. L'activité PR présente un niveau de 4 à 5 pour l'ensemble des points du réseau et de la STEU. Cela est dû à une très faible limite de quantification. En valeurs absolues, ces activités restent inférieures à la valeur seuil proposé par Brand et al. (2013).

5.3 Cartographie des profils de toxicité dans le réseau

Pour chaque point de prélèvement dans le réseau, le profil de toxicité a été établi et reporté sur la carte afin d'avoir une vision globale de l'évolution des caractéristiques des profils de toxicité sur les différentes branches du réseau de collecte des eaux usées (Figure 26).

Pour les activités PE, les différents points de prélèvement présentent des profils assez différents notamment pour les activités AR/GR, PR et PXR. Parmi ces différents profils, celui du point 3 apparaît comme un des plus intéressants du fait de la détection d'une activité GR pour les échantillons des campagnes de mars et novembre. Il s'agit aussi d'un des points qui présente l'activité PXR la plus élevée.

Les résultats des bioessais de génotoxicité, cytotoxicité et d'écotoxicité sont cohérents entre eux, montrant une plus grande toxicité dans l'eau usée collectée par la branche D, et en particulier au point 1, sur la branche Dm.

Tableau 13. Profils de toxicité pour l'ensemble des échantillons prélevés des en différents points du réseau de collecte des eaux usées et de la STEU des Bouillides

		Réseaux de collecte des eaux usées										STEU des Bouillides																															
		Point 1				Point 2		2A		2B		Point 3		Point 4		Point 5		Point 6		Point 7		Point 8		Entrée STEU				Entrée Ozonation				Sortie Ozonation			Sortie STEU								
Date	Type de prélèvement	mars-15	mars-15	sept-15	nov-15	nov-15	nov-15	nov-15	nov-15	nov-15	mars-15	sept-15	nov-15	mars-15	nov-15	mars-15	sept-15	nov-15	mars-15	sept-15	mars-15	sept-15	mars-15	sept-15	nov-15	nov-15	mars-15	juil-15	sept-15	nov-15	nov-15	mars-15	juil-15	sept-15	mars-15	juil-15	sept-15	nov-15	nov-15				
		P	M-24h	M-24h	M-24h	P	P	P	P	P	P	A-24h	A-24h	P	M-24h	P	M-24h	M-24h	P	P	M-3h	A-24h	A-24h	A-24h	A-24h	M-3h	A-24h	A-24h	A-24h	A-24h	M-3h	A-24h	A-24h	M-3h	A-24h	A-24h	A-24h	A-24h	A-24h				
SOS (-S9)		Red	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Red	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow		
SOS (+S9)		Red	Red	Yellow	Yellow	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Yellow	Yellow	Red	Green	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	
Cytotox.		Red	Red	Red	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Yellow	Yellow	Red	Green	Red	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
Ecotox.		Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow
YES		Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
ER		Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
YAS		Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red
AR		Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
GR		Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
PXR		Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	
AhR		Green	Green	Blue							Green	Red	Yellow		Green		Green	Blue			Green	Blue				Green	Blue						Green	Blue									
PR		Green	Green	Blue							Green	Yellow	Blue		Green		Green	Blue			Green	Blue				Green	Blue						Green	Blue									
anti-PR		Yellow	Yellow	Yellow							Yellow	Blue			Yellow		Yellow	Blue			Yellow	Blue				Yellow	Blue						Yellow	Blue									
MR		Blue	Blue	Blue							Blue	Blue			Blue		Blue	Blue			Blue	Blue				Blue	Blue						Blue	Blue									
Anti-MR		Yellow	Yellow	Red							Blue	Red			Yellow		Red	Red			Yellow	Blue				Yellow	Blue						Yellow	Blue									

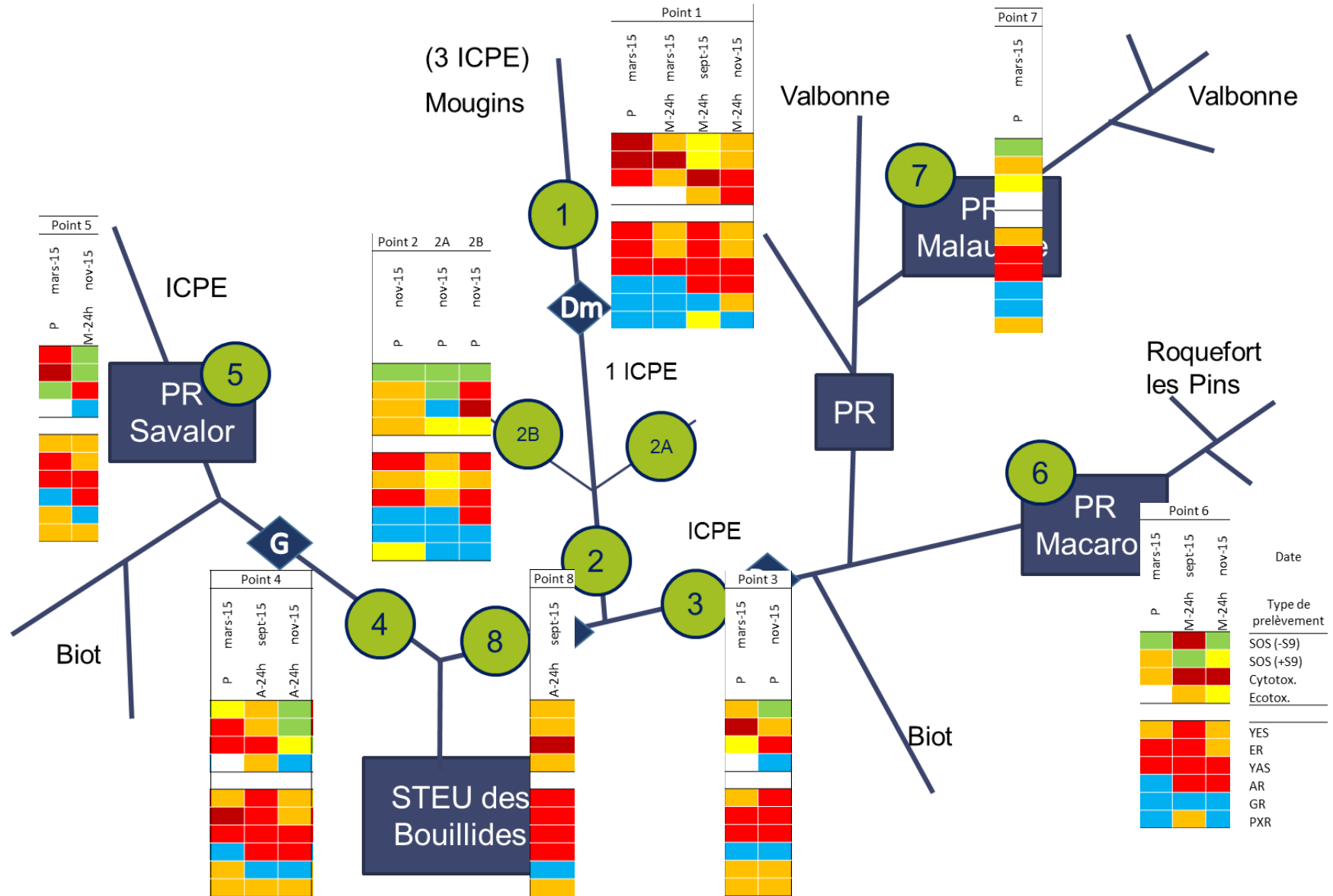


Figure 26. Cartographie des profils de toxicité dans le réseau de collecte des eaux usées de Sophia Antipolis

5.4 Sélection des points de prélèvement pour la mise en œuvre de la démarche EDA

La tâche 2 du projet MICROPOLIS Indicateurs a donc permis de donner les éléments nécessaires à l'application de la démarche EDA (Effect-Directed Analysis), qui constitue la tâche 3 du projet.

L'objectif de l'application de la démarche EDA au territoire de Sophia Antipolis est d'arriver à identifier les composés chimiques organiques les plus problématiques de par leur(s) toxicité(s) (activité PE, génotoxicité...) et de par leur(s) possible(s) résistance(s) aux différentes étapes de traitement de la STEU des Bouillides.

Cette caractérisation de la toxicité des eaux usées brutes (en différents points du réseau) et des effluents de la STEU a permis de sélectionner 4 échantillons sur lesquels la démarche EDA sera appliquée (Tableau 14). Il s'agit des points de prélèvement 1 et 3, localisés sur les branches Dm et Dv du réseau de collecte, ainsi que l'effluent brut et l'effluent traité, prélevés en entrée et en sortie de STEU. L'étude du rejet de la STEU doit permettre de définir si les composés, identifiés comme les plus toxiques, sont éliminés de la phase aqueuse par la STEU (avec un possible transfert vers les boues) ou s'ils présentent un caractère réfractaire aux traitements existants, nécessitant une action de réduction à la source afin d'éviter leur rejet dans le milieu récepteur, la Bouillide.

Tableau 14. Sélection des échantillons pour la mise en œuvre de la démarche EDA

Points de prélèvement	Activités PE	Génotoxicité	Cytotoxicité	Ecotoxicité
Point 1	Faible activité GR	SIF > 3 (avec et sans activation)	DL50 < 50%	Toxicité maximum observée (10 equitox/m ³)
Point 3	100% de fréquence de quantification de toutes les activités PE, dont GR et PXR (sauf AR)	SIF assez élevée. Point positionné sur la branche D (Dv) présentant une des toxicités les plus fortes.	DL50 < 90%	Toxicité relativement élevée (au-dessus du seuil de 1,3 equitox/m ³)
Entrée STEU	Toutes les activités recherchées (sauf une) sont quantifiées dans 100% des échantillons. Valeurs élevées pour ER, GR (et PXR).	Génotoxicité supérieure au seuil de référence (SIF > 1,5) avec et sans activation	Cytotoxicité élevée, DL50 _{max} < 60%	Toxicité supérieure au seuil de référence
Sortie STEU	Plusieurs activités quantifiées (ER, GR, PXR, PR) dont une au-dessus du seuil de référence : PXR.	Toxicité faible (supérieure au SIF de référence pour une analyse sur 10)	Pas de DL50, Viabilité > 90% à la concentration de 100%	Pas de toxicité

6 LA CARACTERISATION DES EAUX USEES PAR UNE DEMARCHE BIO-ANALYTIQUE ET SES LIMITES

La tâche 2A du projet MICROPOLIS Indicateurs a permis de caractériser la toxicité des eaux usées du territoire de Sophia-Antipolis, depuis le réseau de collecte des eaux usées jusqu'à la sortie de la station de traitement des Bouillides.

La démarche bio-analytique pour la recherche de sources de micropolluants :

Cette étude a confirmé l'intérêt de l'utilisation d'une **batterie d'analyses biologiques**, couvrant différents types de toxicité pour la recherche de sources de micropolluants problématiques dans le réseau de collecte des eaux usées.

La réalisation de profils de toxicité a permis d'une part de caractériser les eaux usées brutes prélevées dans les réseaux de collecte (cartographie, identification de « hotspots ») et d'autre part de suivre l'évolution de ces activités au fil des étapes de traitement des eaux usées (identification de toxicités/micropolluants persistants). Cela a permis de sélectionner des points de prélèvement clés pour la recherche, via la démarche EDA, des micropolluants responsables de ces toxicités et, le cas échéant de leur source. Cette démarche a été appliquée sur la fraction dissoute des eaux usées.

Certains bioessais comme les tests de toxicité aiguë (test daphnies) et de cytotoxicité sont toutefois plus pertinents pour le premier objectif (cartographie, application aux eaux usées brutes) alors que les bioessais *in vitro* d'activités perturbateurs endocriniens et génotoxique sont applicables et pertinents pour les deux objectifs mentionnés (cartographie et identification de d'activité persistante/résiduelle).

Dans la batterie de bioessais utilisée dans cette étude, les activités oestrogéniques et androgéniques étaient couvertes par deux bioessais sur levure et culture cellulaire.

Pour l'activité œstrogénique, les bioessais YES et MELN apparaissent comme redondants. Il est donc conseiller de n'utiliser qu'un seul de ces deux bioessais pour couvrir ce mode d'action. A l'inverse, ceci n'est pas aussi évident pour les bioessais YAS et MDA-kb2 visant l'activité androgénique. Tandis que le bioessai YAS permet la quantification sélective de l'activité androgénique, les réponses du bioessai sur culture cellulaire MDA-kb2 sont plus difficiles à interpréter du fait que cette souche possède à la fois des récepteurs pour les activités androgénique et glucocorticoïde. Ces différentes activités sont pertinentes à suivre mais de préférence avec bioessais mono-récepteurs afin de simplifier leur utilisation.

La démarche bio-analytique pour l'évaluation de l'impact potentiel sur le milieu récepteur des eaux usées traitées et des performances des procédés de traitement des micropolluants :

La caractérisation des eaux usées a permis de confirmer le rôle des différentes étapes de traitement de la STEU pour la réduction de la toxicité des effluents. Ceci a été particulièrement mis en évidence pour l'étape d'ozonation tertiaire (ciblant spécifiquement les micropolluants) qui permet de réduire les activités/toxicités résiduelles et/ou réfractaires aux traitements physico-chimiques et biologiques des filières conventionnelles des STEU.

Elle a aussi permis d'identifier des toxicités potentiellement problématiques car toujours présentes en sortie de STEU. Pour cela, nous disposons, pour l'activité œstrogénique, d'un large nombre de résultats d'analyses d'eaux usées (brutes ou traitées) référencés dans la littérature scientifique ainsi que d'une proposition de valeur guide environnementale (*trigger value*) faisant l'objet d'un consensus parmi les experts du domaine. Par conséquent, il est fortement recommandé de suivre cette activité dans les eaux usées traitées autant pour évaluer l'impact potentiel de l'effluent rejeté que pour évaluer la pertinence et la performance d'un traitement complémentaire pour la réduction de cette activité.

Pour les autres activités « perturbateurs endocriniens » ou génotoxique, une des limites rencontrées lors de cette étude est le fait qu'il n'existe pas, pour la plupart des bioessais testés, de valeurs seuils faisant consensus permettant de caractériser l'impact potentiel des eaux usées traitées sur le milieu récepteur et la santé humaine. Des travaux de recherche sont en cours sur ce sujet, en particulier pour les activités « perturbateurs endocriniens ».

7 REFERENCES

- Aït-Aïssa, S., 2009. Outils bio-analytiques in vitro : principe et apports pour la surveillance des contaminants organiques dans le milieu aquatique, INERIS. Verneuil-en-Halatte.
- Baig, S., Daunay, A., Caligaris, M., Penru, Y., Krier, J., Lebosse, X., Rousselot, O., Gislette, P., Rocher, V., 2015. Traitement des polluants émergents dans les rejets de STEP: étude du procédé d'ozonation catalytique TOCCATA®, in: ASTEE 2015. Montauban (France).
- Bellet, V., Hernandez-Raquet, G., Dagnino, S., Seree, L., Pardon, P., Bancon-Montiny, C., Fenet, H., Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Cavailles, V., Budzinski, H., Antignac, J.-P., Balaguer, P., 2012. Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Res.* 46, 1912–1922. doi:10.1016/j.watres.2012.01.013
- Besnault, S., Martin-Ruel, S., Baig, S., Heiniger, B., Esperanza, M., Budzinski, H., Miège, C., Le Menach, K., Dherret, L., Roussel-Galle, A., Coquery, M., 2015. Évaluation technique, économique et environnementale de procédés de traitement complémentaire avancés pour l'élimination des micropolluants. *Tech. Sci. Méthodes* 67–83. doi:10.1051/tsm/201503067
- Brack, W., Dulio, V., Ågerstrand, M., Allan, I., Altenburger, R., Brinkmann, M., Bunke, D., Burgess, R.M., Cousins, I., Escher, B.I., Hernández, F.J., Hewitt, L.M., Hilscherová, K., Hollender, J., Hollert, H., Kase, R., Klauer, B., Lindim, C., Herráez, D.L., Miège, C., Munthe, J., O'Toole, S., Posthuma, L., Rüdell, H., Schäfer, R.B., Sengl, M., Smedes, F., van de Meent, D., van den Brink, P.J., van Gils, J., van Wezel, A.P., Vethaak, A.D., Vermeirssen, E., von der Ohe, P.C., Vrana, B., 2017. Towards the review of the European Union Water Framework Directive: Recommendations for more efficient assessment and management of chemical contamination in European surface water resources. *Sci. Total Environ.* doi:10.1016/j.scitotenv.2016.10.104
- Brand, W., de Jongh, C.M., van der Linden, S.C., Mennes, W., Puijker, L.M., van Leeuwen, C.J., van Wezel, A.P., Schriks, M., Heringa, M.B., 2013. Trigger values for investigation of hormonal activity in drinking water and its sources using CALUX bioassays. *Environ. Int.* 55, 109–118. doi:10.1016/j.envint.2013.02.003
- Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y., 2004. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci. Total Environ.* 324, 55–66. doi:10.1016/j.scitotenv.2003.10.035
- Choubert, J.-M., Martin-Ruel, S., Budzinski, H., Miège, C., Esperanza, M., Soulier, C., Lagarrigue, C., Coquery, M., 2011. Évaluer les rendements des stations d'épuration. *Tech. Sci. Méthodes* 44–62. doi:10.1051/tsm/201101044
- Choubert, J.-M., Penru, Y., Mathon, B., Guillon, A., Esperanza, M., Crétollier, C., Dherret, L., Daval, A., Masson, M., Lagarrigue, C., Miège, C., Coquery, M., 2017. Elimination de substances prioritaires et émergentes des eaux résiduaires urbaines par ozonation : évaluation technique, énergétique et environnementale. Rapport final du projet Micropolis-Procédés.
- Creusot, N., 2011. Contribution de l'approche effect directed analysis à l'identification de perturbateurs endocriniens dans les milieux aquatiques. Université de Bordeaux 1.
- Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, J.-M., Budzinski, H., 2014. Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3649–3657. doi:10.1021/es405313r
- Creusot, N., Kinani, S., Balaguer, P., Tapie, N., LeMenach, K., Maillot-Maréchal, E., Porcher, J.-M., Budzinski, H., Aït-Aïssa, S., 2010. Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 396, 569–583. doi:10.1007/s00216-009-3310-y

- Escher, B.I., Neale, P.A., Leusch, F.D.L., 2015. Effect-based trigger values for invitro bioassays: Reading across from existing water quality guideline values. *Water Res.* doi:10.1016/j.watres.2015.05.049
- Gonzalez Ospina, A., Domenjoud, B., Vulliet, E., Kiss, A., Bergé, A., Bony, S., Devaux, A., Wigh, A., Aït-Aïssa, S., Baig, S., 2016. Élimination des composés pharmaceutiques en station d'épuration par traitements biologiques et ozonation tertiaire. *Tech. Sci. Méthodes* 45–58. doi:10.1051/tsm/201606045
- Jálová, V., Jarošová, B., Bláha, L., Giesy, J.P., Ocelka, T., Grabic, R., Jurčíková, J., Vrana, B., Hilscherová, K., 2013. Estrogen-, androgen- and aryl hydrocarbon receptor mediated activities in passive and composite samples from municipal waste and surface waters. *Environ. Int.* 59, 372–383. doi:10.1016/j.envint.2013.06.024
- Jarošová, B., Bláha, L., Giesy, J.P., Hilscherová, K., 2014. What level of estrogenic activity determined by in vitro assays in municipal waste waters can be considered as safe? *Environ. Int.* doi:10.1016/j.envint.2013.12.009
- Jolibois, B., Guerbet, M., 2006. Simplified protocol for evaluating the genotoxic risk of hospital wastewater. *Environ. Toxicol.* 21, 141–146. doi:10.1002/tox.20166
- Kelder, J., Azevedo, R., Pang, Y., de Vlieg, J., Dong, J., Thomas, P., 2010. Comparison between steroid binding to membrane progesterone receptor α (mPR α) and to nuclear progesterone receptor: Correlation with physicochemical properties assessed by comparative molecular field analysis and identification of mPR α -specific agonists. *Steroids* 75, 314–322. doi:10.1016/j.steroids.2010.01.010
- Körner, W., Bolz, U., Süßmuth, W., Hiller, G., Schuller, W., Hanf, V., Hagenmaier, H., 2000. Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* 40, 1131–1142. doi:10.1016/S0045-6535(99)00362-8
- Kunz, P.Y., Kienle, C., Carere, M., Homazava, N., Kase, R., 2015. In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 106, 107–115. doi:10.1016/j.jpba.2014.11.018
- Leusch, F., Chapman, H., Körner, W., Gooneratne, S.R., Tremblay, L.A., 2005. Efficacy of an Advanced Sewage Treatment Plant in Southeast Queensland, Australia, to Remove Estrogenic Chemicals. *Environ. Sci. Technol.* doi:10.1021/ES0484303
- Leusch, F.D.L., de Jager, C., Levi, Y., Lim, R., Puijker, L., Sacher, F., Tremblay, L.A., Wilson, V.S., Chapman, H.F., 2010. Comparison of Five in Vitro Bioassays to Measure Estrogenic Activity in Environmental Waters. *Environ. Sci. Technol.* 44, 3853–3860. doi:10.1021/es903899d
- Leusch, F.D.L., Neale, P.A., Hebert, A., Scheurer, M., Schriks, M.C.M., 2017. Analysis of the sensitivity of in vitro bioassays for androgenic, progestagenic, glucocorticoid, thyroid and estrogenic activity: Suitability for drinking and environmental waters. *Environ. Int.* 99, 120–130. doi:10.1016/j.envint.2016.12.014
- Malaj, E., von der Ohe, P.C., Grote, M., Kühne, R., Mondy, C.P., Usseglio-Polatera, P., Brack, W., Schäfer, R.B., 2014. Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 9549–9554. doi:10.1073/pnas.1321082111
- Margot, J., Kienle, C., Magnet, A., Weil, M., Rossi, L., de Alencastro, L.F., Abegglen, C., Thonney, D., Chèvre, N., Schäfer, M., Barry, D.A., 2013. Treatment of micropollutants in municipal wastewater: Ozone or powdered activated carbon? *Sci. Total Environ.* 461, 480–498. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.05.034
- Mersch-Sundermann, V., Mochayed, S., Kevekordes, S., 1992. Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in escherichia coli PQ37. *Mutat. Res. Toxicol.* 278, 1–9. doi:10.1016/0165-1218(92)90279-9

- Mnif, W., Dagnino, S., Escande, A., Pillon, A., Fenet, H., Gomez, E., Casellas, C., Duchesne, M.-J., Hernandez-Raquet, G., Cavaillès, V., Balaguer, P., Bartegi, A., 2010. Biological Analysis of Endocrine-Disrupting Compounds in Tunisian Sewage Treatment Plants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 59, 1–12. doi:10.1007/s00244-009-9438-0
- Mnif, W., Pascussi, J.-M., Pillon, A., Escande, A., Bartegi, A., Nicolas, J.-C., Cavaillès, V., Duchesne, M.-J., Balaguer, P., 2007. Estrogens and antiestrogens activate hPXR. *Toxicol. Lett.* 170, 19–29. doi:10.1016/j.toxlet.2006.11.016
- Murk, A.J., Legler, J., van Lipzig, M.M.H., Meerman, J.H.N., Belfroid, A.C., Spenkelink, A., van der Burg, B., Rijs, G.B.J., Vethaak, D., 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 16–23. doi:10.1002/etc.5620210103
- Onda, K., Yang, S.-Y., Miya, A., Tanaka, T., 2002. Evaluation of estrogen-like activity on sewage treatment processes using recombinant yeast. *Water Sci. Technol.* 46.
- Quillardet, P., Hofnung, M., 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 147, 65–78. doi:10.1016/0165-1161(85)90020-2
- Stalter, D., Magdeburg, A., Wagner, M., Oehlmann, J., 2011. Ozonation and activated carbon treatment of sewage effluents: Removal of endocrine activity and cytotoxicity. *Water Res.* 45, 1015–1024. doi:10.1016/j.watres.2010.10.008
- Svenson, A., Allard, A.-S., 2004. Occurrence and some properties of the androgenic activity in municipal sewage effluents. *J. Environ. Sci. Health. A. Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 39, 693–701.
- Svenson, A., Allard, A.-S., Ek, M., 2003. Removal of estrogenicity in Swedish municipal sewage treatment plants. *Water Res.* 37, 4433–4443. doi:10.1016/S0043-1354(03)00395-6
- Tan, B.L.L., Hawker, D.W., Müller, J.F., Leusch, F.D.L., Tremblay, L.A., Chapman, H.F., 2007. Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia. *Environ. Int.* 33, 654–669. doi:10.1016/j.envint.2007.01.008
- van der Linden, S.C., Heringa, M.B., Man, H.-Y., Sonneveld, E., Puijker, L.M., Brouwer, A., van der Burg, B., 2008. Detection of Multiple Hormonal Activities in Wastewater Effluents and Surface Water, Using a Panel of Steroid Receptor CALUX Bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 42, 5814–5820. doi:10.1021/es702897y
- van der Oost, R., Sileno, G., Suárez Muñoz, M., 2016. Ecological key factor toxicity. Background document on effect-based trigger values for environmental water quality. Amersfoort.
- Wilson, V.S., Bobseine, K., Lambright, C.R., Gray, L.E., 2002. A novel cell line, MDA-kb2, that stably expresses an androgen- and glucocorticoid-responsive reporter for the detection of hormone receptor agonists and antagonists. *Toxicol. Sci.* 66, 69–81.

8 ANNEXE

8.1 Annexe 1

Tableau 15. Synthèse bibliographique des résultats de bioessais évaluant l'activité agoniste œstrogéniques

Effluent	Bioessais	Résultats	Pays	Références	
Eaux usées urbaines	Lignée cellulaire	ER-CALUX	1,1 - 120 ng E2-eq/L	Pays-Bas	Murk et al. (2002)
			0,4 - 1,0 ng E2-eq/ L	Pays-Bas	van der Linden et al. (2008)
		E-screen	51 - 70 ng E2-eq/L	Allemagne	Körner et al. (2000)
			17 - 23 ng E2-eq/L	Australie	Leusch et al. (2005)
			108 - 356 ng E2-eq/L	Australie	Tan et al. (2007)
		MELN	46 – 63 ng E2-eq/L	France	Cargouët et al. (2004)
	MLVN	5,4 – 124 ng E2-eq/L	République Tchèque	Jálová et al. (2013)	
	Levure	YES	37 – 100 ng E2-eq/ L	Suisse & Allemagne	Margot et al. (2013)
			35 – 72 ng E2-eq/ L	Japon	Onda et al. (2002)
			10 -18 ng E2-eq/ L	Suisse	Stalter et al. (2011)
18 – 25 ng E2-eq/ L			Allemagne	Stalter et al. (2011)	
1 – 30 ng E2-eq/ L			Suède	Svenson et al. (2003)	
Effluent secondaire	Lignée cellulaire	ER-CALUX	0,03 - 16 ng E2-eq/L	Pays-Bas	Murk et al. (2002)
			6 ng E2-eq/L	Allemagne	Körner et al. (2000)
		E-screen	< 0,75 ng E2-eq/L	Australie	Leusch et al. (2005)
			< 1 - 67,8 ng E2-eq/L	Australie	Tan et al. (2007)
		MELN	2 – 24 ng E2-eq/L	France	Cargouët et al. (2004)
	0,1 – 1 ng E2-eq/ L		France	Projet Echibioteb	
	Levure	YES	0,1 – 5,1 ng E2-eq/L	République Tchèque	Jálová et al. (2013)
			0,7 – 8,3 ng E2-eq/ L	Suisse & Allemagne	Margot et al. (2013)
			1,8 – 3,5 ng E2-eq/ L (moy: 2,8)	Suisse	Stalter et al. (2011)
			1,1 – 4,5 ng E2-eq/ L (moy: 2,0)	Allemagne	Stalter et al. (2011)
			4 - 25 ng E2-eq/ L	Japon	Onda et al. (2002)
			< 0,1 – 15 ng E2-eq/ L	Suède	Svenson et al. (2003)
			<0,02 – 98 ng E2-eq/ L	global review	Leusch et al. (2017)
	Effluent tertiaire	Levure	YES	< 0,1 - 1 ng E2-eq/L	Suisse & Allemagne
0,1 – 1,4ng E2-eq/ L				Suisse & Allemagne	Margot et al. (2013)
Eaux de surface	Lignée cellulaire	ER-CALUX	0,07 - 0,5 ng E2-eq/L	Pays-Bas	Murk et al. (2002)
			0,2 - 0,5 ng E2-eq/ L	Pays-Bas	van der Linden et al. (2008)
	Levure	YES	<0,006 - 5 ng E2-eq/L	Suède	Svenson et al. (2003)

Tableau 16. Synthèse bibliographique des résultats de bioessais évaluant l'activité agoniste androgénique

Effluent		Bioessais	Résultats	Pays	Références
Eaux usées urbaines	Lignée cellulaire	MDA-kb2	< 23 – 193 ng T-eq/ L	République Tchèque	Jálová et al. (2013)
	Levure	YAS	201 ng T-eq/L	Suisse	Stalter et al. (2011)
			300 – 650 ng T-eq/L (moy: 350)	Allemagne	
			30 - 75 ng AEQ/L	Suède	Svenson & Allard (2004)
Effluent secondaire	Lignée cellulaire	MDA-kb2	<LoQ (1-4 ng T-eq/ L)	République Tchèque	Jálová et al. (2013)
	Levure	YAS	2,0 ng T-eq/ L	Suisse	Stalter et al. (2011)
			< 0,1 – 5 ng T-eq/ L (moy: 2)	Allemagne	
			0,8 - 3 ng AEQ/L	Suède	Svenson & Allard (2004)
Effluent tertiaire	Levure	YAS	5,2 - 7 ng T-eq/ L	Suisse	Stalter et al. (2011)
			< 0,1 – 3 ng T-eq/ L	Allemagne	
Eaux usées hospitalières	Lignée cellulaire	AR-CALUX	86 ± 2 ng DHT-eq/ L	Pays-Bas	van der Linden et al. (2008)

8.2 Annexe 2

Tableau 17. Revue bibliographique de valeurs seuils

Activité ciblée		Valeurs seuils proposées	Unité	Composé de référence	Bioessai	Cible du seuil	Références
Œstrogène	agoniste	0,2 - 0,4	ng E2-eq/L	17b-estradiol	YES	Écosystèmes aquatiques	Jarošová et al. (2014)
		0,2 - 0,3	ng E2-eq/L	17b-estradiol	MELN	Écosystèmes aquatiques	Jarošová et al. (2014)
		0,6 - 2	ng E2-eq/L	17b-estradiol	MELN	Écosystèmes aquatiques	Jarošová et al. (2014)
		0,4	ng E2-eq/L	17b-estradiol	NQE (chimique)	Écosystèmes aquatiques	Kunz et al. (2015)
		0,5	ng E2-eq/L	17b-estradiol	ER CALUX	Écosystèmes aquatiques	van der Oost et al. (2016)
		0,1 - 0,3	ng E2-eq/L	17b-estradiol	E-SCREEN	Écosystèmes aquatiques	Escher et al. (2015)
		12	ng E2-eq/L	17b-estradiol	YES	Écosystèmes aquatiques	Escher et al. (2015)
		3,8	ng E2-eq/L	17b-estradiol	ER CALUX	Santé humaine	Brand et al. (2013)
		0,9	ng E2-eq/L	17b-estradiol	E-SCREEN	Santé humaine	Escher et al. (2015)
Androgène	agoniste	11	ng DHT-eq/L	Dihydrotestosterone	AR CALUX	Santé humaine	Brand et al. (2013)
		14	ng TT-eq/L	Testosterone	AR-GeneBLAzer	Santé humaine	Escher et al. (2015)
	antagoniste	25	µg F1-eq/L	Flutamide	AR CALUX	Écosystèmes aquatiques	van der Oost et al. (2016)
Glucocorticoïde	agoniste	100	ng Dex-eq/L	Dexamethasone	GR CALUX	Écosystèmes aquatiques	van der Oost et al. (2016)
		21	ng Dex-eq/L	Dexamethasone	GR CALUX	Santé humaine	Brand et al. (2013)
		150	ng Dex-eq/L	Dexamethasone	GR CALUX	Santé humaine	Escher et al. (2015)
Progestagène	agoniste	333	ng Org2058-eq/L	16α-ethyl-21-hydroxy-19-norprogesterone	PR CALUX	Santé humaine	Brand et al. (2013)
Prégnane et xénobiotiques	agoniste	3	µg N1-eq/L	Nicardipine	PXR CALUX	Écosystèmes aquatiques	van der Oost et al. (2016)
HAP-like	agoniste	150	ng B[a]P-eq/L	Benzo[a]pyrène	PHA CALUX	Écosystèmes aquatiques	van der Oost et al. (2016)
Dioxine-like	agoniste	50	pg T-eq/L	2,3,7,8-TCDD	DR CALUX	Écosystèmes aquatiques	van der Oost et al. (2016)

8.3 Annexe 3 – Liste des figures et des tableaux

8.3.1 Liste des Figures

Figure 1. Localisation des points de prélèvements (numéros) sur le réseau de collecte des eaux usées sur le territoire du Syndicat des Bouillides (PRel : poste de relevage ; ICPE : Installation Classée Pour l'Environnement).....	10
Figure 2. Représentation schématique de la filière de traitement des eaux de la station de Sophia Antipolis « Les Bouillides »	11
Figure 3: Représentation schématique du traitement complémentaire par ozonation de la STEU des Bouillides.....	12
Figure 4. (a) Principe des bioessais in vitro utilisés pour la bio-détection des activités PE et HAP-like dans le projet MICROPOLIS et (b) exemple de courbes dose-réponses obtenues.....	17
Figure 5. Principe du SOS Chromotest	21
Figure 6. Grille de cotation pour le SOS Chromotest sans S9 (à gauche) et avec S9 (à droite).....	22
Figure 7. Fréquence de quantification (f) des principales activités PE (YES, ER, YAS, AR, GR, PR, PXR) dans les échantillons prélevés en différents points du réseau (n > 1).....	25
Figure 8. Activité œstrogénique agoniste (YES) pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (□).	26
Figure 9. Activité œstrogénique agoniste (ER, culture cellulaire MELN) pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (□).	26
Figure 10. Activité androgénique agoniste (YAS) pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (□).	27
Figure 11. Activité androgénique agoniste (AR, souche MDA-kb2) pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (□).	28
Figure 12. Activité glucocorticoïde agoniste (GR, lignée MDA-kb2) pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (□).	29
Figure 13. Activité PXR agoniste pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (□).	30

Figure 14. Activité progestagène agoniste (PR, en haut) et antagoniste (anti-PR, en bas) pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir) et septembre (marron). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (\square).	31
Figure 15. Activité minéralo-corticoïde antagoniste (anti-MR) pour l'ensemble des points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir) et septembre (marron). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (\square).	32
Figure 16. Résultats SOS Chromotest (SIF) pour les différents points de prélèvement du réseau de collecte des eaux usées (sans activation S9, REF = 5X). Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (\square).	34
Figure 17. Résultats SOS Chromotest (SIF) pour les différents points de prélèvement du réseau de collecte des eaux usées (sans activation S9, REF = 5X). Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (\square).	34
Figure 18. DL50 (% , taux de concentration de l'échantillon) pour les différents points de prélèvement du réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (\square).	35
Figure 19. Taux de viabilité à une concentration de l'échantillon de 100% (non dilué) pour les différents points de prélèvement du réseau de collecte des eaux usées. Campagne de mars (noir), septembre (marron), novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (\square).	36
Figure 20. Toxicité aiguë mesurée par le test « Daphnie » (equitox/m ³) en différents points de prélèvement du réseau de collecte des eaux usées. Campagne de septembre (marron) et novembre (bleu). Prélèvement ponctuel (Δ), moyen 24h (O) avec asservissement au débit (\square).	36
Figure 21. SOS Chromotest en différents points de la STEU, sans activation S9, REF = 5X.	46
Figure 22. SOS Chromotest en différents points de la STEU, avec activation S9, REF = 5x.	46
Figure 23. Taux de viabilité des cellules de truite pour les différents échantillons prélevés sur la STEU (en condition non diluée)	47
Figure 24. Toxicité aiguë mesurée par le test « Daphnie » (equitox/m ³) en différents points de la STEU	48
Figure 25. Code couleur pour le SOS Chromotest sans S9 (à gauche) et avec S9 (à droite)	51
Figure 26. Cartographie des profils de toxicité dans le réseau de collecte des eaux usées de Sophia Antipolis.....	54

8.3.2 Liste des Tableaux

Tableau 1. Points de prélèvement dans le réseau de collecte des eaux usées par campagnes et mode d'échantillonnage.....	13
Tableau 2. Points de prélèvement sur la STEU par campagnes et mode d'échantillonnage	13
Tableau 3. Récapitulatif des bioessais appliqués pour la caractérisation des eaux usées (tâche 2A du projet MICROPOLIS Indicateurs).....	15
Tableau 4. Volume d'échantillon filtré par type d'échantillon et point de prélèvement	16
Tableau 5. Synthèse des bioessais YES et YAS.....	18
Tableau 6 : Bioessais <i>in vitro</i> sur cultures cellulaires pour la détection de contaminants ligands de récepteurs nucléaires et de xénobiotiques.....	19
Tableau 7. Valeurs seuils sélectionnées pour différentes activités « PE » du projet MICROPOLIS Indicateurs.....	20
Tableau 8. Fréquence et résultats (médiane, minimum et maximum) de quantification pour les bioessais <i>in vitro</i> PE, et évolution entrée STEU / effluent secondaire.....	39
Tableau 9. Catégories de rendement d'élimination des activités « perturbateurs endocriniens » après ozonation seule et après traitement complémentaire (ozonation + biofiltration DN). Catégories de rendement : ● < 30%, ● 30 à 70%, ● 70 à 90% et ● > 90%.....	43
Tableau 10. Résultats des bioessais activités "perturbateurs endocriniens" pour l'effluent en sortie de STEU.	43
Tableau 11. Valeurs utilisées pour le code couleur des bioessais PE	51
Tableau 12. Grille de notation pour les bioessais de toxicité aigüe « Daphnie » et de cytotoxicité.....	52
Tableau 13. Profils de toxicité pour l'ensemble des échantillons prélevés des en différents points du réseau de collecte des eaux usées et de la STEU des Bouillides.....	53
Tableau 14. Sélection des échantillons pour la mise en œuvre de la démarche EDA	55
Tableau 15. Synthèse bibliographique des résultats de bioessais évaluant l'activité agoniste œstrogéniques	62
Tableau 16. Synthèse bibliographique des résultats de bioessais évaluant l'activité agoniste androgénique	63
Tableau 17. Revue bibliographique de valeurs seuils	64