

Appel à Projet « Innovation et changements de pratiques : micropolluants des eaux urbaines »  
avec le soutien de :

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



# REGARD

*REducation et Gestion des micropolluants sur la métropole borDelaise*

LOT 1 - CARACTERISATION DES SUBSTANCES ET DES IMPACTS  
TACHE 1.3 - RECHERCHE DES SUBSTANCES ET CARACTERISATION DE L'IMPACT

SOUS TACHE 1.3.3 EVALUATION DES IMPACTS ET DES EFFETS

**Détection de composés perturbateurs endocriniens et dioxin-like à l'aide de bioessais *in vitro*  
dans les eaux usées, pluviales et naturelles**

Pas de numéro associé car livrable initialement non prévu

Version finale - Décembre 2017

Auteurs : S. Aït-Aïssa, E. Maillot-Maréchal, N. Creusot, C. Gardia-Parège, H. Budzinski





## SYNTHÈSE OPÉRATIONNELLE

### Objectifs

Un grand nombre de micropolluants organiques exercent leur toxicité en se fixant à des récepteurs intracellulaires impliqués dans la régulation de processus physiologiques essentiels, comme le développement ou la reproduction. Un des objectifs du projet REGARD, présenté à travers cette synthèse, est de dresser un état des lieux sur la toxicité potentielle associée aux micropolluants organiques de type perturbateurs endocriniens (PE) et dioxin-like (DL) présents dans les eaux pluviales et usées, depuis le réseau de collecte jusqu'à la sortie de la STEU et dans le milieu récepteur. Pour cela, l'approche qui est proposée ici se base sur une batterie de bioessais *in vitro* complémentaires permettant la détection spécifique de composés PE (œstrogéniques, androgéniques, glucocorticoïdes) et DL (incluant HAP-like et dioxin-like). L'application de ces bioessais aux échantillons d'eaux collectés dans le projet REGARD est réalisée dans une démarche de criblage et vise avant tout à dresser un premier constat sur le type, les niveaux et les sources potentielles de micropolluants biologiquement actifs au sein du réseau d'eaux usées et pluviales.

### Méthodologie

Les échantillons d'eaux brutes sont conservés à -20°C avant d'être analysés. Après décongélation, ils subissent une étape de prétraitement consistant en une filtration à 0,7µm suivie d'une extraction sur phase solide (SPE, phase HLB™), avant d'être soumis à une analyse dose-réponse lors des bioessais.

Dans leur principe, les bioessais utilisés sont basés sur l'utilisation de cultures cellulaires exprimant un gène rapporteur facilement détectable en luminescence ou fluorescence (e.g. luciférase) dont l'activation est couplée à des récepteurs spécifiques tels que les récepteurs des hormones ou de la dioxine. La présence de molécules capables d'activer ces récepteurs va induire la luminescence des cellules dont l'intensité de réponse est directement proportionnelle à la concentration en substance(s) active(s). Après modélisation, la concentration d'échantillon générant 20 % d'effet (EC20) relativement à la molécule de référence est calculée. Le ratio entre l'EC20 de la molécule de référence du bioessai (en g/L) et l'EC20 de l'échantillon (en facteur de concentration) permet de dériver une quantité d'équivalent-hormone (e.g. équivalent-estradiol) ou d'équivalent-toxique (e.g. équivalent-dioxine) présent dans l'échantillon (Bio-TEQ). La liste des bioessais utilisés est présentée dans le tableau 1. Un contrôle qualité des données est réalisé par analyse de témoins positifs et négatifs.

**Tableau 1 : Bioessais *in vitro* pour l'évaluation des activités de type perturbateur endocrinien et dioxin-like.**

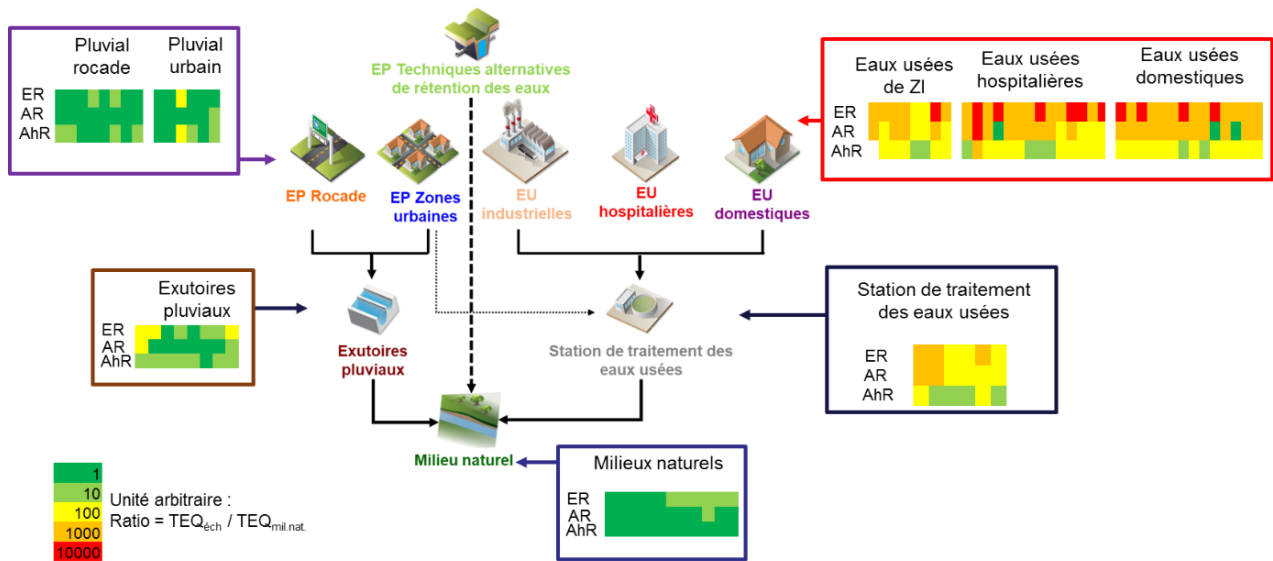
Nom du bioessai	Activité	Principe/mode d'action	Unité en quantité d'équivalents-toxique relatifs à la substance de référence de chaque test
MELN	Oestrogénique	Récepteur des estrogènes (ER) humain / luciférase	Equivalents-estradiol (E2-Eq ng/L)
MDA-kb2*	Androgénique et glucocorticoïdique	Récepteurs des androgènes (AR) et des glucocorticoïdes (GR) humain / luciférase	Equivalents-Dihydrotestostérone (DHT-Eq ng/L)
PLHC-1	Dioxin-like et HAP-like	Récepteur de la dioxine (AhR) / activité EROD après 4 h (HAP-like) ou 24 h (dioxin-like) d'exposition	Equivalents-Benz(a)Pyrène (BaP-Eq µg/L) ou équivalent-dioxine (TCDD-Eq ng/L)

\*Les cellules MDA-kb2 coexpriment les récepteurs des androgènes (AR) et des glucocorticoïdes (GR), une co-exposition avec la flutamide (anti-androgène de référence) permet de statuer sur l'implication de AR et/ou de GR dans le cas d'une réponse positive du bioessai à un échantillon

## Résultats

### 1 Profils globaux d'activités *in vitro*

La figure 1 présente une vue générale des résultats obtenus par les différents bioessais *in vitro* dans les réseaux d'eaux usées et pluviaux. Les données de Bio-TEQ sont exprimées en unités arbitraires relatives par rapport au site de référence (eau de la Jalle de Blanquefort en amont du rejet de la STEU). D'une manière générale, les profils d'activités montrent une graduation depuis le réseau d'eaux usées vers la STEU puis vers le milieu naturel.



**Figure 1. Synthèse des profils d'activités *in vitro* mesurés dans les eaux urbaines prélevées en 2015 et 2016. Les résultats sont présentés en unité relative par rapport au milieu naturel en amont de rejets urbains. ER=activité oestrogénique ; AR=activité androgénique ; AhR=activité HAP-like. Des activités liées aux glucocorticoïdes (GR) ont été ponctuellement détectées (sites hôpital et STEU) mais non représentées sur la figure.**

### 2 Evaluation des activités pour chaque source et milieu

Un focus sur les différentes sources étudiées peut permettre de mettre en évidence des différences d'activités en fonction des échantillons.

Ainsi, les eaux usées sont des sources majeures de xéno-hormones et de composés HAP-like. Si le site du CHU est une source importante de xéno-hormones, incluant des activités glucocorticoïdes non retrouvées en d'autres points du réseau, les autres sources (domestiques et ZI) contribuent également de manière significative. Toutefois, les activités hormonales et HAP-like sont pour majeure partie bien abattues dans les STEU, bien que des activités glucocorticoïdes apparaissent en sortie de traitement.

Les eaux pluviales sont vectrices d'activités HAP-like et ponctuellement de perturbateurs endocriniens. Toutefois, les niveaux mesurés restent sensiblement inférieurs à ceux mesurés dans les eaux usées précédemment présentées.

Enfin, si les niveaux mesurés restent faibles dans le milieu naturel, on observe un impact potentiel du rejet de la STEU en ce qui concerne l'activité oestrogénique.

## Conclusion

Le travail mené et présenté dans ce livrable a permis de dresser différents constats quant à la contamination des eaux usées et pluviales de l'agglomération bordelaise :

- Les sources majeures de composés œstrogéniques, androgéniques et *dioxin-like* sont les eaux usées. Ces composés sont en partie éliminés par les procédés de traitements des eaux usées.
- Les eaux pluviales sont faiblement chargées en composés œstrogéniques et androgéniques mais sont une source en composés *dioxin-like/HAP-like*.
- Les niveaux de composés œstrogéniques, androgéniques et *dioxin-like* sont faibles dans le milieu naturel. Toutefois, un impact de la STEU est noté pour l'activité œstrogénique, dont la concentration est au niveau du seuil actuellement préconisé pour les eaux de surface.
- En dépit des procédés de traitement des eaux usées, les rejets de STEU véhiculent des composés œstrogéniques vers le milieu naturel. La mise en place d'un traitement des eaux usées sur certains sites (ex: effluents hospitaliers) et de traitements tertiaires sur les STEU urbaines pourrait réduire l'émission de ces composés. Le changement des pratiques aiderait à diminuer la présence de certaines familles de composés œstrogéniques et *dioxin-like*

# Sommaire

<b>SYNTHÈSE OPÉRATIONNELLE .....</b>	<b>3</b>
<b>SOMMAIRE .....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>7</b>
<b>2. METHODOLOGIE.....</b>	<b>8</b>
2.1    ECHANTILLONNAGE ET TRAITEMENT DES ECHANTILLONS .....	8
2.2    BIOESSAIS IN VITRO : PRINCIPE ET DETERMINATION D'EQUIVALENTS-TOXIQUES BIOLOGIQUES (BIO-TEQ) .....	8
2.3    CONTROLE DE LA QUALITE DES DONNEES .....	10
<b>3. RESULTATS .....</b>	<b>11</b>
3.1    PROFILS GLOBAUX D'ACTIVITES IN VITRO .....	11
3.2.    EAUX USEES URBAINES.....	12
3.2.1 <i>Eaux usées du site hospitalier universitaire</i> .....	12
3.2.2 <i>Eaux usées domestiques</i> .....	13
3.2.3 <i>Eaux usées en zone industrielles</i> .....	14
3.2.4 <i>Devenir des activités dans les stations de traitements des eaux usées urbaines (STEU)</i> .....	15
3.3    EAUX PLUVIALES.....	16
3.4    MILIEU NATUREL .....	17
3.5    IDENTITE DES MICROPOLLUANTS RESPONSABLES DES ACTIVITES DETECTEES ? .....	18
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>20</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>21</b>

# Introduction

Un grand nombre de micropolluants organiques, appartenant à des classes chimiques très diverses (stéroïdes naturels et synthétiques, pesticides, pharmaceutiques, hydrocarbures, etc), exercent leur toxicité en se fixant à des récepteurs intracellulaires impliqués dans la régulation de processus physiologiques essentiels comme le développement ou la reproduction. C'est le cas de nombreux perturbateurs endocriniens (PE) qui sont capables de perturber la régulation du système endocrinien via leur liaison aux récepteurs des hormones stéroïdes telles que les œstrogènes (ER) et les androgènes (AR) ou des composés dits « dioxin-like » (DL) qui interfèrent avec le récepteur de la dioxine (ou récepteur des hydrocarbures aromatiques, AhR). Pour détecter la présence de tels composés au sein de matrices environnementales, l'utilisation de bioessais cellulaires *in vitro* exprimant ces récepteurs couplés à un gène rapporteur spécifique constituent des méthodes de choix en bio-analyse. Ils permettent de détecter de manière spécifique et sensible l'activité biologique globale d'un extrait environnemental en tenant compte de l'ensemble des substances actives et biodisponibles (i.e. réponse intégrative prenant en compte les effets de mélange). De plus, ils fournissent une mesure quantitative, à travers la détermination d'équivalent-toxique biologique (Bio-TEQ), tout en informant sur le mécanisme d'action des substances en présence (indicateur précoce de danger) (Aït-Aïssa et al 2009). La mesure de Bio-TEQ est directement comparable à la mesure d'équivalent-toxiques dérivés des analyses chimiques ciblées (Chem-TEQ), permettant d'évaluer, sur la base d'un modèle additif, la contribution de polluants cibles à l'activité biologique ou toxique globale au sein d'un mélange environnemental.

Leur application dans différents programmes de surveillance a été démontrée pour des eaux usées (sortie de STEU) et eaux de surfaces en France (Aït-Aïssa 2009, Aït-Aïssa et al. 2015) ou en Europe (Neale et al 2015, Tousova et al 2017). Des travaux antérieurs ont notamment montré leur utilité pour caractériser des eaux usées en sortie de STEU de la métropole bordelaise (Gardia Parege 2015). En revanche, leur utilisation pour tracer les contaminants au sein de réseaux d'eaux usées urbaines en amont des stations de traitement a été peu voire pas rapportée, même si quelques données existent sur les niveaux d'activité œstrogénique avant traitement en station d'épuration urbaine (STEU).

Un des objectifs du projet REGARD est de dresser un état des lieux sur la toxicité potentielle associée aux micropolluants organiques de type PE et DL présents dans les eaux pluviales et usées, depuis le réseau de collecte jusqu'à la sortie de la STEU et dans le milieu récepteur. Pour cela, l'approche qui est proposée ici se base sur une batterie de bioessais *in vitro* complémentaires permettant la détection spécifique de composés PE (œstrogéniques, androgéniques, glucocorticoïdes) et DL (incluant HAP-like et dioxin-like). L'application de ces bioessais aux échantillons d'eaux collectés dans le projet REGARD est réalisée dans une démarche de criblage et vise avant tout à dresser un premier constat sur le type, les niveaux et les sources potentielles de micropolluants biologiquement actifs au sein du réseaux d'eaux usées et pluviales.

## 2. Méthodologie

### 2.1 Echantillonnage et Traitement des échantillons

Un ensemble de 90 échantillons d'eaux destinés aux bioessais *in vitro* ont été prélevés en 2015 et en 2016. La description des sites et campagnes de prélèvement est décrite en détail dans le livrable n°1.1 (Description des sites d'étude et des protocoles d'expérimentation). Ces prélèvements correspondent aux eaux usées (EU) prélevées au sein du réseau (EU domestiques, industrielles, hospitalière, entrée et sortie de STEU), aux eaux pluviales (exutoires pluviaux, collecteur rocade, zones urbaines) et aux eaux du milieu naturel (différents points en amont et en aval de rejets sur la Jalle de Blanquefort).

Les échantillons d'eaux brutes ont été reçus congelés et immédiatement stockés à -20°C avant traitement. Il est à noter que, du fait de problèmes liés au transporteur, certains échantillons ont été réceptionnés dans un état de pré-décongélation. Préalablement aux analyses par les bioessais *in vitro*, chaque échantillon est extrait selon le protocole schématisé dans la Figure 2. Cette étape préparatoire permet une concentration de la phase organique de l'échantillon, augmentant ainsi la sensibilité de la bio-détection. Les eaux ont été filtrées et la phase organique dissoute concentrée après extraction sur phase solide (SPE, phase HLB™). Les extraits finaux obtenus sont repris par un solvant organique (DMSO) et analysés en dose-réponse dans les différents bioessais.

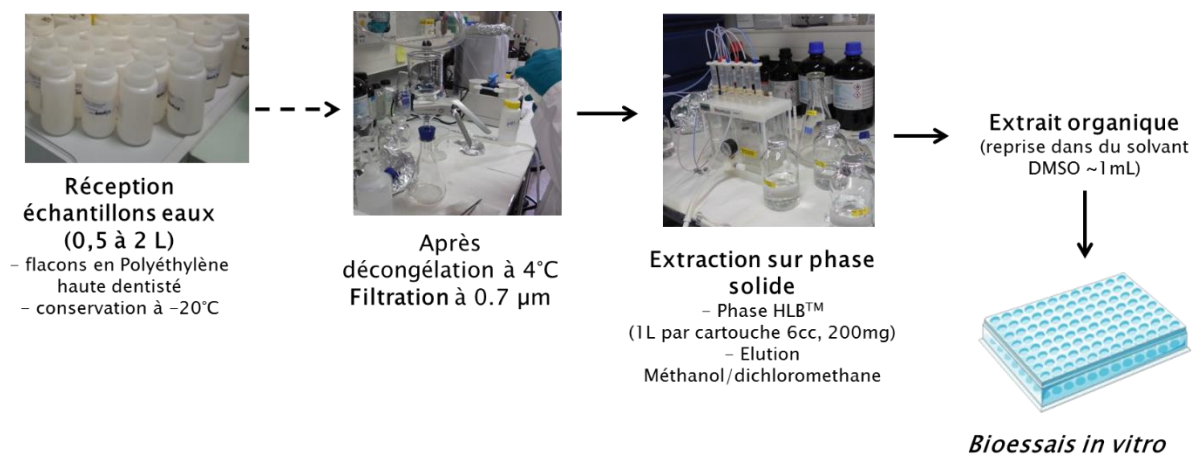


Figure 2. Principales étapes du traitement des échantillons d'eaux conduisant à la préparation d'un extrait organique qui sera utilisé dans les bioessais *in vitro*.

### 2.2 Bioessais *in vitro* : principe et détermination d'équivalents-toxiques biologiques (Bio-TEQ)

Dans leur principe, les bioessais utilisés sont basés sur l'utilisation de cultures cellulaires exprimant un gène rapporteur facilement détectable en luminescence ou fluorescence (e.g. luciférase) dont l'activation est couplée à des récepteurs spécifiques tels que les récepteurs des hormones ou de la dioxine (Figure 3). La présence de molécules capables d'activer ces récepteurs va induire la



luminescence des cellules dont l'intensité de réponse est directement proportionnelle à la concentration en substance(s) active(s).

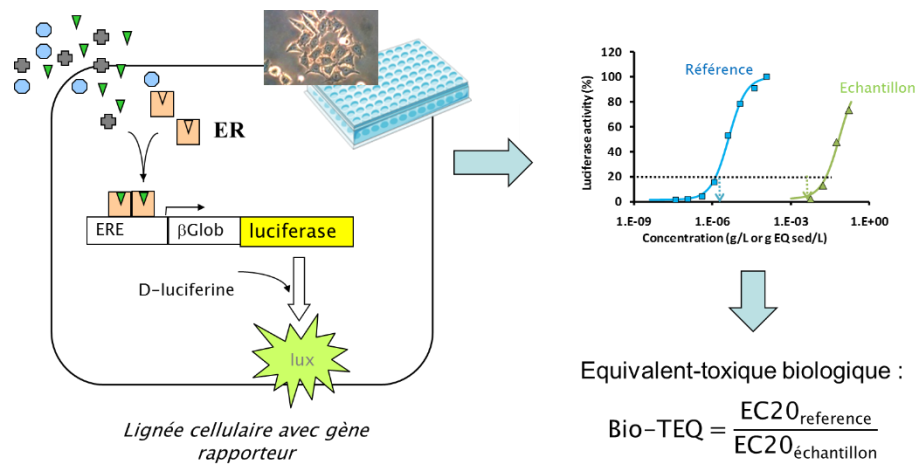


Figure 3 : Principe la quantification d'équivalent-hormone ou équivalent-toxique (Bio-TEQ) dans un extrait organique par les bioessais *in vitro*.

Du point de vue pratique, les analyses sont réalisées en microplaques de 96 puits dans lesquelles sont ensemencées les cellules. Une gamme de dilution de l'extrait organique est réalisée dans le DMSO et chaque dilution est déposée en triplicats sur les cellules à l'aide d'un automate de dilution (EVO75™, Tecan). Après exposition des cellules pendant 4 h ou 24 h (selon le bioessai), l'activité du gène rapporteur est quantifiée au luminomètre (luciférase) ou au fluorimètre (activité EROD).

Dans le cas d'un échantillon actif (au moins deux concentrations montrant un effet supérieur à 20%), la courbe dose-réponse obtenue est modélisée selon le modèle de Hill à l'aide la macro RegTox développée dans Excel™ (Vindimian 2017) afin de déterminer une concentration d'échantillon générant X % d'effet relativement à la molécule de référence (e.g. EC20 pour *effective concentration* induisant 20% d'effet). Le ratio entre l'EC20 de la molécule de référence du bioessai (en g/L) et l'EC20 de l'échantillon (en facteur de concentration) permet de dériver une quantité d'équivalent-hormone (e.g. équivalent-estradiol) ou d'équivalent-toxique (e.g. équivalent-dioxine) présent dans l'échantillon (Bio-TEQ). La mesure de Bio-TEQ est directement comparable à la mesure d'équivalent-toxiques dérivés des analyses chimiques ciblées (Chim-TEQ), déterminée selon l'équation :  $\text{ChemTEQ} = \sum(C_i \times \text{TEF}_i)$ , où C est la concentration mesurée d'un composé *i* et TEF son facteur de toxicité relative au composé de référence (Kinani et al 2010, Creusot et al 2014, Neale et al 2015).

Dans ce projet, un panel de bioessais *in vitro* a été appliqué permettant de détecter des activités médiées par des composés perturbateurs endocriniens (oestrogéniques, androgéniques et glucocorticoïdes) et des composés de type dioxin-like et HAP-like (Tableau 2). Ces bioessais sont complémentaires et renseignent sur la présence potentielle de différentes familles de contaminants aquatiques et relativement peu redondantes entre les bioessais (complémentarité).

Tableau 2 : Bioessais in vitro pour l'évaluation des activités de type perturbateur endocrinien et dioxin-like.

Nom du bioessai	Activité	Principe/mode d'action	Unité en quantité d'équivalents-toxique relatifs à la substance de référence de chaque test
<b>MELN</b>	Oestrogénique	Récepteur des estrogènes ( <b>ER</b> ) humain / luciférase	Equivalents-estradiol (E2-Eq ng/L)
<b>MDA-kb2*</b>	Androgénique et glucocorticoïdique	Récepteurs des androgènes ( <b>AR</b> ) et des glucocorticoïdes ( <b>GR</b> ) humain / luciférase	Equivalents-Dihydrotestostérone (DHT-Eq ng/L)
<b>PLHC-1</b>	Dioxin-like et HAP-like	Récepteur de la dioxine ( <b>AhR</b> ) / activité EROD après 4 h (HAP-like) ou 24 h (dioxin-like) d'exposition	Equivalents-Benz(a)Pyrène (BaP-Eq µg/L) ou équivalent-dioxine (TCDD-Eq ng/L)

\*Les cellules MDA-kb2 coexprimant les récepteurs des androgènes (AR) et des glucocorticoïdes (GR), une co-exposition avec la flutamide (anti-androgène de référence) permet de statuer sur l'implication de AR et/ou de GR dans le cas d'une réponse positive du bioessai à un échantillon.

## 2.3 Contrôle de la qualité des données

Des contrôles expérimentaux sont réalisés afin d'une part d'identifier de possibles contaminations liées à la manipulation et la préparation des échantillons et de s'assurer de la spécificité de la réponse mesurée dans les échantillons. Concernant l'étape de préparation/extraction d'échantillon, des blancs (eau ultra-pure) subissant exactement la même procédure que les échantillons sont réalisés pour chaque série d'extraction. Pour les bioessais, chaque microplaque inclut des témoins positifs (hormone ou toxique de référence, e.g. E2 pour l'activité oestrogénique) et négatifs (témoin DMSO, témoin blanc extraction). Pour chaque série d'analyse, une gamme de calibration avec le composé de référence est systématiquement réalisée afin de vérifier de la sensibilité correcte du bioessai, en termes de concentrations actives et de facteur d'induction par rapport au témoin non traité.

## 3. Résultats

### 3.1 Profils globaux d'activités *in vitro*

La Figure 4 présente une vue générale des différents profils d'activité obtenus par les bioessais *in vitro* dans les réseaux d'eaux usées et eaux pluviales. Pour permettre une représentation aisée de l'ensemble des résultats, les données de Bio-TEQ sont exprimées en unités arbitraires relatives par rapport au site de référence (eau de la Jalle de Blanquefort en amont du rejet de la STEU) et représentées par classes à l'aide d'un code couleur (méthode adaptée de Hamers et al 2008).

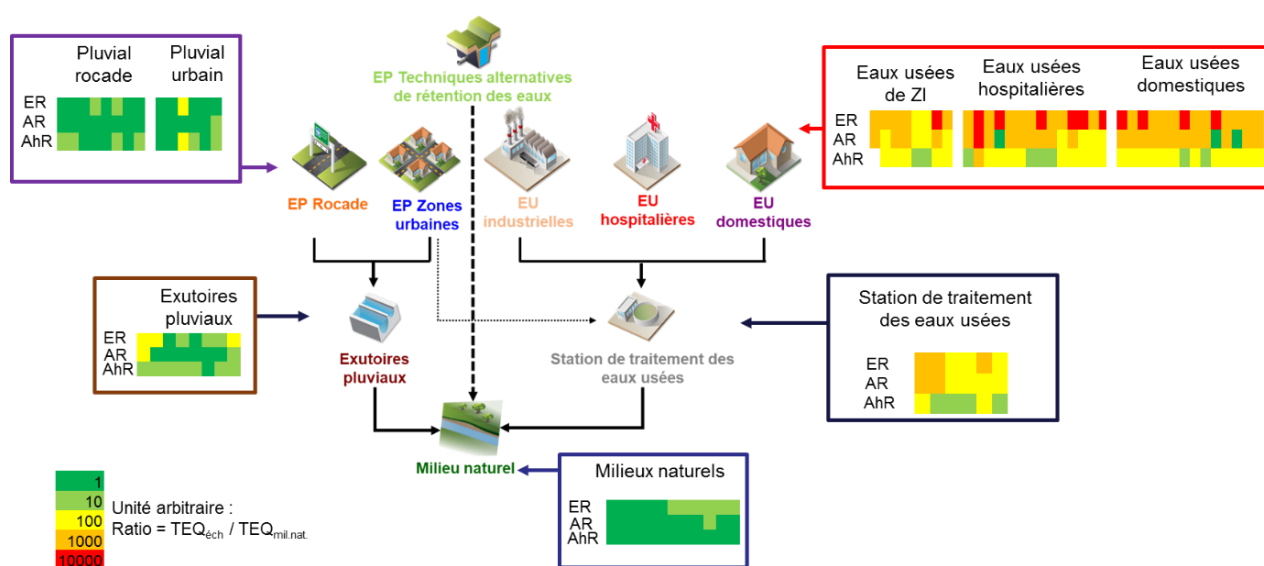


Figure 4. Synthèse des profils d'activités *in vitro* mesurés dans les eaux urbaines prélevées en 2015 et 2016. Les résultats sont présentés en unité relative par rapport au milieu naturel en amont de rejets urbains. ER=activité oestrogénique ; AR=activité androgénique ; AhR=activité HAP-like. Des activités liées aux glucocorticoïdes (GR) ont été ponctuellement détectées (sites hôpital et STEU) mais non représentées sur la figure.

Tous les bioessais *in vitro* appliqués dans cette étude ont permis de détecter la présence de contaminants actifs dans les eaux urbaines et naturelles, à des niveaux de concentrations variables en fonction du type d'eau, du bioessai et/ou du site de prélèvement.

D'une manière générale, les profils d'activités montrent une graduation depuis le réseau d'eaux usées vers la STEU puis vers le milieu naturel. La présence de composés œstrogéniques (ER), androgéniques (AR) et HAP-like (AhR) dans le réseau, à des niveaux très variables selon le type d'échantillons et la nature de l'activité biologique considérée est notable. Certains sites, comme l'hôpital ou des sources domestiques, constituent des sources ponctuelles particulièrement importantes de contaminants à activité hormonale (oestrogénique, androgénique ou glucocorticoïdique) dans les eaux usées. Il est à noter qu'une activité de type glucocorticoïde, non représentée dans la Figure 4, a également été détectée sur certains sites spécifiques (hôpital, entrée et sortie de STEU).

L'analyse des eaux pluviales montre que les niveaux de Bio-TEQ mesurés sont significativement plus faibles que dans le réseau d'eaux usées. Les exutoires pluviaux peuvent néanmoins être une source ponctuelle d'activité hormonale, mais cela reste très dépendant du site de prélèvement. Les eaux pluviales en zones urbaines et rocade sont vectrices d'activités HAP-like.

## 3.2. Eaux usées urbaines

Les eaux usées urbaines qui arrivent dans les stations de traitement des eaux usées sont des sources bien identifiées d'activités hormonales liées aux xénobiotiques. Toutefois peu d'études ont exploré les origines de ces activités au sein du réseau d'assainissement. Dans ce projet, nous avons investigué différentes sources : un site hospitalier avec les effluents de différents services ou bâtiments, différentes sources domestiques et des rejets de zones industrielles.

### 3.2.1 Eaux usées du site hospitalier universitaire

Les activités biologiques mesurées dans les eaux usées rejetées par l'hôpital sont rapportées dans la Figure 5. Les 9 sites sur la partie gauche des graphiques correspondent à des rejets des différents services de l'hôpital. Les 5 sites sur la droite des figures correspondent à des prélèvements réalisés dans le réseau unifié, en amont et en aval du site hospitalier.

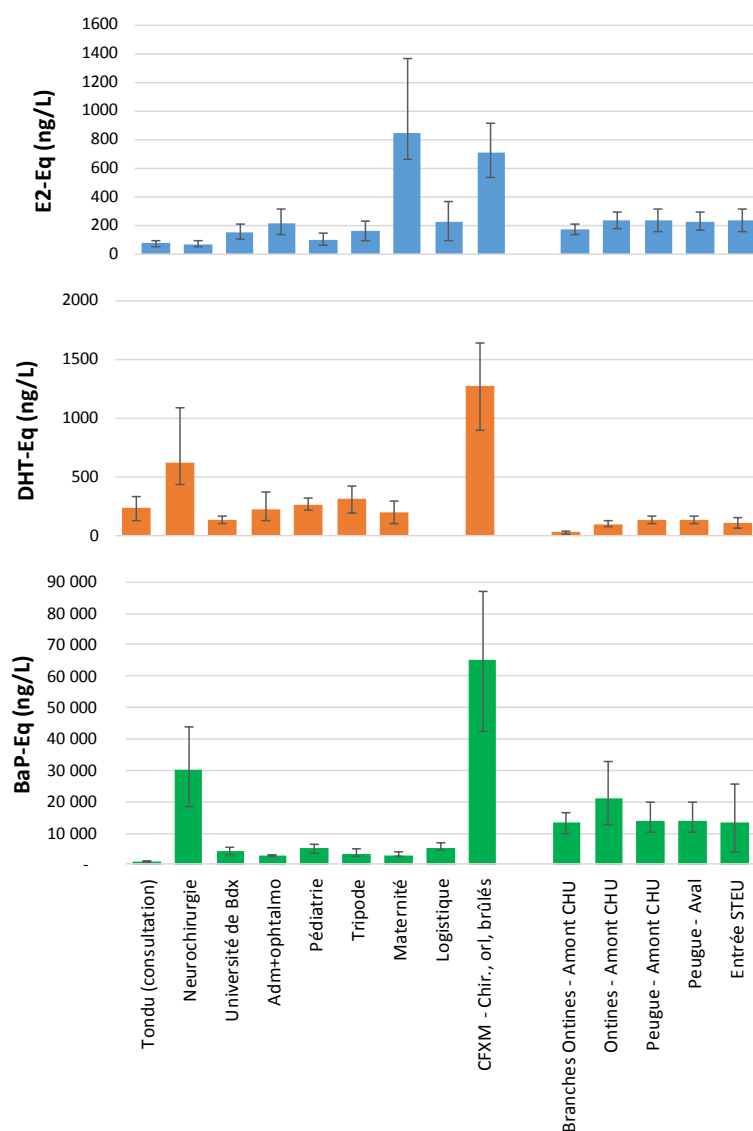


Figure 5. Activités oestrogénique, androgénique et HAP-like in vitro dans les eaux usées du CHU de Bordeaux (9 sites - partie gauche) et du réseau unifié auquel il est raccordé (5 sites - partie droite). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance à 95%, nd : non détecté.

Les niveaux d'activités mesurés dans ces échantillons sont très importants puisqu'ils varient de 71 à 850 ng E2-Eq/L, 25 à 1270 ng DHT-Eq/L et 1049 à 64900 ng BaP-Eq/L. Les services de maternité et CFXM sont sources d'apports massifs en (xéno-)œstrogènes, alors que de très fortes activités androgéniques et HAP-like sont mesurées en sortie de CFXM et de neurochirurgie. Toutefois, il est à noter que sur les sites CFXM, Tondu et Neurochirurgie, nous avons noté la présence de ligands du récepteur des glucocorticoïdes (GR), qui contribuent fortement aux valeurs de DHT-Eq reportées pour ces sites dans la Figure 5. La présence de ligands de GR et de AR nécessiterait des bioessais spécifiques de chaque récepteur pour pouvoir les quantifier séparément.

### 3.2.2 Eaux usées domestiques

La Figure 6 rapporte les activités *in vitro* dans des rejets domestiques prélevés au sein de réseaux séparatifs urbains (SU) collectifs, semi-collectifs, en maison individuelle et en maison de ville, ainsi que des eaux usées en réseaux unifiés (UN).

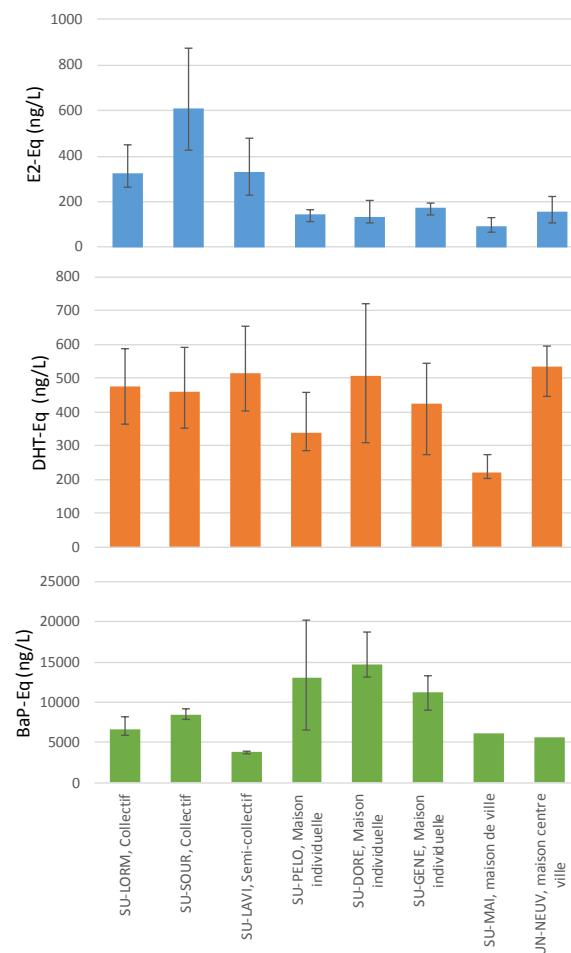


Figure 6. Activités œstrogénique, androgénique et HAP-like *in vitro* dans les eaux usées domestiques (DOM). Valeurs moyennes de deux déterminations indépendantes. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance à 95%.

D'une manière générale, les niveaux d'activités hormonales et HAP-like mesurés restent dans tous les cas très importants et dans le même ordre de grandeur, quel que soit le site investigué.

### 3.2.3 Eaux usées en zone industrielles

La Figure 7 présente les activités *in vitro* des rejets de zones industrielles. A nouveau, les trois types d'activités sont détectées, à des niveaux qui varient d'un site à l'autre mais qui sont en moyenne très importants (i.e. > 100 ng/L pour les activités hormonales). Seul le site de « Carbon blanc » présente des niveaux de contaminants plus faibles.

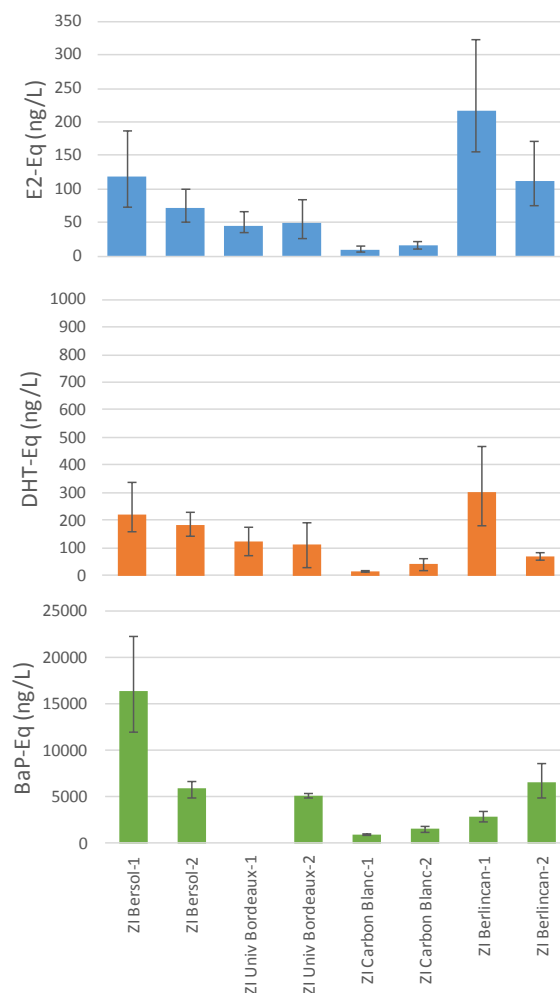


Figure 7. Activités oestrogénique, androgénique et HAP-like *in vitro* dans les eaux usées en zones industrielles (ZI). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance à 95%. (ZI Univ Bordeaux 1 : pas de valeur)

**Les eaux usées sont des sources majeures de xéno-hormones et de composés HAP-like. Si le site du CHU est une source importante de xéno-hormones, incluant des activités glucocorticoïdes non retrouvées en d'autres points du réseau, les autres sources (domestiques et ZI) contribuent également de façon significative.**

### 3.2.4 Devenir des activités dans les stations de traitements des eaux usées urbaines (STEU)

Les bioessais *in vitro* ont été appliqués aux eaux d'entrée et de sortie des STEU de Cantinolle et de Louis Fargues qui collectent les différents réseaux d'eaux usées investigués dans REGARD. Les résultats rapportés dans le Tableau 3 montrent une diminution des activités après le passage dans les STEU avec un taux d'abattement assez important, de 74% à 95% selon les activités.

Tableau 3. Activités *in vitro* des eaux d'entrée et de sortie après traitement dans les STEU de Cantinolle et de Louis Fargues. Les abattements après traitement sont donnés à titre indicatif pour chaque activité.

STEU	Activité	Bio-TEQ (ng/L) en entrée	Bio-TEQ (ng/L) en sortie	Abattement
<b>Cantinolle</b>	E2-Eq (ng/L)	68,2	3,4	95%
	DHT-Eq (ng/L)	94,7	12,6	87%
	BaP-Eq (ng/L)	4347,2	1150,8	74%
<b>Louis Fargues-J1</b>	E2-Eq (ng/L)	43,7	9,4	78%
	DHT-Eq (ng/L)	171,7	Mixte AR/GR	NC
	BaP-Eq (ng/L)	4454,9	285,5	94%
<b>Louis Fargues-J2</b>	E2-Eq (ng/L)	28,1	5,7	80%
	DHT-Eq (ng/L)	160,9	Mixte AR/GR	NC
	BaP-Eq (ng/L)	3208,1	201,7	94%

NC : non calculable.

Un résultat notable concerne l'activité androgénique à Louis Fargues. Nous avons observé une forte activation du bioessai MDA-kb2 dans les échantillons de sortie de STEU laissant suggérer la présence de glucocorticoïdes dans ces échantillons. Pour rappel, ce bioessai exprime à la fois le récepteur des androgènes et celui des glucocorticoïdes, lesquels une fois activés en présence de leurs ligands contribuent à la réponse du bioessai. L'exposition des cellules aux échantillons en présence de flutamide, qui bloque l'activation du AR, était inefficace pour antagoniser l'effet de l'échantillon, confirmant l'hypothèse d'une réponse liée à une activation du récepteur des glucocorticoïdes. Nous avons observé un résultat très similaire dans les effluents de la STEU de Sophia Antipolis dans le cadre du projet MICROPOLIS (Penru et al 2017, Livrable MICROPOLIS n°1). Il est probable que ces composés arrivent dans la STEU sous forme conjuguée et subissent une déconjugaison au cours du traitement, induisant le relargage de composés actifs détectés par le bioessai. Des analyses de glucocorticoïdes dans les échantillons viendraient utilement étayer ces hypothèses.

**Les activités hormonales et HAP-like sont pour majeure partie bien abattues dans les STEU. Toutefois des activités glucocorticoïdes apparaissent en sortie de traitement.**

### 3.3 Eaux Pluviales

La Figure 8 rapporte les activités *in vitro* mesurées dans les eaux pluviales prélevées sur la zone de la rocade bordelaise, en zones urbaines et au sein des exutoires qui collectent in fine l'ensemble des eaux pluviales

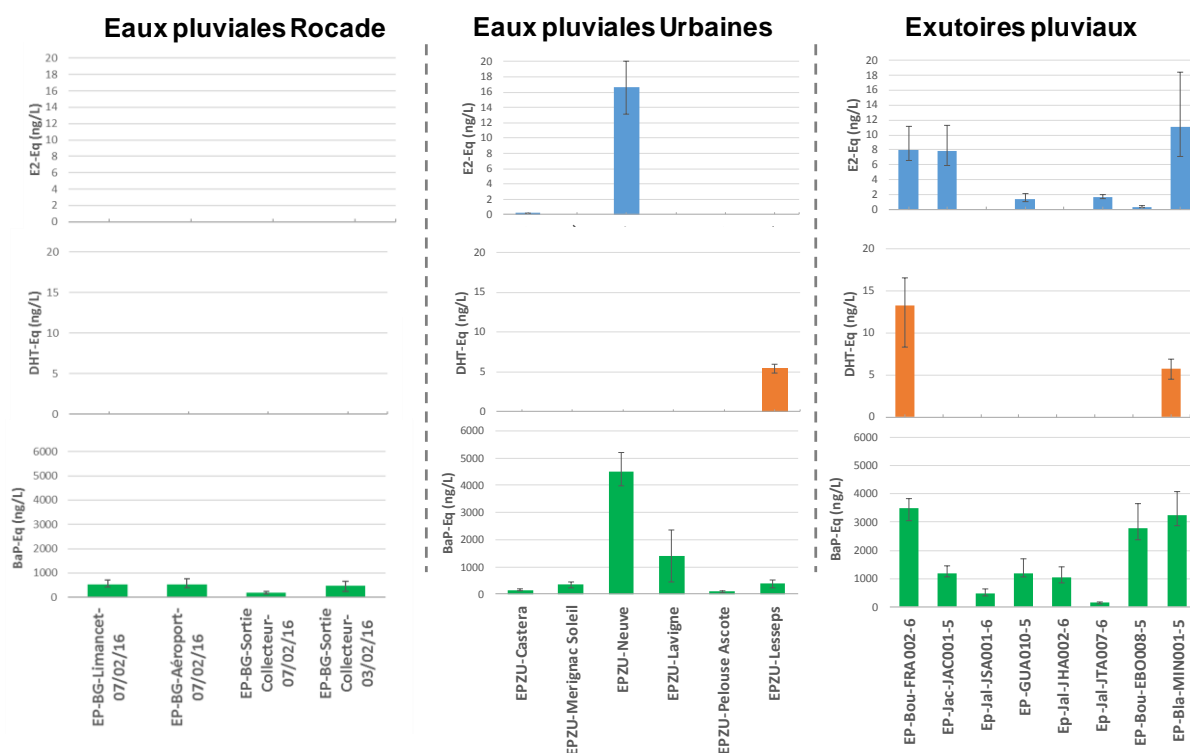


Figure 8. Activités oestrogénique (bleu), androgénique (orange) et HAP-like (vert) mesurées dans les eaux pluviales du collecteur de la Rocade, en zones urbaines et dans les exutoires pluviaux. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance à 95%.

D'une manière générale, les eaux pluviales urbaines sont plus contaminées que les eaux pluviales de la zone de la rocade et les activités détectées de manière récurrente dans ces échantillons concernent principalement les composés de type HAP-like. Quelques échantillons ponctuels présentent une activité oestrogénique et un seul (EP-ZU-Lesseps) une activité androgénique. Le point EPZU-Neuve correspond à un point du réseau unitaire ; il est donc logique de retrouver une activité oestrogénique significative dans cet échantillon, de par l'apport des eaux usées domestiques. De plus, ce prélèvement ayant été réalisé par temps de pluie, on observe un taux de dilution significatif de l'activité oestrogénique lorsque l'on compare avec la même mesure à ce point par temps sec (cf. Figure 5, point UN-NEUV).

De manière intéressante, ces profils d'activité sont retrouvés dans les exutoires pluviaux, qui *in fine* servent de réceptacle de ces eaux. Il est à noter que les exutoires EP-Bou-FRA et EP-Bla-MIN sont localisés en bassin de collecte urbain (sans influence agricole ou industrielle) et présentent des activités oestrogéniques et androgéniques notables.



**Les eaux pluviales sont vectrices d'activités HAP-like et ponctuellement de perturbateurs endocriniens. Toutefois, les niveaux mesurés restent sensiblement inférieurs à ceux mesurés dans les eaux usées.**

### 3.4 Milieu naturel

Nous avons montré que les eaux usées et, dans une moindre mesure les eaux pluviales, sont vectrices d'activités toxiques telles que déterminées par les bioessais *in vitro*. La question de l'impact de ces activités lorsqu'elles rejoignent le milieu récepteur naturel se pose alors.

L'analyse des activités *in vitro* dans la Jalle de Blanquefort montre la détection d'activités significativement plus importantes dans les sites situés en aval du rejet de la STEU de Cantinolle, aux sites Rocade et Réserve naturelle (Figure 9). Si ce constat est assez net pour ce qui est de l'activité oestrogénique, il l'est seulement de façon ponctuelle pour les activités androgéniques et HAP-like et de façon campagne-dépendante. Néanmoins, ce résultat suggère un impact du rejet de la STEU sur le milieu récepteur. Notons par ailleurs une faible activité oestrogénique (0,2 ng/L) quantifiée sur le site du Haillan, en aval d'un exutoire pluvial.

Concernant les niveaux d'activité oestrogénique mesurés, si elles apparaissent comme relativement faibles (<1 ng/L) au regard des niveaux détectables en sortie de STEU (e.g. 3-10 ng E2-Eq/L en sortie des STEU de Cantinolle et Louis Fargues), elles sont du même ordre de grandeur que les normes de qualité environnementale de l'estradiol (0,4 ng/L) recommandée dans la Directive cadre sur l'Eau. Récemment, des auteurs ont rapporté des valeurs seuils de 0,3 ng E2-Eq/L (Jarosova et al 2014), 0,4 E2-Eq/L (Kunz et al 2015) et 0,5 E2-Eq/L (Van der Oost et al 2017) pour l'activité oestrogénique *in vitro* dans les eaux de surface. Les niveaux mesurés sur les sites de la Jalle de Blanquefort en aval de la STEU (0,2-0,6 ng E2-Eq/L) sont au niveau voire au-dessus de ces seuils.

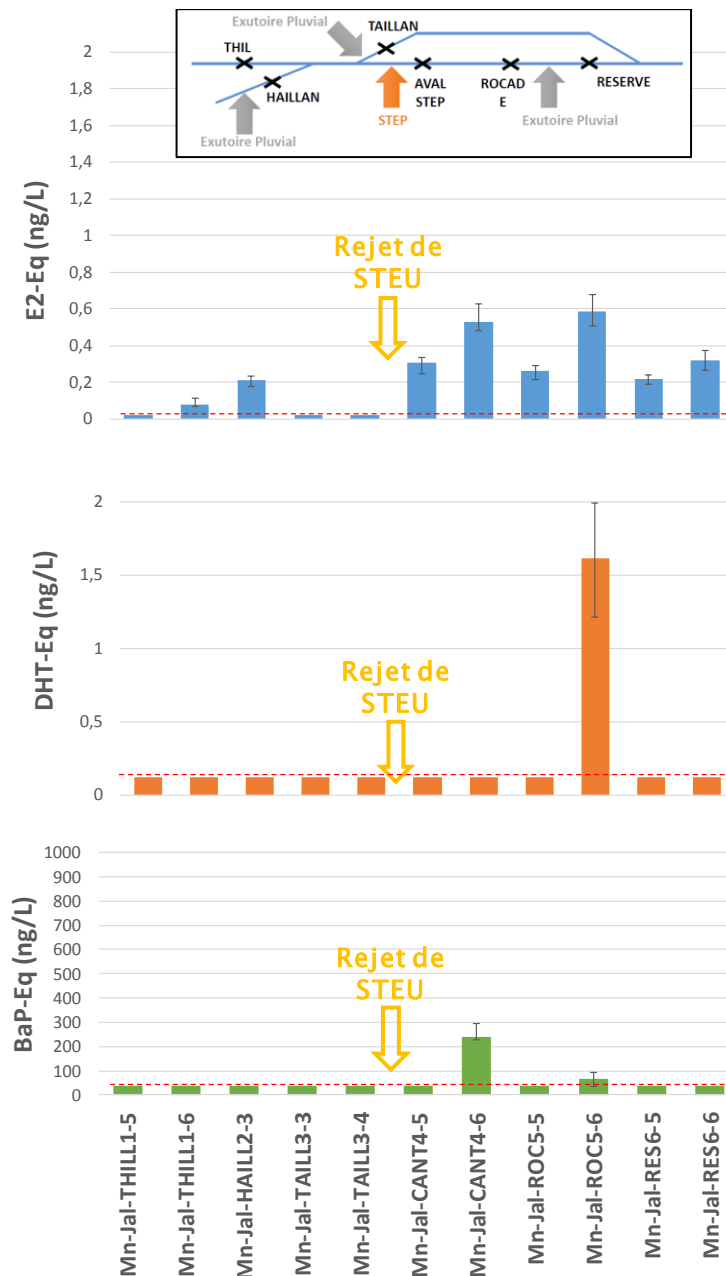


Figure 9. Activités oestrogénique, androgénique et HAP-like dans la Jalle de Blanquefort à différents sites localisés en amont (THIL, THAILL, HAILL) et en aval (CANT, ROC, RES) du rejet de la STEU à Cantinolle. Les lignes en pointillés rouges correspondent aux limites de détection (LD) des bioessais (respectivement 0,02 ng E2-Eq/L, 0,1 ng DHT-Eq/L, 36 ng BaP-Eq/L). Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance à 95%.

**Si les niveaux mesurés restent faibles dans le milieu naturel, on observe un impact potentiel du rejet de la STEU en ce qui concerne l'activité oestrogénique.**

### 3.5 Identité des micropolluants responsables des activités détectées ?

Pour pouvoir agir sur les sources responsables des activités et proposer des mesures qui aideraient à leur réduction, il convient d'identifier les molécules responsables des activités détectées. Une

première approche utilisée dans ce projet a consisté à comparer les concentrations de Bio-TEQ avec la présence de molécules renseignée par les analyses chimiques ciblées (cf. Livrable Substances organiques) et que l'on sait actives dans les bioessais. Sur la base des concentrations (C) des substances individuelles (i), on peut dériver une concentration en équivalent-toxiques chimiques  $\text{ChemTEQ} = \sum(C_i \times \text{TEF}_i)$ , où TEF représente le facteur de toxicité de la substance relative au composé de référence ( $\text{TEF}_i = \text{EC20}_{\text{réf}} / \text{EC20}_i$ ). La comparaison Bio-TEQ et Chem-TEQ informe sur la contribution relative d'une substance à l'activité toxicologique d'un échantillon.

Un travail de recensement de l'activité ER, AR ou AhR des molécules a montré que l'information n'est disponible que pour un nombre très restreint de substances au regard des nombreux micropolluants qui ont été analysés dans REGARD et/ou que de nombreuses molécules analysées ne sont pas actives dans nos bioessais. Pour l'activité oestrogénique, nous avons par exemple identifié que les alkyphénols contribuent faiblement aux activités EU (au mieux pour 7% de l'activité totale en sortie de STEU). Les contaminants majeurs responsables des activités observées ne sont donc pas identifiés parmi les molécules organiques détectées par les analyses chimiques. Pour aller plus loin dans leur identification, le développement de l'approche analytique orientée par les effets (EDA) a été mise en œuvre (cf. Livrable 134 : Nouveaux outils).

## Conclusions

Cette partie du projet REGARD a consisté à appliquer un panel de bioessais *in vitro*, dans une démarche de criblage, pour caractériser les sources de contamination d'eaux usées et pluviales urbaines à l'échelle d'un réseau d'assainissement, tel que celui de Bordeaux Métropole. Ce travail revêtait un réel aspect exploratoire puisque ces outils n'avaient préalablement pas ou très peu été appliqués aux matrices eaux usées à la source et eaux pluviales. Le travail effectué a montré leur fonctionnalité pour analyser ces différentes matrices, qui présentaient des amplitudes de concentration de plusieurs ordres de grandeur. D'une manière générale, les résultats obtenus sont cohérents avec ce que l'on sait de la contamination de ces eaux par les contaminants organiques (cf. Livrable 132 Substances organiques), identifiant des sources majeures de contaminants, tout en informant sur la présence de substances non renseignées a priori par la chimie analytique.

Ce travail a permis de dresser différents constats quant à la contamination des eaux usées et pluviales de l'agglomération bordelaise :

- Les sources majeures de composés œstrogéniques, androgéniques et *dioxin-like* sont les eaux usées. Ces composés sont en partie éliminés par les procédés de traitements des eaux usées.
- Les eaux pluviales sont faiblement chargées en composés œstrogéniques et androgéniques mais sont une source en composés *dioxin-like/HAP-like*.
- Les niveaux de composés œstrogéniques, androgéniques et *HAP-like* sont faibles dans le milieu naturel. Toutefois, un impact de la STEU est noté pour l'activité œstrogénique, dont la concentration est au niveau du seuil actuellement préconisé pour les eaux de surface.
- En dépit des procédés de traitement des eaux usées, les rejets de STEU véhiculent des composés œstrogéniques vers le milieu naturel. La mise en place d'un traitement des eaux usées sur certains sites (ex: effluents hospitaliers) et de traitements tertiaires sur les STEU urbaines pourrait réduire l'émission de ces composés. Le changement des pratiques aiderait à diminuer la présence de certaines familles de composés œstrogéniques et *dioxin-like*.

## Références Bibliographiques

- Aït-Aïssa S (2009) Outils bio-analytiques in vitro : principe et apports pour la surveillance des contaminants organiques dans le milieu aquatique. Rapport INERIS-ONEMA, DRC.
- Aït-Aïssa S, Brion F, Creusot N, Sanchez W (2014) Etude prospective 2012 : Apport des outils biologiques (bioessais et biomarqueurs) pour le diagnostic de la contamination des milieux aquatiques. Rapport INERIS-ONEMA, DRC-14-127339-06620A.
- Creusot N, Aït-Aïssa S, Tapie N, Pardon P, Brion F, Sanchez W, Thybaud E, Porcher JM, Budzinski H (2014) Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling. *Environmental Science & Technology* 48(7): 3649-3657.
- Gardia-Parèze C, Thèse de l'université de Bordeaux, 2015.
- Hamers T, Leonards PEG, Legler J, Vethaak AD, Schipper CA (2010) Toxicity profiling: An integrated effect-based tool for site-specific sediment quality assessment. *Integrated environmental assessment and management* 6(4): 761-73.
- Jarosova B, Blaha L, Giesy JP, Hilscherova K (2014) What level of estrogenic activity determined by in vitro assays in municipal wastewaters can be considered as safe? *Environment International*, 1585 64: 98-109.
- Kinani S, Bouchonnet S, Creusot N, Bourcier S, Balaguer P, Porcher JM, Ait-Aïssa S (2010) Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environmental Pollution* 158(1): 74-83.
- Kunz PY, Kienle C, Carere M, Homazava N, Kase R (2015). In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 106: 107-115.
- Livable REGARD n°134 : Nouveaux outils
- Livable REGARD n°132 : Substances organiques
- Livable REGARD n° 11 : Sites d'échantillonnage
- Neale P, Aït-Aïssa S, Brack W, Creusot N, Denison MS, Deutschmann B, Hilscherová K, Hollert H, Krauss M, Novák J, Schulze T, Seiler TB, Serra H, Shao Y, Escher BI (2015) Linking in vitro effects and detected organic micropollutants in surface water using mixture toxicity modeling. *Environmental Science & Technology*, 49 (24) 14614-14624.
- Penru Y, Guillon A, Aït-Aïssa S, Couteau J (2017) Caractérisation de la toxicité des eaux usées à Sophia Antipolis. Projet MICROPOLIS Indicateurs, Livrable n°1.
- Tousova Z, Oswald P, Slobodnik J, Muz M, Hu M, Brack W, Krauss M, Koprivica S, Ahel M, Schollee J, Hidasi A, Hollender J, Schirmer K, Suter MJF, Sonavane M, Aït-Aïssa S, Creusot N, Brion F, Di Paolo C, Seiler TB, Hollert H, Froment J, Almeida AC, Thomas K, Tollefsen KE, Tufi S, Ouyang X, Leonards P, Lamoree M, Osorio Torrens V, Schriks M, Kolkman A, Spirhanzlova P, Tindall A, Blaha L, Schulze T (2017) European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants with adverse effect potential in European surface waters. *Science of the Total Environment*, 601-602, 1849-1868
- van der Oost R, Sileno G, Suarez-Munoz M, Nguyen MT, Besselink H, Brouwer A (2017) SIMONI (smart integrated monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part I—model design and effect-based trigger values. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(9): 2385-2399.
- Vindimian E (2017) REGTOX : macro Excel™ pour dose-réponse, [http://www.normalesup.org/~vindimian/fr\\_index.html](http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html) (accédé le 12/12/2017).

