



## **Evaluation sommaire de la qualité de l'eau dans les cours d'eau pollués par des effluents d'épuration à l'aide de bioessais écotoxicologiques**

**Étude réalisée sur mandat de l'Office fédéral de  
l'environnement (OFEV)**

**2015 (actualisé 2017)**



## Éditeur

Centre Ecotox, Centre suisse d'écotoxicologie appliquée Eawag-EPFL, 8600 Dübendorf

## Sur mandat de

Office fédéral de l'environnement (OFEV), Section Eau, CH-3003 Bern

L'OFEV est un office du Département fédéral de l'environnement, des transports, de l'énergie et de la communication (DETEC).

## Auteurs

Cornelia Kienle, Etienne Vermeirssen, Petra Kunz et Inge Werner      Centre Ecotox, Centre suisse d'écotoxicologie appliquée Eawag-EPFL

## Accompagnement scientifique

Christian Götz      Envilab AG  
Andreas Häner      BMG Engineering AG  
Michael Schärer      Office fédéral de l'environnement

## Remerciements

Les auteurs et les initiateurs du projet tiennent à remercier les personnes suivantes pour leur contribution, leurs conseils et/ou leurs commentaires constructifs :

Groupe d'accompagnement du module Écotoxicologie du Système modulaire gradué	Michael Schärer/Yael Schindler (présidents), Arielle Cordonier (Service cantonal de l'écologie de l'eau, canton de Genève), Andreas Häner (BMG Engineering AG), Barbara Känel (AWEL, canton de Zurich), Margie Koster (Amt für Umwelt, canton de Thurgovie), Frank Lang (Interkantonales Labor, canton de Schaffhouse), Sergio Santiago (Soluval Santiago), Kristin Schirmer (Eawag)
Eawag	Christian Michel, Nele Schuwirth, Heinz Singer, Christian Stamm, Barbara Spycher
Amt für Umwelt und Energie du canton de Saint-Gall	Michael Eugster, Sergio Rezzonico
RWTH Aachen	Henner Hollert, Sibylle Maletz, Christine Schönlaue
Centre suisse d'écotoxicologie appliquée Eawag-EPFL	Daniela Baumberger, Sophie Campiche, Barbara Ganser, Nadzeya Homazava, Beatrice Läuppi, Daniel Olbrich, Anke Schäfer, Andrea Schifferli, Christina Thiemann

## Remarque

Cette étude a été réalisée sur mandat de l'Office fédéral de l'environnement et cofinancée par le Centre suisse d'écotoxicologie appliquée. Son contenu est de la seule responsabilité de l'éditeur/de l'organisme mandaté. L'actualisation intègre le CQC actualisé pour le diuron (70 ng/l au lieu des 20 ng/l) et une adaptation de l'appellation « concentrations équivalentes » ainsi que du nom de l'algue. De plus, les limites de détection et de quantification du test algues combiné et les liens hypertextes ont été actualisés.

## Contact

Cornelia Kienle: [cornelia.kienle@oekotoxzentrum.ch](mailto:cornelia.kienle@oekotoxzentrum.ch)

## Citation

Kienle, C., Vermeirssen, E., Kunz, P., Werner, I. 2015. Évaluation sommaire de la qualité de l'eau dans les cours d'eau pollués par des effluents d'épuration à l'aide de bioessais écotoxicologiques. Étude réalisée sur mandat de l'OFEV (actualisé 2017). Centre suisse d'écotoxicologie appliquée Eawag-EPFL, Dübendorf.

**Traduction : Laurence Frauenlob, Waldkirch, Allemagne**

**Photo de couverture : Andri Bryner, Eawag**

**Oekotoxzentrum** | Eawag | Überlandstrasse 133 | Postfach 611 | 8600 Dübendorf | Schweiz  
T +41 (0)58 765 55 62 | F +41 (0)58 765 58 63 | [info@oekotoxzentrum.ch](mailto:info@oekotoxzentrum.ch) | [www.oekotoxzentrum.ch](http://www.oekotoxzentrum.ch)

**Centre Ecotox** | EPFL-ENAC-II-GE | Station 2 | CH-1015 Lausanne | Suisse  
T +41 (0)21 693 62 58 | F +41 (0)21 693 80 35 | [info@centreecotox.ch](mailto:info@centreecotox.ch) | [www.centreecotox.ch](http://www.centreecotox.ch)



## Résumé

*Introduction* : La Suisse travaille depuis plusieurs années à l'élaboration d'un outil d'évaluation appelé système modulaire gradué (SMG) qui se compose de méthodes standardisées permettant d'apprécier l'état des cours d'eau, et plus récemment des lacs, selon des critères morphologiques, hydrologiques, biologiques, chimiques et écotoxicologiques afin de pouvoir prendre des mesures adéquates pour réduire les atteintes qu'ils subissent.

Au sein du SMG, le *module Écotoxicologie* souhaite proposer un système d'appréciation de routine de la qualité de l'eau à partir de bioessais écotoxicologiques en détaillant les étapes du prélèvement, de la préparation des échantillons, de la réalisation des essais et de l'appréciation de la qualité à partir des effets observés. Les bioessais utilisés doivent être sensibles, spécifiques, pratiques, bon marché et faciles à interpréter. Le présent rapport expose un système d'évaluation sommaire de la qualité de l'eau à partir de bioessais écotoxicologiques adapté aux cours d'eau subissant des rejets d'eaux usées traitées.

*Prélèvement et préparation des échantillons* : Pour l'échantillonnage, il est recommandé de collecter des échantillons composites sur au moins 24 h ou, faute de mieux, d'effectuer des prélèvements ponctuels. Les échantillons doivent être transportés et conservés à une température de 0 à 5°C. En général, ils sont ensuite préparés par extraction sur phase solide.

*Bioessais recommandés* : Pour l'appréciation sommaire de la qualité de l'eau, deux familles de substances potentiellement écotoxiques ont été ciblées : les inhibiteurs du photosystème II (PSII) et les substances à activité œstrogénique. Leur activité biologique peut être mesurée à l'aide de bioessais. Le test recommandé pour l'évaluation de la qualité de l'eau en fonction de la présence d'inhibiteurs du PSII est le test algues combiné avec une algue verte unicellulaire, *Raphidocelis subcapitata*. Le photosystème II est un élément central de l'appareil photosynthétique des algues et son inhibition entraîne un arrêt de la croissance algale. A la fois simple et bon marché, le test algues combiné a livré des résultats robustes et fiables dans de nombreuses études. La contamination des eaux par les œstrogènes et substances apparentées peut être évaluée à l'aide du test YES (Yeast Estrogen Screen), un bioessai particulièrement robuste mettant en œuvre des levures génétiquement modifiées (*Saccharomyces cerevisiae*). Il existe plusieurs variantes de ce test dont des projets de normes ISO ont été déposés auprès de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) pour certification. Cette procédure n'étant pas achevée, il n'est pas encore possible d'émettre de recommandations méthodologiques définitives pour ces deux bioessais. Le rapport présente ainsi des variantes éprouvées qui peuvent être utilisées pour l'évaluation sommaire de la qualité de l'eau. Le test algues combiné peut être utilisé aussi bien avec des échantillons natifs qu'avec des échantillons concentrés par extraction sur phase solide alors que cette pré-concentration est généralement indispensable à la mise en œuvre du test YES parce que les concentrations des substances à activité œstrogénique dans les eaux usées traitées sont souvent trop faibles pour être détectables dans les échantillons natifs.

*Appréciation de la qualité de l'eau* : L'interprétation des résultats des bioessais en termes de qualité de l'eau s'effectue, comme dans toutes les méthodes du SMG, selon un système de classes d'état. La classe de qualité est déterminée en se référant, notamment, aux valeurs déjà proposées pour les critères de qualité environnementale relatifs à une exposition chronique aux œstrogènes et aux inhibiteurs du photosystème II.

*Conclusions* : La méthode proposée est conçue pour évaluer l'état des cours d'eau contaminés par des rejets d'eaux usées traitées et constitue un premier pas vers une appréciation intégrée de la qualité de l'eau. Les bioessais proposés interviennent en complément de l'évaluation usuelle des substances individuelles et permettent d'appréhender une grande variété de composés traces organiques de façon globale et intégrée.



## Summary

*Introduction:* Within the framework of the “Modular Stepwise Procedure” (MSP), standardized methods are being developed to evaluate and assess the status of rivers in Switzerland. It encompasses various aspects that influence habitat quality, including riverine structure, hydrology, biology, water chemistry and ecotoxicology. The MSP provides information which will form the basis for potential management measures to reduce impairments.

The goal of the *Ecotoxicology module* is to develop a robust approach for routine assessment of water quality based on ecotoxicological bioassays. The concept includes sampling, sample processing, bioassays, and interpretation of results. The selected bioassays should be sensitive, effect-specific, easy to perform, cost-effective and easily interpretable. The present report describes an approach for a first tier evaluation (“Grobbeurteilung”) of water quality in wastewater-impacted rivers based on ecotoxicological bioassays.

*Sampling and sample processing:* It is recommended to collect composite samples over a minimum of 24 h or (if former is not possible) grab samples. These must be transported and stored at 0-5°C. Samples are generally processed using solid phase extraction (SPE).

*Bioassays for measuring water quality:* This first tier evaluation is focused on two relevant substance groups: photosystem II (PSII) inhibiting and estrogenic substances. The biological effects of these two substance groups can be assessed using bioassays. An evaluation of water quality regarding PSII-inhibiting substances can be done using the combined algae assay with single-celled green algae (*Raphidocelis subcapitata*). The photosystem II plays a central role in algae photosynthesis. If it is inhibited, the algae cannot grow. This assay is easy to perform and cost-effective, and it has provided accurate and robust results in numerous previous studies. Due to its robustness, the Yeast Estrogen Screen (YES), a bioassay using genetically modified yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), is well suited to assess estrogenicity in wastewater. For this assay, there are several versions, for which protocol drafts are submitted for standardisation by the *International Organization for Standardization* (ISO). At this time, for both assays, a definitive recommendation for a specific test cannot be given due to the pending ISO certification. We therefore describe versions of these tests, which have been validated and can be applied for a first tier evaluation. The combined algae assay can be conducted with native as well as SPE concentrated samples. Samples to be tested by YES usually have to be SPE concentrated, as the concentrations of estrogenic substances in wastewater are often too low to be detectable in native samples.

*Water quality assessment:* An evaluation of the measured values is performed by applying a class based evaluation system based on the MSP methods. For this purpose, available suggestions for chronic environmental quality standards of estrogenic and PSII-inhibiting substances are used.

*Conclusions:* The approach presented here is intended for the evaluation of wastewater impacted surface waters and represents a first step towards an integrated water quality assessment. The suggested bioassays complement the generally used methods, which are based on single substance assessment, and make it possible to assess a broad spectrum of organic trace substances in an integrative way.



## Zusammenfassung

*Einleitung:* In der Schweiz werden im Rahmen des Projektes Modul-Stufen-Konzept (MSK) standardisierte Methoden für die Untersuchung und Bewertung des Zustandes der Fliessgewässer erarbeitet, um so strukturelle, hydrologische, biologische, chemische sowie ökotoxikologische Aspekte der Wasserqualität zu erfassen und gegebenenfalls Massnahmen zur Verminderung dieser Belastung ergreifen zu können.

Zielsetzung der Arbeiten im Rahmen eines *Moduls Ökotoxikologie* innerhalb des MSK ist die Entwicklung eines Konzeptes zur routinemässigen Beurteilung der Wasserqualität anhand von ökotoxikologischen Biotests, bestehend aus Probenahme, Probenaufbereitung, Durchführung der Biotests und Beurteilung der Effekte. Die Biotests sollen sensitiv, wirkungsbasiert, einfach durchführbar, kostengünstig und gut interpretierbar sein. Im vorliegenden Bericht wird nun ein Konzept zur Grobbeurteilung der Wasserqualität von abwasserbelasteten Gewässern mit ökotoxikologischen Biotests vorgestellt.

*Probenahme und Probenaufbereitung:* Zur Probenahme werden Sammelproben über mindestens 24 Stunden oder (falls ersteres nicht möglich) Stichproben empfohlen. Diese müssen bei 0-5°C transportiert und aufbewahrt werden. Die Probenaufbereitung erfolgt in der Regel mit einer Festphasenextraktion.

*Testverfahren für die Untersuchung der Wasserqualität:* Für die Grobbeurteilung wurden zwei ökotoxikologisch relevante Stoffgruppen ausgewählt: Photosystem II (PSII)-hemmende und östrogen-aktive Stoffe. Die biologische Wirkung dieser beiden Stoffgruppen kann mit ökotoxikologischen Biotests bestimmt werden. Die Bestimmung der Wasserqualität in Bezug auf PSII-hemmende Stoffe kann mit Hilfe des kombinierten Algentests mit einzelligen Grünalgen (*Raphidocelis subcapitata*) erfolgen. Das Photosystem II spielt eine zentrale Rolle in der Photosynthese der Algen; wird es gehemmt können die Algen nicht mehr wachsen. Der kombinierte Algentest ist einfach und kostengünstig durchführbar und hat in zahlreichen bisherigen Studien gute und robuste Ergebnisse geliefert. Zur Ermittlung der Belastung mit östrogen-aktiven Stoffen im Abwasser ist der Yeast Estrogen Screen (YES), ein Biotest mit genetisch veränderten Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*), aufgrund seiner Robustheit gut geeignet. Für diesen Test gibt es mehrere Varianten, für die ISO-Protokoll-Entwürfe zur Zertifizierung durch die *International Organization for Standardization* (ISO) eingereicht sind. Eine definitive Testempfehlung für beide Biotests ist aufgrund der ausstehenden ISO-Zertifizierungen derzeit noch nicht möglich. Es werden daher erprobte Varianten dieser Tests beschrieben, die für eine Grobbeurteilung eingesetzt werden können. Der kombinierte Algentest kann sowohl mit nativen als auch mit Hilfe einer Festphasenextraktion aufkonzentrierten Proben durchgeführt werden. Dahingegen müssen die Proben für den YES in der Regel aufkonzentriert werden, da die Konzentrationen an östrogen-aktiven Stoffen im Abwasser meist nicht hoch genug sind um native Proben messen zu können.

*Beurteilung der Wasserqualität:* Die Beurteilung der Messwerte erfolgt, in Anlehnung an die Methoden des MSK, mit Hilfe eines klassenbasierten Zustandsbeurteilungssystems. Hierfür werden verfügbare Vorschläge für chronische Umweltqualitätskriterien von östrogen-aktiven und PSII-hemmenden Stoffen einbezogen.

*Schlussfolgerungen:* Die vorgestellte Methode ist für die Beurteilung von abwasserbelasteten Gewässern konzipiert und stellt einen ersten Schritt in Richtung integrative Beurteilung der Wasserqualität dar. Die vorgeschlagenen Biotests sind als Ergänzung zur üblichen Einzelstoffbeurteilung gedacht und ermöglichen es, eine breite Palette organischer Spurenstoffe integrativ zu erfassen.





## Table des matières

Résumé.....	i
Summary.....	ii
Zusammenfassung.....	iii
Abréviations.....	vii
1 Introduction.....	1
1.1 Contexte.....	1
1.2 Cadre juridique.....	2
1.3 Le système modulaire gradué et le module Écotoxicologie.....	2
1.4 Objectifs.....	2
1.5 Présentation générale de la démarche d'évaluation sommaire des cours d'eau pollués.....	2
2 Prélèvement et préparation des échantillons.....	4
2.1 Vision synoptique de la démarche.....	4
2.2 Échantillonnage.....	4
2.2.1 Sélection des tronçons d'étude.....	5
2.2.2 Prélèvements dans les effluents d'épuration.....	5
2.3 Transport et stockage des échantillons.....	5
2.4 Préparation des échantillons.....	6
3 Tests recommandés pour l'évaluation de la pollution de l'eau par les substances à activité œstrogénique et les inhibiteurs du photosystème II.....	7
3.1 Test algues combiné pour les inhibiteurs du PSII.....	10
3.1.1 Vue d'ensemble de la réalisation du test et de l'interprétation des données.....	11
3.1.2 Validation du test.....	12
3.2 Test YES (Yeast Estrogen Screen) pour la détection des substances à activité œstrogénique dans les eaux usées.....	13
3.2.1 Vue d'ensemble de la réalisation du test et de l'interprétation des données.....	14
3.2.2 Validation du test.....	15
4 Possibilités d'appréciation de la qualité de l'eau à l'aide des bioessais sélectionnés.....	17
4.1 Détermination du quotient de risque.....	17
4.2 Systèmes d'appréciation envisageables.....	18
4.2.1 Système à trois classes.....	18
4.2.2 Système à cinq classes.....	19
4.2.3 Fonctions de valeur pour l'appréciation de la qualité de l'eau.....	20
5 Conclusions et perspectives.....	21
5.1 Potentialités de la méthode d'appréciation.....	21
5.2 Développements ultérieurs.....	21
6 Références bibliographiques.....	22
7 Listes des figures et tableaux.....	26



7.1	Liste des figures .....	26
7.2	Liste des tableaux.....	27
Annexe 1	Procédures opérationnelles standards (SOPs) pour le prélèvement et le prétraitement des échantillons .....	29
	Échantillonnage.....	29
	Prétraitement des échantillons par extraction en phase solide .....	30
Annexe 2	Informations sur les SOPs relatives aux bioessais.....	31
	Test algues combiné .....	31
	Yeast Estrogen Screen .....	31
Annexe 3	Validation du test algues combiné.....	32
	Introduction.....	32
	Matériel et méthodes.....	33
	Résultats et discussion .....	37
	Synthèse et perspectives .....	40
Annexe 4	Validation du test YES .....	41
	Introduction.....	41
	Matériel et Méthodes.....	42
	Résultats et discussion .....	46
	Résumé .....	49
Annexe 5	Etudes de cas d'application du système d'appréciation .....	50
	Cas n° 1 : Appréciation de l'activité œstrogénique dans les effluents d'épuration et les cours d'eau du canton de Saint-Gall.....	50
	Etude de cas n° 2 : Campagne de mesures au niveau de 12 stations d'épuration et de leurs cours d'eau récepteurs dans le cadre du projet EcolImpact.....	54
Annexe 6	Fonctions de valeur pour l'appréciation de la qualité de l'eau .....	58
	Fonction de valeur et agrégation des données.....	58
	Gestion des incertitudes.....	61



## Abréviations

BPA	Bisphénol A
BEQ	Équivalent bioanalytique ou concentration d'équivalents bioanalytique ( <i>bioanalytical equivalent concentration</i> )
CE	Concentration d'effet ou concentration efficace (effective)
CE <sub>x</sub>	Concentration qui provoque un effet de x%, l'effet maximal étant fixé à 100%
CQC	Critère de qualité « chronique » (également <i>Norme de qualité environnementale en moyenne annuelle, NQE-MA</i> , ou <i>Annual Average Environmental Quality Standard, AA-EQS</i> )
DEQ	Concentration en équivalents diuron ( <i>diuron equivalent concentration</i> )
DO	Densité optique
E1	Estrone
E2	17 $\beta$ -œstradiol
EE2	17 $\alpha$ -éthynylestradiol
EEF	Facteur d'équivalent œstrogénique (17 $\beta$ -œstradiol)
EEQ	Concentration en équivalents 17 $\beta$ -œstradiol ( <i>17<math>\beta</math>-estradiol equivalent concentration</i> )
EQS	<i>Environmental quality standard</i>
ER $\alpha$	Récepteur $\alpha$ des œstrogènes
HCl	Acide chlorhydrique
ISO	Organisation internationale de standardisation
LD	Limite ou seuil de détection
LQ	Limite ou seuil de quantification
MEC	Concentration environnementale mesurée ( <i>measured environmental concentration</i> )
NQE	Norme de qualité environnementale
OEaux	Ordonnance sur la protection des eaux
PSII	Photosystème II
Q <sub>347</sub>	Débit à l'étiage (débit atteint ou dépassé pendant 347 jours par an en moyenne sur dix ans et qui n'est pas influencé de façon notable par la retenue, le prélèvement ou la restitution des eaux)
SMG	Système modulaire gradué
SOP	Procédure opérationnelle standard ( <i>standard operating procedure</i> )
SPE	Extraction en phase solide ( <i>solid phase extraction</i> )
STEP	Station d'épuration des eaux polluées
TEQ	Équivalent toxique ou concentration d'équivalents toxiques ( <i>toxic equivalent concentration</i> )
YES	<i>Yeast Estrogen Screen</i> (test d'œstrogénicité sur levure)





# 1 Introduction

## 1.1 Contexte

La qualité des eaux est habituellement évaluée sur la base d'analyses chimiques en comparant les concentrations mesurées à des critères de qualité individuels déterminés en fonction des effets des substances isolées (Götz et al., 2011). Cette méthode ne peut cependant s'appliquer qu'aux polluants connus pour lesquels des données sont disponibles en qualité et en quantité suffisantes. Pour aller au-delà de cette limite, l'appréciation doit recourir à des méthodes intégratives comme les bioessais écotoxicologiques. Ces derniers permettent de déterminer la toxicité générale de l'eau ou de l'effluent ou de mesurer les effets de groupes de substances apparentées (Fig. 1). Ils donnent ainsi accès à une évaluation de la toxicité des cocktails de produits chimiques tels qu'ils apparaissent dans les matrices environnementales et dont les composants ne peuvent généralement pas être tous identifiés. Les bioessais sont très utiles pour détecter les effets de groupes de substances caractérisées par des critères de qualité en exposition chronique (CQC) très faibles et qui sont très difficilement quantifiables par analyse chimique, comme par exemple les substances à activité œstrogénique.

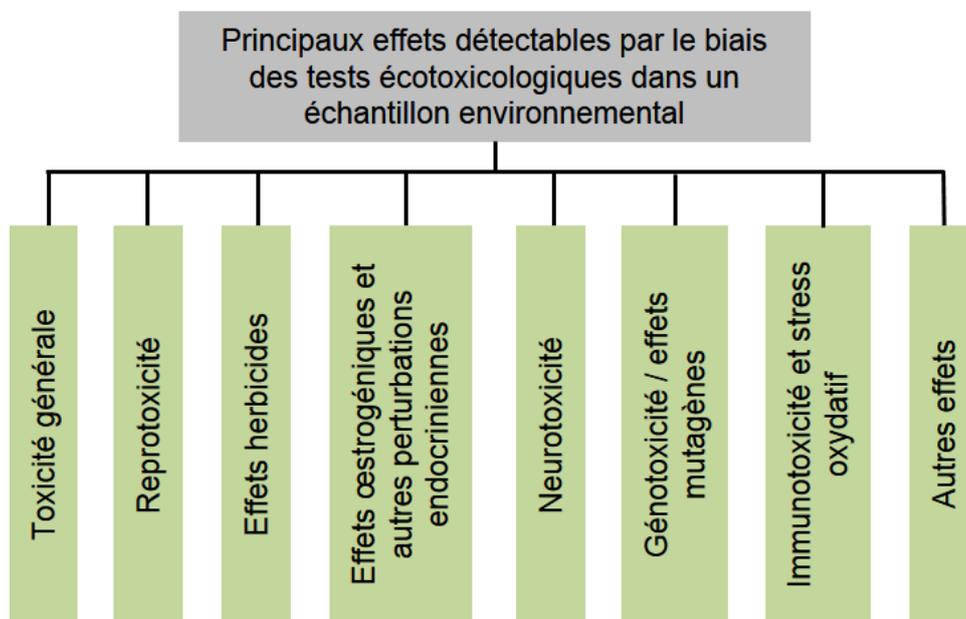


Fig. 1: Principaux effets pouvant être détectés avec les bioessais.

Les bioessais pouvant être utilisés sont plus ou moins nombreux selon l'effet que l'on cherche à détecter. Beaucoup d'entre eux ne sont cependant pas encore normalisés ou sont encore à l'étude et ne sont donc pas encore utilisables dans un cadre réglementaire (Kienle et al., 2015). Un certain nombre ont été évalués, réalisés ou développés dans le cadre des travaux préliminaires à l'élaboration d'un module Écotoxicologie pour le Système modulaire gradué (SMG) de l'OFEV (Schweigert et al., 2001; Escher et Chèvre, 2004; Kienle et al., 2012). Ces tests doivent être relativement simples et bon marché et livrer des résultats robustes, reproductibles et faciles à interpréter. Les évaluations ont montré que certains essais *in vitro* convenaient particulièrement bien aux applications pratiques. Ces tests interviennent principalement au niveau cellulaire et moléculaire et permettent de détecter certains mécanismes d'action bien spécifiques. En complément, de nombreux autres bioessais peuvent être utilisés pour mesurer les effets sur les organismes ou les communautés biotiques. L'étude de Kienle et al. (2015) présente les bioessais actuellement disponibles et utilisables pour l'appréciation de la qualité des eaux.



## 1.2 Cadre juridique

L'Ordonnance suisse sur la protection des eaux (OEaux, RS 814.201) a pour but (art. 1) de préserver les eaux superficielles et souterraines des effets néfastes et d'assurer leur exploitation durable (Schweizerischer Bundesrat, 1998). Les objectifs écologiques sont définis à l'annexe 1 (art. 1(3)). Il y est notamment précisé que les substances parvenant dans le milieu aquatique suite aux activités anthropiques ne doivent avoir d'effets nuisibles ni sur les communautés de végétaux, d'animaux et de microorganismes ni sur l'utilisation des eaux. Les objectifs formulés à l'annexe 1 doivent être pris en compte lors de la réalisation de mesures en vertu de l'OEaux.

## 1.3 Le système modulaire gradué et le module Écotoxicologie

Le projet *Système modulaire gradué* vise à proposer des méthodes standardisées pour l'étude et l'appréciation de l'état des cours d'eau en Suisse. Ces méthodes sont conçues pour évaluer les aspects morphologiques, hydrologiques, biologiques, chimiques et écotoxicologiques de la qualité des eaux en plusieurs étapes correspondant à différents niveaux de détail d'investigation (Liechti et al., 1998). Chaque module vise à répartir les cours d'eau dans différentes classes d'état dans le domaine qui lui est spécifique (<http://www.modul-stufen-konzept.ch>). L'objectif final est d'aboutir à une classification générale intégrant les données de tous les modules (Bundi et al., 2008).

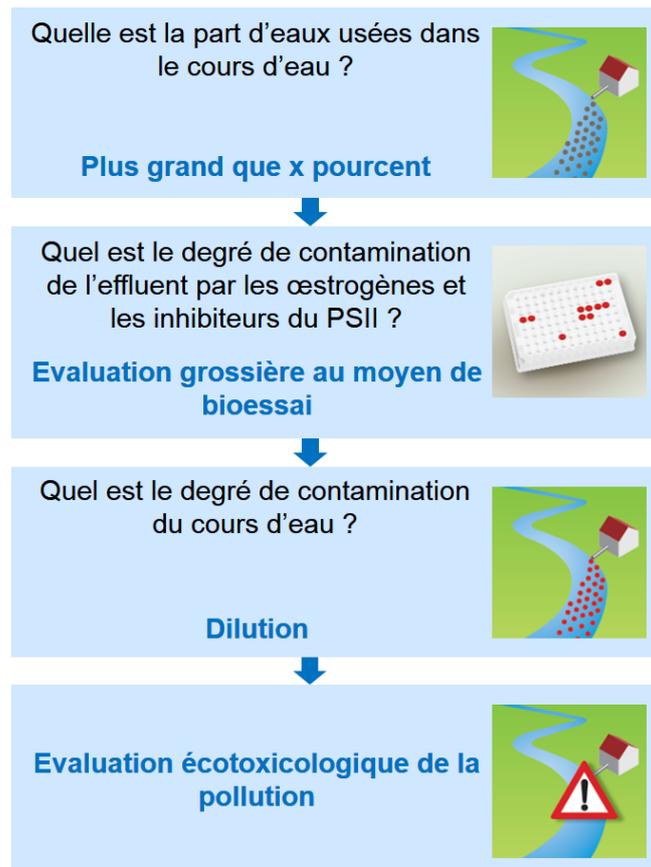
## 1.4 Objectifs

Les travaux effectués dans le cadre du module Écotoxicologie du système modulaire gradué ont pour but d'élaborer un système robuste pour l'évaluation de routine de la qualité des eaux à l'aide de bioessais écotoxicologiques. Les méthodes proposées doivent intervenir en complément de celles des autres modules pour permettre une évaluation des effets possibles des polluants d'origine anthropique sur les communautés de végétaux, d'animaux et de micro-organismes. L'élaboration du module Écotoxicologie s'effectue au Centre Ecotox sous la responsabilité de l'OFEV et les travaux sont supervisés et accompagnés par un groupe d'experts issus de laboratoires privés, de services fédéraux de la protection des eaux et d'organismes de recherche.

## 1.5 Présentation générale de la démarche d'évaluation sommaire des cours d'eau pollués

Le présent rapport décrit une méthode d'évaluation sommaire de la qualité de l'eau dans les cours d'eau pollués par des effluents d'épuration à l'aide de bioessais. La stratégie et les tests proposés ont été choisis pour être utilisés par les services cantonaux, les laboratoires privés et d'autres professionnels de la protection des eaux dans le cadre de l'application des dispositions légales. Priorité a été donnée aux méthodes simples et peu coûteuses dont les résultats étaient faciles à interpréter.

Ce chapitre présente la démarche choisie pour évaluer la qualité de l'eau à partir des résultats d'essais biologiques. Cette démarche s'inspire de celle proposée par Götz et al. (2011) pour l'évaluation au vu des micropolluants issus de l'assainissement communal. Suite aux résultats obtenus dans les études précédentes, il est suggéré de procéder selon les étapes suivantes (Fig. 2).



**Fig. 2: Éléments de la stratégie proposée pour évaluer le degré de contamination par les substances à activité œstrogénique et les inhibiteurs du photosystème II des eaux superficielles recevant des eaux usées (Graphique : Eawag).**

La première étape consiste à estimer le degré de pollution du milieu par les eaux urbaines résiduaires (voir chapitre 2.2.1). Si la part d'effluent dépasse un certain seuil (10%), les eaux usées doivent être analysées à l'aide de bioessais. En considérant les résultats d'études antérieures, nous proposons une solution pragmatique : pour l'évaluation sommaire, les effets de type œstrogène sont mesurés à l'aide du test YES (Yeast Estrogen Screen) avec des levures recombinées et l'inhibition du photosystème II est mesurée à l'aide du test algues combiné. Le degré de pollution du cours d'eau est ensuite déterminé à partir du taux de dilution des effluents dans le milieu récepteur (voir chapitre 2.2.2).

La description détaillée de la démarche s'articule autour des chapitres suivants :

- Échantillonnage : prélèvement, transport, stockage et préparation des échantillons (chapitre 2),
- Méthodes bioanalytiques d'évaluation de la qualité de l'eau : critères de sélection des tests, réalisation des essais, interprétation des résultats (chapitre 3),
- Possibilités d'appréciation de la qualité de l'eau à l'aide des bioessais sélectionnés (chapitre 4),
- Perspectives (chapitre 5).



## 2 Prélèvement et préparation des échantillons

### 2.1 Vision synoptique de la démarche

La Fig. 3 présente de façon synoptique les différentes étapes de traitement subies par les échantillons entre leur prélèvement et leur analyse.

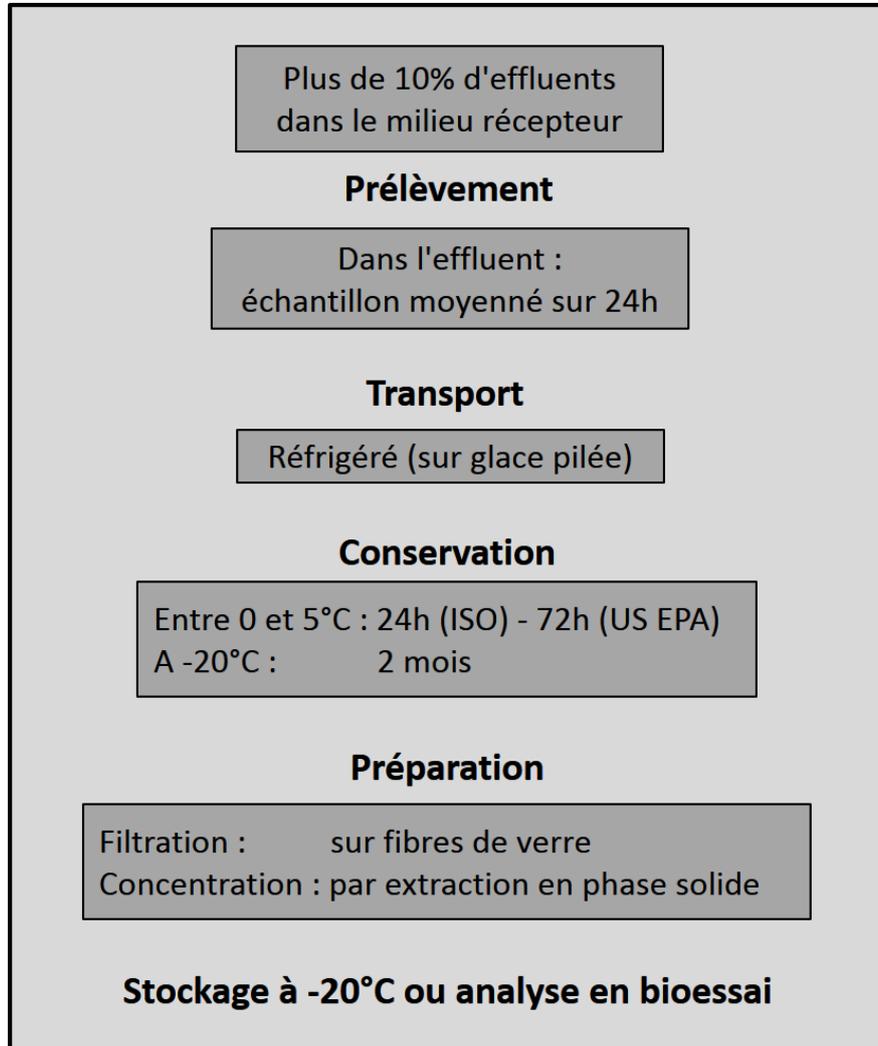


Fig. 3: Vision synoptique de la démarche de prélèvement et de préparation des échantillons

### 2.2 Échantillonnage

Le but de l'échantillonnage est de prélever une partie représentative de la masse d'eau à étudier puis de conserver et de stocker les échantillons de façon à ce que la composition chimique et les propriétés de leur eau reflètent, au moment de l'analyse, celles du milieu dont ils sont extraits (Homazava, 2009). La stratégie d'échantillonnage varie en fonction de la matrice à étudier. Pour l'évaluation des cours d'eaux pollués dont il est question dans la présente méthode d'appréciation, ce sont surtout les eaux usées qui sont pertinentes. La stratégie recommandée est brièvement exposée dans les pages qui suivent. Pour une description plus détaillée, il est recommandé de se référer au rapport de Götz et al. (2011) et à la norme ISO 5667-10 relative à l'échantillonnage des eaux résiduaires (International Organization for Standardization, 1992).



### 2.2.1 Sélection des tronçons d'étude

Les tronçons dans lesquels il est pertinent d'effectuer des prélèvements peuvent être sélectionnés selon la méthode proposée par Götz et al. (2011) en déterminant le degré de dilution des effluents dans le cours d'eau au débit d'étiage ( $Q_{347}$ ). L'expérience acquise jusqu'à présent avec l'évaluation par substances individuelles a montré que la part d'effluents dans le milieu récepteur devenait problématique à partir de 10%.

### 2.2.2 Prélèvements dans les effluents d'épuration

Si les échantillons sont prélevés dans les eaux résiduaires rejetées par les stations d'épuration, le degré de pollution du cours d'eau récepteur peut être extrapolé à partir du degré de dilution de ces effluents (Götz et al., 2011). Il est alors impératif de connaître les flux hydriques, c'est-à-dire les débits journaliers dans le cours d'eau et en sortie de STEP. Il est également possible, notamment dans le cas d'échantillons ponctuels, d'estimer le degré de dilution en mesurant la conductivité dans l'effluent et dans le cours d'eau en amont et en aval de la STEP.

La méthode recommandée pour l'échantillonnage des effluents est le prélèvement d'échantillons moyennés sur une certaine période de temps. En général, les stations d'épuration sont équipées d'échantillonneurs automatiques installés à leur sortie. A des fins d'autocontrôles ou de surveillance par les autorités, des échantillons composites sont collectés quotidiennement sur 24h. Ils peuvent également être utilisés pour les bioessais.

Il convient d'accorder une attention particulière au choix du flaconnage. Un matériau en verre (si possible brun) ou en téflon (polytétrafluoroéthylène, PTFE) est ainsi recommandé pour les échantillons renfermant des polluants organiques (comme les substances à activité œstrogénique ou les inhibiteurs du PSII) (International Organization for Standardization, 1998; US EPA, 2005). Les flacons doivent être rincés plusieurs fois avec de l'acétone puis avec l'échantillon (voir également Van der Linden et al. (2008) et Annexe 1). Pour éviter toute contamination avec des substances à activité œstrogénique à partir des matières plastiques lors du prélèvement ou du transport des échantillons, des précautions particulières doivent être prises (voir Procédure opérationnelle standard (SOP) de l'échantillonnage pour le test YES à l'Annexe 1). Le rapport de Kienle et al. (2012) livre également des informations détaillées à ce sujet.

## 2.3 Transport et stockage des échantillons

La norme ISO 5667 (International Organization for Standardization, 2003) et le rapport de Götz et al. (2011) fournissent des instructions détaillées quant au transport et au stockage des échantillons.

Une fois prélevés, ces derniers doivent être immédiatement réfrigérés (sur de la glace pilée) et transportés le plus rapidement possible au laboratoire.

Les échantillons doivent être, si possible, traités et analysés dès leur arrivée au laboratoire. Si les conditions ne le permettent pas, ils peuvent être conservés pendant 24h à l'obscurité entre 0 et 5°C (International Organization for Standardization, 1998). La durée maximale de stockage dépend généralement des substances à analyser (International Organization for Standardization, 1992). Les œstrogènes, par exemple, se dégradent ou se transforment très rapidement (en l'espace de quelques heures) alors que les inhibiteurs du PSII sont généralement plus stables. L'Agence environnementale américaine (EPA) considère que le stockage peut être prolongé jusqu'à une durée de 72h dans certains cas exceptionnels (US EPA, 2002). S'ils sont stockés à moins 20°C, les échantillons peuvent se conserver pendant deux mois au maximum (International Organization for Standardization, 1998).

Contrairement aux analyses chimiques (en particulier des anions, de l'ammonium et des phosphates), les bioessais n'exigent pas de préfiltration avant le stockage (International Organization for Standardization, 2003). La filtration peut être effectuée après décongélation, avant l'étape d'extraction.



## 2.4 Préparation des échantillons

Avant de pouvoir être analysés, les échantillons d'eau doivent tout d'abord être filtrés afin de les débarrasser d'éventuelles particules solides. Il est recommandé d'utiliser un filtre en fibres de verre (comme l'APFD 09050, 1  $\mu\text{m}$ , de Millipore, par exemple) (Homazava, 2009). Lors du choix des filtres et du matériel entrant en contact avec les échantillons au cours de leur préparation, il est primordial de privilégier les matériaux inertes afin d'éviter toute contamination par des substances à activité œstrogénique et toute adsorption de polluants. De manière générale, les filtres en fibres de verre et les équipements en téflon, en verre ou en inox peuvent être utilisés. Les matières plastiques sont déconseillées étant donné qu'elles peuvent contenir des substances à activité œstrogénique. Les mêmes précautions doivent être prises pour le choix des solvants qui ne doivent en aucun cas contenir des perturbateurs endocriniens comme certains filtres UV par exemple. Le Centre Ecotox peut être consulté pour toute question relative aux matériaux.

Une fois filtrés, les échantillons sont ensuite concentrés par une méthode d'extraction adéquate. L'extraction en phase solide (Liška, 2000) et l'extraction liquide-liquide (Liquid Liquid Extraction, LLE) (Blumberg, 1988) livrent des résultats reproductibles et de bonne qualité pour un investissement relativement modéré. Le bioessai avec les algues peut également être réalisé avec des échantillons d'effluent de STEP non concentrés. En revanche, pour l'analyse des effluents de STEP à l'aide du test YES, il est toujours nécessaire de passer par une méthode d'enrichissement.

Pour déterminer le degré de pollution des effluents par les substances à activité œstrogénique et les inhibiteurs du PSII à l'aide de bioessais *in vitro*, nous recommandons l'**extraction en phase solide (SPE)**. C'est aujourd'hui la méthode la plus utilisée dans le monde pour concentrer les substances organiques dans les échantillons d'eau. En l'occurrence, les polluants sont séparés entre une phase aqueuse et un matériau de sorption solide approprié, qui retient sélectivement les substances organiques. Le choix de l'adsorbant et du solvant d'élution a une influence décisive sur le taux de récupération. De même, les propriétés physico-chimiques de l'eau comme par exemple sa teneur en acides humiques, en argiles et en sels dissous influent aussi bien sur le taux de récupération que sur la reproductibilité des résultats de l'extraction et doivent donc être pris en compte (et, le cas échéant, être analysés à l'aide de standards) lors de l'étude d'échantillons d'origines diverses (Homazava, 2009). Le protocole exact de l'extraction en phase solide est décrit dans une fiche technique du Centre Ecotox (Ecotox Centre, 2015) (voir informations fournies à l'Annexe 1).



### 3 Tests recommandés pour l'évaluation de la pollution de l'eau par les substances à activité œstrogénique et les inhibiteurs du photosystème II

Plusieurs types de bioessais peuvent être utilisés pour une appréciation intégrée de la qualité de l'eau. La méthode d'évaluation sommaire proposée ici se concentre sur ceux portant sur les substances à activité œstrogénique et les inhibiteurs du photosystème II. Les raisons de ce choix sont exposées ci-après.

#### Encadré 1 : Pourquoi les œstrogènes ?

Le groupe d'accompagnement du module Écotoxicologie a jugé pertinent de se concentrer sur la recherche des substances à activité œstrogénique en raison de leur impact sur la capacité de reproduction des poissons (Kidd et al., 2007), de leur présence potentielle en Suisse à des concentrations pouvant avoir un effet sur la vie aquatique (Vermeirssen et al., 2005) et de la difficulté avec laquelle ils peuvent être détectés par les analyses classiques (Götz et al., 2011). Les critères de qualité écotoxicologiques qui ont été déterminés pour apprécier la qualité de l'eau à partir de l'analyse individuelle des polluants ont des valeurs inférieures à 1 ng/l pour les composés particulièrement actifs comme le 17 $\alpha$ -éthynylestradiol (EE2) (voir également <http://www.centrecotox.ch/prestations-expert/criteres-de-qualite-environnementale>). Ces critères de qualité sont donc difficiles à contrôler par le biais d'analyses chimiques. De plus, les analyses individuelles sont dans l'incapacité de prendre en compte les effets des cocktails de substances (Kase et al., 2011; Junghans et al., 2013). Les méthodes d'évaluation du risque uniquement basées sur l'analyse chimique sont donc peu appropriées pour l'étude des matrices environnementales. Il apparaît alors pertinent de mesurer l'activité œstrogénique à l'aide de bioessais qui ont la particularité de prendre en compte toutes les substances ayant le même mécanisme d'action en indiquant un effet global.

En Suisse, les principales substances à activité œstrogénique présents à des concentrations préoccupantes pour l'environnement sont le 17 $\alpha$ -éthynylestradiol, le 17 $\beta$ -œstradiol, l'estrone, le bisphénol A et le nonylphénol (Gälli et al., 2009, par exemple).

#### Encadré 2 : Pourquoi les algues et les inhibiteurs du photosystème II ?

Ces herbicides ont été choisis parce qu'ils représentent, en Suisse, l'un des principaux groupes de polluants affectant les producteurs primaires de façon spécifique. Les algues et les plantes vasculaires qui appartiennent à cette catégorie d'organismes biologiques se situent à la base de la chaîne alimentaire et remplissent des fonctions élémentaires comme la production d'oxygène tout en servant de nourriture aux organismes des niveaux trophiques supérieurs comme les daphnies ou les poissons. Une perturbation de leurs fonctions vitales par des inhibiteurs du photosystème II peut donc avoir de graves conséquences sur tout le réseau trophique (Ralph et al., 2007, p. ex.). En inhibant la photosynthèse, ces herbicides ont non seulement une action directe sur la croissance des végétaux mais ils affectent également leurs capacités de résistance aux stress (Ralph et al., 2007).

Ce groupe d'herbicides compte notamment l'atrazine, le diuron, l'isoproturon, l'irgarol, la simazine, la terbutryne et la terbutylazine. Ces composés sont aussi bien phytosanitaires que biocides et peuvent être émis de façon diffuse ou ponctuelle dans le milieu aquatique. Leur taux d'élimination dans les STEP classiques est beaucoup plus faible que celui des œstrogènes (Kienle et al., 2011; Abegglen et Siegrist, 2012, p. ex.). L'activité photosynthétique est donc un paramètre global qui appréhende tous les herbicides ayant ce mode d'action et qui peut donc être utilisé pour évaluer les mélanges de substances. De plus, le test algues réagit également aux composés dont la fonction primaire n'est pas herbicide, comme le triclosane, certains médicaments et certains métaux (Kühn et Pattard, 1990; Yang et al., 2008; Hall et al., 2009).

Les inhibiteurs du PSII sont régulièrement détectés à des concentrations préoccupantes pour l'environnement dans les eaux suisses (Wittmer et al., 2010; Wittwer et Gubser, 2010, p. ex.).



Les bioessais sélectionnés pour l'évaluation sommaire de la qualité de l'eau devaient être :

- adaptés à l'étude des matrices environnementales (eaux de surface et eaux usées),
- sensibles,
- robustes,
- déjà bien validés et standardisés,
- abordables et facilement utilisables dans les contrôles de routine,
- utilisables dans les laboratoires publics et privés de contrôle de la qualité des eaux.

Dans les pages qui suivent, deux tests sont présentés pour, respectivement, l'évaluation de la pollution par les inhibiteurs du PSII et par les substances à activité œstrogénique :

- un test algues combiné mesurant les effets des inhibiteurs du PSII,
- un test avec des cellules de levure génétiquement modifiées, comme le test YES (Yeast Estrogen Screen), mesurant les effets des substances à activité œstrogénique.

Plusieurs études ont démontré la qualité des deux bioessais pour la mesure des effets cités dans les eaux résiduaires aussi bien en Suisse (Vermeirssen et al., 2005; Escher et al., 2008b; Kienle et al., 2011; Kienle et al., 2012, p. ex.) qu'à l'étranger (Legler et al., 2002; Murk et al., 2002; Leusch, 2008; Leusch et al., 2010; Struijs et al., 2010, p. ex.). Celui portant sur les substances à activité œstrogénique présente par ailleurs une bonne corrélation avec d'autres tests effectués *in vitro* (augmentation de la concentration en vitellogénine, un précurseur de la protéine du jaune d'œuf (vitellus), dans le sang des poissons mâles ou juvéniles) (Vermeirssen et al., 2005; Kunz et al., 2006; Kienle et al., 2011, p. ex.).

Les deux tests se trouvent actuellement en phase préparatoire ou en cours de normalisation au niveau de l'Organisation internationale de standardisation (ISO). Il existe pour chacun d'eux plusieurs variantes qui se basent sur le même principe mais se distinguent dans les détails. Il est encore impossible de savoir laquelle de ces variantes sera finalement certifiée. Le choix définitif des tests ne pourra donc se faire qu'une fois les procédures de normalisation achevées. Dans les pages qui suivent, nous vous décrivons les variantes pour lesquelles une certaine expérience a déjà été acquise en Suisse. Les tests présentés sont actuellement utilisés sous cette forme au Centre Ecotox et sont cités tels quels dans diverses études (dans le contrôle de l'ozonation des eaux résiduaires à l'échelle du laboratoire (Schindler Wildhaber et al., 2015), un projet actuel de la VSA, ou dans le projet EcoImpact de l'Eawag sur l'évaluation de l'impact des effluents d'épuration sur les écosystèmes aquatiques : <http://www.eawag.ch/de/forschung/wasser-fuer-die-oekosysteme/schadstoffe/ecoimpact/>, p.ex.).

Les tests proposés sont brièvement présentés au Tab. 1 avant d'être décrits plus en détail dans les chapitres 3.1 et 3.2. Un protocole détaillé des bioessais est indiqué dans les SOPs correspondantes (voir informations à l'Annexe 2). Les informations relatives à la validation des deux tests sont rassemblées dans les annexes Annexe 3 et Annexe 4.



**Tab. 1 : Présentation synoptique du test algues combiné et du test YES**

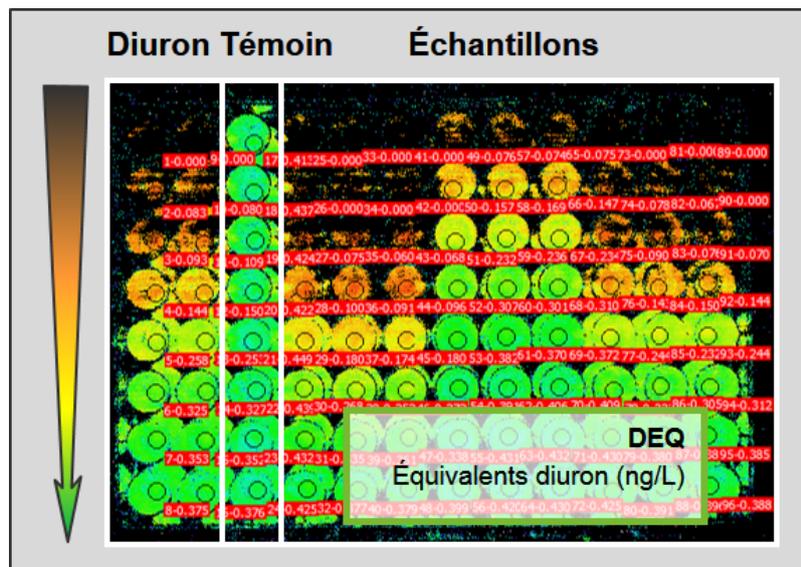
CE : concentration efficace, BEQ : équivalent bioanalytique

Test	Test algues combiné	Yeast Estrogen Screen (YES)
<b>Effet mesuré</b>	Inhibition de la photosynthèse et de la croissance	Activation du récepteur humain des œstrogènes
<b>Domaine d'application</b>	Effluents de STEP Eaux superficielles polluées	Effluents de STEP
<b>Informations générales</b>		
<b>Organismes exposés</b>	Algues vertes unicellulaires	Cellules de levure de boulanger génétiquement modifiée
<b>Principe</b>	Mesure de l'impact de l'échantillon sur l'activité photosynthétique et la croissance des algues	Mise en évidence de l'activation du récepteur humain $\alpha$ des œstrogènes par les substances à activité œstrogénique
<b>Paramètres d'effet</b>	CE <sub>x</sub> , BEQ	CE <sub>x</sub> , BEQ
<b>Conditions de culture et durée</b>		
<b>Stockage des organismes /ou des cellules</b>	En culture sur agar-agar entre 0 et 5°C pour une durée maximale de 6 mois	En cryoculture à -20°C pour une durée maximale de 4 mois A -80°C pour une durée maximale d'un an
<b>Support</b>	Plaques 96 puits	Plaques 96 puits
<b>Préculture à l'issue du stockage</b>	5 jours	Au moins 1 jour (avant chaque test)
<b>Durée du test (à compter de la mise en contact avec l'échantillon)</b>	24 heures	72 heures
<b>Coûts</b>		
<b>Appareillage</b>	Env. 80'000 CHF (équipement courant de laboratoire compris) (+ env. 20'000 CHF pour le lecteur de microplaques et la hotte à flux laminaire) (Estimation du Centre Ecotox)	Env. 44'000 CHF (équipement courant de laboratoire compris) (+ env. 20'000 pour le lecteur de microplaques et la hotte à flux laminaire) (Estimation du Centre Ecotox)
<b>Coûts/échantillon</b> (3 réplicats techniques et 8 dilutions, pré-concentration non comprise)	Env. 350 / 500 CHF (Centre Ecotox)	Env. 350 / 500 CHF (Centre Ecotox)



### 3.1 Test algues combiné pour les inhibiteurs du PSII

Le test algues combiné est réalisé avec des algues unicellulaires de l'espèce *Raphidocelis subcapitata* (nom ancien: *Pseudokirchneriella subcapitata*). Il permet de mesurer les effets d'une pollution du milieu sur la photosynthèse algale. Ces effets causés de façon spécifique par les herbicides et autres composés ayant le même mode d'action (inhibition du photosystème II) se manifestent très rapidement (au bout de quelques minutes à peine). Ce paramètre est mesuré deux heures après le début du test. Au bout de 24h, des effets sur la croissance sont également mesurables (taux de multiplication des cellules). Trop généraux, ils ne peuvent cependant pas être utilisés comme indicateurs de la pollution du milieu par les inhibiteurs du PSII et seule l'inhibition de la photosynthèse intervient dans l'appréciation de la qualité de l'eau. Étant donné, cependant, que les deux types d'effets sont mesurés en parallèle dans le test, la méthodologie présentée ci-après les concernera tous deux. La Fig. 4 présente un exemple de test sur une microplaque.



**Fig. 4: Test algues combiné : plaque de mesure du rendement quantique de la photosynthèse.**

Les deux premières colonnes correspondant à une série de dilution 1:2 du diuron, la substance de référence. La troisième colonne est la colonne témoin, elle ne comprend que du milieu sans substance toxique. Les colonnes 4-12 correspondent à des séries de dilution 1:2 d'extraits de trois échantillons différents comportant trois réplicats techniques. Plus la coloration est sombre, plus le rendement quantique est faible. Une coloration verte indique l'absence d'inhibition de la photosynthèse. Les effets des échantillons environnementaux sont déterminés en relation avec la substance de référence et exprimés en équivalents diuron (DEQ) (ng/l).

Ce test est rapide et facile à réaliser. Il est donc particulièrement adapté aux contrôles de routine effectués par les laboratoires cantonaux ou privés. Sa réalisation en plaques 96 puits et en seulement 24h le rendent très intéressant par rapport au test d'inhibition de la croissance algale certifié par l'ISO et l'OCDE qui s'effectue en erlenmeyer et demande 72h (OECD, 2006; International Organization for Standardization, 2012). Il convient cependant de noter que le test algues combiné ne permet ni de détecter les effets des substances dont la toxicité ne se manifeste qu'après 24h d'exposition ni de rendre compte d'une éventuelle récupération des organismes. En portant à la fois sur la croissance et sur la photosynthèse, il présente toutefois l'avantage de détecter plusieurs modes d'action différents, ce qui est très intéressant pour la surveillance environnementale. Par ailleurs, la mesure de l'inhibition du PSII s'est jusqu'à présent révélée souvent plus sensible que celle de la croissance. Bien que le test ne soit pas encore certifié, une grande expérience a déjà été acquise à son sujet en Suisse (Escher et al., 2005; Schreiber et al., 2007; Escher et al., 2008a; Escher et al., 2009; Vermeirssen et al., 2010; Kienle



et al., 2011), en Angleterre et en Australie (Bengtson Nash et al., 2005; Bengtson Nash et al., 2006; Macova et al., 2010; Reungoat et al., 2010) et, avec une approche très similaire, aux Pays-Bas (Struijs et al., 2000; Durand et al., 2009; Struijs et al., 2010; van der Grinten et al., 2010). La certification ISO d'un test algues miniaturisé avec l'algue verte unicellulaire *Raphidocelis subcapitata* est actuellement en préparation.

Les chapitres qui suivent décrivent brièvement la réalisation du test, l'interprétation des résultats et la validation de l'essai.

### 3.1.1 Vue d'ensemble de la réalisation du test et de l'interprétation des données

#### Organismes exposés

Les algues proviennent de la Collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires (DSMZ, Göttingen, Allemagne). Avant les essais, les cellules algales sont pré-cultivées dans un milieu de culture pendant cinq jours à 25°C sur une table d'agitation orbitale.

#### Réalisation du test

L'essai est réalisé dans des plaques de microtitration 96 puits selon la méthode de Schreiber et al. (2007) et d'Escher et al. (2008a). La substance de référence utilisée est le diuron, un herbicide qui inhibe la photosynthèse de façon spécifique. Le témoin négatif ou blanc est une solution pure de milieu de culture et le témoin solvant une solution d'éthanol. La substance de référence est testée en double (duplicat) et les échantillons environnementaux en double ou en triple (duplicat ou triplicat) dans des gammes de dilution 1 :2 en partant d'une concentration de  $3 \times 10^{-7}$  M de diuron dans l'éthanol (soit 69'900 ng/l). Après évaporation totale du solvant, les substances sont reprises dans 150 µl de milieu de culture algale.

En raison de la forte variabilité potentielle de la pollution du milieu, nous recommandons d'effectuer un test préalable pour déterminer le domaine de concentration des échantillons à utiliser pour l'essai. Ce test préliminaire peut être effectué avec un seul réplicat par concentration. Le facteur de préconcentration des échantillons peut aller de 80-200 (eaux usées) à plus de 400 (eau de rivière) tandis que les échantillons de milieux très pollués peuvent être utilisés tels quels.

Pour terminer, les algues sont ajoutées dans les puits à raison de 150 µl de culture algale de densité optique 0,1 ( $DO_{685}$ ) par puit. L'inhibition de la photosynthèse est mesurée au bout de 2 et 24h par le rendement quantique effectif (ou de fluorescence) ( $Y$ ) après excitation lumineuse avec un Imaging-PAM Maxi (Walz, Effeltrich, Allemagne) (voir également Escher et al. (2008b) et Schreiber et al. (2007)). Le taux de croissance des algues peut être déterminé par la mesure de la densité optique à 685 nm ( $DO_{685}$ ) à intervalles réguliers (à temps 0 et 24h et à deux moments intermédiaires) à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaque (comme le Synergy 2, Biotek, Winooski, USA, par exemple).

#### Interprétation des données

Pour quantifier l'inhibition de la photosynthèse, les résultats sont convertis en équivalents bioanalytiques (BEQ) (aussi nommé équivalents toxiques (TEQ) selon le paramètre d'effet considéré). Le BEQ est défini comme la concentration de substance de référence qui produit le même effet que l'échantillon considéré (Escher et al., 2008a; Escher et al., 2015, p. ex.). Les substances de référence varient en fonction de la nature des effets étudiés. Ce système permet d'exprimer l'efficacité d'un mélange par la concentration d'une substance de référence donnée. Plus le BEQ est élevé, plus l'effet de l'échantillon est forte. Dans notre essai, les données recueillies sont converties en équivalents diuron (ng/l DEQ) en tenant compte de la dilution employée. Les données sont ensuite traitées par Excel et un programme statistique adapté (GraphPad Prism 5 Software, La Jolla, California, USA, p. ex.) en établissant des courbes dose-réponse pour la substance de référence et les échantillons.



### 3.1.2 Validation du test

#### Limites de détection et de quantification

Grâce à l'extraction en phase solide, le test algues combiné peut atteindre une limite de détection de 1-2 ng/l de diuron ou de DEQ ainsi qu'une limite de quantification d'en moyenne 3-6 ng/l de diuron ou de DEQ. Sans préconcentration, la limite de détection est en moyenne de  $185 \pm 85$  ng/l diuron / DEQ ( $n = 91$  tests réalisés en 2014 au Centre Ecotox) et la limite de quantification de  $632 \pm 277$  ng/l diuron / DEQ (voir résumé, Tab. 2). La concentration efficace ( $CE_{50}$ ) du diuron était en moyenne de  $1,86 \times 10^{-8}$  M diuron (intervalle de confiance de 95% =  $1,74 \times 10^{-8}$  à  $2,02 \times 10^{-8}$  M).

**Tab. 2 : Limites de détection et de quantification du test algues combiné.**

DEQ = équivalents diuron, SPE = extraction en phase solide.

	Lim. de détection	Lim. de quantification
Sans préconcentration	$185 \pm 85$ ng/l DEQ	$632 \pm 277$ ng/l DEQ
Avec SPE (concentration x 100 à 200)	1 - 2 ng/l DEQ	3 - 6 ng/l DEQ

#### Reproductibilité

Pour déterminer la reproductibilité des résultats, les mesures ont été effectuées quatre fois dans la même journée ainsi qu'à cinq jours différents sur un même échantillon. Ce test a été effectué avec des extraits reconstitués d'échantillons d'eau. Ils sont constitués en ajoutant du diuron ou un mélange de quatre inhibiteurs du PSII à de l'éthanol (sans extraction en phase solide/SPE). La variabilité des valeurs de DEQ obtenues avec les extraits reconstitués dans le cadre du test algues combiné était de l'ordre de 5 à 11% (voir Tab. 18, Annexe 3).

#### Rendement de récupération

Pour déterminer le rendement de récupération ou recouvrement, le test algues combiné a été réalisé avec des extraits reconstitués d'échantillons d'eau et avec des extraits préparés par SPE d'eau ultrapure et d'eau usée additionnés de diuron ou d'un mélange de quatre inhibiteurs du PSII.

*Extraits d'échantillons d'eau et d'eau ultrapure :* Le recouvrement de 50, 500 et 1000 ng/l de diuron ou de DEQ dans les extraits reconstitués d'échantillons d'eau et dans les extraits par SPE d'eau ultrapure se situait entre 75 et 102% (par rapport à la concentration mesurée par analyse chimique).

*Eau usée :* Entre 99 et 125% du diuron ajouté a été retrouvé dans les extraits d'eau usée obtenus par SPE. Calculé par rapport aux concentrations de DEQ mesurées grâce au bioessai dans les échantillons d'eau ultrapure additionnés de diuron (résultats de l'analyse chimique : 96, 460 et 952 ng/l, résultats du biotest : 44, 365 et 755 ng/l), le rendement de récupération du test algues combiné était compris entre 112 et 147%.

#### Variabilité totale (extraction en phase solide + bioessai)

La variabilité totale a été déterminée à partir des résultats obtenus après extraction en phase solide d'une eau ultrapure additionnée de diuron ou d'un mélange de quatre inhibiteurs du PSII et d'une eau usée puis réalisation du test algues combiné.

*Eau ultrapure :* Une variabilité totale de 7 à 17% a été mesurée dans les valeurs de DEQ obtenues avec les échantillons faiblement ou fortement chargés en polluants (respectivement 50 et 500 ng/l de diuron ou de DEQ). La variabilité était comparable dans les deux types d'échantillons.

*Eau résiduaire :* Dans l'effluent, la variabilité totale des valeurs de DEQ était de 10%.



Le Tab. 3 récapitule les données concernant la validation du test. Pour plus de détails, reportez-vous à l'Annexe 3.

**Tab. 3 : Récapitulation des données concernant la validation du test algues combiné.**

E.R. = eau résiduaire, n = nombre de répétitions par concentration, nd = non déterminé, SPE = extraction en phase solide.

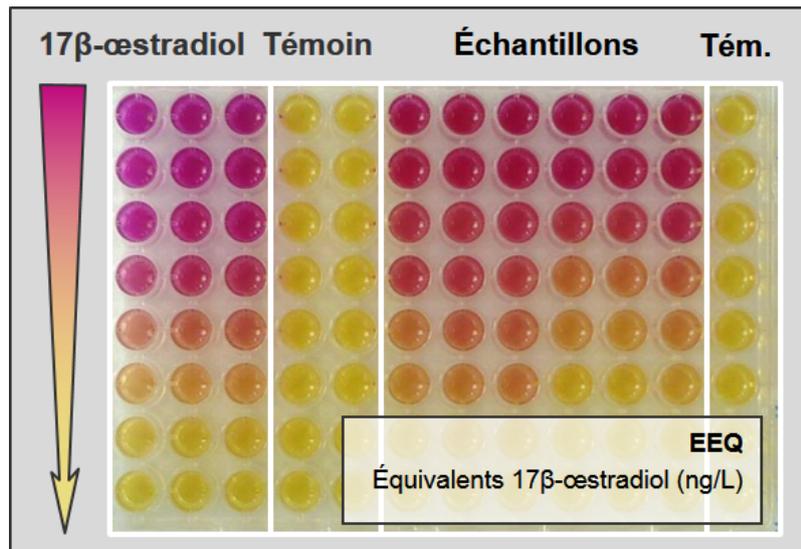
		Reproductibilité (n = 8 pour l'éthanol et 4 pour l'eau ultrapure)	Récupération Bioessai (n = 8 resp. 5 (E.R.))	Variabilité totale (n = 4 resp. 10 (E.R.))
Éthanol ou eau ultrapure	Faible niveau de concentration	5 - 15%	75 - 98%	7 - 15%
(additionnés de diuron ou d'inhibiteurs du PSII)	Niveau de concentration moyen à fort	5 - 17%	82 - 102%	10 - 17%
Eau résiduaire (additionnée de diuron)		nd	104 - 125% (par rapport à l'analyse chimique) 112 - 147% (mesurée en bioessai*)	10%

\* Par rapport aux valeurs mesurées dans le bioessai avec l'eau ultrapure additionnée de diuron

### 3.2 Test YES (Yeast Estrogen Screen) pour la détection des substances à activité œstrogénique dans les eaux usées

Réalisé avec des cellules de levure de boulanger génétiquement modifiée (*Saccharomyces cerevisiae*), le test YES (Yeast Estrogen Screen), parfois appelé test d'œstrogénicité sur levure, permet de déterminer l'activité œstrogénique d'un échantillon (Routledge et Sumpter, 1996). Il convient tout particulièrement à l'évaluation des échantillons d'eaux usées. D'une grande simplicité, le test YES est utilisé depuis plus de dix ans en Suisse et jouit d'une grande popularité dans le monde entier. Il se caractérise par de faibles coûts d'entretien et d'utilisation, une grande simplicité d'apprentissage et une large disponibilité des organismes à exposer. Il a déjà été employé dans divers projets pour détecter la présence des substances à activité œstrogénique dans les effluents et le milieu naturel (Murk et al., 2002; Vermeirssen et al., 2005; Leusch et al., 2010; Kienle et al., 2011; Stalter et al., 2011, p. ex.). Une procédure de normalisation ISO a été lancée.

La Fig. 5 présente un exemple de test YES sur une plaque de microtitration.



**Fig. 5 : Test YES (Yeast Estrogen Screen) : plaque de mesure de l'activité œstrogénique.**

Les trois premières colonnes de puits renferment une gamme de dilution 1 : 2 de la substance de référence 17 $\beta$ -œstradiol. Les colonnes 4, 5 et 12 correspondent au témoin et ne contiennent que du milieu de culture. Les puits des colonnes 6 à 11 renferment des extraits d'échantillons environnementaux étudiés en trois réplicats techniques dans une gamme de dilution 1 : 2. L'activité œstrogénique est d'autant plus forte que la coloration est foncée, le jaune indiquant l'absence d'une telle activité. Les effets mesurés dans les échantillons sont déterminés en relation avec la substance de référence et exprimés en équivalents 17 $\beta$ -œstradiol (EEQ) (ng/l).

Les chapitres qui suivent décrivent brièvement la réalisation du test, l'interprétation des résultats et la validation de l'essai.

### 3.2.1 Vue d'ensemble de la réalisation du test et de l'interprétation des données

#### Organismes exposés

Les cellules de levure génétiquement modifiées viennent du laboratoire de John Sumpter (Brunel University, Uxbridge, UK). En Suisse, elles peuvent être obtenues *via* le Centre Ecotox. Avant les essais, les levures sont pré-cultivées dans un milieu de culture (milieu minimum) pendant 24h à 30°C sur une table d'agitation orbitale.

#### Réalisation du test

Le test est réalisé dans des plaques de microtitration 96 puits selon la méthode de Routledge et Sumpter (1996) et d'Escher et al. (2008b). La substance de référence est l'œstrogène 17 $\beta$ -œstradiol (E2). Le témoin négatif est une solution pure de milieu de culture et le témoin solvant une solution d'éthanol. Le jour de l'essai, la substance de référence et les échantillons d'intérêt sont, comme dans le test algues, injectés dans les puits à l'aide d'une micropipette en deux ou trois gammes parallèles de dilution 1 : 2 (duplicats ou triplicats). Les concentrations de 17 $\beta$ -œstradiol utilisées dans le test vont de 1,25 x 10<sup>-9</sup> à 9,77 x 10<sup>-12</sup> M 17 $\beta$ -œstradiol (soit 341 à 2,7 ng/l).

Comme pour le test algues, il est recommandé d'effectuer des essais préliminaires pour déterminer le domaine de concentration à atteindre dans les échantillons d'eau pour la réalisation optimale du test. Les échantillons doivent être concentrés d'un facteur allant de 20-150 (effluents) à 400 (eau de rivière). Les eaux résiduaires très polluées (à partir de 9 ng EEQ/l) peuvent éventuellement être étudiées sans concentration préalable.



Après pipetage des échantillons, le solvant est mis à évaporer sous une hotte à flux laminaire. Parallèlement, la densité de cellules est déterminée dans les précultures de levure et le milieu de culture est préparé pour le test. Ce milieu est ensuite enrichi de  $4 \times 10^7$  cellules de levure. La suspension de levures est alors injectée dans les puits au moyen d'une micropipette (200  $\mu$ l/puits) et la microplaque est mise à incuber à 30°C.

Au bout de 72h, la densité de cellules est déterminée par mesure de la densité optique à 620 nm ( $DO_{620}$ ) et la coloration des échantillons par la mesure de la densité optique à 540 nm ( $DO_{540}$ ) à l'aide d'un spectrophotomètre de microplaque (comme le Synergy 2, Biotek, Winooski, USA, par exemple).

### Interprétation des données

Comme dans le test algues, les effets mesurés dans le test YES sont exprimés sous la forme d'équivalents bioanalytiques. L'activité œstrogénique observée est rapportée à celle de la substance de référence des œstrogènes, le 17 $\beta$ -œstradiol, et ainsi convertie en équivalents 17 $\beta$ -œstradiol (EEQ). Les concentrations d'EEQ déterminées sont exprimées en ng/l en tenant compte du facteur de dilution respectif de l'échantillon. Comme avec le test algues, les données sont ensuite traitées par Excel et un programme statistique adapté.

## 3.2.2 Validation du test

### Limites de détection et de quantification

Grâce à l'extraction en phase solide, le test YES peut atteindre une limite de détection de 0,09 ng/l d'E2 ou d'EEQ et une limite de quantification d'environ 0,22 ng/l d'E2 ou d'EEQ. Il permet donc également l'étude d'échantillons peu pollués. Sans préconcentration, la limite de détection était en moyenne de  $9,2 \pm 2,0$  ng/l E2 / EEQ (n = 44 tests réalisés au Centre Ecotox en 2013, année également consacrée aux essais de validation du test). La limite de quantification était en moyenne de  $11 \pm 2,6$  ng/l E2 / EEQ. La concentration efficace ( $CE_{50}$ ) du 17 $\beta$ -œstradiol était en moyenne de  $1,0 \times 10^{-10}$  M 17 $\beta$ -œstradiol (intervalle de confiance de 95% =  $9,5 \times 10^{-11}$  à  $1,1 \times 10^{-10}$  M). Les données relatives aux limites de détection et de quantification sont récapitulées au Tab. 4.

**Tab. 4 : Limites de détection et de quantification du test YES.**

EEQ = équivalents 17 $\beta$ -œstradiol, SPE = Extraction en phase solide.

	Limite de détection	Lim. de quantification
Sans préconcentration	$9,2 \pm 2,0$ ng/l EEQ	$11 \pm 2,6$ ng/l EEQ
Avec SPE (concentration x 50 à 100)	0,09 - 0,19 ng/l EEQ	0,11 - 0,22 ng/l EEQ

### Reproductibilité

Pour déterminer la reproductibilité des résultats, les mesures ont été effectuées cinq fois dans la même journée ainsi qu'à cinq jours différents sur un même échantillon. Ce test a été effectué sans extraction en phase solide avec des extraits reconstitués d'échantillons d'eau, c'est à dire des solutions d'éthanol renfermant du 17 $\beta$ -œstradiol ou un mélange de quatre substances à activité œstrogénique. La variabilité des valeurs d'EEQ obtenues dans le test YES avec les extraits reconstitués était comprise entre 12 et 31% mais il est à noter que la variabilité la plus forte a été observée avec l'échantillon contenant 0,3 ng/l d'EEQ, soit une teneur très proche de la limite de quantification.

### Rendement de récupération

Le rendement de récupération du test YES, ou recouvrement, a été déterminé aussi bien avec des extraits reconstitués d'échantillons d'eau qu'avec des extraits par SPE d'eau ultrapure et



d'effluent d'épuration dopés avec du 17 $\beta$ -œstradiol ou un mélange de quatre substances à activité œstrogénique.

*Extraits reconstitués d'échantillons d'eau et extraits par SPE d'eau ultrapure dopés :* Le recouvrement du 17 $\beta$ -œstradiol à une concentration nominale de 6 ng/l dans les extraits reconstitués d'échantillons d'eau et les extraits par SPE d'eau ultrapure était stable et situé entre 82 et 108 %. Le seul cas où le rendement de récupération du test YES était jugé un peu faible (40 à 63 %) était celui d'échantillons très peu chargés en polluants dont la concentration en E2 (0,3 ng/l) était proche de la limite de quantification (0,11-0,22 ng/l E2).

*Effluent d'épuration :* Le recouvrement du 17 $\beta$ -œstradiol ajouté (concentration nominale) était de 48 à 81 % dans les extraits d'effluent par SPE. Le calcul du rendement de récupération par rapport aux teneurs en EEQ effectivement mesurées dans les échantillons d'eau ultrapure dopés avec du 17 $\beta$ -œstradiol (concentration nominale de 6 ng/l, concentration mesurée de 4 ng/l, p.ex.) fait cependant état de valeurs comprises entre 86 et 114 %.

### Variabilité totale (extraction en phase solide et bioessai)

La variabilité totale a été déterminée à partir des résultats obtenus après extraction en phase solide d'une eau ultrapure additionnée de 17 $\beta$ -œstradiol ou d'un mélange de substances à activité œstrogénique et d'un effluent puis réalisation du test YES.

*Échantillons d'eau reconstitués :* La variabilité totale des teneurs en EEQ déterminées dans les échantillons moyennement à fortement chargés en polluants (6 ng/l E2 / EEQ maximum) était de 17 à 19%. Elle était un peu plus élevée dans les échantillons faiblement chargés (26% pour 0,3 ng/l E2 / EEQ).

*Effluent d'épuration :* Dans l'effluent, la variabilité totale des valeurs d'EEQ était de 21%.

Le tableau suivant (Tab. 5) reprend les principaux résultats concernant la validation du test YES. Pour plus de détails, reportez-vous à l'Annexe 4.

**Tab. 5 : Récapitulation des données relatives à la validation du test YES.**

E.R. = eau résiduaire, n = nombre de répétitions par concentration, nd = non déterminé, SPE = Extraction en phase solide.

		Reproductibilité (n = 10)	Récupération bioessai (n = 10 resp. 5 (E.R.))	Variabilité totale (n = 5 resp. 10 (E.R.))
Éthanol ou eau ultrapure	Faible niveau de concentration	31%	40 - 63%	26%
(additionnés de 17 $\beta$ -œstradiol ou de substances à activité œstrogénique)	Niveau de concentration moyen à fort	12 - 23%	79 - 108%	17 - 19%
Effluent (additionné de 17 $\beta$ -œstradiol)		nd	48 - 81% (par rapport à la conc. nominale) 86 - 114% (par rapport à la conc. mesurée*)	21%

\* Par rapport aux valeurs mesurées dans le bioessai avec l'eau ultrapure additionnée de 17 $\beta$ -œstradiol.



## 4 Possibilités d'appréciation de la qualité de l'eau à l'aide des bioessais sélectionnés

Lorsqu'une contamination du milieu aquatique par des substances à activité œstrogénique ou des inhibiteurs du PSII est constatée, il convient de l'interpréter en termes de qualité de l'eau. Cette appréciation peut se faire par le biais d'une analyse de risque, c'est-à-dire par une comparaison des concentrations en composés ou en équivalents bioanalytiques mesurées dans le milieu avec des critères de qualité environnementale adéquats. Lors d'un dépassement de ces critères, il ne peut être exclu que la contamination constitue une menace pour la vie aquatique (Götz et al., 2011; Kase et al., 2011; Junghans et al., 2013). Pour obtenir une appréciation différenciée, la notation de l'état du milieu peut se faire selon un système de classes, comme c'est l'usage dans le système modulaire gradué.

### 4.1 Détermination du quotient de risque

Pour évaluer le degré de pollution d'un cours d'eau, les équivalents bioanalytiques (BEQ) déterminées par bioessai ou par analyse chimique sont comparées avec les critères de qualité relatifs à la pollution chronique (voir également Götz et al., 2011; Kase et al., 2011). Le paramètre indicateur du degré de pollution est alors le quotient de risque calculé à partir du rapport de la concentration environnementale et de la valeur fixée pour le critère de qualité. Dans le cas de bioessais spécifiques, les concentrations environnementales sont représentées par les équivalents bioanalytiques, c'est-à-dire les EEQ pour le test YES et les DEQ pour le test algues combiné.

Le quotient de risque est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Quotient de risque (RQ)} = \frac{\text{MEC ou BEQ}}{\text{EQS}}$$

Avec :

MEC = Concentration mesurée dans l'environnement

BEQ = Concentration d'équivalent bioanalytique

EQS = Norme de qualité environnementale = Critère de qualité « chronique » (CQC)

Le risque pour la vie aquatique est jugé tolérable lorsque  $RQ < 1$  et non tolérable dans le cas contraire ( $RQ > 1$ ) (Junghans et al., 2013).

Grâce à ce calcul, des classes d'état ou de qualité de l'eau peuvent être déterminées directement à partir des équivalents bioanalytiques mesurés dans les essais (voir également Liechti (2010)). Le système permet alors d'identifier les cours d'eau ou tronçons présentant des teneurs problématiques en substances à activité œstrogénique ou en inhibiteurs du PSII.

L'évaluation de la contamination œstrogénique se fait à partir du critère de qualité déterminé pour le 17 $\beta$ -œstradiol (0,4 ng/l) et celle de la pollution par les herbicides portant atteinte à la photosynthèse algale à partir du critère de qualité défini pour le diuron (70 ng/l). Ces critères de qualité ont été choisis notamment pour les raisons suivantes :

#### a) Effets œstrogéniques

Le critère de qualité environnementale déterminé pour les expositions chroniques au 17 $\beta$ -œstradiol (E2) se situe entre celui de l'estrone (E1) (3,6 ng/l) et du 17 $\alpha$ -éthynylestradiol (EE2) (0,037 ng/l). D'autre part, E1 et E2 sont généralement les principaux responsables de l'activité œstrogénique dans les cours d'eau. Enfin, l'appréciation à partir de ce critère de qualité est facilitée par le fait que l'activité œstrogénique mesurée dans les bioessais est déjà exprimée en équivalents 17 $\beta$ -œstradiol. Pour plus de détails, voir également Kienle et al. (2012).



## b) Inhibitions du photosystème II

Le critère de qualité environnementale déterminé pour les expositions chroniques au diuron est inférieur à ceux de plusieurs inhibiteurs du PSII (comme l'isoproturon : 640 ng/l ou la terbuthylazine : 220 ng/l, cf. [www.centrecotox.ch](http://www.centrecotox.ch)) et supérieur à celui de la terbutyne (65 ng/l) ou de l'irgarol (2,3 ng/l) qui n'est cependant plus utilisé aujourd'hui. La référence à ce critère de qualité garantit ainsi une bonne protection des producteurs primaires aquatiques. Par ailleurs, le diuron est un inhibiteur très puissant du photosystème II comme en témoigne la faiblesse de son CQC. Or cet herbicide préoccupant a déjà été détecté en Suisse à des concentrations de 100-300 ng/l (Wittmer et al., 2010). Enfin, l'appréciation à partir de ce critère est d'autant plus facile que l'inhibition du PSII mesurée dans les bioessais est déjà exprimée en équivalents diuron.

## 4.2 Systèmes d'appréciation envisageables

### 4.2.1 Système à trois classes

L'appréciation de la qualité de l'eau peut se faire en distinguant trois classes en fonction des valeurs mesurées pour la contamination en substances à activité œstrogénique ou en inhibiteurs du PSII (Tab. 6).

**Tab. 6 : Système à trois classes proposé pour l'évaluation de la qualité de l'eau en fonction de la présence de substances à activité œstrogénique ou d'inhibiteurs du PSII issus de l'assainissement communal (adapté de Götz et al. (2011) et du module « Analyses physico-chimiques, nutriments » (Liechti, 2010) du système modulaire gradué).**

BEQ = concentration en équivalents bioanalytiques, CQC = critère de qualité « chronique », RQ = quotient de risque = rapport BEQ / CQC

Appréciation		Condition / description		Respect du critère de qualité
	Bonne à très bonne qualité	La BEQ est inférieure au CQC du 17 $\beta$ -œstradiol ou du diuron	RQ < 1	Critère respecté
	Qualité moyenne	La BEQ est inférieure à 2,5 fois le CQC du 17 $\beta$ -œstradiol ou du diuron	$1 \leq RQ < 2,5$	Seuil dépassé
	Qualité médiocre à mauvaise	La BEQ est supérieure ou égale à 2,5 fois le CQC du 17 $\beta$ -œstradiol ou du diuron	RQ $\geq 2,5$	

Exprimées en termes de concentrations, les trois classes sont définies comme suit pour les substances à activité œstrogénique (Tab. 7):

**Tab. 7 : Système à trois classes proposé pour l'appréciation en fonction des concentrations d'équivalent 17 $\beta$ -œstradiol (EEQ) (ng/l) mesurées dans les échantillons. Le critère de qualité « chronique » utilisé est celui du 17 $\beta$ -œstradiol (0,4 ng/l).**

Appréciation		Condition	Respect du critère de qualité
	Bonne à très bonne qualité	EEQ < 0,4 ng/l	Critère respecté
	Qualité moyenne	0,4 ng/L $\leq$ EEQ < 1 ng/l	Seuil dépassé
	Qualité médiocre à mauvaise	EEQ $\geq$ 1 ng/l	

Jusqu'à une concentration d'équivalents 17 $\beta$ -œstradiol de 0,4 ng/l, on peut considérer, en tenant compte des données d'écotoxicité disponibles et de certains facteurs d'extrapolation (plus ou



moins élevés selon le composé, suivant le nombre de données disponibles à son sujet), que les organismes aquatiques ne devraient pas subir d'effets nuisibles à long terme. De tels impacts ne peuvent être exclus pour un équivalent bioanalytique supérieur à cette limite. Le seuil de 1 ng/l a été choisi pour la troisième classe car il s'agit de la concentration à partir de laquelle des effets biologiques peuvent apparaître chez les truites sauvages (augmentation modérée des teneurs en vitellogénine) (Vermeirssen et al., 2005).

Les classes suivantes peuvent être proposées pour les inhibiteurs du PSII (Tab. 8) :

**Tab. 8 : Système à trois classes proposé pour l'appréciation en fonction des concentrations d'équivalent diuron (DEQ) (ng/l) mesurées dans les échantillons. Le critère de qualité « chronique » utilisé est celui du diuron (70 ng/l).**

Appréciation		Condition	Respect du critère de qualité
	Bonne à très bonne qualité	DEQ < 70 ng/l	Critère respecté
	Qualité moyenne	70 ng/l ≤ DEQ < 175 ng/l	Seuil dépassé
	Qualité médiocre à mauvaise	DEQ ≥ 175 ng/l	

En tenant compte des données d'écotoxicité disponibles et des facteurs d'extrapolation, on peut considérer que les organismes aquatiques ne devraient pas subir d'effets chroniques jusqu'à une concentration d'équivalents diuron de 70 ng/l. De tels impacts ne peuvent être exclus pour un équivalent bioanalytique supérieur à cette limite.

#### 4.2.2 Système à cinq classes

Pour une classification plus différenciée, analogue à celle du système modulaire gradué (Liechti et al., 1998; Baumann et Langhans, 2010), un système à cinq classes peut être adopté selon le principe suivant (Tab. 9).

**Tab. 9 : Système à cinq classes proposé pour l'évaluation de la qualité de l'eau en fonction de la présence de substances à activité œstrogénique ou d'inhibiteurs du PSII issus de l'assainissement communal (adapté de Götz et al. (2011) et du module « Analyses physico-chimiques, nutriments » (Liechti, 2010) du système modulaire gradué).**

BEQ = concentration en équivalents bioanalytiques, CQC = critère de qualité « chronique », RQ = quotient de risque = rapport BEQ / CQC

Appréciation		Condition / description		Respect du critère de qualité
	Très bonne qualité	La BEQ est plus de 10 fois plus faible que le CQC du 17β-œstradiol ou du diuron	RQ < 0,1	Critère respecté
	Bonne qualité	La BEQ est de 1 à 10 fois plus faible que le CQC du 17β-œstradiol ou du diuron	0,1 ≤ RQ < 1	
	Qualité moyenne	La BEQ est inférieure à 2,5 fois le CQC du 17β-œstradiol ou du diuron	1 ≤ RQ < 2,5	Seuil dépassé
	Qualité médiocre	La BEQ est supérieure ou égale à 2,5 fois le CQC du 17β-œstradiol ou du diuron	2,5 ≤ RQ < 10	
	Mauvaise qualité	La BEQ est supérieure ou égale à 10 fois le CQC du 17β-œstradiol ou du diuron	RQ ≥ 10	

Exprimées en termes de concentrations, les cinq classes sont définies comme suit pour les substances à activité œstrogénique (Tab. 10) :



**Tab. 10 : Système à cinq classes proposé pour l'appréciation en fonction des concentrations d'équivalent 17 $\beta$ -œstradiol (EEQ) (ng/l) mesurées dans les échantillons. Le critère de qualité « chronique » utilisé est celui du 17 $\beta$ -œstradiol (0,4 ng/l).**

Appréciation		Condition	Respect du critère de qualité
Très bonne qualité		EEQ < 0,04 ng/l	Critère respecté
Bonne qualité		0,04 ng/l ≤ EEQ < 0,4 ng/l	
Qualité moyenne		0,4 ng/l ≤ EEQ < 1 ng/l	Seuil dépassé
Qualité médiocre		1 ng/l ≤ EEQ < 4 ng/l	
Mauvaise qualité		EEQ ≥ 4 ng/l	

Les classes suivantes peuvent être proposées pour les inhibiteurs du PSII (Tab. 11) :

**Tab. 11 : Système à cinq classes proposé pour l'appréciation en fonction des concentrations d'équivalent diuron (DEQ) (ng/l) mesurées dans les échantillons. Le critère de qualité « chronique » utilisé est celui du diuron (70 ng/l).**

Appréciation		Condition	Respect du critère de qualité
Très bonne qualité		DEQ < 7 ng/l	Critère respecté
Bonne qualité		7 ng/l ≤ DEQ < 70 ng/l	
Qualité moyenne		70 ng/l ≤ DEQ < 175 ng/l	Seuil dépassé
Qualité médiocre		175 ng/l ≤ DEQ < 700 ng/l	
Mauvaise qualité		DEQ ≥ 700 ng/l	

Ce système d'appréciation est illustré par deux études de cas à l'Annexe 5.

#### 4.2.3 Fonctions de valeur pour l'appréciation de la qualité de l'eau

Le système d'appréciation peut être complété selon les indications du guide d'élaboration de modules d'appréciation élaboré pour les lacs (Schlosser et al., 2013). L'objectif de ce guide est de permettre à l'avenir l'élaboration de modules méthodologiquement unifiés pouvant être plus facilement combinés en une appréciation globale. L'Annexe 6 présente diverses fonctions de valeur applicables à l'appréciation et à la gestion des incertitudes.



## 5 Conclusions et perspectives

### 5.1 Potentialités de la méthode d'appréciation

La méthode d'appréciation proposée permet de tenir compte de façon intégrée de tous les effets dus à la présence dans le milieu des substances à activité œstrogénique et d'inhibiteurs du PSII. Étant donné qu'elle enregistre la capacité de toutes les substances présentes à se lier au récepteur humain des œstrogènes ou à inhiber le photosystème II, elle permet d'apprécier l'effet des mélanges de composés de ces deux groupes de polluants. Elle autorise ainsi une première évaluation sommaire de la qualité écotoxicologique de l'eau à partir de ces deux types d'effets. Mais la pollution par les substances à activité œstrogénique et par les inhibiteurs du PSII, deux des groupes de substances ayant un impact majeur sur la vie aquatique, pourrait potentiellement être représentative de beaucoup d'autres types de pollutions dans l'évaluation de la qualité écotoxicologique de l'eau. Celle-ci peut alors être estimée en considérant le dépassement ou le respect de critères de qualité déterminés à partir de données d'écotoxicité. Il est cependant à noter que les bioessais sélectionnés pour la méthode d'appréciation sommaire proposée ici mettent en évidence des potentiels écotoxiques spécifiques à l'échelle sous-organismique mais qu'il est pour l'heure encore impossible d'en déduire les impacts à l'échelle de l'écosystème.

### 5.2 Développements ultérieurs

La présente méthode d'appréciation sommaire décrit un procédé d'évaluation de la qualité de l'eau à partir de bioessais écotoxicologiques. Par pragmatisme, elle se limite dans un premier temps à deux bioessais, le test YES et le test algues combiné, portant respectivement sur deux groupes de polluants d'importance majeure pour la vie aquatique, les substances à activité œstrogénique et les inhibiteurs du photosystème II. Les deux tests se trouvent actuellement en phase préparatoire ou en cours de normalisation au niveau de l'Organisation internationale de standardisation (ISO).

L'élaboration de méthodes d'évaluation de la qualité de l'eau basées sur les bioessais écotoxicologiques va se poursuivre et les prochaines étapes seront les suivantes :

- *Normalisation* : Il est essentiel que la Suisse participe activement aux efforts de normalisation et de certification ISO des tests pour que le système d'appréciation sommaire puisse être finalisé. Avec plusieurs autres partenaires, le Centre Ecotox est fortement impliqué dans ces activités. Les travaux ne devraient cependant pas aboutir avant plusieurs années.
- *Extension à d'autres mécanismes d'action* : Il serait souhaitable, à l'avenir, d'étendre le système d'évaluation à d'autres mécanismes d'action ou groupes de polluants. Dans cette optique, le Centre Ecotox a élaboré un récapitulatif de méthodes comprenant un certain nombre de propositions pour des bioessais prometteurs (Kienle et al., 2015).
- *Extension aux pollutions diffuses* : Le système d'évaluation proposé ici ne s'applique encore qu'aux pollutions de sources ponctuelles (dues aux déversements d'effluents d'épuration). Il serait souhaitable de l'étendre prochainement à la contamination des cours d'eau par les micropolluants rejetés de façon diffuse (dans une approche similaire à celle du projet « Micropolluants de sources non ponctuelles » de l'OFEV (Wittmer et al., 2014)).



## 6 Références bibliographiques

- Abegglen C, Siegrist H, 2012. Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser. Verfahren zur weitergehenden Elimination auf Kläranlagen. Umwelt-Wissen Nr 1214: Bundesamt für Umwelt, Bern. p. 210.
- Amt für Umwelt und Energie des Kantons St. Gallen, 2013. Spurenstoffe im Abwasser - Suche nach relevanten Emissionsquellen, Ergebnisse der Messkampagne 2012.
- Baumann P, Langhans SD, 2010. Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer. Synthese der Beurteilungen auf Stufe F (flächendeckend). Umwelt-Vollzug: Bundesamt für Umwelt, Bern. p. 47.
- Bengtson Nash SM, Goddard J, Muller JF, 2006. Phytotoxicity of surface waters of the Thames and Brisbane River estuaries: a combined chemical analysis and bioassay approach for the comparison of two systems. Biosens Bioelectron 21:2086-2093.
- Bengtson Nash SM, Quayle PA, Schreiber U, Muller JF, 2005. The selection of a model microalgal species as biomaterial for a novel aquatic phytotoxicity assay. Aquat Toxicol 72:315-326.
- Blumberg R, 1988. Liquid-liquid extraction. London: Academic Press.
- Bundi U, Langhans S, Weber C, 2008. The Swiss Modular Stepwise Procedure (Das Modul-Stufen-Konzept). Eawag Special Seminar.
- Durand A, Rotteveel S, Collombon M, van der Grinten E, Maas J, Verweij W, 2009. Toxicity measurements in concentrated water samples. Evaluation and validation. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu RIVM.
- Ecotox Centre, 2015. Standard Operating Procedure: Solid Phase Extraction (SPE) of Aqueous Samples for Testing in Bioassays. p. 20.
- Escher B, Chèvre N, 2004. Ökotoxikologische Untersuchung von Wasserproben aus der Glatt, April bis Oktober 2004 - Eine Untersuchung im Rahmen des Modulstufenkonzepts, Modul Ökotoxikologie. Eawag, Dübendorf.
- Escher BI, Bramaz N, Maurer M, Richter M, Sutter D, von Kanel C, Zschokke M, 2005. Screening test battery for pharmaceuticals in urine and wastewater. Environ Toxicol Chem 24:750-758.
- Escher BI, Bramaz N, Mueller JF, Quayle P, Rutishauser S, Vermeirssen ELM, 2008a. Toxic equivalent concentrations (TEQs) for baseline toxicity and specific modes of action as a tool to improve interpretation of ecotoxicity testing of environmental samples. J Environ Monit 10:612-621.
- Escher BI, Bramaz N, Ort C, 2009. JEM spotlight: Monitoring the treatment efficiency of a full scale ozonation on a sewage treatment plant with a mode-of-action based test battery. J Environ Monit 11:1836-1846.
- Escher BI, Bramaz N, Quayle P, Rutishauser S, Vermeirssen ELM, 2008b. Monitoring of the ecotoxicological hazard potential by polar organic micropollutants in sewage treatment plants and surface waters using a mode-of-action based test battery. J Environ Monit 10:622-631.
- Escher BI, Neale PA, Leusch FDL, 2015. Effect-based trigger values for *in vitro* bioassays: Reading across from existing water quality guideline values. Water Res 81:137-148.
- Gälli R, Ort C, Schärer M, 2009. Mikroverunreinigungen in den Gewässern. Bewertung und Reduktion der Schadstoffbelastung aus der Siedlungsentwässerung. Umwelt-Wissen: Bundesamt für Umwelt, Bern. p. 103.
- Götz CW, Kase R, Hollender J, 2011. Mikroverunreinigungen - Beurteilungskonzept für organische Spurenstoffe aus kommunalem Abwasser. Studie im Auftrag des BAFU: Eawag, Dübendorf. p. 108.
- Hall S, Bradley T, Moore JT, Kuykindall T, Minella L, 2009. Acute and chronic toxicity of nano-scale TiO<sub>2</sub> particles to freshwater fish, cladocerans, and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on TiO<sub>2</sub> toxicity. Nanotoxicology 3:91-97.
- Homazava N, 2009. Organic pollutants in water. Influence of the sample preparation and extraction method on the chemical analysis/ bioassay results. Oekotoxzentrum Eawag-EPFL, Dübendorf.
- International Organization for Standardization, 1992. Water quality -- Sampling -- Part 10: Guidance on sampling of waste waters. ISO 5667-10:1992



- International Organization for Standardization, 1998. Water quality -- Sampling -- Part 16: Guidance on biotesting of samples. ISO 5667-16:1998
- International Organization for Standardization, 2003. Water quality -- Sampling -- Part 3: Guidance on the preservation and handling of water samples. ISO 5667-3:2003
- International Organization for Standardization, 2012. Water quality -- Freshwater algal growth inhibition test with unicellular green algae. ISO 8692:2012.
- Junghans M, Kunz P, Werner I, 2013. Toxizität von Mischungen - Aktuelle praxisorientierte Ansätze für die Beurteilung von Gewässerproben. Aqua & Gas 5.
- Kase R, Eggen RIL, Junghans M, Götz C, Hollender J, 2011. Assessment of micropollutants from municipal wastewater - Combination of exposure and ecotoxicological effect data for Switzerland. In: Einschlag FSG, editor. Waste Water - Evaluation and Management: InTech - Open Access Publisher.
- Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, Lazorchak JM, Flick RW, 2007. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. Proc Natl Acad Sci U S A 104:8897-8901.
- Kienle C, Gauch R, Vermeirssen E, Werner I, 2015. Methoden zur Beurteilung der Wasserqualität anhand von ökotoxikologischen Biotests. Studie im Auftrag des BAFU. Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie Eawag-EPFL, Dübendorf.
- Kienle C, Kase R, Werner I, 2011. Evaluation of Bioassays and Wastewater Quality - *In vitro* and *in vivo* Bioassays for the Performance review in the Project "Strategy Micropoll". Swiss Centre for Applied Ecotoxicology Eawag-EPFL, Dübendorf.
- Kienle C, Kunz PY, Vermeirssen E, Homazava N, Werner I, 2012. Evaluation von Methoden für den effektbasierten Nachweis von Östrogen aktiven Substanzen in Abwasserreinigungsanlagen und Fließgewässern. Studie im Auftrag des BAFU. . Schweizerisches Zentrum für angewandte Ökotoxikologie, Eawag-EPFL, Dübendorf.
- Kühn R, Pattard M, 1990. Results of the harmful effects of water pollutants to green algae (*Scenedesmus subspicatus*) in the cell multiplication inhibition test. Water Res 24:31-38.
- Kunz PY, Galicia HF, Fent K, 2006. Comparison of *in vitro* and *in vivo* estrogenic activity of UV filters in fish. Toxicological Sciences 90:349-361.
- Langhans SD, Reichert P, Schuwirth N, 2014. The method matters: A guide for indicator aggregation in ecological assessments. Ecological Indicators 45:494-507.
- Legler J, Zeinstra LM, Schuitemaker F, Lanser PH, Bogerd J, Brouwer A, Vethaak AD, De Voogt P, Murk AJ, Van der Burg B, 2002. Comparison of *in vivo* and *in vitro* reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. Environ Sci Technol 36:4410-4415.
- Leusch FD, de Jager C, Levi Y, Lim R, Puijker L, Sacher F, Tremblay LA, Wilson VS, Chapman HF, 2010. Comparison of five *in vitro* bioassays to measure estrogenic activity in environmental waters. Environ Sci Technol 44:3853-3860.
- Leusch FDL, 2008. Tools to detect estrogenic activity in environmental waters. Global Water Research Coalition. p. 86.
- Liechti P, 2010. Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer. Chemisch-Physikalische Erhebungen, Nährstoffe. Umwelt-Vollzug: Bundesamt für Umwelt (BAFU), Bern. p. 44.
- Liechti P, Sieber U, von Blücher U, Willi HP, Bundi U, Frutiger A, Hütte M, Peter A, Göldi C, Kupper U, Meier W, Niederhauser P, 1998. Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer in der Schweiz, Modul-Stufen-Konzept. Mitteilungen zum Gewässerschutz Nr 26: Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Bern.
- Liška I, 2000. Fifty years of solid-phase extraction in water analysis - Historical development and overview. Journal of Chromatography A 885:3-16.
- Macova M, Escher BI, Reungoat J, Carswell S, Chue KL, Keller J, Mueller JF, 2010. Monitoring the biological activity of micropollutants during advanced wastewater treatment with ozonation and activated carbon filtration. Water Res 44:477-492.
- Margot J, Kienle C, Magnet A, Weil M, Rossi L, de Alencastro LF, Abegglen C, Thonney D, Chevre N, Scharer M, Barry DA, 2013. Treatment of micropollutants in municipal wastewater: ozone or powdered activated carbon? Science of The Total Environment 461-462:480-498.



- Murk AJ, Legler J, van Lipzig MM, Meerman JH, Belfroid AC, Spenkeliink A, van der Burg B, Rijs GB, Vethaak D, 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three *in vitro* bioassays. *Environ Toxicol Chem* 21:16-23.
- OECD, 2006. OECD Guideline for the testing of chemicals 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test.
- Ralph PJ, Smith RA, Macinnis-Ng CMO, Seery CR, 2007. Use of fluorescence-based ecotoxicological bioassays in monitoring toxicants and pollution in aquatic systems: Review. *Toxicological & Environmental Chemistry* 89:589-607.
- Reichert P, Schuwirth N, Langhans S, 2013. Constructing, evaluating and visualizing value and utility functions for decision support. *Environmental Modelling & Software* 46:283-291.
- Reungoat J, Macova M, Escher BI, Carswell S, Mueller JF, Keller J, 2010. Removal of micropollutants and reduction of biological activity in a full scale reclamation plant using ozonation and activated carbon filtration. *Water Res* 44:625-637.
- Routledge EJ, Sumpter JP, 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ Toxicol Chem* 15:241-248.
- Schindler Wildhaber Y, Mestankova H, Schärer M, Schirmer K, Salhi E, von Gunten U, 2015. Novel test procedure to evaluate the treatability of wastewater with ozone. *Water Res* 75:324-335.
- Schlosser JA, Haertel-Borer S, Liechti P, Reichert P, 2013. Konzept für die Untersuchung und Beurteilung der Seen in der Schweiz. Anleitung zur Entwicklung und Anwendung von Beurteilungsmethoden. Bundesamt für Umwelt, Bern Umwelt-Wissen Nr 1326: 38 S.
- Schreiber U, Quayle P, Schmidt S, Escher BI, Mueller JF, 2007. Methodology and evaluation of a highly sensitive algae toxicity test based on multiwell chlorophyll fluorescence imaging. *Biosens Bioelectron* 22:2554-2563.
- Schweigert N, Eggen RIL, Escher BI, Burkhardt-Holm P, Behra R, 2001. Methoden zur Untersuchung und Beurteilung der Fließgewässer in der Schweiz - Vorschläge zur Vorgehensweise im Modul Ökotoxikologie. Eawag, Dübendorf. p. 29.
- Schweizerischer Bundesrat, 1998. Gewässerschutzverordnung (GSchV) vom 28. Oktober 1998 (Stand am 1. August 2011). p. 68.
- 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.
- Struijs J, van de Kamp R, Zwart Dd, Ritsema R, 2000. Toxic pressure in surface water, a pilot on new monitoring techniques. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu RIVM.
- Struijs J, van der Grinten E, Aldenberg T, 2010. Toxic pressure in the Dutch delta measured with bioassays : Trends over the years 2000 - 2009. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu RIVM.
- Uehlinger U, Robinson CT, 2006. Auswirkungen von Massnahmen in der ARA Hofen auf die Steinach unterhalb der heutigen Einleitung. Dübendorf: Eawag.
- US EPA. Revised Manual of Standard Operating Procedures for Environmental Monitoring against the Cockburn Sound Environmental Quality Criteria (2003 - 2004). A supporting document to the State Environmental (Cockburn Sound) Policy. 2005.
- van der Grinten E, Pikkemaat MG, van den Brandhof EJ, Stroomberg GJ, Kraak MH, 2010. Comparing the sensitivity of algal, cyanobacterial and bacterial bioassays to different groups of antibiotics. *Chemosphere* 80:1-6.
- Van der Linden SC, Heringa MB, Man HY, Sonneveld E, Puijker LM, 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.
- Vermeirssen EL, Hollender J, Bramaz N, van der Voet J, Escher BI, 2010. Linking toxicity in algal and bacterial assays with chemical analysis in passive samplers deployed in 21 treated sewage effluents. *Environ Toxicol Chem* 29:2575-2582.
- Vermeirssen ELM, Burki R, Joris C, Peter A, Segner H, Suter MJF, Burkhardt-Holm P, 2005. Characterization of the estrogenicity of swiss midland rivers using a recombinant yeast bioassay and plasma vitellogenin concentrations in feral male brown trout. *Environ Toxicol Chem* 24:2226-2233.



- Wittmer I, Junghans M, Singer H, Stamm C, 2014. Mikroverunreinigungen – Beurteilungskonzept für organische Spurenstoffe aus diffusen Einträgen. Studie im Auftrag des BAFU. Eawag, Dübendorf.
- Wittmer IK, Bader HP, Scheidegger R, Singer H, Luck A, Hanke I, Carlsson C, Stamm C, 2010. Significance of urban and agricultural land use for biocide and pesticide dynamics in surface waters. *Water Res* 44:2850-2862.
- Wittwer A, Gubser C, 2010. Umsetzung des Verbots von Pflanzenschutzmitteln. Untersuchung zum Stand der Umsetzung des Anwendungsverbots von Unkrautvertilgungsmitteln auf und an Strassen, Wegen und Plätzen. *Umwelt-Wissen: Bundesamt für Umwelt, Bern.* p. 54.
- Yang LH, Ying GG, Su HC, Stauber JL, Adams MS, Binet MT, 2008. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ Toxicol Chem* 27:1201-1208.



## 7 Listes des figures et tableaux

### 7.1 Liste des figures

Fig. 1: Principaux effets pouvant être détectés avec les bioessais.....	1
Fig. 2: Éléments de la stratégie proposée pour évaluer le degré de contamination par les substances à activité œstrogénique et les inhibiteurs du photosystème II des eaux superficielles recevant des eaux usées (Graphique : Eawag) .....	3
Fig. 3: Vision synoptique de la démarche de prélèvement et de préparation des échantillons ....	4
Fig. 4: Test algues combiné : plaque de mesure du rendement quantique de la photosynthèse. ....	10
Fig. 5 : Test YES (Yeast Estrogen Screen) : plaque de mesure de l'activité œstrogénique. ....	14
Fig. 6 : Détermination de la concentration d'équivalents diuron (DEQ) par comparaison des concentrations efficaces de l'échantillon et du diuron choisi comme substance de référence...	36
Fig. 7 : Détermination de la concentration d'équivalent 17β-œstradiol (EEQ) par comparaison des concentrations efficaces de l'échantillon et du 17β-œstradiol choisi comme substance de référence. ....	45
Fig. 8 : Résultats du test YES (Yeast Estrogen Screen) dans les effluents d'épuration. La médiane de toutes les mesures est de 0,73 ng EEQ/l; le décuple du critère de qualité est de 4 ng/l. ....	51
Fig. 9 : Teneurs en EEQ mesurées dans les effluents d'épuration avec le test YES et extrapolées au cours d'eau récepteur en appliquant le facteur de dilution par temps sec. L'éventualité d'une pollution préalable du milieu récepteur n'a pas été prise en compte. Pas d'EEQs ont été extrapolées pour les rejets en lacs. ....	52
Fig. 10 : Appréciation de la qualité de l'eau dans les cours d'eau récepteurs des effluents des 44 stations d'épuration avec le système à cinq classes. Pas d'EEQs ont été extrapolées pour les rejets en lacs. ....	53
Fig. 11 : Résultats obtenus avec le test YES (Yeast Estrogen Screen) dans les effluents d'épuration (STEP) et les cours d'eau récepteurs.....	55
Fig. 12 : Résultats obtenus avec le test algues combiné dans les effluents d'épuration (STEP) et les cours d'eau récepteurs. ....	55
Fig. 13 : Appréciation de la qualité de l'eau dans les 12 cours d'eau du projet EcolImpact en fonction de la pollution du milieu par les substances à activité œstrogénique en se référant au système à cinq classes .....	56
Fig. 14 : Appréciation de la qualité de l'eau dans les 12 cours d'eau du projet EcolImpact en fonction de la pollution du milieu par les inhibiteurs du photosystème II en se référant au système à cinq classes. ....	57
Fig. 15 : Possibilité de hiérarchisation des objectifs et attributs correspondants : L'objectif principal est « Absence d'effets écotoxicologiques » et les sous-objectifs « Absence d'activité œstrogénique » et « Absence d'inhibition du photosystème II ». Ces deux sous-objectifs sont évalués à l'aide des attributs « Concentration en équivalents 17β-œstradiol (EEQ, ng/l) » et « Concentration en équivalents diuron (DEQ, ng/l) » .....	58
Fig. 16 : Transformation du système de classes en une fonction de valeur dans le cas de l'activité œstrogénique. ....	59
Fig. 17 : Agrégation minimale additive de l'appréciation des effets œstrogéniques et d'inhibition du photosystème II. ....	60
Fig. 18 : Lois de probabilité relatives à l'activité œstrogénique en EEQ (ng/l) pour une analyse A de moyenne 6 ng/l et d'écart-type 0,5 ng/l (en gris foncé) et une analyse B de moyenne 1 ng/l et d'écart-type 0,1 ng/l (en gris clair). ....	61
Fig. 19 : Représentation graphique des résultats et de l'incertitude pour un échantillon à $1 \pm 0.1$ ng EEQ/l et à $6 \pm 0.5$ ng/l DEQ en utilisant le système d'évaluation continu. Ligne noire = médiane ; surface de couleur = intervalle de confiance à 90%, cas hypothétique. ....	61



## 7.2 Liste des tableaux

Tab. 1 : Présentation synoptique du test algues combiné et du test YES .....	9
Tab. 2 : Limites de détection et de quantification du test algues combiné. ....	12
Tab. 3 : Récapitulation des données concernant la validation du test algues combiné. ....	13
Tab. 4 : Limites de détection et de quantification du test YES.....	15
Tab. 5 : Récapitulation des données relatives à la validation du test YES.....	16
Tab. 6 : Système à trois classes proposé pour l'évaluation de la qualité de l'eau en fonction de la présence de substances à activité œstrogénique ou d'inhibiteurs du PSII issus de l'assainissement communal (adapté de Götz et al. (2011) et du module « Analyses physico-chimiques, nutriments » (Liechti, 2010) du système modulaire gradué).....	18
Tab. 7 : Système à trois classes proposé pour l'appréciation en fonction des concentrations d'équivalent 17 $\beta$ -œstradiol (EEQ) (ng/l) mesurées dans les échantillons. Le critère de qualité « chronique » utilisé est celui du 17 $\beta$ -œstradiol (0,4 ng/l).....	18
Tab. 8 : Système à trois classes proposé pour l'appréciation en fonction des concentrations d'équivalent diuron (DEQ) (ng/l) mesurées dans les échantillons. Le critère de qualité « chronique » utilisé est celui du diuron (70 ng/l). ....	19
Tab. 9 : Système à cinq classes proposé pour l'évaluation de la qualité de l'eau en fonction de la présence de substances à activité œstrogénique ou d'inhibiteurs du PSII issus de l'assainissement communal (adapté de Götz et al. (2011) et du module « Analyses physico-chimiques, nutriments » (Liechti, 2010) du système modulaire gradué).....	19
Tab. 10 : Système à cinq classes proposé pour l'appréciation en fonction des concentrations d'équivalent 17 $\beta$ -œstradiol (EEQ) (ng/l) mesurées dans les échantillons. Le critère de qualité « chronique » utilisé est celui du 17 $\beta$ -œstradiol (0,4 ng/l).....	20
Tab. 11 : Système à cinq classes proposé pour l'appréciation en fonction des concentrations d'équivalent diuron (DEQ) (ng/l) mesurées dans les échantillons. Le critère de qualité « chronique » utilisé est celui du diuron (70 ng/l). ....	20
Tab. 12 : Extraction en phase solide préalable aux bioessais (d'après Escher et al., 2008b) : étapes de prétraitement des échantillons pour l'analyse biologique des substances à activité œstrogénique et des inhibiteurs du photosystème II. ....	30
Tab. 13 : Concentrations nominales d'inhibiteurs du photosystème II dans les échantillons d'eau reconstitués .....	33
Tab. 14 : Phase I - Liste des échantillons reconstitués étudiés .....	34
Tab. 15 : Phase II - Liste des échantillons réels étudiés, avec et sans ajouts dosés .....	35
Tab. 16 : Facteurs d'équivalence diuron (DEF) déterminés pour différents inhibiteurs du photosystème II et DEQ résultant attendu pour les échantillons étudiés dans le test algues combiné. ....	36
Tab. 17 : Rendement de récupération du test algues combiné déterminé pour le diuron dans les échantillons reconstitués et éthanoliques. ....	37
Tab. 18 : Variabilité des résultats du test algues combiné : le test a été effectué 4 fois le même jour ou à cinq jours différents avec des extraits reconstitués. ....	38
Tab. 19 : Reproductibilité et variabilité totale de la méthode : extraction par SPE 4 fois par échantillon puis détermination du DEQ avec le test algues combiné (10x pour l'effluent de station d'épuration (STEP)). ....	38
Tab. 20 : Estimation de la variabilité due à la extraction en phase solide (SPE) (= variabilité totale - variabilité due au bioessai).....	39
Tab. 21 : Ajouts dosés de diuron dans des échantillons réels et mesure consécutive du DEQ dans le test algues combiné.....	39
Tab. 22 : Concentrations de substances à activité œstrogénique dans les échantillons d'eau reconstitués.....	42
Tab. 23 : Phase I - Liste des échantillons reconstitués étudiés.....	43
Tab. 24 : Phase II - Liste des échantillons reconstitués ou réels, avec ou sans ajouts dosés ...	44
Tab. 25 : Facteurs d'équivalence 17 $\beta$ -œstradiol (E2) (EEF) des substances à activité œstrogénique et EEQ attendue en conséquence dans les échantillons étudiés dans le test YES. ....	45



Tab. 26 : Rendement de récupération du 17 $\beta$ -œstradiol (E2) dans le test YES avec les échantillons reconstitués ou éthanoliques. ....	46
Tab. 27 : Variabilité et reproductibilité des résultats du test YES (Yeast Estrogen Screen) : des extraits reconstitués ont été testés cinq fois le même jour ou à cinq jours différents. ....	47
Tab. 28 : Reproductibilité et variabilité totale de la méthode : extraction par SPE 5 fois par échantillon puis mesure de l'EEQ avec le test YES (10x pour l'effluent de station d'épuration (STEP)).....	47
Tab. 29 : Estimation de la variabilité due à la extraction en phase solide (SPE) (= variabilité totale - variabilité due au bioessai).....	48
Tab. 30 : Ajouts dosés de 17 $\beta$ -œstradiol (E2) dans des échantillons réels et mesure consécutive de l'EEQ dans le test YES.....	48



## **Annexe 1 Procédures opérationnelles standards (SOPs) pour le prélèvement et le prétraitement des échantillons**

### **Échantillonnage**

#### **Précautions à prendre pendant l'échantillonnage**

- Utilisez, si possible, des gants en nitrile.
- Évitez d'utiliser des produits cosmétiques (de la crème pour les mains p. ex.) avant les prélèvements.
- Évitez tout contact de la peau avec l'eau prélevée.
- N'utilisez pas de matériel en plastique (tuyaux, entonnoirs etc.) mais recourez exclusivement à des équipements en téflon, en inox ou en verre.

#### **Flaconnage**

- Il est recommandé d'utiliser des flacons propres en verre (Duran ou Schott) ou en Aluminium avec des bouchons en polypropylène ou à revêtement de téflon.
- Si vous devez utiliser d'autres types de bouchons, merci de nous en informer.
- Utilisez, si possible, des flacons en verre brun.

#### **Prétraitement des flacons de prélèvement**

- Le matériel neuf doit être consciencieusement rincé à l'eau avant son nettoyage.
- Après le nettoyage de routine, les flacons de prélèvement doivent subir un nettoyage complémentaire :
- Au plus tard un jour avant l'échantillonnage, les flacons lavés doivent être rincés trois fois à l'acétone (p.a.; qualité chimique pure pour analyse) (de petits volumes suffisent). L'acétone doit ensuite être évaporée pendant une nuit sous la hotte.
- Lors du prélèvement, rincez tout d'abord les flacons avec un peu d'échantillon avant de les remplir.
- Tout le matériel de laboratoire entrant en contact avec les échantillons (verrerie, spatules, etc.) doit être auparavant rincé trois fois à l'acétone (p.a.).
- Une bouteille avec de l'eau ultrapure doit être transportée pendant l'échantillonnage comme „field blank“ et traitée comme les échantillons environnementaux. C'est pour confirmer que les bouteilles et leur nettoyage ne provoquent pas des effets dans les bioessais.

#### **Prélèvement et conservation des échantillons**

- Pour éviter que les flacons en verre n'éclatent lors de la congélation, veuillez ne les remplir qu'à moitié (un échantillon de 1l dans une bouteille de 2l par exemple).
- Refermez les flacons immédiatement après le prélèvement.
- Les échantillons doivent être marqués avec des étiquettes adhésives permettant leur identification (n° de l'échantillon + informations).
- Si vous utilisez des flacons transparents, enveloppez-les dans une feuille d'aluminium.
- Jusqu'au moment du transport, les échantillons doivent être conservés en position couchée au congélateur à -20°C ou au réfrigérateur entre 0 et 5°C.

#### **Transport**

- Transportez les échantillons le plus vite possible au Centre Ecotox dans des conditions assurant leur réfrigération (éléments réfrigérants, glace, glace carbonique).
- Si vous optez pour la glace carbonique, veillez à envelopper les flacons dans du papier ou du papier bulle pour éviter tout contact direct avec le verre.



## Prétraitement des échantillons par extraction en phase solide

La méthode de concentration des échantillons de matrice environnementale par extraction en phase solide est décrite en détail dans la SOP suivante :

Ecotox Centre (2015). Standard Operating Procedure: Solid Phase Extraction (SPE) of Aqueous Samples for Testing in Bioassays.

Le Tab. 12 récapitule les différentes étapes du protocole expérimental.

**Tab. 12 : Extraction en phase solide préalable aux bioessais (d'après Escher et al., 2008b) : étapes de prétraitement des échantillons pour l'analyse biologique des substances à activité œstrogénique et des inhibiteurs du photosystème II.**

Informations générales	
Type d'échantillons	Échantillons d'eau
Volume des échantillons	500 ml d'effluent de STEP
Blancs	500 ml d'eau ultrapure
Préparation des échantillons	
Filtration	Oui, p. ex. sur des filtres en fibres de verre de type APFD 09050 (1 µm) (Merck Millipore)
Acidification	Oui, ajustement à pH 3 avec de l'HCl
Ajout d'une solution d'étalons internes marqués aux isotopes (IS)	Non (possibilité de contrôle du rendement de récupération de la SPE par la méthode des ajouts dosés)
Traitement des échantillons	
Concentration	Extraction en phase solide (SPE)
Cartouches de SPE	LiChrolut EN RP-18 (100 mg LiChrolut EN en bas, 200 mg LiChrolut RP 18 en haut) (Merck, Darmstadt, Allemagne)
Conditionnement	2 ml d'hexane 2 ml d'acétone 6 ml de méthanol 6 ml d'eau (pH 3,0)
Rinçage	Non, simple remplissage de la cartouche avec de l'eau (pH 3,0)
Élution	4 ml d'acétone 1 ml de méthanol
Réduction du volume	Réduire à env. 500 µl avec du N <sub>2</sub> puis ramener à 1000 µl avec de l'éthanol
Facteur de concentration	500 fois celle de l'effluent de STEP
Conservation	A l'obscurité à -20°C



## **Annexe 2 Informations sur les SOPs relatives aux bioessais**

Il est très important que les essais soient réalisés selon les procédures opératoires standardisées les plus récentes possibles. Pour éviter que des SOPs obsolètes ne soient utilisées, ce document n'en présente pas mais recommande de les demander, le moment venu, au Centre Ecotox qui en fournira une version actualisée (contact : [info@oekotoxzentrum.ch](mailto:info@oekotoxzentrum.ch)).

### **Test algues combiné**

Le document suivant propose un protocole détaillé pour le test algues combiné :  
Ecotox Centre (2015). Standard Operating Procedure: Combined Algae Assay.

### **Yeast Estrogen Screen**

La réalisation du test d'œstrogénicité sur levures est décrite en détail dans :  
Ecotox Centre (2015). Standard Operating Procedure: Yeast Estrogen Screen.



## Annexe 3 Validation du test algues combiné

### Détermination de la variabilité, de la reproductibilité et du recouvrement des effets d'inhibition du photosystème II après l'extraction en phase solide et dans le test algues combiné

#### Introduction

##### Contexte et problématique

Pour que les bioessais puissent être intégrés au système d'appréciation de la qualité des eaux, il est impératif que leurs résultats, exprimés en équivalents bioanalytiques (BEQ), permettent de déterminer des classes de qualité. Or une appréciation robuste n'est possible qu'à la condition de connaître la variabilité et la reproductibilité de ces résultats. Dans le cadre de ce projet, ces paramètres ont été étudiés pour le test algues combiné.

Le projet s'est déroulé en deux phases. Dans un premier temps, la reproductibilité, la variabilité et l'extraction en phase solide (SPE) ont été étudiées en effectuant le test algues avec des échantillons d'eau reconstitués et leurs témoins respectifs. Dans un deuxième temps, un échantillon prélevé dans l'effluent de sortie d'une station d'épuration a été étudié afin de vérifier si les résultats de la première phase étaient transposables aux échantillons réels. Les résultats de ces essais sont exposés dans les pages qui suivent.

##### Objectifs de cette étude

Les éléments de validation suivants ont été étudiés pour le test algues combiné :

##### Limites de détection et de quantification

Pour le test algues, la limite de détection (LD = moyenne des témoins + 3x l'écart-type des témoins) et la limite de quantification (LQ = moyenne des témoins + 10x l'écart-type des témoins) ont été déterminées.

##### Rendement de récupération

Pour déterminer le recouvrement ou le rendement de récupération du test algues combiné, l'essai a été réalisé avec des solutions de concentrations définies en diuron, l'herbicide de référence, ou en un mélange d'inhibiteurs du photosystème II dans de l'eau ultrapure pré-concentrées par extraction en phase solide. Les témoins étaient constitués de solutions éthanoliques de référence. L'objectif était notamment de savoir si le test permettait de détecter aussi bien les faibles que les fortes concentrations de diuron et d'inhibiteurs du photosystème II.

##### Variabilité et reproductibilité

Pour vérifier la reproductibilité des résultats de la SPE et du bioessai, des échantillons éthanoliques fortement et faiblement chargés en polluants et des échantillons d'eau reconstitués concentrés par SPE ont été soumis au test algues combiné. L'objectif était de répondre aux deux questions suivantes :

- Observe-t-on des différences, pour un même échantillon, dans les valeurs de DEQ mesurées à quatre ou cinq reprises au cours d'une même journée ou à des jours différents (variabilité intrajournalière et interjournalière du bioessai) ?
- Observe-t-on des différences dans les valeurs de DEQ mesurées dans le test algues combiné après quatre extractions du même échantillon (variabilité générale) ?



### Possibilité de transposition aux échantillons réels

Un échantillon prélevé dans l'effluent de sortie d'une station d'épuration a été étudié afin de vérifier si les résultats relatifs au recouvrement, à la variabilité et à la reproductibilité du test étaient transposables aux échantillons réels.

### Pertinence des ajouts dosés (dopage)

Pour savoir si un dopage (avant extraction) des échantillons réels avec du diuron pouvait être pratiqué dans le contrôle de qualité des bioessais, comme c'est l'usage dans le domaine analytique, des essais ont été effectués avec des échantillons réels et de l'eau ultrapure auxquels différentes concentrations de diuron avaient été ajoutées.

## Matériel et méthodes

### Élaboration des échantillons

#### Échantillons reconstitués

Les échantillons d'eau reconstitués ont été composés en ajoutant des quantités définies de solutions mères à base d'éthanol à de l'eau ultrapure de façon à obtenir des concentrations réalistes d'inhibiteurs du photosystème II. Les échantillons suivants ont ainsi été constitués (Tab. 13) :

**Tab. 13 : Concentrations nominales d'inhibiteurs du photosystème II dans les échantillons d'eau reconstitués**

Dénomination	Composé	Conc. dans l'éch. reconstitué (ng/l)
Diuron <sub>faible</sub>	Diuron	50
Diuron <sub>fort</sub>	Diuron	500
MIX <sub>faible</sub>	Diuron	15
	Isoproturon	30
	Terbuthylazine	60
	Terbutryne	7,5
MIX <sub>fort</sub>	Diuron	150
	Isoproturon	300
	Terbuthylazine	600
	Terbutryne	75

L'échantillon Diuron<sub>fort</sub> correspond aux concentrations de diuron observées dans les effluents d'épuration et l'échantillon Diuron<sub>faible</sub> à celles habituellement rencontrées dans les eaux superficielles recevant ce type d'effluents. Les échantillons contenant un mélange d'inhibiteurs du PSII (MIX) renferment des concentrations réalistes de diuron, d'isoproturon, de terbuthylazine et de terbutryne, l'échantillon MIX<sub>fort</sub> présentant une concentration d'équivalents diuron (DEQ) élevée, typique d'un effluent d'épuration, et l'échantillon MIX<sub>faible</sub> une teneur en DEQ plus faible, représentative des eaux de surface. Ces échantillons vont permettre d'évaluer le taux de récupération et la variabilité et la reproductibilité des résultats de l'extraction en phase solide et du bioessai à différents niveaux de pollution. Pour les témoins, des solutions de référence ont été élaborées en ajoutant à de l'éthanol les mêmes concentrations d'inhibiteurs du PSII que celles attendues après extraction par SPE des échantillons d'eau reconstitués (extraits reconstitués). Le Tab. 14 donne une description détaillée de tous les échantillons reconstitués étudiés.



**Tab. 14 : Phase I - Liste des échantillons reconstitués étudiés**

Dénomination	Description	Traitements et études
<b>Recouvrement du diuron dans les échantillons reconstitués</b>		
Blanc	SPE d'eau ultrapure	SPE, bioessai
Diuron <sub>faible</sub>	Éthanol + 50 ng/l de diuron	Bioessai
Diuron <sub>fort</sub>	Éthanol + 500 resp. 1000 ng/l de diuron	Bioessai
Diuron <sub>faible</sub> (SPE)	SPE d'eau ultrapure additionnée de 50 ng/l de diuron	SPE, bioessai
Diuron <sub>fort</sub> (SPE)	SPE d'eau ultrapure additionnée de 500 ng/l de diuron	SPE, bioessai
Diuron <sub>faible</sub> après SPE	SPE d'eau ultrapure : ajout ultérieur de 50 ng/l de diuron	SPE, ajout de diuron, bioessai
Diuron <sub>fort</sub> après SPE	SPE d'eau ultrapure : ajout ultérieur de 500 ng/l de diuron	SPE, ajout de diuron, bioessai
<b>Variabilité du bioessai : réalisation de l'essai 4 fois le même jour (variabilité intrajournalière) et à 5 jours différents (variabilité interjournalière) avec des extraits reconstitués</b>		
Diuron <sub>faible</sub>	Éthanol + 50 ng/l de diuron	4 / 5 x le bioessai
Diuron <sub>fort</sub>	Éthanol + 500 ng/l de diuron	4 / 5 x le bioessai
MIX <sub>faible</sub>	Éthanol + mélange de diuron, d'isoproturon, de terbuthylazine et de terbutryne correspondant à 50 ng/l DEQ (MIX <sub>faible</sub> ) ou 500 ng/l DEQ (MIX <sub>fort</sub> )	4 / 5 x le bioessai
MIX <sub>fort</sub>		4 / 5 x le bioessai
<b>Variabilité totale de la méthode : quadruple extraction (SPE) puis bioessai avec chaque échantillon reconstitué</b>		
Blancs 1-4 (SPE)	SPE d'eau ultrapure	4 x SPE, 4 x bioessai
Diuron <sub>faible</sub> 1-4 (SPE)	SPE d'eau ultrapure additionnée de 50 ng/l de diuron	4 x SPE, 4 x bioessai
Diuron <sub>fort</sub> 1-4 (SPE)	SPE d'eau ultrapure additionnée de 500 ng/l de diuron	4 x SPE, 4 x bioessai
MIX <sub>faible</sub> 1-4 (SPE)	SPE d'eau ultrapure additionnée de concentrations réalistes de diuron, d'isoproturon, de terbuthylazine et de terbutryne correspondant à 50 ng/l DEQ (MIX <sub>faible</sub> ) ou 500 ng/l DEQ (MIX <sub>fort</sub> )	4 x SPE, 4 x bioessai
MIX <sub>fort</sub> 1-4 (SPE)		4 x SPE, 4 x bioessai

#### Dopage d'échantillons reconstitués ou réels

Pour tenter de savoir si les résultats concernant le rendement de récupération, la variabilité et la reproductibilité des méthodes sont transposables à des échantillons réels prélevés dans des matrices environnementales, un échantillon d'effluent d'épuration a été concentré par SPE de façon répétée puis soumis au test algues. Cette eau résiduaire traitée présente généralement un DEQ de l'ordre de 500 ng/l.

Pour juger de la validité des ajouts dosés, des échantillons dopés ont été créés en ajoutant 100, 500 et 1000 ng/l de diuron à des échantillons environnementaux réels. Pour les témoins, le même dopage a été effectué avec de l'eau ultrapure. Le Tab. 15 donne une description détaillée de tous les échantillons étudiés.



**Tab. 15 : Phase II - Liste des échantillons réels étudiés, avec et sans ajouts dosés**

STEP = station d'épuration, SPE = extraction en phase solide

Dénomination	Description	Traitements et études
<b>Possibilité de transposition aux échantillons réels pour l'étude de la variabilité totale : concentration de l'échantillon d'effluent d'épuration par SPE puis test algues combiné (plusieurs répétitions)</b>		
Blanc 1-4 (SPE)	SPE d'eau ultrapure	4 x SPE, 4 x bioessai
STEP 1-10	SPE d'un échantillon d'effluent de STEP	10 x SPE, 10 x bioessai
<b>Dopage d'échantillons réels (ajouts dosés de diuron)</b>		
Diuron <sub>faible</sub> (SPE) 1-3	SPE d'eau ultrapure additionnée de 100 ng/l de diuron	3 x SPE, 3 x bioessai
Diuron <sub>moyen</sub> (SPE) 1-3	SPE d'eau ultrapure additionnée de 500 ng/l de diuron	3 x SPE, 3 x bioessai
Diuron <sub>fort</sub> (SPE) 1-3	SPE d'eau ultrapure additionnée de 1000 ng/l de diuron	3 x SPE, 3 x bioessai
STEP + Diuron <sub>faible</sub> (SPE) 1-5	SPE d'effluent de STEP additionné de 100 ng/l de diuron	5 x SPE, 5 x bioessai
STEP + Diuron <sub>moyen</sub> (SPE) 1-5	SPE d'effluent de STEP additionné de 500 ng/l de diuron	5 x SPE, 5 x bioessai
STEP + Diuron <sub>fort</sub> (SPE) 1-5	SPE d'effluent de STEP additionné de 1000 ng/l de diuron	5 x SPE, 5 x bioessai

## Extraction

Dans tous les essais avec les échantillons reconstitués, le facteur de concentration des extraits d'échantillons à tester a été choisi de façon à ce qu'une limite de détection de 6 ng/l puisse être atteinte dans le test algues. Cette valeur dépasse les exigences de la directive cadre sur l'eau en matière analytique qui spécifie que la limite de détection doit être inférieure ou égale à 0,3 fois la NQE-MA. Pour le diuron ou l'équivalent diuron, cela correspond à 0,3 x 70 ng/l (NQE-MA du diuron), soit 21 ng/l.

Avant de pouvoir réaliser le test algues combiné, les échantillons d'eau reconstitués et les échantillons réels ont tout d'abord été concentrés par extraction en phase solide (SPE). Pour ce faire, leur pH a été ramené à une valeur de 3 par ajout d'HCl (1M). L'extraction a ensuite été réalisée avec des cartouches Lichrolut RP18/EN (Merck, Darmstadt, Allemagne) selon la SOP correspondante (Ecotox Centre, 2015). Les cartouches ont tout d'abord été conditionnées avec 2 ml d'hexane, 2 ml d'acétone, 6 ml de méthanol et 6 ml d'eau ultrapure (pH 3). Les échantillons ont ensuite été injectés sur les cartouches à raison de 1000 ml (blancs, Diuron<sub>faible</sub> et MIX<sub>faible</sub>) ou de 500 ml (tous les autres échantillons). Le blanc était constitué de 1000 ml d'eau ultrapure. Pour l'élution des échantillons, les cartouches ont été rincées avec 4 x 1 ml d'acétone et 1 ml de méthanol. La solution éluée a été réduite à un volume de 0,5 ml avec de l'azote puis ramenée à un volume de 1 ml par ajout d'éthanol avec une seringue Hamilton de 1 ml. Les échantillons concentrés d'un facteur 1000 (blancs, Diuron<sub>faible</sub> et MIX<sub>faible</sub>) ou 500 (tous les autres échantillons), à présent disponibles sous la forme de solutions de 1 ml d'un mélange de solvants (~50% d'éthanol, ~50% d'acétone et de méthanol) et d'analytes, ont été stockés à -20°C jusqu'à leur analyse en bioessai. Pour l'étude de la variabilité de l'extraction elle-même, la procédure décrite a été suivie 5 fois avec chaque échantillon.



## Réalisation du bioessai

### Méthode

La méthode à suivre pour réaliser le test algues combiné a été décrite en détail dans l'article de Margot et al. (2013). Pour toutes les études intervenant dans ce test, une courbe dose-réponse du diuron en tant qu'étalon de référence (établie pour la concentration de l'échantillon Diuron<sub>fort</sub>) et un témoin solvant (8 réplicats techniques chacun) ont été utilisés à des fins de contrôle de qualité.

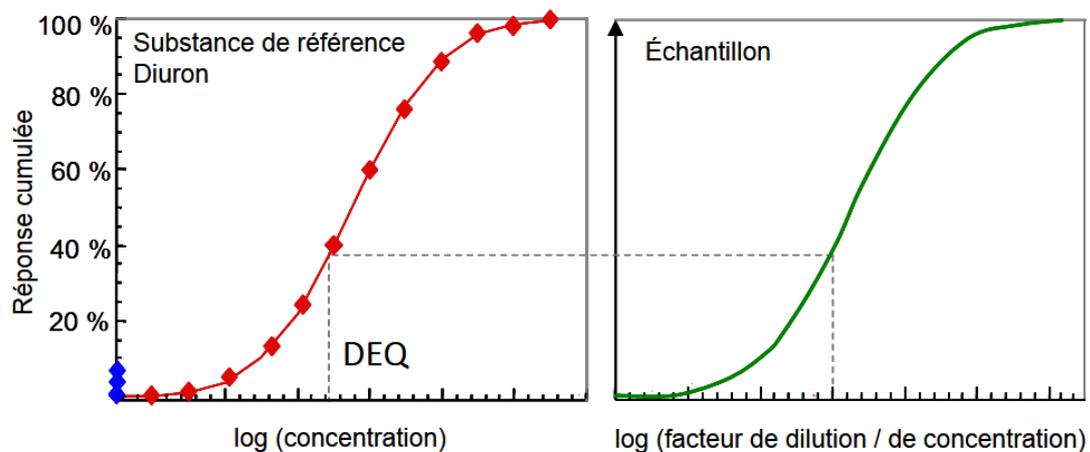
Pour les échantillons MIX éthanoliques et reconstitués, le DEQ attendu a été calculé à l'aide de facteurs d'équivalence diuron (DEF) spécifiques au test (Tab. 16) afin d'évaluer le recouvrement du bioessai seul ou avec l'extraction.

**Tab. 16 : Facteurs d'équivalence diuron (DEF) déterminés pour différents inhibiteurs du photosystème II et DEQ résultant attendu pour les échantillons étudiés dans le test algues combiné.**

Composé / Dénomination	DEF	DEQ attendu (ng/l)
Diuron	1	
Isoproturon	0,178	
Terbutryne	1,14	
Terbuthylazine	0,354	
MIX <sub>faible</sub>		49
MIX <sub>fort</sub>		491

### Analyse des données

Des courbes standard ont été ajustées par une régression non linéaire (fonction de Hill à 4 paramètres, GraphPad Prism®) pour déterminer la concentration effective moyenne (CE<sub>50</sub>), la limite de détection (Moyenne<sub>témoin</sub> + 3 \* écart-type<sub>témoin</sub>) et la limite de quantification (LQ = Moyenne<sub>témoin</sub> + 10 \* écart-type<sub>témoin</sub>). Des concentrations d'équivalent diuron (DEQ) ont été calculées pour les échantillons dont les effets étaient quantifiables dans le test algues combiné (valeur > limite de détection). Le DEQ est défini comme la concentration de diuron qui aurait le même effet que l'échantillon (cf. Fig. 6).



**Fig. 6 : Détermination de la concentration d'équivalents diuron (DEQ) par comparaison des concentrations efficaces de l'échantillon et du diuron choisi comme substance de référence.**



Les valeurs déterminées sont converties en ng/l de DEQ en tenant compte du facteur de dilution correspondant. Dans le test algues combiné, les valeurs ont été quantifiées dès lors qu'elles dépassaient la limite de détection.

## Résultats et discussion

### Limites de détection et de quantification

Grâce à l'extraction en phase solide, le test algues combiné peut atteindre une limite de détection de 1-2 ng/l de diuron ou de DEQ ainsi qu'une limite de quantification d'en moyenne 3-6 ng/l de diuron ou de DEQ. Sans préconcentration, la limite de détection était en moyenne de  $185 \pm 85$  ng/l diuron / DEQ ( $n = 91$  tests réalisés en 2014 au Centre Ecotox) et la limite de quantification de  $632 \pm 277$  ng/l diuron / DEQ. La concentration efficace ( $CE_{50}$ ) du diuron était en moyenne de  $1,86 \times 10^{-8}$  M diuron (intervalle de confiance de 95% =  $1,74 \times 10^{-8}$  à  $2,02 \times 10^{-8}$  M).

### Rendement de récupération

Les concentrations nominales de 50, 500 et 1000 ng/l de diuron ont été retrouvées à 76-102% dans les échantillons d'eau reconstitués et dans les témoins (recouvrement calculé en fonction des concentrations mesurées par voie analytique) (Tab. 17). Lorsque le diuron était ajouté après la SPE, le rendement de récupération variait entre 61 et 90%.

**Tab. 17 : Rendement de récupération du test algues combiné déterminé pour le diuron dans les échantillons reconstitués et éthanoliques.**

Les valeurs sont indiquées en équivalents diuron (DEQ) (ng/l). SPE = extraction en phase solide, moyenne = moyenne de trois réplicats techniques, nd = non détectable / non déterminable.

Dénomination	DEQ attendu (ng/l)	DEQ chim mesuré par analyse chimique (ng/l)	DEQ bio dans le test algues combiné (ng/l)		Rendement de récupération (par rapport au DEQ chim)
			Moyenne	Écart-type	
Blanc	0		nd		
Diuron <sub>faible</sub>	50	50	41	2	81%
Diuron <sub>faible</sub> (SPE)	50	47	36	3	75%
Diuron <sub>faible</sub> après SPE	50	4*	2,5	0,6	61%
Diuron <sub>fort</sub>	1000	960	980	51	102%
Diuron <sub>fort</sub> (SPE)	500	440	361	61	82%
Diuron <sub>fort</sub> après SPE	500	348	312	6	90%

\*sera répété

Dans l'ensemble, le recouvrement des concentrations nominales de diuron était bon.

### Variabilité et reproductibilité

Pour déterminer la variabilité des résultats (exprimés en DEQ) du test algues combiné, le même échantillon a été étudié plusieurs fois le même jour (variabilité intrajournalière) et à des jours différents (variabilité interjournalière). Pour estimer la variabilité du bioessai indépendamment de l'extraction en phase solide, des échantillons éthanoliques (extraits reconstitués) ont été étudiés, auxquels des inhibiteurs du photosystème II avaient été ajoutés dans les mêmes concentrations que celles attendues dans les extraits des échantillons d'eau reconstitués.



Variabilité et reproductibilité du bioessai

Dans des essais effectués indépendamment 4 fois le même jour ou à cinq jours différents sur le même échantillon, les valeurs de DEQ déterminées dans le test algues combiné variaient respectivement de 0,1 à 5 % (intra-journalière) et de 5 à 12 % (inter-journalière). Aucune différence de variabilité n'a été observée entre les types d'échantillons. Un rendement de récupération de 81 à 102 % a été observé dans les échantillons constitués de diuron tandis que 98 % du DEQ attendu était retrouvé dans ceux constitués d'un mélange d'inhibiteurs du PSII (MIX) (Tab. 18).

**Tab. 18 : Variabilité des résultats du test algues combiné : le test a été effectué 4 fois le même jour ou à cinq jours différents avec des extraits reconstitués.**

Les valeurs sont indiquées en équivalents diuron (DEQ) (ng/l).

Dénomination	DEQ attendu (ng/l)	DEQ chim mesuré par analyse chimique (ng/l)	DEQ bio dans le test algues combiné (ng/l)		Variabilité	Rendement de récupération (par rapport au DEQ chim)
			Moyenne	Écart-type		
Diuron <sub>faible</sub>	50	50	41	2	5%	81%
Diuron <sub>fort</sub>	1000	960	980	51	5%	102%
MIX <sub>faible</sub>	50	50	49	5	11%	98%
MIX <sub>fort</sub>	500	517	508	30	6%	98%

Reproductibilité et variabilité totale de la méthode (extraction en phase solide (SPE) + bioessai) avec des échantillons réels ou reconstitués

Les échantillons d'eau reconstitués ont été concentrés quatre fois chacun par extraction en phase solide. Chaque extrait a ensuite été soumis au test algues pour déterminer sa teneur en DEQ. La variabilité de ces mesures se situait entre 7 et 17 %, tous échantillons confondus (Tab. 19). La variabilité de 10 % observée pour l'échantillon d'effluent de STEP pour la combinaison extraction et bioessai présentait une bonne concordance avec les résultats obtenus avec les échantillons reconstitués.

**Tab. 19 : Reproductibilité et variabilité totale de la méthode : extraction par SPE 4 fois par échantillon puis détermination du DEQ avec le test algues combiné (10x pour l'effluent de station d'épuration (STEP)).**

Les valeurs sont indiquées en équivalents diuron (DEQ) (ng/l). SPE = extraction en phase solide, nd = non détectable / non déterminable.

Dénomination	DEQ attendu (ng/l)	DEQ chim mesuré par analyse chimique (ng/l)	DEQ bio dans le test algues combiné (ng/l)		Variabilité	Rendement de récupération (par rapport au DEQ chim)
			Moyenne	Écart-type		
Blanc (SPE) 1-4			nd		--	
Diuron <sub>faible</sub> (SPE) 1-4	50	47	36	3	7%	75%
Diuron <sub>fort</sub> (SPE) 1-4	500	440	361	61	17%	82%
MIX <sub>faible</sub> (SPE) 1-4	50	48	32	5	15%	66%
MIX <sub>fort</sub> (SPE) 1-4	500	524	513	53	10%	98%
Blanc (SPE) 1-4	--		nd		--	--
STEP (SPE) 1-10	--		491	50	10%	--

Le recouvrement après SPE était légèrement plus faible avec les échantillons peu pollués qu'avec ceux qui l'étaient fortement.



La reproductibilité de la SPE elle-même peut être estimée grossièrement à partir des données obtenues pour les échantillons faiblement et fortement pollués. Les variations des valeurs du DEQ déterminées dans le test algues combiné qui sont attribuables à la SPE (variabilité due à la SPE = moyenne de la variabilité totale - moyenne de la variabilité due au bioessai) étaient de l'ordre de 3 à 12 % (Tab. 20).

**Tab. 20 : Estimation de la variabilité due à la extraction en phase solide (SPE) (= variabilité totale - variabilité due au bioessai).**

Dénomination	Variabilité totale	Variabilité bioessai	Variabilité due à la SPE
Diuron <sub>faible</sub>	7%	5%	3%
Diuron <sub>fort</sub>	17%	5%	12%
MIX <sub>faible</sub>	15%	11%	4%
MIX <sub>fort</sub>	10%	6%	4%

De façon générale, la variabilité due à la SPE devrait plutôt être déterminée par voie analytique. Il faut cependant tenir compte du fait que le procédé d'extraction utilisé pour préparer les échantillons au bioessai peut différer de celui employé pour les analyses chimiques.

### Pertinence des ajouts dosés (dopage)

Le rendement de récupération du test algues combiné était de 45 - 79 % avec les échantillons d'eau ultrapure auxquels du diuron avait été ajouté à raison de 100, 500 ou 1000 ng/l avant l'extraction en phase solide. Avec les échantillons d'effluent dopés, le recouvrement déterminé par analyse chimique était de 99 - 125 %. Pour les échantillons d'effluent, le rendement de récupération calculé à partir des valeurs de DEQ mesurées dans le test algues avec les échantillons d'eau ultrapure dopés était de 112 - 147 % à l'issue de ce test (Tab. 21).

**Tab. 21 : Ajouts dosés de diuron dans des échantillons réels et mesure consécutive du DEQ dans le test algues combiné.**

Les valeurs sont indiquées en équivalents diuron (DEQ) (ng/l). STEP = station d'épuration, SPE = extraction en phase solide, nd = non détectable / non déterminable.

Dénomination	DEQ attendu * (ng/l)	DEQ chim mesuré par analyse chimique (ng/l)	DEQ bio dans le test algues combiné (ng/l)		Rend. de récupération **		Variabilité
			Moyenne	Écart- type	par rapport au DEQ chim	mesuré	
Blanc 1-4			nd				
Diuron <sub>faible</sub> (SPE) 1-3	100	96	<u>44</u>	5	45%	--	10%
Diuron <sub>moyen</sub> (SPE) 1-3	500	460	<u>365</u>	49	79%	--	13%
Diuron <sub>fort</sub> (SPE) 1-3	1000	952	<u>755</u>	111	79%	--	15%
STEP (SPE) 1-10	--	472	<u>491</u>	50	104%	--	10%
STEP + Diuron <sub>faible</sub> (SPE) 1-5	600	559	600	52	107%	<u>112%</u>	9%
STEP + Diuron <sub>moyen</sub> (SPE) 1-5	1000	1056	1041	67	99%	<u>122%</u>	6%
STEP + Diuron <sub>fort</sub> (SPE) 1-5	1500	1462	1832	46	125%	<u>147%</u>	2%

\* Le DEQ attendu a été calculé en ajoutant les concentrations nominales utilisées pour le dopage au DEQ mesuré dans l'effluent.

\*\* Le rendement de récupération a été calculé, d'une part, par rapport au DEQ chim déterminé par analyse chimique et, d'autre part, par rapport aux concentrations mesurées dans le témoin positif (eau ultrapure + 100, 500 ou 1000 ng/l de diuron) dans le cadre du test (colonne Rendement de récupération mesuré).



En matière de contrôle de qualité, il est dans l'ensemble plus difficile d'interpréter les résultats d'ajouts dosés de diuron dans les échantillons réels dans le cadre d'un bioessai que dans le cadre d'une analyse chimique où des standards marqués (deutérés) peuvent être utilisés. Ainsi, il n'est pas possible d'établir avec certitude si les pertes éventuelles de l'activité inhibitrice sur le photosystème II proviennent de l'échantillon lui-même ou des solutions étalon ajoutées. Il est également difficile de déterminer avec certitude le rendement de récupération de la totalité de la méthode (extraction + bioessai). Le recours aux témoins positifs (eau ultrapure additionnée de diuron) en autorise une certaine estimation. Mais il faut également garder à l'esprit que les échantillons réels sont toujours un mélange d'inhibiteurs variés du photosystème II et d'autres substances qui peuvent tous interagir et s'influencer mutuellement.

## Synthèse et perspectives

Les résultats ci-dessus montrent que la détermination des teneurs en équivalents diuron d'échantillons préconcentrés dans le cadre du test algues combiné peut être utilisée pour l'appréciation de la qualité de l'eau pour les effluents et les milieux recevant des eaux usées et que la méthode répond aux exigences fixées pour les analyses chimiques en matière de variabilité, de reproductibilité et de recouvrement (variabilité de l'ordre de 20-25 %). Les études effectuées à partir d'échantillons réels ou reconstitués afin de valider la méthode ont donné les résultats suivants :

- Grâce à l'extraction en phase solide, le test algues peut atteindre une limite de détection (LD) de moins de 6 ng/l de diuron et répond ainsi aux exigences de la directive cadre sur l'eau ( $LD < 0,3 \cdot NQE$ ). Cette sensibilité permet l'évaluation d'échantillons faiblement pollués dont le DEQ est inférieur à la NQE-MA du diuron qui est de 70 ng/l.
- Le recouvrement de 50, 500 et 1000 ng/l de diuron ou de DEQ dans les échantillons d'eau reconstitués ( $Diuron_{faible}$ ,  $Diuron_{fort}$ ,  $MIX_{faible}$ ,  $MIX_{fort}$ ) était stable et se situait entre 81 et 102 %. La variabilité des teneurs de DEQ mesurées dans ces échantillons avec le test algues était de 5 à 11 %.
- Les teneurs de DEQ mesurées avec le test algues combiné à l'issue de l'extraction en phase solide dans les échantillons faiblement ( $Diuron_{faible}$  (SPE) et  $MIX_{faible}$  (SPE)) et fortement concentrés en inhibiteurs du PSII ( $Diuron_{fort}$  (SPE) et  $MIX_{fort}$  (SPE)) présentaient une variabilité de 7 à 17 % avec un recouvrement de 66 à 98 %. Aucune différence significative n'a été observée dans la variabilité totale des échantillons faiblement ou fortement pollués.
- L'estimation sommaire de la reproductibilité de la SPE indique que la variabilité des teneurs en DEQ due à l'extraction (variabilité totale - variabilité due au bioessai) est de l'ordre de 3 à 12 % dans les échantillons faiblement et fortement pollués.
- Les valeurs de DEQ mesurées dans des échantillons d'effluent d'épuration dopés avec différentes concentrations de diuron font état d'un recouvrement de 99 à 125 % par rapport à l'analyse chimique.



## Annexe 4 Validation du test YES

### Détermination de la variabilité, de la reproductibilité et du recouvrement de l'activité œstrogénique mesurée par la méthode combinant extraction en phase solide et bioessai (test YES)

#### Introduction

##### Contexte et problématique

Pour que les bioessais puissent être intégrés au système d'appréciation de la qualité des eaux, il est impératif que leurs résultats, exprimés en équivalents bioanalytiques (BEQ, ici en équivalents  $17\beta$ -œstradiol (EEQ)), permettent de déterminer des classes de qualité. Or une appréciation robuste n'est possible qu'à la condition de connaître la variabilité et la reproductibilité de ces résultats. Dans le cadre de ce projet, ces paramètres ont été étudiés pour le test YES (Yeast Estrogen Screen).

Le projet s'est déroulé en deux phases. Dans un premier temps, la reproductibilité, la variabilité et l'extraction en phase solide (SPE) ont été étudiées en effectuant le test YES avec des échantillons d'eau reconstitués et leurs témoins respectifs. Dans un deuxième temps, un échantillon prélevé dans l'effluent de sortie d'une station d'épuration a été étudié afin de vérifier si les résultats de la première phase étaient transposables aux échantillons réels. Les résultats de ces essais sont exposés dans les pages qui suivent.

##### Objectifs de l'étude

Les éléments de validation suivants ont été étudiés pour le test YES :

##### Limites de détection et de quantification

Pour le test YES, la limite de détection ( $LD = \text{moyenne des témoins} + 3x \text{ l'écart-type des témoins}$ ) et la limite de quantification ( $LQ = \text{moyenne des témoins} + 10x \text{ l'écart-type des témoins}$ ) ont été déterminées.

##### Rendement de récupération

Pour déterminer le recouvrement ou le rendement de récupération du test YES, l'essai a été réalisé avec des solutions à concentrations connues en  $17\beta$ -œstradiol (E2), substance de référence des œstrogènes, ou en un mélange d'œstrogènes dans de l'eau ultrapure préconcentrées par extraction en phase solide. Les témoins étaient constitués de solutions éthanoliques de référence. L'objectif était notamment de savoir si le test permettait de détecter aussi bien les faibles que les fortes concentrations d'E2 (dans l'eau assez peu polluée des rivières par exemple).

##### Variabilité et reproductibilité

Pour vérifier la reproductibilité des résultats de la SPE et du bioessai, des échantillons éthanoliques fortement et faiblement chargés en polluants et des échantillons d'eau reconstitués concentrés par SPE ont été soumis au test YES. L'objectif était de répondre aux deux questions suivantes :

- Observe-t-on des différences, pour un même échantillon, dans les valeurs d'EEQ mesurées à cinq reprises au cours d'une même journée ou à des jours différents (variabilité intrajournalière et interjournalière du bioessai) ?
- Observe-t-on des différences dans les valeurs d'EEQ mesurées dans le test YES après quatre extractions du même échantillon (variabilité totale) ?



### Possibilité de transposition aux échantillons réels

Un échantillon prélevé dans l'effluent de sortie d'une station d'épuration a été étudié afin de vérifier si les résultats relatifs au recouvrement, à la variabilité et à la reproductibilité du test étaient transposables aux échantillons réels.

### Pertinence des ajouts dosés (dopage)

Pour savoir si un dopage (avant extraction) des échantillons réels avec du 17 $\beta$ -œstradiol pouvait être pratiqué dans le contrôle de qualité des bioessais, comme c'est l'usage dans le domaine analytique, des essais ont été effectués avec des échantillons réels et de l'eau ultrapure auxquels différentes concentrations de 17 $\beta$ -œstradiol avaient été ajoutées.

## Matériel et Méthodes

### Constitution des échantillons

#### Échantillons reconstitués

Les échantillons d'eau reconstitués ont été composés en ajoutant des solutions mères à base d'éthanol à de l'eau ultrapure de façon à obtenir des concentrations réalistes de substances à activité œstrogénique. Les échantillons suivants ont ainsi été constitués (Tab. 22)

**Tab. 22 : Concentrations de substances à activité œstrogénique dans les échantillons d'eau reconstitués.**

Dénomination	Composé	Conc. dans l'éch. reconstitué (ng/l)
E2 <sub>faible</sub>	17 $\beta$ -œstradiol	0,3
E2 <sub>fort</sub>	17 $\beta$ -œstradiol	6
MIX <sub>faible</sub>	17 $\beta$ -œstradiol	0,1
	Estrone	0,8
	Éthinylestradiol	0,01
	Bisphénol A	50
MIX <sub>fort</sub>	17 $\beta$ -œstradiol	1
	Estrone	8
	Éthinylestradiol	0,1
	Bisphénol A	500

L'échantillon E2<sub>fort</sub> correspond aux concentrations de 17 $\beta$ -œstradiol observées dans les effluents d'épuration. L'échantillon E2<sub>faible</sub> a été constitué de sorte que sa concentration se situe en dessous de 0,4 ng/l, la valeur proposée pour le critère de qualité *chronique* (CQC ou NQE-MA) à appliquer au 17 $\beta$ -œstradiol. Les échantillons contenant un mélange de substances à activité œstrogénique (MIX) renferment des concentrations réalistes d'estrone (E1), de 17 $\beta$ -œstradiol (E2), d'éthinylestradiol (EE2) et de bisphénol A (BPA), l'échantillon MIX<sub>fort</sub> présentant une concentration d'EEQ élevée, typique d'un effluent d'épuration, et l'échantillon MIX<sub>faible</sub> une teneur en EEQ plus faible, représentative des eaux de surface. Ces échantillons doivent permettre d'évaluer le recouvrement, la variabilité et la reproductibilité des résultats de la SPE et du bioessai à différents niveaux de pollution. Les échantillons dopés nécessaires à l'évaluation de la pertinence des ajouts dosés ont été obtenus en ajoutant de l'E2 aux échantillons reconstitués.

Pour les témoins, des solutions de référence ont été élaborées en ajoutant à de l'éthanol les mêmes concentrations de substances à activité œstrogénique que celles attendues après extraction par SPE des échantillons d'eau reconstitués (extraits reconstitués).

Le Tab. 23 donne une description détaillée de tous les échantillons étudiés.



**Tab. 23 : Phase I - Liste des échantillons reconstitués étudiés.**

BPA = bisphénol A, E1 = estrone, E2 = 17 $\beta$ -œstradiol, EE2 = 17 $\alpha$  éthinylestradiol, SPE = extraction en phase solide

Dénomination	Description	Traitements et études
<b>Recouvrement de l'E2 dans les échantillons reconstitués</b>		
Blanc (SPE)	SPE d'eau ultrapure	SPE, bioessai
E2 <sub>fort</sub>	Éthanol additionné de 6 ng/l E2	Bioessai
E2 <sub>faible</sub> (SPE)	SPE d'eau ultrapure additionnée de 0,3 ng/l E2	SPE, bioessai
E2 <sub>fort</sub> (SPE)	SPE d'eau ultrapure additionnée de 6 ng/L E2	SPE, bioessai
E2 <sub>faible</sub> après SPE	SPE d'eau ultrapure : ajout ultérieur de 0,3 ng/l E2	SPE, ajout d'E2, bioessai
E2 <sub>fort</sub> après SPE	SPE d'eau ultrapure : ajout ultérieur de 6 ng/l E2	SPE, ajout d'E2, bioessai
<b>Variabilité et reproductibilité des résultats du bioessai : étude du même extrait reconstitué 5 fois le même jour (variabilité intrajournalière) et à 5 jours différents (variabilité interjournalière)</b>		
E2 <sub>fort</sub>	Éthanol + 6 ng/l E2	5 x bioessai
MIX <sub>faible</sub>	Éthanol + mélange d'E1, d'E2, d'EE2 et de BPA correspondant à 0,3 ng/l d'EEQ (MIX <sub>faible</sub> ) ou 6 ng/l d'EEQ (MIX <sub>fort</sub> )	5 x bioessai
MIX <sub>fort</sub>		5 x bioessai
<b>Variabilité totale de la méthode : quintuple extraction (SPE) puis bioessai avec chaque échantillon reconstitué</b>		
Blanc (SPE) 1-5	SPE d'eau ultrapure	5 x SPE, 5 x bioessai
E2 <sub>fort</sub> (SPE) 1-5	SPE d'eau ultrapure + 6 ng/l E2	5 x SPE, 5 x bioessai
MIX <sub>faible</sub> (SPE) 1-5	SPE d'eau ultrapure + concentrations réalistes d'E1, d'E2, d'EE2 et de BPA correspondant à 0,3 ng/l EEQ (MIX <sub>faible</sub> ) ou 6 ng/l EEQ (MIX <sub>fort</sub> )	5 x SPE, 5 x bioessai
MIX <sub>fort</sub> (SPE) 1-5		5 x SPE, 5 x bioessai

#### Dopage d'échantillons reconstitués ou réels

Pour tenter de savoir si les résultats concernant le rendement de récupération, la variabilité et la reproductibilité des méthodes sont transposables à des échantillons réels prélevés dans des matrices environnementales, un échantillon d'effluent d'épuration peu pollué a été concentré par SPE puis soumis au test YES de façon répétée. Cette eau résiduaire traitée présente généralement un EEQ de l'ordre de 0,5 à 1 ng/l.

Pour juger de la validité des ajouts dosés, des échantillons dopés ont été créés en effectuant un ajout supplémentaire de 0,6, 2 et 6 ng/l d'E2 aux échantillons environnementaux réels. Pour les témoins, le même dopage a été effectué avec de l'eau ultrapure. Le Tab. 24 donne une description détaillée de tous les échantillons étudiés.



**Tab. 24 : Phase II - Liste des échantillons reconstitués ou réels, avec ou sans ajouts dosés**

STEP = station d'épuration, E2 = 17 $\beta$ -œstradiol, SPE = extraction en phase solide.

Dénomination	Description	Traitements et études
<b>Possibilité de transposition aux échantillons réels pour l'étude de la variabilité totale : concentration de l'échantillon d'effluent d'épuration par SPE puis test YES (plusieurs répétitions)</b>		
Blanc 1-4	SPE d'eau ultrapure	4 x SPE, 4 x bioessai
STEP 1-10	SPE d'effluent de STEP	10 x SPE, 10 x bioessai
<b>Dopage d'échantillons réels (ajouts dosés d'E2)</b>		
E2 <sub>faible</sub> x 2 (SPE) 1-3	SPE d'eau ultrapure + 0.6 ng/l E2	3 x SPE, 3 x bioessai
E2 <sub>moyen</sub> (SPE) 1-3	SPE d'eau ultrapure + 2 ng/l E2	3 x SPE, 3 x bioessai
E2 <sub>fort</sub> (SPE) 1-3	SPE d'eau ultrapure + 6 ng/l E2	3 x SPE, 3 x bioessai
STEP + E2 <sub>faible</sub> x 2 (SPE) 1-5	SPE d'effluent de STEP + 0.6 ng/l E2	5 x SPE, 5 x bioessai
STEP + E2 <sub>moyen</sub> (SPE) 1-5	SPE d'effluent de STEP + 2 ng/l E2	5 x SPE, 5 x bioessai
STEP + E2 <sub>fort</sub> (SPE) 1-5	SPE d'effluent de STEP + 6 ng/l E2	5 x SPE, 5 x bioessai

## Extraction

Dans tous les essais avec les échantillons reconstitués, le facteur de concentration des extraits d'échantillons à tester a été choisi de façon à ce qu'une limite de détection de 0,12 ng/l puisse être atteinte dans le test YES. Cette valeur correspond aux exigences de la directive cadre sur l'eau en matière analytique qui spécifie que la limite de détection doit être inférieure ou égale à 0,3 fois la NQE-MA. Pour l'E2 ou l'EEQ, cela correspond à 0,3 x 0,4 ng/l (NQE-MA du 17 $\beta$ -œstradiol), soit 0,12 ng/l.

Avant de pouvoir réaliser le test YES, les échantillons d'eau reconstitués et les échantillons réels ont tout d'abord été concentrés par extraction en phase solide (SPE). Pour ce faire, leur pH a été ramené à une valeur de 3 par ajout d'HCl (1M). L'extraction a ensuite été réalisée avec des cartouches Lichrolut RP18/EN (Merck, Darmstadt, Allemagne) selon la SOP correspondante (Ecotox Centre, 2015). Les cartouches ont tout d'abord été conditionnées avec 2 ml d'hexane, 2 ml d'acétone, 6 ml de méthanol et 6 ml d'eau ultrapure (pH 3). Les échantillons ont ensuite été injectés sur les cartouches à raison de 1000 ml (E2<sub>faible</sub> et MIX<sub>faible</sub>) ou de 500 ml (tous les autres échantillons). Le blanc était constitué de 500 ml d'eau ultrapure. Pour l'élution des échantillons, les cartouches ont été rincées avec 4 x 1 ml d'acétone et 1 ml de méthanol. La solution éluée a été réduite à un volume de 0,5 ml avec de l'azote puis ramenée à un volume de 1 ml par ajout d'éthanol avec une seringue Hamilton de 1 ml. Les échantillons concentrés d'un facteur 1000 (E2<sub>faible</sub> et MIX<sub>faible</sub>) ou 500 (tous les autres échantillons), à présent disponibles sous la forme de solutions de 1 ml d'un mélange de solvants (~50% d'éthanol, ~50% d'acétone et de méthanol) et d'analytes, ont été conservés à -20°C jusqu'à leur analyse en bioessai. Pour l'étude de la variabilité de l'extraction elle-même, la procédure décrite a été suivie 5 fois avec chaque échantillon.



## Réalisation du bioessai

### Méthode

La méthode à suivre pour réaliser le test YES a été décrite en détail dans l'article de Routledge et Sumpter (1996). Pour toutes les études intervenant dans ce test, une courbe dose-réponse de 17 $\beta$ -œstradiol en tant qu'étalon de référence et un témoin solvant (8 réplicats techniques chacun) ont été utilisés à des fins de contrôle de qualité.

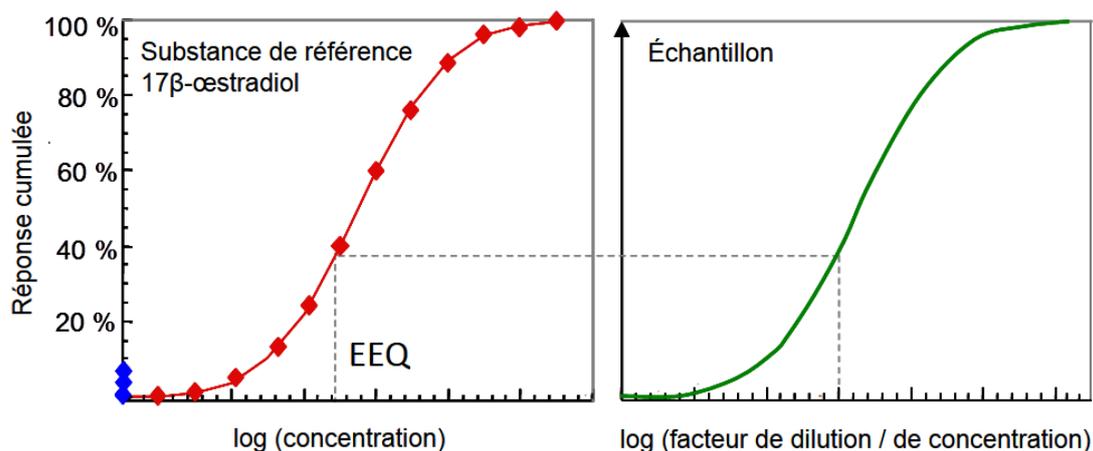
Pour les échantillons MIX éthanoliques et reconstitués, l'EEQ attendue a été calculée à l'aide de facteurs d'équivalence E2 (EEF) spécifiques au test (Tab. 25) afin d'évaluer le recouvrement du bioessai seul ou avec l'extraction.

**Tab. 25 : Facteurs d'équivalence 17 $\beta$ -œstradiol (E2) (EEF) des substances à activité œstrogénique et EEQ attendue en conséquence dans les échantillons étudiés dans le test YES.**

Composé / Dénomination	EEF	EEQ attendue (ng/l)
17 $\beta$ -œstradiol (E2)	1	
Estrone (E1)	0,265	
17 $\alpha$ éthinylestradiol (EE2)	1,181	
Bisphénol A (BPA)	6,47E-05	
MIX <sub>faible</sub>		0,31
MIX <sub>fort</sub>		3,19

### Analyse des données

Des courbes standard ont été ajustées par une régression non linéaire (fonction de Hill à 4 paramètres, GraphPad Prism®) pour déterminer la concentration efficace moyenne (CE<sub>50</sub>), la limite de détection (Moyenne<sub>signal de fond</sub> + 3 \* écart-type<sub>signal de fond</sub>) et la limite de quantification (LQ = Moyenne<sub>signal de fond</sub> + 10 \* écart-type<sub>signal de fond</sub>). Des concentrations d'équivalent 17 $\beta$ -œstradiol (EEQ) ont été calculées pour les échantillons dont les effets étaient quantifiables dans le test YES (induction > limite de détection). L'EEQ est définie comme la concentration de 17 $\beta$ -œstradiol qui aurait le même effet que l'échantillon (cf. Fig. 7).



**Fig. 7 : Détermination de la concentration d'équivalent 17 $\beta$ -œstradiol (EEQ) par comparaison des concentrations efficaces de l'échantillon et du 17 $\beta$ -œstradiol choisi comme substance de référence.**

Dans le test YES, les mesures ont été quantifiées lorsqu'elles se situaient dans le domaine de linéarité entre la limite de détection et la CE<sub>80</sub>. Pour les échantillons dont les courbes dose-



réponse présentaient une pente très différente de la substance de référence E2 (courbes dose-réponse non parallèles), les points de mesure situés dans la partie inférieure du domaine de linéarité (au-dessus de la limite de détection) ont été pris en compte pour le calcul de l'EEQ.

## Résultats et discussion

### Limites de détection et de quantification

En 2013, l'année de réalisation des essais, la limite de détection observée pour le test YES était en moyenne de  $9,2 \pm 2,0$  ng/l d'E2 ou d'EEQ ( $n = 44$  tests) et la limite de quantification moyenne de  $11 \pm 2,6$  ng/l E2 / EEQ. Grâce à l'extraction en phase solide, la limite de détection a pu être abaissée à 0,19 ng/l E2 / EEQ dans les échantillons fortement chargés en polluants (E2<sub>fort</sub> et MIX<sub>fort</sub>) et à 0,09 ng/l E2 / EEQ dans les faiblement chargés (E2<sub>faible</sub> et MIX<sub>faible</sub>) cependant que la limite de quantification était ramenée à, respectivement, 0,22 et 0,11 ng/l d'E2 ou d'EEQ. La concentration efficace (CE<sub>50</sub>) du 17 $\beta$ -œstradiol était en moyenne de  $1,1 \times 10^{-10}$  M 17 $\beta$ -œstradiol (intervalle de confiance de 95% =  $9,5 \times 10^{-11}$  à  $1,1 \times 10^{-10}$  M).

### Rendement de récupération

Le recouvrement du 17 $\beta$ -œstradiol à une concentration nominale de 6 ng/l était stable et situé entre 82 et 108 %. Dans les échantillons peu chargés en polluants, le rendement de récupération était beaucoup plus faible et n'atteignait que 40 à 63 % de l'E2 ajouté (Tab. 26).

**Tab. 26 : Rendement de récupération du 17 $\beta$ -œstradiol (E2) dans le test YES avec les échantillons reconstitués ou éthanoliques.**

Les valeurs sont exprimées en équivalents 17 $\beta$ -œstradiol (EEQ) (ng/l). SPE = extraction en phase solide, moyenne = moyenne de trois réplicats, nd = non détectable / non déterminable.

Dénomination	EEQ attendue (ng/l)	EEQ mesurée dans le YES (ng/L)		Récupération
		Moyenne	Écart-type	
Blanc	0	nd		
E2 <sub>fort</sub>	6	6,45	0,44	108%
E2 <sub>fort</sub> (SPE)	6	4,90	1,32	82%
E2 <sub>fort</sub> après SPE	6	5,94	0,35	99%
E2 <sub>faible</sub> (SPE)	0,3	0,19	0,07	63%
E2 <sub>faible</sub> après SPE	0,3	0,12	0,05	40%

Afin de pouvoir se prononcer réellement sur le rendement de récupération du test YES avec les échantillons faiblement pollués, il est recommandé d'effectuer des essais supplémentaires tenant compte de la variabilité et de la reproductibilité des résultats.

### Variabilité et reproductibilité

Pour déterminer la variabilité des résultats (exprimés en EEQ) du test YES, le même échantillon a été étudié plusieurs fois le même jour (variabilité intrajournalière) et à des jours différents (variabilité interjournalière). Pour estimer la variabilité du bioessai indépendamment de l'extraction en phase solide, des échantillons éthanoliques (extraits reconstitués) ont été étudiés, auxquels des substances à activité œstrogénique ont été ajoutés dans les mêmes concentrations que celles attendues dans les extraits des échantillons d'eau reconstitués.



### Variabilité et reproductibilité du test

Dans des essais effectués indépendamment 5 fois le même jour ou à cinq jours différents sur le même échantillon, les valeurs d'EEQ déterminées dans le test YES variaient de 12 à 31 % (Tab. 27). La variabilité la plus forte a été observée avec l'échantillon à 0,3 ng/l EEQ. Un rendement de récupération de 109 % a été observé dans l'échantillon E2 tandis que 51-79 % de l'EEQ attendue était retrouvée dans ceux constitués d'un mélange de substances à activité œstrogénique.

**Tab. 27 : Variabilité et reproductibilité des résultats du test YES (Yeast Estrogen Screen) : des extraits reconstitués ont été testés cinq fois le même jour ou à cinq jours différents.**

Les valeurs sont exprimées en équivalents 17 $\beta$ -œstradiol (EEQ) (ng/l). E2 = 17 $\beta$ -œstradiol.

Dénomination	EEQ attendue (ng/l)	EEQ mesurée avec YES (ng/l)		Variabilité	Récupération (par rapport à l'EEQ attendue)
		Moyenne	Ecart-type		
E2 <sub>fort</sub>	6	6,56	1,52	23%	109%
MIX <sub>fort</sub>	3,19	2,52	0,30	12%	79%
MIX <sub>faible</sub>	0,31	0,16	0,05	31%	51%

### Reproductibilité et variabilité totale de la méthode (extraction en phase solide (SPE) + bioessai) avec des échantillons réels ou reconstitués

Les échantillons d'eau reconstitués ont été concentrés 5 fois chacun par extraction en phase solide, les échantillons réels 10 fois. Chaque extrait a ensuite été soumis au test YES pour déterminer sa teneur en EEQ.

La variabilité de ces mesures se situait entre 17 et 26 %, tous échantillons confondus. Conformément aux attentes, la variabilité totale la plus élevée et le rendement de récupération le plus faible ont été observés avec l'échantillon faiblement pollué (MIX<sub>faible</sub> (SPE) 1-5). La variabilité totale de 21 % observée pour l'échantillon d'effluent de STEP présentait une bonne concordance avec les résultats obtenus avec les échantillons reconstitués (Tab. 28).

**Tab. 28 : Reproductibilité et variabilité totale de la méthode : extraction par SPE 5 fois par échantillon puis mesure de l'EEQ avec le test YES (10x pour l'effluent de station d'épuration (STEP)).**

Les valeurs sont exprimées en équivalents 17 $\beta$ -œstradiol (EEQ) (ng/l). SPE = extraction en phase solide, E2 = 17 $\beta$ -œstradiol, nd = non détectable / non déterminable.

Dénomination	EEQ attendue (ng/l)	EEQ mesurée avec YES (ng/l)		Variabilité	Récupération (par rapport à l'EEQ attendue)
		Moyenne	Ecart-type		
Blanc (SPE) 1-5	--	nd		--	--
E2 <sub>fort</sub> (SPE) 1-5	6	7,45	1,39	19%	124%
MIX <sub>fort</sub> (SPE) 1-5	3,19	2,86	0,48	17%	90%
MIX <sub>faible</sub> (SPE) 1-5	0,31	0,23	0,06	26%	74%
Blanc (SPE) 1-4	--	ND		--	--
STEP (SPE) 1-10	--	0,12	0,03	21%	--

La reproductibilité de la SPE elle-même peut être estimée grossièrement à partir des données obtenues pour les échantillons fortement chargés en polluants. Les variations des valeurs d'EEQ



déterminées dans le test YES qui sont attribuables à la SPE (variabilité due à la SPE = moyenne de la variabilité totale - moyenne de la variabilité due au bioessai) étaient de -4-5 % (Tab. 29).

**Tab. 29 : Estimation de la variabilité due à la extraction en phase solide (SPE) (= variabilité totale - variabilité due au bioessai).**

Dénomination	Variabilité totale	Variabilité du bioessai	Variabilité due à la SPE
E2 <sub>fort</sub>	19%	23%	-4%
MIX <sub>fort</sub>	17%	12%	5%

De façon générale, la variabilité due à la SPE devrait plutôt être déterminée par voie analytique. Il faut cependant tenir compte du fait que le procédé d'extraction utilisé pour préparer les échantillons au bioessai peut différer de celui employé pour les analyses chimiques.

### Pertinence des ajouts dosés (dopage)

Les essais effectués pour évaluer la pertinence d'ajouts dosés d'E2 à des fins de contrôle de qualité du bioessai ne livrent pas de résultats concluants. Le rendement nominal de récupération du test YES était de 48 - 81 % avec les échantillons d'effluent dopés avec 0,6, 2 ou 6 ng/l E2. S'il était calculé pour ces mêmes échantillons d'effluent à partir des valeurs d'EEQ mesurées dans le test YES avec les échantillons d'eau ultrapure dopés, le rendement de récupération était de 86 - 114 % à l'issue de ce test (Tab. 30).

**Tab. 30 : Ajouts dosés de 17β-œstradiol (E2) dans des échantillons réels et mesure consécutive de l'EEQ dans le test YES.**

Les valeurs sont exprimées en équivalents 17β-œstradiol (EEQ) (ng/l). E2 = 17β-œstradiol, SPE = extraction en phase solide, STEP = Station d'épuration, nd = non détectable / non déterminable.

Dénomination	EEQ attendue* (ng/l)	EEQ mesurée avec YES (ng/l)		Variabilité	Récupération ** (par rapport à l'EEQ attendue) *	
		Moyenne	Écart-type		Base nominale	Base mesurée
Blanc 1-4		nd				
E2 <sub>faible</sub> x 2 (SPE) 1-3	0,60	<u>0,18</u>	0,01	8%	30%	--
E2 <sub>moyen</sub> (SPE) 1-3	2,00	<u>1,21</u>	0,02	1%	61%	--
E2 <sub>fort</sub> (SPE) 1-3	6,00	<u>4,39</u>	0,07	2%	73%	--
STEP (SPE) 1-10	--	<u>0,12</u>	0,03	21%	--	--
STEP + E2 <sub>faible</sub> x 2 (SPE) 1-5	0,72	0,34	0,03	10%	48%	<u>114%</u>
STEP + E2 <sub>moyen</sub> (SPE) 1-5	2,12	1,14	0,23	21%	54%	<u>86%</u>
STEP + E2 <sub>fort</sub> (SPE) 1-5	6,12	4,93	0,38	8%	81%	<u>109%</u>

\* L'EEQ attendue a été calculé en ajoutant la concentration d'EEQ mesurée dans l'effluent aux concentrations nominales utilisées pour les ajouts dosés.

\*\* Le rendement de récupération nominal a été calculé avec les valeurs d'EEQ attendues. À titre de comparaison, le recouvrement a également été calculé à partir des valeurs mesurées avec le bioessai dans les témoins positifs (eau ultrapure + 0,6, 2 ou 6 ng/l E2) et dans l'effluent de STEP (colonne récupération / base mesurée).

En matière de contrôle de qualité, il est dans l'ensemble plus difficile d'interpréter les résultats d'ajouts dosés d'E2 dans les échantillons réels dans le cadre d'un bioessai que dans le cadre d'une analyse chimique. Ainsi, il n'est pas possible d'établir avec certitude si les pertes éventuelles de l'activité œstrogénique observée dans un échantillon dopé proviennent de l'échantillon lui-même ou des solutions étalon ajoutées, comme cela serait possible avec des ajouts d'étalons deutérés. Et il est tout aussi impossible de savoir quelle serait l'activité



œstrogénique de l'échantillon sans cette perte. D'autre part, il est difficile de déterminer avec certitude le rendement de récupération de la totalité de la méthode (extraction + bioessai). Le recours aux témoins positifs (eau ultrapure additionnée d'E2) en autorise une certaine estimation. Mais il faut garder à l'esprit que la présence éventuelle, dans le milieu à analyser et donc dans l'échantillon, de composés agissant de manière entièrement ou partiellement antagoniste<sup>1</sup> peut avoir pour effet une réduction de l'activité œstrogénique qui pourrait être à tort interprétée comme un mauvais recouvrement de l'ajout dosé d'E2. Pour éviter une telle confusion, il serait peut-être judicieux de déterminer, en parallèle, l'activité anti-œstrogénique de l'échantillon.

En termes de contrôle de qualité, il semble que les ajouts dosés d'E2 dans un échantillon réel ne soient pas d'un apport notable. Il paraît plus intéressant de recourir à un blanc (eau ultrapure) et à des témoins positifs (éthanol + E2 et eau ultrapure + E2) ainsi qu'au contrôle concomitant de l'activité anti-œstrogénique.

## Résumé

Les résultats ci-dessus montrent que la détermination des concentrations en équivalent 17 $\beta$ -œstradiol d'échantillons préconcentrés dans le cadre du test YES peut être utilisée pour l'appréciation de la qualité de l'eau dans les effluents et les milieux recevant des eaux usées et que la méthode répond aux exigences fixées pour les analyses chimiques en matière de variabilité, de reproductibilité et de recouvrement (variabilité de l'ordre de 20-25 %). Les études effectuées à partir d'échantillons réels ou reconstitués afin de valider la méthode ont donné les résultats suivants :

- Grâce à l'extraction en phase solide, le test YES peut atteindre une limite de détection (LD) de moins de 0,12 ng/l d'E2 et répond ainsi aux exigences de la directive cadre sur l'eau (LD < 0,3\*NQE). Cette sensibilité permet l'évaluation d'échantillons faiblement chargés dont l'EEQ est inférieur à la NQE-MA du 17 $\beta$ -œstradiol qui est de 0,4 ng/l.
- Dans les témoins et les échantillons d'eau reconstitués, le recouvrement du 17 $\beta$ -œstradiol à une concentration nominale de 6 ng/l était stable et situé entre 82 et 108 %. Seuls les échantillons peu chargés se caractérisaient par un rendement de récupération assez faible (40 à 63 %). La concentration recherchée (0,3 ng/l E2) était cependant proche de la limite de quantification (0,11 ng/l E2). Des essais supplémentaires avec les échantillons reconstitués pourraient apporter les éclaircissements nécessaires.
- La variabilité des valeurs d'EEQ mesurées dans le test YES se situait entre 12 et 31 %.
- La méthode (extraction en phase solide + test YES) présentait une variabilité totale de 17 à 19 % avec les échantillons fortement chargés en substances à activité œstrogénique (E2<sub>fort</sub> et MIX<sub>fort</sub>) et de 26 % avec les échantillons peu chargés (< NQE-MA de l'E2).
- L'estimation grossière de la reproductibilité de la SPE (variabilité totale - variabilité due au bioessai) indique que la variabilité des valeurs d'EEQ attribuable à la SPE est de -4 à 5%.

Dans une deuxième phase du projet, la variabilité totale de la méthode (SPE + bioessai) a été déterminée dans un échantillon d'effluent d'épuration. Pour ce faire, l'échantillon a été dopé avec du 17 $\beta$ -œstradiol et son taux de récupération a été déterminé dans le test YES après extraction. Les résultats suivants ont été obtenus :

- La variabilité totale des mesures d'EEQ effectuées avec le test YES dans l'effluent d'épuration après extraction en phase solide était de 21%.
- En termes de contrôle de qualité, il semble que les ajouts dosés d'E2 dans un échantillon réel ne soient pas d'un grand intérêt. Il paraît plus judicieux de recourir à un blanc (eau ultrapure) et à des témoins positifs (éthanol + E2 et eau ultrapure + E2) ainsi qu'au contrôle concomitant de l'activité anti-œstrogénique.

<sup>1</sup> Les antagonistes partiels ont la capacité d'induire une activité œstrogénique quand ils agissent seuls mais d'inhiber celle de l'E2 lorsque ce dernier est présent dans le milieu et donc d'agir comme des antagonistes.



## **Annexe 5 Etudes de cas d'application du système d'appréciation**

### **Cas n° 1 : Appréciation de l'activité œstrogénique dans les effluents d'épuration et les cours d'eau du canton de Saint-Gall**

#### **Introduction**

Des analyses ont été effectuées en 2012 dans les effluents d'épuration et les cours d'eau du canton de Saint-Gall de même qu'au niveau d'une sélection de stations d'épuration des cantons avoisinants et de la Principauté de Liechtenstein afin de déterminer les sources ponctuelles d'émissions de micropolluants venant des eaux résiduaires urbaines. Dans le cadre de cette étude, l'activité œstrogénique a été mesurée avec le test YES (Yeast Estrogen Screen). En appliquant le facteur de dilution aux teneurs mesurées dans les effluents, les concentrations dans les cours d'eau récepteurs ont été calculées puis comparées à des valeurs écotoxicologiques pour déterminer l'importance potentielle des œstrogènes pour ces milieux. Le degré de contamination par les substances à activité œstrogénique a ensuite été interprété en termes de qualité de l'eau en utilisant le système à cinq classes proposé ici.

#### **Matériel et méthodes**

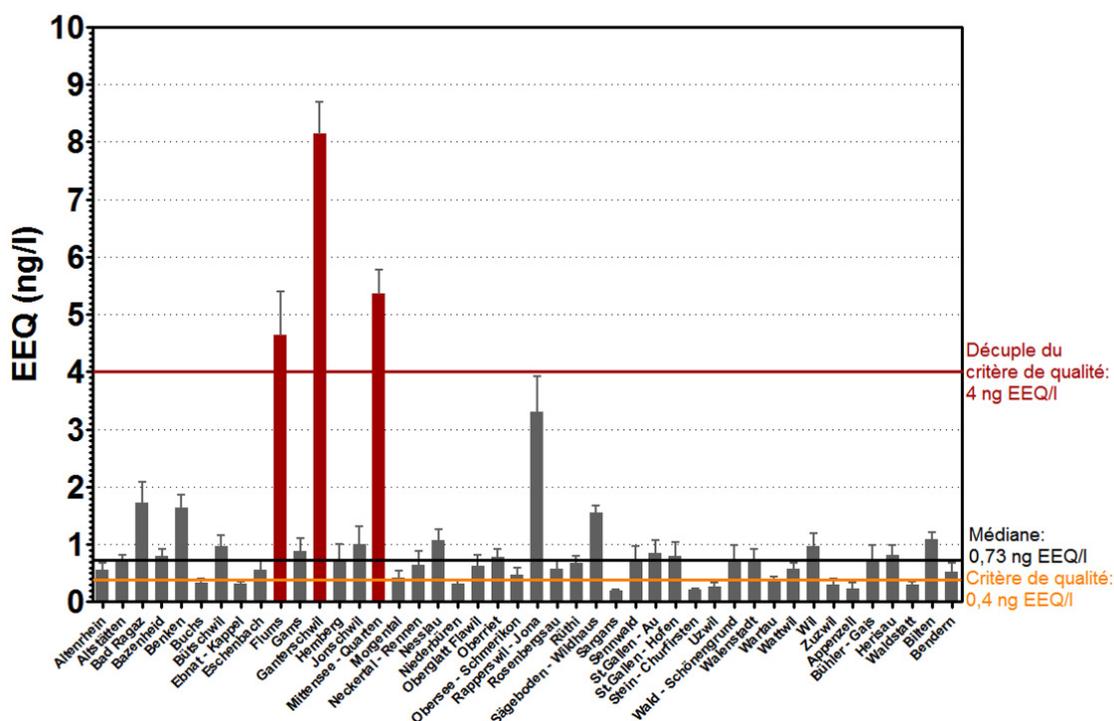
Au printemps 2012, des échantillons moyennés sur une semaine ont été prélevés dans les effluents émis par 44 stations d'épuration communales (STEP). Ces prélèvements ont été effectués en sortie de 38 des 42 stations du canton de Saint-Gall et de 6 stations des cantons voisins et du Liechtenstein. Les paramètres suivants ont été étudiés : les concentrations en équivalents 17 $\beta$ -œstradiol avec le test YES et les concentrations en divers composés traces organiques, en anions (bromures, chlorures, fluorures) et en halogènes organiques adsorbables (AOX) par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse (GC-MS). Pour les analyses, les échantillons ont tout d'abord été reconcentrés par extraction en phase solide (SPE) (voir Annexe 1). Dans ce qui suit, seuls les résultats du test YES sont présentés. Les autres analyses sont détaillées dans le rapport du service de l'environnement du canton de Saint-Gall (Amt für Umwelt und Energie des Kantons St. Gallen, 2013).

#### **Résultats**

##### *Teneurs en EEQ mesurées dans les effluents d'épuration*

La limite de détection du test variait en fonction du degré de reconcentration des échantillons par SPE et se situait entre 0,04 ng/l (facteur de concentration de 186) et 0,02 ng/l (facteur de concentration de 399).

Les teneurs en EEQ mesurées avec le test YES sont présentées dans la Fig. 8.



**Fig. 8 : Résultats du test YES (Yeast Estrogen Screen) dans les effluents d'épuration. La médiane de toutes les mesures est de 0,73 ng EEQ/l; le décuple du critère de qualité est de 4 ng/l.**  
 Un dépassement du critère de qualité écotoxicologique est possible pour les stations dont les effluents représentent plus de 10 % du débit du cours d'eau récepteur. EEQ = concentration en équivalents 17 $\beta$ -œstradiol.

La médiane de toutes les stations d'épuration était de 0,73 ng EEQ/l. La comparaison de cette valeur avec la concentration de 0,4 ng/l proposée pour le critère de qualité environnementale relatif aux expositions chroniques (CQC) au 17 $\beta$ -œstradiol montre clairement qu'à basses eaux, un degré de dilution d'au moins 50% est nécessaire pour que le critère de qualité ne soit pas dépassé. Quatre stations d'épuration présentaient des teneurs en EEQ nettement supérieures à la médiane, trois d'entre elles dépassant même le décuple du critère de qualité. Même une dilution par 10 de leurs effluents ne permettrait pas d'éviter un dépassement du CQC.

Le rapport de l'étude fournit de plus amples informations sur les stations d'épuration étudiées et sur les causes possibles des fortes teneurs en EEQ mesurées (Amt für Umwelt und Energie des Kantons St. Gallen, 2013).

#### Évaluation du degré de pollution des cours d'eau récepteurs

Pour estimer le degré de pollution des cours d'eau récepteurs par les substances à activité œstrogénique, les teneurs d'EEQ mesurées dans les effluents d'épuration ont été extrapolées en leur appliquant le facteur de dilution moyen par temps sec (cf. Fig. 9).







## **Etude de cas n° 2 : Campagne de mesures au niveau de 12 stations d'épuration et de leurs cours d'eau récepteurs dans le cadre du projet EcolImpact**

### **Introduction**

L'objectif du projet EcolImpact de l'Eawag est d'étudier l'impact des micropolluants émis par les stations d'épuration (STEP) sur les écosystèmes d'eau courante et ce, aussi bien dans la situation actuelle que dans des situations futures induites par le recours à des traitements avancés d'épuration tels que l'ozonation ou le charbon actif en poudre ou par la fermeture de certaines stations (pour plus d'informations, voir <http://www.eawag.ch/fr/recherche/eau-pour-les-ecosystemes/polluants/ecoimpact/>). Dans le cadre de ce projet, les deux bioessais proposés - le test YES et le test algues combiné - ont été utilisés avec des échantillons prélevés au niveau de 12 stations d'épuration rejetant leurs effluents dans des cours d'eau. Les concentrations dans le milieu récepteur ont été déterminées en extrapolant celles mesurées dans les effluents avec le facteur de dilution et en effectuant des mesures directes. Comme dans le cas n°1, ces concentrations ont ensuite été comparées à des valeurs écotoxicologiques puis interprétées en termes de qualité de l'eau selon le système en cinq classes en considérant la charge en substances à activité œstrogénique et en inhibiteurs du photosystème II.

### **Matériel et méthodes**

Dans le cadre du projet EcolImpact, une campagne de mesures a été menée en 2013 au niveau de 12 stations d'épuration et de leurs cours d'eau récepteurs. Des échantillons ponctuels ont été prélevés aussi bien dans les effluents de STEP que dans le milieu récepteur pour pouvoir établir une relation entre les effets mesurés dans les cours d'eau et les effets extrapolés au cours d'eau à partir des effluents. Pour évaluer les effets écotoxicologiques le plus complètement possible, des bioessais ont été effectués aussi bien sur le terrain qu'au laboratoire. Pour les analyses de laboratoire, les échantillons ont tout d'abord été reconcentré par extraction en phase solide (SPE) (voir Annexe 1). Tous les échantillons ont été soumis au test YES et au test algues combiné.

### **Résultats**

L'étude de l'activité œstrogénique et de l'inhibition du photosystème II a permis de mettre en évidence une nette influence des stations d'épuration sur les cours d'eau récepteurs. En aval du point de rejet des effluents, les concentrations en équivalents  $17\beta$ -œstradiol (EEQ) et en équivalents diuron (DEQ) mesurées avec les bioessais étaient en général plus élevées qu'en amont.

La Fig. 11 présente les teneurs en EEQ déterminées avec le test YES dans les échantillons étudiés.

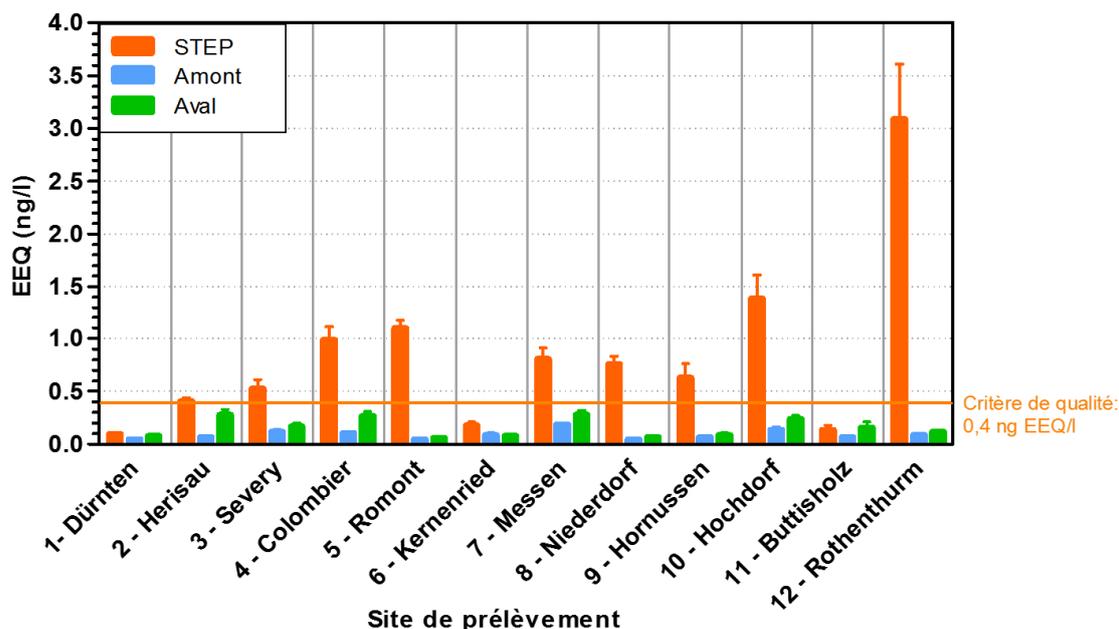


Fig. 11 : Résultats obtenus avec le test YES (Yeast Estrogen Screen) dans les effluents d'épuration (STEP) et les cours d'eau récepteurs.

EEQ = concentration en équivalents  $17\beta$ -œstradiol ; STEP = Station d'épuration.

Aucun dépassement du critère de qualité « chronique » n'a été observé dans les cours d'eau étudiés.

La Fig. 12 présente les teneurs en DEQ déterminées avec le test algues dans les échantillons étudiés.

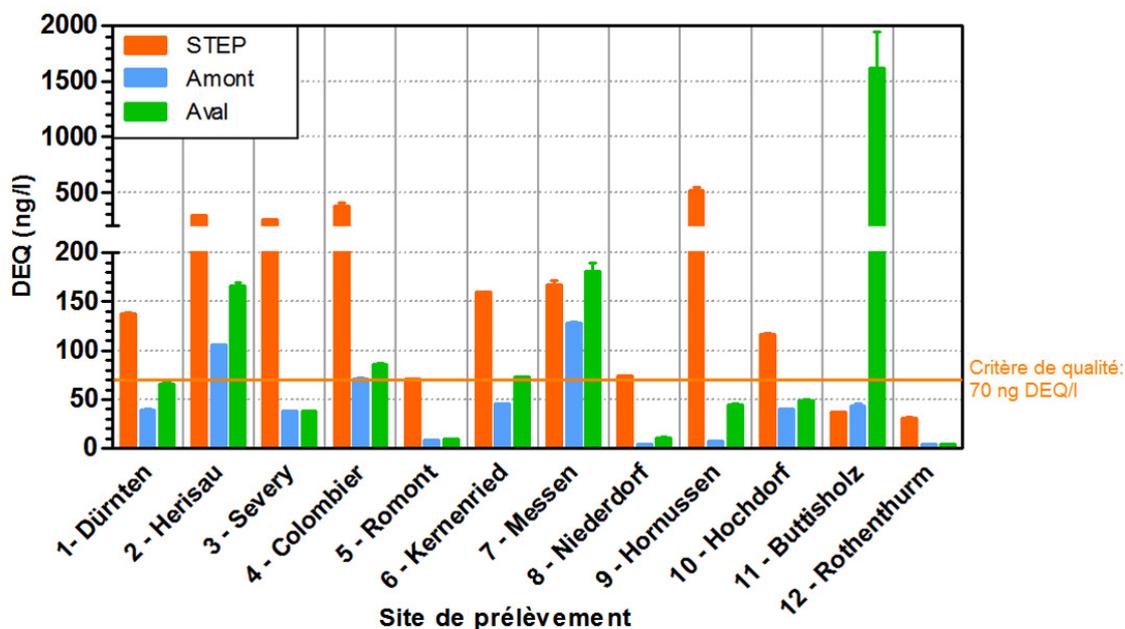


Fig. 12 : Résultats obtenus avec le test algues combiné dans les effluents d'épuration (STEP) et les cours d'eau récepteurs.

DEQ = concentration en équivalents diuron , STEP = Station d'épuration.

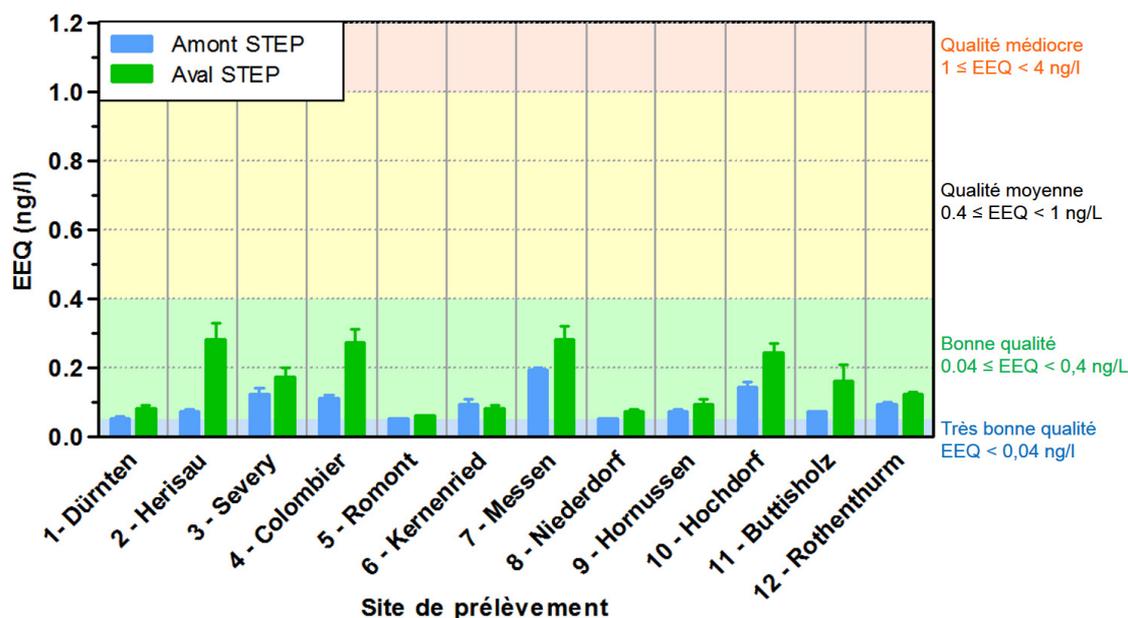


La situation était très différente dans le cas des inhibiteurs du photosystème II. Le critère de qualité défini pour protéger les écosystèmes aquatiques des expositions chroniques au diuron était déjà dépassé en amont des stations d'épuration dans 8 des 12 cours d'eau. En aval, ce seuil était dépassé dans 9 sites d'étude. Au niveau de la station de Buttisholz, la teneur en DEQ était nettement plus élevée en aval de la STEP que dans l'effluent d'épuration. Cette pollution était probablement due à un déversement d'herbicides entre le point de rejet des effluents d'épuration et le site de prélèvement dans le cours d'eau. Les résultats du bioessai ont été confirmés par les analyses chimiques qui ont révélé que les effets toxiques étaient principalement dus à la présence de terbuthylazine dans le milieu. La concentration de cet herbicide dont la puissance d'inhibition du PSII est environ trois fois plus faible que celle du diuron était de 3000 ng/l en aval de la STEP.

#### Appréciation de la gravité de la pollution dans les cours d'eau avec le système à cinq classes

Étant donné que, dans ce projet, des mesures ont été effectuées directement dans les cours d'eau, l'appréciation de la qualité de l'eau s'est basée sur les teneurs en EEQ et en DEQ mesurées dans le milieu aquatique en se référant au système à cinq classes (voir chapitre 4.2.2).

La Fig. 13 présente les teneurs en EEQ mesurées dans les cours d'eau et les classes de qualité de l'eau correspondantes selon le système d'appréciation en cinq classes proposé pour la pollution avec des substances à activité œstrogénique.



**Fig. 13 : Appréciation de la qualité de l'eau dans les 12 cours d'eau du projet Ecolmpact en fonction de la pollution du milieu par les substances à activité œstrogénique en se référant au système à cinq classes**

EEQ = concentration en équivalents 17 $\beta$ -œstradiol, STEP = station d'épuration.

La qualité de l'eau est jugée bonne dans tous les 12 cours d'eau étudiés en ce qui concerne la présence de substances à activité œstrogénique au sens large. La situation est tout autre si l'on considère les inhibiteurs du photosystème II (Fig. 14).

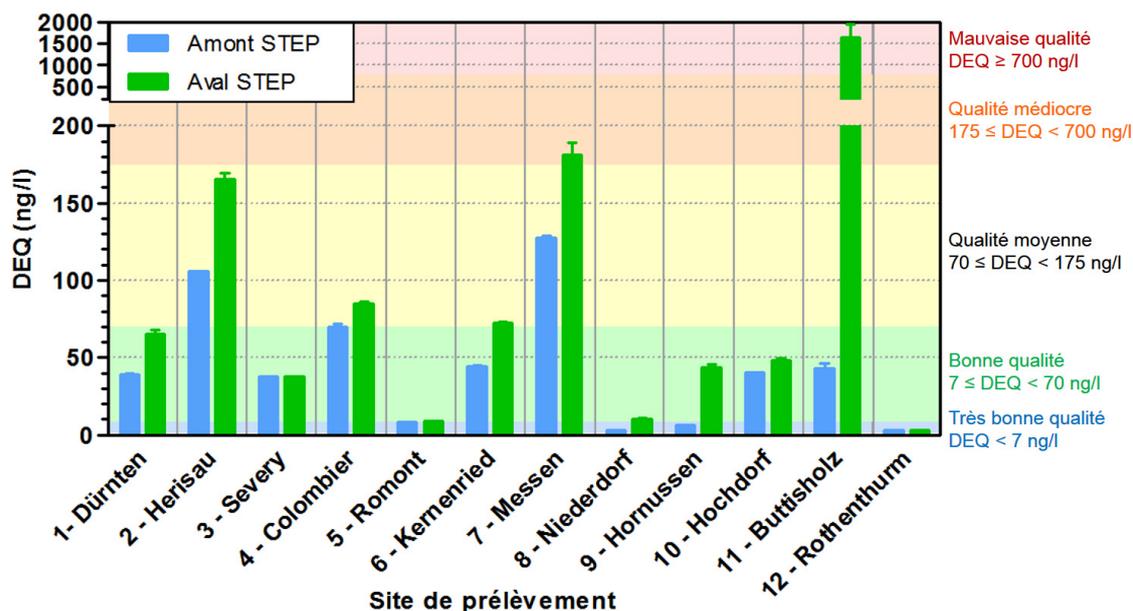


Fig. 14 : Appréciation de la qualité de l'eau dans les 12 cours d'eau du projet Ecolmpact en fonction de la pollution du milieu par les inhibiteurs du photosystème II en se référant au système à cinq classes.

DEQ = concentration en équivalents diuron, STEP = station d'épuration.

En ce qui concerne ce type de polluants, la qualité de l'eau n'était bonne que dans 9 cours d'eau en amont des STEP et dans 7 en aval. Trois cours d'eau présentaient une qualité moyenne en amont de la STEP. Cette situation était aggravée par les rejets des stations d'épuration : en aval des STEP, trois cours d'eau présentaient une qualité de l'eau moyenne, un avec une qualité médiocre et un avec une mauvaise qualité de l'eau. Comme cela a été indiqué plus haut, ce mauvais état était principalement dû à la présence de terbuthylazine dans le milieu.

## Synthèse

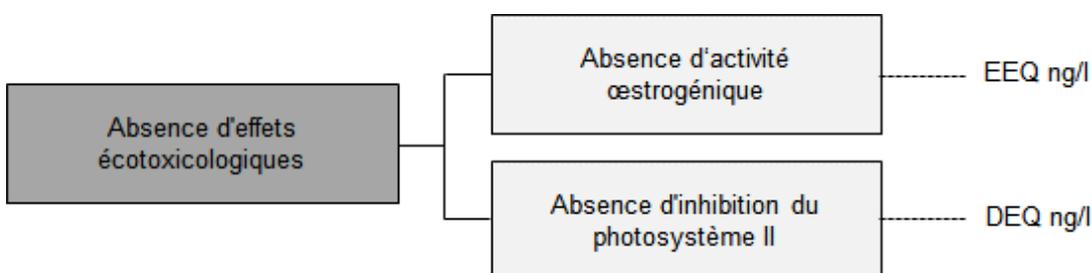
Les méthodes employées se sont avérées bien adaptées à une évaluation écotoxicologique des cours d'eau considérés. Dans l'ensemble, la pollution par les substances à activité œstrogénique peut être jugée peu significative en termes d'impacts. Les teneurs en EEQ ne dépassaient jamais la valeur de 0,4 ng/l fixée pour le critère de qualité « chronique » (CQC) du 17β-œstradiol. En revanche la pollution par les inhibiteurs du photosystème II était beaucoup plus problématique. Dans 5 des 12 cours d'eau étudiés, les teneurs de DEQ dépassaient le CQC du diuron (70 ng/l), déjà en amont des STEP pour certains. L'analyse a indiqué une qualité de l'eau médiocre ou mauvaise en aval des STEP dans 2 des 12 cours d'eau investigués.



## Annexe 6 Fonctions de valeur pour l'appréciation de la qualité de l'eau

### Fonction de valeur et agrégation des données

Comme indiqué au chapitre 4.2.3, le système d'appréciation peut être complété selon les indications du guide d'élaboration de modules d'appréciation élaboré pour les lacs (Schlosser et al., 2013). Cette démarche demande une légère modification des systèmes proposés précédemment. En premier lieu, une hiérarchie doit être établie parmi les objectifs du module Écotoxicologie afin de mettre en évidence ceux dont l'atteinte doit être vérifiée par une étude. Des attributs sont ensuite affectés à ces objectifs. La Fig. 15 présente une possibilité assez évidente de hiérarchisation des objectifs intégrant les attributs relatifs à l'activité œstrogénique et à l'inhibition du photosystème II.

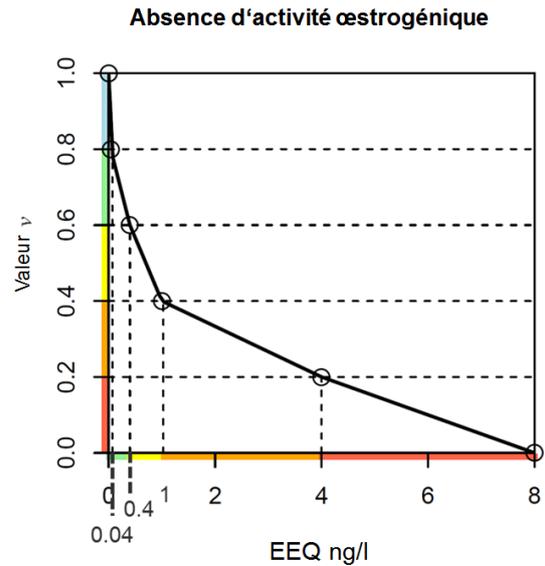


**Fig. 15 : Possibilité de hiérarchisation des objectifs et attributs correspondants** : L'objectif principal est « Absence d'effets écotoxicologiques » et les sous-objectifs « Absence d'activité œstrogénique » et « Absence d'inhibition du photosystème II ». Ces deux sous-objectifs sont évalués à l'aide des attributs « Concentration en équivalents 17 $\beta$ -œstradiol (EEQ, ng/l) » et « Concentration en équivalents diuron (DEQ, ng/l) ».

La hiérarchie des objectifs peut ensuite être complétée à mesure que de nouvelles méthodes interviennent dans le module. Pour l'appréciation de la qualité de l'eau, le système de classes peut être complété par une fonction de valeur qui permet une notation numérique standardisée en attribuant à la qualité de l'eau une valeur allant de 0 (plus mauvais cas possible) à 1 (meilleur cas possible). Les erreurs d'arrondi peuvent ainsi être évitées en agrégeant les données et l'efficacité de mesures éventuelles peut être rendue visible même à l'intérieur d'une même classe. Pour cela, le système de classes doit tout d'abord être transformé en une fonction de valeur. Cela peut se faire très simplement par interpolation linéaire entre les limites (bornes) des différentes classes (Fig. 16).



Appréciation		Condition	Respect du critère de qualité
Très bonne qualité		$EEQ < 0,04 \text{ ng/l}$	Critère respecté
Bonne qualité		$0,04 \text{ ng/l} \leq EEQ < 0,4 \text{ ng/l}$	
Qualité moyenne		$0,4 \text{ ng/l} \leq EEQ < 1 \text{ ng/l}$	Seuil dépassé
Qualité médiocre		$1 \text{ ng/l} \leq EEQ < 4 \text{ ng/l}$	
Mauvaise qualité		$EEQ \geq 4 \text{ ng/l}$	

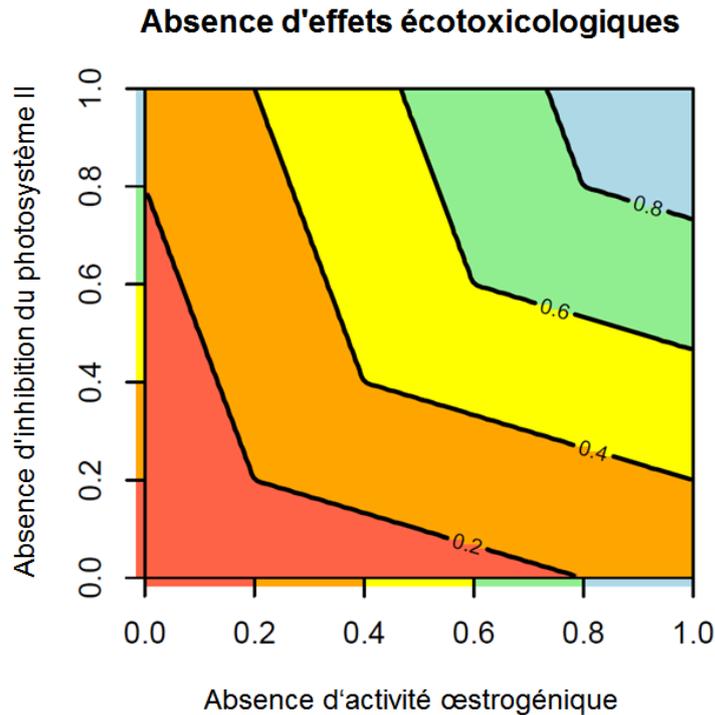


**Fig. 16 : Transformation du système de classes en une fonction de valeur dans le cas de l'activité œstrogénique.**

Dans ce qui suit, plusieurs fonctions seront présentées pour le système d'appréciation et la gestion des incertitudes.

La plus mauvaise valeur a été fixée à 8 ng EEQ/l, c'est-à-dire à 20 fois le critère de qualité de 0,4 ng EEQ/l. De la même façon, la plus mauvaise valeur définie pour l'inhibition du photosystème II mesurée dans le test algues combiné a été fixée à 400 ng/l DEQ. En cas de dépassement de ces limites, la valeur  $v$  reste de 0.

Pour agréger ces deux valeurs en une appréciation globale, différentes méthodes d'agrégation peuvent être appliquées. La Fig. 17 présente l'exemple d'une agrégation minimale additive (Langhans et al., 2014).



**Fig. 17 : Agrégation minimale additive de l'appréciation des effets œstrogéniques et d'inhibition du photosystème II.**

L'agrégation s'effectue en calculant la moyenne de la moyenne arithmétique  $v_{\text{add}}$  et du minimum  $v_{\text{min}}$  avec la formule suivante :

$$v_{\text{add-min}} = 0.5 \cdot v_{\text{add}} + 0.5 \cdot v_{\text{min}}$$

où  $v_{\text{add}} = 0.5 \cdot v_1 + 0.5 \cdot v_2$  et  $v_{\text{min}} = \min(v_1, v_2)$ ,  $v_1$  et  $v_2$  correspondant aux valeurs atteintes dans l'appréciation individuelle des effets œstrogéniques et de l'inhibition du photosystème II.

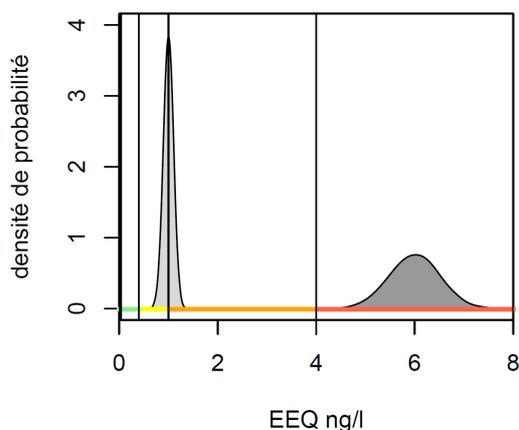
Alors que l'agrégation purement additive (calcul de la seule moyenne arithmétique) permet la compensation totale d'un mauvais résultat au niveau d'un sous-objectif par un meilleur résultat dans un autre sous-objectif, l'agrégation minimale additive a pour effet que le mauvais résultat obtenu à un niveau ne peut être que partiellement compensé par un bon résultat par ailleurs. Cette fonction est donc conseillée pour l'agrégation de sous-objectifs complémentaires (Langhans et al., 2014). Et contrairement à l'agrégation purement basée sur le minimum qui ne permet aucune compensation entre les sous-objectifs puisqu'elle ne retient que la valeur la plus mauvaise, l'agrégation par la moyenne et le minimum autorise une certaine amélioration de la valeur globale par une amélioration au niveau de l'un des sous-objectifs, même s'il ne s'agit pas de celui qui présentait le plus mauvais résultat. La fonction d'agrégation minimale additive représente donc un bon compromis entre les fonctions additive et minimale en intégrant des propriétés de chacune d'elles.



## Gestion des incertitudes

À l'origine, le débat sur le nombre de classes à intégrer au système était dominé par la question des incertitudes inhérentes aux tests écotoxicologiques. Mais il s'est avéré que le choix de la classe à attribuer pouvait être incertain même si l'incertitude du test était faible et le nombre de classes restreint (trois p. ex.) lorsque le résultat du test était proche des bornes définies pour les classes. Inversement, une grande incertitude dans le test et un nombre élevé de classes (cinq p. ex.) n'induisent pas forcément une grande incertitude dans l'attribution de la classe si le résultat est éloigné des bornes (voir Fig. 18). Plus le nombre de classes est faible, plus l'erreur de discrétisation est élevée et plus le résultat de l'évaluation est imprécis, quelle que soit l'incertitude du test. Cette erreur de discrétisation peut être évitée en complétant le système de classes d'une fonction de valeur d'évaluation (voir chapitre précédent).

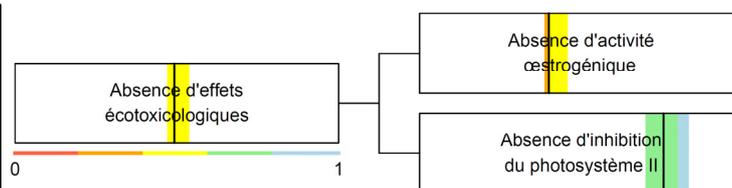
Si besoin est, l'incertitude d'attribution de la classe de qualité peut être évaluée de la manière suivante à condition de connaître l'incertitude du test : 1) Définition d'une loi de probabilité à partir des résultats du test (p. ex. une loi normale dont la moyenne est celle du test et l'écart-type déduit des travaux de validation présentés au chapitre 3.2.2). 2) Sélection aléatoire et automatique de valeurs ponctuelles - correspondant à des échantillons ponctuels - dans cette distribution. 3) Détermination, pour chaque échantillon ponctuel, de la classe de qualité selon le système à cinq classes proposé au chapitre 4.2.2) Détermination de la probabilité des classes de qualité en fonction de la fréquence avec laquelle elles ont été obtenues à l'étape 3 (p. ex. probabilité de 50% pour la classe « qualité moyenne » et de 50% pour la classe « qualité médiocre », Fig. 18). Les résultats doivent être présentés de manière graphique (comme dans la Fig. 19 par exemple (Reichert et al., 2013)). Pour que cette méthode puisse être utilisée dans le cadre des analyses de routine du système modulaire gradué, un logiciel pratique d'exploitation des données devrait cependant être mis à disposition des évaluateurs.



**Fig. 18 :** Lois de probabilité relatives à l'activité œstrogénique en EEQ (ng/l) pour une analyse A de moyenne 6 ng/l et d'écart-type 0,5 ng/l (en gris foncé) et une analyse B de moyenne 1 ng/l et d'écart-type 0,1 ng/l (en gris clair).

D'après la classification du Tab. 9, l'analyse A correspond à la classe « mauvaise qualité » avec une probabilité de 100%.

Malgré une incertitude plus faible (écart-type moins élevé), l'analyse B n'a qu'une probabilité de 50% de correspondre à la classe « qualité moyenne » ou « qualité médiocre ».



**Fig. 19 :** Représentation graphique des résultats et de l'incertitude pour un échantillon à  $1 \pm 0.1$  ng EEQ/l et à  $6 \pm 0.5$  ng/l DEQ en utilisant le système d'évaluation continu. Ligne noire = médiane ; surface de couleur = intervalle de confiance à 90%, cas hypothétique.