

Bioqualité d'une eau résiduaire urbaine épurée **avant et après désinfection**

**LEPEUPLE Anne-Sophie¹, FELIERS Cédric¹, CASTILLO Luis¹, DUCHEMIN Jean²,
GILBERT Jean-Emmanuel³**

1 : Veolia Environnement, Centre de Recherche sur l'Eau
Anjou Recherche
Chemin de la Digue
BP76
78603 Maisons Laffitte

2 : Agence de l'Eau Seine-Normandie
51 rue Salvador Allende
92027 Nanterre Cedex

3 : VigiCell
7, rue Guy Moquet
BP8
94801 Villejuif

Cette étude a été réalisée avec le concours financier de l'agence de l'eau Seine-Normandie.

Une partie des analyses a été réalisée par deux équipes de l'INSERM :

- unité 540, Mécanismes moléculaires et cellulaires des cancers (P Balaguer) à Montpellier
- unité 488 Stéroïdes et Système Nerveux, (M. Pierre et F. Courtin) au Kremlin-Bicêtre

I. INTRODUCTION

La désinfection des eaux résiduaires traitées est une étape indispensable dans le cas d'un déversement en zone sensible comme les zones de baignades ou de pêche. Il existe différentes techniques permettant d'inactiver les microorganismes en sortie d'usine d'assainissement. L'application d'oxydants chimiques comme le chlore, le dioxyde de chlore, l'ozone ou encore l'acide peracétique, tout comme des techniques physiques comme l'irradiation UV sont aujourd'hui appliquées sur différents sites.

S'il est acquis que cette étape de désinfection est nécessaire lorsque les conditions sanitaires l'imposent, il convient cependant de s'interroger sur la formation éventuelle de sous-produits et sur leur impact vis-à-vis des populations exposées. En effet, les effluents de station d'épuration contiennent souvent des résidus de micropolluants qui n'ont pas été dégradés par le traitement biologique (Heberer *et al.*, 2002)

L'objectif de cette étude était d'une part, d'évaluer par des méthodes biologiques, l'effet perturbateur endocrinien des eaux usées traitées et désinfectées par les différentes techniques de désinfection existantes et également de comparer la toxicité cellulaire engendrée par ces différents traitements, d'autre part de voir si ces traitements pouvaient avoir un effet protecteur contre les perturbateurs.

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. PRELEVEMENTS DES ECHANTILLONS

Les échantillons d'eau ont été prélevés sur une usine de traitement des eaux usées située en France. Cette usine traite 125000 eq.hab. Elle est équipée d'un dégrilleur, d'un désableur /déshuileur, d'un bassin de décantation primaire, puis d'un bassin de boues activées et enfin d'un clarificateur secondaire avant rejet en rivière (Figure 1).

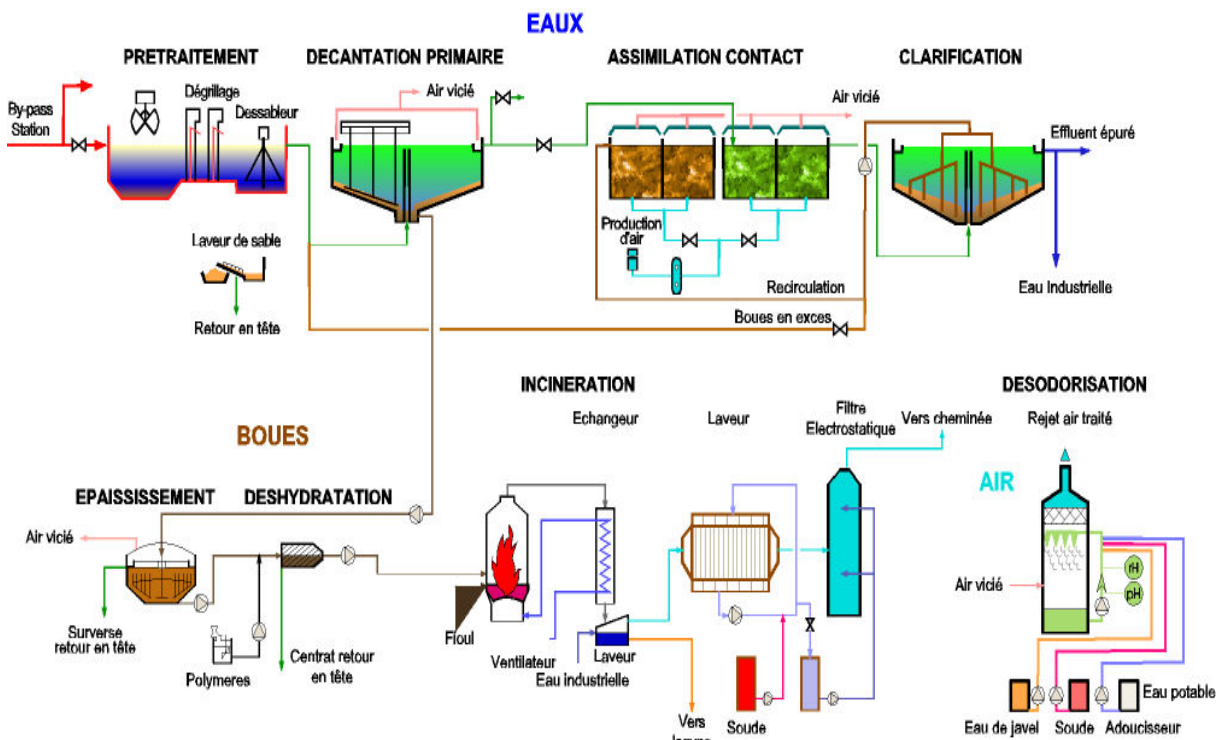


figure 1 : Schéma de l'usine de traitement

II.2. ESSAIS DE DESINFECTION SUR L'EAU PRELEVEE

Pour les essais de désinfection, les doses de produit utilisées et temps de contact ont été déterminés afin d'atteindre des concentrations en *E. coli* et entérocoques proches de 100 UFC / 100 mL (valeurs recommandées par la réglementation en zones de baignade). Les désinfectants testés étaient le chlore (NaOCl), le dioxyde de chlore (ClO_2), l'acide peracétique (CH_3COOOH), l'ozone (O_3) et l'irradiation UV à 254 nm

II.2.1. Chlore, Dioxyde de chlore et acide peracétique

Les essais de désinfection ont été réalisés en batch dans des béchers de 2 L en pyrex. Chaque bécher a été rempli par 1 L d'eau usée à tester. Un barreau aimanté en téflon a été introduit dans l'eau et celle-ci a été agitée pendant toute la durée de la manipulation. Après un temps de contact de 30 minutes avec le produit désinfectant, le mélange était prélevé puis, dans le cas du chlore et dioxyde de chlore, additionné de thiosulfate ou non.

II.2.2. L'ozone

Une ampoule de réaction en pyrex était préparée avec un volume V d'échantillon. Le prélèvement et l'introduction d'ozone était réalisé à l'aide d'une seringue en verre munie d'une aiguille. Lors de l'injection d' O_3 par le septum, un volume équivalent d'échantillon afin de maintenir une pression égale à la pression atmosphérique. Le volume introduit $V = V$ à désinfecter + $V O_3$. Le taux de traitement était de 18 mg O_3 /L. La réaction était fixée à 30 minutes avec une agitation rapide.

II.2.3. L'irradiation UV

Le système d'irradiation utilisé, appelé « collimated beam » (Calgon Carbon Corporation), consiste à irradier un volume de lame d'eau (et donc de trajet optique) connue à l'aide d'une lampe située au-dessus. La lampe UV est une lampe basse pression de 12 W. Le radiomètre utilisé pour la mesure de l'intensité UV à la surface de l'échantillon est un radiomètre International Ligth 1400, équipé d'une sonde SED260 calibré tous les ans. L'échantillon (40 mL) était disposé dans un cristalliseur en pyrex. La solution a été constamment agitée pendant l'irradiation à l'aide d'un agitateur magnétique et d'un barreau aimanté.

II.3. EVALUATION DES EFFETS BIOLOGIQUES

24 heures après avoir subi les traitements de désinfection, chaque échantillon a été filtré à 0,8 μm puis à 0,22 μm puis utilisé immédiatement pour fabriquer les milieux de culture à partir du milieu DMEM en poudre.

L'évaluation des effets biologiques induits par les eaux à tester a été réalisée en couplant trois approches expérimentales : l'évaluation de la toxicité cellulaire, l'évaluation du potentiel perturbateurs endocriniens et l'évaluation du potentiel perturbateurs endocriniens de type thyroïdien. Deux séries d'expériences ont été réalisées à 24 heures d'intervalles afin d'étudier l'évolution des eaux dans le temps. Différentes conditions expérimentales témoins permettaient de valider l'état des cellules lors de chaque série d'expérience (inducteurs connus des gènes étudiés).

II.3.1. Evaluation de la toxicité cellulaire

L'évaluation de la toxicité cellulaire a été réalisée par le suivi *in vitro* (sur la lignée hépatocytaire humaine HepG2) de la modulation de gènes de stress (*hsc70*, *hsp70A*, *hsp70B*, *mt2A*, *hmx1*) et de gènes de métabolisation (*cyp1A1*, *IA2* et *IB1*) par RT-PCR. En outre, les suivis d'une protéine de stress (HSC70) et des dommages membranaires associés à la nécrose furent réalisés en parallèle par cytométrie en flux.

II.3.2. Evaluation du potentiel perturbateurs endocriniens

L'évaluation du potentiel perturbateurs endocriniens a été réalisée en utilisant un système *in vitro* (sur deux lignées cellulaires humaines dérivées de cellules du cancer de l'utérus, HELN, et de la prostate, PALM), permettant d'évaluer les interactions entre les produits à tester et des récepteurs hormonaux stéroïdiens suivants : œstrogènes α (ERa1) et β (ERb1), androgènes (AR), progestatifs (PR), glucocorticoïdes (GR1), minéralocorticoïdes (MR1) et thyroïdien (TR3).

La présence d'un perturbateur endocrinien dans l'échantillon testé entraîne une activation (cas des substances mimétiques) ou, en présence de l'hormone, une inactivation (cas des substances antagonistes) du promoteur, qui est révélée par un gène rapporteur.

II.3.3. Evaluation du potentiel perturbateurs endocriniens de type thyroïdien

L'évaluation du potentiel perturbateurs endocriniens de type thyroïdien a été réalisée par le suivi *in vitro*, sur des astrocytes de rat (culture primaire), de la modulation de l'activité désiodase de type 2 (D2) et de l'activité désiodase de type 3 (D3) dans des conditions basales ou activées par la forskoline ou le TPA.

La D2 a pour inducteur principal la voie AMP cyclique (la forskoline active l'adénylate cyclase). La D3 est surtout induite par la voie PKC (TPA est un activateur de la PKC). Cependant la forskoline est aussi capable d'induire un peu la D3 et de même le TPA est un peu capable d'induire la D2. D'un point de vue physiologique, ces deux enzymes, désiodases des hormones thyroïdiennes jouent un rôle dans les processus de reproduction chez le mammifère (nidation de l'œuf par exemple, expression placentaire) et dans le système de développement du cerveau. L'invalidation du gène de la D3 chez la souris est létale. L'D2 chez la souris conduit à la perte du rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien par la thyroxine, des troubles de l'audition et de la thermogénèse. Leur perturbation peut donc induire des effets délétères importants.

II.4. RECHERCHE D'UNE ACTIVITE ŒSTROGENE-LIKE PAR LE TEST LEVURE (YES)

Un système d'expression inductible chez la levure a été utilisé pour déterminer la présence de composés de type œstrogène dans les échantillons. Le système YES est très sensible aux composés œstrogéniques et aussi sélectif vis-à-vis des œstrogènes et xœstrogènes. Les échantillons ont été purifiés sur cartouche SPE C18 et sur cartouche Florisil. L'extrait obtenu a été séché par évaporation puis dilué 10× avec du méthanol.

III. RESULTATS

III.1. Toxicité cellulaire

III.1.1. Evaluation des atteintes à la membrane cellulaire

Les atteintes à la membrane cellulaire ont été évaluées après mise en contact avec les différents types d'eau.

Globalement, le marquage des cellules était plus important avec toutes les eaux traitées qu'avec les eaux brutes. Les différents traitements généraient donc des sous-produits induisant une fragilisation notable des membranes cellulaires. Les traitements au dioxyde de chlore (avec ou sans thiosulfate) et aux UV (24 h de contact), étaient les plus agressifs ainsi que, dans une moindre mesure, ceux à l'ozone et au chlore.

Contrairement aux expériences témoins et à l'eau non désinfectée, les effets biologiques induits par les eaux désinfectées variaient après 24h indiquant que les différents traitements de désinfection généraient des sous-produits qui évoluent dans le temps. Les évolutions des effets biologiques étaient les suivantes : peu ou pas d'évolution pour le Cl₂ (0%), l'ozone (+6%) et le Cl₂ + thiosulfate (+7%) ; une augmentation de l'agressivité pour les UV (+24%) et enfin, une diminution de l'agressivité pour l'acide peracétique (-12%), le ClO₂ (-32%) et le ClO₂ + thiosulfate (-34%).

Dans les conditions testées, les effets observés des traitements sur l'agressivité de l'eau de STEP vis-à-vis des membranes cellulaires étaient les suivants :

- **Eau brute (traitée, non désinfectée)**: les eaux prélevées en sortie de STEP n'induisent pas d'agression pour la membrane cellulaire et évoluent peu en 24 heures,

- **UV** : ce traitement induit des sous-produits plus agressifs pour la membrane cellulaire et leur évolution dans le temps les rend encore plus agressifs,
- **Ozone** : légère augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la membrane cellulaire. Les composés générés semblent stables.
- **Acide peracétique** : effets comparables à ceux observés pour l'eau non désinfectée, plutôt diminution des effets avec le vieillissement des eaux traitées.
- **Chlore** : légère augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la membrane cellulaire. Les composés générés semblent stables.
- **Chlore + thiosulfate** : augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la membrane cellulaire. Les composés générés semblent stables (très légère augmentation).
- **Dioxyde de chlore** : très forte augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la membrane cellulaire. Retour à la normale après 24h
- **Dioxyde de chlore+ thiosulfate** : très forte augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la membrane cellulaire. Retour à la normale après 24h.

III.1.2. Biomarqueurs de stress et de métabolisation

Un suivi des modulations des biomarqueurs de stress et de métabolisation cellulaire a été réalisé après mise en contact avec les différents types d'eau. Dans ces conditions expérimentales, aucune induction des trois gènes de métabolisation suivis (*cyp1A1*, *IA2* et *IB1*) n'a été observée.

Aucun échantillon n'induisait de réaction de stress après 4 heures de contact avec les cellules. Il s'agissait donc de stress relativement faibles en comparaison avec le témoin positif. En revanche, après 24 heures de contact, tous les échantillons, y compris l'eau non désinfectée, induisaient deux ou trois gènes de stress (*hsp70A*, *hsp70B*, *hsp70C*), de manière variable selon les traitements. Ceci pourrait s'expliquer par une accumulation de substances toxiques dans la cellule, à une apparition de substances plus toxiques (due à l'évolution de l'échantillon et/ou produits par la métabolisation).

L'étude de l'évolution des eaux a montré que les effets biologiques observés étaient différents pour tous les échantillons après 24h. Les eaux, traitées ou non, semblaient donc évoluer. Cependant, cette évolution ne se faisait pas toujours dans le même sens selon les échantillons. En effet, on observait une augmentation de l'agressivité pour le traitement UV (cette forte augmentation avait déjà été observée sur la membrane cellulaire), l'eau non désinfectée, le Cl₂ sans thiosulfate, l'ozone, l'acide peracétique et le Cl₂ avec thiosulfate. Une diminution de l'agressivité était observée pour le ClO₂ sans thiosulfate (même si cet échantillon restait quand même un des plus agressifs), le ClO₂ avec thiosulfate (qui devenait le moins agressif). Ces diminutions avaient déjà été observées sur la membrane cellulaire.

La comparaison des eaux désinfectées avec l'eau de sortie de STEP après 24 heures de contact a montré que les eaux les plus agressives étaient celles traitées par le dioxyde de chlore et les UV. Les autres traitements induisaient plutôt une diminution de la souffrance cellulaire par rapport à l'eau non désinfectée.

Globalement, dans les conditions testées, les effets observés des traitements de l'eau de STEP sur le stress cellulaires étaient les suivants :

- **Eau traitée non désinfectée** : les eaux de sortie de STEP n'induisaient un stress qu'après 24 heures de contact avec les cellules. Leur vieillissement augmentait leur agressivité ;
- **UV basse pression** : ce traitement induisait des sous-produits qui, en évoluant dans le temps (24 heures) devenaient très agressifs pour la cellule ;
- **Ozone, acide peracétique, Chlore et Chlore + thiosulfate**: les composés générés, comme l'eau non désinfectée, évoluaient vers plus d'agressivité en vieillissant, mais conduisaient

- plutôt à une amélioration de la qualité de l'eau (en comparaison à l'eau non désinfectée) ;
- **Dioxyde de chlore** : très forte augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la cellule. Evolution vers une moindre agressivité après 24 heures de vieillissement mais toujours plus agressifs que l'eau non désinfectée ;
- **Dioxyde de chlore+ thiosulfate** : forte augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la cellule. Evolution vers une moindre agressivité après 24 heures de vieillissement (moins agressif que l'eau non désinfectée). Forte amélioration par rapport au dioxyde de chlore seul.

Les tendances observées précédemment (atteintes à la membrane) étaient donc retrouvées.

III.1.3. Suivi de l'expression de la protéine Hsc70 par cytométrie en flux

La protéine Hsc70 est une des premières défenses cellulaires et sa régulation est effectuée par l'activation de protéines déjà présentes dans le cytoplasme. Le suivi de sa modulation doit être mesuré au niveau de la protéine et non pas au niveau des ARNm. La Hsc70 est une réponse cellulaire au stress très sensible et son suivi permet d'observer des effets biologiques, même à de très faibles doses. Sa non-induction ne peut cependant être interprétée comme une absence de stress. En effet, lorsque le stress subi devient trop important, ce marqueur revient à son niveau basal et d'autres systèmes de défense (ex. : Hsp70) prennent alors le relais. Selon les cas, la réponse à un stress conduira donc à une diminution (si la cellule est déjà dans un environnement stressant) ou à une augmentation du niveau d'Hsc70.

Le suivi de la protéine Hsc70 a permis d'observer des effets dès 4 heures de contact (ex. : eau non désinfectée, UV, Chlore avec ou sans thiosulfate). Globalement, une modulation plus forte de la protéine Hsc70 après 24 heures de contact était observée.

L'étude de l'évolution des eaux a montré qu'après 24 heures de contact avec les cellules, l'expression de la protéine Hsc70 augmentait pour les eaux traitées aux UV, à l'ozone et au chlore ainsi que pour l'eau non désinfectée. Une diminution était observée pour le dioxyde de chlore sans thiosulfate, le Cl₂ avec thiosulfate et l'acide peracétique.

III.1.4. Bilan des essais de toxicité cellulaire

Dans les conditions expérimentales étudiées, les observations de toxicité cellulaire effectuées étaient cohérentes et conduisaient aux conclusions suivantes :

- **Les eaux brutes**, avant traitement, n'étaient pas agressives pour la membrane cellulaire mais contenaient des composés qui, après un jour de vieillissement, induisaient assez fortement les réactions cellulaires liées au stress.
- **UV basse pression** : ce traitement générait des sous-produits agressifs pour la membrane et induisaient les gènes de stress. Leur évolution dans le temps rendait ces eaux encore plus agressives. Ces résultats sont assez surprenant compte-tenu du fait que les UV basse pression sont souvent considérés comme non-inducteurs de sous produits. Cependant, on peut supposer que quelques dizaines de ng/l de produits générés par photochimie sont suffisants pour induire une toxicité cellulaire détectable.
- **Ozone** : ce traitement entraînait une légère augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la membrane et une induction des gènes de stress après un jour de vieillissement (mais inférieure à celles induites par l'eau non désinfectée). Ce traitement conduisait plutôt à une amélioration de la qualité de l'eau.
- **Acide peracétique** : ces eaux n'étaient pas agressives pour la membrane et induisaient les

gènes de stress après un jour de vieillissement (mais inférieure à celles induites par l'eau non désinfectée). Ce traitement conduisait plutôt à une amélioration de la qualité de l'eau.

- **Chlore** : ce traitement conduisait à une légère augmentation de l'agressivité pour la membrane et induction des gènes de stress après un jour de vieillissement.
- **Chlore + thiosulfate** : ce traitement conduit à une augmentation de l'agressivité des eaux pour la membrane cellulaire et à une induction des gènes de stress après un jour de vieillissement (mais amélioration par rapport au Chlore seul).
- **Dioxyde de chlore** : très forte augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la cellule au niveau de la membrane cellulaire et des réactions de stress. Cette agressivité diminue après un jour mais reste importante, notamment pour la membrane cellulaire.
- **Dioxyde de chlore+ thiosulfate** : très forte augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la membrane cellulaire Et forte augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la cellule. Evolution vers une moindre agressivité après 24 heures de vieillissement (forte amélioration par rapport au dioxyde de chlore seul).

III.2. EFFETS PERTURBATEURS ENDOCRINIENS : RECEPTEURS HORMONAUX ET TEST YES

Les eaux issues de la station d'épuration, avant et après traitement de désinfection, n'ont eu aucun effet agoniste ou antagoniste avec les 7 récepteurs nucléaires étudiés : œstrogènes α (ERa) et β (ERb), androgènes (AR), progestatifs (PR), glucocorticoïdes (GR), minéralocorticoïdes (MR) et thyroïdien alpha (T3Ra). Ces eaux brutes ne contenaient pas suffisamment de composés interagissant avec les récepteurs hormonaux étudiés, ne permettant pas de conclure sur l'effet des traitements de désinfection.

De la même façon, la totalité des échantillons présentait une activité œstrogénique, toutefois, cette activité n'a pas pu être quantifiée. Cela permet d'affirmer que s'il est apparu une formation de composés perturbateurs endocriniens pour certains traitements, l'effet global ne semblait pas suffisant pour être quantifiable par le test levure.

III.3. EFFETS PERTURBATEURS ENDOCRINIENS THYROÏDIENS

L'étude des effets perturbateurs endocriniens de type thyroïdien de l'eau non désinfectée a montré que celle-ci contenait des composés induisant une augmentation significative de l'activité des enzymes D2 et D3. Il est encore prématuré d'en analyser les mécanismes mais ces enzymes sont connues pour être régulées au niveau transcriptionnel, traductionnel et post-traductionnel (Bianco et al, 2003 ; Courtin et al, 2005). En présence d'un inducteur de la voie PKA (FK), l'eau non désinfectée agit comme un inducteur de l'enzyme D2, apparemment en synergie avec la FK (les effets se multiplient) et de l'enzyme D3, sans effet de synergie avec la FK (les effets s'additionnent, sans se multiplier).

En présence d'un inducteur de la voie PKC (TPA), l'eau non désinfectée agit comme un inducteur de l'enzyme D2, apparemment sans effet de synergie avec le TPA (les effets s'additionnent, sans se multiplier) et comme un antagoniste du TPA sur l'enzyme D3.

Les composés contenus dans l'eau non désinfectée augmentaient l'activité de l'enzyme D2 basale comme induite et augmentaient globalement l'activité de l'enzyme D3 sauf en présence de l'inducteur de la D3, le TPA.

Les traitements de désinfection étudiés conduisaient à des modifications notables des effets biologiques observés sur les enzymes D2 et D3.

En ce qui concerne l'enzyme D3, les eaux les plus perturbatrices étaient, de manière décroissante,

celles issues des traitements au dioxyde de chlore, aux UV et au chlore. La neutralisation par le thiosulfate annulait ces effets. Le traitement à l'acide peracétique ne modifiait pas la qualité de l'eau. Seul le traitement à l'ozone conduisait à une légère amélioration.

L'induction de l'enzyme par la FK était renforcée par les eaux traitées. Les effets étaient globalement similaires à ceux observés en direct. L'amélioration dû au traitement à l'ozone était encore plus visible (induction équivalente au contrôle).

L'induction de l'enzyme par le PKA était diminuée par les eaux traitées. Les traitements induisaient tous des effets comparables. La neutralisation par le thiosulfate réduisait encore l'effet du TPA.

En ce qui concerne l'enzyme D2, les eaux les plus perturbatrices étaient, de manière décroissante, celles issues des traitements au dioxyde de chlore (avec ou sans thiosulfate), au chlore avec thiosulfate et aux UV. La neutralisation des traitements au chlore et au dioxyde de chlore par le thiosulfate conduisait à une augmentation de l'induction de l'enzyme D2. Le traitement à l'acide peracétique ne modifiait pas la qualité de l'eau. Les traitements à l'ozone et au chlore conduisaient à une légère amélioration.

L'induction de l'enzyme par la FK était renforcée par les eaux traitées. Les effets étaient cependant différents de ceux observés en direct : les eaux traitées étaient moins perturbatrices que l'eau non désinfectée. Les différences entre traitements étaient peu importantes.

L'induction de l'enzyme par le PKA était légèrement augmentée par les eaux traitées. Hormis le traitement au dioxyde de chlore, les autres traitements améliorent la qualité de l'eau.

Il est tout à fait attendu (résultats du laboratoire non publiés) d'avoir des augmentations d'activité en présence d'agents oxydants ainsi que des inductions de D3 plus soutenues en basal et induites par la FK. Il est aussi logique que les réducteurs comme les thiosulfates réduisent ces effets.

Les eaux de STEP étudiées contenaient des composés perturbant les enzymes de désiodation des hormones thyroïdiennes, D2 et D3. Certains traitements de désinfection conduisaient à une augmentation notable de ces effets ie traitements au dioxyde de chlore, aux UV et au chlore. Le traitement à l'acide peracétique modifiait peu les propriétés de l'eau de STEP. Le seul traitement conduisant à une amélioration était celui à l'ozone.

IV. CONCLUSION

Durant cette étude, nous avons évalué les effets biologiques d'une eau usée traitée de station d'épuration, avant et après les différents traitements de désinfection UV (basse pression), ozone, acide peracétique, chlore (avec ou sans neutralisation par du thiosulfate) et dioxyde de chlore (avec ou sans neutralisation par du thiosulfate). À réception, c'est à dire 24 heures après avoir subi les traitements de désinfection, chaque échantillon a été filtré puis, selon les types d'expériences, introduit directement dans le milieu de culture ou utilisé immédiatement pour fabriquer les milieux de culture à partir de milieu en poudre. Dans le cas des signaux de stress, une seconde série, réalisée un jour après la première, a été menée et a permis d'observer le vieillissement des eaux. L'évaluation des effets biologiques induits par les différentes eaux à tester a été réalisée en couplant plusieurs approches expérimentales.

L'évaluation de la toxicité cellulaire a été réalisée par le suivi *in vitro* (sur la lignée hépatocytaire humaine HepG2) de la modulation de gènes de stress (*hsc70*, *hsp70A*, *hsp70B*, *hsp70C*, *mt2A*, *hmx1*) et de gènes de métabolisation (*cyp1A1*, *IA2* et *IB1*). En outre, les suivis d'une protéine de stress (HSC70) et des dommages membranaires associés à la nécrose furent réalisés en parallèle par cytométrie en flux.

L'évaluation du potentiel perturbateurs endocriniens a été réalisée en utilisant un système *in vitro* (sur deux lignées cellulaires humaines dérivées de cellules du cancer de l'utérus, HELN, et de la

prostate, PALM), permettant d'évaluer les interactions entre les produits à tester et sept récepteurs hormonaux suivants : œstrogènes α (ERa1) et β (ERb1), androgènes (AR), progestatifs (PR), glucocorticoïdes (GR1), minéralocorticoïdes (MR1) et thyroïdien (TR3).

L'évaluation du potentiel perturbateur endocrinien de type thyroïdien a été réalisée par le suivi *in vitro* sur des astrocytes de rat (culture primaire) de la modulation de l'activité désiodase de type 3 (D3).

Dans les conditions expérimentales étudiées, les observations de toxicité cellulaire et l'évaluation du potentiel perturbateur endocrinien de type thyroïdien ont donné des informations cohérentes. En revanche, l'évaluation des interactions entre les eaux et les sept récepteurs hormonaux n'a pas donné de résultats satisfaisants. Contrairement à ce qui avait pu être observé précédemment dans des conditions similaires, ces eaux de sortie de STEP ne contenaient pas suffisamment de composés interagissant avec les récepteurs hormonaux étudiés, ce qui ne permet pas de conclure sur l'effet des traitements de désinfection sur ce type d'effet biologique.

La combinaison des résultats conduisait aux conclusions suivantes :

- **Les eaux traitées non désinfectées** n'étaient pas agressives pour la membrane cellulaire mais contenaient des composés qui, après un jour de vieillissement, induisaient assez fortement les réactions cellulaires liées au stress. Ces eaux contenaient également des composés qui perturbent les enzymes de désiodation des hormones thyroïdiennes D2 et D3.
- **UV basse pression** : ce traitement générait des sous-produits plus agressifs pour la membrane et induisaient les gènes de stress. Il conduisait également à une augmentation notable des effets de perturbation des enzymes de désiodation des hormones thyroïdiennes D2 et D3. Ce résultat peut sembler surprenant car on considère souvent que les UV basse pression n'induisent pas de sous-produits.
- **Ozone** : ce traitement générait une légère augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la membrane et une induction des gènes de stress après un jour de vieillissement. Ce traitement conduisait plutôt à une amélioration de la qualité de l'eau en comparaison avec l'eau de sortie de STEP. Il conduisait également à une amélioration des effets de perturbation des enzymes de désiodation des hormones thyroïdiennes D2 et D3.
- **Acide peracétique** : ces eaux n'étaient pas agressives pour la membrane et induisaient dans une moindre mesure les gènes de stress après un jour de vieillissement. Ce traitement conduisait plutôt à une amélioration de la qualité de l'eau. Le traitement à l'acide peracétique modifiait peu les propriétés de l'eau de STEP en ce qui concerne potentiel perturbateur endocrinien de type thyroïdien.
- **Chlore** : ce traitement entraînait une très légère augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la membrane et une induction des gènes de stress après un jour de vieillissement. Il conduisait également à une augmentation notable des effets de perturbation des enzymes de désiodation des hormones thyroïdiennes D2 et D3.
- **Chlore + thiosulfate** : ce traitement conduisait à une augmentation de l'agressivité des eaux pour la membrane cellulaire et à une induction des gènes de stress après un jour de vieillissement (mais amélioration par rapport au chlore seul) et à une augmentation notable des effets de perturbation des enzymes de désiodation des hormones thyroïdiennes D2 et D3.
- **Dioxyde de chlore** : ce traitement générait une très forte augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la cellule au niveau de la membrane cellulaire et des réactions de stress. Cette agressivité diminuait après un jour mais restait importante, notamment pour la

membrane cellulaire. Ce traitement conduisait également à une augmentation notable des effets de perturbation des enzymes de désiodation des hormones thyroïdiennes D2 et D3. Le caractère fortement agressif du dioxyde de chlore observé dans ces résultats devrait être considéré pour des études ultérieures visant à choisir un type de traitement plutôt qu'un autre.

- **Dioxyde de chlore+ thiosulfate** : ce traitement entraînait une très forte augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la membrane cellulaire et forte augmentation de l'agressivité des eaux traitées pour la cellule. Après 24 heures de vieillissement on observait une évolution vers une moindre agressivité (amélioration par rapport à Dioxyde seul). Ce traitement conduisait à une augmentation notable des effets de perturbation des enzymes de désiodation des hormones thyroïdiennes D2 et D3.

Cet ensemble de résultats montre que les procédés de traitement de désinfection ne conduisent pas à la même qualité de l'eau rejetée vis-à-vis des effets sur les cellules test. Pour les paramètres biologiques suivis, on constatait que les traitements à l'ozone et à l'acide peracétique conduisaient à une amélioration de la qualité de l'eau. Cette effet protecteur de l'ozone est sans doute explicable par une disparition de micropolluants actifs.

Il est important de noter que cette conclusion est basée sur un nombre d'observations limité par le nombre d'expériences réalisées et la variété des échantillons (une seule eau usée a été étudiée), ainsi que par les phénomènes biologiques suivis (l'évaluation des perturbateurs endocriniens de type stéroïdien devrait être refaite avec un autre protocole et d'autres phénomènes cellulaires pourraient être intégrés : reprotoxicité, atteintes à l'ADN).

Cependant, même si cette étude exploratoire ne constitue pas une démonstration stricte, les résultats obtenus forment un faisceau d'observations cohérent montrant les effets des différents traitements de désinfection sur la qualité de l'eau. De plus, ils sont cohérents avec les résultats décrits dans la littérature.

En effet, Bahr et al., (2005 et 2006) ont montré, grâce à des essais pilotes, que le traitement à l'ozone, avec des doses adaptées (de l'ordre de 5 mg/L O₃), pouvait permettre de dégrader au moins 95% des micropolluants. Des tests de cytotoxicité ont également montré que la réponse positive (présence de toxicité) sur des eaux en sortie de traitement diminuait de façon proportionnelle aux doses d'ozone appliquées jusqu'à devenir négative (pas de toxicité).

Dans le cadre du projet Européen POSEIDON, des essais de pilotes d'ozonation menés sur des effluents de station d'épuration (Ternes 2003) ont montré que, sur 53 composés pharmaceutiques cibles, 30 étaient présents dans l'effluent. Avec des doses appliquées de 10 à 15 mg/l, toutes les concentrations en composés testés passaient en dessous de la limite de détection. L'étude des sous-produits formés a fait l'objet d'une étude ultérieure.

Ainsi le traitement de désinfection à l'ozonation pourrait être une voie d'amélioration des filières pour la dégradation des produits pharmaceutiques réfractaires au traitement classique. Par la suite, il serait intéressant de tenter de caractériser les sous produits formés par le traitement UV basse pression et qui ont une stabilité d'au moins 24h.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bahr C., Ernst M. Reemtsma T., Heinzmann B., Luck F., Jekel M. 2005. Pilot scale ozonation of treated municipal effluent for removal of pharmaceutical compounds and pathogens – The Berlin

study. Proceedings IOA17 Conference Strasbourg, Aout 2005.

Bahr C., Schumacher J., Ernst M., Luck F., Heinzmann B., Jekel M. 2006. UVA as control parameter for the effective ozonation of organic pollutants in secondary effluent. IOA-EA3G International Conference, Avril 2006 – Wasser Berlin 2006.

Courtin F., Zroui H., Lamirand A., Li WW., Mercier G., Schumacher M., Goascogne CL., Pierre M. 2005. Thyroid hormone deiodinase in the central and peripheral nervous system. *Thyroid*. 2005 8: 931-42²

Heberer T., Reddersen K., Melchlinski A. 2002. From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Sci. Technol.*, 46, 81-88.

Ternes et al., 2003. Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from waste water?" *Water Research* 37, 1976-1982.