

---

## Conception du pilote de laboratoire

Pour contrôler les conditions expérimentales de façon optimale, des appareils à faisceau UV collimaté sont généralement utilisés dans les études de dégradation des micropolluants (Pereira *et al.*, 2012; Rosenfeldt *et al.*, 2007) ou d'évaluation de la désinfection (Mamane *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2014). Cette technique permet d'obtenir des rayons UV parallèles d'intensité contrôlée. Le système consiste à irradier une solution contenant une concentration connue en bactéries ou un ou plusieurs polluants organiques. Cette conformation statique permet à l'ensemble de l'échantillon irradié de recevoir une dose uniforme en fonction du temps d'exposition. Il est alors possible d'évaluer précisément des cinétiques d'abattement des microorganismes ou de dégradation de différents micropolluants. Néanmoins, ces conditions expérimentales sont très éloignées des conditions retrouvées dans des réacteurs UV commerciaux où le flux d'eau circule de façon continue. Ainsi, dans le cadre de cette étude, le choix s'est porté sur un système permettant de se rapprocher des conditions réelles d'utilisation tout en contrôlant les paramètres déterminants tels que :

- le débit,
- la température de l'eau,
- la concentration initiale en micropolluants ou en bactéries,
- la concentration initiale en oxydant,
- la dose UV.

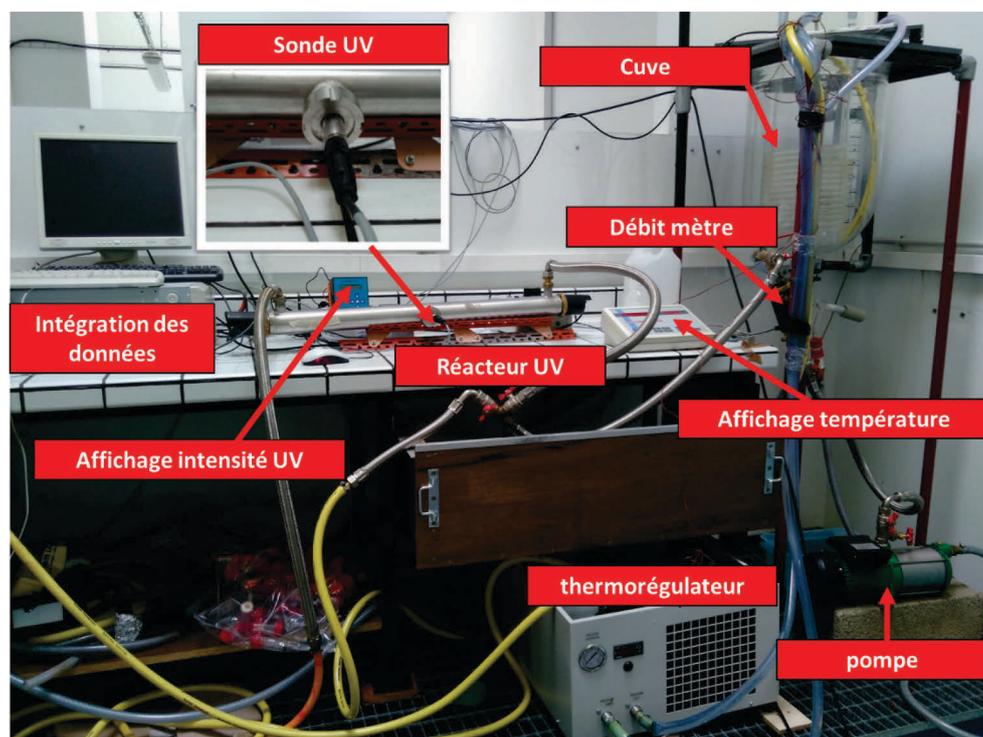
Le pilote est conçu pour permettre d'évaluer à la fois l'efficacité de désinfection et les performances en matière de dégradation de différents micropolluants organiques. Pour cela deux modes de circulation ont été mis en place :

-le mode continu (système ouvert) :il permet un seul passage de l'eau dans le réacteur pour atteindre des doses UV proches des doses réglementaires communément utilisées en désinfection UV (40 mJ/cm<sup>2</sup>) ;

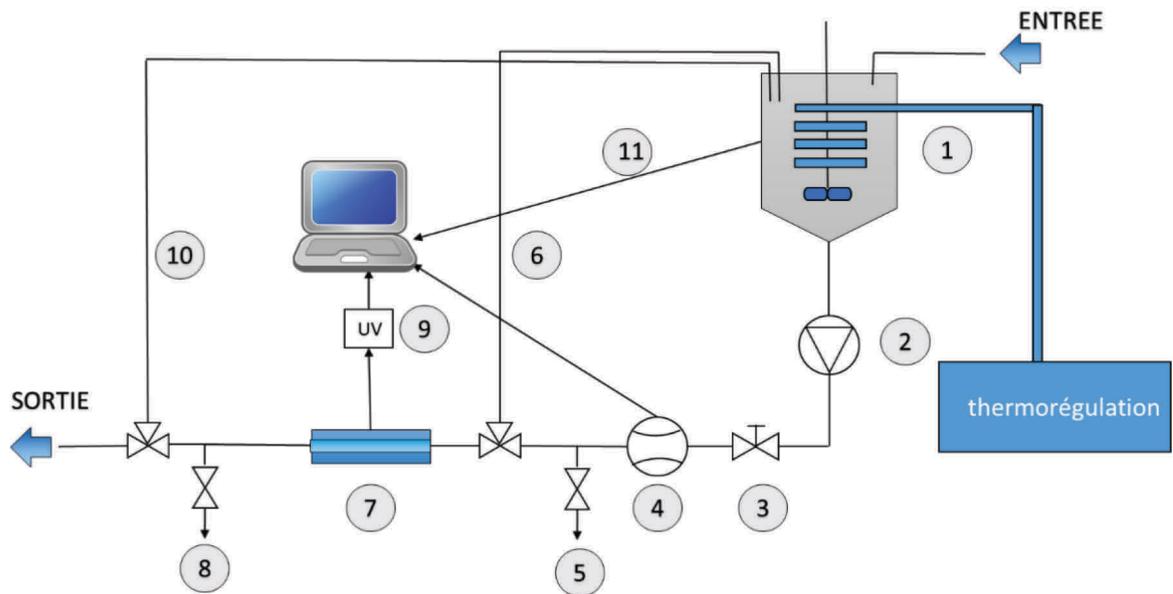
-le mode semi-continu (système fermé) :ce mode assure une recirculation de l'eau dans la cuve, il permet d'atteindre des doses UV élevées en multipliant le passage de l'eau dans le réacteur ( $\approx 1000$  mJ/cm<sup>2</sup>).

### II.1.1.2 Montage du pilote

La *Figure II.1* montre le montage du pilote réalisé en laboratoire. Il permet de faire circuler l'eau jusqu'à un débit maximal de 40 L/min soit 2,4 m<sup>3</sup>/h. Dans ce cas, le temps de séjour dans le réacteur est d'environ 1,7 secondes. L'eau à traiter est stockée dans une cuve en verre de 60 Litres où sont directement injectées les solutions de microorganismes et de micropolluants ainsi que les oxydants. Le volume du réacteur est de 1,1 litre. Pour un volume de 40 litres, 38 litres sont contenus dans la cuve et 2 litres dans le système (tuyaux + réacteur). Une pompe permet d'injecter l'eau dans le système à un débit précis, mesuré par un débitmètre et contrôlé par une vanne. L'eau circule ensuite au sein du réacteur UV ou bien est redirigée vers la cuve par un circuit by-pass (*Figure II.2*). Ce dernier permet notamment d'homogénéiser la température du système et la concentration en micro-organismes ou en polluants organiques. En sortie du réacteur, l'eau est soit rejetée à l'égout dans le cas du mode continu, soit réinjectée dans la cuve dans le cas du mode semi-continu. Un serpentin en verre relié à un thermorégulateur en circuit fermé assure le maintien d'une température constante. Les températures de l'eau de la cuve et de la surface de la lampe sont mesurées en temps réel. Les données de débit, de température et de puissance UV sont intégrées et enregistrées en continu par l'intermédiaire d'un programme développé sous Labview.



**Figure II.1 : système pilote UV installé à l'INSA de Lyon**

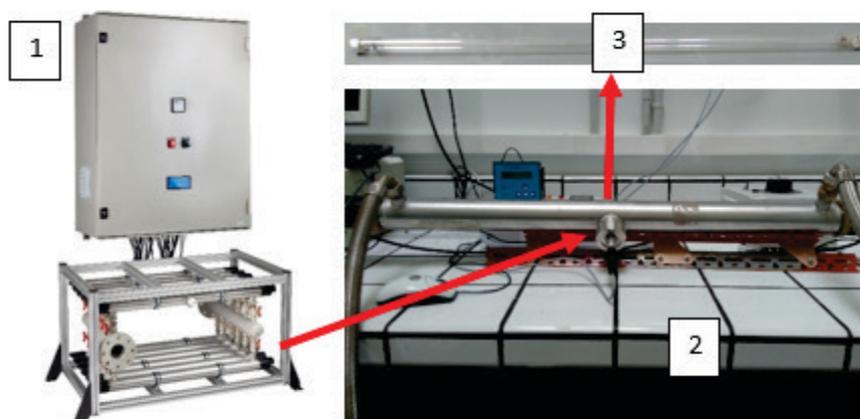


1: cuve ; 2: pompe ; 3: vanne de contrôle du débit ; 4: débitmètre ; 5: point de prélèvement A ; 6: circuit by-pass ; 7: réacteur UV ; 8: point de prélèvement B ; 9: sonde UV ; 10: circuit mode semi-continu ; 11: contrôle de la température

**Figure II.2: vue générale (A) et schéma du système pilote de laboratoire (B).**

### II.1.1.3 Réacteur et lampe UV

Le réacteur UVC utilisé dans le système pilote est un réacteur commercial annulaire en INOX 216L (COMAP WT). Il s'agit d'une unité d'un module conçu pour la désinfection en station d'épuration (*Figure II.3*).



**Figure II.3: module de désinfection UV (1), réacteur UV du pilote expérimental (2) et lampe UV 55W (3).**

L'irradiation UVC est produite par une lampe Philips basse pression d'une puissance électrique de 55 W. Les lampes UV basse pression contiennent du mercure sous forme de gaz à une pression d'environ 0,93 Pa. Les caractéristiques générales de la lampe sont présentées dans le *Tableau II.1*. Un courant électrique circule entre deux électrodes et chauffe la vapeur de mercure. Ce dernier émet alors un rayonnement UV principalement centré autour de 254 nm (environ 85 % du rayonnement). La lampe UV utilisée nécessite des ballasts ferro-magnétiques pour apporter le voltage suffisant qui engendre l'allumage de la lampe. La lampe, placée au centre du réacteur, est isolée de l'eau par un tube en quartz qui laisse passer près de 100% du rayonnement émis. La lame d'eau entre la paroi du réacteur et la lampe est de 1 cm permettant une pénétration des rayons UV même dans le cas d'une eau de faible transmittance (TUV). La lampe UV fournit une puissance germicide de 17,5 W (donnée constructeur) pendant 9000 heures. Une sonde UV (UV Technik) est insérée dans un filet Age situé au milieu du réacteur et donne la puissance UV en W/m<sup>2</sup> à ce point particulier du réacteur (à 1 cm de la lampe). La lampe est préchauffée au minimum 15 minutes avant l'utilisation du pilote

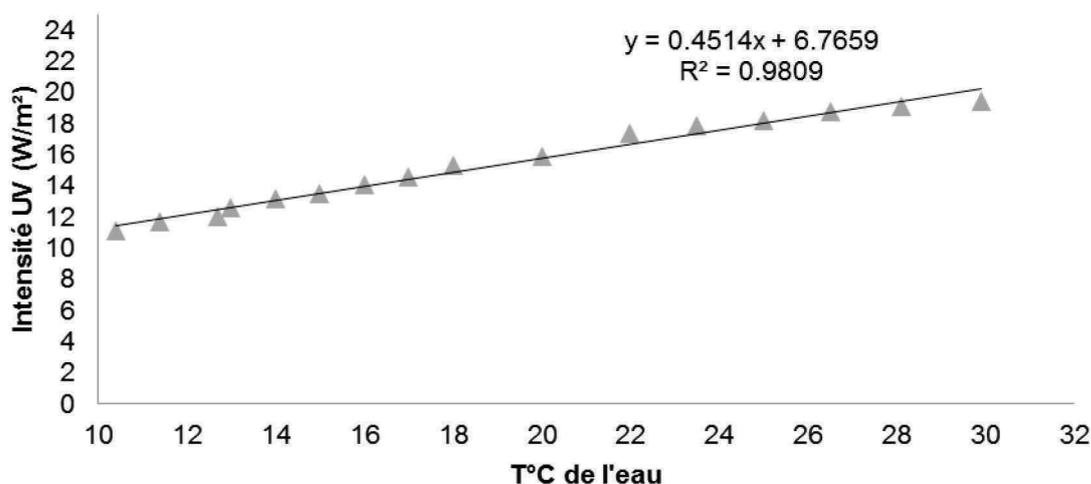
**Tableau II.1 : caractéristiques techniques de la lampe du pilote.**

Longueur (cm)	$\lambda$ (nm)	Puissance (W)	Voltage (V)	Puissance germicide (W)	Ampérage (A)	Durée de vie (h)	Dépréciation en fin de vie (%)
89,5	253,7	55	86	17,5	0,77	9000	10

## II.1.2 Caractérisation et validation du pilote

### II.1.2.1 Effet de la température sur l'efficacité de la lampe

L'efficacité de la lampe dépend de la pression du mercure. Or, cette pression varie en fonction de la température à la surface de la lampe qui dépend elle-même de la température de l'eau. Pour évaluer l'impact de la température sur le système en conditions réelles, le thermorégulateur a été réglé au minimum pour atteindre une température d'environ 10 °C. L'eau qui circule à un débit de 40 L/min, est progressivement réchauffée par la lampe elle-même jusqu'à 30°C. La puissance UV, mesurée par une sonde UV Technik, a été enregistrée sur cette gamme de température qui correspond généralement à celle des eaux usées à traiter. La *Figure II.4* montre que la puissance UV est près de 1,7 fois plus importante à 30 °C qu'à 10 °C (11 W/m<sup>2</sup>). Ce paramètre de température doit donc être parfaitement contrôlé sur le pilote afin de limiter la variation de la puissance UV entre deux expérimentations. Une température de 20 °C est maintenue tout au long des expérimentations sur le pilote, elle correspond à la température ambiante moyenne du laboratoire. Dans ces conditions expérimentales, la valeur de la puissance UV est de 16 W/m<sup>2</sup>. Cette référence permet notamment de contrôler le bon fonctionnement ou l'usure de la lampe.



**Figure II.4:** Effet de la température de l'eau sur l'intensité UV mesurée par la sonde du pilote.

### II.1.2.2 Détermination de la dose UV par biodosimétrie

#### II.1.2.2.1 Facteurs d'influence de la dose UV dans le pilote

Lorsque le système fonctionne en mode continu, il est possible de faire varier le débit et donc le temps de séjour de l'eau dans le réacteur dont dépend la dose UV. En effet, cette dernière, exprimée généralement en mJ/cm<sup>2</sup>, est le produit de la puissance UV par le temps de séjour à un point donné du réacteur. Cette dose UV est l'un des paramètres les plus importants à connaître

lors des expérimentations car elle permet de comparer l'efficacité des traitements. Dans le cas du mode semi-continu, la dose UV dépend du débit et du volume d'eau initial dans la cuve. Ces deux paramètres peuvent donc être modifiés pour obtenir des doses UV différentes. La dose UV émise dépend de nombreuses variables, souvent interdépendantes telles que la géométrie du réacteur (nombre, espacement et puissance des lampes), les caractéristiques des gaines en quartz, la disposition de déflecteurs, la vitesse et la transmittance de l'eau. Ces paramètres sont pris en compte dans l'équation [4] de calcul de dose (ANSES, 2010) :

$$D = \left(\frac{Pt}{S}\right)e^{-kx} \quad [4]$$

où :

D est la dose UV en J/m<sup>2</sup>

P, la puissance biocide de la source de rayonnement UV en W,

S, la surface de la lampe UV en m<sup>2</sup>,

t, le temps d'exposition d'un élément de volume en s,

k, le coefficient d'absorption des rayonnements UV de l'eau à traiter en m<sup>-1</sup>,

x, épaisseur de la lame d'eau en m.

Néanmoins, seule une dose théorique peut être calculée avec cette équation du fait de l'hydraulique complexe du réacteur qui présente généralement un régime turbulent. Pour déterminer la dose UV réelle émise par le réacteur utilisé, une méthode dite biodosimétrique a été choisie.

#### II.1.2.2.2 *Stratégie de calcul de la dose UV dans le pilote*

La biodosimétrie consiste à utiliser un biodosimètre dont la sensibilité aux UV a été étalonnée en laboratoire. Il s'agit de la seule méthode de référence utilisée par les organismes de certification tels que l'ÖNORM, organisme de certification autrichien. Elle permet de déterminer la dose moyenne reçue par une particule élémentaire lors de son trajet dans le réacteur UV et prend donc en compte l'hydraulique du système. La biodosimétrie donne des valeurs précises de dose UV mais est contraignante à mettre en place. Il n'est pas concevable de l'utiliser avant chaque expérimentation. Néanmoins, il existe des logiciels commerciaux qui permettent de calculer une dose UV moyenne en fonction des paramètres du réacteur, du débit et de la transmittance. Dès lors, la stratégie choisie vise à valider l'un de ces logiciels par la méthode biodosimétrique. Par la suite, ce logiciel sera utilisé pour déterminer rapidement les doses UV moyennes atteintes lors des expérimentations sur pilote.

Le choix s'est porté sur le logiciel UVCalc2A développé par la société Bolton Photosciences. En effet, il est déjà utilisé dans différents travaux de recherche (Sindelar *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2015). La version acquise permet de déterminer la dose moyenne émise dans un réacteur où le mélange de l'eau est supposé parfait. La dose obtenue est donc la dose UV maximale théorique. A cela doit donc être appliqué un facteur de correction qui peut être déterminé en fonction des résultats obtenus par biodosimétrie.

### II.1.2.2.3 Mode opératoire

Dans cette étude, des spores de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) ont été choisis comme biodosimètre. Ces micro-organismes sont relativement résistants aux UVC et ont la particularité de présenter une sensibilité linéaire aux UV entre 20 et 60 mJ/cm<sup>2</sup>. Une courbe d'inactivation des spores a été réalisée entre 20 et 80 mJ/cm<sup>2</sup> par le fournisseur. L'équation issue de cette courbe permet de calculer la dose équivalente de réduction (REF) à partir du logarithme décimal de l'abattement mesuré lors des expérimentations :

$$\text{REF} = -\frac{1}{k} \cdot \log\left[1 - \left(1 - 10^{\log\frac{N}{N_0}}\right)^{10^{-d}}\right] [5]$$

où

$N_0$ , est la concentration initiale en spores,

$N$ , la concentration en spores après le traitement UV,

$k$ , la pente de la partie linéaire de la courbe d'inactivation ( $k = 0,0066 \text{ m}^2/\text{J}$ ),

$d$ , le point d'intersection la partie linéaire de la courbe d'inactivation avec l'axe des ordonnées ( $d = 0,66$ ).

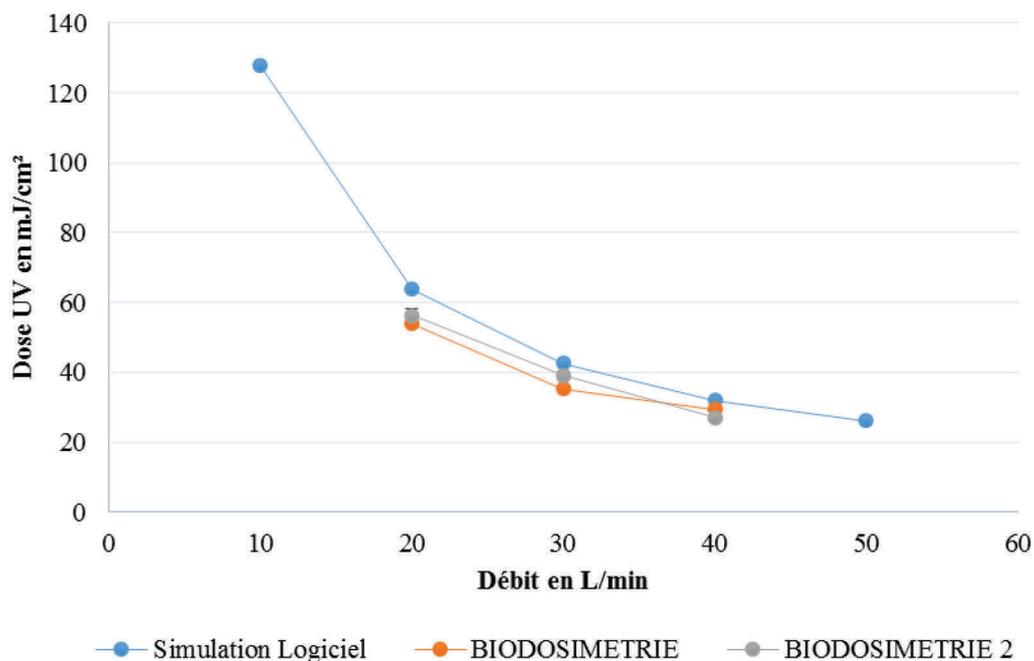
Les constantes  $k$  et  $d$  sont déterminées à partir de la courbe d'inactivation présentée en (ANNEXE 4).

Les spores de *Bacillus*, sous forme lyophilisée, ont été fournis par la société HAI-SO GmbH (Autriche). Après réhydratation dans de l'eau déminéralisée stérile, ils ont été laissés à température ambiante pendant 12 heures. Le test biodosimétrique a été réalisé à une puissance UV maximale (16 W/m<sup>2</sup>) avec variation du débit de 10 L/min à 40 L/min. Il a été répété 2 fois à 2 mois d'intervalle pour vérifier la stabilité de la lampe UV. Tous les tests biodosimétriques sont réalisés avec de l'eau du réseau dont la transmittance est de 97 %. La puissance UV mentionnée est celle mesurée par la sonde UV du pilote.

Une fois les paramètres expérimentaux choisis (débit, transmittance et puissance UV), le biodosimètre est introduit dans la cuve à une concentration d'environ  $5 \cdot 10^5$  UFC/L et homogénéisé quelques minutes. Un premier prélèvement (1 L) est effectué dans la cuve pour déterminer la concentration initiale en spores ( $N_0$ ). Le prélèvement en sortie du réacteur est réalisé une fois que la puissance UV est stabilisée à son maximum (16 W/m<sup>2</sup>) et que le débit est à la valeur souhaitée. Environ 1 litre est échantillonné. Le prélèvement en sortie du réacteur permet de déterminer la concentration en spores restants ( $N$ ). Les échantillons sont analysés en triplicat. La détermination du nombre de colonies bactériennes (unité formant colonie = UFC) est réalisée par la méthode « *Poor plate* » après dilution appropriée des échantillons (Plate count agar, Roth). Les boîtes de Petri sont incubées 44 h à 37 °C. Seules celles possédant entre 20 et 200 colonies sont prises en compte. Le rapport  $\log(N/N_0)$  est déterminé pour chaque échantillon et la dose UV est obtenue à partir de l'équation [5]. Les résultats sont ensuite comparés à ceux obtenus par une simulation réalisée avec le logiciel UVCalc2A.

#### II.1.2.2.4 Résultats de validation

La Figure II.5 présente les doses UV obtenues par biodosimétrie lors des deux expérimentations espacées de 2 mois et la modélisation obtenue sous le logiciel UVCalc 2A. L'efficacité de la lampe est stable dans le temps. Les valeurs obtenues par le logiciel UVCalc2A sont très proches des valeurs biodosimétriques pour les trois débits testés. L'écart entre la valeur théorique et la valeur réelle augmente pour les plus faibles débits (8% pour 40 L/min contre 15% pour 20 L/min). En effet, lorsque des doses supérieures à 80 mJ/cm<sup>2</sup> sont atteintes, la réponse du biodosimètre n'est plus linéaire. Un facteur de correction de 0,88 a été déterminé et appliqué par la suite. Le facteur de correction est plus proche de 1 que celui préconisé par le développeur du logiciel (facteur de 0,7). L'application du facteur 0,88 aux valeurs obtenues par le logiciel permet donc de déterminer une dose UV très proche de la dose obtenue par biodosimétrie.



**Figure II.5: comparaison des résultats biodosimétriques obtenus à différents débits sur le pilote avec une simulation réalisée sous le logiciel UVCalc2A**

Cette expérimentation préliminaire a permis de valider le logiciel UVCalc2A pour déterminer les doses UV appliquées lors des expérimentations sur le pilote. Il s'agit de la dose moyenne reçue à un débit donné lors d'un seul passage dans le réacteur.

#### II.1.2.3 Détermination des doses UV expérimentales par le logiciel UVCalc2

Une fois le logiciel validé, il est possible de déterminer les doses UV appliquées à chaque expérimentation pour le mode semi-continu, en connaissant le débit et la transmittance de l'eau. En mode semi-continu (fermé), il est supposé que tout le volume d'eau de la cuve reçoit la même dose UV au cours d'une durée d'expérience donnée. Ainsi, la dose UV pour un seul cycle est

déterminée avec le logiciel UVCalc2A puis est multipliée par le nombre de passages complets du volume d'eau de la cuve selon l'équation [6] :

$$N_{\text{cycles}} = \frac{t}{V/Q} \text{ [6]}$$

où :

$N_{\text{cycles}}$  est le nombre de passage du volume d'eau de la cuve dans le réacteur,

$t$ , la durée du cycle en min,

$V$ , le volume d'eau dans la cuve en L,

$Q$ , le débit dans le système en L/min.

Par exemple, dans le cas d'une expérimentation réalisée à 40 L/min avec l'eau du réseau ( $T = 97\%$ ), la dose UV calculée par le logiciel est de 26,6 mJ/cm<sup>2</sup> (après application du facteur de correction 0,88). Sur une période d'une heure avec un volume d'eau initial de 50 L, les doses UV calculées pour l'eau du réseau à 20°C à différents temps de circulation de l'eau, sont présentées dans le *Tableau II.2*.

**Tableau II.2: Doses UV calculées avec le facteur de correction dans l'eau du réseau.**

Temps de circulation de l'eau en min	0	10	20	30	40	50	60
Doses UVC en mJ/cm <sup>2</sup>	0	212,8	425,6	638,4	851,2	1064	1276,8

Conditions expérimentales :  $Q = 40$  L/min,  $V_{\text{cuve}} = 50$  L, Température = 20 °C,  $T = 97\%$ .

### II.1.3 Réactifs et matrices des essais

Les expérimentations ont tout d'abord porté sur l'étude des traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur différents modèles bactériens. Les principaux milieux utilisés sont présentés dans le *Tableau II.3*. Par la suite, c'est la dégradation d'un mélange d'hormones composé d'E1, E2 et EE2 par UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et UV/S<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>2-</sup> qui a été étudiée. Pour finir, l'évaluation des traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été étendue à trois produits pharmaceutiques en mélange : diclofénac, naproxène et ibuprofène. Les différents réactifs sont répertoriés dans le *Tableau II.4*.

#### II.1.3.1 Réactifs

Les milieux utilisés pour dénombrer les micro-organismes modèles de l'étude sont obtenus sous formes de poudre. Les consignes du fournisseur sont respectées pour élaborer les milieux de cultures et les géloses. Une quantité donnée de poudre est pesée pour confectionner 1 litre de medium dans l'eau distillée. L'ensemble est stérilisé dans un autoclave (Laboster) à 121 °C pendant 15 minutes. Les détails des media sont présentés dans le *Tableau II.3*. Le *Tableau II.4* présente les réactifs, micropolluants et oxydants, utilisés au cours de l'étude. Les micropolluants, composés estrogéniques et produits pharmaceutiques, sont utilisés sans purification

complémentaire. Ils sont pré-dissous dans 20 mL d'acétonitrile avant d'être ajoutés dans la cuve à une concentration finale de 5 µM.

**Tableau II.3: principaux milieux utilisés dans l'étude des abattements des micro-organismes modèles (*E. coli*, coliformes et streptocoques).**

Milieux	Quantité (g) pour préparation d'1 L	Couleur colonie	Fournisseur
LB	35	Blanche	Roth
Coliforme chromo agar	26,4	Coliformes : rose <i>E. coli</i> : bleu	Roth
KF Streptocoque	71,4	Rouge	VWR

**Tableau II.4: présentation des principaux composés utilisés dans l'étude de dégradation des micropolluants.**

Molécule	CAS	Formule chimique	Masse molaire	Pureté	fournisseur
Estrone	53-16-7	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub>	270,366	98,5	Sigma-Aldrich
β-estradiol	50-28-2	C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	272,382	98,5	Sigma-Aldrich
17α-ethinyl estradiol	57-63-6	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	296,403	98,5	Sigma-Aldrich
Diclofénac	15307-86-5	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> C <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	296,148	98,5	Sigma-Aldrich
Naproxène	22204-53-1	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	230,259	98,5	Sigma-Aldrich
Ibuprofène	15687-27-1	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	206,29	98,5	Sigma-Aldrich
Persulfate de potassium	7727-21-1	K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	270,322	98,5	Sigma-Aldrich
Peroxyde d'hydrogène	7722-84-1	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	34,02	30%	Carl Roth
Acétonitrile	75-05-8	CH <sub>3</sub> CN	41,05	99%	VWR

### II.1.3.2 Caractéristiques des eaux utilisées

Seuls deux types de matrices ont été utilisés pour l'ensemble des expérimentations. Il s'agit de l'eau du réseau de Villeurbanne et l'eau usée traitée de la STEU de la Feyssine (Villeurbanne). Ces deux matrices se différencient principalement par leur transmittance, leur concentration en matière organique et en bactéries.

L'eau du réseau présente une faible charge organique et une très bonne transmittance (TUV<sub>254 nm</sub> = 97%). Elle ne présente pas de bactéries fécales telles qu'*E. coli* conformément à la réglementation (Directive n° 98/83/CE du 03/11/98 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine). Cette eau est utilisée pour l'évaluation de l'abattement d'*E. coli* au contact d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seul. Cette matrice est aussi utilisée pour déterminer la cinétique de dégradation des différents mélanges (hormones ou produits pharmaceutiques) en limitant l'interaction des

différents traitements avec la matière organique et en optimisant la pénétration du rayonnement UV dans l'eau. Cette matrice est facile d'accès et sa qualité est stable dans le temps.

L'eau usée traitée est une matrice plus fortement chargée en matière organique et dont la transmittance est variable selon le jour ( $TUV_{254nm} = 50-70\%$ ). Les micro-organismes naturels de cette matrice ou des micro-organismes exogènes (dopage) sont utilisés pour évaluer la capacité de désinfection des traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Elle est aussi utilisée pour déterminer les taux d'abattement des différents mélanges de polluants dans des conditions proches de la réalité.

### II.1.3.2.1 Eau du réseau

L'eau du réseau de Villeurbanne est directement utilisée en tant que matrice peu concentrée en matière organique. Elle est directement injectée dans la cuve. Les caractéristiques physico-chimiques principales sont présentées dans le *Tableau II.5*. Cette matrice est utilisée pour :

- les études biodosimétriques (validation du logiciel, II.1.2.2),
- les études microbiologiques (Chapitre III),
- les études de dégradation des micropolluants (chapitre IV).

**Tableau II.5: caractéristiques de l'eau du réseau (Villeurbanne 69).**

	Chlore total	Couleur	Conductivité	Turbidité	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	TUV (254 nm)	pH
Unité	mg/l	Pt	μS/cm	NFU	mg/l N	%	
ER	0,05	<5 mg/L	332	0,16	<0,05	97	8

TUV: Transmittance UV à 254 nm, trajet optique 10 mm.

### II.1.3.2.2 Eaux usées traitées de station d'épuration

Les eaux usées traitées sont prélevées à la Station de la Feysine (Villeurbanne 69). Cette STEU traite les eaux usées de 300 000 EH, soit 91 000 m<sup>3</sup> d'eaux usées par jour (données Suez). Le dessablage, le dégraissage et la décantation primaire sont réalisés sans réactif. Les eaux prétraitées sont ensuite envoyées vers 3 lignes de traitement biologique pour éliminer la pollution carbonée (bassin d'aération) et la pollution azotée (nitrification / dénitrification). Les abattements moyens sur le mois de janvier 2014 atteignent 95% pour la DCO, 97% pour la DBO et 98% pour les MES (*Tableau II.6*).

**Tableau II.6: principaux paramètres physicochimiques des eaux en entrée et sortie de la STEU de la Feyssine et les abattements correspondants.**

	Entrée station	Sortie station	Abattement moyen
Débit (m <sup>3</sup> /j)	44962±14186	44354±14690	-
DCO (mg/L)	489±110	24±4	95%
DBO (mg/L)	202±42	5±2	97%
MES (mg/L)	247±64	5±1	98%
NK (mg/l N)	39±12	4±3	90%
NH <sub>4</sub> (mg/l N)	27±9	2±1	93%

(Données du mois de janvier 2014)

Les prélèvements sont réalisés dans des bidons en plastique de 35 L en sortie de STEU. L'eau traitée est utilisée le jour même ou stockée à 3 °C pendant 24 h au maximum. Des variations de la qualité de l'eau traitée sont constatées d'un prélèvement à l'autre. Pour que les différents essais restent comparables, seuls les prélèvements pour lesquels la transmittance est supérieure à 50% et le Carbone Organique Dissous (COD) est inférieur à 40 mg/L sont utilisés. Dans le cadre de cette étude, 3 prélèvements ont été exploités, ils sont dénommés « Eau traitée A (ET A) », « Eau traitée B (ET B) » et « Eau traitée C (ET C) ». Les dates de prélèvement ainsi que les paramètres physicochimiques des eaux (fournis par le laboratoire de la station, sauf la transmittance) sont précisés dans le *Tableau II.7*.

**Tableau II.7: caractéristiques des eaux usées traitées de la STEU de la Feyssine.**

	DCO	COD	DBO <sub>5</sub>	MES	NTK	N- NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	N- NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	N- NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	P <sub>t</sub>	TUV (254 nm)	pH
Unités	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l N	mg/l N	mg/l N	mg/l P	%	
ET A (17/01/15)	21,7	11	5,8	4,7	2,4	0,6	0,1	3,8	2,2	70	8
ET B (16/02/15)	18,5	6,1	3	2	5,04	4,24	0,09	4,54	1,28	60	8
ET C (03/03/15)	19	10,6	3	3	2,36	1,31	0,54	3,68	0,9	55	8

ET : Eaux usées Traitées; DCO : Demande Chimique en Oxygène; COD : Carbone Organique Dissous; DBO<sub>5</sub> : Demande Biologique en Oxygène; MES : Matières En Suspension; TUV : Transmittance UV à 254 nm, 10 mm , NTK : Azote Kjeldahl, P<sub>t</sub> : phosphore total.

## II.2 Evaluation de la désinfection par UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Cette étude a pour objectif d'étudier les capacités de désinfection des traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Le *Tableau II.8* récapitule les expérimentations réalisées. Dans un premier temps, l'effet direct de désinfection du peroxyde d'hydrogène est évalué sur une souche d'*E. coli* sauvage par suivi cinétique en réacteur batch (flacons en verre de 1 Litre). Ensuite, les traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sont mis en œuvre dans le pilote sur les bactéries naturelles (endogènes) de l'eau de STEU afin de déterminer l'effet de la dose UV et de la concentration en peroxyde d'hydrogène sur la désinfection. L'évaluation de cette dernière repose sur des techniques de microbiologie générale basées sur le dénombrement des micro-organismes indicateurs de contamination fécale (*E. coli*, coliformes totaux et streptocoques), mais aussi sur des méthodes analytiques permettant d'évaluer la viabilité de la biomasse bactérienne totale (ATP-métrie et marquage cellulaire).

**Tableau II.8: ensemble des expériences conduites pour l'évaluation de la désinfection par traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.**

		Etude de la capacité de désinfection de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> seul	Etude de la désinfection par traitements UV et UV/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		
Modèle bactérien		<i>E. coli</i> sauvage	<i>E. coli</i>	Coliformes Totaux	Streptocoques
Matrice utilisée		STEU (ET A) + eau du réseau	STEU (ET A)	STEU (ET A)	STEU (ET A)
[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] mg/L	0	non	oui	oui	oui
	50	oui	oui	oui	oui
	100	oui	oui	oui	oui
Dose UV (mJ/cm <sup>2</sup> )		-	10 et 40	10 et 40	10 et 40
Méthode de dénombrement bactérien		Milieu agar chromogène (Chromocult)	Filtration membranaire + Chromocult	Filtration membranaire + Chromocult	Filtration membranaire + KF streptocoque
ATPmétrie		non	Oui	oui	oui

---

## II.2.1 Effet d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seul sur *E. coli* « sauvage »

Afin d'évaluer correctement l'efficacité des traitements UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quant à la désinfection, il convient préalablement d'établir si le peroxyde d'hydrogène peut, utilisé seul, entraîner l'inactivation de microorganismes seul. *E. coli* a été sélectionnée comme organisme modèle au regard de sa large utilisation comme indicateur de contamination fécale. La souche *E. coli* sauvage a été isolée de l'eau de STEU de la Feyssine sur milieu chromogène. Cette souche est cultivée dans un tube stérile contenant du milieu nutritif LB (Roth) pendant 24h à 37 °C sous agitation (150 tr.min<sup>-1</sup>) pour atteindre une concentration de 10<sup>11</sup> UFC/L. L'effet du peroxyde d'hydrogène sur *E. coli* est déterminé dans l'eau du réseau et dans l'eau de STEU. Les différentes expérimentations sont suivies par le dénombrement des bactéries viables et cultivables sur milieu agar chromogène (CarlRoth). La sensibilité des autres modèles étudiés (coliformes totaux et streptocoques fécaux) au contact d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seul n'a pas été évaluée car ceux sont des groupes composés d'espèces bactériennes différentes qu'il n'est pas possible de représenter dans une culture simple. Il serait nécessaire d'isoler chaque espèce bactérienne, de les cultiver et de les tester individuellement.

L'étude est réalisée dans des flacons d'un litre avec soit de l'eau du réseau, soit de l'eau de STEU. *E. coli* est ajoutée à une concentration finale d'environ 1.10<sup>6</sup> UFC/L. Un prélèvement à t = 0 est effectué pour déterminer la concentration initiale en bactéries (N<sub>0</sub>). Le peroxyde d'hydrogène est ajouté à une concentration de 50 mg/L ou 100 mg/L puis des prélèvements réguliers de 40 mL sont effectués dans des tubes Falcon stériles. Un volume d'1 mL de thiosulfate de sodium (40 g/L) est ajouté dans le flacon (concentration finale d'1 g.L<sup>-1</sup>) immédiatement après prélèvement afin de consommer le peroxyde d'hydrogène résiduel. Les microorganismes présents dans les échantillons sont ensuite mis en culture sur milieu chromogène pour dénombrement.

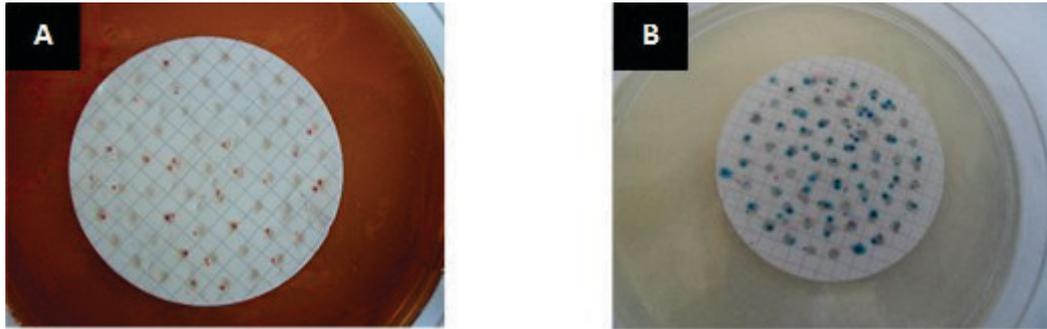
---

## II.2.2 Effet du traitement UV et UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sur la désinfection de l'eau de STEU

Cette étude cherche à mettre en évidence l'influence de la dose UV et de la concentration en oxydant sur l'efficacité de désinfection de l'eau de STEU. Pour cela deux doses UV (10 et 40 mJ/cm<sup>2</sup>) et trois concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0 mg/L, 50 mg/L et 100 mg/L) ont été étudiées sur les microorganismes endogènes de l'eau de STEU de la Feyssine.

### II.2.2.1 Modèles bactériens utilisés et méthodes de dénombrement

Les bio-indicateurs bactériens communément utilisés (*E. coli*, coliformes totaux et streptocoques fécaux) sont détectés par l'intermédiaire de milieux chromogènes. Chaque échantillon est analysé en triplicat par filtration sur membrane d'acétate de cellulose (Sartorius) après dilution appropriée permettant d'obtenir entre 10 et 200 colonies. *E. coli* et les coliformes totaux sont incubés 24 h à 37 °C sur milieu chromogène. Les bactéries *E. coli* forment des colonies bleues/violettes et les coliformes des colonies rose/saumon. Les streptocoques sont incubés sur milieu sélectif (KF Streptococcus Agar, Roth) pendant 44 h à 37 °C. Les colonies sont rouge vif (*Figure II.6*).



**Figure II.6: dénombrement des colonies de streptocoques (A), de coliformes et d'*E. coli* (B) sur milieux chromogènes après filtration sur membrane d'acétate de cellulose.**

### II.2.2.2 Protocole expérimental

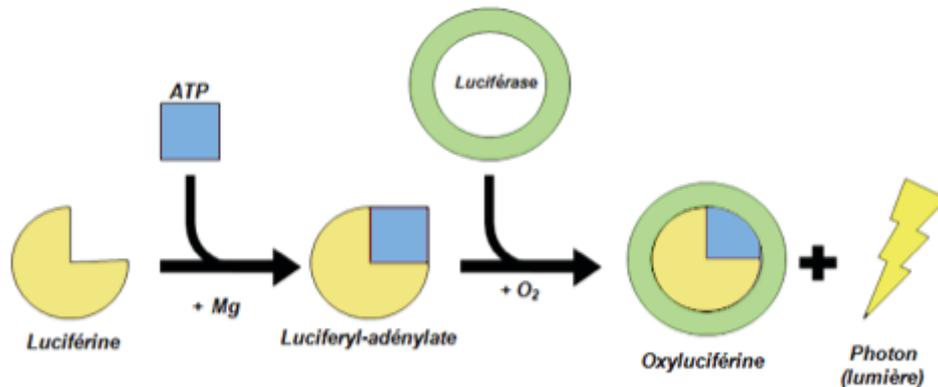
Pour chaque expérimentation, la lampe UV est allumée 15 min avant son utilisation pour une efficacité optimale. La cuve est remplie soit d'eau du réseau soit d'eau usée traitée (50 Litres), une recirculation via le mode by-pass est opérée jusqu'à atteindre une température constante de 20°C. Les différentes solutions en micro-organismes sont injectées dans la cuve et homogénéisées quelques minutes. Un prélèvement est effectué directement dans la cuve pour déterminer la concentration initiale en micro-organismes ( $N_0$ ). Dans le cas de l'évaluation du procédé UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, le peroxyde d'hydrogène est injecté dans la cuve de manière à obtenir la concentration souhaitée. Le pilote est mis en fonctionnement en mode continu et le prélèvement est effectué lorsque le débit et la puissance UV ciblés sont stables. Un volume d'1 L d'eau est prélevé pour déterminer la concentration finale en micro-organismes (N). Après chaque expérimentation, l'ensemble du système est nettoyé avec un détergent et abondamment rincé à l'eau du réseau.

### II.2.3 Evaluation de la viabilité de la biomasse bactérienne

La plupart des bactéries ne sont pas cultivables sur milieux nutritifs, ces bactéries sont décrites comme viables mais non cultivables (BVNV). Une sous-estimation de la charge bactérienne peut donc se produire lors du dénombrement par mise en culture. Par ailleurs, d'autres bactéries normalement cultivables peuvent entrer dans un état de cellule non cultivable (Xu *et al.*, 1982), notamment suite à un traitement visant la désinfection. Dans ce cas, les bactéries ne sont pas lysées mais seulement inactivées : l'efficacité de la désinfection est donc surestimée. Dès lors, d'autres méthodes d'analyses ont été mises en œuvre pour mieux estimer la viabilité de l'ensemble de la biomasse bactérienne avant et après un traitement de désinfection : l'ATP-métrie et le marquage des bactéries viables. L'ATP-métrie est une méthode de mesure de la quantité d'ATP intracellulaire qui est produite uniquement par les cellules vivantes. Le marquage cellulaire permet de différencier les cellules mortes des vivantes par une différence de couleur : rouge pour les mortes, verte pour les vivantes. Ces deux méthodes sont détaillées ci-dessous.

### II.2.3.1 Test ATP

L'Adénosine TriPhosphate (ATP) est une molécule énergétique présente dans tout organisme vivant. Elle est considérée comme un indicateur de la biomasse d'un échantillon. Il est possible de doser cette molécule grâce à la luciférine qui, en présence de luciférase et d'ATP, émet de la lumière proportionnellement à la quantité initiale d'ATP. Le test ATP n'est pas sélectif et prend donc en compte toutes les bactéries vivantes (*Figure II.7*).



**Figure II.7** : principe du test ATP. Source : <http://atp-metrie.fr/>

Le test ATP a été utilisé dans la présente étude pour évaluer le taux de désinfection des différents échantillons traités après UV seul ou UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cette analyse est réalisée dans l'heure suivant le prélèvement des échantillons. Le dosage de l'ATP est effectué avant et après filtration à 0,22 µm (filtre seringue VWR France) pour quantifier respectivement l'ATP totale et l'ATP extracellulaire. L'ATP intracellulaire est par la suite déterminée par soustraction. Dans une plaque 96 puits stérile (Greiner bio one), des volumes de 6 × 100 µL de chaque échantillon sont déposés dans des conditions également stériles. Des volumes de 6 × 100 µL d'eau stérile sont répartis dans la plaque pour déterminer le bruit de fond (contrôle négatif). Une gamme ATP (de 1 mM à 1.10<sup>-6</sup>mM) est préparée en parallèle. Pour quantifier l'ATP, le test commercial BacTiter-Glo™ Microbial Cell Viability Assay (Promega Biotech Iberica, Spain) et un luminomètre Luminoscan Ascent (Thermo scientific) ont été utilisés. Après reconstitution du réactif selon les indications du fournisseur, 100 µL de ce dernier sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est agitée quelques secondes puis placée dans le luminomètre. La lecture est réalisée au bout de 4 minutes. La production de lumière obtenue est exprimée en Unité Relative de Lumière (RLU) et est proportionnelle à la quantité d'ATP de l'échantillon. Les résultats présentés dans l'étude sont exprimés en % d'abattement de l'intensité lumineuse initiale.

### II.2.3.2 Test de viabilité des bactéries par marquage

Le test LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability (Thermofisher) a été mis en place afin d'observer directement les bactéries mortes ou vivantes par microscopie à épifluorescence après les différents traitements. Ce test est constitué de deux marqueurs cellulaires en mélange : le SYTO® 9 qui a une couleur verte et l'iodure de propidium qui a une couleur rouge sous microscopie à épifluorescence. Le SYTO® 9 a la capacité de pénétrer dans toutes les cellules

c'est-à-dire celles ayant une membrane intacte ou endommagée. L'iodure de propidium ne peut, quant à lui, marquer que les cellules dont la membrane est endommagée. Lorsque les deux marqueurs sont présents, l'iodure de propidium entraîne une réduction du signal vert émis par le SYTO® 9. Dès lors, les bactéries possédant une membrane intacte (considérées comme vivantes) vont émettre une couleur fluorescente verte et les bactéries dont la cellule est endommagée (bactéries mortes) vont émettre dans le rouge.

Le Kit commercial L7007 a été utilisé dans cette étude. Le mélange des marqueurs est réalisé dans un tube Eppendorf et homogénéisé. 5 échantillons sont analysés :

- un échantillon témoin positif réalisé sur une culture d'*E. coli sauvage* cultivée,
- un échantillon témoin positif réalisé sur une culture d'*E. coli sauvage* cultivée et soumise à un traitement thermique de 90 °C pendant 10 min,
- un échantillon témoin : eau de STEU sans traitement,
- un échantillon ayant subi le traitement UV (40 mJ/cm<sup>2</sup>),
- un échantillon ayant subi le traitement UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (40 mJ/cm<sup>2</sup> et 50 mg/L).

Pour cela, 2 mL de chaque échantillon sont transférés en triplicat dans des tubes Eppendorf en conditions stériles. Un volume de 6 µL du mélange des marqueurs est ajouté dans chaque tube à analyser. L'ensemble des tubes est homogénéisé avant d'être mis à incuber dans le noir pendant 15 minutes. Environ 5 µL de chaque échantillon sont placés sur une lame en verre de microscope et fixés quelques minutes à 40 °C dans un incubateur.

L'observation des lames est faite sous microscopie à épifluorescence (Olympus type IX81 Inversé) avec les filtres FITC et TRITC. L'ensemble des images est capté par une caméra numérique noir et blanc FluoView II et traité par le logiciel d'acquisition Cell F (AnalySIS).

## II.3 Etude de la dégradation des micropolluants par UV, UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et UV/persulfate

L'objectif est ici de déterminer les cinétiques de dégradations de mélanges de micropolluants soumis à un traitement UV ou UV+ oxydants dans le pilote de laboratoire. Dans cette partie, le mode opératoire pour la mise en œuvre de la dégradation des micropolluants par les différents traitements est tout d'abord présenté. Ensuite les méthodes d'analyses sont décrites : d'une part l'analyse chimique des différents micropolluants pour évaluation de leur dégradation, mais aussi celle des oxydants pour quantification de leur consommation. D'autre part, les analyses biologiques qui permettent d'évaluer l'activité estrogénique des effluents ou bien leur toxicité aigüe. Le *Tableau II.9* résume les différentes expériences réalisées.

**Tableau II.9: résumé des expériences conduites pour l'évaluation de la dégradation de micropolluants par traitements UV et UV+ oxydants .**

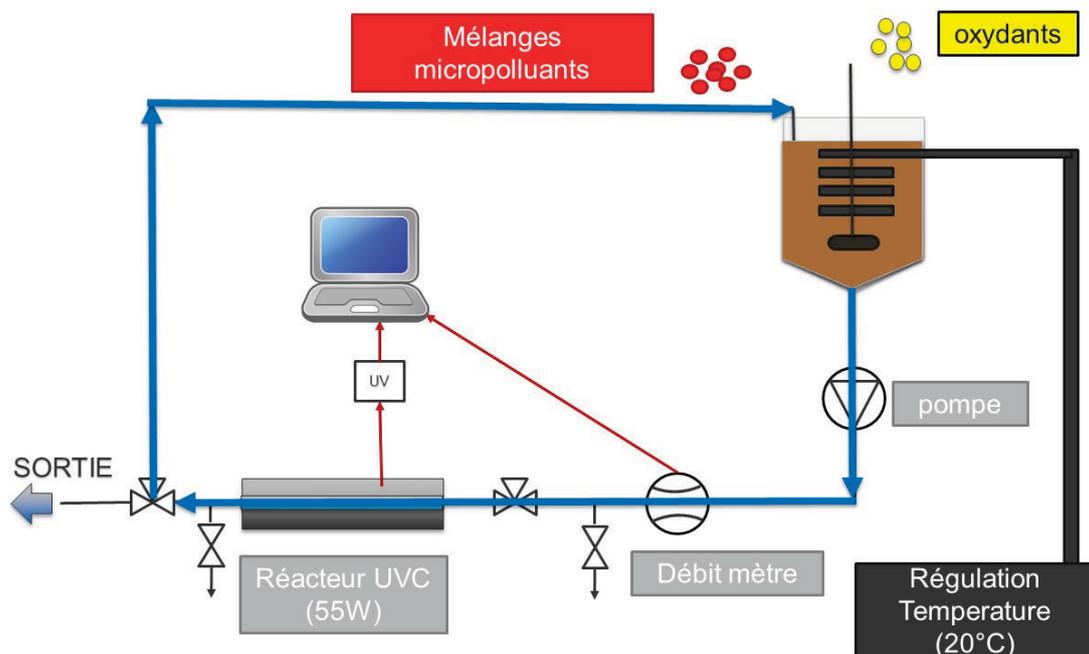
	Expérimentations préliminaires		Etude de l'abattement des micropolluants			
Mélanges de micropolluants	E1, E2, EE2		E1, E2, EE2			Diclofénac, naproxène, ibuprofène
Concentration initiale en micropolluants	5 µM pour chaque micropolluant					
Matrice	Eau réseau	ET A	ET B	ET C		ET C
Oxydant	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Persulfate	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
[Oxydant] (mg/L)	0/40/90		0/50	30	240	0/30
Test YES	non	non	oui	oui	oui	non
Test V. fisheri	non	non	oui	oui	oui	non

### II.3.1 Mode opératoire

Pour chaque expérimentation, la lampe UV est allumée 15 min avant. L'eau usée traitée est ajoutée dans la cuve et le mode by-pass est mis en route afin d'atteindre un équilibre de la température (20 °C). La *Figure II.8* montre le mode opératoire exécuté sur le pilote. Les hormones (E1, E2 et EE2) ou les produits pharmaceutiques (diclofénac, ibuprofène, naproxène) sont pré-dissous dans 10 mL d'acétonitrile (6,25 mM) qui sont ensuite ajoutés aux 50 litres d'eau de la cuve (dilution par 2500) pour atteindre une concentration finale de 5 µM pour chaque composé.

Lors de leur utilisation, les oxydants ( $H_2O_2$  ou persulfate de potassium) sont également ajoutés directement dans la cuve à la concentration souhaitée (*Tableau II.8*). L'ensemble est homogénéisé pendant 2 minutes. Lorsque tous les paramètres sont stabilisés et que les réactifs sont homogénéisés, le mode semi-continu est enclenché. A cet instant, le chronomètre est déclenché.

Pour chaque expérimentation, 6 à 7 prélèvements de 40 mL sont effectués régulièrement et analysés par HPLC-UV afin de déterminer les cinétiques d'abattement des différents polluants. Le volume prélevé suffit pour effectuer l'ensemble des analyses décrites ci-dessous. Comme lors de l'évaluation de la désinfection, du thiosulfate de sodium à 1 g/L (2 mL d'une solution à 40 g/L) est systématiquement ajouté dans tous les échantillons juste après prélèvement afin d'éliminer l'oxydant résiduel. Pour chaque échantillon, le temps de prélèvement est précisément noté. Il permet ensuite de déterminer la dose UV reçue via le logiciel UVCalc2 en fonction de la transmittance de l'eau utilisée, du débit et du volume introduit dans la cuve.



**Figure II.8:** utilisation du pilote en mode semi-continu pour l'étude des cinétiques de dégradation des différents micropolluants.

### II.3.2 Calcul des constantes de dégradation et des taux de dégradation

L'évaluation des différents traitements est tout d'abord basée sur la comparaison des constantes de dégradation qui traduisent la vitesse d'élimination des différents composés en fonction de la dose UV. A partir des concentrations initiales  $[C_0]$  et finale  $[C]$  obtenues par analyse chimique (HPLC-UV) ou biologique (YES), la droite  $\ln([C]/[C_0]) = -k (\text{Dose UV}) + b$  est tracée. Les constantes de dégradation ( $k$ ) sont alors directement obtenues à partir de cette droite.

Les taux de dégradation (Tx) à une dose donnée (généralement 1000 mJ/cm<sup>2</sup>) sont également calculés pour comparer les traitements. Ils sont obtenus à partir de l'équation [7] :

$$Tx (\%) = (1 - e^{(-k \cdot Dose\ UV)}) \cdot 100$$

Où

Tx est le taux d'abattement du polluant en %

La dose UV est la dose obtenue en fonction du temps de prélèvement et des paramètres du pilote

-k est la constant de dégradation obtenue lors des cinétiques.

## II.3.3 Méthodes d'analyse chimique

### II.3.3.1 Quantification des micropolluants par HPLC-UV

L'appareil utilisé est un UHPLC Ultimate 3000+ de Thermo Fisher équipé d'une colonne X-Bridge C18 (2,5 µm 4,6×75mm) de chez Waters. Cet appareil est utilisé en routine pour les analyses des échantillons issus du pilote après filtration (0,45 µm). Deux méthodes d'analyse par HPLC-UV ont été développées afin d'optimiser les temps de rétention (TR) ainsi que les limites de détection (LD) et quantification (LQ) : l'une cible les 3 hormones (E1, E2 et EE2) et l'autre, les 3 produits pharmaceutiques étudiés (diclofénac, ibuprofène et naproxène). Le choix d'une détection des molécules en mélange permet de se rapprocher des conditions réelles. Pour les deux méthodes, le débit de la phase mobile est réglé à 1,5 mL.min<sup>-1</sup> et l'élution est isocratique. Pour l'analyse des hormones, la phase mobile utilisée est composée de 50 % d'eau et 50 % d'acétonitrile acidifié avec 0,1 % d'HCOOH. Pour l'analyse des médicaments, la phase mobile contient 40 % d'eau, 0,04 % d'acide acétique glacial et 60 % d'acétonitrile. Ces conditions permettent d'obtenir les TR, LD et LQ présentés dans le *Tableau II.10*.

**Tableau II.10: conditions d'analyse et sensibilités atteintes pour les 2 méthodes analytiques développées.**

	Molécules	Volume injecté (µL)	λ (nm)	TR (min)	LQ (µg/L)	LD (µg/L)
Méthode 1	E1	80	200	2	25	10
	E2	80	200	1,51	25	10
	EE2	80	200	1,79	25	10
Méthode 2	Ibuprofène	40	226	2,03	43	26
	Diclofénac	40	281	1,8	26	15
	Naproxène	40	236	1,2	10	6

λ : longueur d'onde de détection ; TR : temps de rétention ; LD : limite de détection LQ : limite de quantification

### II.3.3.2 Suivi de la concentration en peroxyde d'hydrogène

La nécessité d'un test rapide pour analyser les concentrations en peroxyde d'hydrogène avant et après traitement a conduit à utiliser un test commercial plutôt qu'un dosage volumétrique. Le choix s'est porté sur le « peroxide test spectroquant® » (Merck) qui permet de déterminer des concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans la gamme 2,0 – 20,0 mg/L. Il est basé sur la formation du complexe acide pertitanique lors de la réaction d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> avec l'oxalate de potassium et de titane (C<sub>4</sub>K<sub>2</sub>O<sub>9</sub>Ti) en milieu acide. La couleur jaune du complexe formé permet un dosage par spectrophotométrie à 410 nm. L'absorbance lue (spectrophotomètre Jasco V-630-bio) est multipliée par 52,3 pour obtenir la concentration massique en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de la solution. Cette valeur correspond à la pente de la droite étalon du test. La linéarité de cette droite étalon ainsi que le coefficient utilisé ont été vérifiés par un dosage de solutions diluées dans la gamme 0-50 mg/L par la méthode au permanganate de potassium et comparé à un dosage par le test commercial. L'écart est inférieur à 5 %.

### II.3.3.3 Suivi de la concentration en persulfate

Le suivi de la concentration résiduelle en persulfate est réalisée à partir d'un test commercial (Chemetrics). En solution acide, le persulfate oxyde les ions Fe<sup>2+</sup> en ions Fe<sup>3+</sup> qui réagissent avec le thiocyanate d'ammonium. Cette réaction engendre du thiocyanate ferrique de couleur rouge/orangé, proportionnellement à la quantité initiale de persulfate. La méthode a été adaptée pour une lecture par spectrophotométrie à 500 nm. Les échantillons sont dilués de façon à être dans la gamme de mesure.

---

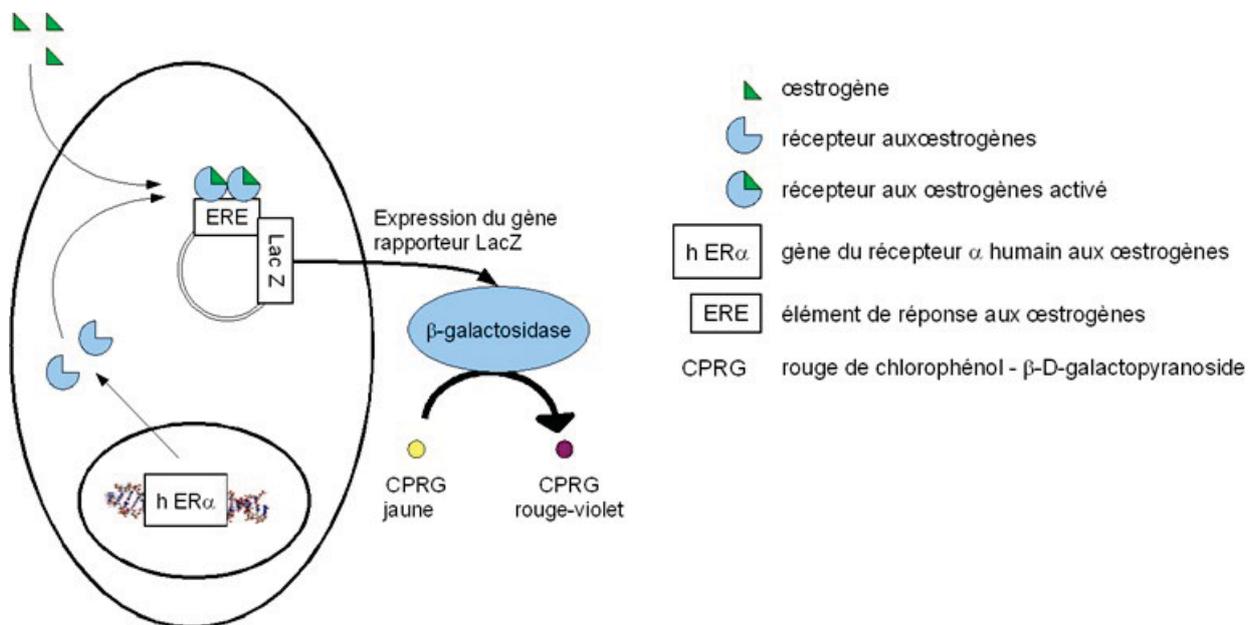
## II.3.4 Méthodes d'analyse biologique

Les analyses biologiques de cette étude reposent sur des bioessais *in vitro* dont l'objectif est d'obtenir un signal mesurable en présence de molécules estrogéniques ou hautement toxiques. Ils sont ainsi très complémentaires des analyses chimiques car ils permettent d'évaluer la capacité des différents traitements testés à abattre les activités estrogéniques ou toxiques liées aux molécules initiales à dégrader. Ces tests ont également la capacité de mettre en évidence la formation de sous-produits de dégradation qui pourraient présenter une activité estrogénique ou toxique similaire ou plus importante que celle des molécules initiales. D'autre part, la complexité chimique de l'eau de STEU implique la présence de nombreuses molécules autres que celles ciblées dans le cadre de cette étude et quantifiées par les méthodes analytiques chimiques déployées. Or, ces molécules non ciblées peuvent elles aussi présenter une activité estrogénique ou une certaine toxicité détectable par les bioessais. Le choix s'est porté sur le test Yeast Estrogen Screen (YES) (Routledge and Sumpter, 1996) pour l'évaluation de l'activité estrogénique et sur le test *Vibrio fischeri* (Olmez-Hanci *et al.*, 2014) pour celle de la toxicité aiguë, en raison de leur fiabilité et de leur capacité de réponse à un large spectre de contaminants.

## II.3.4.1 Test Yeast Estrogen Screen (YES)

### II.3.4.1.1 Généralités et préparations

Le test YES est adapté de t Routeledge et Sumpter (1996). Le principe général du test est présenté dans la *Figure II.9*. Il est réalisé à partir d'une levure (*Saccharomyces cerevisiae* dite levure du boulanger) génétiquement modifiée qui contient un gène codant pour le récepteur humain aux œstrogènes ( $\alpha$ hER) dans son génome. La levure exprime constitutivement ce récepteur ainsi qu'un plasmide portant le gène rapporteur lac-Z, lui-même sous le contrôle de l'élément de réponse aux œstrogènes ERE. Lorsqu'un composé actif œstrogénique se lie à ERE, il active la transcription du gène lac-Z qui engendre la synthèse de la  $\beta$ -galactosidase. Cette enzyme a la capacité de dégrader le Chlorophénol rouge- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG) provoquant le passage de la couleur du milieu du jaune au rouge. Ainsi, l'intensité de la coloration rouge est un indicateur de l'œstrogénicité de la solution testée. La sensibilité du test YES est variable selon les études mais les EC50 (concentrations nécessaires pour atteindre 50 % de l'activité maximale) de E2 et EE2 se situent généralement aux environs de 0,15-0,20 nM (Bistan *et al.*, 2012; Nelson *et al.*, 2007; Rutishauser *et al.*, 2004).



**Figure II.9: schéma général du fonctionnement du test YES (d'après Routledge et Sumpter, 1996).**

La souche de levure modifiée *S. cerevisiae* a été fournie par l'Université du Havre et mise en culture au sein du Laboratoire écotoxicologie (IRSTEA Lyon). Une attention particulière a été apportée à la propreté de la verrerie : un rinçage à l'acétone, puis à l'éthanol et enfin à l'eau ultra pure sont effectués lors de chaque test.

Tous les réactifs proviennent de chez Carl Roth (Allemagne). Le détail des réactifs et des solutions est présenté en ANNEXE 5. Les différents milieux de culture sont préparés puis autoclavés (milieu minimum, solution de glucose, d'acide L-aspartique, de L-thréonine) ou filtrés sur 0,2  $\mu$ m (sulfate de cuivre, CPRG). Une solution mère d'E2 à 0,85 mg/mL (3,12 mM) est préparée avant chaque test. Cette solution est diluée 25 fois en cascade soit 15625 fois pour

obtenir une concentration finale de 54,48  $\mu\text{g/L}$ . Cette solution sert à réaliser une courbe étalon qui permet de déterminer l'EC50 d'E2. Cette EC50 d'E2 est par la suite comparée aux EC50 obtenues pour chaque échantillon testé afin d'exprimer les résultats en équivalent E2.

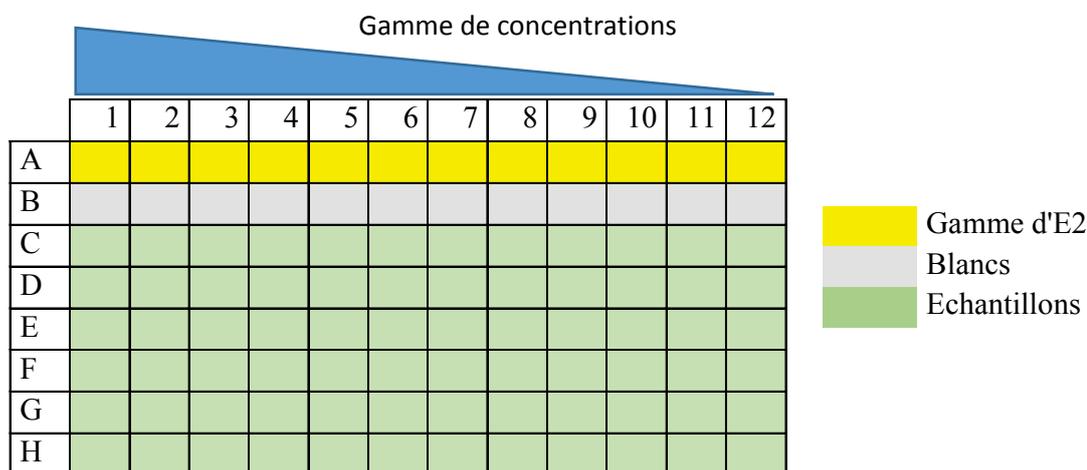
### II.3.4.1.2 Conduite du test YES

- Préparation de la pré-culture

Une pré-culture de levure est lancée 24 h avant le test. Pour cela, 150  $\mu\text{L}$  d'une solution mère de levure concentrée 10 fois (conservée à  $-20^\circ\text{C}$ ) sont ajoutés à 15 mL de milieu de culture dans un erlen de 250 mL. La culture est réalisée sous agitation à  $150 \text{ tr}\cdot\text{min}^{-1}$  et à une température de  $28^\circ\text{C}$  jusqu'à atteindre une absorbance d'environ 1 à 640 nm (après 48h au maximum).

- Déroulement du test

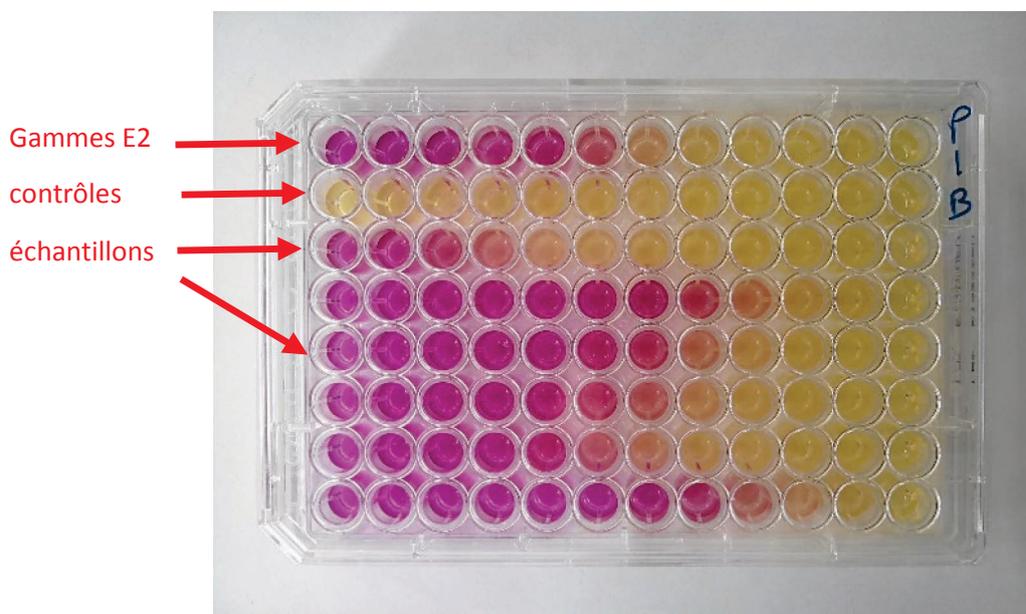
La première ligne de chaque plaque sert de contrôle positif. Elle contient la gamme de concentration en E2 s'étendant de 4,9 pM à 10 nM permettant de déterminer l'EC50 de E2 (Figure II.10). Un volume de 140  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon à analyser est transféré dans la colonne 1 d'une plaque 96 puits dans des conditions stériles (Cellstar, Greiner bio-one). Dans chaque autre puits, 70  $\mu\text{L}$  de milieu minimum sont ajoutés. Ensuite, 70  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon de la colonne 1 sont prélevés à l'aide d'une pipette multicanaux et sont injectés dans la colonne 2. Après homogénéisation, 70  $\mu\text{L}$  de chaque échantillon de la colonne 2 sont à nouveau prélevés et sont injectés dans la colonne 3. Ceci est répété pour les puits suivants afin d'obtenir pour chaque ligne une dilution en série d'un facteur 2.



**Figure II.10: plaque de dilution pour la mise en œuvre du test YES.**

A partir de la plaque de dilution, 10  $\mu\text{L}$  de chaque puits sont ensuite placés dans 2 nouvelles plaques dites d'incubation. 200  $\mu\text{L}$  de milieu de test contenant le CPRG sont alors ajoutés dans chaque puits. Un film plastique est apposé sur chaque plaque avant qu'elle ne soit placée dans l'incubateur pendant 72 à 96 h sans agitation à  $30^\circ\text{C}$ . Ce film plastique limite l'évaporation du milieu qui pourrait entraîner une surestimation de la réponse colorée. Des

contrôles négatifs sont mis en place pour chaque plaque en ligne 2 (*Figure II.11*). Ils contiennent uniquement du milieu de culture complet (levure + CPRG mais aucun autre réactif).



**Figure II.11: exemple de plaques de test YES obtenues après 96 heures d'incubation**

L'absorbance, ou Densité Optique (DO), des plaques est mesurée par un lecteur de plaques TECAN Safire à 540 nm (réponse colorimétrique rouge) et 620 nm (absorbance des levures). La valeur de DO pour un puits est donc calculée selon l'équation [7]

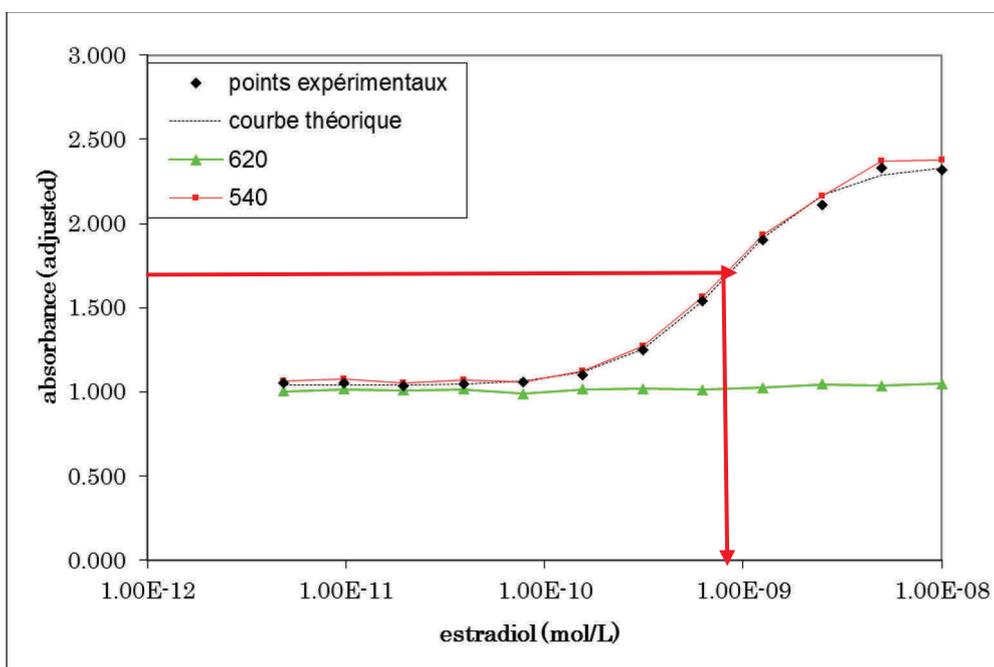
$$DO \text{ expérimentale} = DO_{540} - (DO_{620} - DO_{620 \text{ blanc}}). [7]$$

Les données sont ensuite traitées par rapport à la courbe étalon obtenue à partir de la solution d'E2 diluée. La réponse estrogénique des échantillons est exprimée en équivalent E2. Les données obtenues sont traitées par un fichier macro Excel développé par l'Université du Havre (développé par Xavier Denier doctorant au LEMA de l'Université du Havre).

#### II.3.4.2 Validation du test YES

La *Figure II.12* montre la réponse des levures à la gamme de concentrations d'E2 (témoin positif) lors du traitement des données sous le macro Excel. Pour chaque plaque, il y a une lecture à 540 nm et une lecture à 620 nm. A partir de ces jeux de données, il est possible de déterminer l'EC50 de la gamme d'E2. Les points expérimentaux sont obtenus selon l'équation [7]. Par la suite, un solveur du macro Excel permet de superposer la courbe théorique à la courbe expérimentale en faisant en sorte qu'il y ait le moins de différence possible. L'indice de qualité de la courbe (quality of curvefit) doit être inférieur à 0,4. Dans cet exemple, l'EC50 atteint  $8,30 \cdot 10^{-10}$  M.

parameters for curve fitting	A	1.040	minimum	quality of curvefit 0.1829
	B	1.676	pente	
	C	226.001	position	
	D	2.350	maximum	

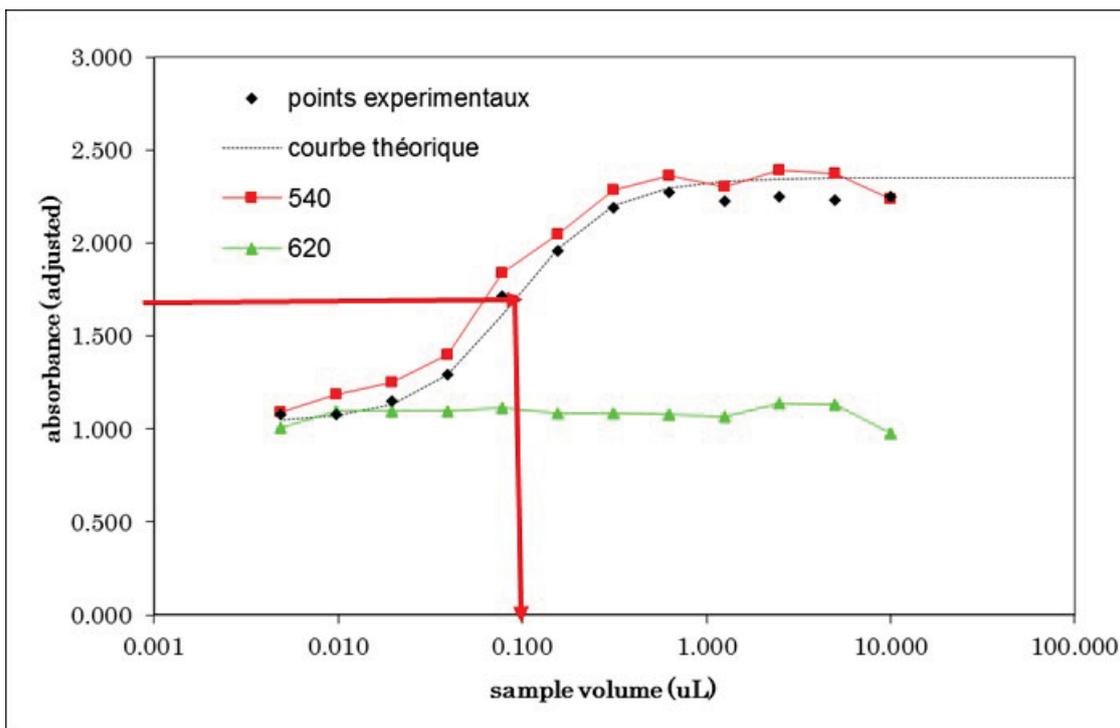


Position Sur la courbe (%)	Absorbance (ABS)	Concentration dans le puits (ng/L)	Concentration dans le puits (M)
50	1.695	226.001	$8.30E^{-10}$

**Figure II.12: exemple de courbes dose réponse obtenues par le test YES pour l'hormone E2 et paramètres calculés par le fichier macro Excel.**

Par la suite le même mode opératoire est effectué pour les différents échantillons (Figure II.13). La courbe a théoriquement le même maximum, le même minimum et la même pente que la courbe étalon d'E2. Seule sa position varie en fonction de la concentration. L'EC50 est donc obtenue à une DO de 1,695. L'EC50 de chaque échantillon peut alors être rapportée à une concentration équivalente E2 (ng d'équivalent Estradiol /  $\mu\text{L}$ ), dans cet exemple : 0,5 ng/ $\mu\text{L}$

Le test est validé lorsque l'absorbance maximale des points expérimentaux se situe aux environs de 2. Cette valeur indique que les levures ont bien réagi à la présence d'estrogènes entraînant la dégradation du CPRG. Une densité optique inférieure indique que les levures se sont faiblement développées ou qu'elles sont peu sensibles à la présence d'estrogène. La densité optique à 620 nm permet de vérifier la croissance des levures. Elle doit être proche de 1, ce qui est vérifié pour l'ensemble des puits. Une densité optique trop faible indiquerait que les levures ne se sont pas développées. Une densité optique trop élevée pourrait correspondre à une contamination bactérienne qui troublerait le milieu. L'EC50 des levures à l'E2 permet de déterminer la sensibilité du test YES.



**Figure II.13:** exemple de courbe obtenue pour un échantillon analysé par test YES. L'EC50 est obtenue pour un volume d'environ 0,091  $\mu\text{L}$  soit 0,5 ng d'équivalent E2/ $\mu\text{L}$

Afin de déterminer la reproductibilité de l'expérimentation et la sensibilité de la levure, les gammes étalons de 10 tests YES réalisés sur une année ont été analysées. Le *Tableau II.11* présente les valeurs moyennes et les écarts types obtenus sur ces 10 tests. L'EC50 calculée est de  $147 \pm 23$  ng/L ce qui correspond à environ 0,54 nM. Différentes études ont mentionné des valeurs d'EC50 comprises entre 27 et 218 ng/L (Bistan, 2011). Par comparaison, la sensibilité du test YES réalisé dans la présente étude se situe dans la fourchette basse. Cependant, elle est stable et reproductible dans le temps ce qui permet de comparer des résultats obtenus à plusieurs mois d'intervalle. Le test YES est également très fiable car aucune contamination n'a été constatée sur ces 10 tests. Une absorbance de 2 est généralement observée après 96 h d'incubation.

**Tableau II.11:** sensibilité moyenne et paramètres du test YES obtenus sur 10 expérimentations.

Absorbance à EC50	EC50	EC50	Absorbance minimum	Absorbance maximale
(ABS)	(ng/L)	(M)	(ABS)	(ABS)
$1,59 \pm 0,12$	$147 \pm 23$	$5,38 \pm 0,84 \cdot 10^{-10}$	$1,00 \pm 0,07$	$2,18 \pm 0,26$

### II.3.4.3 Test *Vibrio fisheri*

La toxicité aigüe des échantillons est déterminée par le test normalisé Microtox qui utilise la bactérie *Vibrio fischeri* (ISO 11348-3, 2007). Cette bactérie est un microorganisme marin qui émet naturellement de la lumière. Le phénomène de bioluminescence est lié au cycle énergétique de la cellule. Une inhibition de la bioluminescence peut donc être interprétée comme une perturbation du métabolisme énergétique de la bactérie. Si une substance affecte ce métabolisme, alors il engendre une inhibition proportionnelle de la luminescence qui est mesurable. Le kit commercial BioTox™ fourni par (Aboatox Oy, Finlande) a été utilisé en conformité avec la norme ISO 11348-3 (2007). L'essai consiste à reconstituer dans un milieu liquide salin une souche de bactérie lyophilisée et à l'exposer pendant 30 minutes à l'échantillon susceptible de présenter une toxicité aigüe. Après la période d'exposition, le niveau de réduction de la bioluminescence est comparé à celui des groupes témoins (matrices sans traitement). Ce test est fiable, standardisé et largement utilisé pour comparer les efficacités de traitement dans des eaux plus ou moins chargées en matière organique ou polluants (Olmez-Hanci *et al.*, 2014; Rozas *et al.*, 2016).

Après les différents traitements appliqués (UV, UV + oxydant), le pH des échantillons est ajusté à 7 si nécessaire et 2 % de NaCl (m/v) sont ajoutés. 200 µL de la suspension bactérienne sont mélangés à 200 µL d'échantillon à analyser dans une microplaque de 96 puits (Thermo Scientific Nunc®). Chaque échantillon est analysé en triplicat. La température des échantillons est maintenue à 15 °C tout au long de l'expérimentation. L'intensité maximale de lumière de chaque échantillon est mesurée lors des premières secondes de contact à l'aide d'un Luminoscan Ascent (Thermo scientific). Le signal lumineux est ensuite mesuré 30 minutes plus tard. Différents contrôles sont préparés en parallèle :

- une solution à 2 % de NaCl (filtrée à 0,22 µm) sert de contrôle négatif (aucune substance nocive);
- la matrice utilisée (eau du réseau ou eau traitée) sans aucun traitement ;
- une solution de dichromate de potassium (18,75 mg Cr<sub>VI</sub>/L) sert de contrôle positif, doit entraîner une baisse de l'intensité lumineuse de l'ordre de 50%.

Le pourcentage d'inhibition de *Vibrio fischeri* est calculé selon la formule :

$$\%INHIBITION= 100 - [100 \cdot (I_{\text{echt}=30} / KF) \cdot I_{\text{echt } t=0}]$$

Où

KF : facteur de correction,  $KF = I_{\text{NaCl } t=30} / I_{\text{NaCl } t=0}$  ;

$I_{\text{echt}30}$  : intensité lumineuse de l'échantillon mesurée après 30 minutes ;

$I_{\text{echt } t0}$  : intensité lumineuse initiale de l'échantillon ;

$I_{\text{NaCl } t30}$  : intensité lumineuse du contrôle mesurée après 30 minutes ;

$I_{\text{NaCl } t0}$  : intensité lumineuse initiale du contrôle.

L'ensemble des résultats du test *V. fischeri* est présenté sous la forme du pourcentage d'inhibition.