

(ID Modèle = 454913)

Ineris - 183506 - 2799067 - v1.0

11/06/2024

**Projet GLUCO – Caractérisation, identification et  
devenir d'une contamination par des  
glucocorticoïdes dans l'Iton et l'Eure.**

**Rapport final**

## **PRÉAMBULE**

Le présent document a été réalisé au titre de la mission d'appui aux pouvoirs publics confiée à l'Ineris, en vertu des dispositions de l'article R131-36 du Code de l'environnement.

La responsabilité de l'Ineris ne peut pas être engagée, directement ou indirectement, du fait d'inexactitudes, d'omissions ou d'erreurs ou tous faits équivalents relatifs aux informations utilisées.

L'exactitude de ce document doit être appréciée en fonction des connaissances disponibles et objectives et, le cas échéant, de la réglementation en vigueur à la date d'établissement du document. Par conséquent, l'Ineris ne peut pas être tenu responsable en raison de l'évolution de ces éléments postérieurement à cette date. La mission ne comporte aucune obligation pour l'Ineris d'actualiser ce document après cette date.

Au vu de ses missions qui lui incombent, l'Ineris, n'est pas décideur. Les avis, recommandations, préconisations ou équivalents qui seraient proposés par l'Ineris dans le cadre des missions qui lui sont confiées, ont uniquement pour objectif de conseiller le décideur dans sa prise de décision. Par conséquent, la responsabilité de l'Ineris ne peut pas se substituer à celle du décideur qui est donc notamment seul responsable des interprétations qu'il pourrait réaliser sur la base de ce document. Tout destinataire du document utilisera les résultats qui y sont inclus intégralement ou sinon de manière objective. L'utilisation du document sous forme d'extraits ou de notes de synthèse s'effectuera également sous la seule et entière responsabilité de ce destinataire. Il en est de même pour toute autre modification qui y serait apportée. L'Ineris dégage également toute responsabilité pour chaque utilisation du document en dehors de l'objet de la mission.

Nom de la Direction en charge du rapport : DIRECTION MILIEUX ET IMPACTS SUR LE VIVANT

Rédaction : AIT-AISSA Selim

Vérification : BRION FRANCOIS; BOUDET CELINE

Approbation : MORIN ANNE - le 11/06/2024

Liste des personnes ayant participé à l'étude : Hélène BUDZINSKI, Karyn LE MENACH (Université de Bordeaux, UMR-EPOC), Maxime DEBRET, Matthieu FOURNIER (Université de Rouen, UMR-M2C), Clémence CHARDON, Emmanuelle MAILLOT-MARECHAL (INERIS).

## Table des matières

1	Contexte et objectifs du projet.....	6
1.1	Biosurveillance des perturbateurs endocriniens : situation française et identification du cas particulier de l'Iton .....	6
1.2	Problématique des glucocorticoïdes (GC) dans les milieux aquatiques.....	7
1.3	Objectifs du projet GLUCO.....	8
2	Recherche de la source et identification de la contamination de l'Iton par les glucocorticoïdes.....	8
2.1	Cartographie des rivières Iton et Eure autour d'Evreux.....	8
2.2	Identification chimique des substances responsables des activités observées dans les eaux usées de la STEU.....	10
2.2.1	Criblage chimique par HR-MS.....	10
2.2.2	Analyses dirigées par les effets (EDA).....	10
2.3	Investigations dans le réseau d'assainissement .....	11
3	Surveillance (bio)analytique dans le rejet de la STEU et dans l'Iton.....	13
3.1	Activité GR.....	13
3.2	Suivi des concentrations en FP et CP .....	13
3.3	Contribution de la FP et du CP aux activités GR détectées .....	14
4	Imprégnation du milieu récepteur : suivi (bio)analytique dans les eaux souterraines et les sédiments .....	16
4.1	Eaux souterraines.....	16
4.2	Sédiments.....	17
4.2.1	Sédiments de surface .....	17
4.2.2	Analyse d'une carotte sédimentaire sur l'Eure .....	17
5	Conclusions et perspectives.....	18
6	Remerciements .....	19
7	Références bibliographiques .....	19
8	Annexes.....	22
8.1	Annexe 1. Description et coordonnées des sites de prélèvements dans le milieu.....	22
8.2	Annexe 2 : Méthodologie de la bioanalyse in vitro d'activité glucocorticoïde.....	23

### Liste des tableaux

Tableau 1. Mesures d'activité GR (Dex-EQ) et concentrations en FP et CP dans le réseau d'assainissement des eaux usées (EU) et pluviales (EP) de l'agglomération d'Evreux.....	12
Tableau 2. Concentrations en fluticasone propionate (FP) et clobetasol propionate (CP) mesurées par analyses chimiques et activité glucocorticoïde (Dex-EQ <sub>Bio</sub> ) dans des échantillons d'eaux de captage en eau potable (ECEP) et d'eaux souterraines (ESOUT) prélevées en amont et en aval d'Evreux .....	16
Tableau 3. Activité GR (Dex-EQ <sub>Bio</sub> ) et concentration en FP et en PC dans des prélèvements de sédiments de surface dans l'Iton et dans l'Eure.....	17

### Liste des Figures

Figure 1. Activité in vitro médiée par le récepteur des glucocorticoïdes (GR) dans des eaux de surfaces françaises (18 sites rivière et 2 sites côtiers échantillonnés en 2018).....	7
Figure 2. Mesure des activités glucocorticoïdes (en ng Dex-Eq/L) le long de l'Iton et de l'Eure et dans les eaux résiduaires à Evreux. ....	9
Figure 3. Profils d'activité GR des eaux d'entrée et de sortie de la STEU après fractionnement par RP-HPLC et test de l'activité biologique des fractions.....	11

Figure 4. Activité glucocorticoïde mesurée dans la phase dissoute du rejet de la STEU et dans l'Iton, en aval proche et lointain du rejet, entre septembre 2019 et mars 2023. ....	13
Figure 5. Concentrations en fluticasone propionate (FP) dans la phase dissoute des eaux d'entrée et de sortie du CTEU à Gravigny et dans l'Iton, en aval proche et lointain du rejet, entre mars 2020 et février 2023.....	14
Figure 6. Concentrations en clobetasol propionate (CP) dans la phase dissoute des eaux d'entrée et de sortie de STEU à Gravigny et dans l'Iton, en aval proche et lointain du rejet, entre mars 2020 et février 2023.....	14
Figure 7. Corrélation entre les analyses chimiques de la FP et du CP (exprimées en Dex-EQ <sub>Chem</sub> ) et l'activité GR mesurée par le bioessai MDA-kb2 (exprimée en Dex-EQ <sub>Bio</sub> ).....	15

## Résumé

En 2018, une campagne nationale de surveillance de la contamination des eaux de surface à l'aide d'une batterie de bioessais *in vitro* a pointé la présence d'une forte activité impliquant le récepteur des glucocorticoïdes (GR) dans l'Iton à l'aval d'Evreux, suggérant la présence de substances actives dans cette rivière. Le projet GLUCO a été initié en septembre 2019 dans le but 1) de caractériser cette contamination d'un point de vue chimique, 2) d'en identifier la(les) source(s), et 3) d'évaluer l'imprégnation du milieu récepteur et de la ressource en eau en aval. A l'aide d'une approche de criblage chimique et d'analyses dirigées par les effets (EDA), la fluticasone propionate (FP) et, dans une moindre mesure le clobétasol propionate (CP), ont été identifiés comme contributeurs principaux de l'activité GR rejetée dans l'Iton, principalement via les eaux usées mais également, dans une moindre mesure, via les eaux pluviales. Des investigations menées dans le réseau d'assainissement des eaux usées et pluviales et dans l'Iton, ont permis d'identifier le rejet d'un site industriel pharmaceutique comme étant la source principale de la FP retrouvée dans le milieu, alors que les rejets issus des activités humaines sur le territoire urbain seraient plus probablement la source du CP. Un suivi temporel mené entre 2020 et 2023 en aval du rejet de la STEU qui traite les eaux usées du territoire a montré une diminution, reflétant probablement les mesures de réduction de rejet prises par l'industriel en 2019, puis une stabilisation de la contamination dans le milieu. Les niveaux de concentrations en activité GR (70-340 ng Dex-Eq/L) et en FP (0,6-7 ng/L) dans l'Iton en aval du rejet urbain restent toutefois significatifs au regard de ce qui est rapporté dans la littérature scientifique pour ces deux paramètres. En termes d'impact sur la ressource en eau, une faible imprégnation de la nappe phréatique est notée, des niveaux traces de FP (<1 ng/L) étant néanmoins détectés en période de hautes eaux uniquement à la station de Normanville. Les analyses de sédiments montrent que la FP est également présente dans le sédiment en aval proche (jusqu'à 3 km) des rejets (pluvial et STEU), montrant la capacité de cette molécule à s'adsorber aux particules. Des travaux complémentaires sont en cours pour évaluer les effets, notamment endocriniens, de ces molécules sur les organismes aquatiques et pouvoir ainsi statuer sur le risque pour l'environnement associé à ces concentrations.

### Pour citer ce document, utilisez le lien ci-après :

Institut national de l'environnement industriel et des risques, , Verneuil-en-Halatte : Ineris - 183506 - v1.0, 11/06/2024.

### Mots-clés :

Bioanalyse, glucocorticoïdes, activité endocrinienne, biosurveillance, rejet industriel

# 1 Contexte et objectifs du projet

## 1.1 Biosurveillance des perturbateurs endocriniens : situation française et identification du cas particulier de l'Iton

Dans la surveillance réglementaire telle que décrite par la Directive Cadre européenne sur l'Eau (DCE 2000/60/CE), l'évaluation de la qualité chimique des masses d'eau repose sur l'analyse d'une liste finie de substances prioritaires pour lesquelles des normes de qualité environnementale (NQE) ont été établies. Si les analyses chimiques ciblées sont indispensables pour détecter et quantifier les polluants prioritaires, elles ne fournissent qu'une vision très partielle de la contamination réelle et du danger (éco)toxique associé puisqu'elles ne prennent pas en compte les effets de nombreuses substances non réglementées, ni les effets de mélange. Dans ce contexte, l'utilisation de méthodes bio-analytiques de détection des contaminants basée sur le mode d'action des polluants est actuellement identifiée comme une approche complémentaire à la chimie ciblée pour caractériser les contaminations chimiques des milieux<sup>1</sup>.

Parmi les outils existants, les outils bio-analytiques basés sur le mécanisme d'action des substances à activité endocrinienne (i.e. composés capables d'interférer avec les récepteurs des hormones), permettent une détection sensible et spécifique d'activités biologiques associées à la présence de substances ayant un même mode d'action. La quantification de ces activités en concentrations d'équivalents-bioanalytiques (BEQ) renseigne de l'ensemble des polluants actifs (ou mélange de polluants) présents, venant ainsi compléter le diagnostic effectué sur la base d'analyses chimiques ciblant des polluants prioritaires. De nombreux travaux ont démontré la pertinence de ces outils pour la détection de substances actives dans différentes matrices environnementales complexes (Kinani et al 2010, Aït-Aïssa et al 2015a, Creusot et al 2014, Neale et al 2015, Sonavane et al 2018,) ainsi que leur performance dans une démarche d'analyse environnementale par comparaison aux analyses chimiques (Aït-Aïssa et al 2015b, Kunz et al 2017, Könneman et al 2018, Simon et al 2023).

L'application à large échelle de ces outils dans une démarche de criblage vise à renseigner de l'état de contamination des masses d'eaux par ces composés et à identifier des sites particulièrement à risque sur lesquels une investigation plus poussée serait nécessaire. Dans le cadre du Réseau de Surveillance Prospective piloté par la direction de l'Eau et de la Biodiversité et l'OFB (Staub et al. 2019) et du programme scientifique d'AQUAREF, l'application d'une batterie de bioessais *in vitro* ciblant différents modes d'action endocriniens a permis de dresser des profils d'activités endocriniennes dans 20 sites d'eaux de surface françaises (Aït-Aïssa et al 2020). Un des résultats notables de cette étude concernait **la présence d'une forte activité impliquant une activation du récepteur des glucocorticoïdes (GR) dans la rivière Iton au site de Normanville**, à un niveau particulièrement important au regard de ceux observés dans les autres sites français (Figure 1). D'une manière plus générale, il est noté qu'une activité GR n'est détectée que sur 5 autres sites de rivière, tous soumis à de fortes pressions anthropiques (contextes urbains et/ou mixtes essentiellement) et présentant des profils multi-contaminés tant en termes de réponses de bioessais qu'en analyses chimiques. Enfin, sur les 14 autres sites investigués, incluant les trois sites de référence considérés peu impactés, l'activité GR n'est pas détectée dans les échantillons (<10 ng Dex-Eq/L). Dans l'ensemble, ces résultats pointent clairement **le site de prélèvement sur l'Iton comme un site où une contamination par les GC importante et spécifique est présente**.

En complément des travaux menés dans le cadre du RSP, une étude locale menée en 2017 et 2018 sur l'Eure (projet AESN-Martox)<sup>2</sup>, à **différents sites situés de 10 à 30 km en aval de la confluence entre l'Iton et l'Eure, a également montré la présence d'une activité GR significative (100-200 ng Dex-Eq/L) dans l'eau de la rivière**.

---

<sup>1</sup> Note Ineris : « Place des méthodes bio-analytiques dans la directive-cadre européenne sur l'eau (DCE) » <https://www.ineris.fr/fr/note-place-methodes-bio-analytiques-directive-cadre-europeenne-eau-dce>

<sup>2</sup> Palos Ladeira et al. 2022 « Projet MarTox : Impacts toxicologiques et écotoxicologiques liés à la destruction du barrage de Martot ». Rapport Final.

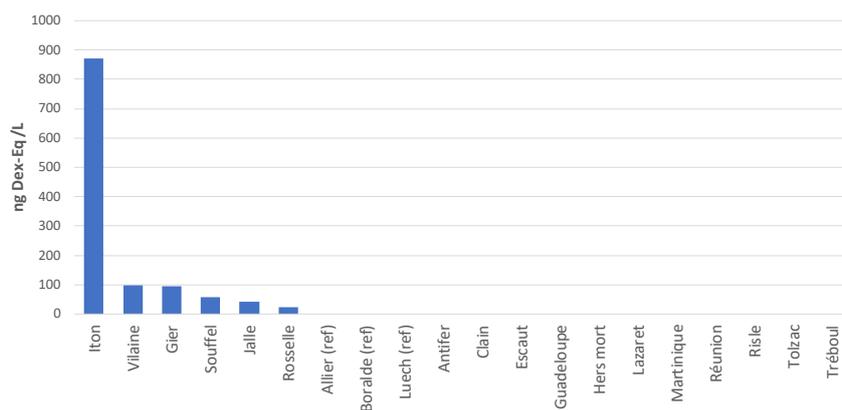


Figure 1. Activité *in vitro* médiée par le récepteur des glucocorticoïdes (GR) dans des eaux de surfaces françaises (18 sites rivière et 2 sites côtiers échantillonnés en 2018).

Les résultats sont exprimés en ng de dexaméthasone-équivalents par litre (ng Dex-Eq/L). Données issues de l'étude de démonstration nationale menée dans le cadre du réseau de Surveillance Prospective et du programme scientifique d'AQUAREF (Aït-Aïssa et al 2020).

## 1.2 Problématique des glucocorticoïdes (GC) dans les milieux aquatiques

Les glucocorticoïdes (GC) constituent un groupe d'hormones stéroïdiennes ayant un rôle central dans de nombreux processus physiologiques comme l'immunité, le développement ou l'inflammation. Ils exercent leur activité biologique au niveau cellulaire en se fixant au récepteur des glucocorticoïdes (GR) et en induisant l'activation de gènes spécifiques régulés par ce récepteur. En médecine humaine et vétérinaire, les GC synthétiques sont très largement utilisés dans le traitement anti-inflammatoire de nombreuses pathologies telles que l'arthrite, l'asthme, l'eczéma ou plus récemment la Covid-19. L'efficacité des GC à contrer les désordres inflammatoires dans de nombreuses pathologies vient de la capacité du GR à intervenir dans de multiples voies de signal (effets pléiotropes). Toutefois, ce caractère pléiotrope du GR peut également avoir des conséquences néfastes sur des processus physiologiques tels que des retards de croissance chez les enfants, une immunosuppression, de l'hypertension ou des perturbations métaboliques (Rhen et al 2005) et, de ce fait, un traitement prolongé aux GC est contre-indiqué.

La grande majorité des GC utilisés comme médicaments sont des molécules synthétiques conçues à la fois pour leur forte affinité pour le GR et pour être plus stables dans le corps humain que l'hydrocortisone, l'hormone naturelle. Leurs multiples usages font que ces molécules sont retrouvées dans les eaux usées urbaines (Schriks et al 2010, Sonavane et al 2018, Weizel et al 2020), issues d'industries pharmaceutiques (van der Linden et al 2008, Creusot et al 2014) et hospitalières (Macikova et al 2014, van der Linden et al 2008) et aboutissent dans les stations d'épuration où certaines sont peu efficacement dégradées par les traitements conventionnels (Weizel et al 2020). C'est le cas par exemple des dérivés halogénés avec chaîne latérale modifiée (e.g. triamcinolone acetonide, clobetasol propionate, betamethasone dipropionate, fluticasone propionate). In fine, ces molécules persistent dans le milieu naturel et peuvent poser un risque pour les écosystèmes. Des études récentes menées au laboratoire sur des poissons modèles ont montré que les GC synthétiques peuvent affecter différents processus physiologiques régulés par ces hormones, comme le développement, le système immunitaire ou la reproduction (Willi et al 2018, Zhang et al 2019).

D'une manière générale, les informations disponibles sur l'occurrence des GC dans les milieux aquatiques sont très récentes et encore très parcellaires. En effet, l'analyse de ces composés à des niveaux traces fait appel à l'utilisation de techniques de pointe (e.g. spectrométrie de masse haute résolution), peu disponibles en analyses de routine. De plus, l'approche analytique par substances se limite aux substances que l'on cible a priori, sans prendre en compte leurs métabolites ou d'autres molécules inconnues non ciblées. Si le développement récent d'outils bio-analytiques dédiés à cette famille de composés a stimulé la recherche de ces composés dans les eaux, établir le lien entre activité GR et identification des substances responsables de ces activités reste un enjeu.

Au bilan, il existe un besoin d'améliorer nos connaissances scientifiques tant en termes d'occurrence environnementale et d'identification des substances en cause afin pouvoir le cas échéant en réduire les émissions, que dans la compréhension des risques associés à leur présence dans l'environnement.

## 1.3 Objectifs du projet GLUCO

Les données de biosurveillance acquises en 2018 ont montré la présence d'une activité glucocorticoïde exceptionnellement élevée de l'Iton et dans une moindre mesure de l'Eure, suggérant la présence dans le milieu de substances actives sur le GR, très probablement des GC d'origine pharmaceutique. Celles-ci peuvent avoir plusieurs origines : humaine (rejets domestiques), hospitalière ou encore industrielle (Weizel et al 2020). Le site de l'Iton à Normanville se situe 3 km en aval de l'agglomération d'Evreux (85 000 habitants), territoire incluant plusieurs zones d'activités dont une industrie pharmaceutique de production de médicaments destinés au traitement de l'asthme. Plusieurs centres de soins dont un centre hospitalier régional sont également présents sur ce territoire et contributeurs potentiels de la pollution.

En février 2019, les gestionnaires et les pouvoirs publics locaux (Agence de l'Eau Seine Normandie, DREAL Eure, OFB, ARS) ont été informés de cette situation et alertés sur la nécessité d'identifier la(les) source(s) de cette contamination et le risque associé. Au regard des enjeux environnementaux et sanitaires, il a été identifié le **besoin 1) de caractériser cette contamination d'un point de vue chimique, 2) d'en identifier la(les) source(s), et 3) d'évaluer l'imprégnation du milieu récepteur et de la ressource en eau potable.**

Pour mener à bien ces objectifs, le projet GLUCO a été initié en septembre 2019 avec le soutien de l'Agence de l'Eau Seine Normandie et cofinancé par le programme d'appui aux politiques publiques de l'Ineris (P181, action MIV34). Il est mené en partenariat avec l'UMR-EPOC de l'université de Bordeaux (pour le volet chimie analytique) et l'UMR-M2C de l'université de Rouen (pour le volet investigations dans les eaux souterraines et les sédiments).

## 2 Recherche de la source et identification de la contamination de l'Iton par les glucocorticoïdes

### 2.1 Cartographie des rivières Iton et Eure autour d'Evreux

En septembre 2019, une cartographie des rivières Iton et Eure a été établie dans le but d'identifier la (les) point(s) de rejet de la pollution dans le milieu. Partant de l'hypothèse que la source principale se situait sur l'Iton à Evreux et pouvait provenir d'un des deux hôpitaux de la ville et/ou d'une industrie pharmaceutique manufacturant ce type de médicaments, un plan d'échantillonnage a été mis en œuvre visant à encadrer les principaux rejets d'eaux usées (Centre de Traitement des Eaux Urbaines - STEU – à Gragny) et d'eaux pluviales connectées à la zone industrielle où se situe le site industriel pharmaceutique (Figure 2). Treize points ont ainsi été échantillonnés le long de l'Iton et de l'Eure, incluant :

- un site de référence sur l'Iton en amont d'Evreux (site 1) ;
- un site en aval direct du rejet hospitalier de la Musse (site 2) ;
- un site en aval direct d'un exutoire d'eaux pluviales (site 4) en aval d'un collecteur d'eaux pluviales de la zone industrielle de la Madeleine (site 3) ;
- différents sites en aval proche à lointain (sites 8, 9, 10, 12 et 13) du rejet de la STEU qui traite les eaux usées urbaines et industrielles de toute l'agglomération d'Evreux ;
- un site de rivière sur l'Eure en amont de la confluence (site 11) ;
- de l'eau d'entrée et de sortie de la STEU d'Evreux (sites 6 et 7).

Les coordonnées précises des sites d'échantillonnage sont indiquées en Annexe 1.

Les différentes étapes d'échantillonnage, de traitement des échantillons et de bioanalyse de l'activité GR sont décrites en Annexe 2.

La représentation spatiale et les résultats d'activité GR obtenus sur chaque site sont présentés dans la Figure 2.

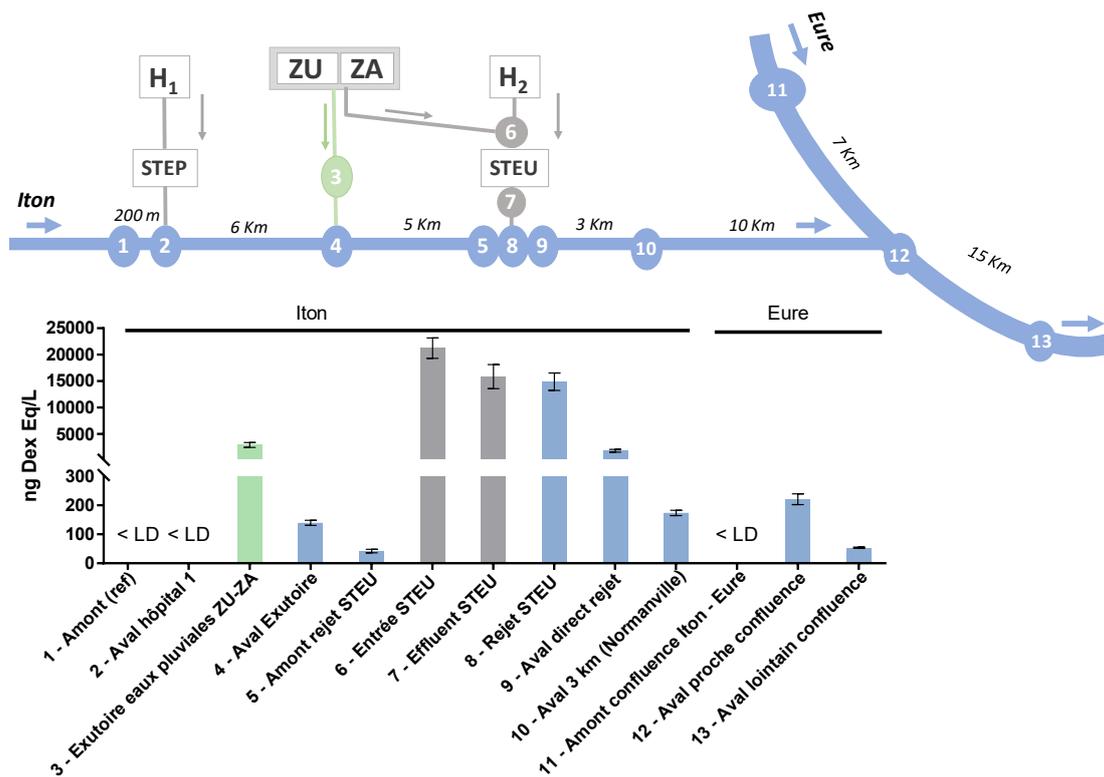


Figure 2. Mesure des activités glucocorticoïdes (en ng Dex-Eq/L) le long de l'Iton et de l'Eure et dans les eaux résiduelles à Evreux.

Prélèvements ponctuels d'eaux de rivière (bleu), d'eaux usées (gris) et d'eau pluviale (vert) réalisés le 25/09/2019. L'activité est mesurée dans la fraction dissoute uniquement (matières en suspension non prises en compte). H : hôpital, ZU : zone urbaine, ZA : zone d'activités intégrant une industrie pharmaceutique, STEP : station d'épuration ; STEU : station de traitement des eaux usées urbaines ; LD = limite de détection (10 ng Dex-Eq/L).

Cette première campagne a permis d'identifier **deux points de rejet de la contamination des glucocorticoïdes dans l'Iton : le rejet de la STEU (site 8) qui collecte l'ensemble des eaux usées du territoire d'Evreux et, dans une mesure moindre, l'exutoire des eaux pluviales dont celles de la zone industrielle, à Bois Jollet (site 3)**. Il n'y a pas d'activité détectée dans l'Iton en amont d'Evreux (sites 1 et 2), le rejet de l'hôpital de la Musse (site 2) n'étant donc pas identifié comme une source significative de glucocorticoïdes dans le milieu.

Les activités les plus fortes sont mesurées dans le rejet de l'effluent de la station d'épuration des eaux usées urbaines (STEU) de la ville d'Evreux (sites 6, 7 et 8). Cette station collecte les eaux usées domestiques mais également celles issues de zones industrielles, dont fait partie l'industrie pharmaceutique identifiée, ainsi que le rejet de l'hôpital régional. La comparaison des niveaux d'activité GR mesurés en entrée (23 µg Dex-Eq/L) et en sortie (16 µg Dex-Eq/L) de STEU montrent que les composés en cause ne sont que partiellement retenus ou dégradés par le traitement.

En aval de ce rejet, on note clairement un gradient décroissant de contamination qui persiste dans l'Eure près de 30 km en aval du rejet (site 13). L'absence de contamination en amont de la confluence entre l'Iton et l'Eure (site 11) confirme que **la source principale est bien localisée uniquement sur l'Iton et que la contamination observée sur l'Eure est très probablement issue de cette même source**.

Le second rejet identifié (site 3) correspond à l'exutoire d'eaux pluviales de Bois Jollet qui est raccordé au réseau collecteur de la zone industrielle sur laquelle se situe le site industriel pharmaceutique. La présence d'activité GR sur ce site pose la question de la contamination des eaux pluviales par des eaux résiduelles provenant de la zone industrielle et/ou urbaine. La présence d'un déversoir d'orage en aval de zone industrielle pourrait être à l'origine de la contamination observée à l'exutoire.

## 2.2 Identification chimique des substances responsables des activités observées dans les eaux usées de la STEU

Un des objectifs du projet est d'identifier la(les) molécule(s) responsable(s) des activités GR détectées. Deux approches méthodologiques complémentaires ont été mises en œuvre, par criblage chimique et par analyses dirigées par les effets (EDA).

### 2.2.1 Criblage chimique par HR-MS

Une approche analytique non quantitative, basée sur différentes techniques complémentaires de criblage chimique et d'identification structurale par spectrométrie masse en haute résolution, a d'abord été mise en œuvre au LPTC. Elle a permis de cibler une liste de 30 molécules glucocorticoïdes en mode analyse de suspects, appliquée aux échantillons (extraits organiques) prélevés aux sites 1 (site amont non actif), 3 (exutoire eaux pluviales), 8 (rejet de la STEU) et 10 (site aval à Normanville) en septembre 2019.

Cette démarche a abouti à l'identification **formelle de fluticasone propionate (FP)**, molécule produite par l'industriel, dans les échantillons des sites 3, 8 et 10 mais pas au site 1. De plus, la présence de 3 entités qui pourraient correspondre à d'autres glucocorticoïdes (fludrocortisone, clobétasol, chloroprednisone acétate) est rapportée, mais avec un degré de confiance moindre en termes d'identification chimique.

### 2.2.2 Analyses dirigées par les effets (EDA)

Pour aller plus loin dans la caractérisation chimique de cet échantillon et faire le lien avec les bioessais, une seconde approche dite EDA (Effect-Directed Analysis) a été mise en œuvre (Creusot et al 2013). L'EDA consiste à fractionner l'échantillon de départ par une méthode HPLC préparative (un échantillon fractionné en 96 fractions en fonction de la polarité des substances du mélange) et à tester l'activité GR de chaque fraction individuelle. Ceci afin d'isoler la(les) différente(s) molécule(s) active(s) et ainsi faciliter leur identification chimique.

Nous avons appliqué cette approche aux échantillons d'entrée et de sortie de la STEU prélevés en septembre 2019. Le résultat présenté dans la Figure 3 montre des profils d'activité GR très particuliers : en entrée de traitement, une fraction majoritaire (F60) et trois autres moins actives (F58, F59 et F61) sont détectés. En sortie de STEU, la fraction 60 reste présente et trois autres pics apparaissent (F59, F62 et F63).

L'analyse par spectrométrie de masse en haute résolution (LC-Q-TOF) de ces 4 fractions actives a permis d'identifier :

- Dans la fraction 60, la plus active en entrée, **la fluticasone propionate, ce qui confirme cette molécule** comme un contributeur majeur de l'activité GR,
- Dans la fraction 59, la présence de **clobétasol propionate (CP)**
- Dans les fractions 62 et 63, la présence de deux autres structures (i.e. **dihydrofluticasone propionate** et **tétrahydrofluticasone propionate**, respectivement) apparentées à la fluticasone propionate et identifiées d'après la littérature comme de possibles métabolites de cette dernière (Weizel et al 2018). Toutefois, l'identification définitive de ce deux molécules n'a pu être confirmée en l'absence de standard analytique disponible commercialement.

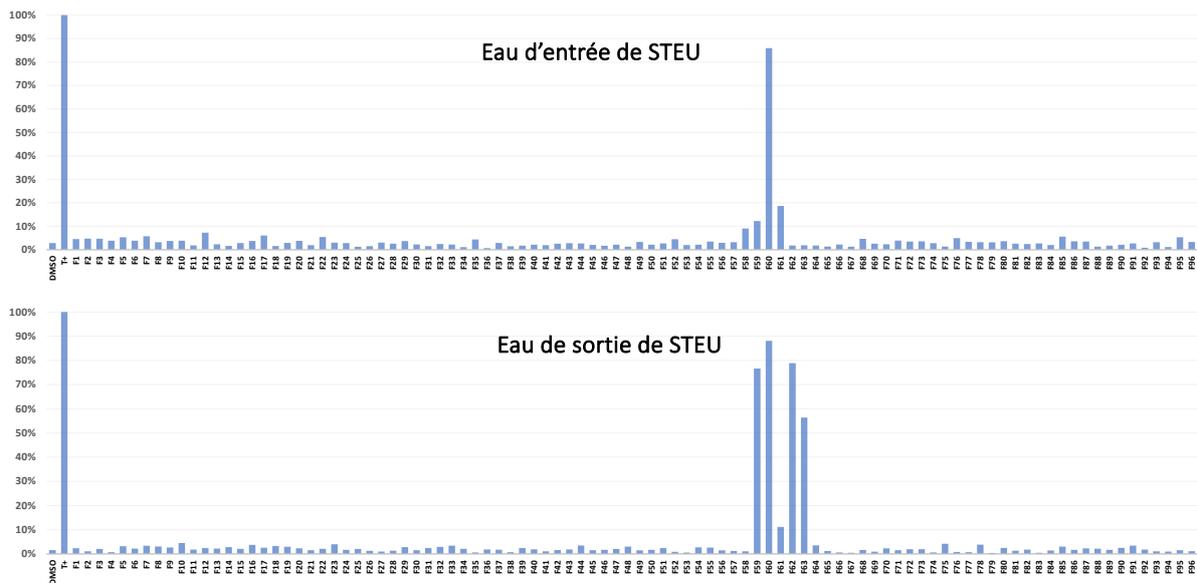


Figure 3. Profils d'activité GR des eaux d'entrée et de sortie de la STEU après fractionnement par RP-HPLC et test de l'activité biologique des fractions.

DMSO = témoin négatif (DMSO 0,5% v/v) ; T+ = témoin positif (dexaméthasone 0,1 µM) ; F1...n = numéro de fractions.

Des données issues du projet ANSES-INDEE (2019-2024) coordonné par l'Ineris montrent que la FP et le CP sont également détectés en sortie d'autres STEU urbaines (3 autres sites investigués) mais avec des profils de concentrations différents. Le CP y est systématiquement présent à des niveaux équivalents à ceux mesurés dans la présente étude. Le CP est un corticoïde topique très largement utilisé dans le traitement des affections de peau comme le psoriasis et sa présence est donc très certainement d'origine domestique. En revanche, la FP est environ 100 fois plus abondante sur le site d'Evreux par rapport aux autres sites, très probablement du fait de l'activité de l'usine présente sur le territoire.

Au bilan, ces résultats montrent que la **FP est un contributeur majeur de l'activité GR détectée dans les eaux usées à Evreux en 2019, mais que d'autres glucocorticoïdes, dont le CP, peuvent également contribuer aux activités mesurées dans le rejet urbain.**

Sur la base de ces résultats, une **méthode d'analyse quantitative de la fluticasone propionate et du clobétasol propionate a été développée** par le partenaire LPTC et appliquée aux différents échantillons collectés et analysés dans la suite du projet.

## 2.3 Investigations dans le réseau d'assainissement

Pour investiguer plus avant l'origine de la contamination au sein du réseau d'assainissement de l'agglomération d'Evreux, des prélèvements au niveau des diverses branches du réseau (eaux usées et pluviales représentatives des zones industrielle, d'habitations, de l'hôpital...) ont été réalisés. Le choix des sites de ces prélèvements et leur réalisation ont été possibles grâce à la collaboration active des services techniques d'Evreux Portes de Normandie (EPN).

Les différents points de prélèvement sont localisés :

- en aval direct de l'usine, dans le réseau des eaux usées (2 points) et pluviales (2 points) ;
- en aval de l'hôpital régional (1 point) ;
- au niveau des quatre branches majeures du réseau qui drainent l'ensemble du territoire communal (4 points identifiés n°3 à n°6).

Les résultats d'analyse de l'activité GR, de la FP et du CP sont reportés dans le Tableau 1.

Tableau 1. Mesures d'activité GR (Dex-EQ) et concentrations en FP et CP dans le réseau d'assainissement des eaux usées (EU) et pluviales (EP) de l'agglomération d'Evreux.

Type d'eau – Site ID	Localisation du site	Date prélèvement	Dex-EQ (µg/L)	CP (ng/L)	FP (ng/L)
EU - Aval usine (<100 m)	Intersection rue Euler avec Chemin Potier	04/11/2020	88	<11	4915
EU - Aval usine (~1 km)	Intersection rue Politzer avec Boulevard des Cités Unies (by-pass)	04/11/2020	24	<13	1008
EP - Exutoire Bois Jollet 1	Allée du Bel Ebat, Boulevard de la Buffardière (prélèvement dans le réservoir ~200 m avant l'exutoire dans l'Iton)	04/11/2020	1	6	26
EP - Exutoire Bois Jollet 2	Allée du Bel Ebat, Boulevard de la Buffardière (prélèvement dans le réservoir ~100 m avant l'exutoire dans l'Iton)	04/11/2020	4	19	38
EU - Aval Hôpital	Rue du Valême	04/11/2020	Toxicité	<49	<20
EU - Point de prélèvement n°3	Bas de la rue Lepouze	26/11/2020	<0,5	<42	<70
EU - Point de prélèvement n°4	Rue Georges Bernard	26/11/2020	<0,7	<61	<102
EU - Point de prélèvement n°5	Rue du Maréchal Joffre (collecte les EU de la zone industrielle)	26/11/2020 28/06/2021	<0,3 10	<33 <9	<55 134
EU - Point de prélèvement n°6	Rue de la Rochette	26/11/2020 28/06/2021	10 24	<31 <7	192 377

\*une toxicité de l'échantillon, causant une mortalité cellulaire, n'a pas permis de mesurer d'activité GR dans le bioessai

Globalement, une forte activité GR est retrouvée à certains sites du réseau d'assainissement des eaux usées et cette activité est principalement expliquée par la présence de la FP dont les concentrations les plus fortes sont mesurées en aval direct du site de l'usine.

**Ces résultats confirment que le rejet du site industriel est la principale source d'activité GR, retrouvée dans le réseau d'eaux usées en aval, avec un gradient décroissant, ainsi que dans le réservoir d'eaux pluviales à Bois Jollet.** Un transfert des eaux usées vers le pluvial, visible au niveau du déversoir d'orage situé à l'intersection de la rue Politzer et du boulevard des Nations Unies (prélèvement effectué par temps sec), explique l'activité GR retrouvée en aval dans le réservoir à Bois Jollet.

Les points de prélèvements n°3, 4, 5 et 6 correspondent aux 4 branches principales du réseau. Une activité GR est retrouvée dans les artères principales au niveau des points de prélèvements n°5 et 6, expliquée par la présence de FP. D'après EPN, la branche correspondant au point n°5 est celle qui collecte la zone industrielle de l'usine ; il est alors surprenant de constater une absence d'activité à ce site en 2020 et une forte présence au point n°6. Pour confirmer ce résultat, un second prélèvement a été effectué en juin 2021, lequel a montré cette fois une forte activité, associée à la présence de FP, aux points 5 et 6. La détection d'activité GR et de FP au point n°6 laisse à penser que cette branche du réseau recueillerait également des eaux de rejet de l'usine.

Il est intéressant de noter que le CP, qui est *a priori* plutôt un marqueur d'eaux usées domestiques, n'est retrouvé que dans le réseau pluvial à Bois Jollet. Cela peut s'expliquer par l'influence des eaux usées du quartier de la Madeleine qui viennent alimenter le réseau pluvial au niveau du déversoir d'orage. Dans le réservoir, il y a une clarification (décantation) de l'eau qui réduit les effets de matrices et permet une quantification de plus faibles niveaux de CP. Le fait que le CP ne soit détecté uniquement après traitement en STEU et dans le milieu (cf chapitre suivant) suggère qu'il est présent dans les eaux usées sous forme complexée.

La bioanalyse de l'eau usée en provenance de l'hôpital a montré une forte toxicité dans le bioessai qui masquerait la présence éventuelle de glucocorticoïdes actifs. L'analyse de FP et de CP ne montre cependant pas de niveaux détectables pour ces deux molécules dans cet échantillon.

Au bilan, ces résultats montrent que le **site de l'usine est la source principale de FP dans le réseau.** Concernant le CP, il n'est pas ou très peu détecté dans le réseau, probablement du fait d'une forme complexée de cette molécule. Si l'étude ne permet pas de conclure sur son origine, elle est très probablement domestique.

### 3 Surveillance (bio)analytique dans le rejet de la STEU et dans l'Iton

Suite aux premiers résultats acquis en 2018-2019, la DREAL a demandé à l'industriel de réduire la charge en GC de son rejet. Des actions de réduction du rejet ont été mises en œuvre par l'industriel courant 2019, conduisant à réduire de 70% la quantité de FP rejetée en août 2019 puis de 85% en décembre 2019 (informations communiquées par la DREAL). Pour évaluer l'impact de ces actions sur la qualité du rejet et du milieu récepteur, un suivi de l'activité GR et des concentrations en FP et CP a été mené par différentes campagnes de prélèvements réalisées entre mars 2020 et mars 2023.

#### 3.1 Activité GR

La Figure 4 reporte le suivi d'activité GR dans les eaux usées (entrée et sortie du CTEU) et dans la rivière Iton en aval proche (~100 m) et lointain (Iton à Normanville) du rejet au cours des trois dernières années. On observe une diminution des niveaux de contamination dans l'Iton par rapport au niveau important mesuré en 2018 (800 ng Dex-EQ/L en avril 2018 à Normanville) ainsi qu'en sortie de STEU entre septembre 2019 et mars 2020 (pas de données en 2018 dans le rejet). Cette diminution initiale pourrait refléter les actions de réduction de rejet opérées par l'industriel. Toutefois, l'activité GR reste par la suite relativement stable et systématiquement quantifiée dans le rejet de la STEU (1290-4900 ng Dex-Eq/L) et dans l'Iton en aval proche du rejet (50-390 ng/L) ou plus lointain à la station de Normanville (40-140 ng Dex-Eq/L).

Actuellement, il n'existe pas de valeur seuil réglementaire pour l'activité GR in vitro au-delà de laquelle un risque pour l'environnement serait prédit. Néanmoins, des valeurs de 7 et 100 ng Dex-EQ /L basées sur l'utilisation des bioessais GR-GeneBLazer et GR-CALUX, respectivement, ont été proposées pour les eaux de surface (Neale et al 2023, Van der Oost et al 2017). Ces bioessais sont basés sur le même principe que ceux utilisés dans notre étude (cellules avec gène rapporteur sous contrôle du GR humain). Bien qu'il faille considérer ces valeurs comme des proxy, il est notable que les niveaux d'activité GR mesurés dans l'Iton en 2023 sont proches des seuils proposés.

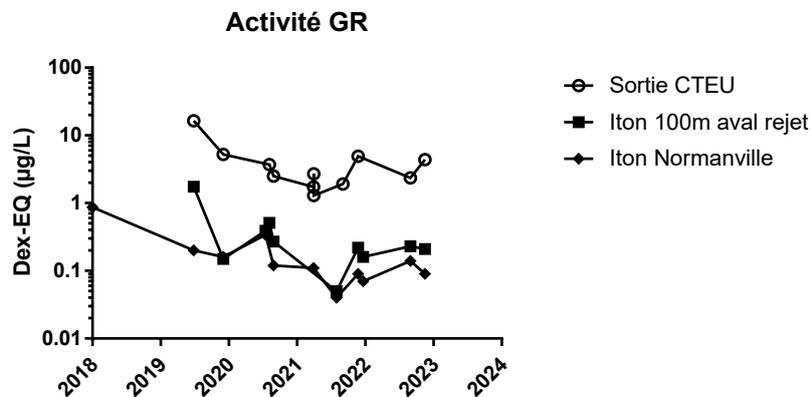


Figure 4. Activité glucocorticoïde mesurée dans la phase dissoute du rejet de la STEU et dans l'Iton, en aval proche et lointain du rejet, entre septembre 2019 et mars 2023.

#### 3.2 Suivi des concentrations en FP et CP

Les concentrations en FP et CP mesurées au cours de ces campagnes sont reportées dans les Figure 5 et Figure 6, respectivement.

L'analyse de la FP à ces quatre sites confirme la tendance observée sur l'activité GR, avec une décroissance entre mars et novembre 2020 puis une stabilisation des concentrations en FP (Figure 5). Nous n'avons pas de résultat d'analyse pour des échantillons antérieurs à mars 2020.

Concernant le CP en revanche, les profils de concentrations dans l'Iton sont stables dans le temps, probablement non influencés par l'activité de l'usine (Figure 6). Dans la STEU, le profil est particulier puisque cette molécule est détectée principalement en sortie, seul un échantillon (mars 2020) était



dexaméthasone des molécules individuelles<sup>3</sup>. Les valeurs de Dex-EQ<sub>Chem</sub> ainsi obtenues sont ensuite directement comparables aux valeurs de Dex-EQ<sub>Bio</sub> mesurées avec le bioessai.

La Figure 7 reporte les valeurs de Dex-EQ<sub>Chem</sub> et Dex-EQ<sub>Bio</sub> mesurées pour l'ensemble des échantillons d'eaux dans lesquels une activité GR, la FP et le CP ont été quantifiées. Cette figure montre que ces deux paramètres sont fortement corrélés (majorité de points sur ou légèrement au-dessus de la droite  $y=x$ ), ce qui démontre que les deux molécules analysées sont des contributeurs majoritaires de l'activité biologique mesurée. La comparaison des concentrations individuelles en Dex-EQ<sub>Chem</sub> pour la FP et le CP avec l'activité GR mesurée (Dex-EQ<sub>Bio</sub>) montre que, dans l'Iton en aval direct et à Normanville, ces deux molécules contribuent pour respectivement 37-95% et 0-35% de l'activité GR. La FP est donc le principal contributeur de l'activité GR mesurée dans le milieu.

A noter que, pour quelques échantillons correspondant à des prélèvements dans le réseau d'eaux usées (Dex-EQ >10 µg/L), l'activité prédite par la chimie est plus forte que celle mesurée dans le bioessai, probablement du fait d'effet de matrice fort ou d'interférence dans le bioessai.

Du point de vue méthodologique, ce résultat démontre la pertinence d'un bioessai de mesure d'activité glucocorticoïde pour tracer quantitativement ces molécules dans les différents compartiments, depuis le rejet jusqu'au milieu récepteur.

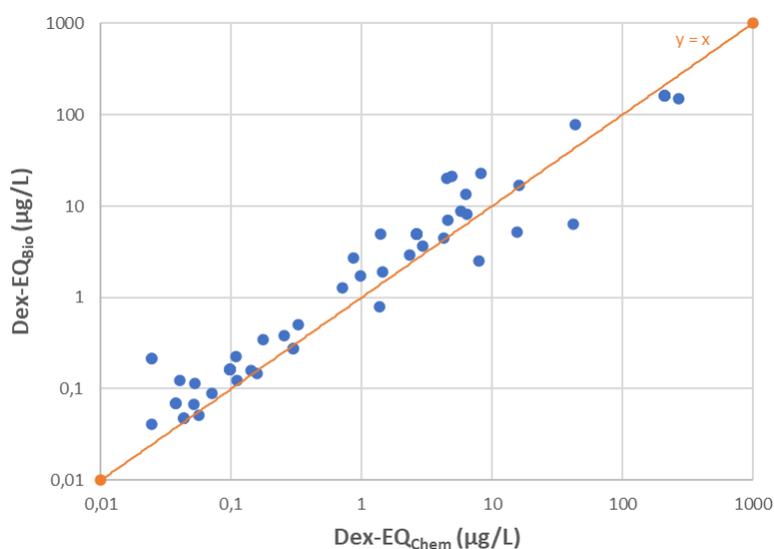


Figure 7. Corrélation entre les analyses chimiques de la FP et du CP (exprimées en Dex-EQ<sub>Chem</sub>) et l'activité GR mesurée par le bioessai MDA-kb2 (exprimée en Dex-EQ<sub>Bio</sub>).  
Ce graphique inclut l'ensemble des échantillons actifs analysés dans le projet (eaux usées, eaux de rivière et eaux souterraines).

**Au bilan, si une tendance à la baisse a été observée entre 2019 et 2020, les niveaux de contamination dans le rejet et dans l'Iton restent relativement stables dans le temps et l'espace. La FP, et dans une moindre mesure le CP, sont des contributeurs majeurs des activités biologiques quantifiées dans le rejet et dans l'Iton.**

<sup>3</sup> Des courbes concentration-réponse des substances seules dans le bioessai ont été réalisées au laboratoire et ont permis de dériver les concentrations actives, caractérisées par leur EC<sub>20</sub> (concentration induisant 20% d'effet). Les valeurs de REP correspondent au ratio de l'EC<sub>20</sub> de la molécule de référence (dexaméthasone) sur l'EC<sub>20</sub> de la substance (CF ou FP).

## 4 Imprégnation du milieu récepteur : suivi (bio)analytique dans les eaux souterraines et les sédiments

Au vu de la persistance dans le temps et l'espace de la contamination, il est apparu important d'investiguer l'état d'imprégnation du milieu récepteur et de la ressource en eau en aval de la contamination. Dans cette optique des échantillons de sédiments et d'eaux souterraines ont été prélevés sur différents sites et à différentes dates.

### 4.1 Eaux souterraines

Des prélèvements d'eau de source, de nappe (piézomètre) et en zone de captage en eau potable ont été réalisés en amont (uniquement eau de source) et en aval d'Evreux, en périodes de basses et de hautes eaux. Ils ont été analysés par bioessai (activité glucocorticoïde) et par analyses chimiques (FP et CP).

Les résultats sont reportés dans le Tableau 2.

*Tableau 2. Concentrations en fluticasone propionate (FP) et clobetasol propionate (CP) mesurées par analyses chimiques et activité glucocorticoïde (Dex-EQ<sub>Bio</sub>) dans des échantillons d'eaux de captage en eau potable (ECEP) et d'eaux souterraines (ESOUT) prélevées en amont et en aval d'Evreux*

*\*nd = non détecté, \*\*faible = activité détectée en deçà du seuil de quantification.*

Type d'eau - Sites	Date prélèvement	FP (ng/L)	CP (ng/L)	Dex-EQ <sub>Bio</sub> (ng/L)
ECEP - à Bérengeville (aval)	14-10-2019	<0,2	<0,2	nd*
ECEP - à Carcquoet (aval)	14-10-2019	<0,2	<0,2	nd
ECEP - à La Vacherie (aval)	14-10-2019	<0,2	<0,2	nd
ESOUT - Résurgence de la Fosse aux Dames à Glisolles (site amont)	29-10-2021	<0,2	<0,2	nd
	22-02-2022	<0,2	<0,2	nd
	21-03-2022	<0,2	<0,2	nd
	29-11-2022	<0,2	<0,2	nd
	14-02-2023	<0,2	<0,2	nd
ESOUT - Piézomètre à Normanville (site aval)	29-10-2021	<0,2	<0,2	nd
	22-02-2022	1,0	<0,2	48
	21-03-2022	<0,2	<0,2	faible**
	29-11-2022	<0,2	<0,2	nd
	14-02-2023	0,6	<0,1	13
ESOUT - résurgence de l'Iton à Brosville (site aval)	29-10-2021	<0,2	<0,2	nd
	22-02-2022	<0,2	<0,2	nd
	21-03-2022	<0,2	<0,2	nd
	29-11-2022	<0,2	<0,2	nd
	14-02-2023	0,1	<0,1	nd

Au vu des données du tableau 2, **la grande majorité des échantillons d'eaux souterraines ont révélé des niveaux non détectables**, que ce soit via les analyses chimiques ou le bioessai. Seuls **les échantillons d'eaux souterraines prélevées à Normanville (piézomètre) ont montré de faibles niveaux d'activité GR, en période de hautes eaux uniquement** (février/mars 2022 et 2023). Cette activité est expliquée par la présence de FP à ces périodes. **Au site de Brosville (résurgence de l'Iton), aucune activité GR n'a été détectée** quelque ce soit la période de prélèvement ; en revanche la **présence de FP** est identifiée par les analyses chimiques en février 2023 uniquement. A ces deux sites situés en aval du rejet, les niveaux mesurés restent globalement faibles (traces) et sont similaires à ceux mesurés dans l'Iton aux mêmes périodes. Ils reflètent très certainement les échanges entre la nappe et l'Iton en cette période de hautes eaux.

**Il est également rassurant de noter qu'aucune activité n'est détectée dans les zones de captage en eau potable, prélevées en octobre 2019, période à laquelle la contamination était plus forte.**

## 4.2 Sédiments

### 4.2.1 Sédiments de surface

Des sédiments de surface (0-5 cm) ont été prélevés en 2020 à différents sites dans l'Iton (aval de l'exutoire de bois Jollet, aval direct du rejet et station de Normanville), dans l'Eure (aux Damps) et en 2021 au niveau de la résurgence de l'Iton à Brosville. Aucune plage de sédiment n'a été trouvée en amont d'Evreux à la Bonneville (station de référence) la rivière drainant très peu de matières en suspension à cet endroit.

Les sédiments ont été lyophilisés, broyés puis extraits par un mélange méthanol:dichlorométhane (50:50). Cet extrait a servi aux analyses par bioessais et aux analyses chimiques. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.

*Tableau 3. Activité GR (Dex-EQ<sub>Bio</sub>) et concentration en FP et en PC dans des prélèvements de sédiments de surface dans l'Iton et dans l'Eure.*

Echantillon, localisation	Date prélèvement	FP (µg/g séd. sec)	CP (µg/g séd. sec)	Dex-EQ <sub>Bio</sub> (µg/g séd. sec)
Sédiment de l'Iton – aval direct exutoire de Bois Jollet à Evreux	14/10/2020	1,57	<0,003	7,37
Sédiment de l'Iton – 100 m aval direct rejet de la STEU à Gravigny	14/10/2020	0,02	<0,004	0,55
Sédiment l'Iton à Normanville	14/10/2020	0,03	<0,004	0,48
Sédiment de l'Eure – Les Damps	14/10/2020	<0,0004	<0,004	<0,05
Crème de vase – résurgence de la nappe à Brosville	29/10/2021	<0,0003	<0,003	<0,05
Crème de vase – résurgence de la nappe à Brosville	22/02/2022	<0,0003	<0,003	<0,05
Crème de vase – résurgence de la nappe à Brosville	21/03/2022	<0,0003	<0,008	<0,05

Une activité GR a été détectée dans les sédiments de l'Iton aux trois stations situées en aval direct de l'exutoire, du rejet de la STEU et à Normanville. Ces activités sont corrélées à la présence de fluticasone propionate dans les échantillons, alors que le CP n'a pas été détecté. Il est intéressant de noter que l'activité mesurée dans le sédiment à Normanville est en accord avec le résultat d'une précédente campagne nationale qui reportait une activité GR de l'ordre de ~1 µg Dex-EQ/g sed (Aït-Aïssa et al 2015). Dans cette précédente étude qui portait sur 120 sites au niveau national, des investigations plus poussées n'avaient pas pu mettre en évidence la molécule responsable de l'activité détectée et donc en identifier la source.

Concernant les autres échantillons de sédiments analysés, aucune activité GR, corroborée par les analyses chimiques, n'est détectée en aval lointain à Brosville au niveau de la résurgence de l'Iton ou sur l'Eure aux Damps. A Brosville, la crème de vase collectée reflèterait l'état de contamination des matières en suspensions drainées par la nappe au cours des 2 ou 3 dernières années. L'absence d'activité dans ces échantillons est donc plutôt rassurante quant à l'état de contamination de la ressource en eau souterraine.

### 4.2.2 Analyse d'une carotte sédimentaire sur l'Eure

Les résultats dans les sédiments de surface l'Iton ont mis en lumière le fait que la FP est capable de s'adsorber aux matières en suspension et de s'accumuler dans ce compartiment, à des niveaux détectables par les bioessais et les analyses chimiques. Pour tenter de tracer l'historique de cette contamination, un carottage de sédiment a été réalisé à Pont de L'arche en mai 2022, dans un petit

chenal où s'accumulent les matières en suspension drainées par l'Eure. Ce site est situé en aval lointain (30 km) de la source de la contamination. Surveillé depuis plusieurs années par l'UMR M2C, ce site a été sélectionné dans notre étude car propice à ce type d'échantillonnage, et s'est avéré un bon indicateur des contaminations anthropiques historiques de la vallée de l'Eure pour différents types de contaminants comme les métaux, les HAP et les PCB.

Une carotte sédimentaire de 120 cm a été prélevée puis transportée au laboratoire où elle a été découpée en tranches de 1 cm, chaque tranche représentant une année d'accumulation de matières en suspension. Chaque tranche individuelle a été lyophilisée puis extraite par un mélange méthanol:dichlorométhane (50:50) ; les extraits obtenus ont été soumis aux analyses par bioessai pour l'activité GR et aux analyses chimiques de FP et CP.

Les analyses par bioessai et les analyses chimiques n'ont pas mis en évidence de niveaux détectables d'activité GR ni de FP ou de CP pour toutes les tranches de sédiment analysées (n'ont été analysées que les tranches supérieures entre 0 et -50 cm de profondeur). Seul un échantillon (tranche 10-11 cm) a montré une faible activité GR non quantifiable. Ce résultat est un peu surprenant au regard de la capacité de cette substance à s'accumuler dans le sédiment et du fait qu'une activité GR ait été détectée dans l'eau à ce site en 2017 et 2018. L'absence de FP dans le sédiment en aval lointain aux Damps et à Pont de l'Arche souligne le besoin de mieux comprendre le comportement devenir de cette molécule et notamment sa dynamique de compartimentation entre les phases aqueuses et particulaires une fois dans le milieu récepteur. Une hypothèse plausible suggère une capacité d'adsorption rapide de la FP vers la matière particulaire, ce qui expliquerait sa présence dans les sédiments proches des sites de rejet et son absence en aval lointain.

## 5 Conclusions et perspectives

Le projet GLUCO visait à fournir des données scientifiques permettant de qualifier chimiquement une contamination exceptionnelle de l'Iton par les composés de type glucocorticoïdes, d'en identifier la(les) source(s) et d'en évaluer l'imprégnation du milieu récepteur.

Les travaux réalisés ont permis d'identifier la fluticasone propionate (FP) et, dans une moindre mesure le clobétasol propionate (CP), comme contributeurs principaux de l'activité GR rejetée dans l'Iton, principalement via les eaux usées mais également, dans une moindre mesure, via les eaux pluviales. Deux autres molécules, métabolites de la FP, ont également été identifiées en sortie de STEU par l'approche EDA, sans toutefois pouvoir confirmer formellement leur identification en l'absence de standard analytique.

Les investigations dans l'Iton et dans le réseau d'assainissement ont permis d'identifier le rejet du site industriel pharmaceutique comme étant la source principale de la FP retrouvée dans le milieu. Le CP, non détecté en aval direct du site de l'usine, aurait probablement une origine domestique, indiquant que les activités humaines contribueraient également mais dans une moindre mesure que le site industriel, à l'activité glucocorticoïde à Evreux.

Le suivi temporel en aval du rejet a montré une baisse, illustrant probablement les mesures de réduction de rejet prises en 2019, puis une stabilisation de la contamination dans le milieu entre 2020 et 2023. Il n'est pas exclu de que des résidus pharmaceutiques aient imprégné le réseau d'assainissement au fil des années de production (sous forme adsorbée au support ou aux matières organiques), ce qui pourrait conduire à un relargage continu de substances actives dans le milieu après 3 ans. Dans le futur, une poursuite de la surveillance de ce site serait utile afin de vérifier s'il existe une tendance à la diminution de la contamination par la FP.

D'une manière générale, une faible imprégnation de la nappe phréatique est notée en aval du rejet, ce qui est rassurant concernant la qualité de la ressource en eau. Des niveaux traces de FP sont néanmoins ponctuellement détectés à Normanville et à Brosville, reflétant les échanges entre l'Iton et la nappe en période de hautes eaux uniquement. Les analyses de sédiments montrent que la FP est présente dans le sédiment en aval proche (jusqu'à 3 km) des rejets (pluvial et STEU). Ce constat montre que ces molécules sont capables de s'adsorber à la phase particulaire, avec une cinétique probablement assez rapide puisqu'aucune activité GR sédimentaire n'est détectée en aval lointain dans l'Eure à Pont de l'Arche et aux Damps.

Enfin, l'occurrence et la persistance de cette contamination dans la rivière pose la question du risque pour les organismes aquatiques. A notre connaissance, il n'existe pas de valeur de concentration sans effet environnementale prédite (PNEC) pour la FP et le CP et, à ce stade, il n'est pas possible d'établir s'il existe ou non un risque pour l'environnement. Cependant, des travaux en cours à l'Ineris ont permis

d'acquérir des données originales sur les effets biologiques de la FP sur le développement et la reproduction chez une espèce modèle, le poisson zèbre (Brion et al 2022). Chez l'embryon, des effets sur l'expression de gènes impliqués dans les réponses endocriniennes (*kfbp5* et *cyp11c1*) sont observés dès 24 et 390 ng/L alors que la signalisation oestrogénique n'est pas affectée. A plus fortes concentrations (5 µg/L), une capacité de cette substance à induire une altération de la fréquence cardiaque et une éclosion précoce est reportée. Chez le poisson zèbre adulte, une inhibition de la fécondité des femelles associée à une diminution des événements de ponte est observée dès 76 et 167 ng/L, respectivement, alors que l'expression ovarienne de l'aromatase A et les concentrations en vitellogénine circulante ne sont pas altérées. Ces résultats démontrent la capacité de cette substance à interférer avec la régulation du système endocrinien et à induire des effets adverses chez le poisson.

Ces effets observés à court terme sont observés à des concentrations en FP plus fortes que celles retrouvées dans l'Iton (1-7 ng/L), mais sont du même ordre de grandeur que celles mesurées dans le rejet de la STEU (12-360 ng/L). Par ailleurs, il faut considérer que dans l'environnement, les organismes sont exposés à un mélange de composés partageant le même mode d'action (action sur le GR), des effets additifs entre GC ayant été rapportés (Willi et al 2018). Une réflexion est actuellement menée pour inclure ces données dans des scénarios de risque, en combinaison avec des données d'écotoxicité sur autres organismes (algues, daphnies), afin de dériver une valeur de PNEC pour la fluticasone qui permette de statuer sur le risque pour l'environnement associé à la présence de FP dans l'Iton.

## 6 Remerciements

Cette étude n'aurait pu se faire sans la collaboration efficace des acteurs et gestionnaires locaux qui ont mis à notre disposition leurs connaissances du terrain. Nous tenons à remercier :

- Ganaëlle Catherine, Gaëlle Poirier, Anaïs Lefort et Eric Lafforge, du service technique d'Evreux Portes de Normandie, pour leur précieuse collaboration pour les prélèvements dans le réseau et au centre de traitement des eaux urbaines (CTEU) de Gravigny ;
- Laurent Desormeaux, de l'OFB, pour son support dans l'identification des sites de prélèvements sur l'Iton et l'Eure qui a abouti à la caractérisation des rejets de glucocorticoïdes dans l'Iton ;
- Delphine Julien, de l'ARS Normandie pour l'accès aux stations de captage d'eau potable ;
- Nathalie Henrion et Julien Vilcot, de la DREAL Normandie ;
- l'AESN et le MTECT (programme P181-MIV34) pour le financement des travaux.

## 7 Références bibliographiques

Aït-Aïssa, S., C. Chardon and F. Brion (2020). Surveillance prospective : Apport des bioessais pour l'évaluation de la qualité chimique des milieux aquatiques – Rapport AQUAREF 2020 – DRC-20-172902-02808A – 41 p.

Aït-Aïssa, S. and N. Creusot (2015). Approche bio-analytique : validation de la mesure de l'activité oestrogénique dans les matrices environnementales – Revue bibliographique. Rapport AQUAREF DRC-15-136927-12327A, 2015 – 32 p.

Aït-Aïssa, S., N. Creusot and F. Brion (2015). Démarche bio-analytique pour l'identification de polluants émergents dans les milieux aquatiques – Application aux sédiments de l'étude prospective. Rapport INERIS, DRC-15-136859-12228A, 32 pp.

Brion, F., N. Hinfray and S. Aït-Aïssa (2023). Rapport d'avancement sur les travaux relatifs à l'évaluation des effets de la fluticasone propionate à l'aide de tests in vivo chez le poisson zèbre. Rapport Ineris-210897-2761559, 24 p.

Creusot, N., S. Ait-Aïssa, N. Tapie, P. Pardon, F. Brion, W. Sanchez, E. Thybaud, J. M. Porcher and H. Budzinski (2014). Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling. *Environmental Science & Technology* 48(7): 3649-3657.

Creusot, N., H. Budzinski, P. Balaguer, S. Kinani, J. M. Porcher and S. Ait-Aissa (2013). Effect-directed analysis of endocrine-disrupting compounds in multi-contaminated sediment: identification of novel ligands of estrogen and pregnane X receptors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405(8): 2553-2566.

Dierkes, G., A. Weizel, A. Wick and T. Ternes (2022). Steroid hormones in the aquatic environment - Insights from new analytical methods for corticosteroids and progestogens, German Environment Agency Report.

Hamilton, C. M., M. J. Winter, L. Margiotta-Casaluci, S. F. Owen and C. R. Tyler (2022). Are synthetic glucocorticoids in the aquatic environment a risk to fish? *Environment International* 162.

Kinani, S., S. Bouchonnet, N. Creusot, S. Bourcier, P. Balaguer, J. M. Porcher and S. Ait-Aissa (2010). Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environmental Pollution* 158(1): 74-83.

Könneman, S., R. Kase, E. Simon, K. Swart, S. Buchinger, M. Schluesener, H. Hollert, B. I. Escher, I. Werner, S. Ait-Aissa, E. Vermeirssen, V. Dulio, S. Valsecchi, S. Polesello, P. Behnisch, B. Javurkova, O. Perceval, C. Di Paolo, D. Olbrich, E. Sychrova, R. Schlichting, L. Leborgne, M. Clara, C. Scheffknecht, Y. Marneffe, C. Chalon, P. Tusil, P. Soldan, B. von Danwitz, J. Schwaiger, M. I. San Martin Becares, F. Bersani, K. Hilscherova, G. Reifferscheid, T. Ternes and M. Carere (2018). Effect-based and chemical analytical methods to monitor estrogens under the European Water Framework Directive. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 102: 225-235.

Kunz, P. Y., E. Simon, N. Creusot, B. S. Jayasinghe, C. Kienle, S. Maletz, A. Schifferli, C. Schonlau, S. Ait-Aissa, N. D. Denslow, H. Hollert, I. Werner and E. L. M. Vermeirssen (2017). Effect-based tools for monitoring estrogenic mixtures: Evaluation of five in vitro bioassays. *Water Research* 110: 378-388.

Macikova, P., K. J. Groh, A. A. Ammann, K. Schirmer and M. J. F. Suter (2014). Endocrine Disrupting Compounds Affecting Corticosteroid Signaling Pathways in Czech and Swiss Waters: Potential Impact on Fish. *Environmental Science & Technology* 48(21): 12902-12911.

Neale, P. A., S. Ait-Aissa, W. Brack, N. Creusot, M. S. Denison, B. Deutschmann, K. Hilscherova, H. Hollert, M. Krauss, J. Novak, T. Schulze, T. B. Seiler, H. Serra, Y. Shao and B. I. Escher (2015). Linking in Vitro Effects and Detected Organic Micropollutants in Surface Water Using Mixture-Toxicity Modeling. *Environmental Science & Technology* 49(24): 14614-14624.

Neale, P. A., B. I. Escher, M. De Baat, J. Enault and F. D. L. Leusch (2023). Effect-Based Trigger Values Are Essential for the Uptake of Effect-Based Methods in Water Safety Planning. *Environmental Toxicology and Chemistry* 42(3): 714-726.

Rhen, T. and J. A. Cidlowski (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids - New mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine* 353(16): 1711-1723.

Schriks, M., J. A. van Leerdam, S. C. van der Linden, B. van der Burg, A. P. van Wezel and P. de Voogt (2010). High-Resolution Mass Spectrometric Identification and Quantification of Glucocorticoid Compounds in Various Wastewaters in The Netherlands. *Environmental Science & Technology* 44(12): 4766-4774.

Simon, E., A. Duffek, C. Stahl, M. Frey, M. Scheurer, J. Tuerk, L. Gehrman, S. Könnemann, K. Swart, P. Behnisch, D. Olbrich, F. Brion, S. Ait-Aissa, R. Pasanen-Kase, I. Werner and E. L. M. Vermeirssen (2022). Biological effect and chemical monitoring of Watch List substances in European surface waters: Steroidal estrogens and diclofenac - Effect-based methods for monitoring frameworks. *Environment International* 159.

Sonavane, M., J. E. Schollee, A. O. Hidas, N. Creusot, F. Brion, M. J. F. Suter, J. Hollender and S. Ait-Aissa (2018). An integrative approach combining passive sampling, bioassays, and effect-directed analysis to assess the impact of wastewater effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 37(8): 2079-2088.

Staub, P. F., V. Dulio, O. Gras, O. Perceval, S. Aït-Aïssa, Y. Aminot, H. Budzinski, S. Lardy-Fontan, F. Lestremau, C. Miège, C. Munsch, A. Togola and E. Vulliet (2019). A Prospective Surveillance Network for improved identification of contaminants of emerging concern (CECs) and testing of innovative monitoring tools in France. *NORMAN Bulletin* 6: 21-24.

Van der Linden, S. C., M. B. Heringa, H.-Y. Man, E. Sonneveld, L. M. Puijker, A. Brouwer and B. Van der Burg (2008). Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environmental Science & Technology* 42(15): 5814-5820.

van der Oost, R., G. Sileno, M. Suarez-Munoz, M. T. Nguyen, H. Besselink and A. Brouwer (2017). SIMONI (Smart Integrated Monitoring) as a novel bioanalytical strategy for water quality assessment: Part I-Model design and effect-based trigger values. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36(9): 2385-2399.

Weizel, A., M. P. Schlusener, G. Dierkes and T. A. Ternes (2018). Occurrence of Glucocorticoids, Mineralocorticoids, and Progestogens in Various Treated Wastewater, Rivers, and Streams. *Environmental Science & Technology* 52(9): 5296-5307.

Weizel, A., M. P. Schlusener, G. Dierkes, A. Wick and T. A. Ternes (2020). Analysis of the aerobic biodegradation of glucocorticoids: Elucidation of the kinetics and transformation reactions. *Water Research* 174.

Willi, R. A., S. Faltermann, T. Hettich and K. Fent (2018). Active Glucocorticoids Have a Range of Important Adverse Developmental and Physiological Effects on Developing Zebrafish Embryos. *Environmental Science & Technology* 52(2): 877-885.

Willi, R. A., N. Salgueiro-González, S. Faltermann, T. Hettich and K. Fent (2019). Environmental glucocorticoids corticosterone, betamethasone and flumethasone induce more potent physiological than transcriptional effects in zebrafish embryos. *Science of the Total Environment* 672: 183-191.

Zhang, J. Y., Y. Yang, W. P. Liu, D. Schlenk and J. Liu (2019). Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and corticosteroid homeostasis are potential targets for endocrine-disrupting chemicals. *Environment International* 133.

## 8 Annexes

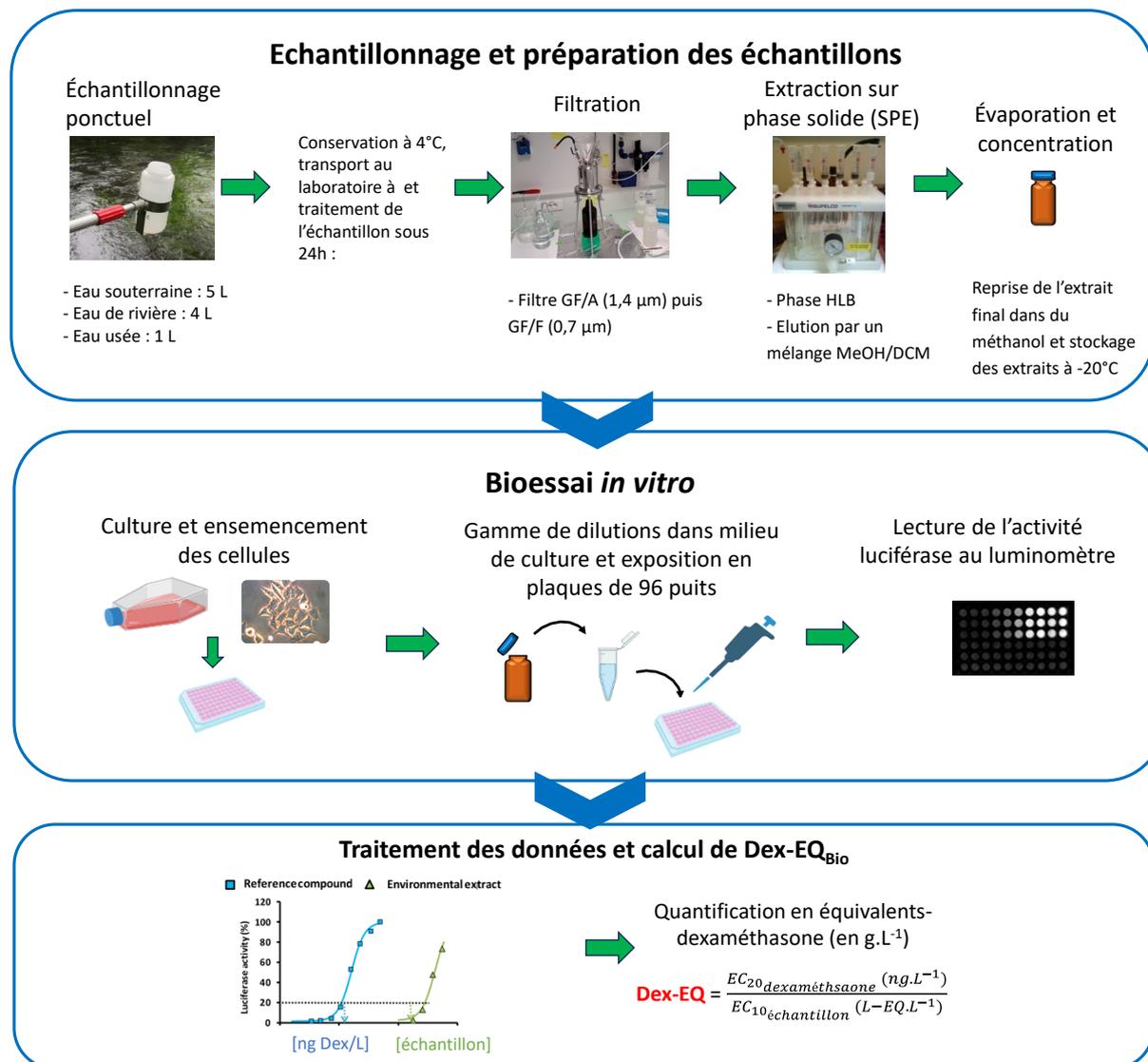
### 8.1 Annexe 1. Description et coordonnées des sites de prélèvements dans le milieu

Description, localisation	Matrice	Coordonnées GPS
<b><i>Campagnes Eaux de surface et sédiment</i></b>		
Amont à Arnières-sur-Iton (site de référence)	Eau de surface (Iton)	48.997032, 1.074867
Rejet Hôpital de la Musse à Arnières-sur-Iton	Eau de surface, aval immédiat du rejet (Iton)	48.997442, 1.076075
Allée du Bel Ebat, collecteur eaux pluviales de la zone de la Madeleine à Evreux	Eaux pluviales	49.021561, 1.141011 49.020752, 1.141407
Pont du Bois-Jollet à Evreux, sortie de l'exutoire des eaux pluviales	Eau de surface (Iton), sédiment	49.022741, 1.140368
Entrée du CTEU à Gravigny	Eau usée non traitée	49.055098, 1.174361
Sortie du CTEU à Gravigny	Eau usée traitée	49.055098, 1.174361
Aval immédiat du rejet du CTEU dans l'Iton à Gravigny	Eau de surface (Iton)	49.058531, 1.163533
Aval proche (100 m) du rejet à Gravigny	Eau de surface (Iton), sédiment	49.059346, 1.164174
Aval lointain (3 km) du rejet à Normanville	Eau de surface (Iton), sédiment	49.080559, 1.151028
Amont de la confluence entre Iton et Eure à Cailly-sur-Eure	Eau de surface (Eure)	49.114493, 1.208928
Aval immédiat de la confluence entre Iton et Eure à Acquigny	Eau de surface (Eure)	49.1751471, 1.1858415
Aval lointain (30 km) de la confluence entre Iton et Eure aux Damps	Eau de surface (Eure), sédiment	49.302643, 1.182410
Aval lointain, Pont de l'Arche	Carotte sédimentaire	49.304358, 1.170622
<b><i>Campagnes Eaux souterraines</i></b>		
Résurgence de la Fosse aux Dames à Gissoles	Eau de source	48.981910, 1.025950
Piézomètre à Normanville	Eau de nappe	49.075710, 1.159228
Résurgence de l'Iton à Brosville	Eau de source, sédiment	49.105670, 1.111693
<b><i>Zone de captage en eau potable</i></b>		
Bérengeville	Eau de nappe	49.116119, 1.064954
Carcouet	Eau de nappe	49.109845, 1.131269
La Vacherie	Eau de nappe	49.131580, 1.126846

## 8.2 Annexe 2 : Méthodologie de la bioanalyse in vitro d'activité glucocorticoïde

### Démarche expérimentale

La figure ci-dessous synthétise les principales étapes de préparation et de bioanalyse d'un échantillon environnemental. Dans son principe, la bioanalyse utilisée dans ce projet est une approche séquentielle basée sur l'extraction de la phase organique dissoute et l'analyse dans le bioessai d'une série de dilutions de l'extrait organique obtenue. Dans le cas d'un échantillon positif, les courbes concentration-réponse permet de dériver une concentration en échantillon induisant 20 % d'effet ( $EC_{20}$  pour *Effective Concentration 20%*), et par comparaison avec l' $EC_{20}$  de la substance de référence (dexaméthasone dans le cas du GR), de calculer une concentration en ng de dexaméthasone-équivalents par litre d'échantillon initial (ng Dex-Eq/L).



### Contrôles qualité

Différents contrôles sont mis en œuvre pour s'assurer de la qualité des données collectées.

Pour évaluer l'influence du système de filtration et d'extraction lors de la préparation des extraits, des blancs procédure ont été générés cours de chaque série d'extraction. Ces blancs se sont avérés exempts de contamination par une activité glucocorticoïde pour toutes les campagnes d'analyses du projet GLUCO.

- Blancs « eau » : un échantillon d'eau ultrapure a suivi le même processus de préparation

- Blancs d'extraction : pour chaque série d'extraction, des blancs d'extraction ont été générés par l'extraction d'une cartouche HLB vierge qui a été conditionnée, séchée et éluée pour générer un extrait de la même manière qu'une cartouche ayant été au contact d'un effluent. Ce type de blanc peut notamment mettre en évidence des contaminations éventuelles liées aux solvants ou au matériel d'extraction utilisés.

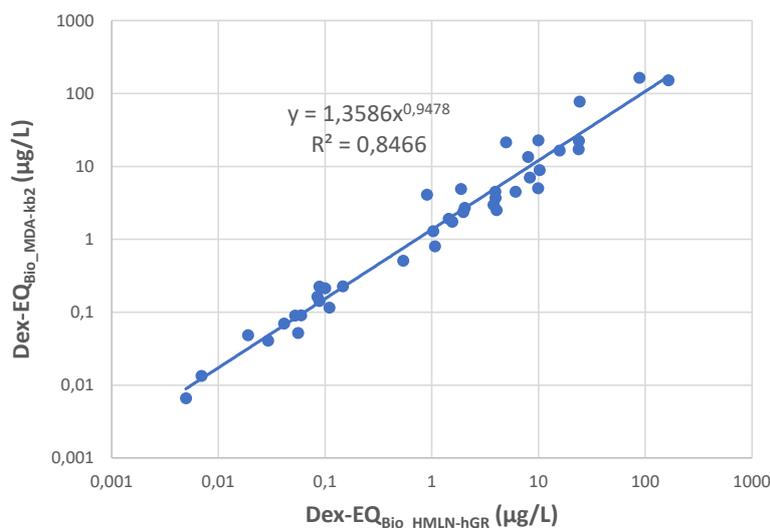
Lors de la réalisation des bioessais *in vitro*, différents contrôles sont mis en œuvre pour s'assurer de la réponse correcte des cellules :

- Témoins positifs et négatifs dans chaque plaque : permettent de vérifier la réactivité (induction maximale) attendue du bioessai au moment de l'essai ;
- Gamme dose-réponse du composé de référence (dexaméthasone) : permet de vérifier la sensibilité (EC50) attendue du bioessai au moment de l'essai.

### Bioessai *in vitro*

L'ensemble des analyses menées dans le projet sont basées sur l'utilisation de la lignée cellulaire humaine (MDA-kb2, obtenue auprès de l'ATCC, référence : CRL-2713). Cette lignée cellulaire exprime de manière stable le gène rapporteur de la luciférase qui est induit spécifiquement par le récepteur des androgènes (AR) et le GR en présence d'activateurs de ces récepteurs (Wilson et al 2002, Aït-Aïssa et al 2010). La réponse luciférase induite par la dexaméthasone (agoniste de référence du GR) est environ quatre fois plus importante que celle induite par la dihydrotestostérone (DHT), agoniste modèle du AR. Lorsqu'une réponse positive est obtenue dans ce test pour un échantillon donné, une co-exposition avec un antagoniste de chacun de ces récepteurs (flutamide pour le AR, RU486 pour le GR) est réalisée afin de s'assurer de l'implication de l'un et/ou l'autre récepteur dans la réponse du bioessai. Dans le projet GLUCO, seuls les échantillons d'eau usée prélevée en amont de STEU ont pu présenter une activité AR. Aucune activité AR n'a été détectée dans les échantillons en sortie de STEU ou dans le milieu naturel (Iton, eau de surface, eaux souterraines et sédiments). De plus, pour s'assurer de la mesure spécifique d'activité GR dans le bioessai MDA-kb2, un second bioessai spécifique du GR (HMLN-hGR, Grimaldi et al 2022) a été utilisée sur certains échantillons générés dans le projet (avec l'aimable autorisation de Patrick Balaguer, Inserm U1194).

La figure suivante montre que les deux bioessais sont, pour une large majorité des échantillons analysés, parfaitement corrélés. Certains échantillons, très actifs (Dex-Eq > 1 µg/L), ayant montré une activité plus forte en MDA-kb2 correspondent aux eaux usées urbaines non traitées, qui pouvaient contenir des androgènes d'origine humaine. Ce second bioessai a permis d'une part de confirmer la présence et la quantification de l'activité GR détectée dans les échantillons, d'autre part de conforter la pertinence de l'utilisation du bioessai MDA-kb2 quant à la détection de ce type d'activité.



Corrélation entre les concentrations en Dex-EQ (µg/L) mesurées par les bioessais HMLN-hGR et MDA-kb2 dans le projet GLUCO.

