

**Arrêté préfectoral complémentaire
Prescrivant à la société SANOFI des mesures de suivi de ses rejets aqueux
et du milieu récepteur**

*Le préfet de la région Auvergne
Préfet du Puy-de-Dôme
Chevalier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Ordre National du Mérite*

VU le Code de l'environnement, partie législative, et notamment le livre V, titre I^{er} relatif aux installations classées pour la protection de l'environnement ;

VU le Code de l'environnement, partie réglementaire, et notamment son article R 512-31 ;

VU l'arrêté préfectoral complémentaire n°09/00602 du 6 mars 2009 autorisant la société SANOFI CHIMIE à poursuivre l'exploitation du site de Vertolaye et définissant ses garanties financières ;

VU le compte rendu de la réunion du comité de suivi du 25 juin 2010, relatif aux malformations du goujon observées sur la rivière Dore ;

VU le rapport de la Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement en date du 25 février 2011 ;

VU l'avis du Conseil Départemental de l'Environnement et des Risques Sanitaires et Technologiques en date du 22 avril 2011;

CONSIDÉRANT qu'en application de l'article R. 512-31 du Code de l'environnement des arrêtés complémentaires peuvent être pris sur proposition de l'inspection des installations classées et après avis du CODERST ;

CONSIDÉRANT les malformations de poissons observées dans la rivière Dore en aval du rejet de l'usine SANOFI CHIMIE de Vertolaye ;

CONSIDÉRANT la présence de perturbateurs endocriniens dans les rejets de l'usine SANOFI CHIMIE de Vertolaye et dans la rivière Dore en aval du point de rejet de cette usine ;

Sur proposition de M. le Secrétaire Général de la Préfecture du Puy-de-Dôme :

ARRETE

Article 1^{er} : Objet de l'arrêté

La société SANOFI CHIMIE, dont le siège social est 9 rue du Président Salvador Allende – 94250 GENTILLY, RCS Créteil 428 706 204 est tenue de mettre en place pour son établissement sis Le

Bourg à Vertolaye (63 480), les mesures définies dans le présent arrêté, concernant le suivi de l'impact de ses rejets sur le milieu naturel.

Article 2 : Suivi des rejets

La société SANOFI CHIMIE est tenue de mesurer selon une fréquence mensuelle, les activités de type glucocorticoïde, progestative, androgénique, œstrogénique et minéralocorticoïde, contenues dans ses effluents. Ces mesures sont réalisées sur un échantillon représentatif des rejets de l'établissement sur la période considérée. Ces analyses seront réalisées par un laboratoire dont les compétences sont reconnues pour ce qui est de l'emploi des techniques en question.

Les opérations de prélèvement et d'échantillonnage devront s'appuyer sur les normes ou les guides en vigueur et notamment :

-la norme NF EN ISO 5667-3 « qualité de l'eau – échantillonnage – partie 3 : lignes directrices pour la conservation et la manipulation des échantillons d'eau » ;

-le guide FD T 90-532-2 « qualité de l'eau – guide de prélèvement pour le suivi des eaux dans l'environnement – prélèvement d'eau résiduaire ».

La société SANOFI CHIMIE est tenue de mesurer selon la même fréquence et sur le même échantillon, la concentration en spironolactone, en dexaméthasone et en roxythromycine. Ces analyses sont réalisées par la méthode directe LC MS-MS (réf. SRDA 10033 Ed.01). Ces analyses seront réalisées par un laboratoire ayant reçu l'aval de l'Inspecteur des installations classées.

Article 3 : Suivi du milieu

La société SANOFI CHIMIE est tenue de mesurer, les activités de type glucocorticoïde, progestative, androgénique, œstrogénique et minéralocorticoïde présentes dans la rivière Dore en amont et en aval de son rejet, en des points ayant reçu l'aval de l'Inspecteur des installations classées.

Les mesures d'activité sont réalisées à partir de capteurs passifs de type POCIS, conformément au protocole défini en annexe au présent arrêté.

Ces mesures d'activité sont complétées par des mesures de concentration en spironolactone, dexaméthasone et roxythromycine sur les mêmes capteurs en amont et en aval du rejet de l'usine, selon la méthode directe LC MS-MS (réf. SRDA 10033 Ed.01).

Les capteurs passifs de type POCIS sont relevés et remplacés simultanément sur les deux emplacements, selon une fréquence adaptée, par de nouveaux capteurs, de manière à réaliser un suivi du cours d'eau en continu.

La pose, la dépose, l'entretien et la surveillance de ces capteurs sont réalisés par la société SANOFI CHIMIE.

Article 4 : Transmission des résultats du suivi

Les résultats des analyses visées aux articles 2 et 3 sont transmis à M. le Préfet selon une fréquence mensuelle, avec les quantités de spironolactone, dexaméthasone et roxythromycine synthétisées sur le site de Vertolaye sur la période considérée, ainsi que les commentaires de l'exploitant sur l'évolution des résultats.

Une synthèse annuelle de ces éléments est transmise à M. le Préfet à compter du 31 décembre 2011.

Article 5 : Réduction des flux de substances actives rejetées

La société SANOFI CHIMIE est tenue de présenter à M. le Préfet pour le 31 mai 2011, un état d'avancement des études et travaux mis en œuvre au sein de ses installations, pour réduire les quantités de substances actives rejetées dans la rivière Dore.

Article 6 : Affichage et publicité

Une copie du présent arrêté sera déposée à la mairie de VERTOLAYE pour y être consultée par toute personne intéressée.

Un extrait de l'arrêté énumérant notamment les prescriptions auxquelles l'installation est soumise, sera affiché en mairie pendant une durée minimale d'un mois. Le procès verbal de l'accomplissement de ces formalités sera établi par le maire.

Le même extrait sera affiché en permanence et de façon visible dans l'établissement par les soins du bénéficiaire de l'autorisation.

Un avis sera inséré par les soins de monsieur le préfet du Puy-de-Dôme et aux frais de l'exploitant dans deux journaux locaux ou régionaux diffusés dans le département concerné par l'exploitation.

Une copie du présent arrêté est notifiée à l'exploitant. Ce document doit, en permanence, être en sa possession et pouvoir être présenté à toute réquisition.

Article 7 : Délais et voies de recours

Le présent arrêté est soumis à un contentieux de pleine juridiction.

Il ne peut être déféré qu'au tribunal administratif de Clermont-Ferrand :

-par les tiers, personnes physiques ou morales, les communes intéressées ou leurs groupements, en raison des inconvénients ou des dangers que le fonctionnement de l'installation présente pour les intérêts mentionnés aux articles L. 211-1 et L. 511-1 dans un délai d'un an à compter de la publication ou de l'affichage de ces décisions. Toutefois, si la mise en service de l'installation n'est pas intervenue six mois après la publication ou l'affichage de ces décisions, le délai de recours continue à courir jusqu'à l'expiration d'une période de six mois après cette mise en service ;

-par les demandeurs ou exploitants, dans un délai de deux mois à compter de la date à laquelle la décision leur a été notifiée.

Article 8 : Exécution

Monsieur le secrétaire général de la préfecture du Puy-de-Dôme, monsieur le maire de VERTOLAYE, monsieur le directeur régional de l'environnement, de l'aménagement et du logement Auvergne, monsieur l'inspecteur des installations classées, sont chargés, chacun en ce qui les concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera adressé également, pour information à :

- la direction départementale des territoires,
- la direction départementale de la cohésion sociale,

- la direction départementale de la protection des populations,
- la direction régionale de l'agriculture, de l'alimentation et de la forêt,
- l'agence régionale de santé,
- l'office national de l'eau et des milieux aquatiques

Fait à Clermont-Ferrand, le **18 MAI 2011**

Pour le Préfet et par délégation,
Le Secrétaire Général



Jean-Bernard BOBIN

Annexe à l'arrêté n° 11/01163 du 18 mai 2011

L'objectif est de mesurer les activités stéroïdiennes agonistes et antagonistes d'extraits organiques de POCIS. Les échantillons sont testés *in vitro* sur des cellules humaines en culture transfectées de manière stable par des éléments de réponse aux stéroïdes ainsi que par les vecteurs d'expression des récepteurs nucléaires (tableau 1).

Le principe de la détection par les tests *in vitro* repose sur la capacité de molécules présentes dans l'échantillon à se lier à un récepteur et à activer la réponse du gène rapporteur associé à ce récepteur. Pour un échantillon actif donné, l'établissement de courbes dose-réponse permet de déterminer une concentration en extrait produisant un niveau fixé d'effet (e.g. EC25 = concentration d'extrait donnant 25% d'effet dans le test cellulaire). L'EC25 est ensuite comparée à celle de la molécule de référence du test considéré (e.g. œstradiol ou E2 pour le récepteur des œstrogènes) afin de quantifier l'activité de l'échantillon en termes d'équivalent toxiques (TEQ), selon la relation : $TEQ_{\text{échantillon}} = EC25 \text{ de la référence} / EC25 \text{ échantillon}$, exprimée en masse d'équivalent toxique par POCIS (e.g. ng E2-Eq/POCIS).

LIGNEES CELLULAIRES UTILISEES

Tableau 1 : Liste des récepteurs étudiés

Récepteur	Code	Récepteur exprimé	Lignée cellulaire	Lignée cellulaire d'origine
Humain œstrogènes α	ER α	ER α entier	MELN	MCF-7
Humain œstrogènes β	ER β	ER β entier	HELN ER β	HeLa
Humain androgènes	AR	AR entier	PALM	PC3
Humain progestatifs	PR	PR entier (ER DBD)	HELN PRB (ER α DBD)	HeLa
<i>Humain glucocorticoïdes</i>	GR	GAL4(DBD)-GR(LBD)	HG5LN GAL4-GR	HeLa
Humain minéralocorticoïdes	MR	GAL4(DBD)-MR(LBD)	HG5LN GAL4-MR	HeLa
Humain xénobiotiques	PXR	GAL4(DBD)-PXR(LBD)	HG5LN GAL4-hPXR	HeLa



PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Culture cellulaire

Le matériel de culture cellulaire provient de Life Technologies (Cergy Pontoise, France).

Milieux de culture cellulaire d'entretien

Les cellules MELN, HELN PRB (ER α DBD), HG5LN Gal4-GR et HG5LN Gal4-MR (Escande et al, 2009 ; Molina et al, 2006) sont cultivées dans du milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) à 1 g/l de glucose contenant du rouge de phénol, supplémenté de 5 % de sérum de veau fœtal (SVF), 1 % d'antibiotiques (pénicilline / streptomycine) 0,5 μ g/ml puromycine et 1 mg/ml G418 dans une atmosphère humide à 95 % en présence de 5 % de CO₂ et à 37°C.

Les cellules PALM sont cultivées dans du milieu de culture RPMI supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) contenant du rouge de phénol, 1 % d'antibiotiques (pénicilline / streptomycine), 1 μ g/ml puromycine et 1 mg/ml G418 dans une atmosphère humide à 95 % en présence de 5 % de CO₂ et à 37°C.

Milieu de culture cellulaire de tests.

Les tests sont effectués dans le milieu de culture DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) à 1 g/l de glucose sans rouge de phénol, supplémenté de 5 % de sérum de veau fœtal déstéroïdé (SVF-DCC), 1 % d'antibiotiques (pénicilline / streptomycine) pour les cellules HG5LN Gal4-PR, HG5LN Gal4-GR et HG5LN Gal4-MR et dans du milieu de culture RPMI supplémenté de 5 % de sérum de veau fœtal déstéroïdé (SVF-DCC) sans rouge de phénol, 1 % d'antibiotiques (pénicilline / streptomycine) pour les cellules PALM.

Détection de la luciférase en cellules entières

Les cellules sontensemencées un jour avant l'induction dans des plaques de culture blanches 96-puits (Greiner CellStar) à raison de 20.000 cellules/puits (sauf les PALM qui sontensemencées à 50.000 cellules/puits) dans 200 μ l de milieu test. Le lendemain, les cellules seront traitées avec les molécules ou les extraits d'eaux à tester. A la fin de l'incubation (16 heures sauf pour les PALM où les cellules sont incubées 40 heures), le milieu test contenant les échantillons est remplacé par du milieu test contenant de la luciférine (0,3 mM). La luciférine diffuse dans les cellules et produit un signal stable 10 minutes plus tard. La plaque 96-puits est ensuite placée dans un luminomètre lecteur de plaque (*Microbeta Wallac Luminometer*) et la luminescence mesurée au rythme de deux secondes par puits. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire de luminescence (RLU) et en pourcentage d'activité luciférase, la valeur 100 % étant donnée par l'activité induite par le ligand de référence. Les eaux sont testées en quadruplets et les expériences sont réalisées au moins deux fois.

Les extraits de POCIS à tester sont également dosés en gamme de concentration (0,1 ; 0,03 ; 0,01 ; 0,03 ; 0,01, 0,003% et 0,001% d'extrait). En cas de réponse positive et de courbe incomplète, des dilutions successives seront effectuées jusqu'à l'obtention d'une courbe complète.

Les courbes d'agonisme permettront de déterminer la nature des ligands (agoniste, antagoniste) et leur affinité (EC₅₀). L'EC₅₀ est la concentration de la molécule ou de l'extrait qui permet obtenir 50% de la réponse maximale.

Les courbes d'antagonisme permettront de confirmer la nature des ligands (agoniste, antagoniste) et leur affinité (IC_{50}). L' IC_{50} est la concentration de la molécule ou de l'extrait qui permet d'inhiber de 50% la réponse maximale.

Les cellules PALM exprimant à la fois AR et GR, il est nécessaire de discriminer la part des deux types d'activité dans l'expression de la luciférase. Afin de ne considérer que l'activité androgénique, les tests sont réalisés en présence de dexamétasone (ligand de GR) à 100 nM.

Les autres lignées cellulaires ont une expression de la luciférase qui est uniquement médiée par un seul récepteur. Les EC_{50} sont indiqués à titre indicatif dans le tableau 3.

Tableau 2 : caractéristiques des ligands de référence

Ligand de référence	Concentration sub-optimale (EC_{50})	Concentration saturante
Oestradiol, E2 ($ER\alpha$)	0,17 pM	10 nM
Oestradiol, E2 ($ER\beta$)	0,67 pM	10 nM
Dexamétasone, dex (GR)	5 nM	100 nM
Promégestone, R5020 (PR)	0,5 nM	10 nM
Aldostérone (MR)	1 nM	10 nM
Méthyltriénolone, R1881 (AR)	0,1 nM	100 nM

Descriptif du matériel d'échantillonnage utilisé.

L'échantillonnage est réalisé grâce à des échantillonneurs passifs. Ces outils sont capables d'intégrer les composés présents dans la masse d'eau échantillonnée pendant un temps défini. Ils sont classiquement composés d'un adsorbant (ou d'un absorbant) capable de piéger les contaminants chimiques du milieu sans mécanisme d'extraction actif (Vrana et al, 2005). Ils permettent ainsi d'échantillonner la fraction dissoute des contaminants sur des périodes de temps de plusieurs semaines. Les contaminants diffusent du milieu vers l'échantillonneur de manière constante jusqu'à une condition d'équilibre. Cet état d'équilibre n'est pas atteint en conditions d'utilisation classique : l'échantillonnage est réalisé pendant la phase de régime intégratif linéaire. Durant cette phase, l'accumulation des composés à l'intérieur de l'échantillonneur est supposée proportionnelle à la concentration dans l'eau (Figure 1) (Vrana et al, 2005).

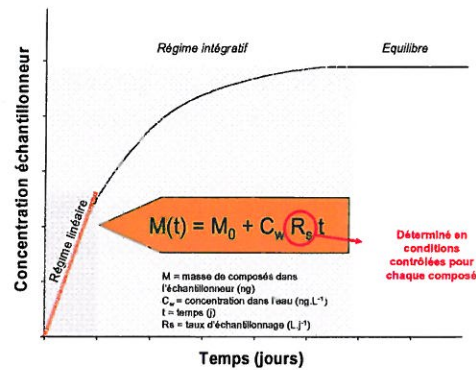


Figure 1 : Principe de l'échantillonnage passif intégratif.

Chaque type d'échantillonneur est spécifique d'une gamme de composé, ainsi les échantillonneurs utilisés dans le cadre de cette étude sont des POCIS (Polar Organic Compound Integrative Sampler). Les POCIS dans leur configuration classique sont des échantillonneurs passifs intégratifs utilisés pour le suivi des contaminants plutôt hydrophile possédant un coefficient de partage octanol/eau compris entre 0,5 et 4 (avec un maximum d'efficacité pour ceux compris entre 1 et 3), comme les pesticides, les substances pharmaceutiques, les détergents, les hormones, les produits de soin corporels... Ils sont composés d'une phase adsorbante solide (copolymère de divinylbenzene fonctionnalisé par des groupements N-vinylpyrrolidone (Oasis HLB, Waters) emprisonnée entre deux membranes de polyéthersulfone. Ces membranes présentent des diamètres de pores de 0,1 μm permettant le passage des contaminants vers la phase adsorbante (Figure 2).

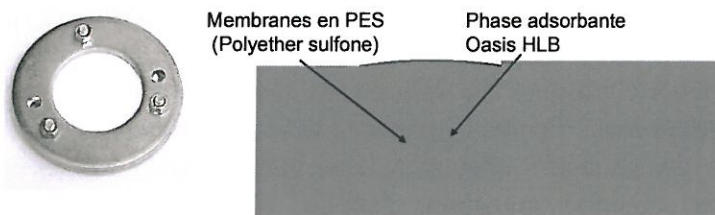


Figure 2 : Schéma d'un POCIS (Polar Organic Compound Integrative Sampler).

Extraction et Analyse des POCIS

Les POCIS sont exposées durant une période d'environ 1 mois sur le terrain. Après exposition les POCIS ont été rincées, puis conservées congelées en attente des analyses. Le protocole d'extraction des POCIS est commun aux analyses chimiques et aux biotests. Les POCIS sont sortis du congélateur 1 heure avant extraction, afin qu'ils reviennent à température ambiante. Les POCIS sont ensuite ouverts, puis la phase contenue à l'intérieur est transférée dans des cartouches SPE en verre. La phase est séchée afin d'éliminer toutes traces d'eau (Figure 3). La phase est ensuite éluée par un mélange de solvants (10 mL de méthanol, 10 mL de méthanol/dichlorométhane, 10 mL de dichlorométhane).



Figure 3 : Extraction des POCIS

Pour l'analyse chimique, les étalons internes de quantification (molécules deutérées) sont ajoutés gravimétriquement à cet extrait. L'extrait est ensuite divisé pour permettre l'analyse des différentes classes de composés, un aliquote pour le dosage des hormones, un pour le dosage des médicaments au sens large, un pour le dosage des antibiotiques et un dernier aliquote de sauvegarde. Les aliquotes sont repris dans les solvants adéquats pour l'analyse en chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem.

Tableau 3 : Conditions d'analyses de différents composés

Composés analysés	Instrumentation	Colonne	Phase mobile	Mode
Hormones	UPLC/MS/MS waters	Acquity BEH C18 10cm ; 2,1mm ; 1,7µm	Eau/ACN/0,1% formique Acide	ESI+
Pharma 1 a	RRLC-QQQ Agilent	Zorbax SB C18 5cm ; 2,1mm ; 1,8µm	Eau/ACN/0,3% formique Acide	ESI +
Pharma 1 b	RRLC-QQQ Agilent	Zorbax SB C18 5cm ; 2,1mm ; 1,8µm	Eau/ACN/0,1% formique Acide	ESI +
Pharma 2	RRLC-QQQ Agilent	Zorbax SB C18 5cm ; 2,1mm ; 1,8µm	Eau /ACN	ESI -

Liste des composés recherchés

Hormones : 11 α hydroxyprogestérone, 17 α ethinyloestradiol (EE2), 17 α oestradiol, 17 β oestradiol (beta E2), androstenedione, cetotestosterone, cortisone, dexaméthasone, DHA, DHEA, DHT, hydroxydihydroprogestérone (DHP), hydroxypregnenolone (OHPn), hydroxyprogestérone (OHPg), levonorgestrel, mestranol, norethindrone, norgestimate, oestriol (E3), oestrone (E1), prednisolone, prednisone, pregnenolone, progestérone, spironolactone, testosterone

Pharma 1 a (esi +): Abacavir, acide oxolinique, acide pipémidique, amoxicilline, ampicilline, atenolol, azithromycine, bacitracine, bisoprolol, céfotaxime, cefpodoxime, ceftiofur, chlortétracycline, ciprofloxacine, clarithromycine, clindamycine, cyclophosphamide, daunorubicine, docetaxel, doxorubicine, doxycycline, enrofloxacin, épirubicine, érythromycine, fluméquine, gemcitabine, ifostamide, indinavir, josamycine, lamivudine, lincomycine, marbofloxacine, meonensine, méthotrécate, métoprolol, metronidazole, nelfinavir, névirapine, norfloxacine, ofloxacine, oxytétracycline, propranolol, rifampicine, ritonavir, roxithromycine, salinomycine, saquinavir, sildénafil, sotalol, spiramycine, stavudine, sulfadiazine, sulfadiméthoxine, sulfamérazine, sulfaméthazine, sulfaméthizole, sulfaméthoxazole, sulfanilamide, sulfapyridine, sulfathiazole, tamoxifen, tétracycline, timolol, triméthoprime, tylosine, virginiamycine

Pharma 1 b (esi +): alprazolam, amitriptiline, bromazepam, caféine, carbamazépine, clenbuterol, diazepam, doxépine, fluoxétine, imipramine, nordiazepam, paracétamol, salbutamol, terbutaline, théophylline,

Pharma 2 (esi-) : aspirine, diclofenac, gemfibrozil, ibuprofène, kétoprofène, naproxène