



**Projet MICROPOLIS Indicateurs**  
**Livrable N°04**

# **Synthèse & Recommandations.** **Application d'outils biologiques** **pour la recherche et** **la caractérisation des effets** **des micropolluants des eaux usées**

*De la collecte des eaux usées...au milieu récepteur*

V1 - Octobre 2018



**Titre :** Synthèse & Recommandations. Application d'outils biologiques pour la recherche et la caractérisation des effets des micropolluants des eaux usées.

Livrable N°04 – Projet MICROPOLIS Indicateurs

**Date:** Octobre 2018

**Auteur :**

Ywann PENRU (SUEZ)

**Contributeurs à l'étude**

Entité, institution de rattachement	Contributeurs
SUEZ	Ywann Penru, Amélie Guillon, Mar Esperanza, Jean Claude Alibar
INERIS	Sélim Ait-Aissa, Nicolas Creusot
TOXEM	Jérôme Couteau
IRSTEA	Adeline François, Olivier Geffard
BIOMAE	Guillaume Jubeaux
Université de Bordeaux – EPOC - LPTC	Caroline Gardia-Parège, Hélène Budzinski
Syndicat des Bouillides	Laure Pumareda, Véronique Bertoni.
Agence de l'eau Rhone Méditerranée Corse	Céline Lagarrigue
Agence Française de la Biodiversité	Olivier Perceval

**Remerciement :**

Les auteurs remercient Mmes Brault, Belloi et Noble et M. Gamberi (Suez Eau France) pour leur contribution à l'organisation et à la réalisation des campagnes de prélèvement.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>1</b>	<b>CONTEXTE</b> .....	<b>4</b>
1.1	Appel à projet « Lutte contre les micropolluants aquatiques » .....	4
1.2	RSDE et l'obligation des collectivités à réduire les émissions de micropolluants.....	5
1.3	Le territoire de Sophia Antipolis .....	5
1.3.1	La STEU de Sophia Antipolis et son traitement complémentaire par ozonation .....	5
<b>2</b>	<b>OBJECTIFS ET DEMARCHES DU PROJET MICROPOLIS</b> .....	<b>8</b>
2.1	Enjeu n°1 : Réduction à la source .....	8
2.1.1	Etape de caractérisation.....	8
2.1.2	Recherche et identification des micropolluants par les bioessais .....	9
2.2	Enjeu n°2 : Traitement en STEU et toxicité résiduelle .....	11
2.3	Enjeu n°3 : Impact du rejet sur la qualité du milieu aquatique.....	11
<b>3</b>	<b>PRINCIPAUX RESULTATS ET CONCLUSIONS</b> .....	<b>13</b>
3.1	Profils de toxicité de la source au rejet de la STEU de Sophia Antipolis .....	13
3.2	Enjeu n°1 : Réduction à la source .....	13
3.2.1	Caractérisation de la toxicité et cartographie du territoire.....	13
3.2.2	Recherche et identification des micropolluants par les bioessais .....	16
3.3	Enjeu n°2 : Performances de traitement et toxicités résiduelles .....	17
3.3.1	Performances de traitement de la STEU « conventionnelle » (entrée STEU / sortie biofiltration nitrifiante) .....	17
3.3.2	Performances de traitement de l'étape d'ozonation.....	17
3.3.3	Toxicités résiduelles dans les eaux traitées .....	18
3.4	Enjeu n°3 : Evaluation de l'impact du rejet de la STEU et de la qualité du milieu récepteur .....	19
<b>4</b>	<b>SYNTHESE ET RECOMMANDATIONS</b> .....	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>REFERENCES</b> .....	<b>25</b>

# 1 CONTEXTE

## 1.1 Appel à projet « Lutte contre les micropolluants aquatiques »

Des études récentes (Brack et al., 2017; Malaj et al., 2014) montrent que les micropolluants sont présents dans les milieux aquatiques parfois à des concentrations très faibles, à l'état de mélanges plus ou moins complexes et susceptibles d'exercer, à ces niveaux de concentration, une toxicité vis-à-vis des organismes biologiques qui composent les biocénoses aquatiques. Pour répondre aux objectifs d'atteinte du bon état des eaux et en garantir les usages, la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) impose une réduction, voire une suppression des émissions dans l'eau des substances dangereuses pour l'Homme et l'environnement. La Conférence Environnementale de septembre 2012 a également mis en avant l'importance de s'intéresser aux micropolluants présents dans l'eau, dans le cadre de la prévention des risques sanitaires et environnementaux.

Depuis 2010, le Ministère de l'Ecologie a notamment piloté l'élaboration et la mise en œuvre du plan national de "Lutte contre les Micropolluants Aquatiques", ainsi que celui consacré aux résidus de médicaments dans les eaux (en partenariat avec le Ministère de la Santé), qui préconisent tous deux le recours à des expérimentations territorialisées pour éprouver et valider les méthodes et outils de gestions en rapport avec ces catégories de contaminants.

Pour répondre à la problématique croissante en lien avec la présence des micropolluants dans les eaux urbaines, l'agence française de la biodiversité (AFB), les agences de l'eau et le Ministère de l'Ecologie, en concertation avec le Ministère de la Santé, ont lancé conjointement un appel à projets intitulé « Innovation et changements de pratiques – Lutte contre les micropolluants des eaux urbaines ». Les questions abordées dans le cadre de cet appel à projet portent à la fois sur les solutions permettant d'identifier et de prioriser les micropolluants à enjeux et sur les solutions et changements de pratiques permettant d'éviter ou de réduire leurs déversements dans les réseaux et les milieux naturels. Cet appel à projets, lancé en juin 2013, s'est déroulé en deux phases : un appel à manifestations d'intérêt suivi d'une phase finale de sélection. Il a permis de sélectionner 13 projets collaboratifs composés de différents partenaires (collectivités, laboratoires de recherche, entreprises) sur 34 projets candidats. Chacun des projets de Recherche, Développement et Innovation retenus est ancré dans un territoire. Ces projets sont aidés par l'AFB et les agences de l'eau grâce à une enveloppe financière de 10 millions d'euros.

L'identification des flux de micropolluants vers les milieux aquatiques récepteurs et le développement de solutions pour la réduction de ces flux se heurtent à plusieurs problèmes techniques.

D'une part, la quantification de l'ensemble des substances est rendue difficile par le nombre et la diversité des micropolluants recherchés et nécessite donc la mise en place d'un arsenal de méthodes analytiques à la fois coûteux et complexe. Cette solution ne saurait être suffisante au regard du nombre de molécules (et de l'existence de produits de dégradation) qui peuvent potentiellement se retrouver dans les eaux usées urbaines et industrielles, voies principales de rejet de ces micropolluants vers le milieu récepteur. Elle ne garantit pas de détecter les concentrations des molécules d'intérêt dans l'environnement qui sont souvent inférieures aux limites de quantification des appareils analytiques.

D'autre part, la quantification de quelques dizaines de molécules réglementées ne permet pas d'évaluer le potentiel toxicologique et écotoxicologique de ces flux de micropolluants, pour lesquels les effets de mélange peuvent parfois conduire à un potentiel de toxicité supérieur à la somme des toxicités de chacune des substances.

## 1.2 RSDE et l'obligation des collectivités à réduire les émissions de micropolluants

Dans sa note technique du 12 août 2016, le ministère en charge de l'écologie décline une nouvelle stratégie de Recherche et Réduction de Substances Dangereuses pour l'Eau (RSDE) à destination des collectivités (stations d'épuration de tailles supérieures à 10 000 EH).

Cette stratégie s'appuie sur deux prérequis :

- les stations d'épuration ne sont pas construites pour traiter les substances dangereuses ;
- la réduction à la source (en amont des rejets dans les réseaux d'assainissement) est la solution à privilégier.

Ainsi, deux typologies d'action sont à mettre en œuvre par les collectivités :

- de nouvelles campagnes d'analyses à partir de 2018 (en entrée et en sortie de station d'épuration) qui permettent d'identifier et quantifier les substances les plus problématiques pour un territoire ;
- le déploiement de diagnostics (dits « diagnostics amont ») dès 2017 et ensuite en 2019, visant à identifier les sources des substances et les solutions de réduction appropriées.

Un cahier des charges rédigé par l'ASTEE est à disposition des collectivités pour préciser le contenu des diagnostics amont. La difficulté majeure reste l'identification des sources sur des réseaux d'assainissement où les rejets sont nombreux, de natures diverses et dispersés. Les premiers retours d'expérience montrent les limites des analyses chimiques pour ce type d'action (Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse, 2018). Le réseau est à la fois une zone de mélange qui entraîne une forte dilution et un réacteur biologique où les substances sont transformées ou fixées. La quantification de substances aux effets dès les plus faibles concentrations en est compromise.

## 1.3 Le territoire de Sophia Antipolis

Le projet MICROPOLIS s'est déroulé sur le territoire couvert par le *syndicat intercommunal pour l'extension et la gestion de la station d'épuration des Bouillides* (« syndicat des Bouillides »), regroupant les communes de Valbonne, Biot, Le Rouret, Opio, Mougins, Châteauneuf-de-Grasse, et Roquefort les Pins, du département des Alpes Maritimes.

### 1.3.1 La STEU de Sophia Antipolis et son traitement complémentaire par ozonation

Le technopôle de Sophia Antipolis, premier d'Europe, fait partie du territoire du syndicat et héberge notamment de nombreuses industries et centres de recherche du domaine de la chimie, dont certains rejettent leurs effluents dans le réseau des eaux usées urbaines. Il abrite également la station d'épuration des Bouillides (30 000 EH) qui traite les eaux usées collectées sur le territoire (Figure 1).

Sa filière de traitement est composée d'un traitement primaire physico-chimique par décantation lamellaire, d'un traitement par biofiltration pour l'élimination du carbone et la nitrification (pour plus de détails, Choubert et al., 2017).

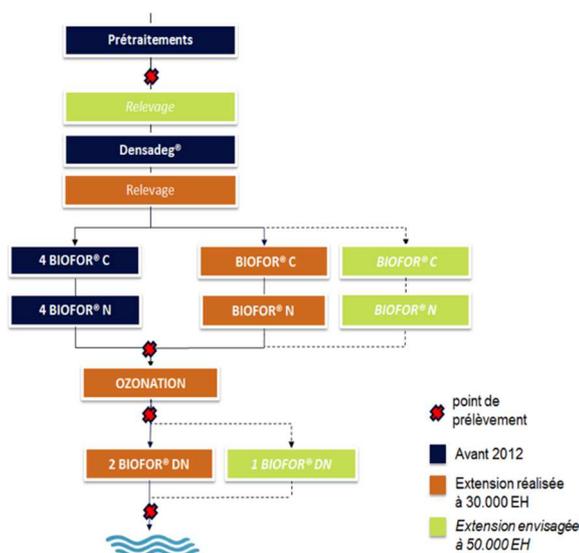


Figure 1. Schéma de la STEU de Sophia Antipolis

Les travaux menés en 2012 ont inclus l'installation d'un traitement complémentaire par ozonation pour l'élimination des micropolluants, suivi d'un traitement de dénitrification par biofiltration. Il s'agit de la première station d'épuration en France ayant des garanties de traitement des micropolluants vis-à-vis du maître d'ouvrage (Figure 2).

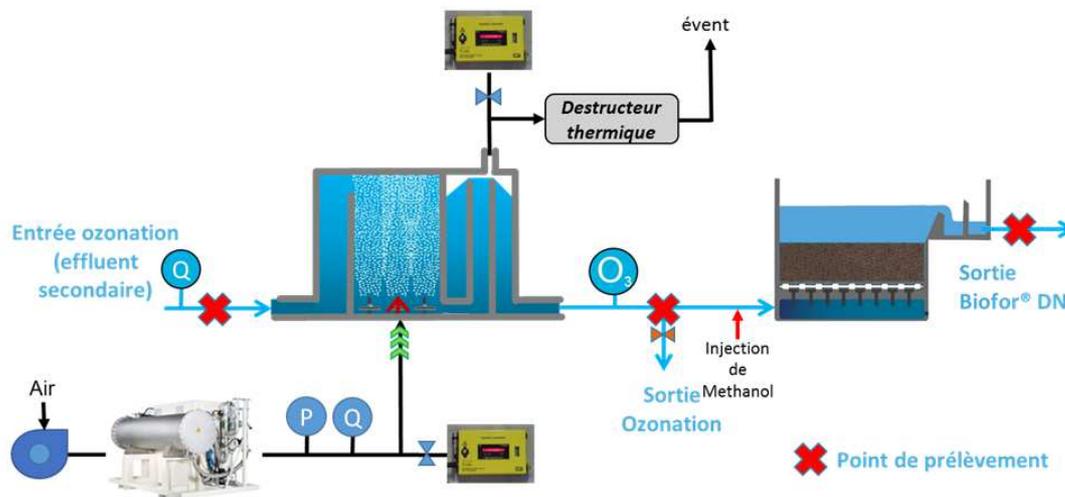


Figure 2. Schéma explicatif du traitement complémentaire par ozonation et biofiltration DN

De plus, à l'étiage, le faible débit de la Bouillide, cours d'eau récepteur des eaux usées traitées par la station, le rend très sensible aux pollutions. Ce cours d'eau alimente la Brague, rivière qui s'infiltre partiellement dans la nappe phréatique d'Antibes, une des ressources en eau pour la production d'eau potable dans la région (Figure 3).

L'ensemble de ces éléments montre l'intérêt du syndicat des Bouillides pour les solutions innovantes et anticipatrices visant la réduction des rejets de micropolluants et la protection du milieu aquatique récepteur. Il a aussi permis de proposer et mener à bien l'approche innovante pour la lutte contre les micropolluants aquatiques du projet MICROPOLIS.

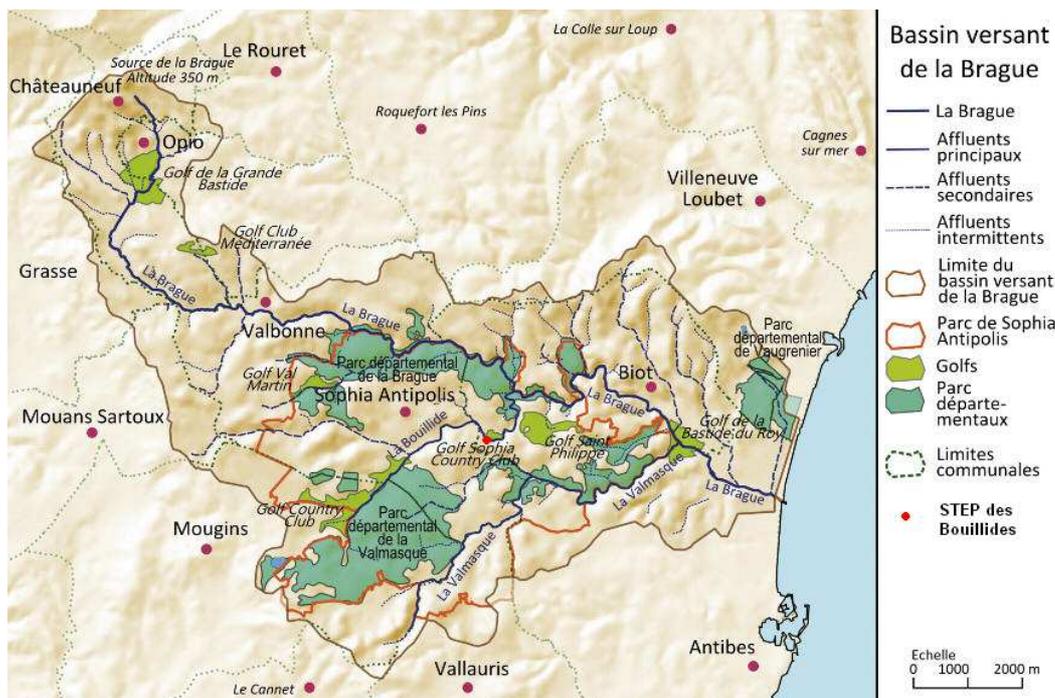


Figure 3. Cartographie du bassin versant de la Bouillides et de la Brague

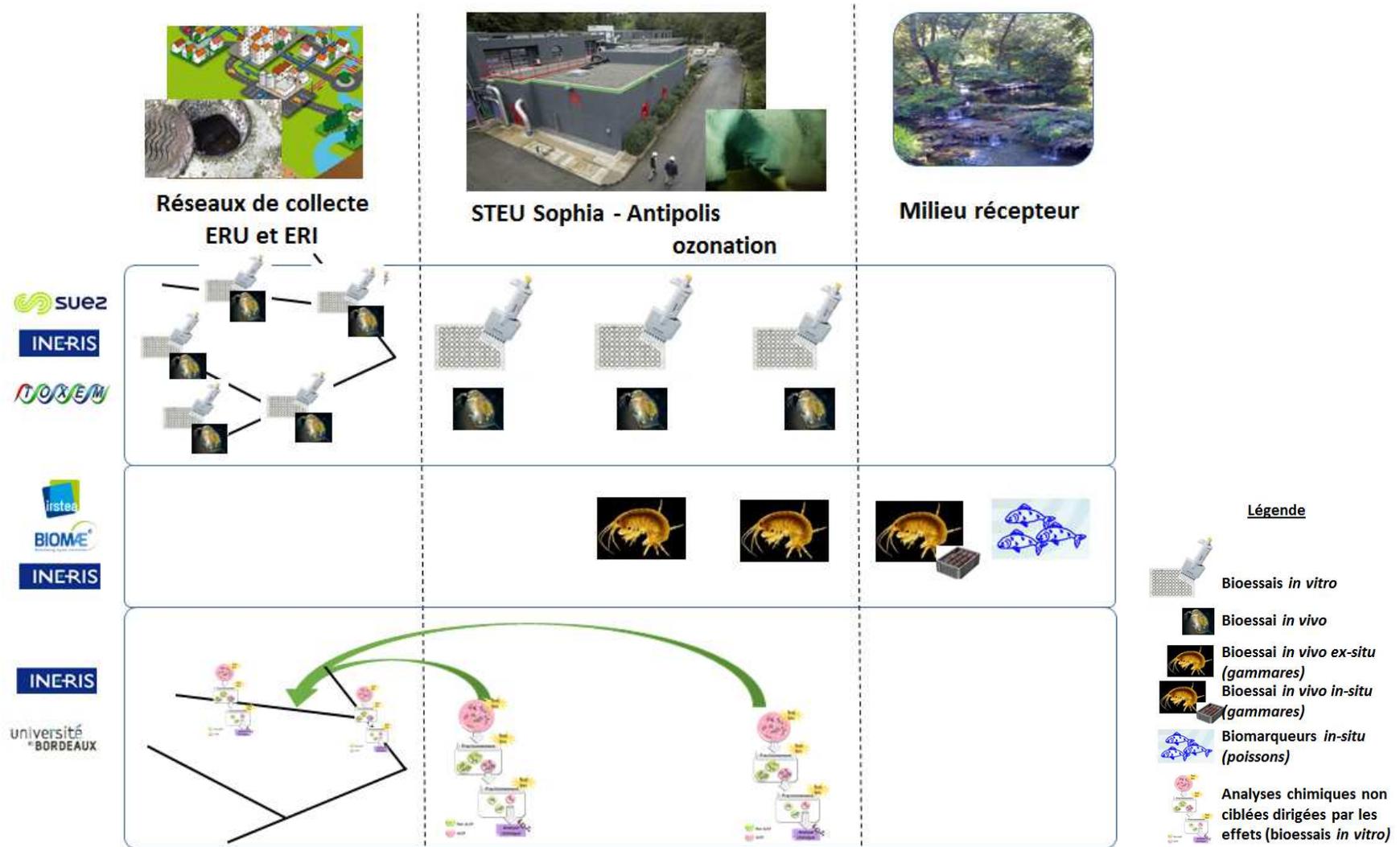


Figure 4. Schéma d'application des différents outils biologiques dans le projet MICROPOLIS

## 2 OBJECTIFS ET DEMARCHES DU PROJET MICROPOLIS

Le projet MICROPOLIS Indicateurs a souhaité proposer et développer une stratégie innovante pour la détection, la caractérisation et l'identification des micropolluants des eaux usées urbaines et de leurs impacts avérés et/ou potentiels. Dans ce but, un des principaux objectifs du projet était d'évaluer et de valider un ensemble cohérent d'outils biologiques pour :

- La **recherche et l'identification** des micropolluants pour leur **réduction à la source, i.e. avant traitement à la Station de Traitement des Eaux Usées (STEU)**
- L'évaluation des **performances d'élimination ou de réduction** de la **toxicité** des micropolluants par les procédés de traitement de la STEU des Bouillides, en particulier **l'ozonation**.
- La caractérisation de l'empreinte chimique du rejet de la STEU des Bouillides et son impact toxique potentiel **dans le milieu récepteur**

Cette batterie d'outils biologiques est constituée de plusieurs bioessais (*in vitro* et *in vivo*) de laboratoire et de terrain ainsi que de méthodes de bio-monitoring, qui ciblent différents modes d'action des contaminants et différentes fonctions physiologiques des organismes. Ces outils ont été appliqués sur l'ensemble du système d'assainissement du territoire de Sophia-Antipolis (Syndicat des Bouillides) **du réseau de collecte des eaux usées jusqu'au rejet de la STEU et dans le milieu récepteur** (Figure 4) afin de répondre à différents enjeux de la lutte contre les micropolluants aquatiques.

### 2.1 Enjeu n°1 : Réduction à la source

*Stratégie innovante de caractérisation de la toxicité et de recherche et d'identification des micropolluants par les bioessais*

#### 2.1.1 Etape de caractérisation

La stratégie pour la caractérisation et la recherche de micropolluants, mise en œuvre dans le cadre du projet MICROPOLIS, s'appuie d'abord sur une caractérisation des toxicités des eaux usées. Elle se base sur les réponses d'un ensemble de bioessais complémentaires (Tableau I), incluant :

- Des **bioessais *in vitro* spécifiques du mode d'action** des contaminants permettant de dresser des profils de contamination sur la base d'activités de type perturbateurs endocriniens (PE, approche multi-récepteurs), dioxin-like et génotoxique. Ces outils *in vitro* permettent de renseigner sur le type d'activité, et, pour les activités PE, sur la quantité (en équivalents-toxiques) de contaminants présents dans l'échantillon.
- des **bioessais d'écotoxicité** aiguë *in vivo* (bioessai sur Daphnies) et *in vitro* (cytotoxicité sur cellules de truites ; RTG2), pour renseigner de la toxicité globale associée aux échantillons.

L'application de cette démarche, depuis le réseau de collecte des eaux usées à la sortie de la STEU de Sophia Antipolis a permis :

- D'établir des **profils de toxicité du système d'assainissement** de Sophia Antipolis, du réseau de collecte des eaux usées au rejet de la STEU
- D'établir une **cartographie** innovante de la toxicité **réseau de collecte** des eaux usées en fonction des différentes typologies de toxicité recherchées
- D'**identifier des points d'intérêt** (« hotspots »), présentant un profil atypique de toxicité et/ou une ou des activités particulièrement élevées, en vue de la recherche et de l'identification de micropolluants responsables de cette toxicité (tâche 3).

*Pour plus de détails, se reporter au livrable n°01 du projet MICROPOLIS*

## 2.1.2 Recherche et identification des micropolluants par les bioessais

La seconde étape de la stratégie mise en œuvre dans le cadre de ce projet est celle de la recherche et de l'identification éventuelle des micropolluants responsables des toxicités observées aux points d'intérêt identifiés lors de la première étape. Cette recherche s'est faite selon une démarche d'analyse chimique non-ciblée dirigée par les activités mesurées par les bioessais *in vitro* (« Effect-directed Analysis » – EDA).

Cette approche se base sur la simplification de l'échantillon par un fractionnement physico-chimique (par séparation chromatographique en HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)). Chacune des fractions est testée par les bioessais afin de déterminer celles qui sont biologiquement actives et qui contiennent donc les composés d'intérêt. Les profils biologiques ainsi obtenus suite à un tel fractionnement peuvent être caractéristiques d'un échantillon donné et permettre une première comparaison des échantillons entre eux, e.g. profil spécifique d'un site d'échantillonnage, comparaison entrée/sortie de STEU informant sur la persistance, disparition ou apparition de pics, .... En parallèle, l'analyse des profils HPLC permet de sélectionner et d'isoler les pics les plus pertinents à investiguer (selon leur abondance, leur singularité, spécificité, le lien avec l'activité observée, ...) pour identifier les molécules associées et donc potentiellement responsables des activités mises en évidence.

La recherche de l'identité des molécules responsables des activités dans les fractions les plus actives est réalisée par une méthode d'analyse non ciblée utilisant la spectrométrie de masse haute résolution. Cette méthode d'analyse permet d'identifier des composés non recherchés a priori et/ou inconnus par l'obtention d'information sur la formule brute et la structure des molécules. L'identification se finalise par une étape de confirmation structurale qui implique une comparaison dans les mêmes conditions d'analyse avec des étalons analytiques correspondant aux composés suspectés. Une fois identifiées, les molécules étalons sont testées biologiquement avec les bioessais afin d'évaluer leurs activités biologiques et, le cas échéant, confirmer leur contribution à l'activité biologique de l'échantillon initial.

*Pour plus de détails, se reporter au livrable n°03 du projet MICROPOLIS*

**Tableau I. Récapitulatif des bioessais appliqués pour la caractérisation des eaux usées (tâche 2A du projet MICROPOLIS Indicateurs).**

Bioessai	Nom du bioessai	Type de toxicité	Mode d'action	Cellules / Organismes	Analyse sur	Laboratoire	Exemples de molécules ciblées		
<i>In vitro</i>	YES	Activités « perturbations endocriniennes »	Œstrogènes	Levure - Saccharomyces cerevisiae	Extrait organique	SUEZ (CIRSEE)	Hormones oestrogéniques		
	YAS		Androgènes				Hormones androgéniques		
	ER		Œstrogènes	Lignée cellulaire MELN (humaine)		INERIS	Œstrogènes naturels et synthétiques, alkylphénols, produits cosmétiques, bisphénols, phtalates		
	AR		Androgènes	Lignée cellulaire MDA-kb2 (humaine)			Stéroïdes naturels et synthétiques, pesticides, médicaments, bisphénols		
	GR		Glucocorticoïdes	Lignée cellulaire MDA-kb2 (humaine)			Corticoïdes naturels et de synthèse (pharmaceutiques)		
	MR et anti-MR		Minéralo-corticoïdes	Lignée cellulaire HG5LN-hMR (humaine)*			Progestagènes naturels et de synthèse (pharmaceutiques)		
	PR et anti-PR		Progestagène	Lignée cellulaire HELN-PRB (humaine)*			Médicaments, pesticides, stéroïdes, plastifiants, surfactants		
	PXR		Prégnane et xénobiotiques	Lignée cellulaire HG5LN-hPXR (humaine)			Produits de combustions, composées organiques volatils : HAP, PCB, dioxine		
	AhR		Dioxin-like	HAP-like ( <i>Aryl hydrocarbon</i> )			Lignée cellulaire PLHC-1 (poisson)	TOXEM	HAP, PCB,...
	SOS Chromotest		Génotoxicité	Dommages primaires à l'ADN			<i>E. coli</i> génétiquement modifiée (PQ37)		
	Test de cytotoxicité	Cytotoxicité	Mortalité de cellules en culture	Lignée cellulaire RTG2 (poisson)	Echantillon brut	TOXEM	Métaux,...		
<i>In vivo</i>	Test Daphnies	Ecotoxicité	Immobilisation	<i>Daphnia Magna Straus</i>		ANALY-CO	Métaux,...		

\* bioessais réalisés à l'unité INSERM U1194 (sous-traitance)

## 2.2 Enjeu n°2 : Traitement en STEU et toxicité résiduelle

*Evaluation des performances de la STEU de Sophia Antipolis (ozonation) pour le traitement de la toxicité*

*Evaluation des toxicités résiduelles dans le rejet de la STEU*

Pour l'évaluation des performances d'élimination de la toxicité de la STEU de Sophia Antipolis et de son traitement complémentaire par ozonation, la batterie de bioessais *in vitro* et *in vivo* de laboratoire, décrite précédemment, a été appliquée à des échantillons prélevés en 4 points de la STEU (Entrée STEU, effluent secondaire/entrée ozonation, sortie ozonation, sortie STEU). En complément le bioessai « gammare » a également été appliqué aux eaux usées traitées de la STEU des Bouillides (entrée ozonation, sortie ozonation et sortie STEU). Ce bioessai *in vivo* ex-situ consiste en l'exposition de gammare calibrés (population, taille, sexe) à différentes dilutions de l'effluent dans des conditions contrôlées (température, lumière oxygène dissous) et s'appuie sur un ensemble de réponses biologiques mesurées dans le gammare en réponse à cette exposition (mortalité, taux d'alimentation, activité AChE<sup>1</sup> neurotoxicité, reproduction - cycle de mue, fécondité, fertilité-).

La complémentarité de ces bioessais a permis :

- L'évaluation des **performances d'élimination** des micropolluants et de leur toxicité associée, par des procédés de traitement des eaux usées de la STEU de Sophia-Antipolis, dont le **traitement par ozonation**.
- D'identifier, le cas échéant, les **toxicités résiduelles** en sortie de traitement biologique (effluent secondaire), après traitement complémentaire par ozonation et dans le rejet de la STEU

*Pour plus de détails, se reporter aux livrables n°01 et 02 du projet MICROPOLIS*

## 2.3 Enjeu n°3 : Impact du rejet sur la qualité du milieu aquatique

*Evaluation de l'impact du rejet de la STEU sur le milieu récepteur*

*Evaluation de la qualité des milieux aquatiques récepteurs des eaux usées traitées*

Pour l'évaluation de la qualité du milieu récepteur des eaux usées de la STEU des Bouillides et de l'impact du rejet de la STEU des Bouillides sur celui-ci, une approche basée sur différentes stratégies de bio-surveillance et d'indicateurs biologiques a été mise en œuvre :

Au niveau écotoxicologique :

- la **bio-surveillance active : approche *in-situ***. La bio-surveillance active consiste à déployer des organismes d'essai calibrés au laboratoire avant d'être exposés *in situ* pendant une durée fixe sur chaque station de mesure. Dans ce projet, l'organisme modèle est une espèce de crustacé d'eau douce, le gammare (*Gammarus fossarum*), largement présente dans les hydrosystèmes français et européens et ayant un rôle écologique important dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Les gammare sont sélectionnés à partir d'une population de référence en fonction de leur taille, leur sexe pour une durée de 7 à 21 jours, via une méthode d'**encagement** (Figure 5 ; Dedourge et al., 2009, Besse et al., 2013). Celle-ci s'appuie sur la mesure de différentes réponses biologiques à l'issue de la période d'exposition (bioaccumulation, biomarqueurs spécifiques et traits biologiques), pour lesquels des valeurs seuils de contamination biodisponible et de toxicité sont disponibles. Cette méthode d'encagement permet de caractériser la qualité du milieu aquatique en un endroit précis. Le déploiement de cet outil sur un cours d'eau en amont et en aval d'un rejet de STEU peut permettre de caractériser l'empreinte chimique du rejet et son impact toxique sur milieu récepteur.

---

<sup>1</sup> Activité de l'enzyme acétylcholinesterase, indicateur de neurotoxicité

- La **bio-surveillance passive : approche poisson**. Elle consiste à mesurer, chez des poissons prélevés sur le site, un ensemble de biomarqueurs fournissant des éléments d'information sur leur exposition aux contaminants dans le milieu récepteur sur d'éventuelles perturbations des grandes fonctions physiologiques du poisson (neurotoxicité, génotoxicité, toxicité envers la reproduction, immunotoxicité, stress oxydant, biotransformation des contaminants, gestion de l'énergie). Il est à noter toutefois les potentielles difficultés d'interprétation des résultats en termes de contamination chimique du fait de plusieurs facteurs tels que l'adaptation locale des populations, l'effets de facteurs environnementaux ou l'effet habitat.

Au niveau écologique :

- La **bio-indication : étude des communautés piscicoles** L'inventaire piscicole (et calcul de l'Indice Poisson de Rivière, IPR) a pour objectif de caractériser le peuplement piscicole en place en différents points des cours d'eau étudiés. En apportant des informations sur la diversité spécifique et la densité du peuplement, l'inventaire reflète l'état écologique de la rivière.

*Pour plus de détails, se reporter au livrable n°02 du projet MICROPOLIS*

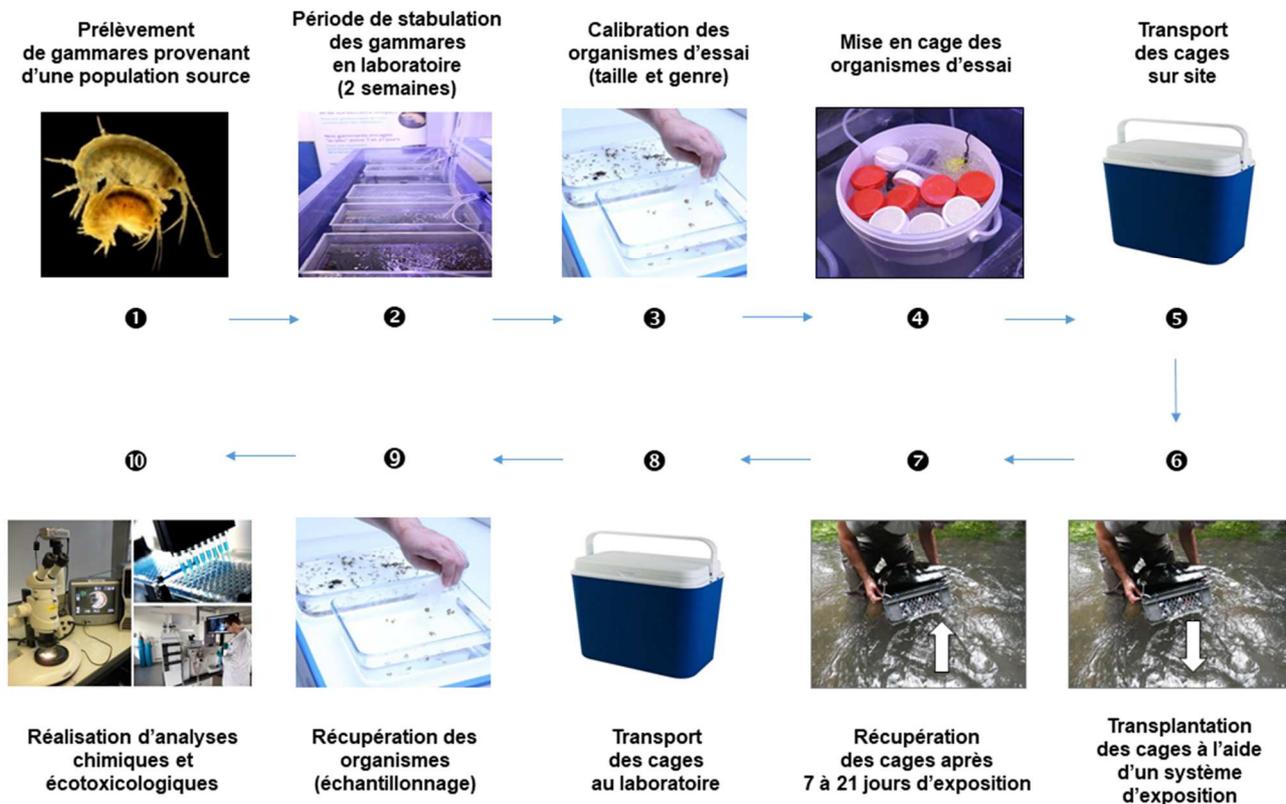


Figure 5 : Etapes de réalisation des bioessais *in situ* "gammare"

## 3 PRINCIPAUX RESULTATS ET CONCLUSIONS

### 3.1 Profils de toxicité de la source au rejet de la STEU de Sophia Antipolis

La complémentarité des bioessais appliqués dans le cadre de cette étude a permis de caractériser le **profil de toxicité** des eaux depuis différentes branches du réseau de collecte des eaux usées jusqu'au rejet de la STEU (Figure 6).

Sur l'ensemble du réseau, cette caractérisation indique que les profils d'activité peuvent varier d'un point à un autre du réseau révélant la présence de différents micropolluants (ou à des niveaux de concentration différents) suivant les branches (voir §3.2.1).

Cette caractérisation a permis également de mettre en évidence une réduction de la toxicité des eaux usées tout au long du traitement même si la présence d'activités génotoxique et perturbateurs endocriniens résiduelles est observable après traitement (voir §3.2.2).

La présentation des résultats d'activités biologiques et d'effet sous la forme de profils est aussi un des développements innovants du projet. Pour cela, un référentiel d'interprétation des résultats a été construit à partir de critères permettant une gradation du potentiel (éco-)toxique des eaux usées :

- des valeurs seuils (dont la VGE de 0,4 ng E2-eq/L pour l'activité œstrogénique)
- les limites de quantification des bioessais PE et ses multiples (x5, x10, x100, x1000)
- le potentiel génotoxique associant à la fois le facteur d'induction spécifique et le facteur de concentration (bioessai SOS Chromotest et de cytotoxicité)

### 3.2 Enjeu n°1 : Réduction à la source

#### 3.2.1 Caractérisation de la toxicité et cartographie du territoire

Les effluents de la STEU des Bouillides présentent un profil de d'activité biologique et d'effet assez atypique, notamment pour certaines activités PE. Les niveaux d'activités oestrogéniques et androgéniques, caractéristiques des eaux usées, sont particulièrement élevés comparés aux valeurs de la littérature. Il n'existe pas (ou très peu) de référence dans la littérature pour évaluer les niveaux d'activités pour les autres bioessais. Toutefois, il est à noter que l'activité GR, quantifiée en différents point du réseau et en entrée de STEU, est considérée comme spécifique des eaux usées d'origines industrielle et/ou hospitalière. Ces observations sont cohérentes avec les différentes origines (urbaines, industrielles, hospitalières) des eaux usées transitant par la STEU.

Les profils de toxicité de différents points du réseau, établis grâce à la batterie de bioessais, ont permis de construire une **cartographie innovante de la toxicité du réseau de collecte** des eaux usées (Figure 7) afin d'avoir une vision globale de l'évolution des caractéristiques des profils de toxicité selon les différentes branches du réseau.

Cette étape de caractérisation a permis d'identifier et de retenir 4 échantillons d'eau sur lesquels une démarche EDA a été appliquée : 2 points du réseau (points 1 et 3), l'eau usée brute en entrée de STEU et le rejet de la STEU. Le choix du point 3 se justifie par la détection d'une activité glucocorticoïde (GR), activité de type « perturbateur endocrinien » mesurée après traitement dans le rejet de la STEU, à plusieurs reprises lors des différentes campagnes de prélèvement. Il s'agit aussi d'un des points qui présente l'activité PXR la plus élevée. Le point 1 se caractérise quant à lui par de fortes activités observées pour es bioessais de génotoxicité, de cytotoxicité et d'écotoxicité. Ces deux points sont localisés sur la branche D du réseau de collecte.

L'étude du rejet de la STEU doit permettre de définir si les composés, identifiés comme responsables des activités biologiques observées aux point 1, 3 et en entrée de STEU, sont éliminés de la phase aqueuse par la STEU ou s'ils présentent un caractère réfractaire aux traitements existants, nécessitant une action de réduction à la source afin d'éviter leur rejet dans le milieu récepteur.

*Pour plus de détails, se reporter au livrable n°01 du projet MICROPOLIS*

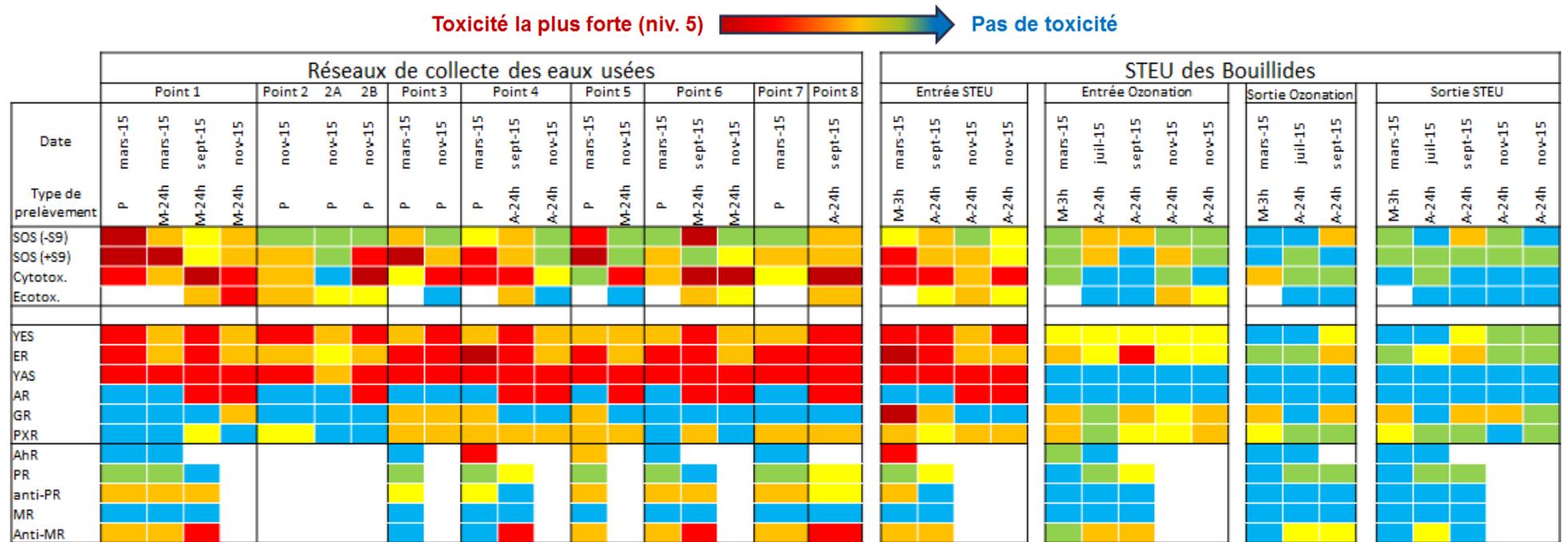


Figure 6. Profils de toxicité en différents points du réseau de collecte et de la STEU des Bouillides. Pour chaque point, chaque case correspond à un échantillon prélevé lors d'une des 5 séries de prélèvement.

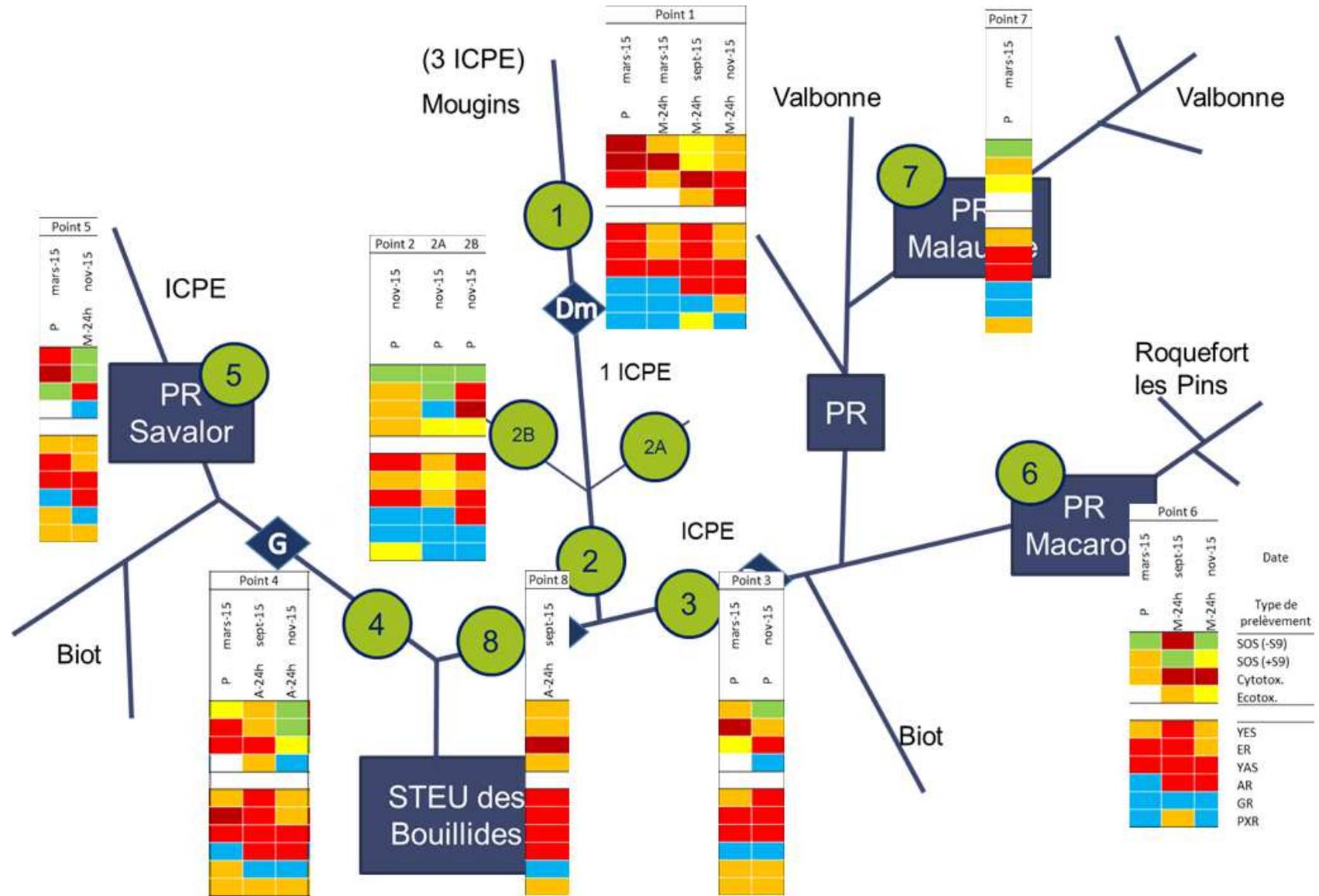


Figure 7. Cartographie des profils de toxicité dans le réseau de collecte des eaux usées de Sophia Antipolis

### 3.2.2 Recherche et identification des micropolluants par les bioessais

L'approche dirigée par l'effet (EDA) a permis de dresser le profil biologique des eaux du point 1, point 3, entrée et sortie de la STEU des Bouillides. Les points 1, 3 et entrée de la STEU ont des profils similaires pour l'activité œstrogénique (ER) et l'activité androgénique/glucocorticoïde (AR/GR). Quelques fractions actives dans ces échantillons (ER : F36 à F38 et F42, F43 ; AR/GR : F58) le sont également dans le profil de sortie de STEU. Ces similitudes suggèrent que les composés actifs sont les mêmes entre les différents sites de prélèvement. La comparaison des profils permet de montrer que les composés œstrogène-mimétiques et ceux induisant l'activité glucocorticoïde sont bien présents dans le réseau aux points 1 et 3. Une fois arrivés en STEU, une partie des composés actifs est éliminée de la phase dissoute par les procédés de traitement alors que certains pics persistent après traitements en sortie de STEU. Le procédé mis en place dans la STEU des Bouillides ne permet donc d'éliminer que de façon partielle les molécules biologiquement actives sur les récepteurs des oestrogènes (F36-38, F42-43) et des glucocorticoïdes (F58) dans la phase dissoute. Ce résultat confirme le constat fait sur la base des profils globaux de toxicités obtenus sur les extraits bruts.

La même procédure EDA appliquée au SOS chromotest n'a pas permis d'identifier de fraction ou de groupe de fractions ayant une activité génotoxique importante ( $SIF > 1,5$ ). Mêmes si certaines fractions isolées présentaient une activité résiduelle ( $1,2 > SIF > 1,5$ ), l'effort d'identification chimique s'est focalisé sur les groupes de fractions présentant des activités de perturbateurs endocriniens importantes et beaucoup plus marquées, de façon à être guidé confortablement pour la mise en œuvre des analyses par spectrométrie de masse haute résolution.

Les analyses non-ciblées effectuées sur les fractions ayant les activités les plus importantes ont permis de suspecter, parmi les centaines de signaux détectés, plusieurs composés en entrée de la STEU et dans le réseau d'eaux usées. Parmi les composés ayant été confirmés, sont identifiés des produits de transformation comme l'oxindole (F12), le O-desméthylvenlafaxine (F12-F13), des composés naturels comme la daidzéine (F12-F13), la pipérine (F46) et des molécules de synthèse comme l'éthylparabène (F21) et le climbazole (F52). Dans la liste de molécules identifiées, la daidzéine et l'éthylparabène sont des ligands connus du récepteur des œstrogènes et leur présence contribue à l'activité œstrogénique des fractions F12-F13 et F21, respectivement. Les autres molécules citées ont été testées pour les bioessais mais n'ont pas présenté d'activité notable, suggérant qu'elles ne contribuaient pas à l'activité détectée dans les fractions analysées. D'autres molécules, non identifiées par la méthode d'analyse utilisée, sont manifestement contributrices mais n'ont pu être identifiées à ce stade.

### 3.3 Enjeu n°2 : Performances de traitement et toxicités résiduelles

Le projet MICROPOLIS a permis de caractériser les différents types d'activité biologique de l'eau usée (activités « perturbateurs endocriniens », génotoxique et cytotoxique) en différents points de la STEU des Bouillides et ainsi suivre leurs évolutions le long de la filière de traitement, soit :

- Entrée STEU
- Après traitement biologique « conventionnel » (sortie biofiltre nitrifiant)
- Après ozonation
- Après ozonation plus biofiltration dénitrifiante (sortie STEU)
- 

#### 3.3.1 Performances de traitement de la STEU « conventionnelle » (entrée STEU / sortie biofiltration nitrifiante)

Comme cela avait pu être observé par l'analyse chimique de micropolluants (Choubert et al., 2017), la première partie de la filière de traitement de la STEU de Sophia Antipolis (traitement primaire + biofiltration) permet un abattement de la toxicité présente dans l'eau usée brute. Toutefois, suivant les types d'activité biologique, l'abattement peut aller de 30 – 70 % à plus de 90% (Figure 8). Ceci est cohérent avec le fait que certains micropolluants sont connus pour être réfractaires aux procédés de traitement des eaux usées car non-biodégradables et hydrophiles (et donc non-adsorbés sur les MES et biomasse).

Toxicité	Cible / Bioessai		% élimination
Génotoxicité	SOS-Chromotest	sans activation	
		avec activation	
Cytotoxicité	Test sur cellules de gonades de truite		
Toxicité aiguë	Inhibition de la mobilité des daphnie		
Activité « perturbateurs endocriniens »	Oestrogénique	YES	
		ER	
	Androgénique	YAS	
		AR	
	Glucocorticoïde	GR	NC
	pregnane X receptor	PXR	
	HAP-like	AhR	
	Progestagène	PR	
		Anti-PR	
	Mineralocorticoïde	MR	ND
Anti-MR			

Légende	
> 90%	
70 - 90%	
30 - 70%	
< 30%	
Non Calculable	
Non Détecté	

Figure 8. Abattement de la toxicité par la STEU « conventionnelle » de Sophia Antipolis

#### 3.3.2 Performances de traitement de l'étape d'ozonation

Le traitement par ozonation de la STEU de Sophia Antipolis a fait l'objet d'une évaluation technique, énergétique et environnementale pour l'élimination des micropolluants prioritaires et émergents lors du projet MICROPOLIS-Procédés (Choubert et al., 2017). Les études menées dans le cadre des tâches 2A et 2B du projet MICROPOLIS Indicateurs (livrables n°01 et n°02) ont permis de compléter cette évaluation par l'utilisation d'une batterie de bioessais *in vitro* et *in vivo* (T2A) et l'ensemble de biomarqueurs issus de l'exposition des gammarès (T2B).

##### Bioessais *in vitro* et *in vivo*

L'étape d'ozonation conduit à une réduction de moyenne à très forte suivant les toxicités résiduelles présentes dans l'effluent secondaire de la STEU des Bouillides. Ces résultats indiquent ainsi que les produits de dégradation de l'ozonation des micropolluants ne conduisent pas à une augmentation de la toxicité après traitement.

### Bioessai « Gammare »

L'effluent secondaire (après traitement biologique « conventionnel ») de la STEU de Sophia Antipolis présente une toxicité marquée sur le gammare pour une large gamme de (bio)marqueurs.

Après ozonation, on note une amélioration plus ou moins marquée de ces différents indicateurs :

- Réduction de la toxicité aiguë « mortalité », mise en lumière par une augmentation du taux de survie de 20 à 50% suivant les campagnes, taux de dilution et durée d'exposition.
- Récupération de la prise alimentaire (+ 20 à 50% suivant les campagnes et taux de dilution). Elle n'est toutefois jamais complète pour l'effluent non dilué.
- Réduction des effets de perturbation endocriniennes sur le cycle de mue (retour au niveau du témoin après traitement) et la fécondité. Les effets restent toutefois prononcés dans l'effluent (non dilué) après traitement.

### 3.3.3 Toxicités résiduelles dans les eaux traitées

#### Bioessais *in vitro* et *in vivo*

Les bioessais *in vitro* attestent de la présence de micropolluants organiques multiples capables d'interférer avec différentes cibles (récepteurs) des PE. Pour certaines activités *in vitro*, les niveaux mesurés dans l'effluent s'avèrent supérieurs à des valeurs seuils traduisant un risque potentiel pour les populations d'organismes sauvages exposées récemment proposées dans la littérature :

- **L'activité œstrogénique** peut présenter des niveaux de contamination élevés dans l'effluent secondaire (0,5 – 50 ng E2-eq/L). Cette activité résiduelle est (fortement) supérieure à la valeur guide environnementale (VGE) de 0,4 ng E2-eq/L (Jarošová et al., 2014; Kunz et al., 2015) et indique un potentiel risque dans le milieu récepteur des eaux usées traitées du fait du faible taux de dilution de l'effluent par la Bouillide. La réduction complémentaire apportée par l'étape d'ozonation (de 70 à >90%) permet de diminuer l'activité résiduelle observée dans le rejet de la STEU (globalement sous la VGE) diminuant ainsi fortement le risque environnementale lié à l'activité perturbateur endocrinien œstrogénique.
- **l'activité glucocorticoïde**, bien que non détectée systématiquement en entrée de STEU (avec la souche MDA-kb2), est toujours quantifiée dans l'effluent secondaire à des valeurs relativement élevées par rapport à celles reportées dans la littérature (Creusot et al., 2014; Leusch et al., 2017). Le traitement par ozonation permet une réduction de cette activité (> 70%) mais pas son élimination totale ; elle est donc encore présente dans le rejet de la STEU.
- l'activité PXR présente dans l'effluent secondaire des niveaux d'activité similaires à ceux référencés dans la littérature (gamme haute). Cette activité est pourtant partiellement éliminée par le traitement primaire et secondaire de la STEU (30 – 70%). Le traitement tertiaire par ozonation, aux doses testées, contribue à la réduction complémentaire de l'activité avant rejet comprise entre 30 et 70%. Une valeur seuil (environnementale) de 0,4 µg SR-eq/L a été proposée pour l'activité PXR par van der Oost et al. (2016). Cette valeur n'est qu'indicative car elle ne fait pas l'objet d'un consensus scientifique. Toutefois, il est à noter que dans l'effluent secondaire, l'activité résiduelle reste systématiquement supérieure à cette proposition de VGE. Suivant les campagnes de prélèvement, l'ozonation permet de passer sous cette valeur seuil ou de s'en rapprocher fortement.

#### Bioessai « Gammare »

Les effets toxiques observés chez le gammare dans cette étude montrent la présence d'une contamination chimique biodisponible dans les effluents en sortie de STEU, malgré la réduction apportée par le traitement par ozonation. Ces effets sont particulièrement forts dans l'effluent non dilué mais persistent pour certains dans l'effluent dilué (33%). Ces résultats suggèrent un possible impact sur le milieu récepteur des eaux usées traitées.

### 3.4 Enjeu n°3 : Evaluation de l'impact du rejet de la STEU et de la qualité du milieu récepteur

#### Encagement de « Gammare » »

Que ce soit pour les concentrations en métaux et composés organiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques et composés organochlorés) mesurées dans les gammare ou bien les réponses des marqueurs d'effets toxiques (survie, comportement alimentaire, reprotoxicité et neurotoxicité), les résultats de ces différents bioessais sont comparés à des valeurs seuils définies selon une méthode développée par le laboratoire d'écotoxicologie d'Irstea (Bioaccumulation - Besse et al., 2013; Taux d'alimentation – Coulaud et al., 2011; Neurotoxicité - Xuereb et al., 2009; Reprotoxicité – Geffard et al., 2010). Ces valeurs seuils tiennent compte de la variabilité naturelle des réponses suivies liée à l'impact de facteurs de confusion environnementaux comme la température qui peut modifier significativement les niveaux de réponses des marqueurs suivis, même en conditions contrôle (sans apport de contaminants chimiques). L'utilisation de ces valeurs seuils est valide si les conditions environnementales lors de l'exposition des organismes sont comprises dans une gamme définie de température (7 à 20°C), de pH (6,3 à 8,9), d'oxygène (supérieur à 5 mg/L) et de conductivité (100 à 1000 µS/cm).

Les analyses chimiques (bioaccumulation) et d'écotoxicité réalisées à partir de gammare encagés *in situ* pendant 7 à 21 jours ont permis de caractériser l'empreinte chimique du rejet de la station d'épuration sur la Bouillide, d'évaluer son impact toxique et de le suivre jusqu'à la confluence avec la Brague.

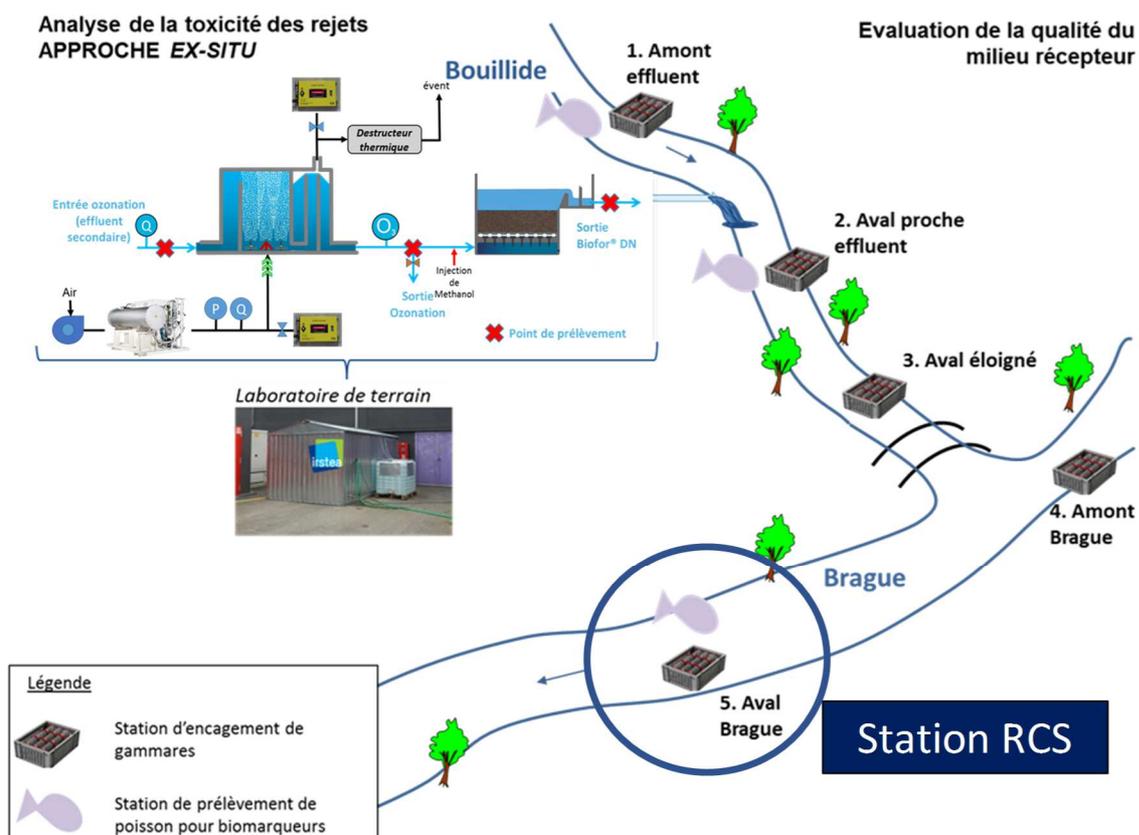


Figure 9. Répartition des points d'encagement des gammare (*in situ*) et de prélèvements des poissons (bio-surveillance passive)

Concernant la qualité du milieu en amont du rejet ou de la confluence entre la Bouillide et la Brague, on observe que les deux stations amont montrent des effets toxiques sur les gammare encagés. Au niveau de la Bouillide, une inhibition de l'activité alimentaire a été notée lors de la première

campagne de terrain. Au niveau de la Brague, une mortalité conséquente des organismes femelles en première campagne ainsi qu'une inhibition de l'activité acétylcholinestérase (neurotoxicité liée à la présence de certains insecticides), et une perturbation endocrinienne (désynchronisation entre le cycle de mue et le développement ovocytaire) ont été mesurées en deuxième campagne. Les effets toxiques observés montrent que la Bouillide n'est pas exempte de perturbations avant rejet des eaux traitées dans le milieu récepteur, et que des sources de contamination sont présentes sur la Brague en amont de la confluence avec la Bouillide. Ce constat appuie l'intérêt de développer et d'utiliser des valeurs seuils pour caractériser la qualité du milieu récepteur avant le rejet d'un effluent ; ceci de manière à pouvoir évaluer plus précisément l'impact du rejet sur le milieu récepteur

Sur la Bouillide en aval direct de la station d'épuration, une mortalité importante a été mesurée lors de la campagne 2 en période d'étiage marqué (l'effluent constituant la majorité des apports en eau en aval du rejet). Lors des campagnes 1 et 3, on observe des effets marqués sur le comportement alimentaire du gammare (inhibition de l'alimentation supérieure à 60%).

Concernant les conditions d'exposition *in situ*, le suivi en continu de la conductivité et de l'oxygène à l'amont et à l'aval du rejet montre une baisse marquée des teneurs en oxygène en aval direct du rejet à des niveaux inférieurs à la limite basse d'applicabilité pour l'encagement de gammares. Les faibles niveaux d'oxygène dissous dans le cours d'eau peuvent impacter les organismes encagés et rendent donc plus difficile à relier les effets observés avec la chimie du rejet. En aval de la confluence Brague/Bouillide, des effets sur la survie et sur le taux d'alimentation ont été mesurés lors de la première campagne à des niveaux plus faibles qu'en aval de la station d'épuration. Ces résultats montrent que l'utilisation de telles réponses biologiques permet de tracer sur le linéaire d'un cours d'eau une toxicité du milieu à l'aval de la STEU jusqu'à la confluence (effet de dilution).

Concernant la bioaccumulation de métaux et de composés organiques dans les gammares, aucune substance n'a été mesurée à des concentrations biodisponibles anormales en comparaison au seuil de contamination définie par Biomae sur plusieurs centaines de stations de mesure expérimentées en France. Parmi les substances chimiques suivies au cours de cette étude, les il s'agit principalement de substances prioritaires de la Directive Cadre Eau, assez peu représentatives des substances d'intérêt qui ont été caractérisées dans le rejet de station d'épuration. La liste des substances suivies dans les gammares pourrait donc être étendue aux substances chimiques mesurées dans l'effluent.

### **Bio-surveillance passive : biomarqueurs du poisson**

Les résultats obtenus avec les poissons semblent essentiellement indiquer une situation de stress immunitaire. En effet, les analyses des autres biomarqueurs biochimiques ne montrent aucune différence entre l'amont et l'aval. Ce stress immunitaire proviendrait plutôt de microorganismes (rejetés par les STEU). Cependant, il n'est pas possible d'exclure totalement l'effet de polluants car le système immunitaire est également sujet à modulation par de nombreux stress chimiques.

En complément, il est à noter l'absence de poissons en aval direct du rejet. Sur le site aval de la Brague, après la confluence avec la Bouillide, les poissons présentent une capacité de reconnaissance et d'adhésion des pathogènes stimulée, sans toutefois pouvoir mettre en œuvre la destruction du pathogène (faible pourcentage d'internalisation, réduction de la présence en lysosome et pas d'induction de la flambée oxydative). L'ensemble de ces résultats peuvent expliquer le taux anormal de parasitisme et le stress immunitaire observés chez les organismes prélevés à la confluence entre la Bouillide et la Brague.

## 4 SYNTHÈSE ET RECOMMANDATIONS

### La démarche bio-analytique pour la recherche de sources de micropolluants :

Ce projet a confirmé l'intérêt de l'utilisation d'une **batterie d'analyses biologiques**, couvrant différents types d'activités ou d'effets biologiques pour la recherche de sources de micropolluants problématiques dans le réseau de collecte des eaux usées. La réalisation de profils de toxicité a permis, d'une part, de caractériser les eaux usées brutes prélevées dans les réseaux de collecte (cartographie, identification de « hotspots ») et d'autre part, d'identifier des activités persistantes en sortie de station de traitement des eaux usées. Cela a aussi permis de sélectionner des points de prélèvement clés pour la recherche, via la démarche EDA, des micropolluants responsables de ces toxicités.

Certains bioessais comme les tests de toxicité aiguë (test daphnies) et de cytotoxicité sont toutefois plus pertinents pour le premier objectif (cartographie, application aux eaux usées brutes) du fait de la faible fréquence de détection d'activité toxique après traitement conventionnel en station de traitement des eaux usées.

Les bioessais *in vitro* d'activités perturbateurs endocriniens et génotoxique sont, pour leur part, applicables et pertinents pour les deux objectifs mentionnés (cartographie et identification de d'activité persistante/résiduelle). Dans la batterie de bioessais utilisée dans cette étude, les activités oestrogéniques et androgéniques étaient détectées au moyen de deux types de bioessais, l'un basé sur levure (YES et YAS) et l'autre sur culture cellulaire (lignée cellulaire MELN et MDA-kb2).

Pour l'activité œstrogénique, la comparaison des résultats des bioessais YES et MELN confirme leur redondance en termes de tendance tout au long de la filière de traitement. Toutefois, le bioessai sur culture cellulaire quantifie des activités biologiques plus fortes, en valeurs absolues exprimées en équivalent-17 $\beta$ -estradiol, ce qui suggère une plus grande sensibilité de ce bioessai. Il est, par conséquent, conseillé de n'utiliser qu'un seul de ces deux bioessais pour couvrir ce mode d'action, de préférence le bioessai MELN.

Cette conclusion n'est pas aussi évidente pour les bioessais YAS et MDA-kb2 visant à détecter l'activité androgénique. Alors que le bioessai YAS permet la quantification sélective de l'activité androgénique, les réponses du bioessai sur culture cellulaire MDA-kb2 sont plus difficiles à interpréter du fait que cette souche possède à la fois des récepteurs pour les activités androgénique et glucocorticoïde. Ces différentes activités sont pertinentes à suivre mais de préférence avec bioessais mono-récepteurs afin de fiabiliser l'interprétation des résultats.

Les autres activités « perturbateurs endocriniens » étudiées sont intéressantes mais elles présentent aujourd'hui certaines limites quant à une utilisation opérationnelle à large échelle :

- le manque de valeurs seuil de référence, pour mieux caractériser l'activité observée (et le risque associé)
- le manque de données de comparaison de réponses de différents bioessais pour une même activité (par exemple l'activité PXR)
- le faible nombre de données de la littérature disponibles car ce sont des bioessais récemment développés ou encore peu déployés dans le domaine de l'environnement.

Une des limites de cette démarche est qu'elle n'a été appliquée que sur la **fraction dissoute** des eaux usées. Par conséquent, elle n'intègre pas les contaminants qui sont présents dans la phase particulaire des eaux usées résiduaires, ni totalement ceux qui sont éliminés par adsorption sur les MES et la biomasse lors du traitement en STEU.

Concernant la démarche EDA, son application sur les extraits d'eaux du Point 1, Point 3, entrée de STEU et sortie de STEU a permis d'identifier de façon certaine plusieurs composés dont certains composés perturbateurs endocriniens non recherchés a priori qui se sont avérés actifs sur les bioessais utilisés. Ce projet a également été l'occasion d'éprouver la mise en œuvre d'un nouveau protocole de fractionnement en format microplaque qui, combiné à un automate de

dilution préalable au fractionnement, a permis d'augmenter de façon significative les capacités de criblage des fractions par les bioessais *in vitro*, étape initialement limitante en termes de temps au sein dans la démarche EDA. Ce travail ouvre donc des pistes méthodologiques importantes pour améliorer l'opérationnalité future de l'outil EDA dans un contexte de surveillance des eaux (e.g. contrôle d'enquête).

Cependant, un nombre conséquent de composés n'a pas pu être identifié formellement actuellement soit par manque de disponibilité de l'étalon analytique dans le commerce, soit par manque de moyen pour approfondir la recherche en mode manuel d'une structure probable. Actuellement, les bibliothèques spectrales ne contiennent qu'une quantité limitée de spectres. Le processus d'identification peut être assez rapide lorsque les molécules sont déjà répertoriées dans des bibliothèques spectrales. L'interrogation de ces bases de données permet de donner une structure probable voire un nom à une molécule inconnue, lorsqu'il y a correspondance entre les spectres de fragmentation théoriques et ceux observés. Lorsqu'il n'y a pas de correspondance, la recherche de structure doit s'effectuer manuellement. Pour aider à l'interprétation des données, des logiciels *in silico* (e.g. Metfrag, Molecular structure correlator) sont actuellement disponibles mais les résultats générés ne sont pas toujours concluants et ces algorithmes demandent à être améliorés. Les efforts de recherche au niveau national et international sont actuellement axés sur l'amélioration des algorithmes et l'enrichissement continu des bases de données spectrales. Concernant l'absence d'étalon analytique, il est éventuellement possible de faire synthétiser le composé mais cette étape est onéreuse.

### **La démarche bio-analytique pour l'évaluation de l'impact potentiel sur le milieu récepteur des eaux usées traitées et des performances des procédés de traitement des micropolluants :**

La caractérisation des eaux usées a permis de confirmer le rôle des différentes étapes de traitement de la STEU pour la réduction de la toxicité des effluents. Ceci a été particulièrement mis en évidence pour l'étape d'ozonation tertiaire (ciblant spécifiquement les micropolluants) qui permet de réduire les activités/toxicités résiduelles et/ou réfractaires aux traitements physico-chimiques et biologiques des filières conventionnelles des STEU.

Elle a aussi permis d'identifier des toxicités potentiellement problématiques car toujours présentes en sortie de STEU. Pour l'activité œstrogénique, nous disposons d'un large nombre de résultats d'analyses d'eaux usées (brutes ou traitées) référencés dans la littérature scientifique ainsi que d'une proposition de valeur guide environnementale (*trigger value*) faisant l'objet d'un consensus parmi les experts du domaine permettant d'interpréter le suivi de ce paramètre. Par conséquent, il est fortement recommandé de suivre cette activité dans les eaux usées traitées autant pour évaluer l'impact potentiel de l'effluent rejeté, que pour évaluer la pertinence et la performance d'un traitement complémentaire pour la réduction de cette activité.

Pour les autres activités « perturbateurs endocriniens » ou génotoxique, une des limites rencontrées lors de cette étude est le fait qu'**il n'existe pas encore**, pour la plupart des bioessais testés, **de valeurs seuils** faisant consensus permettant de caractériser l'impact potentiel des eaux usées traitées sur le milieu récepteur et la santé humaine. Des travaux de recherche sont toutefois en cours sur ce sujet et des discussions sont très avancées au niveau européen, en particulier pour les activités « perturbateurs endocriniens », AR, GR, PR, dioxin-like et PXR.

Le bioessai *in vivo* « gammarets » a permis d'apporter des éléments complémentaires d'un point de vue écologique à ceux de la démarche bio-analytique (orientés « risque d'effet toxique »), autant pour l'évaluation des procédés complémentaires de traitement et de la toxicité du rejet (approche *ex-situ*), que pour identifier la qualité du milieu et l'impact du rejet de la STEU sur celui-ci (approche *in-situ*).

Dans une perspective de suivi des impacts sur le milieu, il semble nécessaire de recourir à différents organismes représentatifs de différents groupes taxonomiques (invertébrés, poissons) ou niveaux trophiques, du fait de leur diverses sensibilités aux contaminants (notamment en fonction du mode d'action de ces derniers). Dans ce projet, les producteurs primaires n'ont pas

été ciblés, il existe toutefois de outils biologiques qui permettent de le faire (ex : bioessai d'inhibition de la photosynthèse).

Les travaux menés à Sophia Antipolis montrent également la difficulté pouvant être rencontrée en utilisant des approches de bio-surveillance active. L'absence de poissons sur le site aval proche, permet de mettre en lumière un impact du rejet sur le cours d'eau. Toutefois cette observation ne suffit pas pour identifier /expliquer les raisons de cette absence : micropolluants spécifiques, taux de dilution trop faible, manque d'oxygène dissous ?

Une des limites rencontrées est le temps de réponse de ces outils d'exposition sur plusieurs (dizaines de) jours. Des développements sont en cours pour bénéficier du côté intégrateur du modèle biologique avec une réponse instantanée/rapide. Ce type d'amélioration permettrait d'aller plus loin que l'emploi de ces outils à des fins de diagnostic sinon à de la bio-surveillance (active).

L'identification et la quantification de la contribution des différents facteurs expliquant les toxicités observées restent des points d'amélioration de ces outils biologiques. Comme observé ici, au-delà de la pression exercée par la présence de micropolluants résiduels (non-identifiés et non quantifiés), il a été noté que les concentrations en oxygène dissous et en nitrites pouvaient avoir une influence non négligeable sur la qualité du milieu aquatique et l'impact du rejet de la STEU.

	Bioessais <i>in vivo</i> (labo)	Bioessais <i>in vitro</i>	Démarche EDA	Bioessai <i>in vivo</i> ex-situ (gammare)	Biomonitoring»	
					Actif - Encagement de gammare	Passif « biomarqueurs poissons
<b>Caractérisation</b> de la toxicité des eaux usées	Applicable à l'intégralité du système d'assainissement Complémentarité des différents effets/activités biologiques pour la création de <b>profils de toxicité</b> et de <b>cartographie « toxicité » du réseau</b> . Identification de points d'intérêt			Applicable à l'effluent secondaire et tertiaire		
<b>Identification</b> des micropolluants		Identification de fractions actives par bioessai				
Evaluation des <b>performances de traitement</b>	Applicable au traitement conventionnel (tous) et aux traitements avancés ( <i>in vitro</i> ) Prise en compte des sous-produits d'oxydation et de transformation			Applicable aux <b>traitements avancés</b> Prise en compte des sous-produits d'oxydation et de transformation		
Evaluation des <b>Risques environnementaux</b> (NQE, valeur seuil)		Comparaison à une valeur seuil pour l'activité œstrogénique A développer pour les autres bioessais				
Evaluation de <b>l'impact du rejet sur la qualité du milieu</b>				Caractérisation de l'impact potentiel via le test de plusieurs taux de dilution	Caractérisation de l'empreinte chimique du milieu et de l'impact toxique du rejet sur le milieu récepteur	Information sur l'exposition aux contaminants dans le milieu récepteur pour différentes grandes fonctions physiologiques du poisson. Influence de facteurs environnementaux

Outil/méthode opérationnel et disponible dans le commerce

Nécessite un développement complémentaire et/ou un transfert industriel

## 5 REFERENCES

- Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse 2018 - note sur la réalisation des diagnostics amont par l'intermédiaire d'analyses chimiques, 6 p, disponible en ligne : <http://www.eaurmc.fr>
- Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O. (2013). Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Research*. 47 (2) 650-660.
- Choubert, J.-M., Penru, Y., Mathon, B., Guillon, A., Esperanza, M., Crétollier, C., Dherret, L., Daval, A., Masson, M., Lagarrigue, C., Miège, C., Coquery, M., 2017. Elimination de substances prioritaires et émergentes des eaux résiduaires urbaines par ozonation : évaluation technique, énergétique et environnementale. Rapport final du projet Micropolis-Procédés.
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., ... Chaumot, A. (2011). In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research*, 45(19), 6417–6429.
- Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Tapie, N., Pardon, P., Brion, F., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, J.-M., Budzinski, H., 2014. Identification of Synthetic Steroids in River Water Downstream from Pharmaceutical Manufacture Discharges Based on a Bioanalytical Approach and Passive Sampling. *Environ. Sci. Technol.* 48, 3649–3657. doi:10.1021/es405313r
- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Charmantier-Daures, M. (2010). Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(10), 2249–2259.
- Jarošová, B., Bláha, L., Giesy, J.P., Hilscherová, K., 2014. What level of estrogenic activity determined by in vitro assays in municipal waste waters can be considered as safe? *Environ. Int.* doi:10.1016/j.envint.2013.12.009
- Kunz, P.Y., Kienle, C., Carere, M., Homazava, N., Kase, R., 2015. In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 106, 107–115. doi:10.1016/j.jpba.2014.11.018
- Leusch, F.D.L., Neale, P.A., Hebert, A., Scheurer, M., Schriks, M.C.M., 2017. Analysis of the sensitivity of in vitro bioassays for androgenic, progestagenic, glucocorticoid, thyroid and estrogenic activity: Suitability for drinking and environmental waters. *Environ. Int.* 99, 120–130. doi:10.1016/j.envint.2016.12.014
- Malaj, E., von der Ohe, P.C., Grote, M., Kühne, R., Mondy, C.P., Usseglio-Polatera, P., Brack, W., Schäfer, R.B., 2014. Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 9549–9554. doi:10.1073/pnas.1321082111
- van der Oost, R., Sileno, G., Suárez Muñoz, M., 2016. Ecological key factor toxicity. Background document on effect-based trigger values for environmental water quality. Amersfoot.
- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., & Geffard, O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology*, 94(2), 114–122.