



**HAL**  
open science

## Évaluation de l'écotoxicité des eaux usées de la station de traitement de Sophia Antipolis et de leurs impacts sur la qualité du milieu récepteur

A. Francois, N. Bado Nilles, G. Jubeaux, Olivier Geffard

### ► To cite this version:

A. Francois, N. Bado Nilles, G. Jubeaux, Olivier Geffard. Évaluation de l'écotoxicité des eaux usées de la station de traitement de Sophia Antipolis et de leurs impacts sur la qualité du milieu récepteur. [Rapport de recherche] irstea. 2018, pp.80. hal-02608479

**HAL Id: hal-02608479**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02608479>**

Submitted on 16 May 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



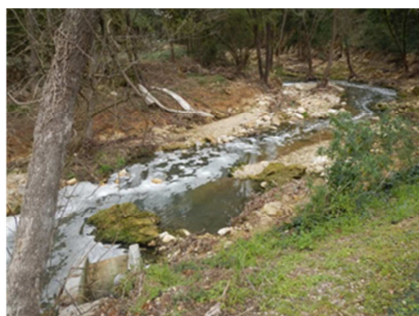
## PROJET MICROPOLIS Indicateurs

Tache 2B :

# Evaluation de l'écotoxicité des eaux usées de la station de traitement de Sophia Antipolis et de leurs impacts sur la qualité du milieu récepteur

## *Livrable 2*

Rapport final – mars 2018



Adeline FRANCOIS,  
Anne BADO-NILLES,  
Guillaume JUBEAUX,  
Olivier GEFFARD.



## TABLES DES MATIERES

1.	INTRODUCTION .....	7
1.1.	CONTEXTE.....	7
1.2.	OBJECTIFS .....	8
1.3.	METHODOLOGIES MISES EN PLACE .....	8
1.3.1.	L'approche en conditions contrôlées - approche <i>ex-situ</i> .....	10
1.3.2.	Les approches déployées dans le milieu récepteur .....	10
2.	MATERIELS ET METHODES .....	12
2.1.	PRELEVEMENTS D'ORGANISMES.....	12
2.1.1.	<i>Gammarus fossarum</i> .....	12
2.1.2.	Poissons.....	12
2.2.	METHODOLOGIES D'EXPOSITION DES GAMMARES.....	13
2.2.1.	Méthodologie <i>ex-situ</i> .....	13
2.2.2.	Méthodologie <i>in-situ</i> .....	15
2.3.	PHYSICO-CHIMIE DES MILIEUX ETUDIES .....	17
2.3.1.	Physico-chimie de l'effluent .....	17
2.3.2.	Physico-chimie du milieu.....	17
2.4.	MARQUEURS ETUDIES.....	17
2.4.1.	Synthèses des tests effectués à partir de <i>Gammarus fossarum</i> .....	17
2.4.2.	Traits d'histoire de vie .....	18
2.4.3.	Biomarqueurs .....	22
2.4.4.	Bioaccumulation de micropolluants métalliques et organiques dans le gammare .....	24
2.5.	EXPRESSION DES RESULTATS.....	25
2.5.1.	Approche <i>ex-situ</i> : comparaison au témoin d'exposition.....	25
2.5.2.	Approche <i>in-situ</i> : comparaison aux référentiels .....	25
2.5.3.	Bioaccumulation des composés métalliques et organiques dans le gammare.....	26
2.5.4.	Poisson : comparaison amont-aval .....	27
3.	RESULTATS.....	28
3.1.	EFFETS DES TRAITEMENTS SUR LA TOXICITE DE L'EFFLUENT : TESTS <i>EX-SITU</i> .....	28
3.1.1.	Physico-chimie de l'effluent .....	28
3.1.2.	Traits d'histoire de vie .....	28
3.1.3.	Biomarqueurs .....	33
3.1.4.	Bioaccumulation de micropolluants métalliques et organiques dans le gammare .....	33

3.2.	IMPACT SUR LE MILIEU RECEPTEUR.....	35
3.2.1.	Etude <i>in-situ</i> : <i>Gammarus fossarum</i> .....	35
3.2.2.	Etude sur le peuplement piscicole autochtone.....	41
4.	DISCUSSION.....	43
4.1.	EVALUATION DE LA QUALITE DU REJET ET IMPACT SUR LE MILIEU RECEPTEUR.....	43
4.1.1.	Etude <i>Ex-situ</i> : toxicité des effluents de la station d'épuration et évaluation de l'efficacité des traitements.....	43
4.1.2.	Impact sur le milieu récepteur .....	44
4.2.	CONCLUSION .....	46
	Références.....	47
	ANNEXES.....	50

ANNEXE 1 : Rapport d'étude : Réalisation de pêches électriques dans la Brague et la Bouillide, Indice Poisson Rivière, Conseils Scientifiques des Iles de Lerins, 2015. 24

ANNEXE 2 : Liste des composés métalliques et organiques dosés dans les gammars dans les campagnes *ex-situ* et *in-situ*

ANNEXE 3 : Caractéristiques chimiques des effluents

## TABLEAUX

Tableau 1 : Déroulement des études réalisées pour caractériser la toxicité des effluents depuis la sortie du traitement secondaire jusqu'à l'impact du rejet dans le milieu .....	10
Tableau 2 : Codification des conditions d'exposition des expérimentations réalisées entre juin 2015 et avril 2016.....	15
Tableau 3 : Anions et cations analysés lors des expérimentations <i>ex-situ</i> et méthodes utilisées.....	17
Tableau 4 : Description des biotests étudiés par condition d'exposition. ....	18
Tableau 5 : Biomarqueurs mesurés et références associées .....	24
Tableau 6: Concentrations ponctuelles en NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> dans les témoins et en entrée et sortie de la chaîne de traitement complémentaire (IIR, Bf).....	28
Tableau 7 : Survie moyenne des mâles (moy, n=4) exprimée en pourcentage du témoin, pour les différentes conditions testées (les effluents IIR, O3, Bf à 11, 33 et 100%), au cours des trois campagnes, après 7 jours d'exposition .....	28
Tableau 8: Survie moyenne des femelles (moy, n=3) exprimée en pourcentage du témoin pour les différentes conditions testées (les effluents IIR, O3, Bf à 11, 33 et 100%) et pour les trois campagnes expérimentales, après une exposition de 21 jours maximum.. ....	29
Tableau 9 : Teneurs en micropolluants métalliques, exprimées en µg/g de poids sec, dans les gammars exposés aux 3 effluents bruts et à la condition témoin pour les campagnes de juin et septembre 2015, et pour lesquels une valeur seuil est disponible.....	33
Tableau 10: Teneurs en micropolluants métalliques, exprimées en µg/g de poids sec, dans les gammars exposés aux 3 effluents non dilués et à la condition témoin au cours des campagnes de juin et septembre 2015, et pour lesquels les valeurs seuils ne sont pas disponibles.....	34
Tableau 11: Teneurs en micropolluants organiques, exprimées en ng/g de poids sec dans les gammars exposés aux 3 effluents bruts et à la condition témoin au cours des campagnes de juin et septembre 2015, disposant d'une valeur seuil. ....	34
Tableau 12 : Paramètres physico-chimiques suivis dans les milieux étudiés .....	36
Tableau 13: Résultats d'analyse des paramètres majeurs mesurés dans la Bouillide lors de la campagne 3, le 13 avril 2016.....	37
Tableau 14: Effets toxiques mesurés dans les stations étudiés sur la Brague et la Bouillide. ....	39
Tableau 15 : Teneurs en micropolluants métalliques exprimés en µg/g de poids sec dans les gammars après une semaine d'encagement pour les campagnes 1 et 2 et pour lesquels il existe des valeurs seuils. ....	40
Tableau 16 : Résultats des biomarqueurs mesurés dans les Chevesnes prélevés dans la Brague le 23 septembre 2015. ....	42
Tableau 17 : Listes des composés métalliques.....	Annexe 2
Tableau 18 : Listes des composés organiques.....	Annexe 2
Tableau 19 : Concentrations ponctuelles en anions et cations mesurées dans la condition témoin et les 3 effluents étudiés (IIR, O3, Bf).....	Annexe 3

## FIGURES

Figure 1 : Schéma de la filière de traitement de l'usine des Bouillides .....	8
Figure 2 : Schéma de la localisation des différents points d'études. ....	9
Figure 3 : Schéma expérimental précisant les conditions étudiées pour la STEU des Bouillides par la méthode <i>ex-situ</i> au cours de trois campagnes entre juin 2015 et avril 2016.....	15
Figure 4: Plan de localisation des stations de mesure <i>in-situ</i> .....	16
Figure 5 : Méthode utilisée pour la mesure du taux d'alimentation lors des expérimentations <i>ex-situ</i> et <i>in-situ</i> .....	19
Figure 6 : Déroulement du cycle de mue, principe méthodologique du test de reproduction et critères d'identification des stades de mues et embryonnaires .....	20
Figure 7 : Schéma de la procédure utilisée pour déterminer le stade de mue des organismes.....	21
Figure 8 : Schéma de la démarche utilisée pour mesurer les paramètres biologiques de reproduction. ....	21
Figure 9 : Taux d'alimentation (moy $\pm$ E.T ; n = 4) exprimé en pourcentage du témoin pour les différentes conditions testées (les effluents IIR, O3, Bf à 11, 33 et 100%) et pour les trois campagnes expérimentales.....	30
Figure 10 : Distribution des stades de mue observés chez les ♀ après exposition de 21 jours maximum dans les différentes conditions testées (les effluents IIR, O3, Bf à 11, 33 et 100%) et pour les campagnes expérimentales de sept 2015 et avril 2016. ....	31
Figure 11 : Fertilité exprimée en pourcentage d'ovocytes produits par rapport au nombre d'ovocytes moyen dans la condition témoin, après une exposition des ♀ de 21 jours au maximum, dans les différentes conditions testées (les effluents IIR, O3, Bf à 11, 33 et 100%), pour les campagnes expérimentales de sept 2015 et avril 2016.....	32
Figure 12 : Fécondité exprimée en pourcentage d'embryons produits par rapport au nombre d'embryons moyen de la condition témoin, après une exposition des ♀ de 21 jours au maximum, dans les différentes conditions testées (les effluents IIR, O3, Bf à 11, 33 et 100%) pour les campagnes expérimentales de sept 2015 et avril 2016.....	32
Figure 13: Activité acétylcholinestérase (moy $\pm$ E.T ; n = 5) exprimée en pourcentage du témoin pour les différentes conditions testées (les effluents IIR, O3, Bf à 11, 33 et 100%) et pour les trois campagnes expérimentales.....	33
Figure 14 : Chronique de conductivités et de concentrations en oxygène dissous mesurés en continu à l'amont (en bleu) et à l'aval (en rouge) du rejet de la station d'épuration au cours de la campagne 3 (du 7/04/16 au 20/04/16). ....	37

## ILLUSTRATIONS

Illustration 1 : Photographie aérienne de l'usine des Bouillides (crédits : SUEZ) .....	8
Illustration 2 : Photographies d'un prélèvement de gammares .....	12
Illustration 3 : Représentation schématique des différents sites d'étude sur la Brague et les Bouillides. .....	13
Illustration 4 : Méthodologie de l'exposition <i>ex-situ</i> .....	14
Illustration 5 : Photographies des cages et du système d'immersion utilisés pour une exposition <i>in-situ</i> .....	16
Illustration 6 : Photographie au microscope optique d'une griffe de périopode de <i>Gammarus fossarum</i> (x200) permettant la détermination du stade de mue .....	22
Illustration 7 : Photographie au microscope optique d'ovocytes de <i>Gammarus fossarum</i> (x50) permettant la mesure de la surface ovocytaire moyenne .....	22

# 1. INTRODUCTION

## 1.1. CONTEXTE

La Directive Cadre Européenne sur l'Eau (DCE) vise à atteindre et/ou préserver un « bon état » des masses d'eau sur l'ensemble du territoire européen. Elle impose pour cela un suivi de la qualité « écologique » et « chimique » de ces masses d'eau via l'utilisation de divers indicateurs. La qualité des masses d'eau, ne peut cependant pas être totalement déconnectée de la toxicité des intrants qu'elles reçoivent, notamment les effluents urbains et industriels. Aujourd'hui, la gestion des milieux impose de revenir aux causes et de comprendre quels intrants, quels rejets posent des problèmes et comment ils conduisent à la dégradation des milieux. La caractérisation de la toxicité des rejets, leur évaluation comme sources de contamination et de toxicité, ainsi que leurs impacts sur la qualité des milieux récepteurs conduisent au développement de nouvelles stratégies innovantes et d'outils biologiques pour la surveillance.

Dans ce contexte, le projet « MICROPOLIS Indicateurs » propose une approche basée sur la recherche et la détection des micropolluants, à partir de l'utilisation d'une batterie de tests biologiques (bioessais *in vitro* et *in vivo*) et de biomarqueurs, connus ou récemment développés.

Cette approche est pour la première fois appliquée de la source d'émission des micropolluants (eaux usées industrielles et réseaux de collecte des eaux usées urbaines) jusqu'au milieu récepteur. L'objectif de ce projet est de définir un ensemble cohérent d'outils pour le traçage des micropolluants, pour l'évaluation de l'efficacité des procédés de traitement et pour l'évaluation de l'impact de ces flux de micropolluants sur le milieu aquatique récepteur.

Le projet MICROPOLIS - indicateurs vise plus précisément à caractériser la toxicité des eaux usées de la station de traitements des Bouillides et à évaluer l'impact de l'effluent sur la qualité du milieu récepteur, à l'aide de tests *in vivo* en conditions contrôlées et sur le terrain. La station de traitement des eaux usées (STEU) des Bouillides (Illustration 1), située à Sophia-Antipolis (Alpes Maritimes 06), a été sélectionnée comme lieu d'étude dans ce projet en raison de la diversité d'effluents raccordés, d'origines urbaines, industrielles (plus de 10 ICPE raccordées) et hospitalières, de la présence de procédés de traitement tertiaire récents et enfin de la sensibilité / vulnérabilité du milieu récepteur.

La Bouillide, milieu récepteur de la station d'épuration, est une petite rivière karstique, affluent de la Brague, qui a pour particularité d'alimenter la nappe phréatique d'Antibes, elle-même utilisée pour l'alimentation en eau de la ville. Son débit d'étiage est soutenu par l'effluent de la station d'épuration, et des teneurs élevées en nitrates y ont fréquemment été mesurées. Pour faire face à ces teneurs en nitrate, le groupement SUEZ/EITP sous mandat du syndicat gestionnaire de la station d'épuration (Syndicat Intercommunal pour l'extension et la gestion de la station d'épuration des Bouillides), a fait le choix en 2009 d'équiper la station d'un traitement avancé de l'azote et d'y ajouter un traitement des micropolluants par ozonation. En sortie de traitement secondaire biologique, il existe un traitement par ozonation à 5 mg/L d'ozone, suivi d'un traitement biologique de l'azote par biofiltres dénitrifiants BIOFOR® DN. La station de traitements des eaux usées, d'une capacité de 50 000 équivalents habitants, a été mise en service sous ce format en 2012 (Choubert J.M. *et al.*, 2017). L'illustration 1 présente la succession des procédés de traitements en aval du traitement primaire. Le projet vise à compléter les approches analytiques mises en place lors des campagnes RSDE par des approches biologiques afin de mieux caractériser l'efficacité des traitements tertiaires





Illustration 1 : Photographie aérienne de l'usine des Bouillides (crédits : SUEZ)

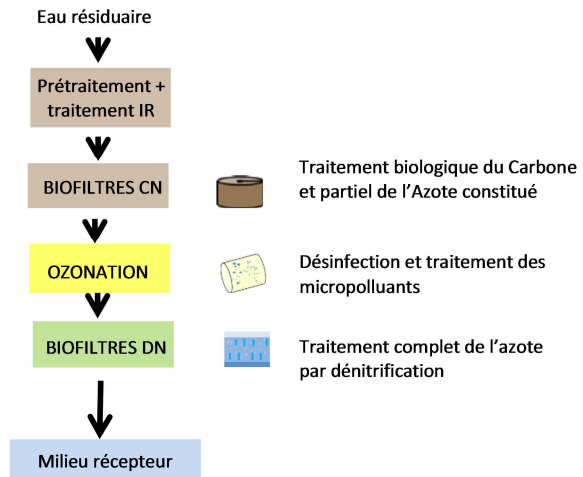


Figure 1 : Schéma de la filière de traitement de l'usine des Bouillides

## 1.2. OBJECTIFS

La tâche 2B, objet de ce document, se focalise sur l'effluent secondaire et les traitements complémentaires (ozonation suivie de biofiltration dénitrifiante) de la STEU des Bouillides et sur le milieu récepteur : elle vise d'une part à évaluer l'efficacité des traitements tertiaires, visant à abattre les micropolluants et l'azote, fonctionnant en aval du traitement secondaire et d'autre part à évaluer l'impact du rejet de la station d'épuration sur la qualité du milieu récepteur.

## 1.3. METHODOLOGIES MISES EN PLACE

Au sein de cette tâche, trois approches ont été mises en place (figure 2):

- une approche *ex-situ* (laboratoire itinérant) par laquelle IRSTEA a exposé des gammares « contrôles », *Gammarus fossarum*, à différentes concentrations des trois effluents étudiés (sortie de secondaire, sortie d'ozonation et sortie du biofiltre dénitrifiant), ceci en conditions de températures, de lumière et d'oxygénation contrôlées ;
- une approche par biomonitoring actif ou approche *in-situ*, assurée par BIOMAE et qui a consisté au déploiement de gammares « contrôles » engagés dans la Bouillide, à l'amont et à l'aval du rejet de la station et sur la Brague en amont et en aval de sa confluence avec la Bouillide ;
- une approche par biomonitoring passif assurée par l'INERIS, et qui a consisté à mesurer une série de biomarqueurs chez des poissons autochtones, prélevés sur les mêmes stations que l'approche *in-situ* ;

Suite aux expositions de gammares *via* les approches *ex-situ* et *in-situ*, les organismes ont été utilisés pour mesurer des marqueurs moléculaire (activité acétylcholinestérase) et traits biologiques individuels (alimentation et reproduction) précédemment développés chez cette espèce par l'équipe d'écotoxicologie de IRSTEA Lyon.

En parallèle de ces approches, une étude du peuplement piscicole a été réalisée par le conseil scientifique des Iles de Lérins. Le rapport d'étude associé est annexé à ce document (annexe 1).

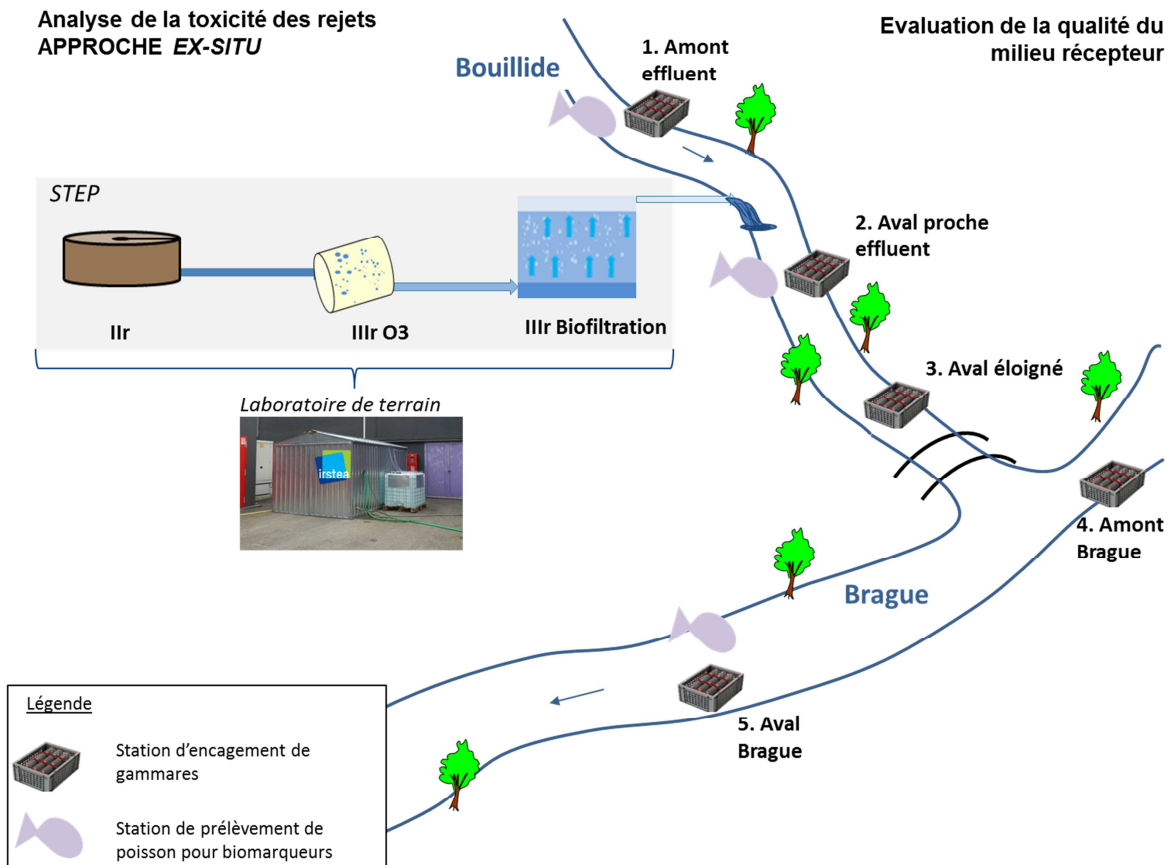


Figure 2 : Schéma de la localisation des différents points d'études.

Les dates des trois campagnes expérimentales et des différentes approches sont présentées dans le tableau 1.

Tableau 1 : Déroulement des études réalisées pour caractériser la toxicité des effluents depuis la sortie du traitement secondaire jusqu'à l'impact du rejet dans le milieu

Campagne	<i>Ex-situ</i> Etudes des 3 effluents	<i>In-situ</i> Biomonitoring actif	Biomarqueurs poisson	Etude du peuplement piscicole
C1 : Printemps 2015	17/06	29/04 – 13/05 <u>4 stations</u> :		
	–	(Bouillide : amont / aval proche effluent		
	8/07	Brague : amont / aval confluence avec la Bouillide)		
C2 : Automne 2015	15/09	15/09 – 29/09 <u>4 stations</u> :	Prélèvement de chevesnes le 23/09/15	Inventaire piscicole le 23/09/15
	–	(Bouillide : amont / aval proche effluent	<u>2 stations</u> :	<u>3 stations</u> :
	2/10	Brague : amont / aval confluence avec la Bouillide)	Bouillide : amont effluent Brague : aval confluence	Bouillide amont/ aval effluent Brague : aval confluence
C3 : Printemps 2016	6/04	6/04 – 22/04 <u>3 stations</u> :		
	–	(Bouillide : amont / aval proche et éloigné effluent)		
	22/04			

### 1.3.1. L'approche en conditions contrôlées - approche *ex-situ*

L'expérimentation *ex-situ* a eu lieu directement sur le site de la STEU des Bouillides, à l'aide d'un laboratoire expérimental temporaire. A partir d'effluents dérivés, des conditions expérimentales correspondant à plusieurs niveaux de dilutions ont été créés. Des individus calibrés de l'espèce *Gammarus fossarum* ont été exposés, en continu, aux différentes conditions. Cette approche combine l'intérêt des expositions en laboratoire, c'est-à-dire permettant le contrôle de la température, de la lumière et de l'oxygène, et la complexité des eaux usées et de leur évolution dans le temps par l'exposition en continu. Enfin, cette approche permet de réaliser des relations dose-réponse, et ainsi, préciser la toxicité des effluents testés et donner une gradation de la dangerosité des eaux usées. Les réponses obtenues pour les conditions testées sont comparées à celle d'un témoin d'exposition, réalisé exactement dans les mêmes conditions à partir d'eau de forage contrôle, disponible au laboratoire d'écotoxicologie de Lyon.

### 1.3.2. Les approches déployées dans le milieu récepteur

#### La bio-surveillance active: approche *in-situ*

La bio-surveillance active consiste à déployer des gammars contrôlés dans le milieu, *via* une méthode d'encagement (Dedourge *et al.*, 2009, Besse *et al.*, 2013). Après exposition dans le milieu,

les réponses mesurées pour chaque bioessai sont interprétées selon un référentiel développé par le laboratoire de IRSTEA Lyon. Ce référentiel intègre la variabilité naturelle des réponses biologiques au regard des facteurs environnementaux et propose des valeurs seuils au-delà desquelles une toxicité significative est observée. L'utilisation de valeurs seuils permet de comparer les niveaux toxiques de stations déconnectées dans l'espace et dans le temps, et de s'affranchir de la présence d'un témoin « local ».

### **La bio-surveillance passive: approche poisson**

Afin de compléter les approches de bio-indication (calcul de l'Indice Poisson Rivière) mises en œuvre en amont et en aval du rejet des eaux usées par le Conseil Scientifique des Iles de Lérins (annexe 1). L'approche proposée par l'INERIS (Unité d'écotoxicologie *in-vitro* et *in-vivo*) consiste à mesurer chez le poisson un ensemble de biomarqueurs, fournissant des éléments d'information sur leur exposition aux contaminants dans le milieu récepteur. Au regard des informations disponibles et relatives aux pressions exercées sur la Bouillide et sur la Brague, la mesure d'indicateurs de l'état de différentes fonctions physiologiques critiques pour les organismes a été mise en œuvre (paragraphe 2.4.3).

### **La bio-indication : Etude des communautés piscicoles**

L'inventaire piscicole a pour objectif de caractériser le peuplement piscicole en place sur les stations étudiées. En apportant des informations sur la diversité spécifique et la densité du peuplement, l'inventaire reflète l'état écologique de la rivière.

## 2. MATERIELS ET METHODES

### 2.1. PRELEVEMENTS D'ORGANISMES

#### 2.1.1. *Gammarus fossarum*

Les expérimentations *ex-situ* et *in-situ* ont été menées à partir du crustacé amphipode *Gammarus fossarum*. C'est un organisme détritivore, distribué dans toute l'Europe, de façon abondante et qui joue un rôle écologique important, (décomposeur, source de nourriture...). Il a la particularité d'être sensible à de nombreux micropolluants, ce qui le place comme un excellent candidat pour évaluer l'impact toxique des substances chimiques.

Pour les expérimentations, les gammares ont été prélevés dans le milieu naturel, puis maintenus en conditions contrôlées au laboratoire pendant 3 semaines. Pour les campagnes *ex-situ*, le milieu de prélèvement est une section de rivière non contaminée : la rivière Bourbre, à Bourgoin Jailleu (05°15'30" E, 45°36'14" N). Les campagnes *in-situ* ont été menées à partir d'une population de gammares provenant d'une ancienne cressiculture, située à Saint-Maurice-de-Rémans (coordonnées : 5°17'45" E, 45°58'09" N). L'échantillonnage a été réalisé au filet troubleau. L'échantillon est ensuite passé sur une colonne de tamis et les organismes de taille souhaitée ont été ramenés au laboratoire. La stabulation est effectuée dans l'eau contrôle du laboratoire de IRSTEA à raison de 2 renouvellements / jour, à  $12 \pm 1^\circ\text{C}$ , sous une photopériode de 16/8h jour/nuit.



Colonne de tamis



Prélèvement au troubleau



Tri sur colonne de tamis

Illustration 2 : Photographies d'un prélèvement de gammares

#### 2.1.2. Poissons

Des chevesnes *Squalius cephalus* ont été échantillonnés le 23 septembre 2015 sur deux sites de prélèvements (illustration 3) :

- « **Site amont** » : cette station correspond à la Bouillide 100 mètres en amont du rejet de la station d'épuration,
- « **Site aval** » : cette station est 50 mètres en aval de la confluence entre la Brague et la Bouillide.

Le site des Bouillides à 300 mètres en aval du rejet n'a pas pu être échantillonné du fait de l'absence de chevesnes lors de l'inventaire piscicole.



Illustration 3 : Représentation schématique des différents sites d'étude sur la Brague et la Bouillide.

Des chevesnes adultes ont été échantillonnés par pêche électrique. Après leur capture, un examen macroscopique portant sur l'état général du poisson a été réalisé (présence de déformations, de parasites, de lésions, érosion des nageoires). Un prélèvement sanguin a ensuite été effectué au niveau de la veine caudale pour les tests de micronoyaux (génotoxicité) et le dosage de la vitellogénine. Les poissons ont ensuite été sacrifiés, mesurés et pesés avant de récupérer le foie, la rate, les gonades et le muscle pour l'analyse des biomarqueurs présentés dans le tableau 5 (paragraphe 2.4.3).

## 2.2. METHODOLOGIES D'EXPOSITION DES GAMMARES

### 2.2.1. Méthodologie *ex-situ*

L'illustration 4 schématise les étapes d'une expérimentation *ex-situ*. Les eaux traitées dérivées alimentent en continu des cuves tampons oxygénées, dans lesquelles un débit est prélevé en continu et apporté dans un seau thermorégulé où sont exposés les organismes. Des dilutions sont réalisées en combinant des arrivées d'eaux usées et d'eau contrôle à l'aide de pompes péristaltiques. L'eau contrôle est l'eau de forage du laboratoire d'écotoxicologie de IRSTEA Lyon. L'installation en continue nécessite également de prévoir un collecteur d'évacuation des eaux de surverse. Une fois les dilutions créées, les organismes positionnés dans des cages en polypropylène percées, sont déposés dans les seaux maintenus dans le bain thermo-régulé, soumis à une photopériode de 16/8h jour/nuit. Des sondes autonomes de températures ont été placées dans chacune des conditions. Après exposition, les organismes sont ramenés vivants au laboratoire pour la mesure des divers marqueurs de toxicité.

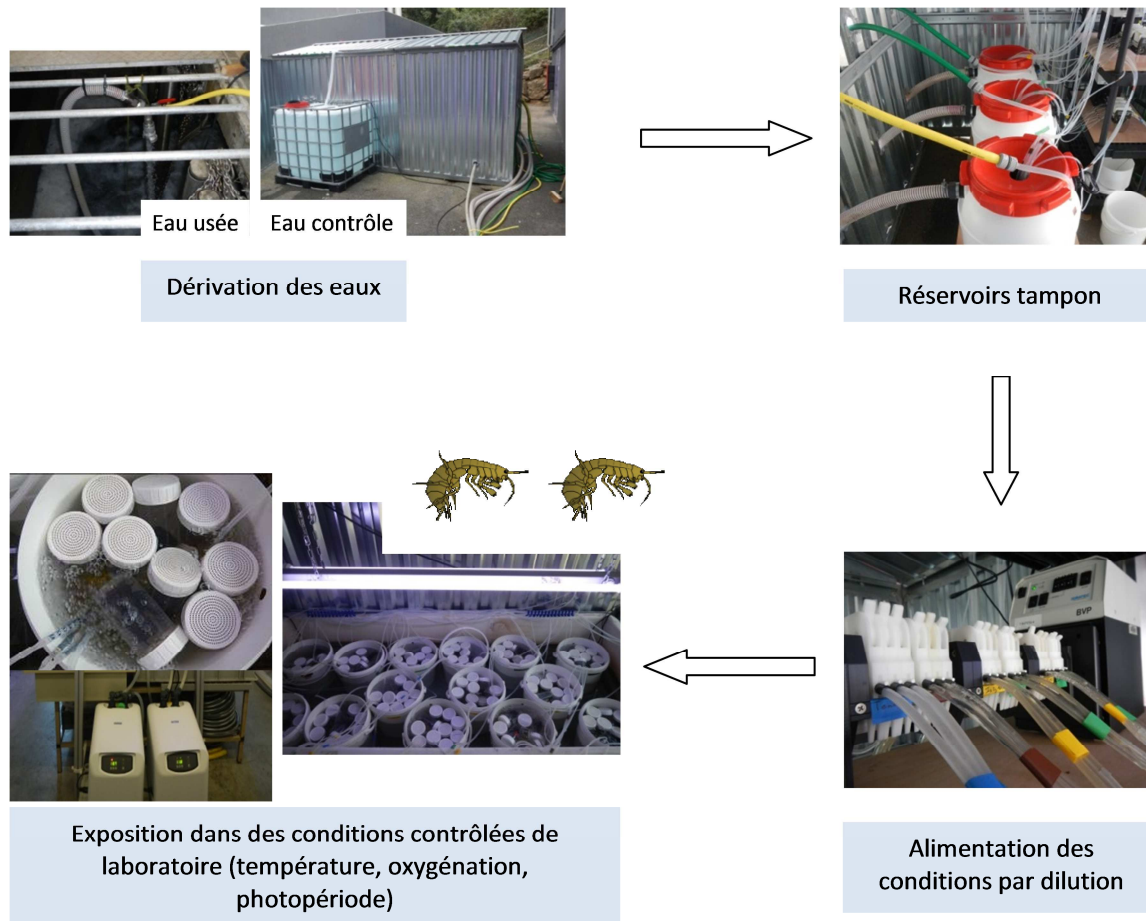
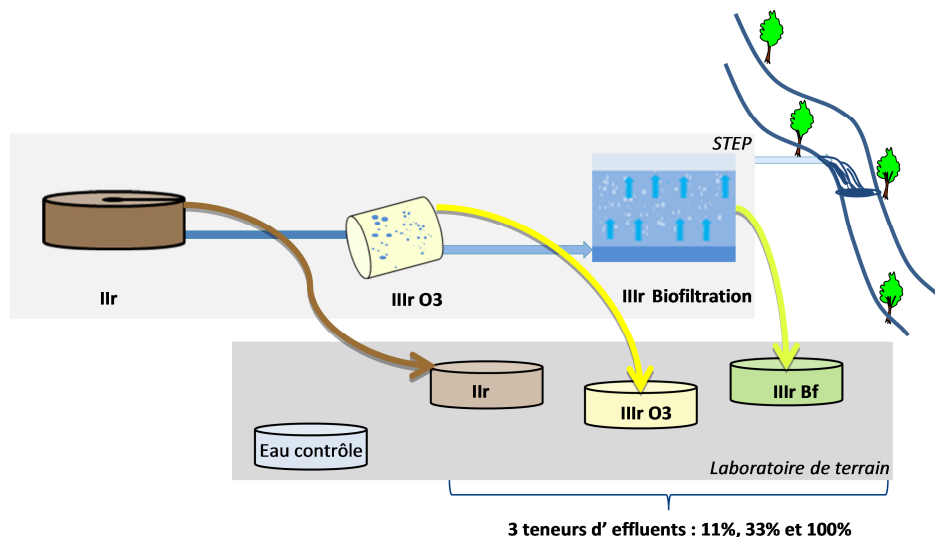


Illustration 4 : Méthodologie de l'exposition *ex-situ*

Trois effluents ont été étudiés :

- l'effluent secondaire (ou entrée ozonation), symbolisé par IIr,
- l'effluent en sortie du traitement par ozonation ( $O_3$ ),
- l'effluent en sortie du traitement de biofiltration dénitrifiante (Bf), correspondant à l'effluent rejeté par la STEU des Bouillides au milieu récepteur.

Pour chacun des effluents, trois conditions ont été testées : 11%, 33% et 100% (volume d'effluent). Un témoin a été réalisé à partir d'eau contrôle, livrée par transporteur deux fois par semaine. Cette eau contrôle a également été utilisée pour les dilutions. Le schéma expérimental et les conditions d'exposition des trois campagnes (taux de renouvellement et température moyenne d'exposition) sont présentés dans la figure 3. Les conditions testées et leur codification sont décrites dans le tableau 3.



	T° moyenne d'exposition	Nb de renouvellements /jour
C1 : juin 2015	12,6°C	2
C2 : sept 2015	14,9°C	4
C3 : avril 2016	14,4°C	4

Figure 3 : Schéma expérimental précisant les conditions étudiées pour la STEU des Bouillides par la méthode *ex-situ* au cours de trois campagnes entre juin 2015 et avril 2016.

Tableau 2 : Codification des conditions d'exposition des expérimentations réalisées entre juin 2015 et avril 2016

Code	Condition
Témoin	Contrôle, eau de IRSTEA
11 IIR	11% d'effluent secondaire « entrée ozonation » dilué avec de l'eau contrôle
33 IIR	33% d'effluent secondaire « entrée ozonation » dilué avec de l'eau contrôle
100 IIR	Effluent secondaire « entrée ozonation » non dilué
11 O3	11% d'effluent « sortie d'ozonation » dilué avec de l'eau contrôle
33 O3	33% d'effluent « sortie d'ozonation » dilué avec de l'eau contrôle
100 O3	Effluent « sortie d'ozonation » non dilué
11 Bf	11% d'effluent de sortie du biofiltre DN dilué avec de l'eau contrôle
33 Bf	33% d'effluent de sortie du biofiltre DN dilué avec de l'eau contrôle
100 Bf	Effluent de sortie du biofiltre DN non dilué

### 2.2.2. Méthodologie *in-situ*

Pour chacune des stations étudiées, les cages en polypropylène, contenant les gammarès, sont protégées par un système d'immersion (illustration 5). Ce système d'immersion est placé directement sur le substrat du cours d'eau, face au courant, sans distinction de rives, et est lesté pour qu'il ne soit jamais exondé. Les systèmes sont immergés pour une période de une à trois semaines, selon le biotest considéré. Un nettoyage du système d'immersion est réalisé à sept jours (J+7).





Transplantation *in-situ* des cages sur site d'étude



Système d'immersion contenant les cages de gammares

Illustration 5 : Photographies des cages et du système d'immersion utilisés pour une exposition *in-situ*

Quatre stations ont été étudiées lors des deux premières campagnes (figure 4). Deux stations, situées dans la Bouillide encadrent le rejet de la station d'épuration, et deux autres stations sont situées dans la Brague, en amont et en aval de la confluence avec la Bouillide. Les stations situées en amont du rejet et de la confluence Bouillide / Brague ont pour objectif d'évaluer la qualité du milieu récepteur. La station située à l'aval du rejet évalue l'impact de la station d'épuration sur la qualité de la Bouillide, et celle située sur la Brague en aval de la confluence, l'impact de la Bouillide sur la qualité de la Brague. La station située sur la Brague en aval de la confluence est également un point réglementaire de suivi du Conseil Départemental des Alpes-maritimes (06). Des données hydro-biologiques sont disponibles pour ce point (code station – 06209950) de 2014 à 2016, et référencent annuellement le milieu en « état écologique moyen ». L'indice diatomées (IBD) qualifie ce point comme étant en « bon état », et l'indice invertébrés en « état moyen ».

Lors de la troisième campagne, non prévue initialement, des mesures en continu de teneurs en oxygène, de salinité et de conductivité dans la rivière ont été ajoutées en amont et en aval du rejet de la station de traitement. Une station aval supplémentaire a été ajoutée dans la Bouillide et est appelée aval éloigné. En revanche aucune mesure n'a été réalisée dans la Brague en aval de la confluence lors de cette dernière campagne.

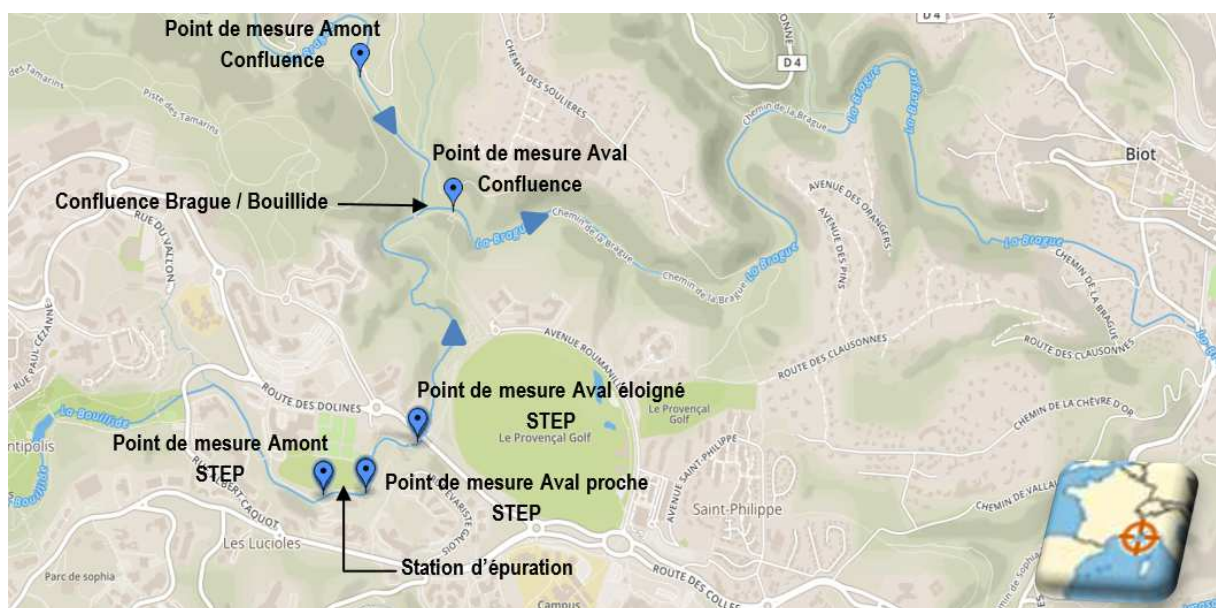


Figure 4: Plan de localisation des stations de mesure *in-situ*

## 2.3. PHYSICO-CHIMIE DES MILIEUX ETUDIES

### 2.3.1. Physico-chimie de l'effluent

Des analyses en cations et anions ont été réalisées dans chaque effluent non dilué, simultanément aux expérimentations *ex-situ*. Un prélèvement de 250mL a été effectué au premier et septième jour d'expérimentation pour la première campagne, et au premier, septième et dernier jour d'expérimentation pour les deux autres campagnes. Suite aux prélèvements, les échantillons ont été conditionnés en glacière à 6°C avant d'être livrés le jour même au Laboratoire d'Analyses des Milieux Aquatiques de IRSTEA pour analyses. Les paramètres analysés et les méthodes sont décrits dans le tableau 3.

Tableau 3 : Anions et cations analysés lors des expérimentations *ex-situ* et méthodes utilisées

Paramètres	Méthodes	Unités	LQ
Conductivité	NF EN 27888	μS/cm	-
pH	NF-T90-008		-
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NF EN ISO 9963-1	mg/L	30
Cl <sup>-</sup>	NF EN ISO 10 304-1	mg/L	1
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	NF EN ISO 10 304-1	mg/L	1
Na <sup>+</sup>	NF EN ISO 14 911	mg/L	1
K <sup>+</sup>	NF EN ISO 14 911	mg/L	1
Mg <sup>2+</sup>	NF EN ISO 14 911	mg/L	1
Ca <sup>2+</sup>	NF EN ISO 14 911	mg/L	4
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	NF EN ISO 14 911	mg/L	0,02
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NF EN ISO 10 304-1	mg/L	0,05
N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NF EN ISO 10 304-1	mg/L	1
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	NF EN ISO 10 304-1	mg/L	0,1

### 2.3.2. Physico-chimie du milieu

Le pH, la conductivité, et l'oxygène dissous ont été mesurés ponctuellement à chaque intervention sur chaque point à J0, J7 et/ou J+N (14 ou 21). Seuls les minimum et maximum des trois mesures effectuées sont présentés dans le paragraphe 3.2.1. Des enregistreurs ont été déployés sur chaque point pour mesurer la température en continu pendant l'exposition (une mesure par heure). Lors de la troisième campagne, en plus des enregistreurs de température, des capteurs autonomes de conductivité, de salinité et d'oxygène dissous ont été installés dans les deux stations à proximité du rejet. Ces dispositifs ont enregistré une mesure toutes les cinq minutes.

## 2.4. MARQUEURS ETUDIES

### 2.4.1. Synthèses des tests effectués à partir de *Gammarus fossarum*

L'évaluation de la toxicité de l'effluent a été faite à l'aide de marqueurs moléculaire et individuels chez le gammare *Gammarus fossarum*. Les marqueurs étudiés sont la survie, l'inhibition de l'activité enzymatique acétylcholinestérase (AChE), l'inhibition de la prise alimentaire et des marqueurs de reproduction. Des mesures de bioaccumulation de composés métalliques et organiques ont également été réalisées en campagne 1 et 2 pour les expérimentations *ex-situ* et *in-situ*. Le tableau 4 présente les différents biotests (intérêt, durée, nombre de réplicas d'exposition et genre des organismes utilisés).

Tableau 4 : Description des biotests étudiés par condition d'exposition.

Biotest étudié	Réponse	Durée d'exposition	Nombre de réplicats d'exposition	Organismes exposés par réplicats
Survie à 7 jours des mâles	Marqueur de toxicité létale et non spécifique d'une typologie de micropolluants			
Activité AChE	Marqueur de toxicité spécifique sub-létale en lien avec la présence d'insecticides anti-cholinestérasique	7 jours	4	20 ♂ <i>G.fossarum</i>
Taux d'alimentation	Marqueur de toxicité sub-létale et non spécifique d'une typologie de micropolluants			
Survie des femelles à 21 jours maximum	Marqueur de toxicité létale et non spécifique d'une typologie de micropolluants			
Reproduction (cycle de mue, fécondité, fertilité)	Marqueur de toxicité sub-létale et non spécifique d'une typologie de micropolluants	de 14 à 21 jours maximum	3	7 ♀ <i>G.fossarum</i> en stade B
Désynchronisation des cycles de mue et de croissance ovocytaire	Marqueur de toxicité spécifique sub-létale en lien avec la présence de perturbateurs endocriniens			
Teneurs en métaux	Contamination métallique biodisponible anormale	7 jours	1	20 ♂ <i>G.fossarum</i>
Teneurs en composés organiques	Contamination organique biodisponible anormale	7 jours	1	100 ♂ <i>G.fossarum</i>

## 2.4.2. Traits d'histoire de vie

### Survie

Le nombre de gammares vivants a été déterminé après 7 jours pour les expositions des mâles et entre 14 et 21 jours pour les femelles. Lorsque la mortalité moyenne dépasse 50%, l'analyse des biomarqueurs n'est plus possible, n'a pas d'intérêt et par conséquent n'a pas été menée.

### Taux d'alimentation

L'alimentation chez le gammare est sensible à une large gamme de contaminants, aussi bien organiques que métalliques. La mesure du taux d'alimentation correspond à la surface consommée de feuille en une semaine. La figure 5 illustre la méthodologie utilisée, décrite par Dedourge *et al.*, 2009 et Coulaud *et al.*, 2011.

En pratique, pour chaque condition, quatre réplicas de 20 disques de feuille d'aulne de 20 mm et 20 gammares mâles calibrés ont été exposés pendant une semaine au milieu testé. Un témoin de dix disques de feuille d'aulne sans organismes a été ajouté afin d'évaluer la dégradation éventuelle des feuilles par les micro-organismes présents dans les milieux testés. A la fin de l'exposition, le nombre de gammares vivants a été déterminé et les restes de feuilles ont été récupérés, scannés et la surface

déterminée à l'aide du Logiciel SIGMA Scan Pro v5<sup>®</sup>. Par différence entre la surface initiale et la surface résiduelle, le taux d'alimentation est défini et exprimé en mm<sup>2</sup> consommés par gammare et par jour, selon la formule suivante :

$$\text{Taux d'alimentation}_i = \frac{(Sa_{\text{contrôle}} - Sa_i) / ((l_{i,t0} + l_{i,t7}) / 2))}{\Delta t}$$

où *Taux d'alimentation* est le taux d'alimentation calculé pour le réplica *i*, *Sa<sub>contrôle</sub>* la surface de feuille à la fin d'exposition du lot contrôle sans gammars, *Sa<sub>i</sub>*, la surface de feuilles restant après exposition pour le réplica *i*, *l<sub>i,t0</sub>*, le nombre de gammars au début de l'exposition pour le réplica *i*, *l<sub>i,t7</sub>*, le nombre de gammars vivants après 7 jours d'exposition pour le réplica *i* et  $\Delta t$ , la durée en jours de l'exposition, ici 7 jours.

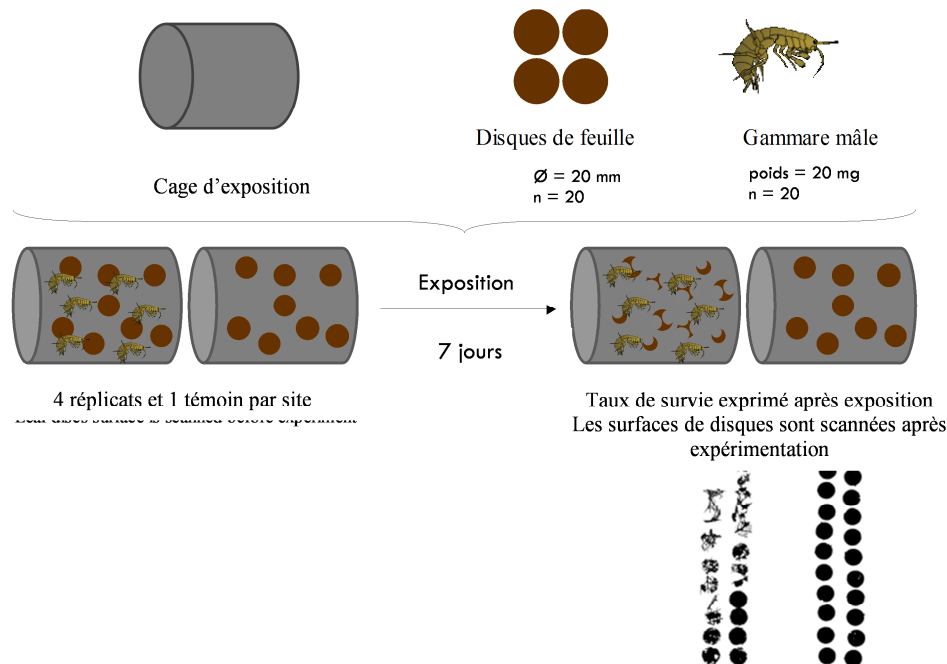


Figure 5 : Méthode utilisée pour la mesure du taux d'alimentation lors des expérimentations *ex-situ* et *in-situ*

### Marqueurs de reproduction

Les paramètres biologiques étudiés sont la mue, la fertilité et la fécondité. Leur niveau est dépendant du déroulement du cycle de mue qui a été décrit par Geffard *et al.*, 2010, et qui est présenté dans la figure 6. Le cycle de mue est parfaitement synchronisé avec le développement embryonnaire et la croissance des ovocytes (vitellogénèse). Il est divisé en six stades, identifiables par observation trans-tégumentaire des 3<sup>ième</sup> et 4<sup>ième</sup> paires de périopodes. Pour chaque stade de mue, correspond une surface ovocytaire et un stade de développement embryonnaires spécifiques.

Après avoir libéré les juvéniles du marsupium, la femelle mue puis pond une série d'ovocytes dans sa poche marsupiale qui sont alors immédiatement fécondés par le mâle. A ce moment, la femelle est en stade de mue A et le développement embryonnaire commence. Parallèlement, un nouveau lot d'ovocytes primaires rentre en maturation dans les gonades. Les stades C1 et C2 correspondent aux stades d'inter-mue. Au stade C2, la vitellogénèse secondaire est mise en place. C'est le stade ciblé dans le biotest de reproduction pour mesurer la fertilité et la fécondité. Les stades D1 et D2 correspondent aux stades de pré-mue.

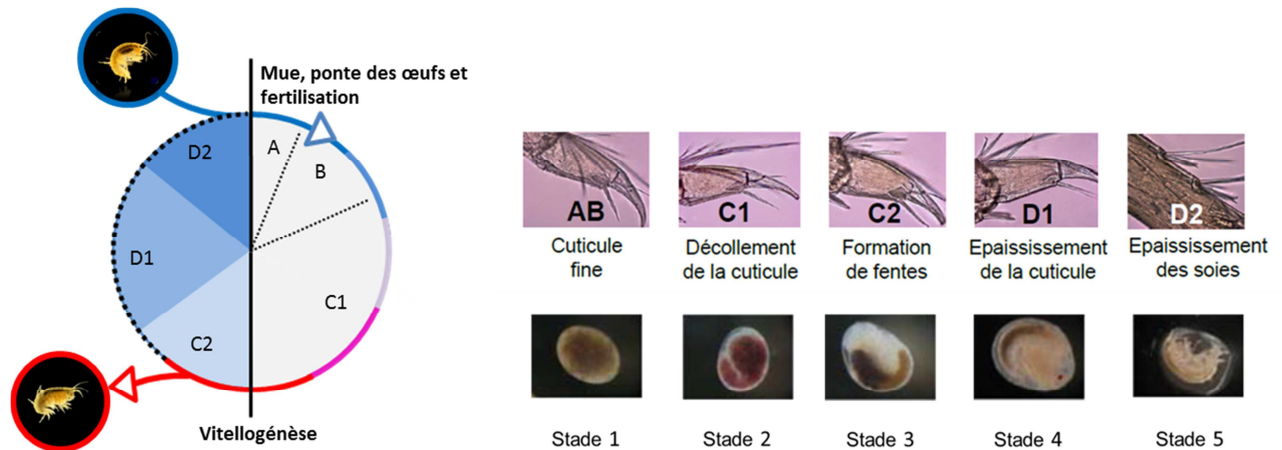


Figure 6 : Déroulement du cycle de mue, principe méthodologique du test de reproduction et critères d'identification des stades de mues et embryonnaires

La figure 6 schématise la méthodologie du test de reproduction. Les femelles sont triées en stade D2, par observation du stade embryonnaire et la présence de gonades très développées. Elles sont ensuite maintenues trois jours à 12°C pour permettre la mue, la ponte des ovocytes et leur fécondation. Suite à ces trois jours de stabulation, seules les femelles en stade A-B, ayant muées et pondues, sont utilisées et placées dans des chambres pour leur engagement dans le milieu. Après une exposition suffisamment longue, dépendante de la température d'exposition, pour que les femelles aient atteint le stade C2, les individus sont récupérés et ramenés au laboratoire pour la mesure des paramètres de reproduction. Ces mesures se font sur un minimum de 10 femelles. Les femelles sont photographiées pour mesurer la taille par analyse d'images (SIGMA Scan Pro v5®). Le cycle de mue, la fécondité et la fertilité sont déterminés pour chaque femelle sous loupe binoculaire et microscope selon les méthodes présentées dans les figures 7 et 8 et décrites par Geffard *et al.*, 2010.

- Le stade de mue a été déterminé par l'observation trans-tégumentaire de la formation de la cuticule des extrémités des 3<sup>ième</sup> et 4<sup>ième</sup> paires de périopodes (figure 6) au microscope (DM 2500®, Leïca, x 400), après avoir été sectionnées à l'aide de ciseaux de Wecker et placées entre lame et lamelle. Une distribution des stades de mue des femelles, ayant atteint ou non le stade C2 a ainsi été obtenue pour chaque condition testée.
- La fécondité a été déterminée en quantifiant le nombre d'embryons. Pour ceci, les embryons ont été délicatement retirés du marsupium à l'aide d'une micro-pince, placés sur lame avec une goutte d'eau du milieu testé et observés à l'aide d'une loupe binoculaire (x 30). La fécondité de chaque femelle a ensuite été normalisée par la taille de l'individu.
- La fertilité a été évaluée seulement pour les femelles ayant dépassée le stade C2, par dénombrement des ovocytes secondaires dans chacune des deux gonades par observation *in-vivo* trans-cuticulaire à l'aide d'une loupe binoculaire (x 30). Elle a ensuite été normalisée par la taille de l'individu à maturité.

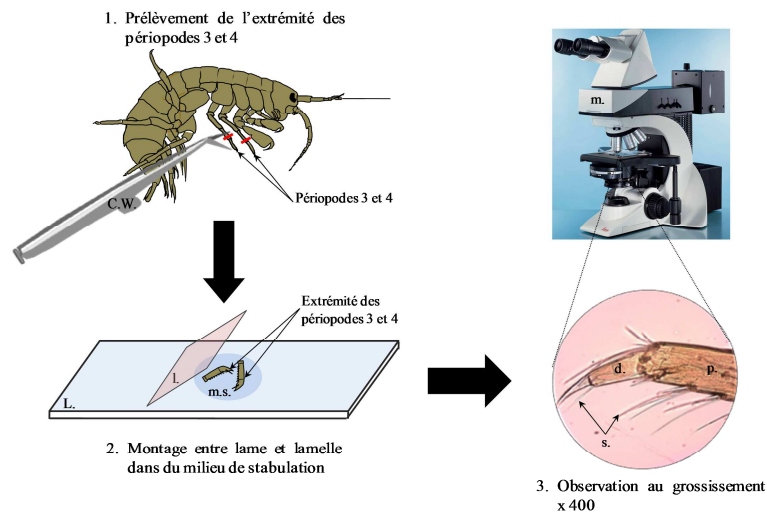


Figure 7 : Schéma de la procédure utilisée pour déterminer le stade de mue des organismes. c.w. : ciseaux de Wecker ; d. : dactilopodite ; L. : lame ; l. : lamelle ; m. : microscope ; m.s. : milieu de stabulation ; p. : protopodite ; s. : soie. Adapté de Xuereb, 2009

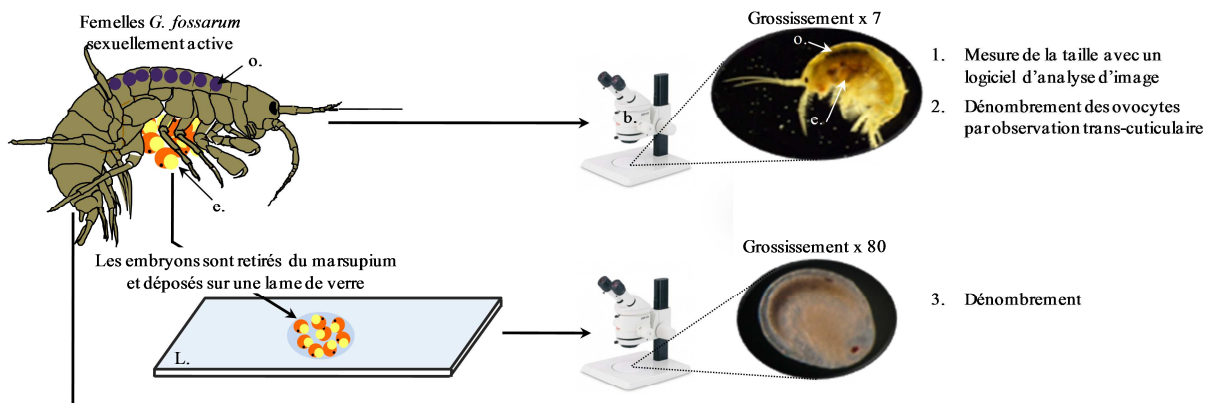


Figure 8 : Schéma de la démarche utilisée pour mesurer les paramètres biologiques de reproduction. b. : loupe binoculaire ; e. : embryons contenus dans la poche incubatrice ; L. : lame ; m. : microscope ; o. : ovocytes secondaires visibles au travers de la cuticule. Adapté de Xuereb, 2009

### Perturbation endocrinienne

A partir des femelles utilisées pour le test de reproduction, des mesures complémentaires ont été réalisées uniquement dans l'étude *in-situ* afin d'identifier l'exposition aux perturbateurs endocriniens. L'étude des effets des perturbateurs endocriniens consiste en une comparaison du stade de mue et de la surface ovocytaire moyenne de chaque femelle, ceci afin d'identifier une désynchronisation spécifique.

Chez *Gammarus fossarum*, les cycles de mue et de croissance ovocytaire sont parfaitement synchronisés : à chaque stade de mue correspond une surface ovocytaire précise. Ces deux processus physiologiques sont sous le contrôle de deux voies hormonales bien distinctes : la mue étant contrôlée par des hormones «ecdystéroïdes» tandis que la croissance ovocytaire par des hormones «terpénoïdes». Dans le cadre d'une toxicité globale, on observe un retard simultané de la

mue et de la croissance ovocytaire. Une désynchronisation de ces deux processus (retard de l'un par rapport à l'autre) s'interprète comme un effet spécifique de sa voie hormonale, et par conséquent par la présence de composés ayant des propriétés de perturbation endocrinienne.

Les surfaces ovocytaires sont mesurées par observation microscopique *in toto*. Les femelles sont placées latéralement entre deux lames de verre, dans une goutte d'eau, puis les ovocytes sont photographiés au grossissement x 50. La surface de chaque ovocyte est ensuite déterminée avec le logiciel d'analyse Sigma Scan Pro 5<sup>®</sup>. La surface moyenne des ovocytes est calculée avec *a minima* cinq ovocytes par femelle. La vitellogenèse (ou ovogenèse) a été caractérisée en mesurant l'évolution de la surface ovocytaire moyenne au cours du cycle de reproduction. (Geffard *et al.*, 2010).



Illustration 6 : Photographie au microscope optique d'une griffe de périopode de *Gammarus fossarum* (x200) permettant la détermination du stade de mue

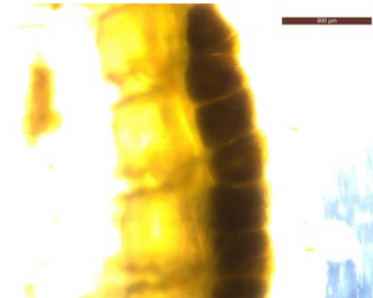


Illustration 7 : Photographie au microscope optique d'ovocytes de *Gammarus fossarum* (x50) permettant la mesure de la surface ovocytaire moyenne

### 2.4.3. Biomarqueurs

Les différents biomarqueurs mesurés chez les chevesnes et les gammares, ainsi que les méthodologies associées sont présentés dans le tableau 5 :

- Des atteintes neurotoxiques sont déterminées à partir de l'activité acétylcholinestérase (AChE). Un effet inhibiteur de différents polluants sur l'AChE pouvant à terme induire des perturbations du comportement des individus a notamment été démontré. Il s'agit du seul biomarqueur mesuré chez les deux espèces.
- La gestion de l'énergie, est un caractère essentiel qui en fait une variable privilégiée pour décrire les impacts sur les différentes fonctions physiologiques. Les indices de condition (K de Fulton, rapports hépato-somatique et gonado-somatiques) sont utilisés en tant qu'indicateur quantitatif de santé de l'organisme. Leur modification est perçue comme une détérioration de l'état de santé, liée à une réduction des réserves énergétiques (statut lipidique) pouvant provenir d'une diminution de l'ingestion de nourriture, d'une augmentation des demandes métaboliques liées à la détoxification du polluant et/ou du maintien des fonctions de base de l'organisme.
- Les réponses immunitaires, sont particulièrement vulnérables face aux stress environnementaux, physico-chimiques comme biologiques, et elles représentent une cible privilégiée de l'action de ces contraintes. De ce fait, l'immunotoxicité a rapidement été utilisée pour la mise en place de diagnostics de risque lors d'un apport dans le milieu de substances chimiques potentiellement toxiques. Dans ce cadre, nous nous sommes focalisés sur l'immunité non-spécifique, qui est indépendant d'un premier contact avec un pathogène (distribution leucocytaire, mortalité cellulaire, activités de phagocytose, flambée oxydative, intégrité membranaire des lysosomes (LMI)).
- Une modification dans les fonctions de la reproduction est susceptible à terme d'impacter

directement les populations en place. De ce fait, une modification de certains des paramètres (vitellogénine, occurrence d'individus intersexués, indice gonado-somatique) pourrait être précurseur d'une perturbation de la reproduction des individus.

- La biotransformation est importante pour l'excrétion des contaminants métabolisés. Suite à leur pénétration dans l'organisme, les xénobiotiques à caractère hydrophobe subissent une métabolisation, ou biotransformation, catalysés par différents systèmes enzymatiques. Lors de la première phase d'oxydation, la molécule est rendu plus polaire du fait majoritairement de l'action des monooxygénases (cytochrome P450-3A (CYP3A), 7 éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD)). Au cours de cette première phase, les contaminants peuvent subir une activation métabolique entraînant la formation de dérivés généralement électrophiles, plus toxiques que le produit initial et qui sont susceptibles de se lier aux macromolécules. Au cours de la seconde phase, il y a fixation sur les métabolites issues de la première phase de molécules possédant des groupements hydroxyles, sulfhydriles ou carboxyles afin d'accroître leur hydrosolubilité et de faciliter leur excrétion par l'urine ou par la bile (glutathion S transférase (GST)).
- Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les systèmes anti-oxydants et les systèmes pro-oxydants impliquant la production d'espèces réactives de l'oxygène, source d'effets toxiques potentiels et irréversibles pour la cellule (superoxyde dismutase (SOD), glutathion peroxydase (GPx), glutathion total (GSH), catalase (CAT)). De plus, ces dérivés de l'oxygène peuvent également être induits par la présence de composés exogènes à l'organisme tel que les contaminants. La lipopéroxydation lipidique (TBARS) est le résultat de l'attaque des espèces réactives de l'oxygène sur les acides gras polyinsaturés des membranes biologiques.
- Les paramètres génotoxiques sont le reflet des changements induits par des xénobiotiques au niveau du matériel génétique des organismes. Dans le cadre de ce projet, TOXEM nous a fourni des données d'atteintes génotoxiques par l'étude des micronoyaux. Le but de l'essai de micronoyaux est d'identifier des lésions cyto-génétiques et des micronoyaux dans lesquels il reste des fragments de chromosomes ou des chromosomes entiers.



Tableau 5 : Biomarqueurs mesurés et références associées

Fonctions physiologiques	Biomarqueurs	Gammare entier	Poisson (Organe)	Instituts	Références	
Neurotoxicité	AChE	×		IRSTEA / BIOMAE	Xuereb <i>et al.</i> , 2009a et 2009 b	
			×	(muscle)	INERIS	Sturm <i>et al.</i> 1999
Gestion de l'énergie	Statut lipidique		×	INERIS	Lu <i>et al.</i> 2008, Cheng <i>et al.</i> , 2011	
			(foie)			
			×			(rate)
Réponses immunitaires	Mortalité cellulaire		×	INERIS	Bado-Nilles <i>et al.</i> , 2014	
	Phagocytose		×	INERIS	Bado-Nilles <i>et al.</i> , 2011	
	Flambée oxydative		×	INERIS	Chilmonczyk and Monge, 1999	
	Présence en lysosomes		×	INERIS	Bado-Nilles <i>et al.</i> , 2013	
	Biotransformation	EROD		×	INERIS	Flammarion <i>et al.</i> , 2000
		CYP-3A		×	INERIS	Miller <i>et al.</i> , 2000
GST			×	INERIS	Habig <i>et al.</i> , 1974	
Stress oxydant	SOD		×	INERIS	Paoletti <i>et al.</i> , 1986	
	GPx		×	INERIS	Paglia and Valentine, 1967	
	GSH		×	INERIS	Vandeputte <i>et al.</i> , 1994	
	TBARS		×	INERIS	Ohkawa <i>et al.</i> , 1979	
	CAT		×	INERIS	Babo and Vasseur., 1992	
	Génotoxicité	Micronoyaux		×	TOXEM	-
Reproduction	Vitellogénine		×	INERIS	Hinfray <i>et al.</i> , 2010	
	Sévérité de l'intersexualité		×	INERIS	Bateman <i>et al.</i> , 2004	

#### 2.4.4. Bioaccumulation de micropolluants métalliques et organiques dans le gammare

Les dosages de composés métalliques et organiques ont été effectués dans des gammares exposés dans les conditions témoin, Ilr 100, O3 100 et Bf 100 des expérimentations *ex-situ* et dans les gammares exposés dans les quatre stations d'études *in-situ* des campagnes 1 et 2 (avril et septembre 2015), selon la méthodologie décrite par Besse *et al.* en 2013. Ces dosages, non prévus initialement, ont été ajoutés pour être mis en regard des concentrations en contaminants biodisponibles mesurées en rivière par Biomae, et évaluer la part attribuable au rejet de la station d'épuration.

Après une durée d'exposition de 7 jours, les gammares de chaque condition ont été poolés puis répartis de façon aléatoire dans un flaconnage adapté en fonction du type d'analyse : un réplica de 5

individus pour les analyses en composés métalliques et un réplica de 70 individus pour les analyses en composés organiques. Les échantillons ont été stockés dans un congélateur -20°C jusqu'à leur expédition au laboratoire LDA 26 pour lyophilisation et dosage. Le laboratoire LDA 26 est certifié COFRAC pour les analyses demandées.

Après minéralisation des échantillons par micro-ondes avec de l'acide nitrique, les composés métalliques ont été dosés par plasma à couplage inductif couplé à la spectrométrie de masse (ICPMS, Thermo série X7 II). Après extraction, l'analyse des composés organiques est effectuée par chromatographie en phase gazeuse avec détection par spectrométrie de masse en tandem (GCMS/MS). Les données ont été exprimées en microgramme par gramme de masse sèche pour les métaux ( $\mu\text{g/g MS}$ ) et en nanogrammes par gramme de masse sèche pour les composés organiques ( $\text{ng/g de MS}$ ). Le facteur d'incertitude pour chaque micropolluant est compris entre 30 et 40% de la limite de quantification (LQ) atteinte.

Au total, 26 composés métalliques et plus de 20 composés organiques ont été mesurés (annexe 2).

## 2.5. EXPRESSION DES RESULTATS

### 2.5.1. Approche *ex - situ* : comparaison au témoin d'exposition

Pour les neuf conditions testées, les résultats des marqueurs de toxicité ont été comparés aux valeurs mesurées dans la condition témoin, par des tests unilatéraux de comparaison de moyenne au risque  $\alpha$  de 5% (test de Wilcoxon). Le logiciel utilisé pour la réalisation des tests d'hypothèse est le logiciel R. Avant traitements statistiques, les données recueillies sont transformées et exprimées en pourcentage du témoin selon la formule suivante :

$$F_{\%i} = \frac{F_i}{\text{moyenne}(F_{\text{témoin}})_{j=1}^n} \times 100$$

où  $F_{\%i}$  est le marqueur étudié pour le réplica ou la femelle  $i$  exprimé en pourcentage du témoin,

$F_i$ , la valeur du marqueur étudié mesuré pour le réplica ou la femelle  $i$ ,

$F_{\text{témoin}}$ , le marqueur étudié mesuré dans la condition témoin,  $j$  le numéro du réplica ou de la femelle et  $n$  le nombre de réplicas ou de femelles de la condition témoin.

Le taux d'alimentation, et l'activité acétylcholinestérase ont été exprimés en pourcentage du témoin pour chaque réplica. La fécondité et la fertilité ont été exprimées en pourcentage du témoin pour chaque femelle étudiée.

L'effet dose-réponse a été étudié pour ces mêmes marqueurs en testant la significativité statistique du coefficient de corrélation linéaire entre la réponse observée et les quatre dilutions de chaque effluent (témoin, 11%, 33%, 100% d'effluent). Le coefficient a été calculé par la méthode de Spearman. Le coefficient a ensuite été testé à l'aide de la fonction `cor.test` du logiciel R.

Concernant le cycle de mue, la distribution de femelles ayant atteint ou non le stade C2 est directement comparée à la distribution obtenue dans la condition témoin, à l'aide du test du Khi-deux (fonction `prop.test`).

### 2.5.2. Approche *in-situ* : comparaison aux référentiels

Pour chaque marqueur de toxicité étudié, des valeurs de références et des valeurs seuils issues des travaux de recherche de IRSTEA ont été définies pour la population « contrôle » engagée, et permettent l'interprétation des effets de toxicité induits par la contamination présente dans le milieu naturel (Xuereb *et al.*, 2009 ; Recoura-Massaquant *et al.*, 2014). Ces valeurs de références correspondent aux valeurs attendues en condition non toxique et les valeurs seuils associées aux valeurs pour lesquelles un effet toxique est reconnu statistiquement. Par conséquent, lorsqu'un effet

est mesuré au-delà des valeurs seuils, l'effet ne peut être attribué qu'à la toxicité du milieu et non à la variabilité naturelle du marqueur.

La valeur moyenne du taux d'alimentation obtenu pour une station est comparée à la valeur de référence, qui correspond à la consommation de feuille attendue en milieu non contaminé et pour les températures observées au cours de l'exposition. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'inhibition. Pour une interprétation fiable du test d'alimentation, le taux de mortalité ne doit pas dépasser 25% de l'effectif initial. Entre 25 et 50% de mortalité, les résultats sont présentés à titre indicatif. Le taux d'alimentation peut-être mesuré *a minima* à partir de trois répliques.

L'indice de fécondité est comparé à la valeur de référence correspondante. La distribution des stades de mue observée pour les femelles est comparée à la distribution attendue en condition de référence et pour les températures d'exposition observées. Pour une interprétation fiable des tests de reprotoxicité et de perturbation endocrinienne, le nombre de mesures individuelles doit être égal ou supérieur à 10.

La moyenne de l'activité AChE mesurée à partir de cinq répliques est comparée à la valeur de référence. La différence mesurée est exprimée en pourcentage d'inhibition. Pour l'interprétation fiable du test de neurotoxicité, l'activité AChE doit être mesurée *a minima* à partir de trois répliques.

Des tests statistiques ont été réalisés pour vérifier la conformité des résultats obtenus pour chaque marqueur par rapport aux valeurs attendues hors toxicité (référentiel). Les résultats sont représentés sous forme de code couleur :

- en **vert** lorsque la réponse obtenue est conforme au référentiel
- en **orange** lorsque la réponse obtenue est non-conforme avec un effet significatif au risque  $\alpha$  de 5%
- en **rouge** lorsque la réponse obtenue est non-conforme avec un effet très significatif (au risque  $\alpha$  de 1%).

### **2.5.3. Bioaccumulation des composés métalliques et organiques dans le gammare**

Les niveaux de contamination dans les organismes, exposés *ex-situ* et *in-situ*, ont été déterminés pour onze composés métalliques et plus de vingt contaminants organiques. Ces suivis ont été réalisés en 2015 pour les expositions *in-situ* et *ex-situ*. Pour les tests *ex-situ*, les niveaux de contamination observés chez les organismes exposés aux trois conditions non diluées des effluents en sortie de secondaire, des traitements d'ozonation et de biofiltration sont comparés aux niveaux observés en milieux témoins, afin d'évaluer l'apport du rejet en contamination biodisponible. Pour les tests *in-situ*, étant donné qu'il n'y a pas de conditions de référence, la présence d'une contamination biodisponible anormale est identifiée à l'aide de la comparaison entre les teneurs mesurées dans les organismes exposés et les valeurs seuils préalablement définies par IRSTEA (Besse *et al.*, 2013, Geffard *et al.*, 2014, Recoura-Massaquant *et al.*, 2014). Le code couleur ci-dessous permet d'indiquer la présence avérée de contaminants biodisponibles dans le milieu testé pour chaque substance. Une concentration supérieure au seuil traduit une contamination significativement anormale avec un risque  $\alpha$  de 5%, par rapport à un niveau moyen bas déterminé sur plus de 200 sites par IRSTEA.

- en vert lorsque la teneur de l'élément est inférieure à la valeur seuil
- en rouge lorsque la teneur de l'élément est supérieure à la valeur seuil.

#### **2.5.4. Poisson : comparaison amont-aval**

Pour l'ensemble des données obtenues sur le poisson, des tests statistiques permettent de mettre en exergue des différences amont-aval. Pour ce faire, la normalité et l'homogénéité des variances sont testées, respectivement, par les tests de Shapiro-Wilk et de Levene ( $\alpha = 5 \%$ ). Si la normalité et l'homogénéité des variances sont vérifiées, un test-t de Student est réalisé ( $\alpha = 5 \%$ ). Dans le cas contraire, le test non paramétrique de Mann-Whitney ( $\alpha = 5 \%$ ) est réalisé.

### 3. RESULTATS

#### 3.1. EFFETS DES TRAITEMENTS SUR LA TOXICITE DE L'EFFLUENT : TESTS EX-SITU

##### 3.1.1. Physico-chimie de l'effluent

Les analyses physico-chimiques sont présentées en annexe 3. En comparaison au témoin, l'effluent présente une plus forte conductivité (Témoin =  $500\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ , Effluent  $> 1000\mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$ ) et des teneurs en ions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{PO}_4^{3-}$  nettement plus élevées (cf. annexe 3). Aucune différence de composition n'a été notée entre les effluents, hormis pour le nitrite. Ce dernier, connu pour sa toxicité, a été mesuré ponctuellement en fortes concentrations dans les effluents en sortie de traitements secondaire et de biofiltration DN lors des trois campagnes. Une extraction des résultats pour cet élément est présentée dans le tableau 6. Les valeurs surlignées en rouge indiquent les concentrations élevées.

Tableau 6: Concentrations ponctuelles en  $\text{N-NO}_2^-$  dans les témoins et en entrée et sortie de la chaîne de traitement complémentaire (IIR, Bf).

		Témoin	IIR 100	Bf 100
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (C.I.) [N] =en mg/L	C1 : juin 2015	< 0,02	0,10	3,84
		0,05	2,86	0,44
		< 0,02	0,86	0,08
	C2 : sept 2015	< 0,02	1,00	0,74
		< 0,10	0,41	9,1
		< 0,02	0,2	0,5
	C3 : avril 2016	< 0,03	0,0	1,0
		< 0,02	< 0,02	2,3

##### 3.1.2. Traits d'histoire de vie

###### Survie

- Mâles après 7 jours d'exposition

Les pourcentages de survies moyennes sont présentés dans le tableau 7. En première campagne, une mortalité significative a été observée pour la teneur 100% effluent secondaire et les conditions 33% et 100% effluent biofiltration DN. En campagne 2 et en campagne 3, aucune mortalité significative n'a été observée pour l'ensemble des conditions.

Tableau 7 : Survie moyenne des mâles (moy, n=4) exprimée en pourcentage du témoin, pour les différentes conditions testées (les effluents IIR, O3, Bf à 11, 33 et 100%), au cours des trois campagnes, après 7 jours d'exposition. Les \* correspondent aux valeurs pour lesquelles un effet significatif a été mesuré.

	Iir 11	Iir 33	Iir 100	O3 11	O3 33	O3 100	Bf 11	Bf 33	Bf 100
C1 : juin 2015	90,9	87,9	34,8* <i>pv = 0,01</i>	87,9	77,3	78,8	93,9	0,0	16,7* <i>pv = 0,01</i>
C2 : sept 2015	94,9	89,8	93,2	98,3	91,5	96,6	96,6	96,6	93,2
C3 : avril 2016	100	100	98,6	100	100	88,6	100	100	100

- **Femelles après 21 jours d'exposition maximum**

Le tableau 8 montre qu'en campagne 1, une mortalité significative a été observée dans tous les effluents à la concentration de 100% et pour les conditions O3 et Bf à la concentration de 33%. Une faible survie a également été mesurée dans l'effluent secondaire à la concentration de 11% (Ilr 11). Ces résultats sont à mettre en regard des problèmes d'oxygénation observés en première campagne (voir discussion).

Lors de la deuxième campagne, pour l'ensemble des effluents aux concentrations de 33% et 100%, un impact significatif sur la survie a été observé, avec des survies comprises entre 24 et 77 %. Des relations dose-réponses ont été mesurés et sont significatives dans les effluents O3 et Bf (*p-value* des coefficients de corrélation à  $5.10^{-3}$  et  $4.10^{-4}$ ).

Enfin lors de la troisième campagne, seule la condition O3 100 a eu un impact sur la survie.

Tableau 8: Survie moyenne des femelles (moy, n=3) exprimée en pourcentage du témoin pour les différentes conditions testées (les effluents IIR, O3, Bf à 11, 33 et 100%) et pour les trois campagnes expérimentales, après une exposition de 21 jours maximum. Les \* correspondent aux valeurs pour lesquelles un effet significatif a été mesuré.

	Ilr 11	Ilr 33	Ilr 100	O3 11	O3 33	O3 100	Bf 11	Bf 33	Bf 100
<b>C1 : juin 2015</b>	40,0* <i>pv=0,03</i>	100,0	0,0	100,0	6,7* <i>pv=0,03</i>	26,7* <i>pv=0,03</i>	73,3* <i>pv=0,03</i>	0,0	0,0
<b>C2 : sept 2015</b>	76,5	58,8* <i>pv=0,04</i>	23,5* <i>pv=0,04</i>	88,2	76,5	52,9* <i>pv=0,03</i>	88,2	76,5* <i>pv=0,04</i>	52,9* <i>pv=0,04</i>
<b>C3 : avril 2016</b>	88,9	100,0	92,6	88,9	96,3	77,8* <i>pv=0,02</i>	88,9	85,2	100,0

### Taux d'alimentation

La figure 9 présente les taux d'alimentation obtenus pour les trois campagnes. Lors des trois campagnes et pour chaque effluent, une relation dose-réponse a été observée avec les différentes concentrations testées.

Lors de la campagne 1, les impacts sur le taux d'alimentation sont significatifs à partir de la concentration 33% et ceci pour chaque effluent ( $pv_{Ilr\ 33}$ ,  $pv_{O3\ 33}$  et  $pv_{O3\ 100}$  de 0,01). Les fortes mortalités observées pour la condition Ilr (100%) et Bf (33 et 100%) n'ont pas permis d'évaluer le taux d'alimentation.

Lors de la campagne 2, un impact significatif a été observé pour les deux concentrations les plus élevées d'effluent secondaire et pour la concentration la plus forte à la sortie de l'ozonation ( $pv_{IIR\ 33} = 1.10^{-2}$ ,  $pv_{IIR\ 100} = 1.10^{-2}$ ,  $pv_{O3\ 100} = 1.10^{-2}$ ). A l'inverse, aucun effet significatif par rapport au témoin n'a été mesuré pour l'effluent à la sortie de la biofiltration DN. Une diminution de la toxicité de l'effluent le long de la chaîne de traitement a été observée. Des effets doses réponses significatifs ont été notés dans les effluents Ilr et O3 (*pv* du coefficient de corrélation des conditions Ilr, O3 respectivement de  $6.10^{-4}$ ;  $1.10^{-2}$ ). Lors de la campagne 3, l'alimentation est inhibée dans toutes les conditions d'au moins 40%, et une relation dose-réponse significative est observée dans les trois effluents (*pv* du coefficient de corrélation des conditions Ilr, O3 et Bf respectivement de  $4.10^{-7}$ ;  $9.10^{-4}$  et  $6.10^{-5}$ ). Lorsqu'on s'intéresse uniquement aux conditions d'effluent non dilué (100%), les inhibitions des taux d'alimentation diminuent le long du traitement, passant de 70% pour l'effluent secondaire (Ilr) à 50% à la sortie de la biofiltration DN (Bf).

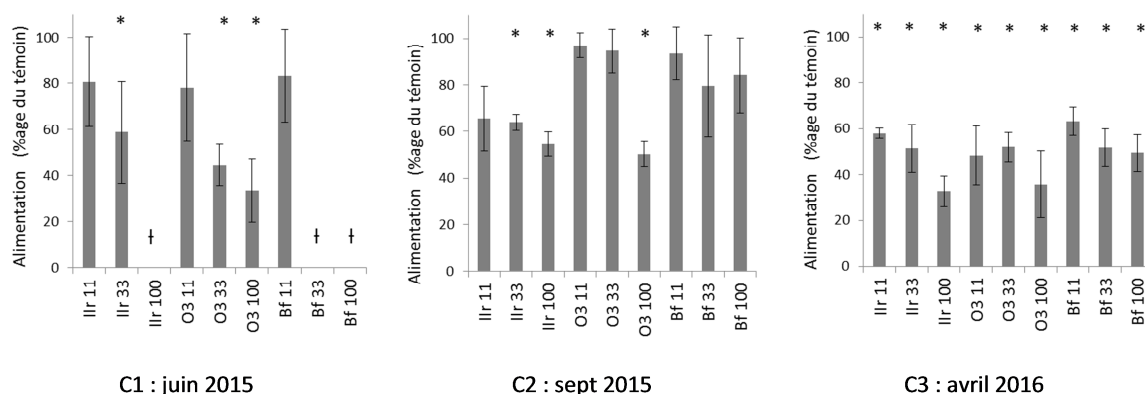


Figure 9 : Taux d'alimentation (moy ± E.T ; n = 4) exprimé en pourcentage du témoin pour les différentes conditions testées (les effluents IIR, O3, Bf à 11, 33 et 100%) et pour les trois campagnes expérimentales. Les † correspondent aux conditions où la mortalité est importante et pour lesquelles les analyses n'ont pas pu être effectuées. Les \* correspondent aux valeurs pour lesquelles un effet significatif a été mesuré.

### Marqueurs de reproduction

En raison des fortes mortalités observées dans la campagne 1 et dans les concentrations 100% de la campagne 2, les paramètres de reproduction n'ont pas été obtenus pour ces conditions. Lors de la troisième campagne, des résultats incohérents sur le cycle de mue et la fécondité ont été observés dans les conditions O3. Les résultats concernant les marqueurs de reproduction pour ces conditions ne sont donc pas présentés.

- **Cycle de mue**

L'occurrence de femelles ayant atteint ou pas le stade de mue C2 est présentée dans la figure 10.

Lors de la campagne 2, en comparaison au témoin, une augmentation du nombre de femelles n'ayant pas atteint le stade de mue C2 a été observée pour les trois effluents à la concentration de 33% et en sortie du traitement d'ozonation à 11% (O3 11). Toutefois, cette observation concerne trop peu de femelles. Les effets ne sont pas statistiquement significatifs.

En campagne 3, un effet des effluents sur le cycle de mue a été observé, avec un impact significatif seulement dans la sortie de l'effluent secondaire à 100% ( $p_v = 4.10^{-3}$ ). Dans les conditions « sortie biofiltration DN », aucune différence significative n'a été notée entre les trois concentrations d'effluent. Une diminution significative de l'impact du rejet sur le cycle de mue a ainsi été observée le long du traitement ; l'effluent de sortie de station d'épuration n'ayant pas d'effet sur le déroulement du cycle de mue.

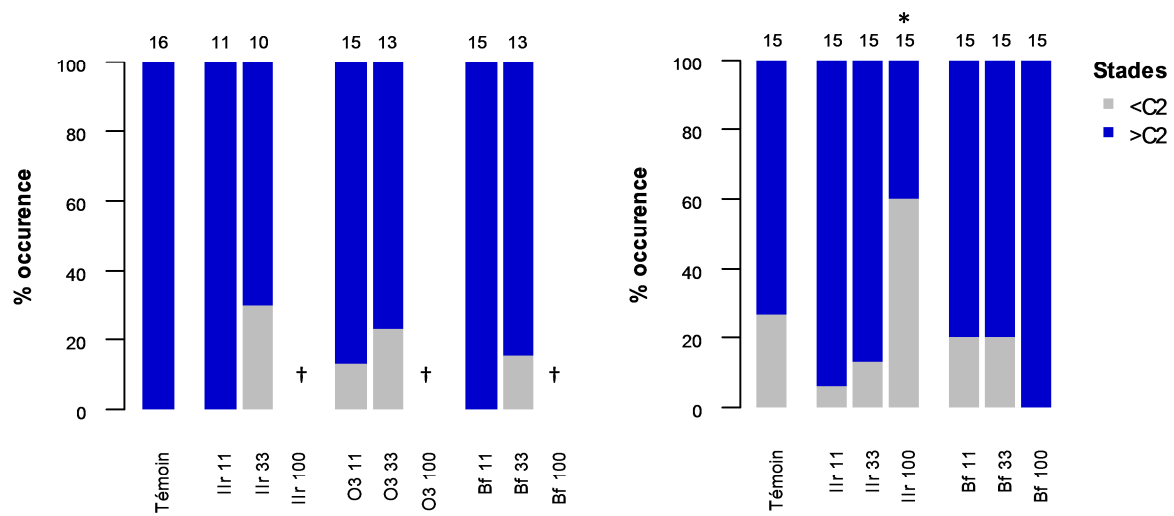


Figure 10 : Distribution des stades de mue observés chez les ♀ après exposition de 21 jours maximum dans les différentes conditions testées (les effluents IIR, O3, Bf à 11, 33 et 100%) et pour les campagnes expérimentales de sept 2015 et avril 2016. Les chiffres au-dessus des barres d'histogramme correspondent au nombre de femelles pour lesquelles le stade de mue a été déterminé. Les † correspondent aux conditions où la mortalité est trop importante et pour lesquelles les analyses n'ont pas pu être effectuées. Les \* correspondent aux valeurs pour lesquelles un effet significatif a été mesuré.

- **Fertilité : nombre d'ovocytes produits par femelle**

Le nombre d'ovocytes normalisé par la taille des femelles est présenté dans la figure 11. Pour les deux campagnes C2 et C3, et pour les conditions dans lesquelles la survie a été suffisamment élevée (campagnes C2 et C3), le nombre d'ovocytes dénombré dans les différentes conditions d'effluents est proche du nombre d'ovocytes observés dans le témoin (C2 : moy<sub>témoin</sub> = 1,33 ; ET<sub>témoin</sub> = 0,68 ; C3 : moy<sub>témoin</sub> = 1.44 ; ET<sub>témoin</sub> = 0,58). Aucun impact significatif des effluents n'a été observé.

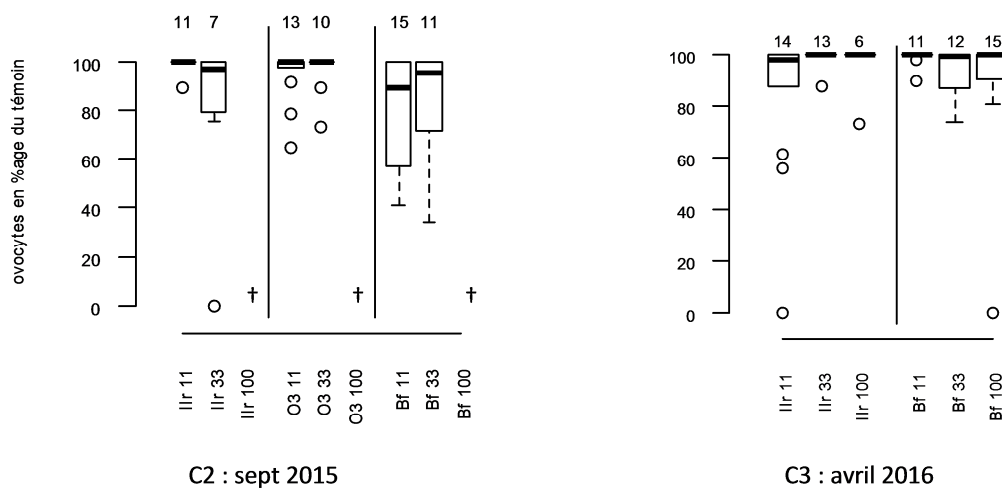




Figure 11 : Fertilité exprimée en pourcentage d'ovocytes produits par rapport au nombre d'ovocytes moyen dans la condition témoin, après une exposition des ♀ de 21 jours au maximum, dans les différentes conditions testées (les effluents IIR, O3, Bf à 11, 33 et 100%), pour les campagnes expérimentales de sept 2015 et avril 2016. Les chiffres au-dessus des boxplots correspondent au nombre de femelles pour lesquelles la fertilité a été mesurée. Les † correspondent aux conditions où la mortalité est trop importante et pour lesquelles les analyses n'ont pas pu être effectuées.

- **Fécondité : nombre d'embryons par femelle**

Les résultats observés pour la fécondité sont présentés dans la figure 12. Pour les deux campagnes (C2 et C3) pour lesquelles la survie a permis une analyse de la fécondité, une relation dose-réponse significative a été observée pour chaque effluent ( $p$  des  $r^2$  de  $1.10^{-5}$ ,  $1.10^{-4}$ ,  $5.10^{-8}$ ,  $1.10^{-2}$  et  $3.10^{-3}$  respectivement pour les effluents IIR, O3, Bf en campagne 2, et IIR et Bf en campagne 3). Lors de la campagne 2, un impact significatif et très marqué sur la production d'embryons a été observé pour les trois effluents à la concentration de 33%. Les valeurs médianes s'élèvent à 20% du témoin dans le secondaire, et 0% du témoin en sortie d'ozonation et de biofiltration DN ( $p$ -values respectives de  $1.10^{-5}$ ,  $8.10^{-4}$ ,  $2.10^{-5}$ ). A la concentration la plus faible (11%), seul l'effluent de sortie de biofiltration DN a impacté significativement la production d'embryons, montrant de la toxicité après ce traitement (médiane à 35% du témoin,  $p$  =  $1.10^{-3}$ ). A l'inverse lors de la campagne 3, une diminution de l'impact sur la production des embryons a été observée le long du traitement. Un impact fort a été mesuré dans les trois concentrations testées pour l'effluent secondaire (IIR, médianes toutes inférieures à 20% du témoin), alors que seules les concentrations de 33% et 100% ont impacté la production d'embryons à la sortie de la biofiltration DN (médiane à 0). La médiane de la concentration 11% d'effluent en sortie de biofiltration DN (Bf11) s'élève à 83% du témoin.

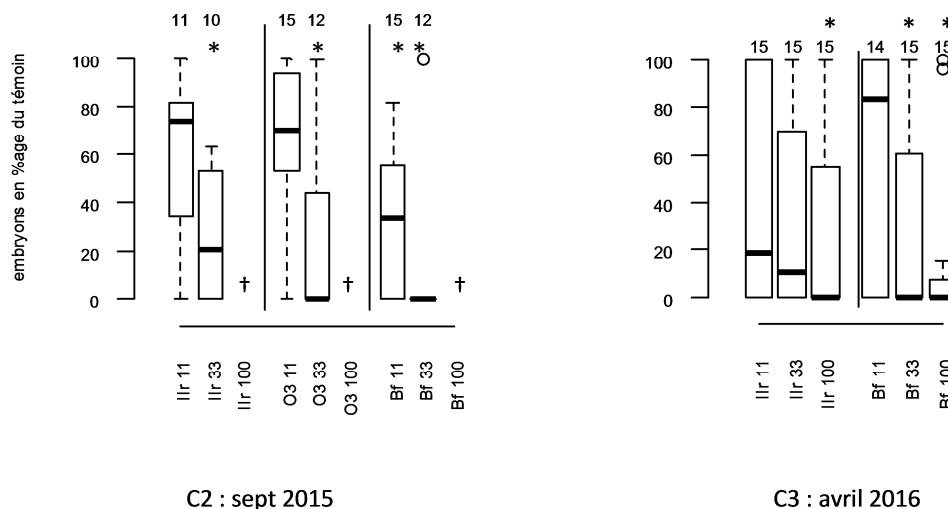


Figure 12 : Fécondité exprimée en pourcentage d'embryons produits par rapport au nombre d'embryons moyen de la condition témoin, après une exposition des ♀ de 21 jours au maximum, dans les différentes conditions testées (les effluents IIR, O3, Bf à 11, 33 et 100%) pour les campagnes expérimentales de sept 2015 et avril 2016. Les chiffres au-dessus des boxplots correspondent au nombre de femelles pour lesquelles la fertilité a été mesurée. Les † correspondent aux conditions où la mortalité est importante et pour lesquelles les analyses n'ont pas pu être effectuées. Les \* correspondent aux valeurs pour lesquelles un effet significatif a été mesuré.

### 3.1.3. Biomarqueurs

#### AChE

Les résultats des mesures d'activité AChE sont présentés dans la figure 13. En raison des mortalités significatives observées dans les conditions Ilr 100, Bf 33 et Bf 100 en campagne 1, le niveau d'AChE n'a pas pu être mesuré. Pour les trois campagnes et les différentes conditions testées, aucune inhibition significative de l'activité acétylcholinestérase n'a été observée.

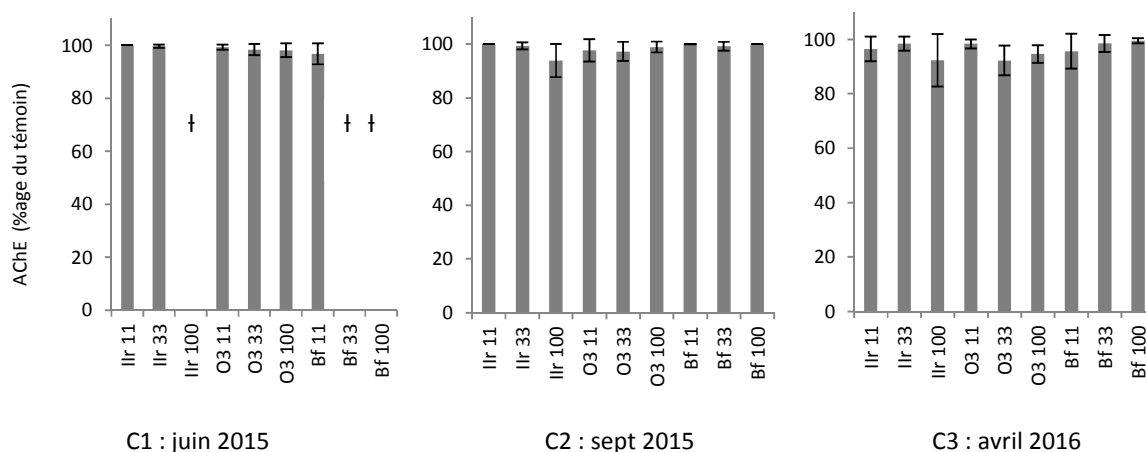


Figure 13: Activité acétylcholinestérase (moy ± E.T ; n = 5) exprimée en pourcentage du témoin pour les différentes conditions testées (les effluents IIR, O3, Bf à 11, 33 et 100%) et pour les trois campagnes expérimentales. † correspond aux conditions où la mortalité a été importante et pour lesquelles les analyses n'ont pas pu être effectuées.

### 3.1.4. Bioaccumulation de micropolluants métalliques et organiques dans le gammare

Les résultats des dosages en composés métalliques et organiques dans les organismes exposés *ex situ*, sont présentés dans les tableaux 9 et 11. L'interprétation de ces données a été réalisée à l'aide des valeurs seuils disponibles pour les tests *in-situ*. A titre informatif, les résultats de 15 composés métalliques supplémentaires qui ne disposent pas de valeur seuils sont présentés dans le tableau 10.

#### Composés métalliques

Les valeurs mesurées dans les gammares exposés aux trois effluents bruts ne dépassent pas les seuils de contamination définis et utilisables pour les tests *in-situ*. En comparaison aux concentrations mesurées dans le témoin, les métaux Fer et Manganèse sont plus élevées dans les trois effluents et ceci pour les deux campagnes de mesure (tableau 10).

Tableau 9 : Teneurs en micropolluants métalliques, exprimées en µg/g de poids sec, dans les gammares exposés aux 3 effluents bruts et à la condition témoin pour les campagnes de juin et septembre 2015, et pour lesquels une valeur seuil est disponible (un code couleur est attribué selon la conformité des résultats au référentiel; en vert, les résultats sont conformes au référentiel, en rouge les résultats sont non conformes).

	C1 : juin 2015				C2 : sept 2015			
	Témoïn	llr 100	O3 100	Bf 100	Témoïn	llr 100	O3 100	Bf 100
<b>Arsenic</b>	1.16	1.18	1.03	1.1	0.96	1.13	1.2	1.07
<b>Cadmium</b>	0.07	0.06	0.06	0.05	0.05	0.08	0.09	0.06
<b>Chrome</b>	0.24	0.21	0.24	0.17	0.22	0.22	0.33	0.33
<b>Cobalt</b>	0.08	0.12	0.34	0.2	0.07	0.26	0.37	0.26
<b>Cuivre</b>	60.7	67	63.7	68.2	60.1	57.8	63.7	57.2
<b>Mercure</b>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.05	0.05	0.06	0.06
<b>Nickel</b>	0.23	0.49	1.19	0.9	0.26	0.69	1.11	1
<b>Plomb</b>	0.21	0.13	0.17	0.11	0.18	0.39	0.17	0.16
<b>Selenium</b>	1.95	1.87	1.99	1.72	1.28	1.47	1.33	1.27
<b>Zinc</b>	47.7	54.1	52.5	49.9	52	59.5	60.6	56.8

Tableau 10 : Teneurs en micropolluants métalliques, exprimées en µg/g de poids sec, dans les gammars exposés aux 3 effluents non dilués et à la condition témoïn au cours des campagnes de juin et septembre 2015, et pour lesquels les valeurs seuils ne sont pas disponibles.

	C1 : juin 2015				C2 : sept 2015			
	Témoïn	llr 100	O3 100	Bf 100	Témoïn	llr 100	O3 100	Bf 100
<b>Aluminium</b>	59.2	36.1	48.9	25.4	25.6	26.9	30.4	34
<b>Antimoine</b>	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
<b>Argent</b>	0.14	0.15	0.15	0.13	0.11	0.12	0.17	0.16
<b>Baryum</b>	51.8	50.7	43.7	46.7	45.5	30.4	33.4	25.7
<b>Béryllium</b>	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
<b>Bore</b>	2.89	3.07	3.04	3.01	3.46	3.61	3.28	4.62
<b>Etain</b>	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
<b>Fer</b>	45.7	74.3	98.9	71.3	41.8	85.7	99.1	107.9
<b>Lithium</b>	0.21	0.17	0.17	0.16	0.23	0.13	0.14	0.14
<b>Manganèse</b>	35	28.6	55.8	53.8	22.8	50.6	57.2	80.2
<b>Molybdène</b>	0.25	0.35	0.42	0.28	0.29	0.38	0.39	0.39
<b>Tellure</b>	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
<b>Thallium</b>	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10	<0.10
<b>Titane</b>	1.67	3.06	2.08	1	<1.00	1.08	1.28	1.33
<b>Uranium</b>	0.11	0.04	0.05	0.02	0.12	0.03	0.03	0.03

### Composés organiques

L'essentiel des substances dosées sont en dessous des seuils de contamination définis en rivière pour les tests *in-situ*. Quelques substances dépassent ponctuellement les seuils dans les divers traitements. Le point remarquable concerne les composés PCB dosés en première campagne qui dépassent les seuils de contamination dans l'effluent en aval du traitement complémentaire de biofiltration DN (Bf).

Tableau 11: Teneurs en micropolluants organiques, exprimées en ng/g de poids sec dans les gammars exposés aux 3 effluents bruts et à la condition témoïn au cours des campagnes de juin et septembre 2015, disposant d'une valeur seuil (un code couleur est attribué selon la conformité des résultats au référentiel; en vert, les résultats sont conformes au référentiel, en rouge les résultats sont non conformes).

	C1 : juin 2015				C2 : sept 2015				LQ	max mesuré en rivière
	Témoins	Ilr 100	O3 100	Bf 100	Témoins	Ilr 100	O3 100	Bf 100		
Acenaphthene	5	6	2	11	2	4	2	7	1	191
Acenaphthylene	<1	<1	1	6	1	3	1	6	1	52
Anthracene	<1	<1	1	2	<1	<1	<1	4	1	576
Benzo (a) Anthracene	2	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	578
Benzo (a) pyrene	<1	<1	<1	2	<1	1	<1	<1	1	112
Benzo (b+j)										
Fluoranthene	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	2	262
Benzo (e) Pyrene	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	150
Benzo (g,h,i) Perylene	2	2	<1	6	<1	<1	3	12	1	70
Benzo (k) Fluoranthene	2	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	92
Chrysene	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	671
Fluoranthene	10	13	3	9	3	4	2	8	1	2430
Fluorene	10	13	5	18	5	10	4	18	1	50
Indeno (1,2,3-cd)										
Pyrene	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	1	53
Naphthalene	71	87	21	<1	24	38	25	158	1	142
Perylene	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	118
Phenanthrene	38	46	17	61	12	23	9	41	1	4510
Pyrene	6	8	3	7	3	5	2	9	1	526
DDD 4,4'	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	45
DDE 2,4'	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	11
DDE 4,4'	1	2	14	23	5	7	2	7	1	200
DDT 2,4'	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	59
DDT 4,4'	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	114
HCH Gamma (Lindane)	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	1	12
Hexachlorobenzene	<1	<1	2	5	2	4	2	3	1	11
PCB 101	<1	<1	35	54	16	38	5	14	1	520
PCB 118	<1	<1	37	64	13	42	6	18	1	108
PCB 138	<1	<1	37	63	11	23	5	16	1	157
PCB 153	<1	<1	45	75	16	26	5	21	1	323
PCB 180	<1	<1	10	19	3	4	<1	4	1	220
PCB 28	<1	<1	5	10	2	3	<1	3	1	46
PCB 52	<1	<1	13	23	7	14	2	7	1	300

## 3.2. IMPACT SUR LE MILIEU RECEPTEUR

### 3.2.1. Etude *in-situ* : *Gammarus fossarum*

#### Physico-chimie du milieu

Le tableau 12 présente les paramètres physico-chimiques mesurés dans la rivière au niveau des différents points de mesure et au cours de toutes les campagnes. Les conditions physico-chimiques sont dans la gamme optimale pour laquelle l'outil a été validé par IRSTEA. On a distingué toutefois une conductivité ponctuelle supérieure à 1000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  au niveau de la confluence en campagne 1, et à

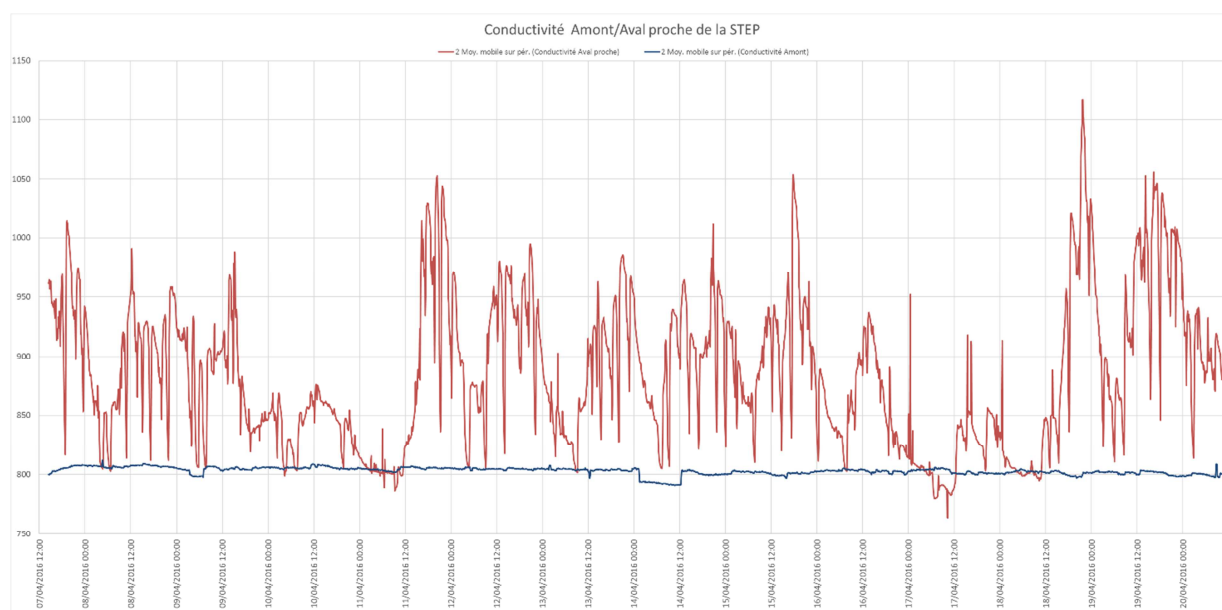
l'aval proche du rejet en troisième campagne. Une température moyenne supérieure à 20°C en aval de la station de traitement au cours de la seconde campagne a également été mesurée.

Les chroniques d'oxygène et de conductivité mesurées en continu pendant la campagne 3, du 7 au 20 avril 2016 sont présentées dans la figure 14 et les résultats d'analyses ponctuelles en anions et cations dans le tableau 13. A partir des chroniques de mesures en continu, des pics de conductivité dépassant 1000 µS/cm sont retrouvés en aval proche du rejet de la station d'épuration. L'oxygène, a été ponctuellement mesuré en dessous du seuil critique de 5 mg/L. Des valeurs moyennes de 3 et 5 mg/L d'oxygène dissous sur des séries de 30 à 90mn, ont essentiellement été mesurés entre le septième jour et la fin de l'exposition. Concernant les autres paramètres physico-chimiques (tableau 13), il est à noter que le nitrite, connu pour sa toxicité, est plus élevé à l'aval proche et éloigné du rejet de la station d'épuration qu'à l'amont.

Tableau 12 : Paramètres physico-chimiques suivis dans les milieux étudiés

	C1 : avril 2015				C2 : sept 2015				C3 : avril 2016		
	Amont STEP	Aval STEP	Amont confluence	Aval confluence	Amont STEP	Aval STEP	Amont confluence	Aval confluence	Amont	Aval proche	Aval éloigné
Température (°C)	[14,4 ; 15,7 ; 17,7]	[14,3 ; 17,6 ; 19,9]	[13,3 ; 15,3 ; 18,9]	[13,4 ; 15,9 ; 19,0]	[14,7 ; 16,3 ; 19,5]	[15,0 ; 21,9 ; 23,7]	[13,3 ; 16,0 ; 18,7]	[14,7 ; 18,0 ; 20,8]	[12,9 ; 14,4 ; 15,7]	[13 ; 17 ; 18,8]	[13,6 ; 16,6 ; 19,1]
Conductivité (µS/cm)	[787 ; 810]	[806 ; 983]	[835 ; 1094]	[896 ; 1018]	[725 ; 819]	[959 ; 1250]	[833 ; 992]	[862 ; 997]	[773 ; 803 ; 812]	[740 ; 876 ; 1136]	[873 ; 925]
Salinité (‰)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	[0,378 ; 0,393 ; 0,398]	[0,362 ; 0,430 ; 0,865]	NA
Oxygène (mg/L)	[12,2 ; 12,5]	[10,6 ; 11,2]	[11,2 ; 11,4]	[9,94 ; 10,13]	[7,0 ; 7,1]	[6,3 ; 6,7]	[5,42 ; 9,4]	[5,2 ; 8,5]	[7,1 ; 8,0 ; 9,8]	[1,9 ; 6,2 ; 8,4]	[7,1 ; 8,1]
pH (unité pH)	[8 ; 8,5]	[7,8 ; 8,3]	[8,4 ; 8,6]	[8,5 ; 8,6]	[6,8 ; 6,9]	6,8	[6,8 ; 6,9]	6,9	7,7	[7,8 ; 7,9]	[8 ; 8,1]

[minimum, médiane, maximum], NA : Non Analysé



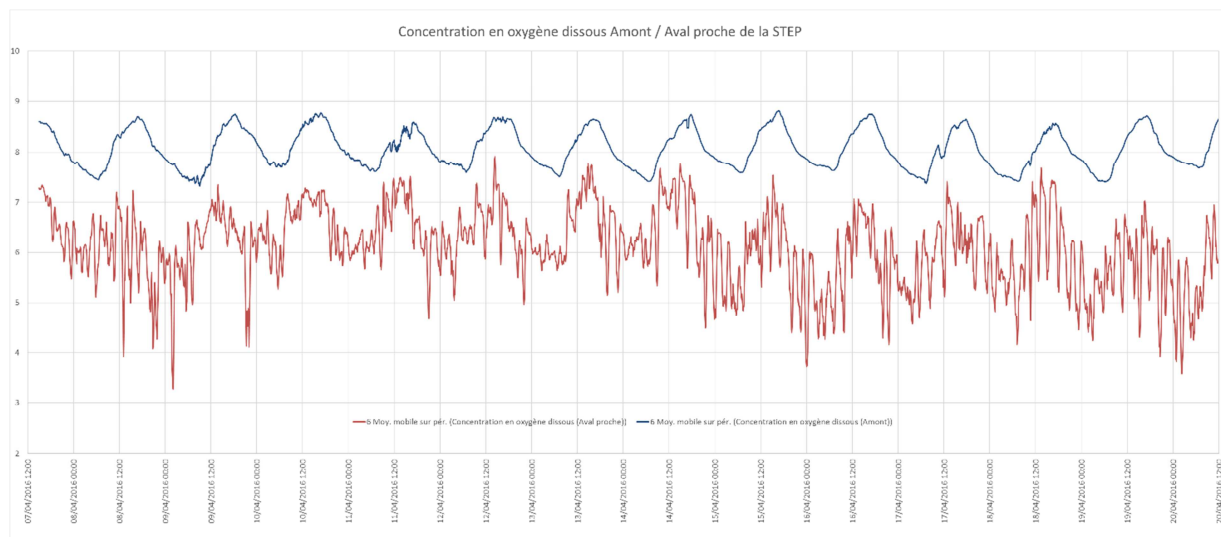


Figure 14 : Chronique de conductivités et de concentrations en oxygène dissous mesurés en continu à l'amont (en bleu) et à l'aval (en rouge) du rejet de la station d'épuration au cours de la campagne 3 (du 7/04/16 au 20/04/16).

Tableau 13: Résultats d'analyse des paramètres majeurs mesurés dans la Bouillide lors de la campagne 3, le 13 avril 2016.

	Amont	Aval proche	Aval éloigné
<b>Ammonium (NH4+)</b>	<0,05	0,05	0,11
<b>Bicarbonates</b>	438	283	285,5
<b>Calcium (Ca)</b>	116	88	86
<b>Carbonates</b>	<12	<12	<12
<b>Chlorures (Cl)</b>	25	120	110
<b>Fluorures</b>	0,2	0,2	0,2
<b>Magnésium (Mg)</b>	35	21	20
<b>MES</b>	3,2	<1	<1
<b>Azote nitreux (NO2-N)</b>	<0,003	0,164	0,124
<b>Nitrites (NO2-)</b>	<0,01	0,54	0,41
<b>Orthophosphate (PO4-P)</b>	<0,03	0,035	0,04
<b>Orthophosphate (PO43-)</b>	<0,1	0,11	0,12
<b>Potassium (K)</b>	<1	13	14
<b>Sodium (Na)</b>	16	64	62
<b>Sulfates</b>	66	51	49
<b>T.A</b>	<2	<2	<2
<b>T.A.C</b>	35,9	23,2	23,4

### Traits d'histoire de vie

Le tableau 14 présente les résultats d'analyse obtenus au cours des trois campagnes pour tous les marqueurs de toxicité mesurés (survie, inhibition alimentaire, inhibition AChE, marqueurs de reproduction, perturbation endocrinienne).

- **Survie des mâles**

Après 7 jours d'encagement en première campagne, il n'y a pas d'effet sur la survie des organismes au niveau de la station d'épuration (mortalité amont et aval de - 19%) ou de l'amont de la confluence (25%). Les taux de mortalité sont compris dans la gamme de référence (0 à 25% de mortalité). A l'inverse, en aval de la confluence, un taux de mortalité plus élevé de 38% a été observé.

Pour la campagne 2, un effet prononcé sur la survie des gammares a été observé en aval de la station d'épuration ; le taux de mortalité est égal à 100%. Pour les autres points de mesure, les taux de mortalité sont compris entre 11% et 14%.

Lors de la troisième campagne, la mortalité en aval éloigné a été supérieure à 50%. Le taux de mortalité pour les points de mesure amont et aval proche du rejet est inférieur à 25%.

*Rq : En raison des impacts significatifs sur la survie dans les stations en aval proche de la station d'épuration en campagne 2, et en aval éloigné en campagne 3, les marqueurs d'alimentation et d'inhibition de l'ACHé n'ont pas pu être réalisés. Les marqueurs d'alimentation et d'ACHé de la station aval confluence de la première campagne, sont présentés uniquement à titre indicatif, en raison de la faible survie mesurée.*

- **Survie des femelles**

Lors de la première campagne, les taux de mortalités sont plus élevés dans la Brague au niveau de la confluence (amont : 52% ; aval : 47%) que dans la Bouillide en amont et aval du rejet de la station d'épuration (amont : 10% ; aval : 14%).

A l'inverse, lors de la deuxième campagne, les taux de mortalité sont plus élevés dans les stations qui encadrent le rejet de la station d'épuration avec 68% de mortalité en amont et 100% en aval. Les mortalités sont sensiblement plus faibles dans la Brague, au niveau de la confluence.

Lors de la troisième campagne, un effet sur la survie a été observé dans la Bouillide en aval proche et éloigné du rejet de la station d'épuration.

- **Inhibition alimentaire**

Lors de la première campagne, un impact sur le taux d'alimentation des organismes exposés dans la Bouillide a été observé en amont et en aval proche du rejet de la station d'épuration, ainsi que dans la Brague en aval de la confluence (respectivement 29, 66, et 36 % d'inhibition alimentaire). L'effet est nettement plus prononcé en aval proche du rejet. La Brague en amont de la confluence avec la Bouillide n'induit pas d'effet sur le taux d'alimentation.

Au cours de la campagne 2, aucun effet n'a été observé pour l'alimentation sur les trois stations où la mesure a été possible, l'amont de la station d'épuration et l'amont et l'aval de la confluence entre la Brague et la Bouillide.

Lors de la troisième campagne, où seule la Bouillide a été étudiée, aucune inhibition de l'alimentation n'a été observée en amont de la station d'épuration. En revanche, le point aval proche présente une très forte inhibition de l'alimentation (74%).

- **Marqueurs de reproduction et de perturbation endocrinienne**

Aucun effet sur les marqueurs en lien avec la reproduction n'a été noté lors de la première campagne.

Lors de la deuxième campagne, en raison de la mortalité élevée, seulement 9 femelles ont pu être analysées en amont de la station d'épuration. Aucun effet sur les marqueurs de reprotoxicité et de perturbation endocrinienne n'a été noté dans la Bouillide et dans la station en aval de la confluence. En revanche, dans la Brague en amont de la confluence, des retards de mue attribuable à un effet de type « perturbateur endocrinien » ont été observés.

Lors de la troisième campagne, aucun effet n'a été observé au niveau du point amont dans la Bouillide. Aucune mesure n'a pu être réalisée pour le point aval proche et aval éloigné du fait d'une mortalité très importante des organismes femelles.

## Biomarqueur : AChE

Après 7 jours d'encagement au mois d'avril 2015, septembre 2015 et avril 2016, l'activité enzymatique AChE mesurée correspond aux valeurs de la gamme de référence, indiquant l'absence de pression de type neurotoxique et donc d'insecticides anti-cholinestérasiques (insecticides "carbamates" et "organophosphorés") dans le milieu récepteur. Dans la Brague, en amont de la confluence avec la Bouillide, une inhibition de l'AChE dépassant tout juste les seuils a été mesurée, indiquant un impact neurotoxique en lien avec la présence d'insecticides anti-cholinestérasiques. Rappelons, qu'en raison d'une forte mortalité, ce marqueur n'a pas pu être mesuré en aval direct de la station d'épuration dans la Bouillide en deuxième campagne et en aval éloigné en troisième campagne.

Tableau 14: Effets toxiques mesurés dans les stations étudiés sur la Brague et la Bouillide (un code couleur est attribué selon la conformité des résultats au référentiel; en vert, les résultats sont conformes au référentiel, en orange, un effet toxique est suspecté et en rouge, l'effet toxique est avéré).

	C1 : du 29/04/15 au 06/05/15				C2 : du 15/09/15 au 22/09/15				C3 : du 06/04/16 au 13/04/16		
	Amont STEP	Aval STEP	Amont Confl.	Aval Confl.	Amont STEP	Aval STEP	Amont Confl.	Aval Confl.	Amont	Aval proche	Aval éloigné
Mortalité (%)	19	19	25	38	11	100	14	13	10	14	78
Inhibition alimentaire (%)	29	66	20	36	9		6	17	11	74	
Inhibition AChE (%)	-13	-11	-19	-10	-11		16	-6	-4,7	-16,7	

Reproduction	C1 :				C2 :				C3 :		
	du 29/04/15 au 13/05/15				du 15/09/15 au 29/09/2015				du 06/04 au 22/04	du 06/04/16 au 20/04/16	
	Amont STEP	Aval STEP	Amont Confl.	Aval Confl.	Amont STEP	Aval STEP	Amont Confl.	Aval Confl.	Amont	Aval proche	Aval éloigné
Mortalité (%)	10	14	52	47	68	100	43	35	4	100	100
n individus	15	15	12	14	9	0	15	15	18	0	0
Indice de fécondité	3,9	2,9	3,7	3,9	2,7		2,7	2,5	3,1		
Cycle de mue	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme		Retard avéré	Conforme	Conforme		
Perturbation endocrinienne	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme	Conforme		oui	Conforme	Conforme		

## Bioaccumulation dans le gammare

- **Composés métalliques**

Le tableau 15 présente les résultats d'analyse pour 10 métaux disposant d'une valeur seuil. La colonne « Maximum » présente la valeur maximale déjà enregistrée dans les milieux aquatiques pour chaque élément dans la base de données BIOMAE.



Dans les stations pour lesquelles le taux de survie a permis une analyse des composés métalliques aucune contamination biodisponible anormale n'a été observée pour ces éléments métalliques lors des deux premières campagnes.

Tableau 15 : Teneurs en micropolluants métalliques exprimés en µg/g de poids sec dans les gammars après une semaine d'encagement pour les campagnes 1 et 2 et pour lesquels il existe des valeurs seuils.

	C1 : avril 2015				C2 :sept 2015				Max
	Amont STEP	Aval STEP	Amont Confluence	Aval Confluence	Amont STEP	Aval STEP	Amont Confluence	Aval Confluence	
	Bouillide	Bouillide	Brague	Brague	Bouillide	Bouillide	Brague	Brague	
<b>Arsenic</b>	1,6	1,2	1,4	1,2	1,1	na	1,2	1,4	<b>9,2</b>
<b>Cadmium</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	na	0,1	0,1	<b>35</b>
<b>Chrome</b>	0,4	0,4	0,2	0,2	0,6	na	0,4	0,5	<b>66</b>
<b>Cobalt</b>	0,2	0,2	0,1	0,1	0,2	na	0,2	0,2	<b>4,8</b>
<b>Cuivre</b>	73	36	69	61	75	na	70	77	<b>93</b>
<b>Mercure</b>	0,04	0,03	0,04	0,03	<0,05	na	<0,05	<0,05	<b>0,2</b>
<b>Nickel</b>	0,3	0,7	0,3	0,5	0,4	na	0,5	0,7	<b>14</b>
<b>Plomb</b>	0,3	0,2	0,2	0,2	0,4	na	0,4	0,7	<b>33</b>
<b>Sélénium</b>	2,2	1,6	2,0	1,8	1,6	na	1,8	1,8	<b>3,3</b>
<b>Zinc</b>	71	65	69	63	65	na	66	66	<b>619</b>

na : non analysé

- **Composés organiques**

Le tableau 16 présente les résultats d'analyse pour les contaminants organiques disposant d'une valeur seuil.

Après 7 jours d'exposition, aucune contamination biodisponible anormale en éléments organiques n'a été observée en avril et en septembre 2015 dans les sites, pour lesquels la survie a été suffisante pour réaliser les dosages.

Tableau 16 : Teneurs en micropolluants organiques exprimés en ng/g de poids sec dans les gammares après une semaine d'encagement pour les campagnes 1 et 2 et pour lesquelles il existe des valeurs seuils.

	C1 : avril 2015				C2 : sept 2015				
	Amont STEP	Aval STEP	Amont Confl.	Aval Confl.	Amont STEP	Aval STEP	Amont Confl.	Aval Confl.	Max
	Bouillide	Bouillide	Brague	Brague	Bouillide	Bouillide	Brague	Brague	
Benzo (a) Anthracène	2	2	2	2	<1	na	<1	<1	578
Benzo (a) Pyrène	<1	<1	<1	<1	<1	na	<1	<1	112
Benzo (b,j) Fluoranthene	<1	<1	<1	<1	<1	na	<1	3	262
Benzo (k) Fluoranthene	<1	<1	<1	<1	<1	na	<1	1	92
Benzo (e) Pyrène	<1	<1	<1	<1	<1	na	<1	<1	149
Benzo (g,h,i) Perylene	<1	<1	2	<1	1	na	1	2	31
Chrysene	<1	<1	<1	<1	<1	na	<1	<1	672
Dibenzo (a,c) Anthracène	<1	<1	<1	<1	<1	na	<1	<1	6
Indeno (1,2,3-cd) Pyrene	<1	<1	<1	<1	<1	na	<1	2	20
Perylene	<1	<1	<1	<1	<1	na	<1	<1	48
DDD 4,4'	2	3	2	3	<1	na	<1	<1	45
DDE 2,4'	<1	<1	<1	<1	<1	na	<1	<1	11
DDE 4,4'	6	10	7	8	2	na	3	2	200
DDT 2,4'	<1	<1	<1	1	<1	na	<1	<1	216
DDT 4,4'	7	6	8	13	<1	na	<1	<1	114
HCH Gamma (Lindane)	<1	1	<1	<1	<1	na	<1	<1	13
Hexachloro benzene	1	2	1	1	<1	na	<1	<1	8
PCB 101	14	23	14	17	5	na	6	4	520
PCB 118	13	22	14	17	4	na	5	3	108
PCB 138	12	22	12	16	4	na	4	3	151
PCB 153	19	31	21	25	5	na	6	4	323
PCB 180	3	5	3	5	<1	na	<1	<1	220
BDE 47	8	17	9	12	<1	na	<1	<1	61
BDE 99	3	9	4	5	<1	na	<1	<1	40

na : non analysé / à cause d'une trop forte mortalité, les analyses n'ont pas pu être réalisées en aval de la station d'épuration.

### 3.2.2. Etude sur le peuplement piscicole autochtone

#### Biomarqueurs

La campagne de prélèvement a permis d'échantillonner 20 chevesnes par station. Les poissons prélevés sont homogènes en termes de poids et de taille. De plus, les indices de conditions (K de Fulton, hépato-somatique, gonado-somatique) sont similaires quel que soit le site échantillonné.

Au cours de l'examen morphologique réalisé sur les chevesnes, 40 % des individus présentent des parasites au niveau de leur tube digestif sur le site aval contre 10 % en amont. Au niveau de l'histologie gonadique, aucune intersexualité n'a été observée sur les sites échantillonnés.

Les réponses obtenues pour les différents biomarqueurs mesurés sont présentées dans le tableau 18. Les profils de réponse montrent peu d'effet entre l'amont et l'aval pour l'ensemble des biomarqueurs mesurés en dehors des paramètres immunitaires.

En effet, les poissons en aval de la station d'épuration (confluence Brague-Bouillide) se caractérisent par :

- un taux anormal de parasitisme (40 % des individus),
- une réduction de la mortalité cellulaire apoptotique et nécrotique,
- une augmentation de la capacité de phagocytose (adhésion des pathogènes) sans effet sur l'efficacité de phagocytose (internalisation du pathogène),
- une réduction de la présence en lysosome.

Tableau 16 : Résultats des biomarqueurs mesurés dans les Chevesnes prélevés dans la Brague le 23 septembre 2015. Les \* correspondent aux valeurs pour lesquelles un effet significatif a été mesuré

Fonctions physiologiques	Biomarqueurs (unité)	Sexe	Site Amont confluence	Site Aval confluence
<b>Gestion de l'énergie</b>	Statut lipidique (g/g poids frais)	M/F	4,8 ± 0,6	5,2 ± 1,0
	Lymphocytes (%)	M/F	96,1 ± 2,1	94,9 ± 5,9
	Mortalité cellulaire (apoptose %)	M/F	0,09 ± 0,03*	0,02 ± 0,02
	Mortalité cellulaire (nécrose)	M/F	0,8 ± 0,3*	0,4 ± 0,2
<b>Réponses immunitaires</b>	Capacité de phagocytose (%)	M/F	27,1 ± 9,0*	40,8 ± 11,4
	Efficacité de phagocytose (%)	M/F	16,0 ± 3,2	15,1 ± 3,9
	Flambée oxydative (MFI)	M/F	2,8 ± 1,8	1,3 ± 0,4
	Présence en lysosomes (MFI)	M/F	33,7 ± 4,9*	26,4 ± 3,4
<b>Biotransformation</b>	EROD (pmol/min/mg prot tot)	M/F	1,9 ± 0,8	1,9 ± 1,1
	CYP-3A (pmol/min/g prot tot)	M/F	19,0 ± 7,2	15,6 ± 8,2
	GST (U.10 <sup>3</sup> /g prot tot)	M/F	2,2 ± 0,5	2,8 ± 0,9
<b>Stress oxydant</b>	SOD (U.10 <sup>3</sup> /g prot tot)	M/F	14,5 ± 8,1	19,2 ± 11,6
	GPx (U/g prot tot)	M/F	231,8 ± 131,1	288,4 ± 91,5
	GSH (µmol/g prot tot)	M/F	2,6 ± 0,7	2,7 ± 0,8
	TBARS (nmol/g prot tot)	M/F	45,4 ± 31,9	35,6 ± 24,2
	CAT (U.10 <sup>6</sup> /g prot tot)	M/F	6,3 ± 1,7	6,5 ± 2,7
<b>Neurotoxicité</b>	AChE (U/g prot tot)	M/F	232,7 ± 52,8	181,6 ± 82,9
<b>Reproduction</b>	Vitellogénine (ng/mL)	M	58 [43–77] <i>a</i>	111 [48–252] <i>a</i>
<b>Génotoxicité (TOXEM)</b>	Micronoyaux (pour 1000 cellules)	M/F	0,2 ± 0,5	0,1 ± 0,5

## 4. DISCUSSION

### 4.1. EVALUATION DE LA QUALITE DU REJET ET IMPACT SUR LE MILIEU RECEPTEUR

#### 4.1.1. Etude *Ex-situ* : toxicité des effluents de la station d'épuration et évaluation de l'efficacité des traitements

Les résultats des biotests sur le gammare déployés dans le cadre des expérimentations *ex-situ* ont montré que les effluents de la station d'épuration des Bouillides ont une toxicité marquée sur le gammare.

La mortalité observée lors de la première campagne dans les concentrations brutes de rejet et dans la condition Bf 33 peut être liée à des aléas techniques qui ont conduit à des déficits en oxygénation en fin d'expérimentation pour les conditions témoin, Ilr 11, Bf 33, Bf 100 et toutes les conditions O3. Ce déficit a été également amplifié pour les conditions Bf par 1 - l'absence d'oxygène obligatoire dans la filière de traitement par biofiltration DN, et 2 - la consommation d'oxygène par les nitrites mesurés ponctuellement en fortes concentrations dans les effluents. Ces problèmes techniques ont été résolus pour les deux campagnes suivantes et une oxygénation adéquate a été réalisée pour compenser l'anoxie obligatoire de la filière de dénitrification par biofiltration.

Les biotests réalisés chez les mâles ont montré l'absence d'effets neurotoxiques des effluents, traduisant l'absence ou la présence de très faibles concentrations d'insecticides de type anti-cholinestérasique.

Des profils similaires entre campagnes ont été observés pour le taux d'alimentation et les impacts sur la reproduction, notamment pour les campagnes 2 et 3, réalisées dans des conditions techniques optimales. Une récupération de la prise alimentaire en sortie de station d'épuration a été observée dès le traitement par ozonation lors de la campagne 2 et suite à la biofiltration DN (Bf) pour la campagne 3. Notons que, dans l'effluent non dilué, la récupération de la prise alimentaire n'a jamais été complète. En deuxième campagne, elle a atteint 80% du témoin en sortie de station, et seulement 55% du témoin en 3<sup>ème</sup> campagne.

Concernant les biotests réalisés sur les femelles, les résultats observés lors des campagnes 2 et 3 confirment que l'effluent présente une toxicité aiguë sur le gammare, quel que soit le traitement. Il est à noter que les mortalités en sortie des traitements par ozonation et biofiltration DN sont plus faibles que celles observées à la sortie du secondaire, montrant un effet bénéfique des traitements complémentaires. De même, pour le cycle de mue et pour la fécondité, les effets observés à la sortie du secondaire sont plus marqués que ceux mesurés après ozonation et biofiltration DN, confirmant l'effet positif de ces deux traitements complémentaires. Les effets en sortie de STEU restent toutefois prononcés puisqu'aucune femelle ne porte d'embryons dans les effluents concentrés en sortie de biofiltration DN.

La présence ponctuelle en nitrite, observée principalement en sortie de biofiltration, peut également être responsable d'une partie des effets toxiques sur le gammare. Le nitrite présente, une LC50 de 2,09 et 12,3 mg/L à 96 h respectivement chez les amphipodes *Eulimnogammarus tolenatus* et *Gammarus sp* (Alonso *et al.*, 2006 ; Kelso *et al.*, 1999.) et de 6 mg/L chez le microcrustacé copépode *Daphnia obtusa*. Pour cette dernière espèce, les paramètres de reproduction sont altérés après 21 jours pour une EC 50 de 1,59 mg/L (Xiang *et al.*, 2011). Des mesures d'effets toxiques sur *E. tolenatus* par pulse et en post-exposition ont également été attribués aux nitrites dès 5 mg/L 8 heures après avoir été en contact avec ce composé (Alonso *et al.*, 2009).

Toutefois, la diminution des effets observée entre l'effluent secondaire et la sortie de la biofiltration, montre que la toxicité de l'effluent peut être attribuée à la présence de micropolluants et non aux

nitrites. D'autant plus, que les milieux testés fortement oxygénés, participent à la transformation des nitrites en nitrates et que la concentration élevée en ions chlorures, présent dans les effluents, atténue la toxicité du nitrite<sup>-</sup> du fait de leur compétition au niveau des canaux ioniques à chlorure (Alonso *et al.*, 2008).

Ces travaux montrent que les effluents de la station se caractérisent par la présence d'une contamination chimique biodisponible conduisant à des effets toxiques chez le gammare, et d'autre part, parmi les réponses biologiques ciblées, que le taux d'alimentation et le développement embryonnaire sont les réponses les plus sensibles et par conséquent de fort intérêt pour les études écotoxicologiques.

Les substances chimiques dosées dans le gammare n'ont montré aucune contamination biodisponible pour les 10 éléments métalliques et l'essentiel des substances organiques. Les contaminations en substances organiques, notamment en PCB, restent faibles avec des valeurs proches des valeurs seuils. Seule une augmentation en teneurs pour le fer et le manganèse a été observée entre les organismes témoins et ceux exposés aux effluents

Dans tous les cas, ces travaux n'ont pas permis d'identifier de profils de contamination biodisponibles pour les rejets étudiés et un effet des traitements sur le niveau de contamination biodisponible. Enfin et parmi les composés recherchés dans les organismes, il n'est pas possible d'identifier ceux responsables des effets toxiques observés. Cependant, il est à noter que le choix des molécules recherchés a été guidé par la disponibilité de valeurs seuils préalablement établies et que ces molécules ne sont pas forcément les plus pertinentes dans le cas de cette étude.

#### **4.1.2. Impact sur le milieu récepteur**

##### ***In-situ* : le gammare**

Les études de toxicité et de bioaccumulation à partir du gammare encagé ont permis de caractériser la qualité du milieu récepteur et les impacts de l'effluent de la station d'épuration sur ce dernier.

Les stations amont (amont du rejet sur la Bouillide et amont de la confluence Bouillide – Brague sur la Brague) montrent des effets toxiques sur les gammares encagés. Une inhibition de l'activité alimentaire dans la Bouillide a été notée lors de la première campagne. Une mortalité conséquente des organismes femelles en première campagne ainsi qu'une inhibition de l'activité acétylcholinestérase, et une perturbation endocrinienne ont été mesurées en deuxième campagne dans la Brague (retard sur le cycle de mue). Les effets toxiques observés montrent que le milieu récepteur Bouillide n'est pas indemne de perturbations avant réception de l'effluent de la station d'épuration, et que des sources de contamination sont présentes sur la Brague avant la confluence avec la Bouillide. Ce constat appuie l'intérêt d'utiliser des référentiels pour mesurer la qualité des milieux et ainsi ne pas devoir se limiter à la mise en place d'une comparaison avec le site amont, qui potentiellement, comme c'est le cas ici peut être déjà dégradé.

En se focalisant sur la rivière Bouillide, une mortalité importante a été régulièrement mesurée en aval du rejet (septembre 2015, avril 2016) ainsi qu'en aval éloigné en avril 2016 et souligne une toxicité aiguë du rejet sur la qualité du milieu récepteur, en particulier lors de la campagne 2. Pour les campagnes 1 et 3 qui présentent des taux de survie plus élevés, des effets marqués sont mesurés sur le comportement alimentaire (inhibition de l'alimentation supérieure à 60%). On peut souligner qu'aucun effet sur l'activité acétylcholinestérase n'a été observé indiquant qu'il n'y a pas de pression spécifique en lien avec des insecticides anti-cholinestérasiques (carbamates et organophosphorés). En conclusion, la batterie de réponses biologiques utilisée permet de caractériser et prioriser les sites et en particulier l'aval du rejet en fonction de la qualité globale du milieu récepteur : toxicité aiguë (mortalité), toxicités sub-aiguës globales (alimentation et reproduction) et spécifiques (AChE et perturbation endocrinienne).

L'observation des chroniques en continu de la conductivité et de l'oxygène entre l'amont et l'aval du rejet montre une différence d'oxygénation du milieu non négligeable, qui est engendrée par le rejet de la station d'épuration. En aval de la station d'épuration, les mesures en continue indiquent que les niveaux d'oxygène dissous dans le cours d'eau sont faibles entre le septième jour et la fin de l'exposition, devenant alors limitant pour les organismes encagés, et expliquant les fortes mortalités retrouvées en ce point. Au déficit d'oxygène, des effets négatifs engendrés par les fortes concentrations ponctuelles en nitrites mesurées en aval du rejet et/ou par la toxicité du milieu (inhibition alimentaire) peuvent s'ajouter et entraîner la mort des organismes encagés.

En aval de la confluence Brague/Bouillide, des effets sur la survie et sur la prise alimentaire ont été mesurés en première campagne seulement. Ces résultats montrent que l'utilisation de telles réponses biologiques permet de tracer une toxicité du milieu à l'aval de la STEU jusqu'à la confluence de la Bouillide avec la Brague.

En regardant les composés chimiques bioaccumulés dans toutes les stations étudiées, aucun contaminant n'a été relevé en concentration anormale.

En conclusion, en regard de la qualité de l'eau dans la zone en amont du rejet qui est déjà sous pression de contamination, la qualité de l'eau dans le milieu récepteur est d'autant plus dégradée en aval du rejet de l'effluent de la station d'épuration. Toutefois, et parmi les contaminants recherchés dans les organismes exposés, il n'est pas aujourd'hui possible de cibler les composés responsables des effets observés. De plus, il est à souligner que d'autres facteurs, comme l'oxygène ou les fortes concentrations en nitrite, apparaissent comme jouant un rôle non négligeable, notamment à la station aval proche et éloignée de la station. Selon l'arrêté du 27 juillet 2015, mentionnant les règles d'évaluation de l'état écologique des cours d'eau, les concentrations en nitrite mesurées classe la Bouillide à l'aval proche et éloigné de la station d'épuration dans un état « moyen » à « mauvais »,

### **Le 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, suggérant une absence potentielle de pollution chimique supplémentaire, sur le site aval de la Brague, de type micropolluants, induite par la STEU. Cependant, 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 chez les organismes prélevés à la confluence entre la Bouillide et la Brague.

## 4.2. CONCLUSION

Une des originalités de ce travail réside dans la mise en place d'une approche multi-biotests ou multi-outils autour d'un objet unique, la station d'épuration des Bouillides, qui a pour objectifs d'évaluer le rôle et les bienfaits des traitements complémentaires sur la qualité toxique de son effluent et son impact sur la qualité des milieux récepteurs, que sont dans un premier temps la Bouillide, puis la Brague. Les conclusions de ce travail constituent un cas d'étude sur la pertinence de cette approche multiple et offrent l'opportunité d'établir un diagnostic précis.

Concernant l'action des traitements complémentaires sur la qualité toxique de l'effluent, c'est l'approche *ex situ*, réalisée en conditions contrôlées d'oxygène, de lumière et de température qui est l'approche de choix. Notre étude montre clairement que les traitements complémentaires améliorent la qualité de l'effluent, en diminuant la toxicité liée à la présence de contaminants chimiques et donc leur apport dans les milieux aquatiques. Dans le cas de la Bouillide, nos travaux montrent cependant que l'effluent sortant constitue encore un apport de toxicité dans le milieu récepteur, comme démontré par les effets mesurés sur les taux d'alimentation et la fécondité. Cet apport de contaminants toxiques et de toxicité, également confirmé par les approches *in-situ* chez le gammare et l'utilisation du poisson, montre l'intérêt de ces approches pour évaluer l'impact d'un rejet sur le milieu. En effet l'absence de poissons et les effets observés sur la survie et les taux d'alimentation chez les gammares encagés à l'aval du rejet en regard de l'amont, confirment la perturbation induite par le rejet sur la qualité du milieu. Ces travaux montrent également ici, la difficulté pouvant être rencontrée avec le *biomonitoring* passif. L'absence de poissons sur le site aval proche, peut être attribuée bien sûr à l'impact du rejet, mais toutefois ne permet pas de qualifier les effets induits par la présence d'un apport en contaminants. Ceci est d'autant plus remarquable que dans le cas de la Bouillide, les travaux d'encagement chez le gammare, notamment lors des campagnes 1 et 3 pour le marqueur du taux d'alimentation, confirment la présence d'une perturbation chimique. Toutefois, les résultats observés à l'aval pour la campagne 2 et à l'aval éloigné pour la campagne 3 montrent des effets plus marqués que ceux observés sur l'effluent. Cette augmentation de l'impact est liée à une problématique d'oxygénation du rejet comme le montre nos suivis continus en campagne 3. Par conséquent, et concernant l'impact du rejet sur la qualité du milieu, nos résultats montrent clairement que l'effluent constitue un apport en contaminants chimiques et une toxicité associée, mais également des effets induits par sa faible charge en oxygène. Les concentrations fortes en nitrite mesurées ponctuellement dans le milieu naturel sont également suspectées. Par conséquent, et pour limiter l'impact du rejet sur le milieu, les questions de l'oxygène et du nitrite doivent également être prises en compte. A ce jour, et d'après l'arrêté du 24 août 2017 relatif aux systèmes d'assainissement collectif, ces deux paramètres font partie des molécules à suivre dans les modalités d'auto surveillance des stations de traitements d'eau usées. En revanche aucune préconisation de gestion y sont associées. Enfin, les travaux menés sur la Brague avec le poisson et le gammare encagé montrent que les dilutions successives par la Bouillide puis par la Brague conduisent à la disparition des effets toxiques liés au rejet de la station d'épuration de la Bouillide. Les travaux menés sur la Brague amont *via* l'encagement de gammares supportent une nouvelle fois l'intérêt du *biomonitoring* actif, permettant ici de mettre en évidence une dégradation chimique et toxique de l'eau de la Brague en amont de sa confluence avec la Bouillide, c'est-à-dire en amont de la source de toxicité induite par la station de traitement des eaux usées des Bouillides.

Concernant la partie sur la surveillance de la contamination chimique biodisponible, il est à noter la cohérence entre les résultats observés entre les tests *ex-situ* et *in-situ*, ainsi que la très faible contamination mesurée sur la trentaine de composés étudiés couramment dans les milieux aquatiques. Aujourd'hui, il est impossible de cibler les molécules pouvant être incriminées dans les effets toxiques observés. Ces travaux montrent qu'il est important d'élargir ou de revoir les molécules suivies, en y intégrant les composés pharmaceutiques et les biocides largement utilisés dans les activités urbaines et industrielles, notamment en intégrant les molécules présentes dans la réglementation RSDE (Recherche et réduction des rejets de substances dangereuses dans l'eau).

## RÉFÉRENCES

- Alonso A., Camargo J.A., Toxicity of nitrite to three species of freshwater invertebrates. 2006, *Environmental Toxicology* 21:90-94.
- Alonso A., Camargo J.A., Effects of pulse duration and post-exposure period on the nitrite toxicity to a freshwater amphipod. 2009, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:2005-2008.
- Alonso A., Camargo J.A., Ameliorating effect of chloride on nitrite toxicity to freshwater invertebrates with different physiology : a comparative study between amphipods and planarians. 2008, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54: 259-265
- Babo, S., and P. Vasseur. 1992. In vitro effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 22:61-68.
- Bado-Nilles, A., S. Betoulle, A. Geffard, J.-M. Porcher, B. Gagnaire, and W. Sanchez. 2013. Flow cytometry detection of lysosomal presence and lysosomal membrane integrity in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) immune cells: applications in environmental aquatic immunotoxicology. *Environmental Science and Pollution Research* 20:2692-2704.
- Bado-Nilles, A., S. Jolly, J.-M. Porcher, O. Palluel, A. Geffard, B. Gagnaire, S. Betoulle, and W. Sanchez. 2014. Applications in environmental risk assessment of leucocyte apoptosis, necrosis and respiratory burst analysis on European bullhead, *Cottus* sp. *Environmental Pollution* 184:9-17.
- Bado-Nilles, A., C. Quentel, D. Mazurais, J. L. Zambonino-Infante, M. Auffret, H. Thomas-Guyon, and S. Le Floch. 2011. In vivo effects of the soluble fraction of light cycle oil on immune functions in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linné). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74:1896-1906.
- Bateman, K. S., G. D. Stentiford, and S. W. Feist. 2004. A ranking system for the evaluation of intersex condition in european flounder (*Platichthys flesus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23: 2831–2836. doi:10.1897/03-541.1 23: 2831–2836:2831-2836.
- Besse JP., 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: 650-660
- Coulaud R., Geffard O., Xuereb B., Lacaze E., Quéau H., Garric J., Charles S., 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.
- Cheng, Y. S., Y. Zheng, and J. S. VanderGheynst. 2011. Rapid Quantitative Analysis of Lipids Using a Colorimetric Method in a Microplate Format. *Lipids* 46:95-103.
- Chilmonczyk, S., and D. Monge. 1999. Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish & Shellfish Immunology* 9:319-333.
- 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 : évaluations technique, énergétique, environnementale. Rapport final du projet MICROPOLIS-PROCEDES. 167 p.
- Dedourge-Geffard O., Palais F., Biagiatti-Risbourg S., Geffard O., Geffard A. 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum* : an *in-situ* experiment. *Chemosphere* 11: 1569-1576.
- Flammarion, P., B. Migeon, and J. Garric. 1998. Statistical analysis of cyprinid ethoxyresorufin-O-deethylase data in a large French watershed. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40:144-153.



- Geffard O., Besse JP., Chaumot A., François A., Gahou J., Grisot G., Lopes C., Récoura-Massaquant R., Coquery M. 2014. Rapport de synthèse de l'étude pilote : déploiement de l'outil gammare engagé au niveau national, résultats pour les métaux ciblés. Rapport final. IRSTEA. 31p.
- Habig, W. H., M. J. Pabst, and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249:7130-7139.
- Hinfray, N., O. Palluel, B. Piccini, W. Sanchez, S. Aït-Aïssa, P. Noury, E. Gomez, P. Geraudie, C. Minier, F. Brion, and J.-M. Porcher. 2010. Endocrine disruption in wild populations of chub (*Leuciscus cephalus*) in contaminated French streams. *Science of The Total Environment* 408:2146-2154.
- Kelso BHL., Glass DM., Smith RV., 1999. Toxicity of nitrite in freshwater invertebrates. In : Wilson WS, Ball AS, Hinton RH, editors. *Managing risks of nitrates to humans and the environment*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. p175-188
- Lu, Y. H., S. A. Ludsin, D. L. Fanslow, and S. A. Pothoven. 2008. Comparison of three microquantity techniques for measuring total lipids in fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 65:2233-2241.
- Miller, V. P., D. M. Stresser, A. P. Blanchard, S. Turner, and C. L. Crespi. 2000. Fluorometric High-Throughput Screening for Inhibitors of Cytochrome P450. *Annals of the New York Academy of Sciences* 919:26-32.
- Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95:351-358.
- Paglia, D. E., and W. N. Valentine. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 70:158-169.
- Paoletti, F., D. Aldinucci, A. Mocali, and A. Caparrini. 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry* 154:536-541.
- Récoura-Massaquant R., Geffard O., Besse JP., Chaumot A., François A., Lopes C., Miège C., Roussel-Galle A., Serveto F., Coquery M. 2014. Rapport de synthèse de l'étude pilote : déploiement de l'outil gammare engagé au niveau national, résultats pour les substances organiques ciblées. Rapport final. IRSTEA. 40p.
- Sturm, A., H. C. d. S. d. Assis, and P.-D. Hansen. 1999. Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research* 47:389-398.
- Vandeputte, C., I. Guizon, I. Genestie-Denis, B. Vannier, and G. Lorenzon. 1994. A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biology and Toxicology* 10:415-421.
- Xiang F., Geng L., Lu K., Zhang J., Minter EWA., Yang Z., Effect of long term nitrite exposure on the cladoceran *Daphnia obtusa* : Survival, moults and reproduction. *Biochemical Systematics and Ecology* 41:98-103
- Xuereb B, Noury P, Felten V, Garric J, Geffard O. 2007. Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos. *Toxicology*, 236: 178-189.
- Xuereb B, Chaumot A, Mons R, Garric J, Geffard O. 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquatic Toxicology*, 93: 225-233.

Arrêté du 21 juillet 2015 relatif aux systèmes d'assainissement collectif et aux installations d'assainissement non collectif, à l'exception des installations d'assainissements non collectif recevant une charge brute de pollution inférieure ou égale à 1,2 kg/j de DBO5, modifiée par l'arrêté du 24 août 2017 et consolidée par la version du 29 janvier 2018, Article 17 et Annexe 2.

Arrêté du 27 juillet 2015 modifiant l'arrêté du 25 janvier 2010 modifié relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface pris en application des articles R.212-10, R.212-11 et R.212-18 du code de l'environnement.

## **ANNEXES**

**ANNEXE 1 Rapport d'étude : Réalisation de pêches électriques dans la Brague et la Bouillide, Indice Poisson Rivière, CONSEILS SCIENTIFIQUES DES ILES DE LERINS, 2015**



## Conseil Scientifique des Iles de Lérins

Association Loi de 1901,  
Agréée « Protection de l'Environnement » et « Recherches et Développement »  
11, avenue du Commandant Bret – 06400 Cannes  
☎ : 04.92.99.22.40 / 06.21.23.90.12 - [csil@free.fr](mailto:csil@free.fr) – [www.csil.fr.st](http://www.csil.fr.st)

### **REALISATION DE PECHES ELECTRIQUES DANS LA BRAGUE ET LA BOUILLIDE**

**BRAGUE : AVAL CONFLUENCE BRAGUE-  
BOUILLIDE  
BOUILLIDE : AMONT / AVAL STEP DES  
BOUILLIDES**

---

**Indice Poisson Rivière  
(IPR)**

---

**Rapport d'étude**

**Campagne septembre 2015**

# SOMMAIRE

<b>OBJET DE L'ETUDE</b> .....	<b>4</b>
<b>1. LES STATIONS D'ETUDE</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 STATION AMONT STEP DES BOUILLIDES</b> .....	<b>5</b>
<b>1.2 STATION AVAL STEP DES BOUILLIDES</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3 STATION BRAGUE CONFLUENCE</b> .....	<b>7</b>
<b>2. METHODOLOGIE</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1 TECHNIQUE DE PECHE ELECTRIQUE</b> .....	<b>7</b>
<b>2.2 INDICE POISSON RIVIERE (IPR)</b> .....	<b>8</b>
<b>3. RESULTATS</b> .....	<b>9</b>
<b>3.1 CARACTERISTIQUES GENERALES DES INVENTAIRES PISCICOLES</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2 ANALYSE DU PEUPLEMENT PISCICOLE</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2.1 Richesse spécifique</b> .....	<b>10</b>
<b>3.2.2 Densités et classes de taille</b> .....	<b>13</b>
3.2.2.1 Densité numériques et pondérales .....	13
3.2.2.2 Analyse des classes de taille .....	13
<b>3.3 INDICE IPR</b> .....	<b>16</b>
<b>3.3.1 Traits biologiques des espèces capturées et métriques utilisées dans l'IPR</b> .....	<b>16</b>
<b>3.3.2 Comparaison de la composition réelle et théorique du peuplement</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3.3 Comparaison des valeurs réelles et théoriques des métriques de l'IPR</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3.4 Scores des métriques et calcul de l'IPR</b> .....	<b>19</b>
<b>4. CONCLUSION</b> .....	<b>20</b>
<b>5. ANNEXES</b> .....	<b>21</b>

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Classes de qualité de l'indice IPR .....	8
Tableau 2 : Caractéristiques générales des trois stations de pêche .....	9
Tableau 3 : Caractéristiques physiques générales des trois stations de pêche .....	9
Tableau 4 : Paramètres physico-chimiques in-situ des trois stations de pêche .....	10
Tableau 5 : Composition des peuplements échantillonnés dans les trois stations de pêche .....	11
Tableau 6 : Variables utilisées dans le calcul de l'IPR des 7 espèces capturées dans la Bouillide et la Brague .....	17
Tableau 7 : Probabilités théoriques de présence de 13 espèces de l'IPR .....	17
Tableau 8 : Comparaison des valeurs réelles et théoriques des 3 métriques d'occurrence de l'IPR .....	18
Tableau 9 : Comparaison des valeurs théoriques des métriques d'abondance de l'IPR (nb ind. /m <sup>2</sup> ) .....	19
Tableau 10 : Valeurs des 7 métriques et notes IPR associées .....	19

## Liste des photos

Photo 1 : Secteur aval de la station de pêche « Bouillide amont STEP » .....	6
Photo 2 : Secteur amont de la station de pêche « Bouillide amont STEP » .....	6
Photo 3 : Secteur amont de la station de pêche « Bouillide aval STEP » .....	6
Photo 4 : Secteur aval de la station de pêche « Bouillide aval STEP » .....	6
Photo 5 : Secteur aval de la station de pêche « Brague confluence » .....	7
Photo 6 : Secteur amont de la station de pêche « Brague confluence » .....	7
Photo 7 : Anguilles .....	11
Photo 8 : Barbeau méridional adulte .....	11
Photo 9 : Chevaines adultes .....	12
Photo 10 : Vairons .....	12
Photo 11 : Tanche .....	12
Photo 12 : Gardon .....	12
Photo 13 : Perche soleil .....	12

## Liste des cartes

Carte 1 : Localisation des stations d'étude .....	4
Carte 2 : Localisation des stations d'étude et du rejet de la STEP des Bouillides .....	5

## Liste des graphiques

Graphique 1 : Densité numérique (nombre d'individu/1000m <sup>2</sup> ) .....	13
Graphique 2 : Densité pondérale (kg/ha) .....	13
Graphique 3 : Répartition des classes de taille de l'anguille .....	14
Graphique 4 : Répartition des classes de taille du barbeau méridional .....	15
Graphique 5 : Répartition des classes de taille du chevaine .....	16

## OBJET DE L'ÉTUDE

Le Conseil Scientifique des Iles de Lérins a été mandaté par la Lyonnaise des eaux et le Syndicat de la station des Bouillides pour l'étude piscicole de la Brague et de son affluent la Bouillide.

La station d'épuration des Bouillides rejette ses eaux traitées dans la Bouillide au niveau du parc d'activité de Valbonne-Sophia Antipolis, dans la commune de Biot (Alpes-Maritimes).

Afin d'évaluer l'impact de ce rejet sur les peuplements piscicoles de la Bouillide et de la Brague, le CSIL a réalisé des « Indices Poissons Rivière » (IPR) dans les cours d'eau.

Les pêches électriques ont été réalisées par le CSIL en équipe avec le bureau d'études AQUASCOP le 23 septembre 2015.

Ce rapport présente les résultats des investigations des 3 stations inventoriées.

### 1. LES STATIONS D'ÉTUDE

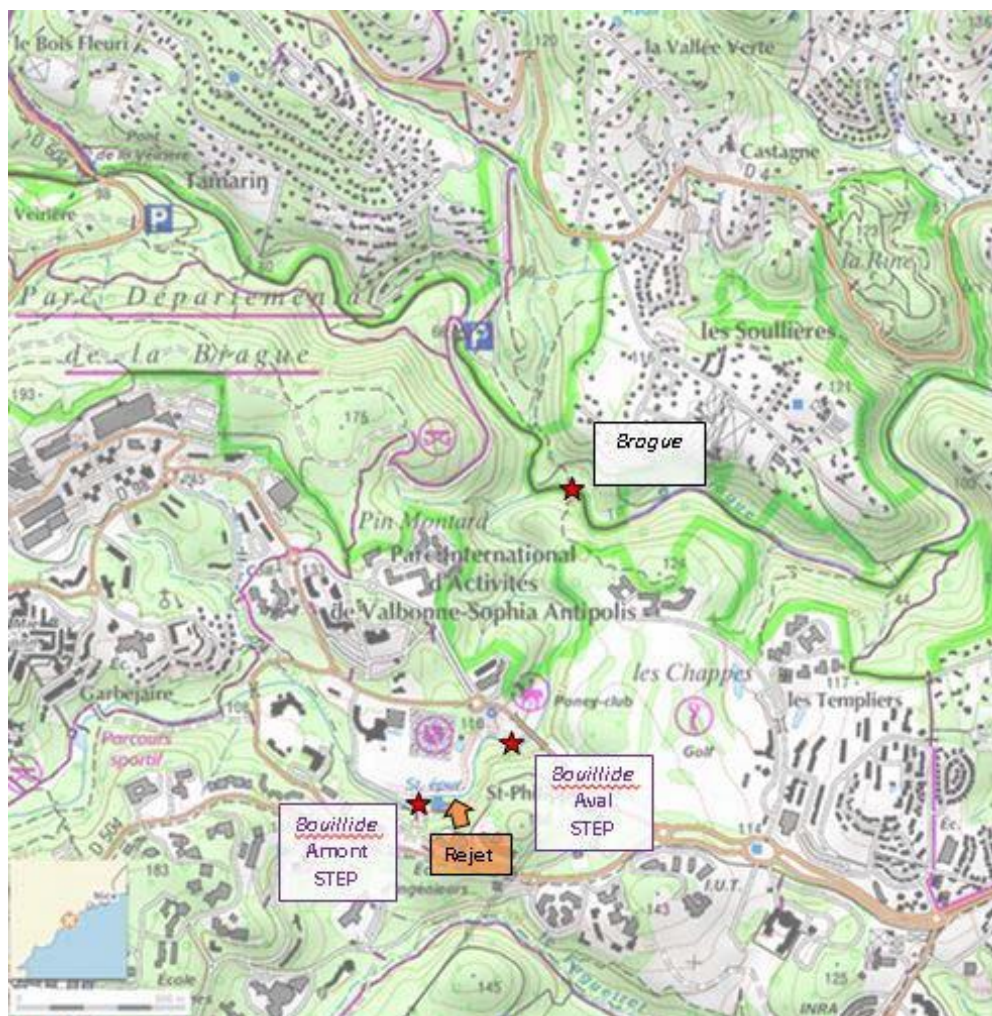
Les inventaires piscicoles ont été réalisés dans 3 stations :

- la Bouillide, 100 mètres en amont du rejet de la station d'épuration ;
- la Bouillide, 300 mètres en aval du rejet ;
- la Brague, 50 mètres en aval de sa confluence avec la Bouillide.

Le secteur d'étude de la Bouillide et de la Brague se situe dans le Parc départemental de la Brague, dans une zone urbanisée, au niveau du Parc International d'activité de Valbonne-Sophia Antipolis, à proximité du golf de Biot. Les cartes 1 et 2 suivantes présentent la localisation des 3 stations d'étude.



*Carte 1 : Localisation des stations d'étude*



Carte 2 : Localisation des stations d'étude et du rejet de la STEP des Bouillides

### 1.1 Station amont STEP des Bouillides

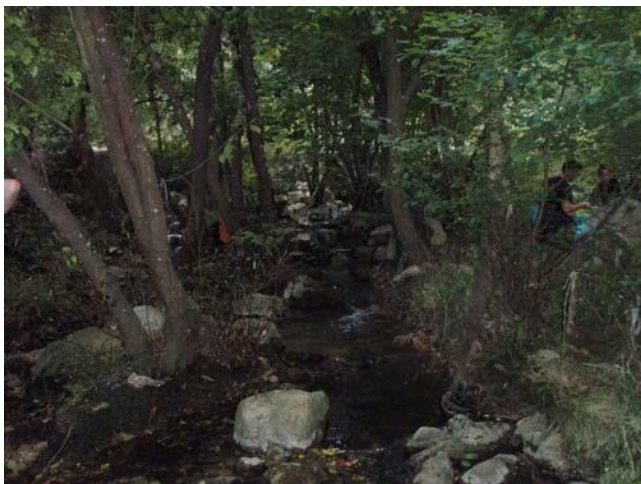
Cette station se situe à environ 100 mètres en amont du rejet de la station d'épuration de Bouillides. Le lit en eau mesure entre 3 et 4 mètres de large et présente une bonne sinuosité naturelle. La pente est moyenne et l'écoulement est caractérisé par une alternance de plats lents assez longs entrecoupés de courts radiers. Le substrat du lit est majoritairement composé de dalles naturelles affleurantes, de blocs et de graviers légèrement colmatés. Les berges assez pentues, constituées de rochers et de terre sont connectées au lit en eau.

La ripisylve du cours d'eau est assez large et continue. La strate arborée est particulièrement dense, offrant un ombrage important, et de nombreux habitats racinaires en pied de berges.

Les habitats piscicoles, essentiellement situés en berge sont plutôt riches et diversifiés. Les zones de graviers et de racines immergées offrent des surfaces de reproduction pour la plupart des espèces piscicoles.

Les photos 1 et 2 illustrent la station amont STEP des Bouillides.





*Photo 1 : Secteur aval de la station de pêche « Bouillide amont STEP »*



*Photo 2 : Secteur amont de la station de pêche « Bouillide amont STEP »*

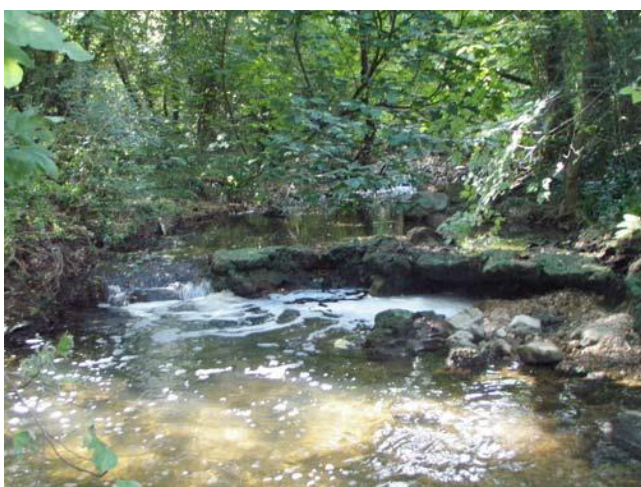
## 1.2 Station aval STEP des Bouillides

En aval du rejet de la station d'épuration, la Bouillide se situe comme à la station amont, dans une zone urbanisée bordée par une ripisylve continue très dense, offrant un ombrage important. L'environnement est plus encaissé qu'en amont, mais la pente reste moyenne et l'écoulement est dominé par des faciès lenticules entrecoupés de quelques petits radiers. On note la présence d'un petit seuil au milieu de la station.

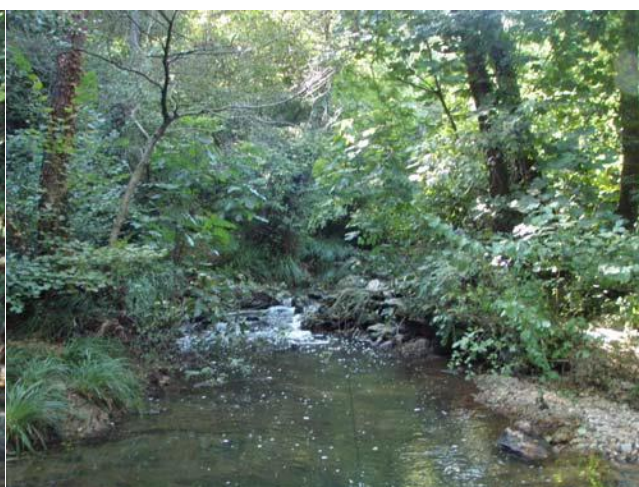
Le substrat est majoritairement composé par des pierres partiellement colmatés. Les berges sont connectives et offrent de nombreux habitats piscicoles (racines immergées, abris sous berges,...).

Pour information des développements bactériens ont été observés dans ce secteur de cours d'eau.

Les photos 3 et 4 illustrent la station aval STEP des Bouillides.



*Photo 3 : Secteur amont de la station de pêche « Bouillide aval STEP »*



*Photo 4 : Secteur aval de la station de pêche « Bouillide aval STEP »*

### 1.3 Station Brague confluence

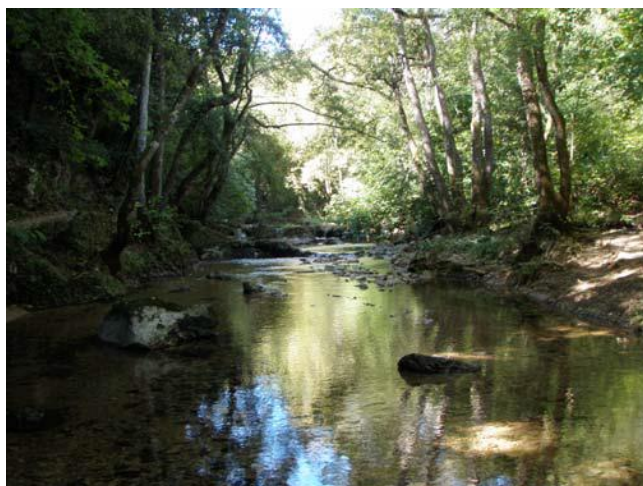
La station de la Brague se situe dans le Parc départementale de la Brague, environ 50 mètres en aval de la confluence avec la Bouillide, soit 1,5 kilomètres en aval du rejet de la station d'épuration des Bouillides.

Le lit en eau de la Brague compris entre 6 et 9 mètres de large, sinue naturellement dans un environnement forestier préservé malgré la proximité de la zone urbaine. Les faciès d'écoulement sont variés et alternent entre mouilles, plats lents et radiers.

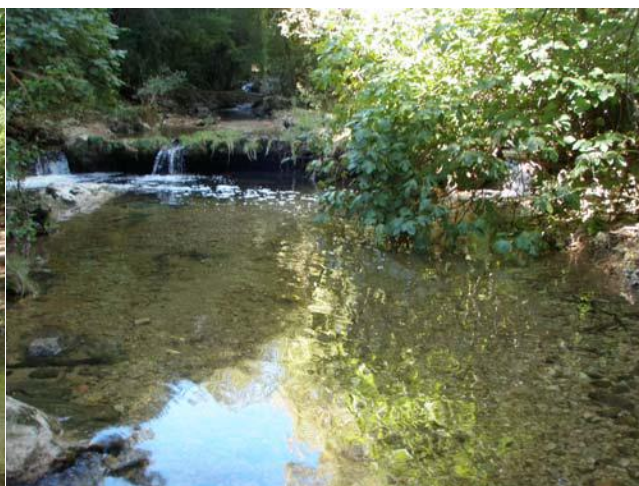
Le substrat du lit est composé majoritairement de pierres accompagnées de blocs et de cailloux peu colmatés. Les berges en pente douce sont fréquemment connectées avec le lit en eau et offrent des habitats piscicoles intéressants (racines immergés et abris sous berges).

On note la présence d'écumes et une odeur de lessive au niveau de la mouille amont.

Les photos 5 et 6 illustrent la station Brague en aval immédiat de sa confluence avec la Bouillide.



*Photo 5 : Secteur aval de la station de pêche « Brague confluence »*



*Photo 6 : Secteur amont de la station de pêche « Brague confluence »*

## 2. METHODOLOGIE

### 2.1 Technique de pêche électrique

La technique de pêche électrique repose sur l'illustration d'un courant continu (redressé) fourni par un groupe électrogène fixe ou portatif (puissance nécessaire de 1 à 12 Kwa) de 150 à 800 volts et de 0,5 à 2 ampères suivant la minéralisation (conductivité) de l'eau. La cathode est immergée près du groupe ; l'anode, mobile, est reliée au groupe par une bobine de fil de longueur adaptée et est déplacée par l'opérateur. Lorsque l'opérateur trempe l'anode dans l'eau, il s'établit une différence de potentiel entre les deux électrodes, et les poissons situés dans un rayon de 0,5 à 2 m autour de l'anode (suivant le courant utilisé et la conductivité de l'eau) sont attirés par le courant électrique (galvanonarcose), ce qui se traduit par :

- une stimulation des fibres nerveuses et des muscles
- une nage forcée vers l'anode et donc vers l'opérateur.

Les poissons peuvent ainsi être capturés, pesés et mesurés avant d'être remis à l'eau vivants.

D'après la norme XP T90-383 relative aux échantillonnages des poissons dans le cadre des réseaux de suivi, la station pêche doit mesurer environ 20 fois sa largeur en eau, avec un minimum de 50 mètres et comporter une succession de deux séquences d'alternance de faciès d'écoulement, représentatifs du linéaire étudié.

La station de pêche est délimitée par deux filets barrages, placés aux limites amont et aval, avant d'être échantillonnée de l'aval vers l'amont. Après un premier passage, l'inventaire piscicole n'est pas exhaustif, mais l'efficacité de l'effort de pêche est généralement supérieure à 80 % et permet d'obtenir une bonne appréciation de la richesse spécifique et des abondances relatives des espèces capturées. L'indice Poisson Rivière (IPR) a été construit en tenant compte de ces spécificités et utilise les données de captures d'un seul passage.

## 2.2 Indice Poisson Rivière (IPR)

L'évaluation de l'indice IPR (norme NF T 90-344) est basée sur la mesure de l'écart entre la composition du peuplement d'une station donnée et la composition du peuplement attendue en situation de référence. Cet écart mesuré permet de calculer un indice dont la valeur varie entre 0 (conforme à la référence) et l'infini (au-delà de 36, la classe de qualité est considérée comme très mauvaise).

Cet indice prend en compte certaines caractéristiques d'habitat, de sensibilité, de trophie des 34 espèces de poissons les plus fréquemment rencontrées. A partir des données des effectifs capturés lors d'un passage de pêche électrique, 7 métriques sont calculées, dont 3 d'occurrence (nombre d'espèces) et 4 d'abondance (densité des espèces).

La situation de référence est évaluée à partir de 10 paramètres caractéristiques du milieu (distance à la source, profondeur, température, ...) intervenant dans la mise en place du peuplement piscicole. La somme des 7 métriques correspond à la note IPR mesurant l'écart à la situation de référence.

Cinq classes de qualité sont définies selon la note IPR et présentées dans le tableau 1.

*Tableau 1 : Classes de qualité de l'indice IPR*

Note IPR	Qualité IPR (NF T 90-344)	Etat écologique (arrêté du 25/01/2010)
IPR < 7	<b>Excellente</b>	<b>Très bonne</b>
7 ≤ IPR ≤ 16	<b>Bonne</b>	<b>Bonne</b>
16 < IPR ≤ 25	<b>Médiocre</b>	<b>Moyenne</b>
25 < IPR ≤ 36	<b>Mauvaise</b>	<b>Médiocre</b>
IPR > 36	<b>Très Mauvaise</b>	<b>Mauvaise</b>

Comme tous les indices biologiques, l'IPR présente des limites de mise en application et de robustesse liées aux caractéristiques propres des cours d'eau sélectionnés et étudiés pour la conception de cet indice. Ainsi, les cours d'eau méditerranéens, présentant une très courte distance entre la source et la mer et des conditions hydrologiques et thermiques particulières, ont un fonctionnement assez différent de la plupart des cours d'eau utilisés pour la conception de l'indice, ce qui réduit sa robustesse.

Par ailleurs, les résultats sont moins robustes quand l'échantillon comporte peu d'individus. Les résultats de l'IPR doivent aussi être interprétés avec précaution lorsque la part significative des espèces capturées n'intervient pas dans le calcul de l'indice.

Dans sa version actuelle, l'IPR ne prend pas en compte la biomasse, ni la taille des individus capturés, alors que certaines altérations agissent prioritairement sur l'état d'une population avant d'affecter la composition spécifique du peuplement.

Il convient donc d'interpréter avec prudence les résultats de l'indice et de compléter le diagnostic par une analyse approfondie de la structure des peuplements et la qualité de l'habitat disponible.

### 3. RESULTATS

#### 3.1 Caractéristiques générales des inventaires piscicoles

Les paramètres descripteurs sont présentés dans les tableaux 2, 3 et 4, ci-dessous.

Tableau 2 : Caractéristiques générales des trois stations de pêche

	Bouillide amont STEP	Bouillide aval STEP	Brague confluence
Date	23/09/2015	23/09/2015	23/09/2015
Matériel	groupe fixe : 1 anode + 2 épousettes		groupe fixe : 2 anodes + 2 épousettes
Durée du passage	50 min	45 min	60 min
Longueur de station	122 m	75 m	107 m

Tableau 3 : Caractéristiques physiques générales des trois stations de pêche

	Unité	Bouillide amont STEP	Bouillide aval STEP	Brague confluence
Surface échantillonnée (SURF)	m <sup>2</sup>	417	319,7	729,8
Surface du bassin versant drainé (SBV)	km <sup>2</sup>	10,6	11,2	38,3
Distance à la source	km	5	5,4	13,6
Largeur moyenne en eau (LAR)	m	3,7	4,3	6,9
Pente du cours d'eau (PEN)	‰	16,9	16,9	9,6
Profondeur moyenne (PROF)	m	0,31	0,26	0,27
Altitude (ALT)	m	97	90	50
Température moyenne de juillet (T JUILLET)	°C	24,5	24,5	24,5
Température moyenne de janvier (T JANVIER)	°C	9,8	9,8	9,8

Tableau 4 : Paramètres physico-chimiques in-situ des trois stations de pêche

	Bouillide amont STEP	Bouillide aval STEP	Brague confluence
Date / Heure	23/09/2015 à 19 h30	23/09/2015 à 16h00	23/09/2015 à 11h30
pH	7,5	8,1	8,4
Température (°C)	16,3	25	16,6
Conductivité (µs/cm)	828	1038	975
Oxygène dissous (mg/l)	7,8	6,8	8,8
Saturation en oxygène (%)	76	81	93

La Bouillide et la Brague sont des cours d'eau caractéristiques du pourtour méditerranéen, marqués par des linéaires assez court entre la source et la mer, une pente moyenne à élevée, une forte minéralisation et un régime thermique plutôt chaud.

Les secteurs étudiés sont situés à une faible distance de la source des cours d'eau avec une altitude moyenne. La largeur moyenne du lit en eau est faible (< 5 m pour la Bouillide et < 7 m pour la Brague), mais la profondeur moyenne est relativement importante, de l'ordre de 30 cm. La pente est relativement élevée pour la Bouillide et moyenne pour la Brague. Le régime thermique est homogène pour les trois stations avec une température hivernale assez élevée (proche de 10 °C) et une température estivale élevée (proche de 25 °C).

Les eaux des milieux étudiés se caractérisent par :

- une température fraîche dans la Bouillide en amont du rejet et dans la Brague, alors qu'elle est chaude dans la Bouillide en aval du rejet de la station d'épuration ;
- une forte minéralisation ;
- un pH neutre à basique ;
- une sous-oxygénation de l'eau constatée dans l'ensemble des stations.

### 3.2 Analyse du peuplement piscicole

#### 3.2.1 Richesse spécifique

Sur l'ensemble des 3 stations inventoriées, les pêches électriques ont permis de capturer un total de 7 espèces différentes :

- une espèce migratrice amphihaline : l'anguille,
- cinq cyprinidés : le barbeau méridional, le chevine, le gardon, la tanche et le vairon,
- une espèce classée nuisible à l'article R432-5 du Code de l'Environnement : la perche soleil

A noter, que l'anguille et le barbeau méridional sont deux espèces patrimoniales protégées.

Le tableau 5, en page suivante, récapitule la composition des peuplements échantillonnés sur les trois stations de pêches.

Tableau 5 : Composition des peuplements échantillonnés dans les trois stations de pêche

Espèce piscicole	Bouillide amont STEP	Bouillide aval STEP	Brague confluence	Nombre total d'occurrence de l'espèce
Anguille	X	X	X	3
Chevaine	X	X	X	3
Barbeau méridional	X		X	2
Tanche	X		X	2
Gardon	X			1
Perche soleil	X			1
Vairon			X	1
<b>Nombre total d'espèces</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	

Seulement deux espèces, l'anguille et le chevaine, ont été capturés dans les trois stations. Avec le barbeau méridional et le vairon, ces quatre espèces constituent un cortège spécifique plutôt cohérent avec les caractéristiques des cours d'eau méditerranéens.

En revanche, la présence de la tanche dans deux stations, du gardon et de la perche soleil dans la Bouillide amont est plus inattendue. En effet, ces espèces se rencontrent plutôt dans les milieux lenticules, type plan d'eau ou cours d'eau de plaine. La présence d'étangs en amont des stations de la Bouillide et la fréquence de seuils le long des cours d'eau favorisant la formation de faciès lenticules pourraient expliquer la présence de ces espèces.

Enfin, on observe une **diminution significative de la richesse spécifique en aval du rejet de la station d'épuration**, avec notamment la disparition du barbeau méridional, pourtant espèce dominante dans la station amont.

Les photos suivantes illustrent les espèces de poissons inventoriées sur les stations Brague et Bouillides.



Photo 7 : Anguilles



Photo 8 : Barbeau méridional adulte



Photo 9 : Chevaines adultes



Photo 10 : Vairons



Photo 11 : Tanche



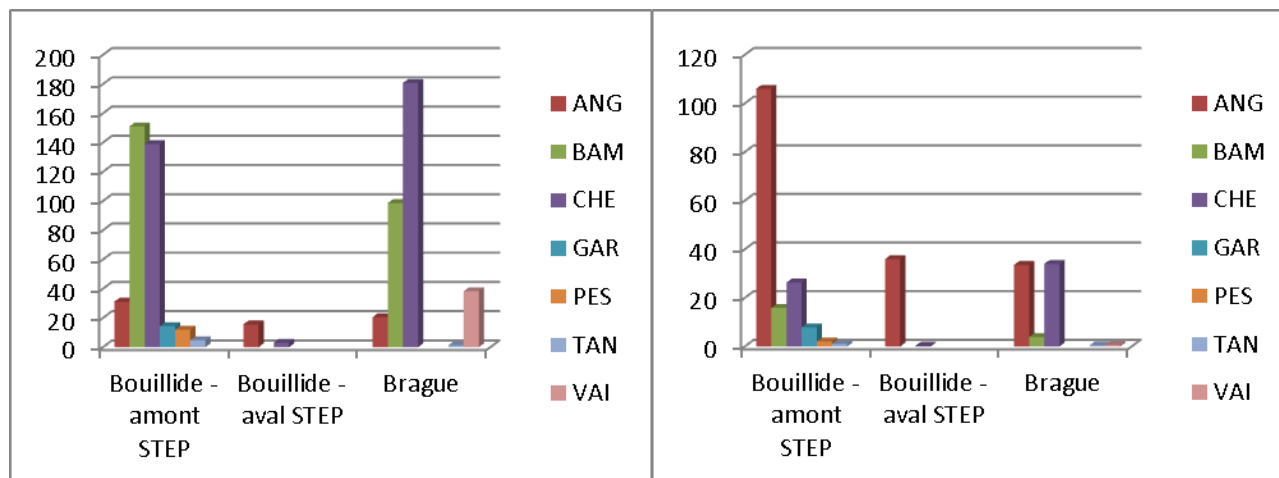
Photo 12 : Gardon



Photo 13 : Perche soleil

### 3.2.2 Densités et classes de taille

#### 3.2.2.1 Densité numériques et pondérales



*Graphique 1 : Densité numérique (nombre d'individu/1000m<sup>2</sup>)*

*Graphique 2 : Densité pondérale (kg/ha)*

ANG : anguille, BAM : barbeau méridional, CHE : chevaine, GAR : gardon, PES : perche soleil, TAN : tanche, VAI : vairon

Le peuplement piscicole de la Bouillide en amont du rejet de la station d'épuration est composé de 6 espèces. Le chevaine et le barbeau méridional dominent le peuplement en effectif alors que l'anguille domine en biomasse. Les présences du gardon, de la perche soleil et de la tanche sont marginales.

En aval du rejet, la diversité se réduit considérablement puisque seulement deux espèces sont retrouvées (anguille et chevaine) avec des densités très faibles. La disparition du barbeau méridional est d'autant plus significative qu'il s'agit de l'espèce dominante en effectif dans la station amont.

Dans la Brague, le peuplement est composé de cinq espèces, dominé encore en effectif par le chevaine et le barbeau méridional, et en biomasse par l'anguille et le chevaine.

#### 3.2.2.2 Analyse des classes de taille

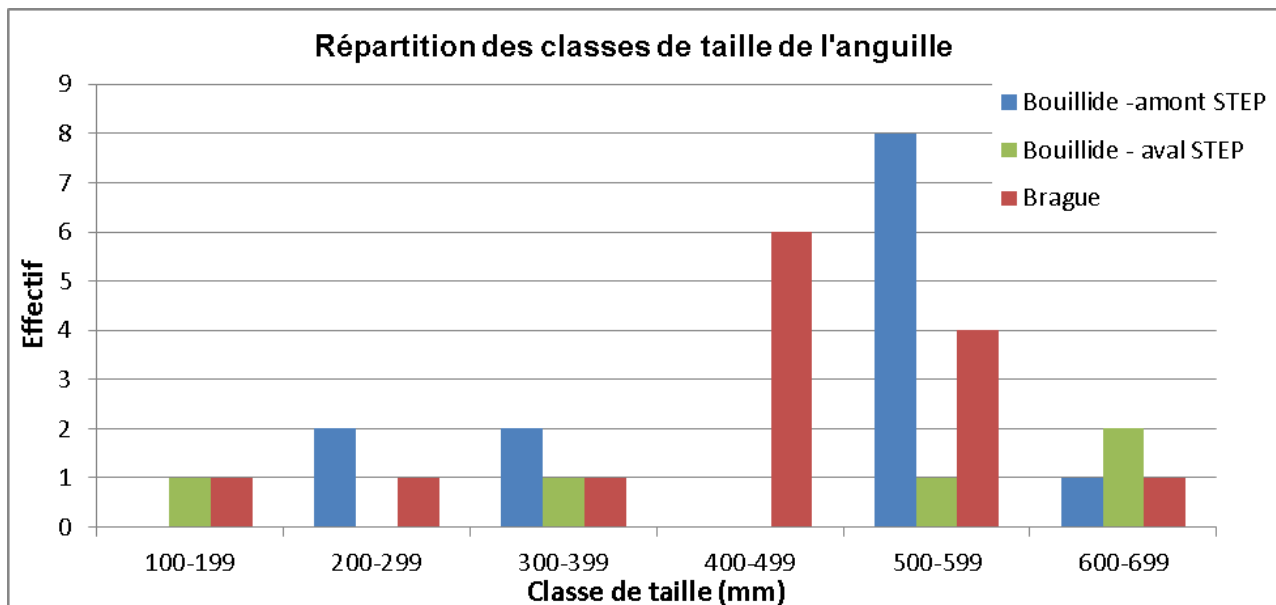
L'analyse de la répartition des classes de taille d'une même espèce permet de mettre en évidence les différentes cohortes (individus de même âge). Cette approche apporte des informations intéressantes sur l'efficacité de la reproduction et les capacités d'accueil et de croissance des différents stades de développement permettant ainsi un diagnostic de l'état de santé d'une population.

L'analyse suivante porte sur les trois espèces qui dominent le peuplement, anguille, barbeau méridional et chevaine.



- **Anguille**

Le graphique 3 représente la répartition des classes de taille de l'anguille (effectif en fonction des classes de tailles) inventoriés sur les trois stations.



*Graphique 3 : Répartition des classes de taille de l'anguille*

Les anguilles capturées sont de tailles variables allant de 155 à 650 mm.

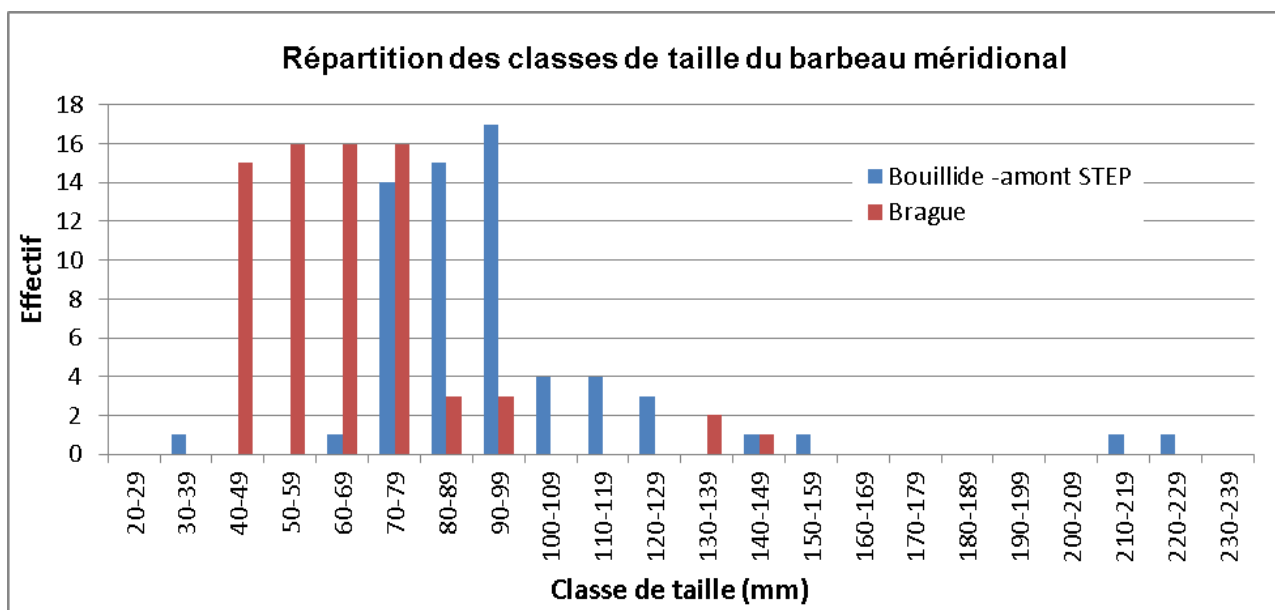
La faible densité des petites anguilles (inférieures à 300 mm), malgré la présence de la mer à 8 km en aval, témoigne de la difficulté de ce poisson à coloniser le milieu depuis la mer. Il est possible que de nombreux obstacles difficilement franchissables en montaison freinent la migration de cette espèce amphihaline.

En revanche, on constate que les populations d'anguilles des trois stations sont dominées par des individus de plus de 400 mm, correspondant à des individus âgés, probablement des mâles pour les plus petits et des femelles pour les plus gros individus. Ces individus devraient engager prochainement une dévalaison vers les zones de reproduction en mer des Sargasses, mais il est possible qu'une partie d'entre eux soient sédentarisés.

Cette concentration de gros individus indique soit la présence d'obstacles infranchissables en amont proche, soit des conditions environnementales favorables au grossissement (ressources trophiques et caches abondantes).

- **Cyprinidés : Barbeau méridional et Chevaine**

Le graphique 4 représente l'histogramme de répartition des classes de taille du barbeau méridional (effectif en fonction des classes de tailles) inventoriés sur les trois stations.



Graphique 4 : Répartition des classes de taille du barbeau méridional

L'analyse des classes de taille de la population de barbeau méridional de la Bouillide en amont du rejet, fait apparaître quatre cohortes :

- [60-100 mm] : cohorte 0+, issus de la reproduction de l'année en cours est bien distincte, avec de nombreux individus,
- [100-130 mm] : cohorte 1+, moins marquée et probablement à cheval avec la cohorte 0+,
- [140-160 mm] : cohorte 2+, avec seulement 2 individus
- [210-230 mm] : seulement 2 individus âgés, probablement issus de la cohorte 4+ ou plus.

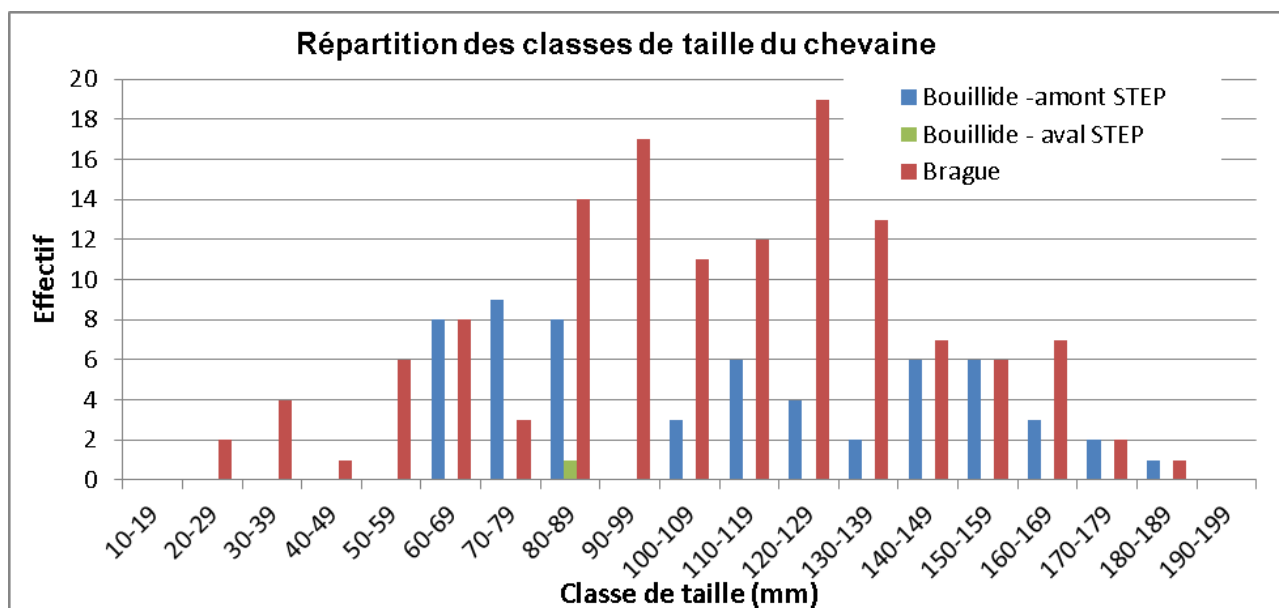
Ces résultats indiquent un bon succès de reproduction lors des années 2014 et 2015. En revanche, l'importante réduction des effectifs des cohortes des années précédentes et l'absence d'individus de la cohorte 3+ pourrait indiquer une forte mortalité ou un déplacement des populations entre 2011 et 2013.

Dans la Brague, l'analyse des classes de taille met en évidence seulement deux cohortes correspondant à l'année en cours et la cohorte 1+ ou 2+. Comme dans la Bouillide amont, l'absence d'individus plus âgés témoigne d'une altération du peuplement entre 2011 et 2013.

Comme vu précédemment, les cohortes 0+ sont bien marquées dans les deux stations Brague et Bouillide amont STEP. On observe que la taille moyenne de ces cohortes est plus élevée dans la Bouillide ([60-100 mm]) que dans la Brague ([40-100 mm]). Cette différence témoigne, soit d'une reproduction plus précoce dans la Bouillide, soit d'une vitesse de croissance plus rapide dans la Bouillide.

Cependant, l'influence du rejet sur la température de l'eau ou l'enrichissement trophique du milieu qui aurait pu être à l'origine de ces écarts ne peut être précisé puisqu'aucun barbeau méridional n'a été capturé en aval du rejet.

Les histogrammes du graphique 5 suivant, illustrent la structure des classes de taille des populations de chevine dans les trois stations.



Graphique 5 : Répartition des classes de taille du chevine

Le peuplement de la station Bouillide amont STEP présente au moins 3 cohortes ([60-90 mm], [100-140 mm] et [140-190 mm]). Les effectifs des juvéniles issus de la reproduction du printemps sont relativement faibles mais restent toutefois supérieurs à ceux des cohortes suivantes. Ces résultats semblent indiquer une reproduction effective chaque année et une faible mortalité.

Un seul individu de chevine a été pêché dans la station Bouillide aval STEP. Il est fortement probable que le rejet de la station d'épuration des Bouillides ait un impact sur la population de chevine et plus largement sur le peuplement piscicole.

Dans la Brague, la structure de la population est beaucoup moins régulière que dans la Bouillide amont. La taille des individus s'échelonne de 30 à 190 mm mais les cohortes sont peu marquées, et l'abondance de la cohorte de juvéniles est inférieure à celles des individus plus âgés. Ces résultats semblent révéler un succès de reproduction plus aléatoire suivant les années et des vitesses de croissance très hétérogènes.

Par ailleurs, on note l'absence de gros individus (>200 mm) dans les trois stations malgré la présence d'habitats favorables.

Il est également probable que des événements hydrologiques marqués aient pu favoriser des déplacements de poissons, mélangeant ainsi les cohortes de la population de chevine. Le caractère pélagique cette espèce la rend plus sensible à la dévalaison lors de crue par rapport à d'autres espèces benthiques comme le barbeau méridional.

### 3.3 Indice IPR

#### 3.3.1 Traits biologiques des espèces capturées et métriques utilisées dans l'IPR

Le calcul de l'indice IPR fait intervenir des variables environnementales (voir tableau 3 chapitre 3.2) et des caractéristiques du peuplement piscicole en place (tableau 6 suivant).

Tableau 6 : Variables utilisées dans le calcul de l'IPR des 7 espèces capturées dans la Bouillide et la Brague

Famille	Nom français	Code Espèce	Variables d'occurrence			Variables d'abondance			
			Nombre total d'espèces	Nombre d'espèces rhéophiles	Nombre d'espèces lithophiles	Densité d'individus tolérants	Densité d'individus invertivores	Densité d'individus omnivores	Densité totale
			NTE	NER	NEL	DIT	DII	DIO	DTI
anguillidae	Anguille	ANG	X				X		X
cyprinidae	Vairon	VAI	X		X				X
cyprinidae	Chevaine	CHE	X			X		X	X
cyprinidae	Barbeau méridional	BAM	X	X	X				X
cyprinidae	Tanche	TAN	X					X	X
cyprinidae	Gardon	GAR	X			X		X	X
centrarchidae	Perche soleil	PES	X				X		X

Au sens de l'IPR, seul le barbeau méridional est considéré comme espèce rhéophile (espèce qui affectionne les eaux courantes) et avec le vairon comme espèce lithophile (espèce dont le cycle de reproduction, en particulier la ponte se déroule sur un substrat minéral grossier). Ces espèces affectionnent les eaux courantes de bonne qualité. A contrario, le chevaine, la tanche et le gardon sont des espèces omnivores, assez tolérantes (capables de s'adapter à une large gamme d'habitats et de supporter des variations de qualité du milieu).

### 3.3.2 Comparaison de la composition réelle et théorique du peuplement

A partir des variables environnementales de chaque station, l'IPR calcule une probabilité théorique de présence de chacune des 34 espèces de poissons prises en compte dans l'indice. La comparaison du peuplement réel avec le peuplement théorique permet d'évaluer la qualité spécifique du peuplement. Le tableau 7 suivant présente les plus fortes probabilités de présence théorique, soit 13 espèces sélectionnées.

Tableau 7 : Probabilités théoriques de présence de 13 espèces de l'IPR

Espèce	Bouillide - amont STEP	Bouillide - aval STEP	Brague
<b>Barbeau méridional</b>	<b>83%</b>	84%	<b>90%</b>
<b>Anguille</b>	<b>70%</b>	<b>74%</b>	<b>94%</b>
<b>Vairon</b>	67%	71%	<b>83%</b>
<b>Chevaine</b>	<b>66%</b>	<b>70%</b>	<b>88%</b>
Goujon	53%	59%	87%
Carpe commune	26%	27%	34%
Loche franche	21%	24%	35%
Truite	16%	14%	6%
<b>Gardon</b>	<b>8%</b>	10%	29%
<b>Perche soleil</b>	<b>6%</b>	7%	18%
Toxostome	5%	6%	46%
Carassin	2%	2%	3%
<b>Tanche</b>	<b>1%</b>	2%	4%

en gras : les espèces capturées

Dans le bassin de la Brague et de la Bouillide, quatre des cinq espèces qui présentent une probabilité de présence théorique de plus de 50 % ont été retrouvées dans au moins une station. Seul le goujon ne figure pas parmi les espèces capturées alors que sa probabilité de présence est élevée.

En revanche, comme évoqué dans les paragraphes précédents, les présences du gardon, de la perche soleil et de la tanche dans ce bassin, étaient beaucoup moins attendues.

L'analyse des scores de probabilités théoriques indique que :

- dans la Brague : la composition du peuplement est conforme à la situation de référence attendue,
- dans la Bouillide amont : le peuplement dominant est plutôt conforme à la situation de référence, mais l'absence du vairon et la présence du gardon, de la tanche et de la perche soleil traduisent une altération du peuplement,
- dans la Bouillide aval STEP : la composition du peuplement est altérée et marquée par l'absence de nombreuses espèces comme le barbeau méridional et le vairon.

### 3.3.3 Comparaison des valeurs réelles et théoriques des métriques de l'IPR

#### • Métriques d'occurrence

Le tableau 8 présente la comparaison des valeurs réelles et théoriques des trois métriques d'occurrence de l'IPR.

Dans la Brague, les trois métriques d'occurrence mesurées sont plutôt cohérentes avec les valeurs théoriques.

En revanche, dans la Bouillide amont, on observe une richesse spécifique trop élevée (6 espèces capturées contre 4,3 attendues) en raison de la présence du gardon, de la perche soleil et de la tanche, et un nombre d'espèces lithophiles légèrement inférieur à celui attendu en raison de l'absence de vairon.

Enfin dans la Bouillide aval, avec seulement deux espèces capturées, toutes les métriques d'occurrence sont significativement plus faibles que celles attendues.

Tableau 8 : Comparaison des valeurs réelles et théoriques des 3 métriques d'occurrence de l'IPR

Station	Nombre total d'espèces (NTE)		Nombre d'espèces lithophiles (NEL)		Nombre d'espèces rhéophiles (NER)	
	valeur théorique	valeur observée	valeur théorique	valeur observée	valeur théorique	valeur observée
Bouillide – amont STEP	<b>4,3</b>	<b>6</b>	<b>1,7</b>	<b>1</b>	<b>1,1</b>	<b>1</b>
Bouillide – aval STEP	<b>4,5</b>	<b>2</b>	<b>1,8</b>	<b>0</b>	<b>1,1</b>	<b>0</b>
Brague	6,3	5	2,3	2	1,5	1

en gras : les plus gros écarts avec les valeurs théoriques

#### • Métriques d'occurrence

Le tableau 9 établit la comparaison des valeurs théoriques des métriques de l'abondance de l'IPR. Concernant les métriques de l'abondance, les densités mesurées présentent des écarts relativement importants avec les valeurs théoriques.

Au niveau des stations de la Brague et de la Bouillide en amont de la station d'épuration, les densités d'individus tolérants et omnivores (DIT et DIO) sont de 3,6 à 16 fois supérieures aux densités attendues. Les fortes abondances du chevaine (poisson omnivore et tolérant) dans les peuplements de ces stations contribuent à s'écarter des valeurs théoriques.

Au contraire, dans la station de la Bouillide située en aval de la station d'épuration, la faible densité totale mesurée (DTI) est de 11,5 fois inférieure à la valeur théorique.

Tableau 9 : Comparaison des valeurs théoriques des métriques d'abondance de l'IPR (nb ind. /m<sup>2</sup>)

Station	Densité d'individus tolérants (DIT)		Densité d'individus omnivores (DIO)		Densité d'individus invertivores (DII)		Densité totale d'individus (DTI)	
	valeur théorique	valeur observée	valeur théorique	valeur observée	valeur théorique	valeur observée	valeur théorique	valeur observée
Bouillide – amont STEP	<b>0,02</b>	<b>0,15</b>	<b>0,01</b>	<b>0,16</b>	0,01	0,04	0,22	0,35
Bouillide – aval STEP	<b>0,02</b>	<b>0,003</b>	<b>0,01</b>	<b>0,003</b>	0,01	0,02	<b>0,23</b>	<b>0,02</b>
Brague	<b>0,05</b>	<b>0,18</b>	<b>0,02</b>	<b>0,18</b>	0,02	0,02	0,24	0,34

en gras : les plus gros écarts avec les valeurs théoriques

### 3.3.4 Scores des métriques et calcul de l'IPR

Le tableau 10 suivant présente les valeurs des sept métriques et les notes IPR associées pour chacune des stations pêchées.

Tableau 10 : Valeurs des 7 métriques et notes IPR associées

Station	Scores des métriques d'occurrence			Scores des métriques d'abondance				Valeur de l'IPR	Classe de qualité associée
	NER	NEL	NTE	DIT	DIO	DII	DTI		
Bouillide amont STEP	1,5	<b>3,3</b>	2,0	<b>4,3</b>	<b>7,0</b>	0,1	1,0	<b>19,2</b>	<b>Moyenne</b>
Bouillide aval STEP	<b>6,2</b>	<b>8,2</b>	<b>3,4</b>	0,5	1,0	0,6	<b>8,0</b>	<b>27,8</b>	<b>Médiocre</b>
Brague	2,8	2,0	1,5	<b>3,2</b>	<b>5,8</b>	0,5	0,7	<b>16,4</b>	<b>Moyenne</b>

Dans les stations de la **Bouillide amont STEP** et de la **Brague**, la valeur de l'IPR correspond à la **classe de qualité moyenne** selon l'arrêté du 25 janvier 2010.

Les principales métriques impactant la qualité sont des métriques d'abondance (densité des individus tolérants et omnivores). Les fortes abondances du chevaine (espèce omnivore et tolérante dominant le peuplement) influence la note IPR. En effet, dans la conception de l'IPR, le développement d'espèces tolérantes dans le milieu est considéré comme pénalisant puisqu'il se fait au détriment d'espèces rhéophiles, lithophiles et invertivores. Or, ce n'est pas le cas ici, notamment dans la Brague, au regard de l'abondance du barbeau méridional et du viron. Pour ces raisons et avec une note de 16,4 (note à la limite supérieure de la classe de bonne qualité [7-16]), **le peuplement piscicole de la Brague peut être considéré comme plutôt bon.**

Dans la station **Bouillide aval STEP**, l'indice IPR correspond à une **classe de qualité médiocre** selon l'arrêté du 25 janvier 2010. La faible diversité échantillonnée dans cette station (2 espèces), explique en grande partie ce résultat. Cette pauvreté faunistique accompagnée d'abondances réduites (5 anguilles et 1 chevaine) témoigne d'une altération majeure du peuplement piscicole.

#### 4. CONCLUSION

- **La Bouillide en amont du rejet de la station d'épuration des Bouillides**

Le peuplement est dominé en effectif et en biomasse par trois espèces attendues dans le peuplement théorique (anguille, barbeau méridional, chevaine). Néanmoins, on constate l'absence du vairon, espèce assez sensible à la qualité de l'eau et du substrat, ainsi que la présence de trois espèces plus tolérantes, moins sensibles et habituellement inféodées aux milieux lenticques (gardon, tanche et perche soleil).

Cette altération partielle du peuplement piscicole traduit :

- l'enrichissement trophique du milieu, mis en évidence par la minéralisation élevée de l'eau,
- une altération de l'habitat disponible, notamment une faible proportion de faciès lotiques, et la présence de zones de retenues lenticques en amont.

Par ailleurs, l'analyse des cohortes d'âge semble indiquer une forte mortalité entre 2011 et 2013.

- **La Bouillide en aval du rejet de la station d'épuration des Bouillides**

Avec la capture de seulement 6 individus, le peuplement piscicole de cette station est très fortement altéré. On note entre autre, l'absence du barbeau méridional et du vairon, espèces sensibles à la qualité de l'eau, alors qu'ils sont présents plus en amont et/ou plus en aval de la station. Ces résultats semblent indiquer un impact important du rejet de la station d'épuration des Bouillides, puisque malgré la présence d'habitats favorables, le peuplement piscicole est quasi inexistant.

- **La Brague en aval immédiat de la confluence avec la Bouillide**

Dans cette station, la composition spécifique du peuplement piscicole est conforme à celle attendue puisque les 4 espèces (anguille, barbeau méridional, chevaine, vairon) qui dominent en effectif et en biomasse présentent plus de 80 % de probabilité de présence d'après l'IPR. La tanche complète marginalement le peuplement avec un seul individu probablement dévalant d'une zone de retenue amont. Ce peuplement piscicole est caractéristique des cours d'eau méditerranéen de moyenne altitude. L'impact pressenti du rejet de la station d'épuration sur le peuplement piscicole de la Bouillide ne semble pas affecter significativement celui de la Brague.

En revanche, à l'exception de l'anguille, on observe l'absence d'individus âgés de plus de trois ans, malgré la présence d'habitats favorables. Ce constat rejoint les observations réalisées dans les autres stations, indiquant une forte mortalité ou un déplacement des populations entre 2011 et 2013. Ces observations pourraient témoigner d'une ou plusieurs pollutions de la Bouillide et de la Brague il y a quelques années, mais aussi d'un important épisode hydrologique qui aurait pu avoir un impact significatif sur le peuplement.

Enfin, nous soulignerons que ces inventaires ont permis de confirmer la présence de deux espèces à enjeu patrimonial :

- l'**anguille** est présente dans les trois secteurs prospectés. L'absence de jeunes anguilles témoigne de la difficulté qu'a cette espèce à remonter rapidement depuis la mer. Par contre, de nombreux gros individus ont été capturés ; il s'agit probablement soit de femelles non encore entrées en migration, soit des mâles sédentarisés.
- Le **barbeau méridional** est présent en abondance dans les stations de la Bouillide amont STEP et de la Brague. Sa population est dynamique ; la présence de plusieurs cohortes d'âge témoigne d'une reproduction efficace. Soulignons toutefois son absence dans la Bouillide en aval du rejet et l'absence d'individus âgés dans la population de la Brague.

## 5. ANNEXES

Inventaire piscicole – biométrie

## ● Station de la Bouillide amont STEP

CODE TAXON	CODE TYPE LOT	N° LOT	EFFECTIF LOT	TAILLE INDIVIDU	TAILLE MIN	TAILLE MAX	POIDS LOT
ANG	G	4	8		520	650	4000
ANG	N		1	250			28
ANG	N		1	250			28
ANG	N		1	300			50
ANG	N		1	320			50
ANG	N		1	520			265
BAM	G	1	42		75	95	112
BAM	G	3	14		90	124	150
BAM	N		1	36			2
BAM	N		1	60			3
BAM	N		1	82			8
BAM	N		1	149			44
BAM	N		1	159			57
BAM	N		1	210			120
BAM	N		1	225			165
CHE	G	2	25		68	88	70
CHE	N		1	105			12
CHE	N		1	105			12
CHE	N		1	108			13
CHE	N		1	110			16
CHE	N		1	110			14
CHE	N		1	110			15
CHE	N		1	112			14
CHE	N		1	114			16
CHE	N		1	119			19
CHE	N		1	120			17
CHE	N		1	122			22
CHE	N		1	122			18
CHE	N		1	125			27
CHE	N		1	130			24
CHE	N		1	134			28
CHE	N		1	140			28
CHE	N		1	142			29
CHE	N		1	142			32
CHE	N		1	145			33
CHE	N		1	145			33
CHE	N		1	148			36
CHE	N		1	150			38
CHE	N		1	150			39
CHE	N		1	150			37
CHE	N		1	152			39
CHE	N		1	155			43
CHE	N		1	155			43
CHE	N		1	160			44
CHE	N		1	160			44
CHE	N		1	166			58
CHE	N		1	170			53
CHE	N		1	170			53
CHE	N		1	185			79
GAR	N		1	80			12
GAR	N		1	104			17
GAR	N		1	122			26
GAR	N		1	145			46
GAR	N		1	190			109
GAR	N		1	195			120
PES	N		1	62			5
PES	N		1	77			10
PES	N		1	89			13
PES	N		1	100			19
PES	N		1	129			39
TAN	N		1	88			10
TAN	N		1	130			33



● Station de la Bouillide aval STEP

CODE TAXON	CODE TYPE LOT	N° LOT	EFFECTIF LOT	TAILLE INDIVIDU	TAILLE MIN	TAILLE MAX	POIDS LOT
ANG	N		1	155			3
ANG	N		1	320			50
ANG	N		1	550			292
ANG	N		1	600			271
ANG	N		1	600			535
CHE	N		1	85			10

● Station de la Brague

CODE TAXON	CODE TYPE LOT	N° LOT	EFFECTIF LOT	TAILLE INDIVIDU	TAILLE MIN	TAILLE MAX	POIDS LOT
ANG	N		1	190			9
ANG	N		1	275			37
ANG	N		1	380			84
ANG	N		1	430			128
ANG	N		1	430			86
ANG	N		1	440			115
ANG	N		1	460			133
ANG	N		1	460			167
ANG	N		1	490			163
ANG	N		1	500			210
ANG	N		1	500			252
ANG	N		1	550			315
ANG	N		1	590			350
ANG	N		1	600			400
BAM	G	1	62		45	72	122
BAM	N		1	79			7
BAM	N		1	80			5
BAM	N		1	87			8
BAM	N		1	89			9
BAM	N		1	90			8
BAM	N		1	92			10
BAM	N		1	96			12
BAM	N		1	132			32
BAM	N		1	133			29
BAM	N		1	147			43
CHE	N		1	54			3
CHE	N		1	27			1
CHE	N		1	28			1
CHE	N		1	32			1
CHE	N		1	33			1
CHE	N		1	37			1
CHE	N		1	38			1
CHE	N		1	45			2
CHE	N		1	52			2
CHE	N		1	52			2
CHE	N		1	54			2
CHE	N		1	56			3
CHE	N		1	56			3
CHE	N		1	60			4
CHE	N		1	60			4
CHE	N		1	62			4
CHE	N		1	62			3
CHE	N		1	62			4
CHE	N		1	62			2
CHE	N		1	65			4
CHE	N		1	68			5
CHE	N		1	75			5
CHE	N		1	76			3
CHE	N		1	78			7
CHE	N		1	80			5
CHE	N		1	82			8
CHE	N		1	83			7
CHE	N		1	84			5
CHE	N		1	85			7
CHE	N		1	85			8
CHE	N		1	85			7
CHE	N		1	85			8
CHE	N		1	86			9
CHE	N		1	88			9

CODE TAXON	CODE TYPE LOT	N° LOT	EFFECTIF LOT	TAILLE INDIVIDU	TAILLE MIN	TAILLE MAX	POIDS LOT
CHE	N		1	88			7
CHE	N		1	89			7
CHE	N		1	89			6
CHE	N		1	89			7
CHE	N		1	90			7
CHE	N		1	90			9
CHE	N		1	90			7
CHE	N		1	90			8
CHE	N		1	90			8
CHE	N		1	92			7
CHE	N		1	92			9
CHE	N		1	92			7
CHE	N		1	95			8
CHE	N		1	95			10
CHE	N		1	95			8
CHE	N		1	95			10
CHE	N		1	96			9
CHE	N		1	96			10
CHE	N		1	98			10
CHE	N		1	98			11
CHE	N		1	99			12
CHE	N		1	100			13
CHE	N		1	100			10
CHE	N		1	100			11
CHE	N		1	100			13
CHE	N		1	103			14
CHE	N		1	104			12
CHE	N		1	105			8
CHE	N		1	105			12
CHE	N		1	105			15
CHE	N		1	105			17
CHE	N		1	108			18
CHE	N		1	110			16
CHE	N		1	110			13
CHE	N		1	111			16
CHE	N		1	112			19
CHE	N		1	112			19
CHE	N		1	113			15
CHE	N		1	115			17
CHE	N		1	115			17
CHE	N		1	115			15
CHE	N		1	115			17
CHE	N		1	117			22
CHE	N		1	119			23
CHE	N		1	120			24
CHE	N		1	120			20
CHE	N		1	123			21
CHE	N		1	123			19
CHE	N		1	124			24
CHE	N		1	125			25
CHE	N		1	125			22
CHE	N		1	125			23
CHE	N		1	125			19
CHE	N		1	125			22
CHE	N		1	125			25
CHE	N		1	126			24
CHE	N		1	126			25
CHE	N		1	126			24
CHE	N		1	126			24
CHE	N		1	126			25
CHE	N		1	126			26
CHE	N		1	128			27
CHE	N		1	128			24
CHE	N		1	130			27
CHE	N		1	130			30
CHE	N		1	130			27
CHE	N		1	130			20
CHE	N		1	130			27
CHE	N		1	130			24
CHE	N		1	132			21
CHE	N		1	133			29
CHE	N		1	133			27

CODE TAXON	CODE TYPE LOT	N° LOT	EFFECTIF LOT	TAILLE INDIVIDU	TAILLE MIN	TAILLE MAX	POIDS LOT
CHE	N		1	134			30
CHE	N		1	135			26
CHE	N		1	135			27
CHE	N		1	139			32
CHE	N		1	140			31
CHE	N		1	140			35
CHE	N		1	142			37
CHE	N		1	145			32
CHE	N		1	146			37
CHE	N		1	146			36
CHE	N		1	146			39
CHE	N		1	150			37
CHE	N		1	150			43
CHE	N		1	150			41
CHE	N		1	151			33
CHE	N		1	155			43
CHE	N		1	155			40
CHE	N		1	160			42
CHE	N		1	160			54
CHE	N		1	160			36
CHE	N		1	164			58
CHE	N		1	165			41
CHE	N		1	168			56
CHE	N		1	169			57
CHE	N		1	174			65
CHE	N		1	179			70
CHE	N		1	180			60
TAN	N		1	140			40
VAI	G	2	26		58	76	43
VAI	N		1	28			1
VAI	N		1	75			3

## ANNEXE 2 : Liste des composés métalliques et organiques dosés dans les gammars dans les campagnes *ex-situ* et *in-situ*

Tableau 1 : Listes des composés métalliques

Composés métalliques	LQ $\mu\text{g/g}$	Valeurs seuils
Aluminium (Al)	2	
Antimoine (Sb)	0,05	
Argent (Ag)	0,02	
Arsenic (As)	0,05	×
Baryum (Ba)	1	
Béryllium (Be)	0,1	
Bore (B)	2	
Cadmium (Cd)	0,02	×
Chrome (Cr)	0,1	×
Cobalt (Co)	0,05	×
Cuivre (Cu)	0,1	×
Etain (Sn)	0,1	
Fer (Fe)	1	
Lithium (Li)	0,1	
Manganèse (Mn)	0,2	
Mercure (Hg)	0,05	×
Molybdène (Mo)	0,1	
Nickel (Ni)	0,1	×
Plomb (Pb)	0,05	×
Selenium (Se)	0,1	×
Tellure (Te)	0,1	
Thallium (Tl)	0,1	
Titane (Ti)	0,2	
Uranium (U)	0,02	
Vanadium (V)	0,1	
Zinc (Zn)	1	×

Tableau 2 : Listes des composés organiques

<b>Famille</b>	<b>Substance</b>	<b>LQ</b>
Organochloré	2,4' DDE	1
Organochloré	2,4' DDT	1
Organochloré	4,4' DDD	1
Organochloré	4,4' DDE	1
HAP	Acenaphthene	1
HAP	Acenaphthylene	1
HAP	Anthracene	1
HAP	Benzo (a) Anthracene	1
HAP	Benzo (a) pyrene	1
HAP	Benzo (b+j) Fluoranthene	2
HAP	Benzo (e) Pyrene	1
HAP	Benzo (g,h,i) Perylene	1
HAP	Benzo (k) Fluoranthene	1
HAP	Chrysene	1
Organochloré	DDT 4,4'	1
HAP	Fluoranthene	1
HAP	Fluorene	1
Organochloré	HCH Gamma (Lindane)	1
Organochloré	Hexachlorobenzene	1
HAP	Indeno (1,2,3-cd) Pyrene	1
HAP	Naphthalene	1
Organochloré	PCB 101	1
Organochloré	PCB 118	1
Organochloré	PCB 138	1
Organochloré	PCB 153	1
Organochloré	PCB 180	1
Organochloré	PCB 28	1
Organochloré	PCB 52	1
HAP	Perylene	1
HAP	Phenanthrene	1
HAP	Pyrene	1
	Dibenzo (a, c)	
	Anthracène	1
	BDE 47	1
	BDE 99	1

## ANNEXE 3 : Caractéristiques chimiques des effluents

Tableau 3 : Concentrations ponctuelles en anions et cations mesurées dans la condition témoin et les 3 effluents étudiés (IIR, O3, Bf)

Paramètre	Unité	Campagne	Date	témoin	IIR 100	O3 100	Bf 100
Cond	µS/cm	C1 : juin 2015	25/06/15	525	1090	1110	1070
			08/07/15	345	1145	1155	1035
		C2 : sept 2015	17/09/15	525	1170	1170	1065
			23/09/15	435	1105	1105	1045
			02/10/15	515	1170	1140	1040
		C3 : avril 2016	06/04/16	485	1075	1025	960
			12/04/16	565	900	995	860
20/04/16	370	1030	1075	1010			
pH	[pH]	C1 : juin 2015	25/06/15	8,0	7,5	7,1	7,4
			08/07/15	8,1	7,2	7,3	7,5
		C2 : sept 2015	17/09/15	7,6	7,1	7,1	7,7
			23/09/15	8,3	7,8	7,6	8,1
			02/10/15	7,8	6,9	6,7	7,3
		C3 : avril 2016	06/04/16	8,1	7,6	8,0	8,0
			12/04/16	7,5	7,4	7,6	7,6
20/04/16	8,1	7,4	7,6	7,8			
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	mg/L	C1 : juin 2015	25/06/15	240	130	130	160
			08/07/15	115	120	135	275
		C2 : sept 2015	17/09/15	245	170	180	280
			23/09/15	175	100	100	240
			02/10/15	235	75	70	175
		C3 : avril 2016	06/04/16	210,0	122,0	118,0	224,0
			12/04/16	262	121	102	203
20/04/16	126	99	90	216			
Cl <sup>-</sup> (C.I.)	mg/L	C1 : juin 2015	26/06/15	17,8	160	162	160
			08/07/15	18,0	152	154	151
		C2 : sept 2015	17/09/15	18,3	168	167	159
			23/09/15	18,1	147	149	155
			02/10/15	17,6	173	166	167
		C3 : avril 2016	06/04/16	17,3	167,0	145,0	152,0
			12/04/16	16,7	129	134	128
20/04/16	17,6	160	170	158			
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (C.I.)	mg/L	C1 : juin 2015	26/06/15	38,2	43,2	43,9	44,0
			08/07/15	37,4	44,8	44,9	42,9
		C2 : sept 2015	17/09/15	39,0	55,5	55,7	56,6
			23/09/15	38,4	51,7	51,8	52,7
			02/10/15	38,5	49,7	50,0	50,3
		C3 : avril 2016	06/04/16	38,8	41,9	44,2	41,2
			12/04/16	43,0	41,9	44,3	41,5
20/04/16	40,5	45,9	46,1	45,3			

Paramètre	Unité	Campagne	Date	témoïn	Ilr 100	O3 100	Bf 100
Na <sup>+</sup> (C.I.)	mg/L	C1 : juin 2015	26/06/15	11,7	82,2	84,0	83,0
			08/07/15	11,4	82,0	83,5	80,7
		C2 : sept 2015	17/09/15	12,0	90,6	90,4	87,9
			23/09/15	12,1	85,2	86,6	90,3
			02/10/15	11,6	95,6	93,5	93,9
		C3 : avril 2016	06/04/16	12,1	91,7	83,9	85,6
			12/04/16	13,9	85,8	91,0	84,1
20/04/16	13,7		102,0	108,0	102,0		
K <sup>+</sup> (C.I.)	mg/L	C1 : juin 2015	26/06/15	2,7	21,2	21,8	20,9
			08/07/15	< 1,0	2,3	20,6	18,8
		C2 : sept 2015	17/09/15	1,9	24,8	24,9	25,8
			23/09/15	2,0	21,9	23,0	24,2
			02/10/15	2,4	25,7	25,7	25,2
		C3 : avril 2016	06/04/16	2,4	18,6	20,0	18,5
			12/04/16	2,7	19,1	21,2	19,2
20/04/16	3,2		20,0	21,0	22,9		
Mg <sup>2+</sup> (C.I.)	mg/L	C1 : juin 2015	26/06/15	7,5	14,6	14,6	14,6
			08/07/15	7,3	14,2	14,5	13,7
		C2 : sept 2015	17/09/15	7,9	17,4	17,2	17,5
			23/09/15	7,9	17,4	17,2	17,5
			02/10/15	8,5	17,4	17,2	16,9
		C3 : avril 2016	06/04/16	7,9	15,2	15,0	14,8
			12/04/16	8,1	14,0	14,1	13,7
20/04/16	8,0		14,4	14,8	15,0		
Ca <sup>2+</sup> (C.I.)	mg/L	C1 : juin 2015	26/06/15	83,7	83,7	83,1	83,1
			08/07/15	42,9	85,0	87,2	80,1
		C2 : sept 2015	17/09/15	87,1	88,9	90,7	87,5
			23/09/15	64,5	73,6	74,8	76,1
			02/10/15	84,7	69,8	68,1	67,2
		C3 : avril 2016	06/04/16	75,7	76,0	76,3	74,9
			12/04/16	95,0	68,3	70,2	66,6
20/04/16	48,8		72,1	74,7	76,4		
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (C.I.)	[N] = mg/L	C1 : juin 2015	26/06/15	< 0,02	0,74	0,88	0,35
			08/07/15	0,05	1,97	3,58	3,55
		C2 : sept 2015	17/09/15	-	-	-	-
			23/09/15	-	-	-	-
			02/10/15	-	-	-	-
		C3 : avril 2016	06/04/16	< 0,03	2,0	0,4	< 0,03
			12/04/16	< 0,04	0,09	3,20	< 0,04
20/04/16	< 0,03		< 0,03	0,10	0,50		

Paramètre	Unité	Campagne	Date	témoïn	Ilr 100	O3 100	Bf 100
<b>N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (C.I.)</b>	[N] = mg/L	C1 : juin 2015	26/06/15	< 0,02	0,10	0,22	3,84
			08/07/15	0,05	2,86	1,20	0,44
		C2 : sept 2015	17/09/15	< 0,02	0,86	0,57	0,08
			23/09/15	< 0,02	1,00	0,94	0,74
			02/10/15	< 0,10	0,41	0,84	9,1
		C3 : avril 2016	06/04/16	< 0,02	0,2	-	0,5
			12/04/16	< 0,03	0,03	-	1,0
20/04/16	< 0,02	< 0,02	-	2,3			
<b>N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (C.I.)</b>	[N] = mg/L	C1 : juin 2015	26/06/15	2,59	32,1	33,6	18,7
			08/07/15	10,3	161	160	1,1
		C2 : sept 2015	17/09/15	2,50	27,6	27,9	< 0,45
			23/09/15	2,40	30,6	31,8	1,40
			02/10/15	2,57	43,3	42,4	3,72
		C3 : avril 2016	06/04/16	2,6	25,3	27,6	1,2
			12/04/16	2,64	21,4	28,2	1,40
20/04/16	2,50	25,9	28,4	2,21			
<b>P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> (C.I.)</b>	[P] = mg/L	C1 : juin 2015	26/06/15	< 0,03	0,32	0,36	0,13
			08/07/15	< 0,10	0,90	1,11	0,98
		C2 : sept 2015	17/09/15	< 0,03	0,35	0,38	0,08
			23/09/15	< 0,03	0,45	0,47	0,23
			02/10/15	< 0,03	0,92	0,88	0,30
		C3 : avril 2016	06/04/16	< 0,12	0,4	0,4	< 0,12
			12/04/16	< 0,03	0,3	0,3	< 0,03
20/04/16	< 0,03	0,2	0,2	0,18			



## REMERCIEMENTS

Ce travail a nécessité la collaboration de plusieurs membres de l'équipe d'écotoxicologie d'IRSTEA<sup>1</sup> et de BIOMAE<sup>2</sup> qui sont intervenus dans la réalisation des expérimentations sur le terrain et l'acquisition des données biologiques.

Nous remercions particulièrement :

Quentin Chabanne<sup>1</sup>, Alexandre Decamps<sup>1</sup>, Nicolas Delorme<sup>1</sup>, Thibaut Hombert<sup>2</sup>, Rémi Recoura-Massaquant<sup>2</sup>, Hervé Quéau<sup>1</sup>, et Lucile Perrier<sup>1</sup> pour la réalisation des prélèvements, sélections d'organismes et expositions sur le terrain ;

Patrice Noury<sup>1</sup>, Nicolas Delorme<sup>1</sup>, Hervé Quéau<sup>1</sup> et Amandine Maurice<sup>2</sup> pour l'acquisition des données enzymatiques et de traits d'histoire de vie.

Nous remercions également Mmes Belloi et Noble et M. Gamberi de Suez Eau France, pour nous avoir accueillis pendant deux années sur le site de la Station de traitements des eaux usées des Bouillides ainsi que pour leur contribution à la réalisation des campagnes *in-situ*.