Caractérisation des eaux usées d'un réseau d'assainissement pour un diagnostic des pollutions en amont des stations d'épuration : de l'analyse physico-chimique au développement d'un nouveau bioessai toxicologique

Laëtitia Frat

▶ **To cite this version:**

Laëtitia Frat. Caractérisation des eaux usées d'un réseau d'assainissement pour un diagnostic des pollutions en amont des stations d'épuration : de l'analyse physico-chimique au développement d'un nouveau bioessai toxicologique. Environnement et Société. Institut agronomique, vétérinaire et forestier de France, 2020. Français. NNT : 2020IAVF0003 . tel-04040277

HAL Id: tel-04040277
https://pastel.hal.science/tel-04040277

Submitted on 22 Mar 2023

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.

agreenium
l'institut agronomique, vétérinaire & forestier de France

AgroParisTech

NNT : 2020 IAVF 0003

THÈSE DE DOCTORAT

préparée à l'Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (AgroParisTech)

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Institut agronomique vétérinaire et forestier de France

Spécialité : Sciences de la vie et de la santé

École doctorale n°581
Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

par

Laëtitia FRAT

Caractérisation des eaux usées d'un réseau d'assainissement pour un diagnostic des pollutions en amont des stations d'épuration : de l'analyse physico-chimique au développement d'un nouveau bioessai toxicologique

Directeur de thèse : **David SIAUSSAT**
Co-encadrement de la thèse : **Didier MOERS**

Thèse présentée et soutenue à Sorbonne Université, le 27 février 2020 :

Composition du jury :

M. Frédéric MARION-POLL, Professeur, AgroParisTech	Président
Mme Gaëlle LE GOFF, Chargée de recherche, HDR, INRAE	Rapporteur
Mme Jeanne GARRIC, Directrice de recherche émérite, INRAE	Rapporteur
Mme Claudia COSIO, Professeure, Université de Reims Champagne-Ardenne	Examinatrice
M. Olivier GEFFARD, Directeur de recherche, INRAE	Examinateur
M. Didier MOERS, Directeur général des services, SIARP	Co-encadrant de thèse
M. David SIAUSSAT, Maître de conférences, HDR, Sorbonne Université	Directeur de thèse
M. Vincent ROCHER, Docteur, Directeur Innovation, SIAAP	Membre invité

UMR 113 Institut d'Écologie et des Sciences de l'Environnement de Paris
Sorbonne Université, campus Pierre et Marie Curie, Paris 5e

Remerciements

Il y a trois ans je partais pour une aventure. Aujourd'hui elle se termine et me remplit d'émotions. Cette thèse a été pour moi une formidable opportunité de travail mais aussi de rencontres. L'intérêt que ce sujet a suscité auprès de plusieurs professionnels, académiques comme opérateurs, fait ma joie et ma fierté. J'ai pris plaisir à apprendre et à partager autour de mon sujet. J'espère pouvoir continuer dans ce domaine où tant de choses restent à faire.

Un titre de docteur ne s'obtient pas sans l'évaluation du travail par ses pairs. Je tiens donc à remercier les membres de mon jury ; Gaëlle Le Goff, Jeanne Garric, Frédéric Marion-Poll, Claudia Cosio, Olivier Geffard et Vincent Rocher.

Et comme un si long projet se fait rarement sans compagnons, je souhaiterais les remercier également.

David et Didier, vous avez été mes mentors durant ces trois années. Vous m'avez confié ce sujet et m'avez laissé le faire évoluer. J'ai appris beaucoup auprès de vous entre le monde académique et opérationnel. C'était un plaisir d'être sous votre encadrement. David, mon directeur de thèse, tu as aussi su m'écouter quand j'en avais besoin et apaiser mes doutes tout le long de cette route. Merci à vous deux pour tous les bons moments passés à rire, à festoyer et à apprendre !

Je remercie les membres de mon comité de suivi, à commencer par l'Agence de l'Eau Seine-Normandie. Vincent et Anne-Sophie, merci d'avoir soutenu ce projet pour l'obtention des financements et de m'avoir accompagnée durant ces trois ans. Olivier, tes conseils plus que pertinents et ton enthousiasme ont été bénéfiques et m'ont permis de redoubler d'efforts. Enfin toi, Tom, mon mentor drosophiliste, tu m'as poussée dans ma réflexion scientifique et appris de nombreuses choses.

J'ai pu être accueillie au sein de deux structures au cours de ma thèse, le SIARP et le laboratoire IEES-Paris. Il y a donc de nombreuses personnes qui m'ont entourée durant ces années (et j'ai la pression pour ne pas en oublier !).

Le SIARP. Je remercie le président, M. Emmanuel Pezet et l'ancienne directrice générale des services Mme Marie Hélène Cieslak d'avoir soutenu ce projet et de m'avoir

permis d'intégrer le SIARP. Je remercie tous les agents qui m'ont apporté leur expertise et ont pris part au bon déroulement des travaux de thèse ; Emilien, Stéphanie, Sébastien (merci pour tes petites leçons techniques bien utiles), Cécile (les allers-retours entre les bureaux pour voir les plans, les tableaux Excel à n'en plus finir, l'analyse des données parfois casse-tête, grâce à toi ce projet à trouver des bases solides), Sophie (merci pour tes plans magnifiques et indispensables !), Pascale (toujours le sourire quand j'arrive), Kévin, Rémy, Benoît, Nicolas, les gars du CTS, et tous ceux du 73 à l'administration. J'aimerais aussi remercier Elodie pour ses leçons sur le terrain et les contrôles entreprises, son aide dans ces travaux son soutien dans tous les moments passés. Merci à Cédric pour les prélèvements d'eaux usées. Grâce à vous tous, j'ai appris de nombreuses choses dans le domaine de l'eau et de l'assainissement et cela à fait naître un grand intérêt pour ce domaine. Merci de m'avoir encouragée à participer au 97ème congrès de l'ASTEE, j'en garde un souvenir mémorable.

Le laboratoire. Je remercie d'abord notre suprême, Martine, qui a toujours eu un œil bienveillant. Mes chers compères de bureau, Aude, Thomas D., Emma, Lucie, Gabriela, Thibaut et Cynthia. Nous avons partagé de nombreux échanges scientifiques mais aussi fous rires, confessions, anecdotes, bières et alcools corses et belges et tant d'autres. Ces moments de partage et de soutien sont difficiles à résumer en quelques mots tant ils ont été nombreux. Annick merci pour ton écoute, ton aide dans les manips et tous les moments partagés. Françoise, tu m'as formée à la digne technique de la qPCR, tu m'as aussi soutenue et aidée durant la thèse et tes gâteaux étaient un pur délice (comme ceux d'Emma d'ailleurs !). J'ai également passé de très bons moments avec Line, Phillipe, Matthieu (merci pour les stats !), Nicolas D., Stéphane, Claudia (merci pour ton soutien et tes mots justes), Mannuel. Et je ne saurais manquer de remercier Nicolas et (de nouveau) Tom pour les moments partagés lors de nos repiquages quotidiens. Merci pour votre aide et vos conseils mais aussi les moments de rigolade autour de nos plaisirs coupables musicaux et podcasts. Je remercie également Carole, Johanna et Véronique qui ont géré à la perfection tous les petits besoins, les commandes, les ordres de missions et autres. Grâce à vous tous, j'ai beaucoup appris dans le monde du laboratoire et de la biologie.

Just a few words for my Spanish colleagues, Rosario, Óscar and Lola. Thank you for your welcome, your kindness, your precious scientific advices. Thanks for all the moments shared in Madrid (including tinto de verano and tapas!). I have unforgettable memories with you. ¡ Muchas gracias !

Enfin dans un registre plus personnel, je remercie tous les amis, thésards et non thésards, qui m'ont apporté leur soutien, leur aide, leur intérêt pour mon sujet. Maud, tu es l'un de mes piliers et je te remercie d'être là chaque jour. Merci à ma famille d'avoir été présente pour moi depuis toutes ces années et dans mes projets de vie incluant cette thèse, en particulier ma maman. Merci aussi à ma belle-famille, qui m'accompagne et me soutient depuis plusieurs années maintenant. Je souhaiterais remercier ma sœur jumelle, Coralie, pour tout ce que tu fais pour moi, ainsi que ta magnifique mise en page et tes figures qui subliment cette thèse. Tu es mon double, ma moitié et tu contribues à mon équilibre. Enfin, mon cher et tendre, Christophe, tu m'apportes joie et équilibre depuis plusieurs années. Ton soutien, ta bonne humeur, ta patience m'ont aidé à tenir dans les moments les plus difficiles.

Et puis, je ne peux pas terminer ces lignes sans avoir de pensées pour mes grands-parents et mon oncle, partis trop tôt, qui auraient été fiers de moi, j'en suis sûre.

Préface

A l'émergence de l'ère industrielle révolutionnant à jamais nos méthodes de production, l'impact d'activités polluantes sur notre environnement n'était guère la première des préoccupations. La notion de « souiller » l'environnement est un concept contemporain et intrinsèquement lié à l'évolution des consciences, des connaissances et des méthodes analytiques. De nombreuses sources d'émission polluantes peuvent conduire à des nuisances et des perturbations des écosystèmes telles que le rejet d'eaux usées par exemple. Les eaux usées sont des eaux ayant été utilisées par l'Homme. Elles sont considérées comme sales et impures par l'usage qui en a été fait et ne constituent plus une ressource de qualité. Elles doivent être dépolluées au sein des stations d'épuration avant d'être rejetées au milieu naturel sous peine d'engendrer des effets négatifs sur l'environnement. Les eaux usées qui sont produites par les activités domestiques, industrielles ou encore agricoles sont alors collectées et transportées par et dans les réseaux d'assainissement (ou égouts) puis acheminées dans les stations d'épuration. Elles subissent ainsi un traitement visant à les débarrasser de la pollution qu'elles transportent puis sont rejetées dans le milieux aquatique. A ce moment, ce ne sont plus des eaux usées mais des eaux dites « traitées ». La qualité de celles-ci est très suivie en raison des résidus de pollution et du risque que ces eaux peuvent représenter si le traitement n'est pas adapté ou complet. En opposition aux eaux traitées, les eaux usées sont quant à elles, moins étudiées du fait qu'elles passent par l'usine de traitement avant d'atteindre le milieu naturel. Cependant, des bipasses direct dans l'environnement ou un traitement incomplet sont des événements qui peuvent survenir au niveau des systèmes d'assainissement et provoquer le déversement d'eaux usées ou d'eau partiellement traitées dans le milieu naturel. Une des solutions pour limiter la contamination de l'environnement est de s'intéresser aux sources d'émissions de pollutions dans les eaux usées brutes. Les comprendre et les identifier permettrait ainsi de limiter la contamination de l'environnement, mais aussi anticiper au mieux les besoins de traitement.

Liste des abréviations

20E : 20-hydroxyecdysone
ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
AESN : agence de l'eau Seine-Normandie
AFNOR : agence française de normalisation
AMPA : acide aminométhylphosphonique
ANC : assainissement non collectif
AOE : enzyme antioxydante
AOX : halogène organique adsorbable
APEO : alkylphénols éthoxylés
ARE : élément de réponse antioxydant
ARN : acide ribonucléique
BR-C : broad complexe
CIRC : centre internationale de recherche sur le cancer
COFRAC : comité français d'accréditation
COHV : composés organo-halogénés volatils
CPR : cytochrome p450 réductase
DBO_5 : demande biologique en oxygène sur 5 jours
DCE : directive cadre sur l'eau
DCO : demande chimique en oxygène
DEHP : di(2-éthylhexyl) phtalate
Dib : disembodied
DL50 : dose létale pour 50% d'une population
DRIEE : direction régionale et interdépartementale de l'environnement et de l'énergie
DNAse : désoxyribonucléase
ECPP : eaux claires parasites permanentes
EcR : ecdysone receptor
EH : équivalent-habitant
ERR : estrogen related receptor
EU : eaux usées
EUAD : eaux usées assimilées domestiques
EUD : eaux usées domestiques
EUND : eaux usées non domestiques (eaux usées industrielles)
FTZ-F1 : bêta fushi tarazu-factor 1
GEREP : gestion électronique du registre des émissions polluantes
GST : glutathion S-transférase
HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique

HSE : heat shock element
HSF : heat shock factor
HSPs : heat shock proteins
ICPE : installations classées pour l'environnement
INERIS : institut national de l'environnement industriel et des risques
ISO : international standards organization
JH : hormone juvenile
Jheh : juvenile hormone epoxide hydrolase
Kr-h1 : krüppel homologue 1
LQ : limite de quantification
Met : méthoprène tolerent
MES : matière en suspension
METOX : métaux toxiques (arsenic, cadmium, chrome, cuivre, mercure, nickel, plomb, zinc)
MTs : metallothionéines
MRE : metal response element
NOEC : no observed effect concentration
NQE : norme de qualité environnementale
NTK : azote total Kjeldahl
PBDE : polybromodiphényléthers
PCB : polychlorobiphényles
Phm : phantom
PNEC : predicitve no-effect concentration
RSDE : recherche de substances dans l'eau
Sad : shadow
SAGE : schéma d'aménagement et de gestion des eaux
SDAGE : schéma directeur d'aménagement et de gestion des eaux
Shd : shade
SIAAP : syndicat interdépartemental pour l'assainissement de l'agglomération parisienne
SIARP : syndicat intercommunal pour l'assainissement de la région de Pontoise
SIG : système d'information géographique
SOERE URBIS : système d'observation et d'expérimentation sur le long terme en environnement urbain centré sur l'hydrologie
STEU : station d'épuration des eaux usées
TBT : tributylétain
UGT : glucuronosyltransférase
USP : ultraspiracle
VLE : valeur limite d'émission dans les eaux usées

Sommaire

Chapitre I : État de l'art 17

A. Repère historique en matière d'assainissement et de réglementation 18
A.1. Pollution et assainissement 18
A.1.1. Pollution de l'eau, de quoi parle-t-on ? 18
A.1.2. Concept et définition de l'assainissement 19
A.1.2.1. Bref historique sur l'assainissement autour de la ville de Paris 19
A.1.2.2. Le réseau d'assainissement d'aujourd'hui 23
A.2. Contexte réglementaire autour de l'assainissement en France 27
A.2.1. L'Eau, patrimoine mondial à protéger 29
A.2.2. Réglementation propre aux systèmes d'assainissement 32
Conclusion 33

B. État des connaissances des pollutions présentes dans les eaux usées 34
B.1. Origine et disponibilité de différentes familles de polluants 34
B.1.1. Toxicité et devenir des polluants : concepts et problématiques 34
B.1.2. Sources et transferts dans le milieu aquatique 35
B.1.3. Effets sur la biosphère 38
B.1.4. Types de toxicité observés 40
B.2. Caractéristiques et suivi des eaux usées 42
B.2.1. Familles de polluants d'intérêts retrouvées dans les eaux usées : sources et effets 46
B.2.2. Occurrence des polluants dans les eaux usées 53
B.2.3 Stratégie et limites du suivi de qualité des eaux usées dans un réseau d'assainissement 58
B.3. Suivi des eaux usées par le Syndicat Intercommunal pour l'Assainissement de la Région de Pontoise 60
Conclusion 62

C. *Drosophila melanogaster,* un modèle d'étude pour l'évaluation de la toxicité des eaux usées 63
C.1. Pourquoi la drosophile pour étudier la toxicité des eaux usées brutes 63
C.2. Brève histoire du genre Drosophila 64
C.3. Biologie et cycle de vie : des traits de vie facilement observables 65
C.4. Une panoplie de biomarqueurs génétiques 66
Conclusion 75

D. Problématique et objectifs de la thèse 76

Chapitre II : Caractérisation physico-chimique des eaux usées 79

A. Stratégie pour la caractérisation physico-chimique des eaux usées brutes 82
A.1. Démarche générale 82
A.2. Connaissances et cartographie du réseau d'assainissement et de son environnement 83
A.3. Sélection des sites et des points de prélèvements des eaux usées 84
A.4. Choix des paramètres physico-chimiques à suivre dans les eaux usées 85
A.5. Prélèvements des eaux usées et quantification des paramètres suivis 87

B. Composition physico-chimique des eaux usées brutes 89
B.1. Campagnes de prélèvements et description des sites 89
B.2. Composition physico-chimique des eaux usées 98
B.2.1. Paramètres globaux : les macropollutions 98
B.2.2. Micropolluants et polluants spécifiques 105
B.2.2.1. Concentrations dans le réseau d'assainissement 106
B.2.2.2. Concentrations en fonction de l'origine des eaux usées 114
B.2.2.3. Sources dans le réseau d'assainissement 118
B.2.2.4. Signature des eaux usées à l'échelle du territoire d'assainissement 124

B.3. Retour d'expérience 125

Conclusion 127

Annexes 129

Chapitre III : Étude de la réponse de *Drosophila melanogaster* à des polluants présents dans les eaux usées 133

A. Mise en place du bioessai 136
A1. Sélection des polluants et des concentrations 136
A.2. Déroulement général du bioessai 139
A.2.1. Phénotypes macroscopiques 140
A.2.2. Recherche de biomarqueurs moléculaires 141

B. Exposition seule ou en mélange du cadmium et du mercure sur Drosophila melanogaster : réponses moléculaires et impacts sur le développement post-embryonnaire 142

C. Effets d'une exposition unique ou combinée de polluants prioritaires sur l'expression des gènes et le développement post-embryonnaire de *Drosophila melanogaster* 151

D. Des biomarqueurs pour le suivi de la pollution dans les eaux usées ? 163

Conclusion 168

Chapitre IV : Caractérisation toxicologique des eaux usées brutes 170

A. Caractérisation toxicologique des eaux usées brutes de la campagne 2018 173
A.1. Phénotypes macroscopiques 173
A.1.1. Mortalité 173
A.1.2. Durée du développement 176
A.1.3. Taille de la pupe 177
A.1.4. Sex-ratio 177
A.2. Cibles moléculaires 177
Conclusion 180

B. Caractérisation toxicologique des eaux usées brutes de la campagne 2019 182
1. Introduction 184
2. Matériels et méthodes 185
2.1. Collecte d'échantillons d'eaux usées et analyses physico-chimiques 185
2.2. Elevage des insectes, traitement aux eaux usées et mesures toxicologiques 188
2.3. Extraction des ARN totaux des insectes et synthèse des brins d'ADNc en vue d'analyse par qPCR 188
2.4. PCR et qPCR 188
2.5. Analyses statistiques 189
3. Résultats et discussion 190
3.1. Composition des eaux usées 190
3.1.1. Paramètres globaux 190
3.1.2. Micropolluants 190
3.1.3. Bilan sur la composition chimique des eaux usées et substances significatives 193
3.2. Effets des eaux usées sur Drosophila melanogaster 194
Conclusion 201
Références bibliographiques 202

C. Bilan sur les paramètres de toxicité mesurés en tant que biomarqueurs du suivi de la pollution dans les eaux usées 206

Conclusion 210

Chapitre V : Discussion générale et perspectives 212

1. Quelle est la pertinence d'un bioessai pour l'évaluation de la toxicité des eaux usées brutes ? 214
2. Quelles sont les limites des outils appliqués ? 215
3. Quelle relation entre la physico-chimie et la toxicité mesurée ? 218
4. Quelle est la place de la drosophile en tant que bioessai ? 219
5. Quel retour d'expérience pour une structure telle que le SIARP ? 221
6. Quelles perspectives pour le bioessai ? 223

Glossaire 228

Références bibliographiques 232

Chapitre I
État de l'art

«La connaissance des mots conduit à la connaissance des choses.»

Platon.

L'essentiel chapitre I *: Depuis les années 2000, le contexte réglementaire impose la prise de mesures dans la recherche de substances dangereuses dans l'eau. Les eaux usées représentent une source d'apport de pollution dans l'eau, bien que les traitements des stations d'épuration soient de plus en plus performants. L'issue pour diminuer la présence de ces pollutions est la réduction à la source des émissions polluantes. Les gestionnaires de réseaux d'assainissement sont désormais responsables de la nature et du caractère plus ou moins dangereux de leurs eaux usées. Depuis 2007, ils doivent mettre en place une autosurveillance de leur structure d'assainissement et depuis 2016, connaître et transmettre les informations sur les micropolluants qui pourraient se trouver dans leurs eaux usées. Ces micropolluants sont tout aussi nombreux que différents par leur nature et leurs effets toxiques. Ils peuvent être transférés dans l'environnement via les sous-produits de l'assainissement (eaux traitées et boues) et être plus ou moins persistants et ce, au sein même des réseaux d'assainissement. En raison de la dynamique de ce type de matrice d'étude (eaux usées) et de la variabilité de sa composition, les méthodes actuelles (chimie analytique) pour étudier les polluants (présence et concentration) sont souvent limitées et coûteuses.*

Les bioessais représentent un complément voire même une alternative à la chimie analytique. Ils sont tout à fait adaptés pour exprimer la toxicité des micropolluants mais aussi celle des produits de dégradation de ces derniers au sein d'un milieu, ce qui n'est pas toujours faisable avec la chimie. Ces outils sont généralement moins onéreux et permettent souvent de gagner du temps sur le rendu des résultats. Des panels de tests biologiques in vivo et in vitro sont souvent utilisés pour caractériser un nombre important d'effets. Cependant, s'ils doivent être utilisés en routine, le coût financier peut augmenter rapidement. De plus dans ces panels, des organismes aquatiques polluants-sensibles sont le plus souvent utilisés afin d'évaluer les effets dans le milieu naturel. Dans cette étude, la matrice d'intérêt, les eaux usées, est un déchet et ne constitue pas un « milieu naturel » et peut donc être très toxique. Des organismes trop polluants-sensibles pourraient biaiser les résultats toxicologiques, à l'instar d'organismes trop résistants. La difficulté était de choisir un modèle bioessai pour une utilisation en routine et sur les eaux usées. La drosophile ou Drosophila melanogaster occupe une place de choix dans les laboratoires. C'est un modèle de plus en plus utilisé dans les études de toxicologie environnementale en raison de ses caractéristiques de développement et des outils qui lui sont dédiés. Il s'avère donc être un allié dans la recherche des substances dangereuses pour établir un premier profil toxicologique des eaux usées et prioriser les zones à risques au niveau du territoire d'assainissement.

A. Repère historique en matière d'assainissement et de réglementation

A.1. Pollution et assainissement

A.1.1. Pollution de l'eau, de quoi parle-t-on ?

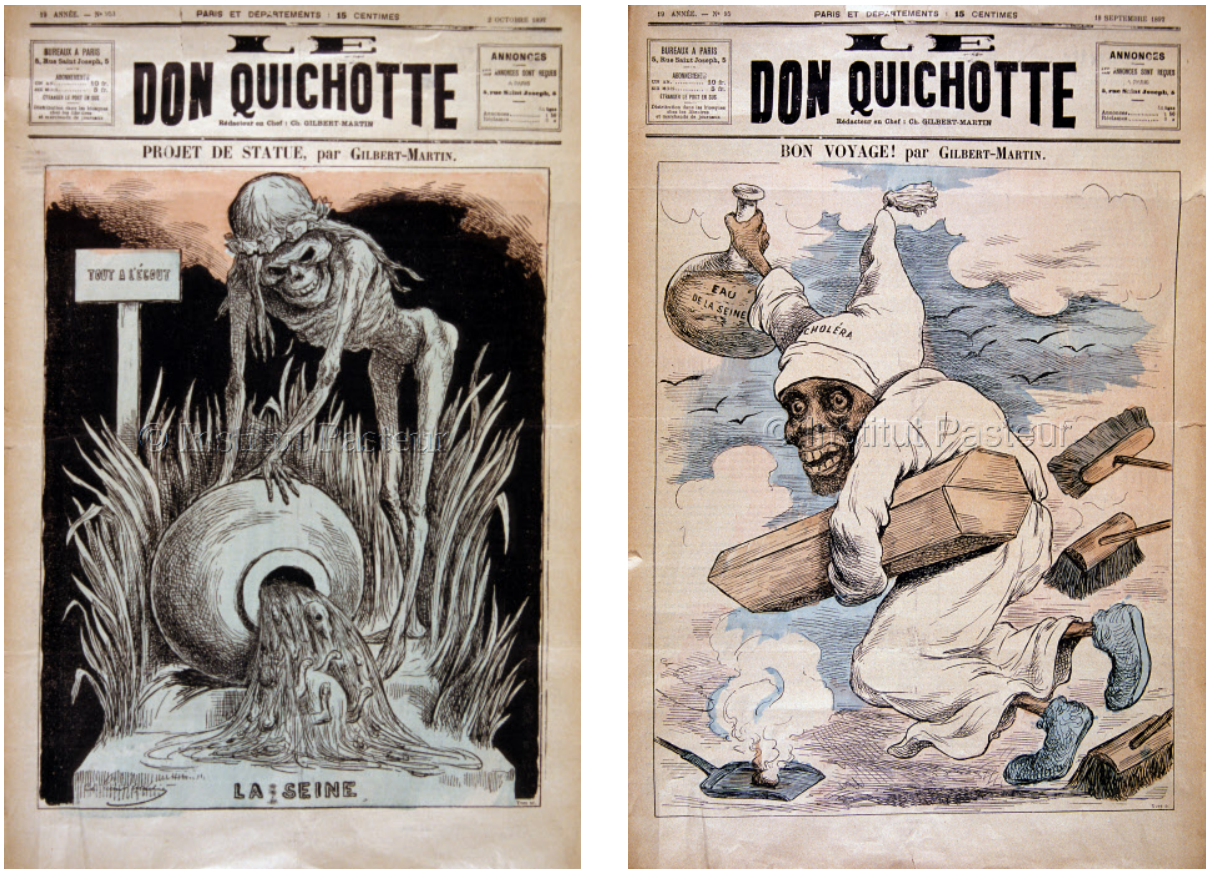
La **Directive Européenne 2000/60/CE** communément appelée Directive Cadre sur l'Eau (DCE) a été rédigée au début du siècle afin de pouvoir réglementer l'usage de l'eau. Elle concerne l'ensemble des états membres de l'Europe et a permis de tracer des lignes directrices pour la protection de cette ressource. Plusieurs termes ont été décrits avec précision afin que les transcriptions en droits nationaux respectent ces lignes. Ainsi « **une pollution** » est définie comme : *l'introduction directe ou indirecte, par suite de l'activité humaine, de substances ou de chaleur dans l'air, l'eau ou le sol, susceptibles de porter atteinte à la santé humaine ou à la qualité des écosystèmes aquatiques ou des écosystèmes terrestres dépendant directement des écosystèmes aquatiques, qui entraînent des détériorations aux biens matériels, une détérioration ou une entrave à l'agrément de l'environnement ou à d'autres utilisations légitimes de ce dernier.* Cette définition large permet d'incriminer tout élément qui, en fonction de son seuil ou même de sa présence, peut être une pollution susceptible de dégrader l'environnement.

Une pollution peut être classée selon son origine, sa nature, sa répartition dans le temps ou ses effets et est toujours associée à un élément dangereux et malsain (Richards et Shieh, 1986). Dans cette thèse, je me suis principalement intéressée au problème des pollutions chimiques, né durant l'ère industrielle (XIX^{e} siècle). Nombre de ces polluants se retrouvent dans l'eau. Ces polluants se mesurent à diverses concentrations et lorsque qu'elles sont faibles, on parle de micropolluant. En effet, ce terme a été mis en lumière depuis la création de la DCE et définit un micropolluant comme : *indésirable et détectable dans l'environnement à très faible concentration (µg/L voire ng/L). Sa présence est, au moins en partie, due à l'activité humaine et peut à ces très faibles concentrations engendrer des effets négatifs sur les organismes vivants en raison de sa toxicité, de sa persistance et/ou de sa bioaccumulation* (définition donnée par le Ministère de la Transition écologique et solidaire). Chaque activité quotidienne et professionnelle peut contribuer à la contamination de l'environnement aquatique et au déversement de ce type de pollution. Le terme micropolluant est contrasté avec celui de « macropolluant » qui fait référence à des substances présentes et dommageables à plus forte concentration (notamment les nutriments comme l'azote et le phosphore).

Quel que soit le terme employé – pollution, polluant, molécule, xénobiotique, substance ou micropolluant – il désigne un élément potentiellement nocif pour la santé humaine et la santé des écosystèmes. Chaque polluant est ainsi associé à une famille (ex. hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), métaux, polluants organiques…) en fonction de sa structure chimique et/ou ses propriétés, son utilisation ou ses effets (ex. détergents, pesticides, perturbateurs endocriniens…) (cf. chapitre I – B.2.1).

A.1.2. Concept et définition de l'assainissement

A.1.2.1. Brève historique sur l'assainissement autour de la ville de Paris



Couvertures Don Quichotte *: Couvertures du journal satirique Don Quichotte. D457 - Allégorie de la mort et du choléra (à droite) et D458 - Allégorie du choléra chassé par la salubrité publique. ©Institut Pasteur*

L'assainissement est lié étymologiquement au verbe assainir qui signifie « rendre sain ». C'est en fait un concept ancien apparu avec la sédentarité, qui s'est intensifié et systématisé il y a environ un siècle à cause de l'accroissement des villes, des nombreuses épidémies de maladies graves et donc la nécessité de gérer les déchets et eaux usées. La **figure I-1** synthétise de façon globale l'avènement de l'assainissement jusqu'à notre époque.

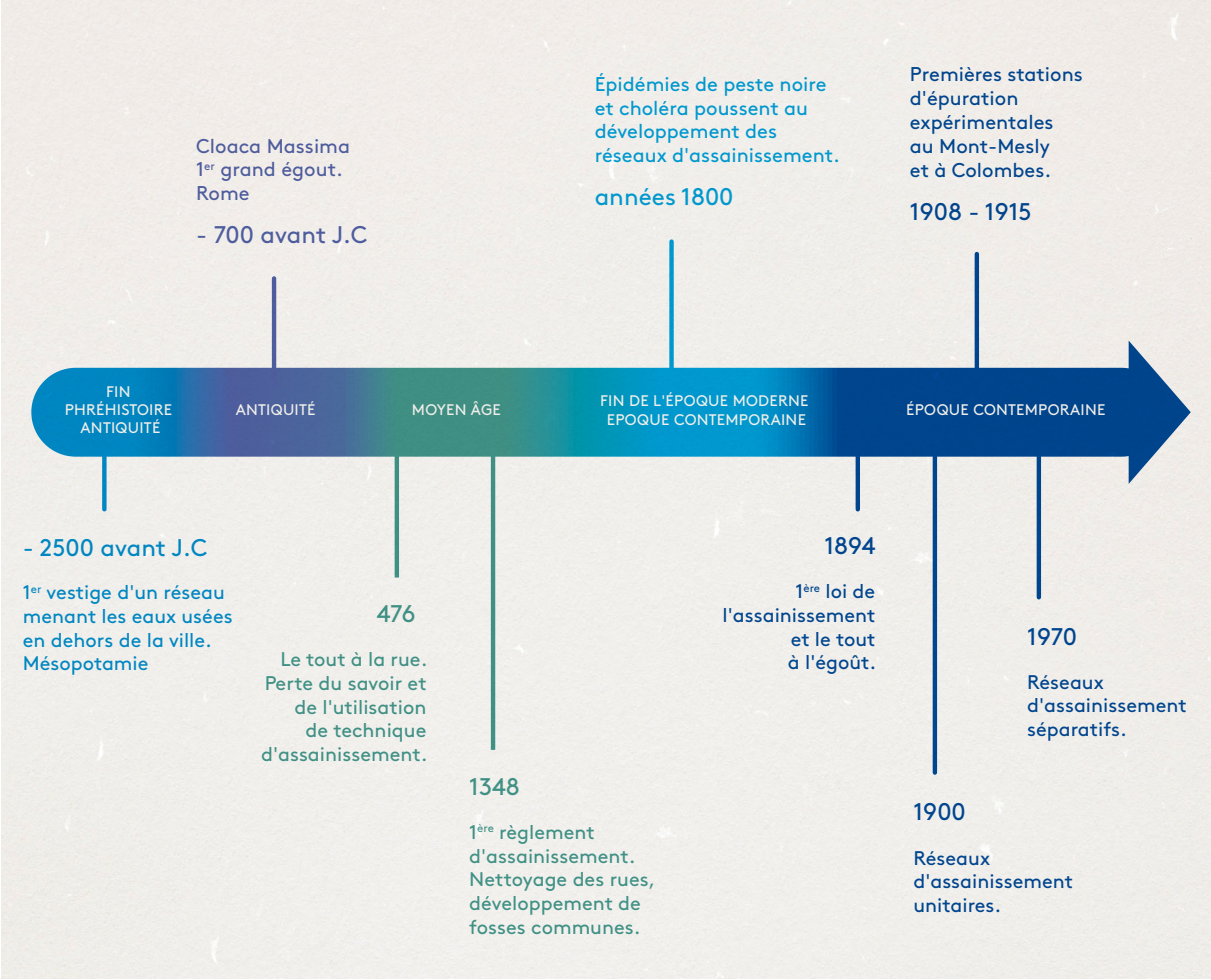


Figure I-1. *Chronologie de l'avènement de l'assainissement.*

Les premières traces de réseaux d'eaux usées furent trouvées en Mésopotamie et datent d'environ 2 500 ans avant J-C. Ces premiers réseaux construits de briques permettaient l'évacuation des eaux en dehors de la ville (Marcel et Ghelmi, 2012). La civilisation romaine a probablement été l'une des pionnières en matière d'innovation de collecte des eaux usées par la construction du « *cloaca massima* », le grand égout. Ce savoir-faire s'est perdu au cours du temps et arrivé au Moyen-âge, en Europe, il n'y a plus d'égouts ni d'évacuations des eaux usées. Elles sont rejetées

directement à la rue produisant ainsi odeurs et matières pestilentielles. Ce n'est que grâce à la pluie – par ruissellement et lessivage – que les rues étaient nettoyées.

En France, à cause des odeurs, Philippe II Auguste ordonna en 1185 le pavage de la ville de Paris et la création de fosses centrales. Ces moyens restaient néanmoins insuffisants pour gérer les quantités de déchets mêlés d'eaux usées mais aussi d'ossements, de carcasses et de sang. Le terrible épisode de peste noire de 1347, qui a ravagé l'Europe et décimé la moitié de la population française, engendra un premier règlement officiel du roi Philippe VI de Valois (Marcel et Ghelmi, 2012). Il a été imposé à la population de laver devant chez soi afin d'évacuer plus rapidement les eaux usées et déchets plutôt que d'attendre les périodes pluvieuses et ainsi éviter la transmission de maladies et les odeurs. Par la suite plusieurs arrêtés concernant l'hygiène ont défilé mais rien de bien concret et de fonctionnel pour garantir la salubrité des rues. Les eaux résiduaires ont continué de contribuer à la transmission de pathologies graves telles que le choléra, la coqueluche ou encore la variole. Pour tenter d'y remédier, la ville est nettoyée et l'ébauche des premiers réseaux d'assainissement est construite pour amener les eaux usées dans la Seine. La qualité du fleuve se dégrade à grande vitesse, alors qu'il constitue une source d'approvisionnement en eau potable. Indirectement, les eaux usées favorisent le développement de la bactérie *Vibrio cholerae*, responsable des épidémies de choléra des années 1832-1854. Ces événements ont mené à l'avènement de l'assainissement au sens actuel du terme.

Les égouts, jusqu'ici délaissés s'agrandissent. Les premiers ouvrages de la ville sont dus à Rambuteau, préfet de la Seine à cette époque. Puis en 1855, est confiée à l'ingénieur Eugène Belgrand, l'entreprise d'assainir Paris remodelant ainsi la gestion de l'eau potable et usée (Marcel et Ghelmi, 2012). En 1894 la loi du « tout à l'égout » impose l'installation de système d'évacuation permettant de récupérer les eaux usées et de les épandre directement sur les champs. L'épandage permet ainsi la fertilisation des parcelles agricoles et limite l'impact sur la santé humaine et sur la Seine dont la qualité s'était fortement dégradée par l'apport d'eaux usées et de pollutions chimiques en plus forte concentration avec l'industrialisation (Marcel et Pastor, 2011). Les débits d'étiages de la Seine sont ainsi devenus très faibles à cause des pratiques de pompages et les pollutions déversées viennent à augmenter la toxicité du fleuve, entraînant une forte mortalité piscicole à l'époque (Rocher et Azimi, 2017). L'eau doit être rendue au fleuve et permettre le pompage des volumes nécessaires à la ville qui croît de façon exponentielle. De nouvelles méthodes alternatives de gestion des eaux usées sont indispensables, d'autant plus que les engrais

chimiques viennent concurrencer l'épandage et que les surfaces agricoles tendent à se réduire et s'éloigner des villes. Dès le début du XX^{e} siècle, des chercheurs étudient les processus d'épuration et notamment le processus biologique artificiel vers lequel Paris s'orienta (Marcel et Ghelmi, 2012). Ainsi en 1908, est construite une station de traitement des eaux usées (STEU) expérimentale au Mont-Mesly (Créteil, département 94) et s'ensuit celle de Colombes (département 92) en 1915. Puis en 1929, un schéma directeur d'assainissement du département de la Seine est créé et permet la construction de plusieurs émissaires vers une nouvelle station d'épuration à haute capacité équivalent-habitant (EH) inaugurée en 1939 à Achères (département 78) (Marcel et Pastor, 2011). La création et la mise en place des réseaux d'aujourd'hui sont lancées et en fonction de diverses contraintes économiques, écologiques, pratiques, techniques et sociales, deux approches – l'unitaire et le séparatif – se sont développées l'une après l'autre. De nos jours, l'assainissement comprend la collecte, le transport et le processus d'épuration des eaux usées, crucial en raison des pollutions (macro- et micro- polluants) et matières biologiques transportées.

Quelques chiffres d'aujourd'hui : La majeure partie du territoire parisien est gérée par le Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne (SIAAP), l'un des précurseurs de l'assainissement moderne à Paris. Mais de nombreux autres syndicats et entreprises s'attèlent à la gestion des eaux usées sur l'ensemble du territoire français. En 2017, la France compte sur son territoire 21 282 stations de traitements des eaux usées pour les grandes agglomérations dont 530 en Île-de-France, représentant une capacité épuratoire totale de 104 millions d'équivalent-habitant. Pour les agglomérations de moins de 2 000 habitants, le nombre de ces stations se monte à 3 740 pour une capacité épuratoire de 74 millions d'équivalent-habitant (Ministère de la Transition écologique et solidaire). L'ensemble de ces chiffres concerne l'assainissement collectif. Pour les logements en dehors des zones de raccordements à un réseau collectif, des procédés individuels (fosses septiques, toutes eaux…) sont mis en place. Cela concernerait 5 millions de logements en France (Forquet et al., 2012).

A.1.2.2. Le réseau d'assainissement d'aujourd'hui

Le système de collecte

Le réseau d'assainissement a pour objectif de collecter et de transporter les eaux usées (brutes) à la station de traitement des eaux usées (STEU) via les canalisations et émissaires, le tout de façon gravitaire dans la mesure du possible. Le réseau est impliqué dans le petit cycle de l'eau où l'apport de micropolluants est multiple et où tous les compartiments dépendent les uns des autres (**Figure I-2**). Pour les nouvelles constructions, c'est le réseau en branchement séparatif qui prédomine mais en fonction des contraintes existantes ou de l'héritage patrimonial, le réseau peut être unitaire comme le cas de la ville de Paris. Dans la **configuration unitaire**, les eaux pluviales sont mélangées aux eaux usées des habitations et des industries et sont acheminées à la STEU (pointillés, **Figure I-2**).

Ce type de réseau présente quelques contraintes, la première étant la construction. Puisqu'il est difficile d'estimer la quantité de pluie, il est nécessaire de surdimensionner le réseau afin d'en éviter la surcharge. Et pour assurer la sécurité et le bon fonctionnement du système, des points de rejets directs dans l'environnement ou bipasses sont prévus. C'est le rôle des bassins de rétention et des déversoirs d'orage. Les premiers permettent une régulation du flux en entrée du réseau d'assainissement et les seconds permettent une surverse unitaire des eaux pluviales mélangées aux eaux usées sans traitement dans le milieu récepteur. Dans ce cas, les eaux les plus diluées sont déversées en premier, ce qui permet de garder les eaux les plus concentrées dans le fond du déversoir qui seront réinjectées dans le réseau lors de la baisse du flux. Malgré la présence de pollutions dans les eaux pluviales, les traiter implique un coût économique supplémentaire et la gestion du flux de pollution est plus aléatoire en temps de pluie obligeant parfois des surverses unitaires dans l'environnement. De plus, les eaux pluviales peuvent diluer les eaux usées ce qui peut être un problème durant les processus d'épuration biologique. Et l'alternance des périodes sèches et pluvieuses favorise la concentration de micropolluants au sein du réseau (Marcel et Pastor, 2013) ; les sédiments peuvent piéger les pollutions et les relarguer après immersion. A partir des années 1970, la **configuration en séparatif**, s'est préférentiellement étendue sur le territoire. Le réseau séparatif permet de séparer dans des linéaires parallèles les eaux usées et pluviales, ces dernières étant rejetées directement dans l'environnement sans traitement hormis cas particuliers (**Figure I-2**).

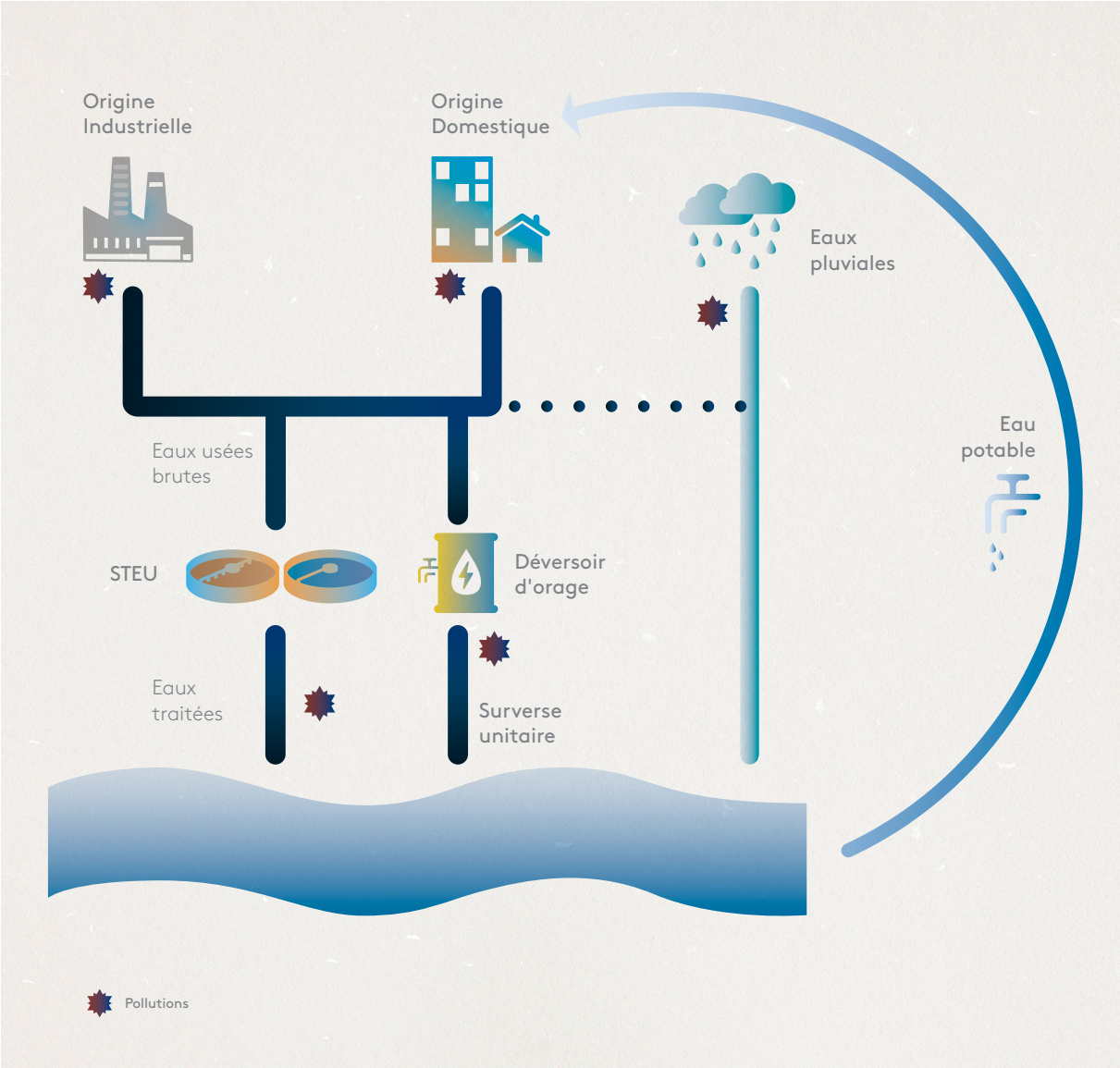


Figure I-2. *Petit cycle de l'eau. Les habitations et industries/entreprises sont branchées sur le réseau d'assainissement et y rejettent leurs eaux usées dites aussi « brutes ». Les eaux usées sont ensuite transportées à la STEU pour y subir un traitement épuratoire avant leur rejet au milieu récepteur (eaux traitées). Si le réseau est* **unitaire**, *les eaux pluviales rejoignent les eaux usées (pointillés) et sont toutes envoyées à la STEU. En cas de surcharge du réseau unitaire par forte pluie, le déversoir d'orage (uniquement présent sur l'unitaire) permet de bipasser eaux pluviales et usées directement au milieu récepteur. Si le réseau est* ***séparatif****, les eaux usées et pluviales ne se rejoignent pas. Les eaux usées sont transportées à la STEU et les eaux pluviales sont directement rejetées sans traitement dans l'environnement. Les stations de pompage d'eau potable prélèvent l'eau du milieu naturel qui est redistribuée après traitement de potabilisation chez les particuliers et industriels, ce qui clôture le petit cycle de l'eau.*

Le dimensionnement des réseaux est simplifié car un flux journalier peut être calculé en fonction du nombre d'habitants (unité équivalent-habitant EH). C'est ce système de configuration et ses eaux résiduaires qui ont fait l'objet de cette thèse. Parmi les eaux usées collectées, se distinguent les eaux usées domestiques et assimilées domestiques (EUD, EUAD) et non domestiques (EUND). Les EUD ou EUAD désignent les eaux utilisées par la population et par les professionnels (activités économiques) à des fins domestiques

uniquement. Elles proviennent des sanitaires (eaux vannes charriant fèces et microorganismes), de la cuisine, machine à laver et douche (eaux grises ou ménagères charriant micropolluants organiques, graisses…). Quant aux EUND, dites aussi industrielles, désignent les eaux rejetées dans le cadre d'activités professionnelles contenant des pollutions susceptibles d'être en plus grande quantité ou plus dangereuses que celles contenues dans les eaux d'origine domestique (métaux lourds, phénols, colorants chimiques, hydrocarbures…). Les eaux usées de toutes origines sont envoyées à la STEU. De plus, les eaux usées industrielles peuvent éventuellement subir des prétraitements avant même d'être rejetées et collectées dans le réseau d'assainissement. En raison du double réseau en parallèle eaux usées/eaux pluviales dans la configuration séparative, des non-conformités d'installations comme des inversions de branchements sont présentes rendant ainsi le milieu récepteur vulnérable aux eaux usées brutes et surcharge inutilement les STEU (encadré eaux pluviales). Le pompage de l'eau et les stations de traitement de potabilisation permettent la distribution de l'eau chez les particuliers et les industriels via le réseau d'eau potable et clôture le petit cycle de l'eau. L'eau potable deviendra à son tour de l'eau usée après utilisation.

Eaux pluviales : Le traitement des eaux pluviales avant leur rejet dans l'environnement est une question cruciale en raison de la présence de micropolluants à cause des pollutions urbaines (atmosphère, toitures…) (Zgheib et al., 2012). Cependant la composition est extrêmement variable en fonction des évènements météorologiques mais aussi de l'occupation des sols, des pratiques et des activités économiques (Briand et al., 2018). Lorsqu'elles sont envoyées dans les STEU, elles diluent la charges polluante (DBO_5, DCO) et donc les nutriments nécessaires aux microorganismes qui permettent l'épuration de l'eau. De ce fait, cela peut causer de mauvais rendements de ces STEU.

La réglementation est donc pour le moment assez vague et concerne principalement les problèmes d'inondation. Le projet MicroMegas-Lyon lancé en 2015 pour une durée de quatre ans, vise à développer et tester des méthodes alternatives de gestion des eaux pluviales pour limiter la contamination de l'environnement et notamment des nappes phréatiques ; sources de pompage des eaux destinées à la consommation. Des noues, tranchées, structures réservoirs et bassins sont suivis pour évaluer leur efficacité contre les inondations et les pollutions.

Il existe sur le territoire français quelques stations de traitement des eaux pluviales uniquement, mais ces ouvrages ne sont pas très nombreux. La plupart des eaux pluviales sont infiltrées à la parcelle ou rejetées en surface (Marcel et Pastor, 2013).

Le système de traitement

Bien que le sujet de la thèse ne porte pas sur le système de traitement des eaux usées, il est essentiel de le connaître car il fait partie du petit cycle de l'eau (**Figure I-2**). A l'origine, les STEU ont été créées pour l'épuration des macropolluants (carbone, azote, phosphore) et limiter la propagation de bactéries pathogènes. Grâce aux divers procédés appliqués, le rendement est plutôt bon concernant les micropolluants mais leur élimination dépend toutefois de leurs propriétés physico-chimiques (cf. chapitre I – B.1.1.2.).

Le principe d'une STEU est de faire subir aux eaux usées un parcours précis (**Figure I-3**).

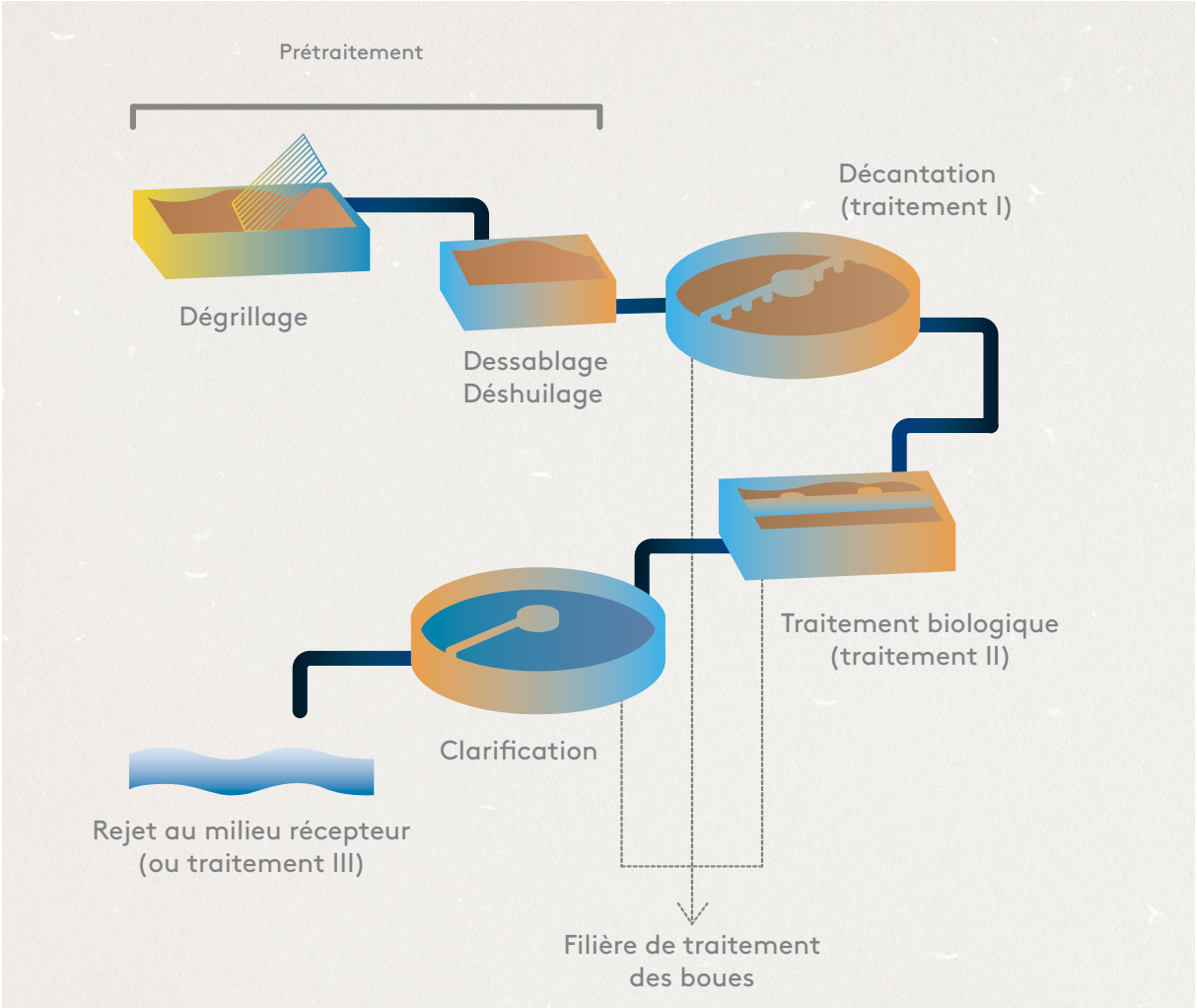


Figure I-3. *Principe de la filière de traitement d'une station d'épuration. Les eaux usées suivent un parcours bien précis avec plusieurs étapes de traitement permettant leur épuration. Au cours de l'épuration, des boues se forment et seront traitées dans une filière appropriée et l'eau épurée est rejetée au milieu naturel.*

Une phase de prétraitement est d'abord appliquée. Il s'agit du dégrillage, dessablage, déshuilage permettant de filtrer les déchets volumineux, de laisser sédimenter les matières lourdes, de séparer huile et graisse de l'eau et d'éviter le dysfonctionnement de l'ouvrage de traitement dans les étapes suivantes (**Figure I-3**). Dans certains cas et en particulier dans les STEU à forte capacité EH, un **traitement primaire** de décantation permet la sédimentation des matières en suspension (MES) créant ainsi les boues primaires (**Figure I-3**). Afin d'accroître l'abattement des MES de la STEU, des produits chimiques peuvent y être ajoutés comme des floculants. Le **traitement secondaire** ou biologique consiste en l'épuration des matières dissoutes parfois complétée par l'ajout d'un sel métallique en cas d'excès. Le but de ce traitement secondaire est de reproduire de façon accélérée l'autoépuration des cours d'eau. Selon les phases d'aérobie et d'anaérobie, les processus de nitrification/dénitrification sont réalisés par différentes bactéries menant à la formation de nouvelles boues par digestion de ces matières. Par la suite, boues et eau purifiée sont séparées par décantation dans des clarificateurs (**Figure I-3**). Une partie de ces boues est réinjectée dans les bassins pour maintenir une biomasse efficace (recirculation) et l'excédent de boues est extrait de la filière traitement pour valorisation (agronomique, énergétique ou matériel). L'eau épurée est restituée au milieu récepteur et permet le maintien des débits d'étiage des cours d'eau. Un **traitement tertiaire** peut être appliqué en fonction des contraintes spécifiques du milieu récepteur (zone sensible, eaux de baignade, captage d'eau potable en aval…) et en fonction de la capacité de la STEU et du coût économique, puisque non obligatoire sauf cas spécifiques liés au milieu récepteur. Il peut s'agir d'ozonation (oxydant puissant), de filtration spécifique sur charbon actif ou membrane ou encore de l'utilisation d'ultraviolet pour désinfecter l'eau et éliminer les dernières pollutions restantes y compris des micropolluants.

A.2. Contexte réglementaire autour de l'assainissement en France

L'encadrement réglementaire des pollutions dans l'eau a débuté par la protection des milieux aquatiques et concerne plusieurs types de pollutions, macro- comme micro-. La première loi sur l'eau a tout juste 55 ans mais la détérioration de notre environnement a imposé la multiplication des actions réglementaires pour minimiser notre impact et en a renforcé la sévérité. En effet, en plus d'un encadrement sur les milieux aquatiques, les installations polluantes et désormais les systèmes d'assainissement sont intégrés dans ce cadre.

La **figure I-4** retrace la chronologie des textes marquants au cours des dernières décennies dans le domaine de l'eau et des eaux usées.

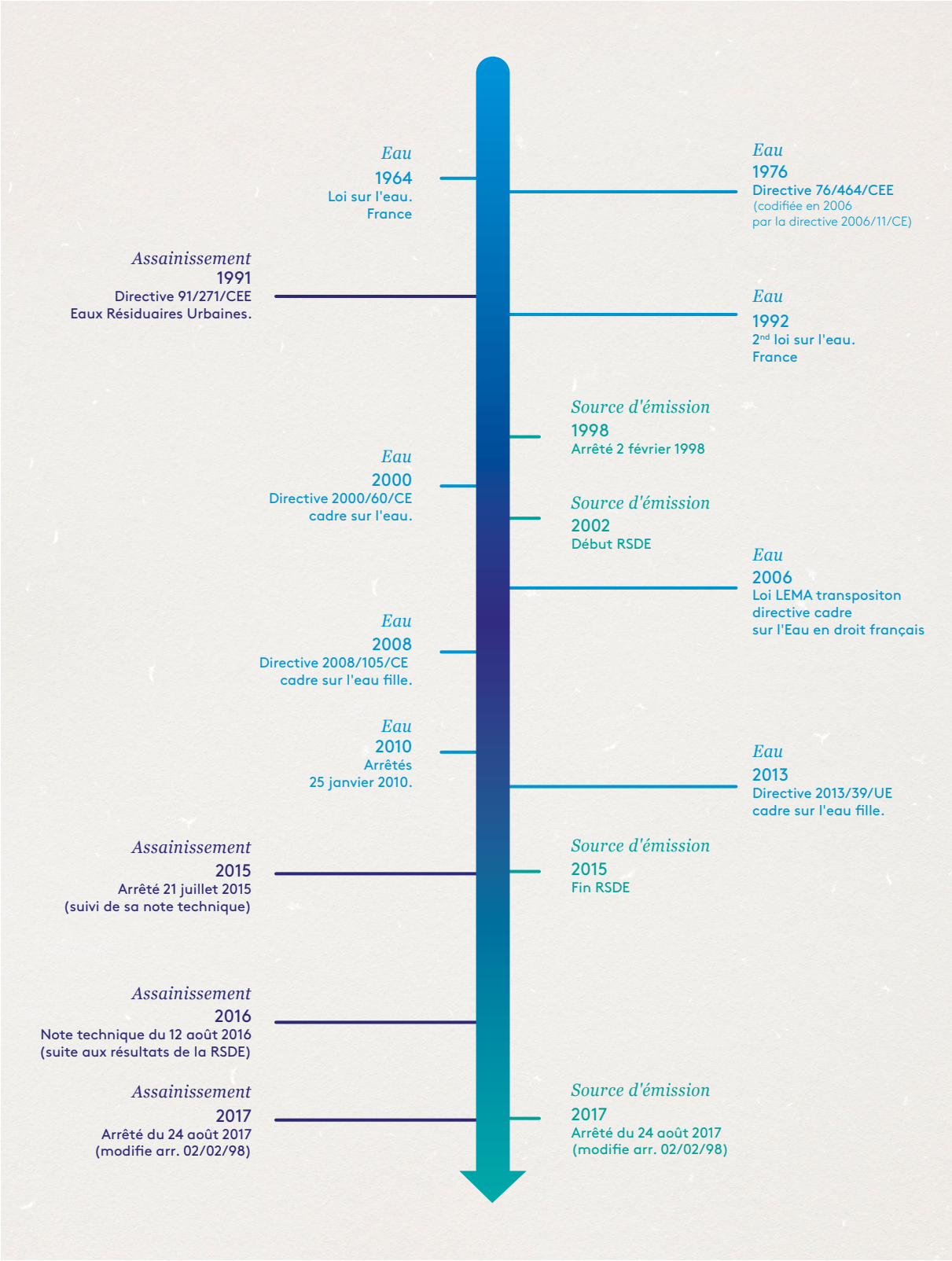


Figure I-4. *Chronologie de l'avènement de la réglementation de la protection des milieux au travers de trois secteurs ; l'eau, l'assainissement et les sources d'émissions polluantes.*

A.2.1. L'Eau, patrimoine mondial à protéger

Initiative française dans la moitié du XXe siècle

La réglementation sur l'assainissement découle de la dégradation de l'état des cours d'eau dans les années 1960 avant la mise en place des stations d'épuration à grande échelle. La France a instauré le principe « pollueur-payeur » et a promulgué sa première **loi sur l'Eau le 16 décembre 1964** (n° 64-1245) fondant la gestion de l'eau à l'échelle des grands bassins hydrographiques (Artois-Picardie, Seine-Normandie, Loire-Bretagne, Rhin-Meuse, Adour-Garonne et Rhône-Méditerranée-Corse). C'est la création des agences de l'eau en charge de coordonner les actions et d'aider l'ensemble des acteurs de l'eau. Une **seconde loi, de 1992** (n° 92-3), reconnaît officiellement « l'Eau » comme patrimoine de la nation et apporte des mesures de protection étendues à tous les types d'eaux sur son territoire. C'est également la mise en place de plans de gestions (toujours d'actualité) nommés *schémas directeurs d'aménagement et de gestion des eaux* (SDAGE). En fonction des grands bassins hydrographiques, les SDAGE prévoient des schémas d'aménagement et de gestion des eaux (SAGE) à un niveau plus local selon les besoins et ainsi facilitent la gestion sur l'ensemble du territoire français.

La directive cadre sur l'eau et ses directives filles

L'Europe a adopté la **Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE** (DCE) le 23 octobre 2000 qui fut inspirée du système de gestion français et transposée en droit français par la **loi sur l'eau et les milieux aquatiques (LEMA) en 2006**. Le but est de structurer et de restituer la qualité des cours d'eau à l'échelle de son territoire pour l'année 2015. Trente-trois substances sont listées à l'annexe X de la DCE comme substances prioritaires dont treize affichées comme dangereuses prioritaires (ex. mercure, benzo(a)pyrène, nonylphénol...). En 2008 et 2013 les **directives filles 2008/105/CE et 2013/39/UE** viennent compléter la directive mère. S'ajoutent alors de nouvelles substances dont certaines déjà identifiées précédemment dans la **directive 2006/11/CE** *concernant la pollution causée par certaines substances dangereuses déversées dans le milieu aquatique de la Communauté*. Sont également mises à jour les normes de qualité environnementale (NQE), des valeurs seuils visant à protéger l'intégrité des écosystèmes aquatiques et le « bon état chimique » des masses d'eau. Un volet sur la santé des écosystèmes a été ajouté afin de prendre en compte l'état de santé écologique (encadré). Les objectifs de réduction ou de

suppression des substances visées par la DCE et autres directives s'étendent de 2021 à 2033.

> *Évaluation de l'état de santé des masses d'eau : L'Europe a créé au travers de ses directives, des systèmes de mesures afin d'évaluer l'état de santé de ses masses d'eau. On peut distinguer l'état chimique et l'état écologique qui permettent d'évaluer l'état de santé général d'une masse d'eau de surface. Concernant les eaux souterraines cela diffère, c'est un état quantitatif qui est évalué. 1) L'état chimique est évalué par la présence de substances ciblées par l'annexe X de la DCE dont les concentrations se doivent de respecter les NQE. Si une seule de ces substances dépasse sa valeur seuil alors l'état du cours d'eau sera déclassé et considéré comme « pas bon ». Dans le cas inverse, l'état chimique est dit « bon ». 2) L'état écologique consiste à évaluer la biodiversité d'un milieu ainsi que des paramètres physico-chimiques et hydromorphologiques dans l'objectif d'attribuer une note sur cinq à chacun, variant du très bon, bon, moyen, médiocre au mauvais état. Le déclassement se fait par rapport à la moins bonne note qui représentera alors la note finale du cours d'eau étudié. Les NQE sont également prise en compte dans cette notation.*

La lutte contre les pollutions

L'une des premières directives émises pour la lutte contre les polluants fut celle de 1976 **(76/464/CEE)**. Elle établit des dispositions à prendre afin de réduire les concentrations et conduire à l'élimination de certaines substances classées dangereuses répertoriées dans les listes I et II de ladite directive. En 2006, elle est codifiée par la **directive 2006/11/CE** permettant d'actualiser et d'unifier certains textes dans un souci de clarté pour appliquer les mesures initiales de réduction en accord avec les autres textes.

Afin d'assurer la transposition en droit national des directives communautaires, **l'arrêté du 2 février 1998** permet l'encadrement des rejets des installations classées pour l'environnement (ICPE). Leurs rejets sont soumis à autorisation et doivent être contrôlés afin d'améliorer la qualité des eaux traitées en sortie de STEU et des boues d'épuration. Ainsi, des valeurs limites d'émission dans le réseau d'assainissement (VLE) ont été mises en place et concernent un certain nombre de paramètres physico-chimiques et de substances dangereuses. Cet arrêté a récemment été modifié par **l'arrêté du 24 août 2017** suite aux résultats de l'action RSDE (Recherche de Substances Dangereuses dans l'Eau). L'objectif de ce plan national était d'améliorer les connaissances sur la présence de polluants en sortie de STEU et ceux visés par les différentes directives, et ainsi mettre à jour les valeurs limites d'émissions et les listes de substances à rechercher dans l'eau en cohérence avec ce qui est trouvé au niveau des STEU.

Enfin les **deux arrêtés du 25 janvier 2010** : l'un, permettant l'établissement *du programme de surveillance de l'état des eaux en application de l'article R. 212-22 du code de l'environnement* en fonction du SDAGE 2009-2015, définit les substances spécifiques de l'état écologique (PSEE) et l'autre, *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,* permet de lister les normes de qualité environnementale des PSEE en indiquant les règles d'attribution de l'état des cours d'eau. Tous deux seront modifiés par la suite avec l'évolution du SDAGE 2016-2021.

Plusieurs plans nationaux ont été mis en place (RSDE, ECOPHYTO, polychlorobiphényles (PCB), micropolluants...) concernant diverses substances comme les résidus médicamenteux (plan 2010-2015). En effet, la France fait partie des plus gros consommateurs mondiaux de médicaments – en position 4 selon le ministère de la Transition écologique et solidaire – et cette surconsommation a fait s'interroger la communauté scientifique sur le risque de ces résidus dans l'eau. Les données accumulées au cours des années ont permis l'émergence du nouveau plan « micropolluants 2016-2021 ». Un des objectifs généraux des plans nationaux est de rassembler des informations sur la présence et la toxicité des molécules recherchées afin de hiérarchiser et prioriser les actions sur les plus préoccupantes. Il demeure impossible de lutter contre toutes à la fois. Par exemple, les résidus médicamenteux, très médiatisés à l'instar des perturbateurs endocriniens, ne sont pas encore réglementés dans les eaux usées. Une étude a montré que les métaux lourds présentent un risque plus élevé que certaines de ces substances (Zhou et al., 2019). De plus, ils restent dépendants des pratiques sociales (prescriptions, consommations...). Mais il existe une liste de vigilance européenne concernant des composés tels que le diclofénac et des hormones (ex. œstradiol et ses dérivés) à surveiller dans les eaux de surface en raison de leurs effets toxiques (décision d'exécution (UE) 2015/495 de la commission).

Complément sur le réseau d'observatoire SOERE URBIS

C'est grâce à la connaissance de la présence et des effets des polluants que la réglementation est en perpétuelle évolution et se tient à jour. Pour cela des observatoires de pollutions dans les eaux urbaines, incluant les eaux usées, travaillent régulièrement sur les substances à suivre actuellement et les substances futures à rechercher à l'amont des milieux récepteurs. Le réseau SOERE URBIS (système d'observation et d'expérimentation sur le long terme en environnement urbain centré sur l'hydrologie) est composé de trois

observatoires : l'OPUR (observatoire des polluants urbains à Paris), l'OTHU (observatoire de terrain en hydrologie urbaine à Lyon) et l'ONEVU (observatoire nantais des environnements urbains). L'objectif de ce réseau est d'étudier et de rassembler des données sur les micropolluants dans les matrices urbaines (certaines parfois peu étudiées) et d'aider à la prise de décisions dans la recherche de ceux-ci. De nombreux travaux ont ainsi été publiés aidant la communauté scientifique et les acteurs de l'eau à comprendre les phénomènes de transfert des micropolluants dans les matrices urbaines et lesquels sont prioritaires.

A.2.2. Réglementation propre aux systèmes d'assainissement

En accord avec les principes de protection de l'environnement et les précédentes directives, **la directive européenne du 21 mai 1991 (91/271/CEE)** oblige les agglomérations à traiter leurs eaux usées avant de les restituer au milieu récepteur. En fonction de la taille des agglomérations, l'équivalent-habitant (EH) permettra une adaptation des traitements des eaux résiduaires au sein des STEU. Les bases de l'assainissement sont posées. À la suite de cette directive, un certain nombre de textes sont transposés en droit français touchant également l'eau potable et sa distribution. C'est avec l'arrêté de juin 2007, modifié et amélioré en 2015, qu'un réel changement s'opère. **L'arrêté du 21 juillet 2015** *relatif aux systèmes d'assainissement collectif et aux installations d'assainissement non collectif (ANC), à l'exception des installations ANC recevant une charge brute de pollution organique ≤ à 1,2 kg/j de DBO5*, concerne toutes les branches de l'assainissement de la collecte à l'épuration. Il fixe des prescriptions techniques et oblige l'autosurveillance des installations avec transmission des résultats aux autorités compétentes(prescriptions et dispositions reprises dans la note technique du 7 septembre 2015). Les maîtres d'ouvrage sont désormais responsables de la potentielle détérioration du milieu récepteur et seront dans l'obligation d'enquêter sur les sources en cas de pollution à la STEU. De plus, les rejets industriels dans le réseau d'assainissement peuvent faire l'objet d'une surveillance plus stricte en raison du risque élevé pour l'environnement de certaines activités. Cet arrêté fixe aussi les performances minimales des traitements de la macropollution des stations d'épuration.

Enfin, la **note technique du 12 août 2016** *relative à la recherche de micropolluants dans les eaux brutes et dans les eaux usées traitées de stations de traitement des eaux usées et à leur réduction* prescrit les modalités à suivre dans le cadre, désormais obligatoire, de la recherche des polluants à la source. Cela implique

qu'en fonction des résultats de la phase de recherche à la STEU, les maîtres d'ouvrage des réseaux d'assainissement sont dans l'obligation de rechercher les molécules concernées, réfléchir à leurs origines et proposer une solution de réduction de ces dernières dans la mesure du possible. Cette seconde phase de recherche est nommée **diagnostic amont** en référence à la recherche de substances à l'amont de la STEU. Cette note technique découle notamment des résultats de plusieurs plans nationaux comme le plan RSDE. Avec les futurs résultats du nouveau plan micropolluants, cette liste sera probablement amenée à être modifiée. Aujourd'hui ce sont 96 substances qui sont recherchées dans les systèmes d'assainissement comprenant pesticides, COHV, métaux, PCB, alkylphénols et autres.

A l'échelle communale

Avec la création d'un cadre réglementaire concernant l'obligation de collecte des eaux usées, le code de la santé publique a instauré l'article L1331-10 concernant l'autorisation de déversement des eaux usées dans le réseau d'assainissement. Elle est acquise de droit pour les particuliers, mais pour les professionnels, en fonction de l'activité déclarée, elle peut faire l'objet de restriction ou bien d'une demande de prétraitement des eaux usées si elles présentent un risque pour le système de collecte ou de traitement. Cette autorisation est obligatoire pour se raccorder au réseau d'assainissement et est délivrée par le maire ou par un établissement public ou syndicat comme le SIARP (cf. chapitre I – B.3).

Conclusion

La mise en œuvre des techniques d'assainissement est relativement récente, datant de moins d'un siècle bien que le concept soit plus ancien. Afin de garantir la sécurité sanitaire des personnes mais aussi de conserver la ressource en eau, l'hygiène des rues et le traitement des eaux usées sont devenus indispensables et même obligatoires à la fin du XX^{e} siècle. Ces dispositions ont permis de restaurer la qualité des cours d'eau et notamment de la Seine, qui jusque dans les années 1960, avait une qualité au plus bas (Rocher et Azimi, 2017). La montée en puissance de ces installations et l'amélioration des performances d'analyse et de traitement ont contribué à la réduction de plusieurs polluants chimiques de l'eau mais également à la découverte de substances parfois dites « émergentes ». La mise à jour des données sur les listes réglementaires est donc indispensable tout comme l'apport de connaissances sur la présence de ces pollutions dans les différentes matrices urbaines. L'apport de micropolluants est constant au

cours du cycle de l'eau et les dysfonctionnements des réseaux d'assainissement (ex. inversions de branchements en séparatif, surverse unitaire…) sont autant de sources d'émission diffuses vers le milieu aquatique. Bien que les systèmes de traitement soient de plus en plus performants, il arrive que certains micropolluants soient transférés d'un compartiment terrestre à l'autre en raison de la réutilisation des sous-produits (ex. boues), ce qui ne constitue pas une méthode viable pour la préservation de l'environnement. Une autre solution, en plus de l'amélioration des traitements STEU, est la réduction des sources de pollutions à l'amont des systèmes de traitement. Bien que la réglementation oblige certaines démarches, elle n'impose aucune méthode ou analyse en raison du coût économique que cela représente pour certaines collectivités. Une limite se dessine entre la volonté de faire et la possibilité d'action pour les acteurs désireux de réaliser cette démarche et ne disposant pas de fonds supplémentaires dédiés.

B. Etat des connaissances des pollutions présentes dans les eaux usées

B.1. Origine et disponibilité de différentes familles de polluants

Aujourd'hui plus de 100 000 substances chimiques sont connues et répertoriées en Europe (European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances) et plusieurs millions de tonnes seraient produites chaque année. Il y a donc un grand nombre de substances dans l'environnement dont il est impossible de faire l'inventaire exhaustif. La priorité est de hiérarchiser ces recherches en se focalisant sur la capacité d'un polluant ciblé à induire des effets nocifs dépendant de sa toxicité intrinsèque mais aussi de sa présence et de sa concentration. Actuellement, ce sont environ 900 polluants agissant à faible concentration (micropolluants) qui sont ciblées par des programmes d'études en France et en Europe (Briand et al., 2018).

B.1.1. Toxicologie et devenir des polluants : concepts et problématiques

Une pollution, comme définie précédemment, est capable d'induire des effets nocifs sur un être vivant le menant à la mort dans les cas les plus graves. L'étude de ces effets relève du domaine de la toxicologie. Plus récemment, l'écotoxicologie étend cette définition au fonctionnement et à la structure des écosystèmes en raison de l'omniprésence des polluants dans notre environnement (Ramade, 2007). La révolu-

tion industrielle et agricole a eu pour conséquence l'utilisation massive de produits chimiques dans différents domaines d'exploitation (ex. textile, agro-alimentaire, médecine, métallurgie, artisanat, cosmétiques) et une large distribution de ces produits dans l'ensemble des compartiments terrestres (atmosphère, hydrosphère, géosphère, biosphère). Bien que les risques de toxicité aiguë soient souvent écartés grâce aux mesures réglementaires sur l'usage et la sécurité, les risques de toxicité chronique pour la faune et la flore demeurent, notamment en raison de la présence simultanée de centaines de substances chimiques dans les rivières (European Environment Agency, 2018; Ramade, 2007). Au cours de la vie d'un polluant, les interactions avec les êtres vivants et son environnement abiotique vont induire des changements dans sa toxicité (ex. (bio)dégradation, adsorption). Ainsi, les normes de qualité environnementale (NQE) et autres valeurs réglementaires par polluants tentent de protéger l'environnement. Elles sont calculées via l'évaluation du **risque écotoxique**, qui est fonction de l'**exposition** au polluant étudié et de la toxicité intrinsèque – **le danger** qu'il représente (Ineris, 2011). Ces valeurs permettent une limitation des substances dans l'environnement et sont proposées pour une substance à la fois ; il demeure le problème de la combinaison des polluants entre eux dans l'environnement et au sein même d'un organisme.

B.1.2. Sources et transferts dans le milieu aquatique

Pour réduire les sources d'émission, il est important de comprendre quels contributeurs participent à la dispersion de polluants et quels sont-ils. Les sources d'émission vers le milieu aquatique, l'hydrosphère, sont multiples et interconnectées avec les autres sphères terrestres : l'atmosphère, la géosphère et la biosphère (**Figure I-5**). Ces sources peuvent être chroniques impliquant de faibles concentrations déversées, ou accidentelles impliquant de fortes concentrations déversées. Le naufrage d'un cargo peut, par exemple, engendrer d'importants rejets d'hydrocarbures dans l'eau de telle façon qu'ils provoquent une toxicité aigüe sur les organismes aquatiques (marée noire).

L'un des contributeurs majeurs et réguliers de la pollution de l'eau est le déversement d'eaux usées brutes et traitées pouvant contenir des substances dangereuses (**Figure I-5**) (Caballero-Gallardo et al., 2016; Rogowska et al., 2019). Le type de pollution rejeté est fonction de l'origine des eaux usées et du traitement ou de l'absence de traitement (cf. chapitre I – A.1.2.2) ainsi que de la composition physico-chimique (cf. chapitre I – B.2.2).

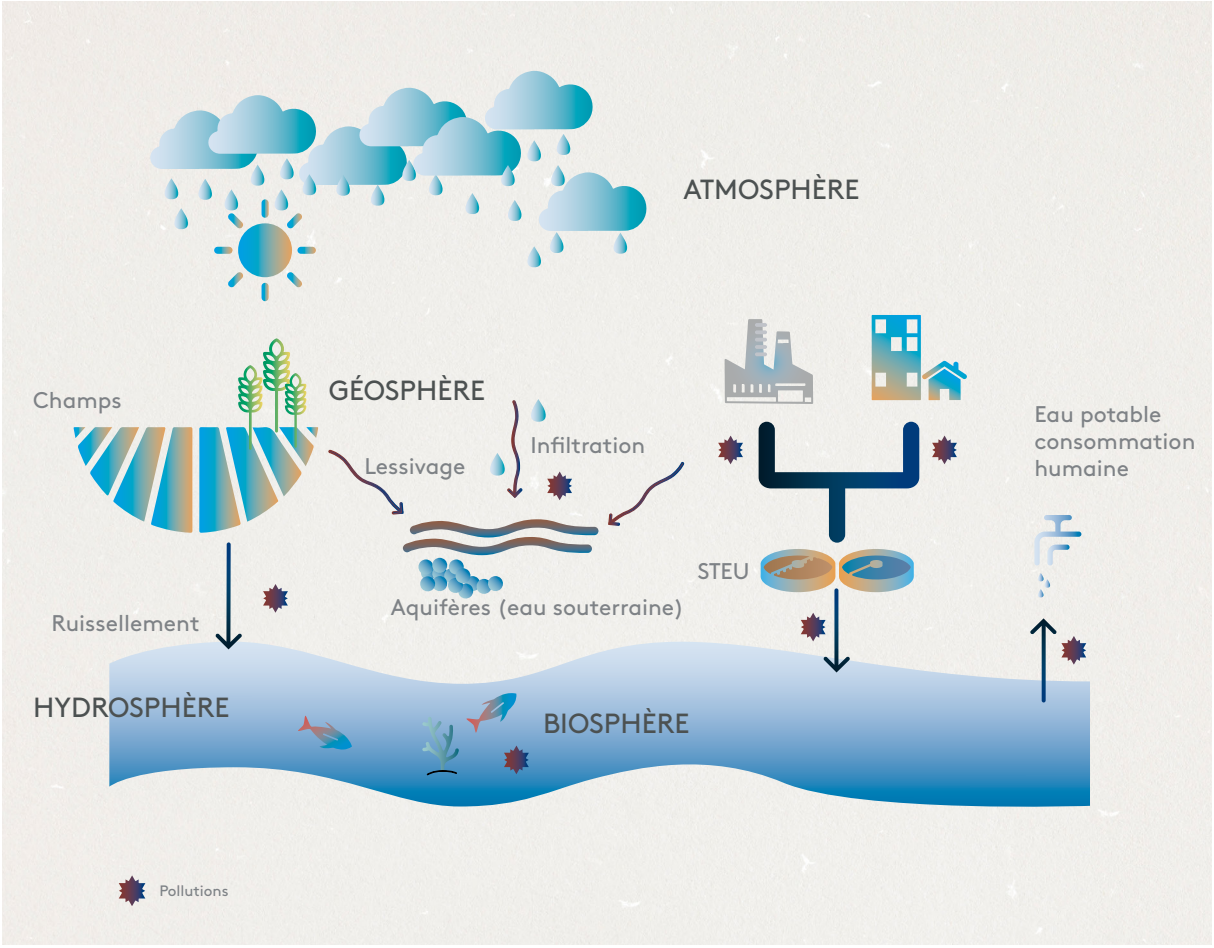


Figure I-5. *Sources et transferts des pollutions dans les différents compartiments terrestres (modifié et adapté de Caballero-Gallardo et al., 2016).*

Selon l'arrêté du 8 janvier 1998, les boues de station d'épuration doivent être détruites ou valorisées par incinération ou épandage. Potentiellement polluées, elles peuvent participer à la contamination de l'atmosphère et de la géosphère (**Figure I-5**). Ces compartiments terrestres communiquent avec l'hydrosphère. La pluie et les eaux de ruissellement vont entraîner les substances dans l'air (ex. hydrocarbures, nanoparticules, COHV, PCB) et en surface du sol ou des bâtiments (ex. métalloïdes et métaux, pesticides...) favorisant les transferts vers les eaux de surfaces. Tandis que les phénomènes d'infiltration et de lessivage vont permettre à certaines substances comme les pesticides de rejoindre les eaux souterraines (**Figure I-5**) (Pal et al., 2014). Les familles de polluants retrouvées sont aussi variées qu'il existe de sources d'émission de ceux-ci. Les pollutions peuvent être inorganiques (ex. métaux) ou organiques (ex. hydrocarbures) (Yves Perrodin, 2013). Il y a également les polluants dit émergents – phtalates, parabènes ou divers composés pharmaceutiques – que l'on recherche désormais en raison de leur dangerosité et que l'on arrive à détecter via l'avancée technologique (chimie analytique et seuil de détection plus bas).

En fonction de leurs propriétés physico-chimiques, les polluants sont présents sous formes dissoutes ou particulaires, adsorbés sur matières solides. Ainsi un même composé pourra prendre différentes formes au cours de sa vie (ex. solide, liquide, ionique, complexée…). Ces propriétés déterminent la capacité et la vitesse de transfert dans les différents compartiments terrestres. L'eau est par définition un liquide polarisé. Les composés chargés peuvent échanger des charges avec les molécules d'eau et seront plus facilement solubilisés tandis que les composés non chargés le seront bien plus difficilement. En conséquence les composés non chargés formeront le plus souvent des couches lipidiques dans l'eau due au caractère hydrophobe (Tanford, 1980). Afin d'évaluer quel comportement pourrait adopter un polluant, en plus de modèles de transferts, plusieurs indices et coefficients ont été calculés pour tenter d'anticiper leur dispersion. Le caractère hydrophobe/soluble d'un composé peut être évalué par le logarithme du coefficient de partage n-octanol/eau ($LogK_{ow}$) et de sa solubilité dans l'eau. De façon générale, les valeurs de ces indices sont inversement proportionnelles. Plus le $LogK_{ow}$ sera élevé plus sa solubilité dans l'eau sera faible car la substance sera préférentiellement hydrophobe (Voutsas, 2007). D'autres informations peuvent être prises en compte comme la capacité d'adsorption, la biodégradabilité ou encore la volatilité. Le **tableau I-1** donne certaines de ces propriétés physico-chimiques de représentants de familles de polluants présents dans l'eau. Il est également important de prendre en compte la spéciation (forme structurale et chimique) ; par exemple le cadmium sous sa forme naturelle est insoluble dans l'eau mais le devient fortement sous forme de sels (CdCl2) (**Tableau I-1**). En fonction des propriétés inhérentes à cette forme, un composé sera transporté sur des distances plus ou moins longues (Walker et al., 2012). En général, plus le transport est long et plus la concentration de ce polluant diminue. Les pollutions dissoutes peuvent être transportées relativement loin de l'exutoire. Les polluants peuvent se répandre dans toute l'hydrosphère sans être pour autant (bio)dégradés (polluants persistants). En revanche, les polluants adsorbés sur les matières en suspension auront tendance à sédimenter près de l'endroit où ils ont été déversés en fonction de la taille des agrégats (Walker et al., 2012), si ces matières ne sont pas emportées par les courants. Dans le cas où les polluants atteignent l'eau et les nappes phréatiques, sources d'approvisionnement en eau potable pour l'Homme (**Figure I-5**), des répercussions sur la santé peuvent être occasionnées (Focazio et al., 2008). En subissant ces phases de transfert, les polluants non persistants sont dégradés de façon biotique ou abiotique pour certains (**Tableau I-1**). Cela a pour conséquence la création de nouveaux composés, les métabolites, issus de la substance mère pouvant être parfois plus toxiques.

Famille	Composé	Masse Molaire (g/mol)	Solubilité (mg/L)	Log Kow	Bioaccumulation	Adsoprtion	Biodégradation
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)	Benzo(a)pyrène	252,3	$3*10^{-3}$	5,8-6,7	+++	++++	++
Bisphénols	Bisphénol A	229,5	300	3,4	+	+++	++++
Métaux et métalloïdes	Cadmium (Cd)	112,4	insoluble	-	++++	+++	-
Métaux et métalloïdes	Chlorure de cadmium (CdCl2)	183,3	$1,4*10^{6}$	-	++++	+++	-
Métaux et métalloïdes	Chlorure de methyl mercure (Ch3HgCl)	251,1	$6*10^{3}$	0,39	++++	++	+
Phtalates	DEHP	390,6	$3*10^{-3}$	7,5	+++	++++	++
Composés pharmaceutiques	Diclofénac	296,148	2,37-4,52	4,02-4,51	+ Peu de données	++++	+++
Pesticides	Glyphosate	169	$1,05*10^{4}$	-3,2	+	++++	++
Composés pharmaceutiques	Ibuprofène	206,29	21	3,97	+ Peu de données	+++	+
Métaux et métalloïdes	Mercure	200,59	$56*10^{-3}$	-	++++	+++	-
Composés pharmaceutiques	Methyl-parabène	152,5	$2*10^{3}$	1,96	+ Peu de données	++	+++
Alkylphénols	Nonylphénol (4-nonylphénol)	220,34	6	4,48-5,76	++	+++	++

Tableau I-1. *Propriétés physico-chimiques de polluants présents dans l'eau. Plusieurs propriétés de polluants sont données dans ce tableau, indiquant leur capacité à se solubiliser ou encore à se biodégrader. Pour les paramètres bioaccumulation, adsorption et biodégradation, des symboles permettent de se rendre compte de la capacité de chacun des polluants à se bioaccumuler, s'adsorber et se biodégrader. Les symboles correspondent aux valeurs moyennes des facteurs de bioaccumulation calculés sur des espèces de niveaux trophiques différents (algues, bilvalves, crustacés, poissons, autres invertébrés comme les insectes), des coefficients de partage carbone organique/eau qui permettent de rendre compte de la capacité du polluant à s'adsorber sur la matière organique et du temps que reste le polluant dans l'eau. (AESN-Aquascop, 2018; Bisson et al., 2011, 2006; Briand et al., 2018; Diderich et al., 2010; Ellis et al., 2013; Gouzy, 2012a, 2012b; Tissier et al., 2005).*
- : non concerné ; + : négligeable ; ++ : faible ; +++ : moyen ; ++++ : fort.

B.1.3. Effets sur la biosphère

La conséquence de la contamination des compartiments terrestres est le transfert vers le compartiment biotique ou biosphère (**Figure I-5**). Ce transfert est évidemment dépendant des propriétés physico-chimiques citées précédemment et

de la forme des composés. Si l'exposition à un composé est avérée, le risque n'est pas nécessairement élevé mais dépend de la dangerosité de celui-ci. Souvent des doses (quantités) et concentrations sont calculées pour évaluer la dangerosité d'une substance. Par exemple, il est souvent calculé la dose ou concentration létale pour 50% des individus de la population étudiée (DL50 ou CL50). La DL50 ou la CL50 entraîne la mortalité de la moitié d'une population. D'autres indicateurs comme la concentration sans effets observés (NOEC) ou encore la concentration prédite sans effets (PNEC) peuvent être calculés. Ces valeurs permettent d'estimer si une substance est toxique et à quelle concentration ou dose. Ainsi, la connaissance de ces valeurs permet de mettre en place les normes de qualité pour la protection de l'environnement.

Tel que l'indique F. Ramade dans son ouvrage, la concentration d'un micropolluant dans l'environnement ne présente pas de signification écotoxicologique (Ramade, 2007). Seule la fraction dite biodisponible, fraction partielle ou totale du micropolluant, peut expliquer que la substance est toxique ou non pour un organisme exposé. Un polluant est dit biodisponible s'il est capable d'être absorbé et agit sur un organisme vivant (Ramade, 2007). Après absorption, un polluant peut être biotransformé ou stocké dans différents organes et tissus (ex. foie, tissus adipeux, muscles, os, cerveau) (Shin et al., 2016). En fonction de la voie d'entrée dans l'organisme (tégumentaire, respiratoire ou digestive), le polluant est transporté par le système circulatoire – le sang, la lymphe ou l'hémolymphe selon si l'on étudie un vertébré ou un invertébré. Que ce soit chez les vertébrés, invertébrés mais aussi chez les plantes et les microorganismes, les mêmes classes d'enzymes exprimées différemment en fonction des espèces et des organes interviennent dans la biotransformation (Feyereisen, 1999). Les cytochromes P450 et les carboxylestérases sont les premières enzymes permettant la détoxication de xénobiotiques. Elles ont pour rôle d'inactiver la substance par oxydation menant à la création de métabolites primaires davantage polaires que la substance mère, c'est la phase I (Shin et al., 2016). Ces complexes enzymatiques se situent dans le réticulum endoplasmique des cellules animales, principalement dans le foie et les reins chez les vertébrés, et dans l'hépatopancréas, le corps gras, le tube digestif et les tubules de Malpighi chez les invertébrés (Shin et al., 2016; Walker et al., 2012). L'objectif est de rendre la substance hydrophile pour en facili-

Les phases de détoxication peuvent parfois former des composés plus réactifs et toxiques. Un exemple bien connu est celui du benzo(a)pyrène. Lorsque cet hydrocarbure est métabolisé, des diols-époxydes causent du stress oxydatif et peuvent mener à de la mutagénicité et à terme de la cancérogénicité dues aux adduits d'ADN (Miller et Ramos, 2001).

ter son excrétion par les reins/tubules de Malpighi. La phase II de la détoxication permet de conjuguer les métabolites primaires avec des substrats hydrophiles. Les enzymes qui interviennent dans ces processus sont les glutathion S-transférases (GST), les glucuronosyltransférases (UGT) et autres localisées généralement dans le cytosol des cellules animales (Haubruge et Amichot, 1998; Walker et al., 2012). Les produits de dégradation peuvent être excrétés de la cellule par voie passive ou à l'aide de transporteurs membranaires ATP-dépendants tels que les transporteurs ABC (Sharom, 1997). A l'échelle de l'organisme, ils sont évacués dans les urines, les fèces, la bile, la transpiration... Mais selon sa forme (initiale ou métabolite), un xénobiotique peut aussi être transporté vers différents tissus pour y être stocké et se bioaccumuler (Streit, 1992). La capacité d'un polluant à se bioaccumuler n'est pas la même en fonction de ses propriétés physico-chimiques (ex. caractère hydrophobe, **Tableau I-1**). Les sites de stockage sont très variés entre individus et espèces ; le foie, les muscles, les os, la peau, le tube digestif, les tissus adipeux ou même le cerveau en font partie (MacKay et Fraser, 2000; Rabitsch, 1997; Vizuete et al., 2019). La bioconcentration fait que le polluant peut être transféré vers des niveaux trophiques supérieurs via la prédation (Qiu et al., 2017; Ren et al., 2017). Un polluant amené à se bioconcentrer peut redevenir biodisponible pour l'organisme dans certains cas. De ce fait, une toxicité retardée due à un relargage postérieur à l'exposition lors de la mobilisation de ressource comme le tissu adipeux peut être observée, à l'instar d'intoxications secondaires des prédateurs (Azevedo-Pereira et al., 2012; Qiu et al., 2017; Zhang et al., 2016).

Ce parcours que subit un polluant à travers l'organisme jusqu'à l'excrétion est la toxicocinétique. La toxicocinétique est un facteur déterminant dans l'évaluation du danger d'une substance et permet de savoir si cette substance atteint sa cible, sous quelle forme et à quelle concentration. Ces mécanismes n'agissent pas à la même vitesse selon un polluant, lui conférant un temps de demi-vie plus ou moins long dans l'organisme.

B.1.4. Types de toxicité observés

Une fois absorbé, chaque xénobiotique a sa propre toxicodynamique et ainsi déclenche une réponse toxique qui dépend de la façon par laquelle il est métabolisé ou bioaccumulé. Un polluant peut induire chez un même organisme des réponses à plusieurs niveaux – moléculaire, cellulaire, organisme entier. C'est le cas en particulier des micropolluants qui agissent à des doses dites sublétales. Ils ne provoquent pas la mort mais sont susceptibles de modifier la physiologie d'un individu voire même son écologie

à long terme (Ramade, 2007). Ainsi, plusieurs types de perturbations ont été observés à différentes échelles de l'organisme dont certaines sont irréversibles (ex. malformations) :

Au niveau moléculaire et cellulaire

- Modifications de l'ADN, formation d'adduits, mutations (Doganlar et al., 2014; Kier et Kirkland, 2013; Rencüzoğulları et Aydın, 2019)
- Modulations de l'expression de gènes impliqués dans la régulation du stress et des mécanismes de défense (Herrero et al., 2017; Zhang et al., 2015)
- Modulations de l'activité d'enzymes de défenses et neuronales (Gunderson et al., 2018; Le Goff et al., 2006)
- Modulations d'acteurs du métabolisme (Aviles et al., 2019; Beauvais-flück et al., 2017)
- Imitations et interférences avec les messagers des systèmes endocriniens et reproducteurs (Dziewirska et al., 2018; Kabir et al., 2015; Rana, 2014)
- Effets sur le recrutement de cellules immunocompétentes (Borowska et Pyza, 2011; Mokarizadeh et al., 2015)

Au niveau des tissus et organes

- Modifications histologiques et effets sur le poids et la taille des organes (Gao et al., 2017; Kontogiannatos et al., 2015; Sheweita et al., 2016)

Au niveau de l'organisme entier

- Troubles du développement (Rice et al., 2014; Schmidt et al., 1992)
- Troubles du comportement locomoteur et reproducteur (Chen et al., 2018; Dickerson et Gore, 2007)
- Troubles de la reproduction (Cervera et al., 2004; Overturf et al., 2015)
- Malformations (Foster et al., 2016; Planelló et al., 2013)

Les mécanismes de défense induits à la suite d'une exposition servent en général à lutter contre le xénobiotique et limiter son impact. Mais dans certains cas, ces mécanismes peuvent augmenter la toxicité de ce dernier. Les acteurs moléculaires, cellulaires et les observations à l'échelle de l'organisme entier peuvent servir de marqueurs de cette toxicité.

Les tests de toxicité sont le plus souvent réalisés dans des conditions contrôlées dans le cadre de mono-exposition. Les êtres vivants sont confrontés à pléthore de substances présentes simultanément et pouvant avoir des interactions entre elles (effets cocktails). Ces interactions peuvent induire des effets additifs (somme) mais parfois des effets synergiques (potentialisation) ou antagonistes (inhibition). Un certain nombre d'articles, souvent récents, s'intéressent donc à la question de ces mélanges sur la santé humaine et environnementale (Carvalho et al., 2014; Hernández et al., 2017; Lee et al., 2017; Wu et al., 2016). En fonction des informations disponibles sur les effets des polluants seuls, les effets des mélanges peuvent être prévisibles (Kienzler et al., 2016; Kim et Kim, 2017). Mais le manque, voire l'absence de données peut compliquer cette tâche. Etudier les mélanges de polluants représente un vrai défi en raison du nombre illimité de conditions possibles à tester. Cela représente un temps et un coût économiquement non viable. Pourtant l'acquisition de connaissances est nécessaire pour aller plus loin et notamment prendre en compte les mélanges dans un contexte réglementaire. L'utilisation d'outils biologiques qui restent peu onéreux peut fournir des informations supplémentaires sur la complexité d'effets de mélanges, en particulier lorsque plusieurs niveaux d'organisation d'un organisme sont étudiés.

B.2. Caractéristiques et suivi des eaux usées

Une eau usée est une matrice différente des autres types d'eaux. Sa composition physico-chimique lui confère une signature reconnaissable. Cette signature peut servir à l'identification d'eaux usées et pluviales dans les réseaux séparatifs. Si une inversion de branchement entre les deux linéaires est suspectée, une analyse physico-chimique révélera la nature de l'eau. Généralement, ce profil peut être défini grâce à la demande chimique et biologique en oxygène (DCO et DBO_5), les matières en suspension totale (MES), l'azote et ses différentes formes (NTK) et le phosphore total. L'ensemble de ces paramètres est communément appelé « paramètres globaux » dans l'étude du suivi des eaux usées.

Paramètres globaux

DCO et DBO5 : la DCO donne la quantité d'oxygène nécessaire pour l'oxydation chimique des matières organiques et minérales. Elle offre un aperçu de la charge polluante de l'eau. Á la différence de la DCO, la DBO5 donne la quantité d'oxygène nécessaire aux organismes biologiques pour oxyder les matières organiques carbonées. Elle représente la partie biodégradable de l'effluent. Le rapport de ces deux paramètres permet d'évaluer si un effluent sera facilement biodégradable ou s'il nécessite un traitement oxydant particulier en STEU (une mauvaise biodégradabilité entraîne un traitement biologique difficile). Ces paramètres peuvent également donner une indication sur l'origine – un effluent industriel aura généralement une plus faible DBO5 et une plus forte DCO que les effluents domestiques. En sortie de station d'épuration, ces valeurs doivent être minimales pour éviter la formation de zones hypoxiques dans l'environnement aquatique.

MES : les matières en suspension favorisent la formation de zones hypoxiques mais contribue également aux transferts de polluants dans l'environnement via les phénomènes de sorption/désorption. Dans le réseau d'assainissement, elles peuvent causer des dommages matériels (ouvrage et exploitation).

NTK et phosphore total : l'azote total Kjeldahl, donne la quantité d'azote ammoniacal et organique dans l'eau. Dans les eaux usées, l'azote est un indicateur de l'origine domestique de l'effluent ou de contamination domestique dans les eaux usées industrielles. Le phosphore peut avoir diverses origines, domestique, industrielle ou agronomique. Ces éléments indispensables à la vie provoquent à forte concentration, l'eutrophisation des milieux. A l'instar de la DBO5 et DCO, l'azote et le phosphore peuvent avoir une incidence sur le traitement biologique des stations d'épuration.

Le **tableau I-2** donne un aperçu de l'étendue moyenne des concentrations de ces paramètres pour des eaux usées toutes origines confondues (Bergé et al., 2014; UNESCO, 2017; Zgheib, 2009) ainsi que les valeurs limites d'émission dans les eaux usées brutes (VLE) et les valeurs limites de rejets après traitement en STEU. La température d'un effluent ne doit pas excéder 30°C et le pH ne doit ni être trop acide ni trop basique. Pour rappel, ces valeurs ont été définies réglementairement dans plusieurs arrêtés (cf chapitre I – A.2.2).

Demande chimique en oxygène (DCO)	min	123,5
	med	423,0
	max	1758,5
	VLE	2000,0
	Rejet STEU	125,0
Demande biologique en oxygène (DBO_5)	min	30,1
	med	143,9
	max	997,4
	VLE	800,0
	Rejet STEU	25,0
Matières en suspension (MES)	min	41,0
	med	104,1
	max	1007,0
	VLE	600,0
	Rejet STEU	35,0
Azote total Kjedahl (NTK)	min	12,5
	med	35,6
	max	77,5
	VLE	150,0
	Rejet STEU	15,0
Phosphore total (Pt)	min	3,9
	med	7,0
	max	14,5
	VLE	50,0
	Rejet STEU	2,0

Tableau I-2. *Étendue des concentrations moyennes des paramètres globaux dans les eaux usées toutes origines confondues (domestiques et industrielles) et valeurs limites d'émission dans le réseau d'assainissement (VLE) et de rejets dans l'environnement par la STEU. Les VLE et les valeurs de rejets STEU doivent être respectées pour éviter la dégradation des ouvrages d'assainissement, des dysfonctionnements au niveau des processus d'épuration et des effets sur les écosystèmes aquatiques.*

La composition physico-chimique est grandement influencée par les secteurs économiques (ex. chimie, métallurgie, mécanique et lavage automobile, imprimerie, textile, pharmaceutique, cosmétiques). Certains secteurs économiques rejettent parfois des eaux usées atteignant des concentrations très élevées des paramètres globaux (DCO, DBO_5, matières en suspension, azote et phosphore) (Bergé et al., 2014). Ces valeurs sont imposées pour éviter la dégradation des ouvrages d'assainissement et des dysfonctionnements auto-épuratoires (population des microorganismes, baisse du rendement d'épuration). Les autorisations de déversement locales peuvent abaisser ou augmenter ces seuils en fonction de l'activité économique et de la problématique des effluents rejetés. Si les effluents rejetés par les industriels sont effectivement très polluants, des stations de prétraitements des eaux usées avant le déversement dans le réseau d'assainissement peuvent être construites pour en assurer une meilleure qualité.

B.2.1. Familles de polluants d'intérêt retrouvées dans les eaux usées : sources et effets

Il y a de nombreuses familles de polluants présentes dans les eaux usées. Dans cette sous-partie sont brièvement décrits les sources, effets toxiques de plusieurs de ces familles retrouvées dans les eaux usées, qui sont fortement suivies d'un point de vue réglementaire et qui ont fait l'objet d'études approfondies dans cette thèse (**Tableau I-3**).

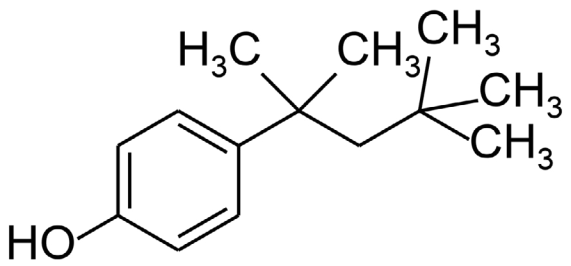
Famille	Représentants	Source	Toxicité
Alkylphénols	**Nonylphénol,** Octylphénol...	Anthropique procédés industriels, surfactants, détergents, pesticides, additifs...	Perturbateur endocrinien
Bisphénols	**Bisphénol A**, Bisphénol F, Bisphénol S...	Anthropique plastiques polycaronates et résines	Dose-réponse toxique non monotone, perturbateur endocrinien (agoniste des oestrogènes, dérèglement)
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)	Anthracène, **Benzo(a)pyrène**, Fluoranthène, Indeno(1 2 3-cd)pyrène, Napthalène...	Naturelle et Anthropique libérés par combustion (feux de forêt, industrie lourde, véhicules à moteur...)	Cancérogène, génotoxique, probalement tératogène, suspicion forte d'atteinte du système endocrinien
Métaux et métalloïdes	**Cadmium**, Cuivre, **Mercure**, Nickel, Plomb, Zinc...	Naturelle et Anthropique présents dans le fond géochimique terrestre, industrie chimique et électrique, exploitation minière, métallurgie, incinération de déchets, traitements de surface, engrais...	Létale, cancérogène, génotoxique, perturbateur endocrinien, trouble du développement, de la reproduction et du comportement
Pesticides	Cyperméthrine, DDT, **Glyphosate**, Imidaclopride...	Anthropique Utilisation agronomique, traitement de surface, traitement antiparasite des animaux domestiques	Létale selon l'organisme ciblé, cancérogène, perturbateur endocrinien potentiel, trouble du développement, de la reproduction et neurologique
Phtalates	Benzylbutyle, **Di(2-éthylhexyl)phtalate**, Di-isononyl phtalate, Phtalate de diisodécyl	Anthropique utilisation dans les matières plastiques, fluides diélectriques et insecticides	Probablement cancérogène, perturbateur endocrinien, reprotoxique

Tableau I-3. *Sources et effets toxiques notoires chez des espèces de vertébrés et d'invertébrés de familles de polluants présentes dans les eaux usées et encadrés dans la DCE (AESN-Aquascop, 2018;* Atli, 2013; *Aviles et al., 2019; Booc et al., 2014; Costa et al., 2008; Dziewirska et al., 2018;* Hirano et al., 2004; *Kabir et al., 2015; Lintelmann et al., 2003; Miyagawa et al., 2016a, 2016b; Mogren et Trumble, 2010; Mokarizadeh et al., 2015; Murata et Kang, 2018; Oberdörster et al., 1999;* Oetken et al., 2004; *Pal et al., 2014; Rana, 2014; Rice et al., 2014; Sheweita et al., 2016; Walker et al., 2012; Wu et al., 2016;* Yuan et al., 2013; *Zarean et al., 2016*).

Famille des alkylphénols

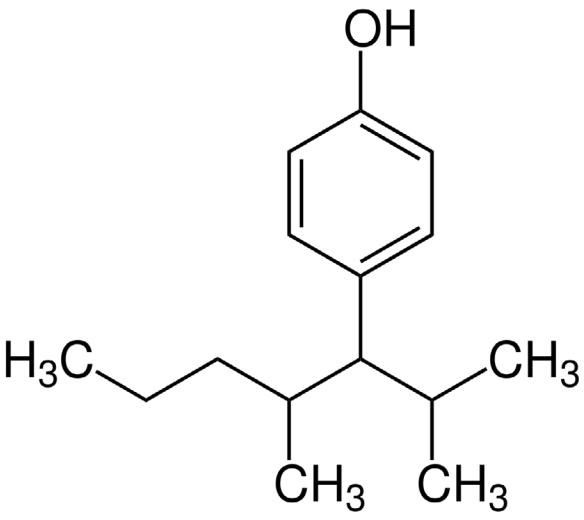
Les alkylphénols, comme leur nom l'indique, sont obtenus par alkylation de phénols et ne sont pas naturellement présents dans notre environnement. Ils sont utilisés dans la fabrication de tensioactifs, de détergents et résines ou encore de pesticides. Le nonyl- et l'octyl- phénol, les représentants les plus célèbres, sont fortement suivis dans les eaux en raison de leur toxicité et de leur persistance moyenne dans l'environnement. Ils sont issus de la dégradation des alkylphénols éthoxylés (APEO), les substances mères (Ying et al., 2002). Au niveau national, le nonylphénol fait partie des objectifs de réduction de 100% dans l'eau pour 2021. Les alkylphénols sont également suivis en tant que famille avec les APEO dans la note technique du 12 août 2016. La dégradation incomplète de ces composés, l'insuffisance ou l'absence de traitement au sein de la STEU représentent une importante source de déversement dans l'environnement (Ahel et al., 1994; Ying et al., 2002). Les alkylphénols sont peu solubles dans l'eau et auront tendance à s'adsorber et se bioaccumuler (AESN-Aquascop, 2018).

4-tert-octylphénol



Les alkylphénols sont connus pour induire des effets de perturbation endocrinienne chez les vertébrés ; ils sont capables de se lier au récepteur des œstrogènes et de mimer leurs actions – chez les mâles, cela peut engendrer l'apparition de caractère femelle (Miyagawa et al., 2016a, 2016b). Chez les invertébrés, de la mortalité peut être observée à forte dose et des perturbations physiologiques incluant le système reproducteur ont été montrées (Atli, 2013; Hirano et al., 2004; Oetken et al., 2004; Yuan et al., 2013).

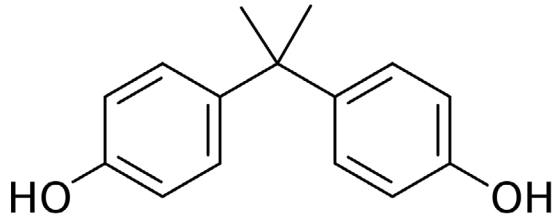
nonylphénol



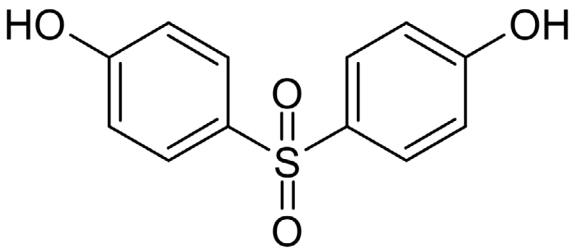
Famille des bisphénols

La famille des bisphénols est très médiatisée et reste controversée à l'heure actuelle. Les bisphénols sont des composés strictement anthropiques dont les formes sont parfois très proches chimiquement. Ils sont utilisés dans la fabrication de plastiques polycarbonates y compris les plastiques alimentaires et de résines (Murata et Kang, 2018; Rochester et Bolden, 2015). Le bisphénol A (BPA) est très souvent évoqué pour parler de cette famille même s'il existe d'autres composés comme le bisphénol F ou S – les informations toxicologiques sont manquantes sur ces autres formes. Bien que le BPA soit facilement biodégradable et métabolisable, il agit sur le système endocrinien des vertébrés et est capable de perturber certaines voies de signalisation entraînant réponses inflammatoires ou même obésité (AESN-Aquascop, 2018; Dziewirska et al., 2018; Kabir et al., 2015; Murata et Kang, 2018). Chez les invertébrés des effets sur le système reproducteur ont également été rapportés (Maria et al., 2019; Oetken et al., 2004).

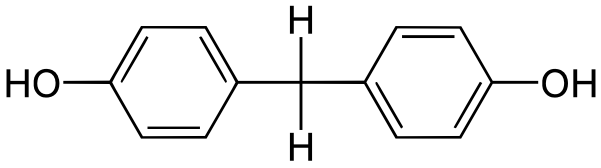
Bisphenol-A



Bisphenol-S



Bisphenol_F

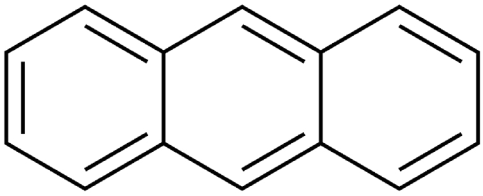


La toxicité du BPA est connue pour être non linéaire mais en forme de U ou U inversé ayant des effets à faibles ou moyennes concentrations chez les vertébrés comme invertébrés (Miyagawa et al., 2016c). Pour ces raisons et notamment sa présence dans les biberons, le BPA a été banni des plastiques alimentaires et fait l'objet de restrictions d'usage. Il peut cependant être remplacé par les composés S ou F dont on suspecte des effets similaires (Rochester et Bolden, 2015). Le BPA est retrouvé en sortie de station d'épuration et est présent dans les eaux usées brutes (Coquery et al., 2011; Deblonde et al., 2011; Sánchez-Avila et al., 2009). A ce jour, les bisphénols ne font pas partie des substances à suivre dans les eaux brutes selon la note technique du 12 août 2016.

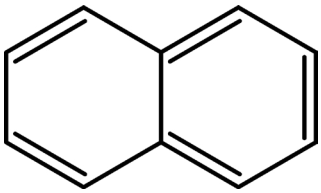
Famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques ou HAPs

Les HAPs existent sous forme solide ou liquide et comprennent dans leurs structures des cycles dit « aromatiques » du benzène. Cette spécificité fait de ces polluants des éléments difficilement biodégradables et bioaccumulables en raison de leur caractère hydrophobe (AESN-Aquascop, 2018). Parmi eux, huit représentants sont suivis par la DCE dont six sont classés comme substances prioritaires dangereuses tel que le benzo(a) pyrène reconnu comme traceur de la famille. Les HAPs sont présents naturellement dans les carburants fossiles et émis dans l'environnement via des combustions incomplètes (Alegbeleye et al., 2017). La présence de HAPs est fortement corrélée à l'industrialisation des villes et la densité de population (Kim et al., 2013; Piren-Seine, 2009). Ainsi, les véhicules à moteur, l'industrie pétrochimique ou encore la cigarette favorisent le relargage de ces molécules dans notre environnement. Les feux de forêts dans les régions fortement végétalisées représentent aussi une source significative (Alegbeleye et al., 2017).

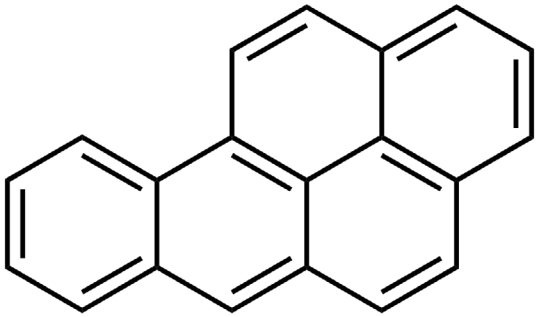
Anthracène



Naphthalène



Benzo(a)pyrène



Les HAPs sont omniprésents dans les eaux usées (Zgheib, 2009), en réseau séparatif comme en unitaire, la pluie représentant un apport non négligeable (Hwang et Foster, 2006). Les HAPs considérés comme très toxiques (ex. benzo(a)pyrène) font partie des objectifs de réduction nationaux de 30% à 100% pour 2021. Les HAPs sont classés par le CIRC comme probablement cancérogènes (selon le composé) et sont aussi mutagènes, génotoxiques et voire tératogènes (Kim et al., 2013; Vicentini et al., 2017). Des études ont montré leur capacité à interagir avec des composantes du système endocrinien y compris chez les invertébrés même si cela reste un phénomène moins observé (Booc et al., 2014; Oberdörster et al., 1999; Sheweita et al., 2016).

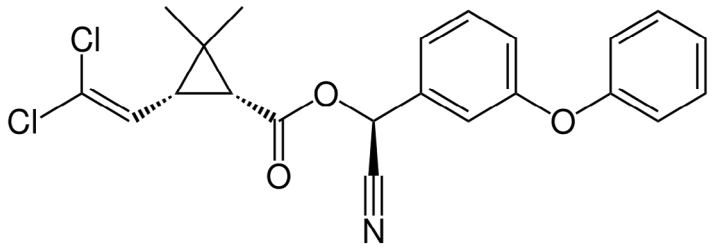
Famille des métaux et métalloïdes

Le fond géochimique de la planète contient naturellement des composés de cette famille. Ils peuvent être relargués vers l'eau et l'atmosphère lors d'événements tels que l'érosion ou les éruptions volcaniques (Vizuete et al., 2019; Wu et al., 2016) et sont, pour certains, indispensables à la vie comme le zinc, le magnésium et le fer (Walker et al., 2012; Zoroddu et al., 2019). L'exploitation minière, la fabrication d'alliages, l'industrie chimique et électrique, l'incinération des déchets ou même l'utilisation de certains engrais viennent à les concentrer dans notre environnement (UNESCO, 2017). Ils sont très souvent retrouvés dans les eaux usées industrielles mais aussi dans les rejets domestiques, unitaires et pluviaux(AESN-Aquascop, 2018; Coquery et al., 2011; UNESCO, 2017). Certains de ces composés s'adsorbent sur les matières en suspension et viennent à contaminer les boues d'épuration (Perron et Hébert, 2007). Pour les métaux non essentiel – cadmium, mercure, plomb et autres – des effets délétères ont été montrés. Ils provoquent entre autres, des troubles du développement, de la reproduction et du système endocrinien, de la génotoxicité, des dysfonctions neurologiques et des modifications comportementales chez les deux grands clades vertébrés/invertébrés (Mogren et Trumble, 2010; Oetken et al., 2004; Rana, 2014; Rice et al., 2014; Wu et al., 2016).

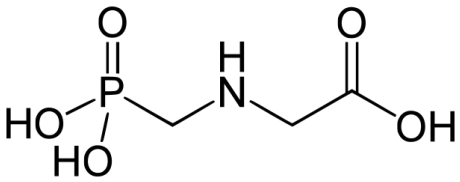
Famille des pesticides

Cette famille désigne un ensemble de polluants dont la particularité est de lutter contre des organismes nuisibles que ce soient des invertébrés, des rodentiens, des végétaux ou des champignons. Ils ont principalement une utilisation agronomique, qu'elle soit uniquement professionnelle ou quotidienne en accord avec les restrictions d'usage (ex. traitement antiparasitaire des animaux domestiques, produits d'entretien...) (Costa et al., 2008; Pal et al., 2014; Walker et al., 2012). De nombreux pesticides sont retrouvés dans les eaux de ruissellement et malgré ces principales sources normalement lointaines aux eaux usées, ils y sont fréquemment mesurés (Coquery et al., 2011; Westlund et Yargeau, 2017), probablement en raison d'un usage urbain, quotidien et des non-respects d'usage. Ils ont donc une grande diversité au niveau de leurs structures et de leurs actions, et beaucoup d'entre eux font polémique tant sur leurs cibles que sur leurs emplois.

Cyperméthrine

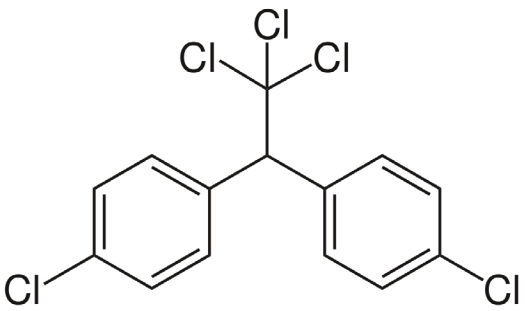


Glyphosate

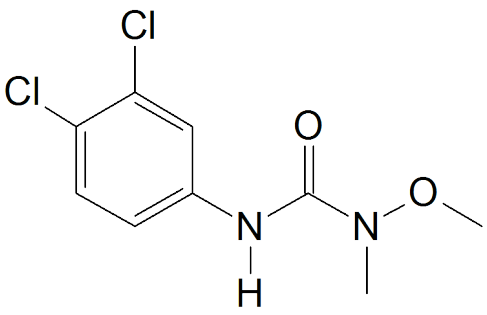


Par exemple, les insecticides utilisés en très grande quantité sur les cultures favorisent le développement de résistances chez les insectes face aux substances actives (ex. cyperméthrine, imidaclopride). De plus, ils ciblent trop largement différents ordres d'insectes incluant les pollinisateurs (Haubruge et Amichot, 1998; Walker et al., 2012). D'autres pesticides sont très médiatisés comme le glyphosate qui est largement produit et utilisé à travers le monde (Gill et al., 2017). Son utilisation est aujourd'hui restreinte en France dans les espaces verts publics (depuis 2017) et chez les particuliers (depuis 2019). Cet herbicide non sélectif fait débat en raison de son utilisation massive et des effets néfastes suspectés sur l'Homme puisqu'il est classé probablement cancérogène par le CIRC. Selon leurs structures, les pesticides soulèvent de nombreuses questions quant à leur devenir dans l'environnement. Nombre d'entre eux sont très persistants et peuvent se bioaccumuler et se bioamplifier dans le réseau trophique (AESN-Aquascop, 2018; Qiu et al., 2017). Les pesticides sont donc très toxiques pour les espèces cibles mais peuvent aussi induire chez les espèces non cibles vertébrés/invertébrés des perturbations endocriniennes, des risques de cancers, des dérèglements du système immunitaire avec allergies, des troubles du développement, de la reproduction et neurologiques (AESN-Aquascop, 2018; Costa et al., 2008; Lintelmann et al., 2003; Mokarizadeh et al., 2015; Oetken et al., 2004).

DDT

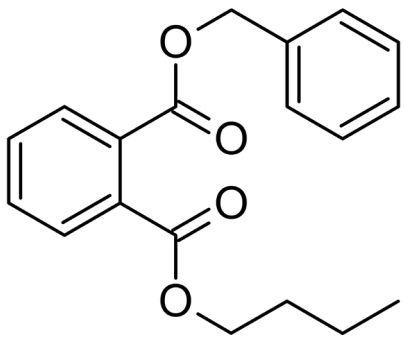


Linuron



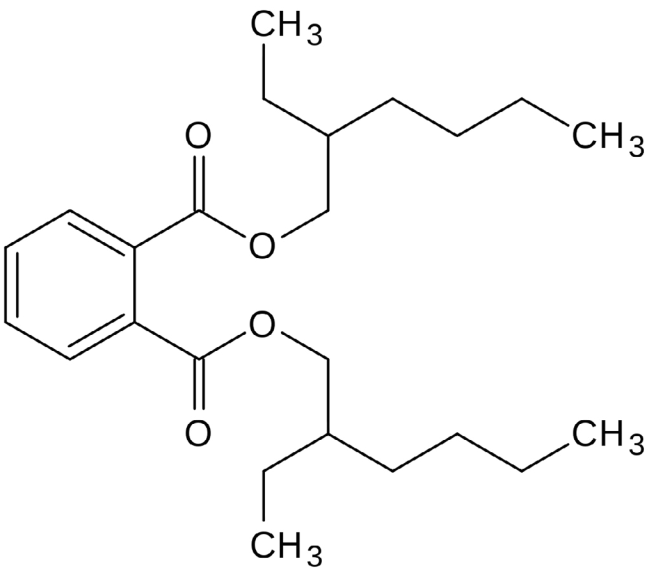
Famille des phtalates

Les phtalates sont des composés de synthèse utilisés comme plastifiant tel que le di(2-éthylhexyl) phtalate ou DEHP (le plus étudié) et sont aussi retrouvés dans la composition de lubrifiants, de fluides diélectriques ou encore d'insecticides (AESN-Aquascop, 2018). Les matières plastiques étant présentes en très grand nombre sur le globe, les sources d'émission des phtalates sont très diffuses – d'autant plus qu'ils sont plus ou moins persistants dans l'environnement selon le compartiment terrestre dans lequel ils se trouvent (Wang et al., 2019). Dans les eaux usées, ils sont très souvent quantifiés en conséquence de la multitude de matériaux plastiques au contact de l'eau et de leurs utilisations dans les processus industriels (Bergé et al., 2014; Deblonde et al., 2011). En raison des effets toxiques notoires, les phtalates sont bannis des films alimentaires, des cosmétiques et d'autres matériaux susceptibles d'être en contact avec de la nourriture. Des études ont montré leurs aptitudes à interférer avec le système endocrinien et reproducteur et des corrélations ont été trouvées entre les métabolites présents dans les urines et des troubles du développement (Wang et al., 2019; Zarean et al., 2016). Chez les invertébrés, en particulier chez les insectes, les effets de ces composés sont moins étudiés mais des perturbations endocriniennes et des troubles du développement ont été rapportés (Aviles et al., 2019; Oetken et al., 2004).



Benzyl butyl phtalate

DEHP



Autres familles de polluants

D'autres familles de polluants sont présentes dans les eaux usées en raison de leurs utilisations telles que les chlorophénols, les composés organiques volatils (COV), les polychlorobiphényles (PCB), les polybromodiphényléthers (PBDE), les composés pharmaceutiques etc. Les sources dans l'eau et les eaux usées de ces substances sont nombreuses et concernent divers métiers et utilisations quotidiennes – encres, peintures, transformateurs électriques, adjuvants, retardateurs de flamme (ex. textile, mobilier, construction...), médicaments et métabolites, solvants... (AESN-Aquascop, 2018; Deblonde et al., 2011; Fatta-Kassinos et al., 2011; Mendoza et al., 2015; Néfau, 2014; Walker et al., 2012). Les effets toxiques connus sont aussi nombreux et variés que les sources d'émission telles que des perturbations du système hormonal vertébré et invertébré, des troubles du développement et de la reproduction, et sont pour certains cancérogènes et mutagènes (AESN-Aquascop, 2018; Dickerson et Gore, 2007; Linares et al., 2015; Oetken et al., 2004).

B.2.2. Occurrence des polluants dans les eaux usées

Concernant les teneurs en micropolluants, la composition des eaux usées est très variable. Ils sont présents en très grand nombre et de familles diverses comme celles présentées ci-dessus. Les activités économiques et les pratiques des émetteurs sont révélatrices des polluants que l'on retrouve dans les eaux usées. Par exemple, une industrie de production de textile ne rejettera pas nécessairement les même micropolluants qu'une industrie pharmaceutique ou qu'un rejet domestique. Les paramètres globaux peuvent donner une indication potentielle de l'origine des eaux usées mais il n'existe pas nécessairement de corrélations avec les teneurs en micropolluants (Bergé et al., 2014).

En se plaçant à l'échelle des grands bassins versants français, ce qui permet de rassembler un jeu de données conséquent, il est possible d'obtenir une appréciation de la signature des micropolluants dans les eaux usées (**Figure I-6**). Parmi les familles recherchées, les métaux (ex. arsenic, cadmium, chrome, cuivre, mercure, nickel, plomb, zinc) sont le plus souvent quantifiés dans les eaux usées et dans les plus fortes concentrations suivies de certains composés pharmaceutiques – ibuprofène et paracétamol – et des alkylphénols et phtalates. Les HAPs ont un profil un peu différent. Lorsqu'ils sont quantifiés, ils sont présents en nombre mais restent peu concentrés en comparaison de composés d'autres familles (**Figure I-6**).

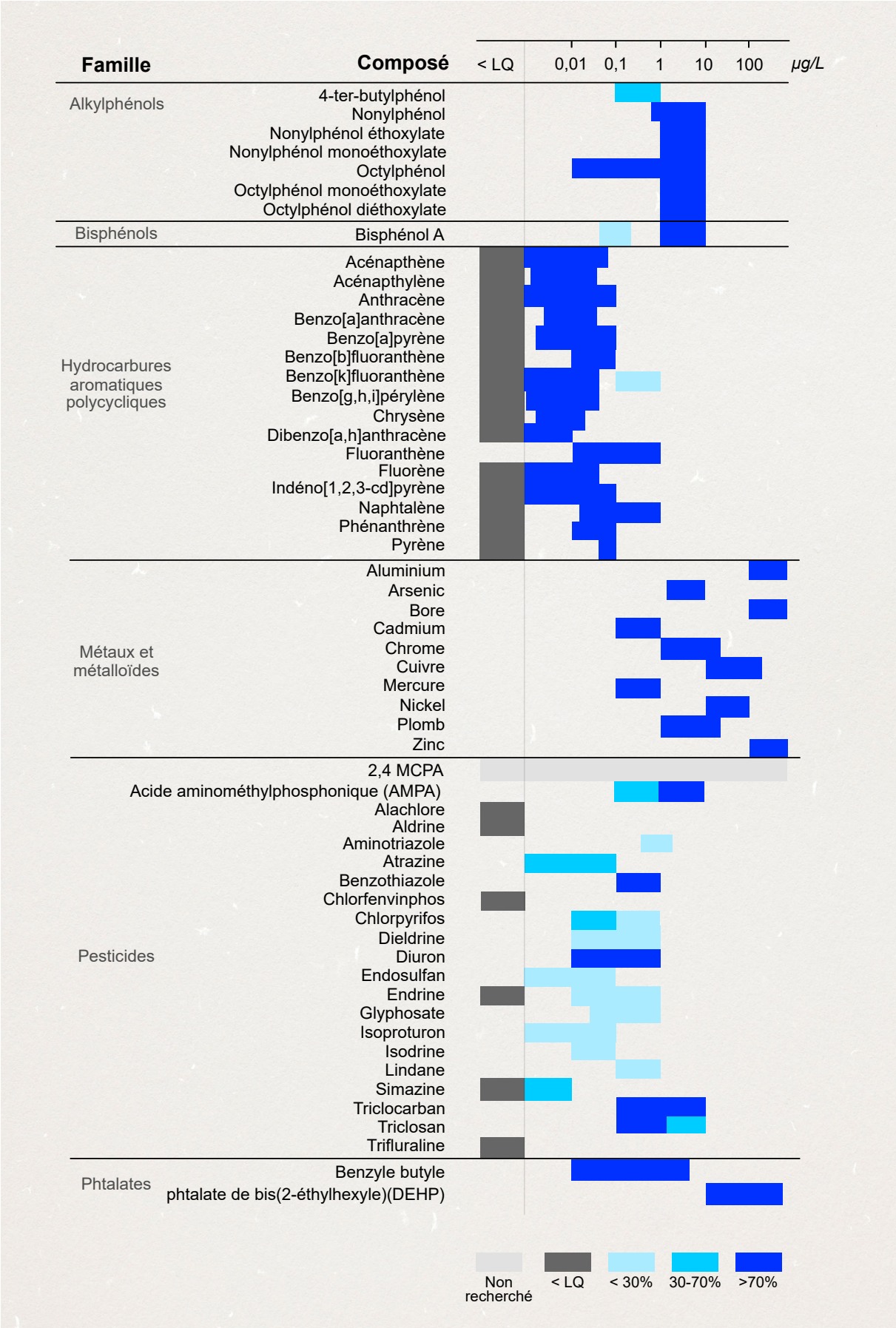


Figure I-6. *Signature chimique d'eaux usées brutes à l'échelle de grands bassins de collecte nationaux (modifié et adapté de Briand et al., 2018). L'échelle horizontale indique la concentration moyenne (µg/L) à laquelle le composé étudié est retrouvé dans les eaux usées et le code couleur indique l'occurrence (%) dans les eaux usées. LQ : limite de quantification.*

Les pesticides font partie des familles présentant le plus de variation (**Figure I-6**). En fonction de la molécule, les pesticides sont plus ou moins détectés dans les eaux usées avec des concentrations variables. Quant aux autres exemples de familles PCB, PBDE ou encore COV, elles sont parfois très rarement quantifiées (**Figure I-6**).

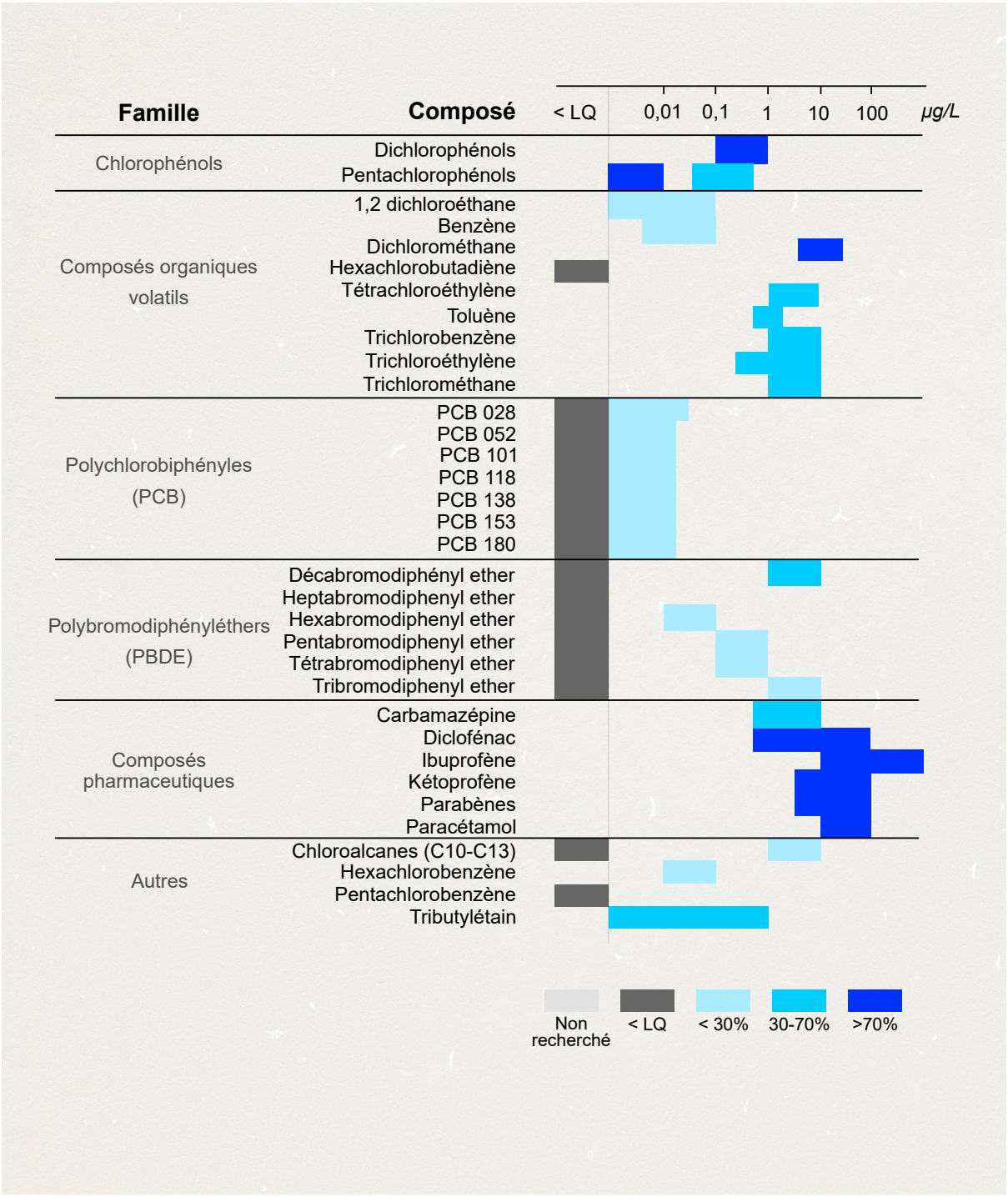


Figure I-6 (suite). *Signature chimique d'eaux usées brutes à l'échelle de grands bassins de collecte nationaux (modifié et adapté de Briand et al., 2018). L'échelle horizontale indique la concentration moyenne (µg/L) à laquelle le composé étudié est retrouvé dans les eaux usées et le code couleur indique l'occurrence (%) dans les eaux usées. LQ : limite de quantification.*

Pour certains micropolluants, des restrictions ou interdictions d'usage peuvent expliquer leur absence comme les PCB interdits en France depuis 1987. D'autres études menées à l'étranger rapportent des résultats similaires sur ces mêmes familles dans les eaux usées brutes (Petrie et al., 2017; Rule et al., 2006; Sánchez-Avila et al., 2009). A savoir que la configuration du réseau et ses défauts (ex. inversion de branchements avec le réseau d'eaux pluviales) peuvent influencer la signature des eaux usées. La variabilité des profils dépend donc de la contamination avec les eaux pluviales et des ruissellements urbains (Bomboi et Hernández, 1991) mais aussi des activités industrielles (Blanchard et al., 2004; Mezzanotte et al., 2016). Les résultats de l'action 2RSDE ont montré des apports de substances parfois comparables, parfois différents entre plusieurs eaux usées d'origine industrielle (Greaud-Hoveman et al., 2008). Cette variabilité spatio-temporelle est aussi dépendante des moyens économiques mis en place dans le cadre de l'assainissement et de l'utilisation saisonnière de certaines substances (Camacho-Muñoz et al., 2014; Coquery et al., 2011; UNESCO, 2017). Enfin, les informations sont uniquement accessibles pour les substances qui ont été ciblées. Un certain nombre de substances présentes non étudiées reste inconnu dans les eaux usées.

Les fractions totales ou échantillons bruts sont les plus couramment analysés mais la répartition des micropolluants entre les différentes phases peut être analysée. Les travaux de Zghieb (2009) ont montré que de nombreux polluants sont sous forme particulaire dans les eaux urbaines. Les métaux, HAPs, phtalates, PCB sont préférentiellement trouvés dans la phase particulaire. Les alkylphénols et pesticides oscillent entre les deux phases en fonction du composé étudié (Zgheib, 2009). Ainsi de façon générale, un polluant avec un $\log K_{ow} < 3$ sera préférentiellement trouvé dans la phase dissoute (ex. glyphosate, methyl-paraben, **Tableau I-1**) à l'inverse avec un $\log K_{ow} > 5$, il sera préférentiellement dans la phase particulaire (ex. benzo(a) pyrène, DEHP, **Tableau I-1**). Les molécules avec un $\log K_{ow}$ compris entre 3-5 oscilleraient entre les deux phases. Ce type d'informations est important pour le traitement qui sera appliqué à la STEU et donne des indications sur le devenir des polluants.

Occurrence dans les sous-produits de l'assainissement : boues et eaux traitées

L'intérêt de s'intéresser aux eaux usées brutes découle de l'importance de ces eaux dans la contamination de l'environnement. Dans le cas où elles sont traitées en station d'épuration, les rendements sont plus ou moins bons selon le type de

pollution. Pour rappel, à l'origine les STEU ont été créées pour traiter les macropollutions et non les micropolluants. L'amélioration des traitements des STEU et une surveillance rigoureuse de la qualité des rejets ont permis de réduire drastiquement l'impact sur le milieu naturel au cours de ces dernières décennies (Briand et al., 2018; Rocher et Azimi, 2017).

Comme expliqué ci-dessus, les polluants se répartissent entre la phase dissoute et la phase particulaire selon leurs propriétés physico-chimiques. Des transferts entre sous-produits de l'assainissement peuvent s'opérer. Les polluants hydrophobes et (bio)dégradables sont facilement éliminés de l'eau mais sont retrouvés dans les boues d'épuration (Coquery et al., 2011). C'est le cas des métaux – les plus concentrés (mg/kg) – suivis des HAPs, PCB, alkylphénols et composés pharmaceutiques. Les COV, pesticides et chlorophénols sont moins quantifiés dans ce sous-produit (Besnault, S. et al., 2015; Briand et al., 2018; Coquery et al., 2011). Mais actuellement, seules les teneurs en PCB, HAPs et métaux sont encadrées réglementairement dans les boues.

Plusieurs études montrent que sont majoritairement retrouvés dans les eaux traitées (en sortie de STEU) des métaux avec des concentrations très variables et parfois fortes (ng/L au µg/L voire mg/L très rarement) comme pour le zinc, mais aussi des phtalates (DEHP), des alkylphénols (nonylphénol) et quelques pesticides (diuron, AMPA...). De nombreux composés pharmaceutiques sont également présents en plus ou moins faible concentration avec d'autres types de polluants. Du fait de leur caractère hydrophobe, les HAPs et PCB y sont plus rarement détectés (Besnault, S. et al., 2015; Coquery et al., 2011; Deshayes et al., 2018; Partaix et al., 2016; Rogowska et al., 2019).

Globalement de nombreuses substances dans les eaux usées brutes sont indéniablement retrouvées dans les différentes filières de l'assainissement pouvant avoir des conséquences néfastes sur l'environnement. Besnault et al. (2015) soulignent l'importance de continuer de changer nos pratiques (utilisation de moins de produits ou de produits moins nocifs par exemple) et de s'intéresser à la source des pollutions en raison de certains processus aujourd'hui inefficaces pour éliminer 100% des micropolluants. Les eaux usées constituent une matrice d'étude hétérogène ce qui peut parfois compliquer le suivi de leur qualité ou extrapoler les données à une échelle géographique et temporelle différente de l'étude menée.

B.2.3. Stratégie et limites du suivi de qualité des eaux usées dans un réseau d'assainissement

Une des premières méthodes d'évaluation de la qualité des eaux usées est la recherche de sources d'émission potentielles sur son territoire. Une corrélation doit être réalisée entre les types d'activités et les entreprises raccordées au réseau d'assainissement. Cela permet d'élaborer une liste préliminaire de polluants potentiellement présents dans les eaux usées. A long terme, cette méthodologie est limitante car elle ne confronte pas la théorie à la pratique. Des analyses physico-chimiques sur plusieurs points du réseau d'assainissement sont le plus souvent menées pour compléter l'analyse bibliographique sur les sources d'émission polluante. Les paramètres globaux sont mesurés en priorité puisqu'ils donnent les premières informations sur la qualité et la nature de l'eau, mais la mesure des teneurs de micropolluants peut venir en complément. Des recommandations en matière d'échantillonnage et de conservation des échantillons sont prescrites pour évaluer correctement ces teneurs (Eymery et al., 2011; Ort et al., 2010). Le choix du laboratoire est également décisif. La sélection d'un partenaire accrédité (COFRAC, instance reconnue par l'Etat) est fortement préconisée pour s'assurer d'une qualité standard des résultats. Paradoxalement, des laboratoires de recherche non accrédités sont parfois plus à même de réaliser des analyses car ils disposent d'appareillages plus performants ou adaptés dans certaines conditions (Briand et al., 2018).

La chimie analytique oblige à faire un choix dans le suivi des polluants en raison du coût économique – jusqu'à plusieurs dizaines de milliers d'euros selon le nombre de substances analysées. Les analyses des eaux usées sont souvent réalisées à l'aide de normes françaises (NF) ou européennes (ISO) permettant une standardisation des méthodes (cf. chapitre II). Cependant, ces normes d'analyses n'existent pas pour tous les paramètres. Des changements de méthodes ou des limites de détection et de quantification différentes entre laboratoires sont possibles et peuvent compliquer la comparaison et l'interprétation des résultats (Coquery et al., 2011). La chimie analytique ne permet pas non plus d'évaluer la toxicité des eaux usées puisqu'elle n'est pas exhaustive et ne donne pas d'information sur le danger de ces substances ensemble. La toxicité ne peut être donnée que par un test biologique (bioessai). A ce jour, aucun test biologique n'est proposé dans le cadre réglementaire pour l'évaluation de la qualité des eaux usées, ce qui peut remettre en question la pertinence des résultats des analyses chimiques seules (Hernando et al., 2005; Kittinger et al., 2013). En effet, Vasquez et Fatta-Kassinos (2013) soulignent que la corrélation entre

évaluation physico-chimique et toxicité réelle des effluents est difficile à établir en raison des limites de la chimie analytique (non exhautive, pas d'information sur le danger ou la biodisponibilité des polluants). De plus, il convient d'accumuler un certain nombre de données avant de s'y aventurer – connaissance du territoire d'assainissement, des problématiques du réseau, des polluants potentiellement présents, etc. (Racinais, 2019).

Les bioessais permettent de mesurer des réponses à l'aide de variables plus ou moins sensibles permettant d'obtenir des informations sur l'exposition ou les effets toxiques (Aronson et Ferner, 2017; Ramade, 2007). Les outils biologiques sont couramment utilisés pour les eaux naturelles (de surface par exemple) pour évaluer la qualité d'un milieu. Certains de ces tests sont normés à l'échelle française (AFNOR) ou européenne (OCDE) (test de bioaccumulation chez les gammares, test de perturbateurs endocriniens sur têtards, test d'immobilité des daphnies...). De tels outils pourraient être applicables aux eaux usées pour évaluer la toxicité de celles-ci et rechercher des sources d'émission de pollutions toxiques au sein du réseau d'assainissement. Ainsi, de plus en plus d'études utilisent des modèles biologiques pour évaluer la toxicité des effluents bruts et traités (Harbi et al., 2017; Penru et al., 2017; Yu et al., 2019).

Projet MICROPOLIS Indicateurs : Caractérisation des eaux usées à Sophia Antipolis
Ce projet a été crée dans le contexte de la recherche de micropolluants de façon innovante basée sur la toxicité d'effluents bruts et traités. Plusieurs échantillons d'eaux usées brutes et d'eaux traitées de Sophia Antipolis ont été analysés à l'aide de plusieurs bioessais d'écotoxicité et de spécificité de mode d'action in vivo et in vitro. Plus d'une dizaine de tests biologiques a été réalisée. Ces tests ont mesuré la toxicité chez des levures et plusieurs lignées cellulaires (activités perturbations endocriniennes, génotoxicité, cytotoxicité) et chez Daphnia magna Straus (immobilité). Ces résultats combinés ont permis de créer des profils de toxicité par points analysés sur le réseau d'assainissement. Les profils, différents entre les points, montrent une contamination hétérogène des eaux usées sur le réseau d'assainissement mais ont permis l'identification de points prioritaires du réseau d'assainissement pour rechercher les polluants toxiques potentiellement responsables des effets les plus forts. En sortie de STEU (effluents traités), la toxicité est réduite mais non éliminée montrant l'interêt de s'intéresser aux effluents bruts responsables en partie de cette toxicité résiduelle (Penru et al., 2017).

B.3. Suivi des eaux usées par le Syndicat Intercommunal pour l'Assainissement de la Région de Pontoise

Le Syndicat Intercommunal pour l'Assainissement de la Région de Pontoise ou SIARP, comme de nombreuses autres entités en France, constitue un des remparts contre la pollution de l'eau. Cet établissement public de plus de soixante-dix ans a pour mission l'exploitation et la maintenance des systèmes de collecte et de transport – collectifs et non collectifs – des eaux usées. La délivrance des autorisations de déversements, le contrôle des rejets non domestiques lui incombent. Le territoire situé dans le Val d'Oise (département 95) dont le siège social est localisé à Pontoise – à une quarantaine de kilomètres de Paris (**Figure I-7**) – regroupe vingt-quatre communes.

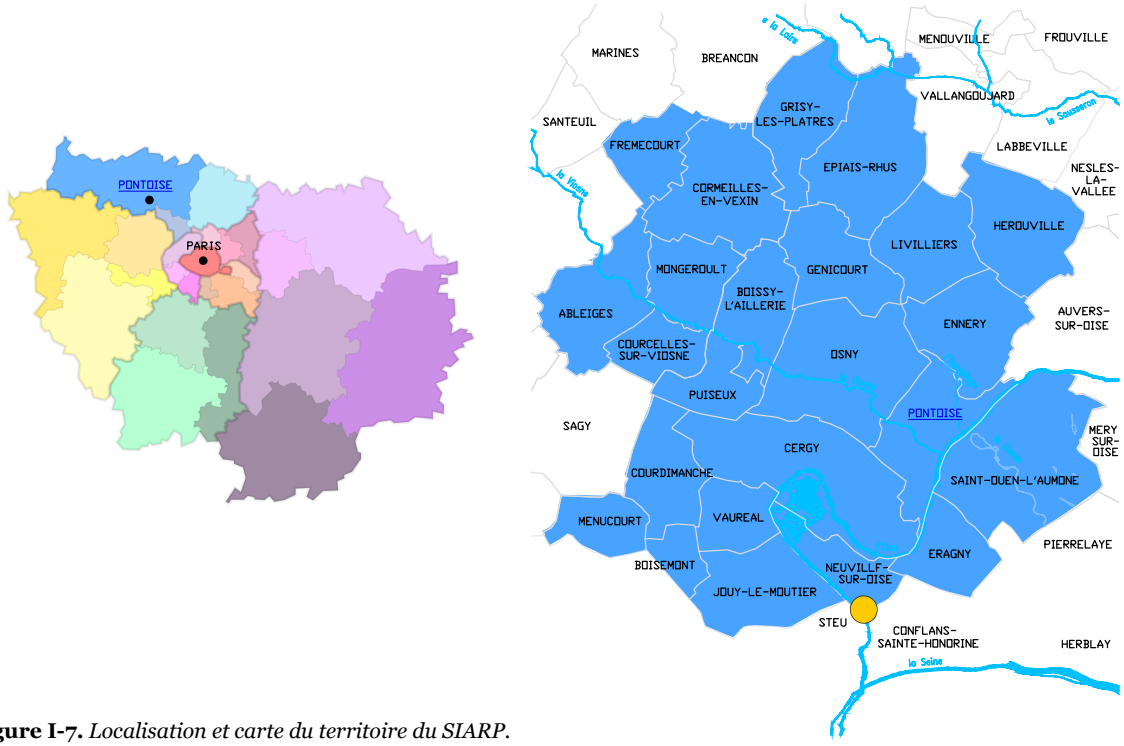


Figure I-7. *Localisation et carte du territoire du SIARP.*

Les eaux usées collectées et transportées sont principalement urbaines bien que le nord du territoire amène une partie rurale. Il est difficile d'évaluer la proportion d'eaux usées industrielles (EUND) et domestiques (EUAD, EUD). Sur le territoire, sont présents de nombreux parcs industriels et zones d'activités commerciales (ex. centre d'incinération des déchets, restauration, chimie, pharmacologie, hôpitaux, mécanique automobile etc.) dont un certain nombre d'entreprises sont classées pour l'environnement (ICPE). Selon les communes, les habitations sont quant à elles collectives et/ou individuelles.

En matière de canalisations, le territoire du SIARP s'étend actuellement sur plus de 731 kilomètres qui comprennent 72% de linéaire séparatif et 2% de linéaire unitaire, le reste du réseau étant alloué aux canalisations de refoulement (2%) et aux branchements (24%). Le SIARP dispose également d'ouvrages spéciaux pour la configuration unitaire comme des bassins de stockage et de surverse. Plus de 20 000 regards de visite sont installés pour accéder à l'intérieur du réseau d'assainissement. Les eaux usées du SIARP sont transportées vers la station d'épuration de Cergy-Neuville. Actuellement, cette STEU abat 98% de la charge polluante et a un débit de référence de 55 000 m^3/J pour une capacité nominale épuratoire de plus de 400 000 EH. Elle dispose de prétraitements et d'un traitement primaire classiques et traite secondairement ses effluents à l'aide de biofiltres. Les boues sont envoyées en filières conventionnelles pour compostage, épandage et incinération. Quant aux eaux traitées, elles sont rejetées dans l'Oise. A l'issue du dernier SDAGE 2009-2015, le bilan de l'état écologique des masses d'eau du Val d'Oise est globalement moyen pour les polluants spécifiques de l'eau (PSEE) et ceux de la STEU. La qualité de l'Oise et de la Viosne, rivières présentes sur le territoire du SIARP, ont une qualité écologique moyenne selon les critères d'évaluation réglementaires. La qualité chimique est bonne lorsque les HAPs sont exclus de l'analyse (Données DRIEE & AESN).

Dans le cadre de son autosurveillance, le SIARP dispose d'outils et de personnels assurant les missions. Un logiciel d'information géographique (SIG) a été mis en place et est régulièrement mis à jour depuis 2005. Cependant certaines parties du réseau nécessitent des connaissances approfondies comme sur l'état de la structure et la disposition du réseau et de ses branchements. Le SIARP envoie ses agents sur le terrain pour contrôler les installations et évaluer la conformité. Ainsi, au fil des années, des contributeurs potentiels sur différents bassins de collecte ont pu être identifiés. Les moyens humains présentent néanmoins certaines limites car il est difficile de contrôler un territoire aussi vaste tout en lançant des procédures de travaux et de suivis de remise en conformité. En 2016, afin d'anticiper la réglementation mais aussi aller plus loin, le SIARP a souhaité démarrer son propre diagnostic amont pour évaluer la qualité de ses eaux usées. Une stratégie d'étude était alors nécessaire afin d'évaluer si leurs effluents présentaient des pollutions plus ou moins importantes pour la STEU et l'environnement. En raison du coût et des limites que présentent les méthodes actuelles, le SIARP souhaitait s'ouvrir aux nouvelles technologies permettant la caractérisation de ses eaux usées.

Conclusion

Plus de 100 000 substances chimiques sont présentes sur le marché européen dont un nombre important se retrouve dans les eaux usées à la suite de l'utilisation de ces dernières dans l'eau. En fonction de leurs caractéristiques – hydrophobicité, volatilité, (bio)dégradation, bioaccumulation, capacité à s'adsorber – ces substances sont plus ou moins éliminées de l'eau et/ou transférées dans d'autres compartiments terrestres via les sous-produits de l'assainissement ou par rejets directs d'effluents bruts (ex. inversions de branchement). Les effets toxiques que peuvent déclencher ces polluants sont très variables selon les familles chimiques mais aussi d'un composé à l'autre. Les eaux usées représentent une matrice d'étude avec des caractéristiques relativement claires sur les macropollutions qui sont traitées en STEU. Mais dans le cadre des micropolluants, la signature est plus ou moins variable, hétérogène en fonction du lieu d'étude et les capacités de rendement des STEU ne sont pas toujours optimales pour le traitement des micropolluants (traitements non adaptés ou trop onéreux).

Aujourd'hui, la recherche des micropolluants est une priorité voire une obligation dans les eaux traitées et désormais dans les eaux usées brutes (note technique du 12 août 2016). Actuellement, une étude bibliographique complétée par la chimie analytique permet de suivre la qualité des eaux usées et de tracer les micropolluants. Cependant ces techniques sont limitées, l'extrapolation des données bibliographiques peut s'avérer difficile à chaque lieu d'étude et la chimie analytique présente un coût économique non négligeable pour des gestionnaires d'ouvrages d'assainissement. De plus, ce coût limite les mesures en ce qui concerne le nombre de polluants suivis et l'échelle spatio-temporelle. De nouvelles technologies sont souhaitables par et pour ces professionnels permettant de les aider dans la recherche des sources d'émission polluantes. Les bioessais ont connu un essor remarquable depuis les deux dernières décennies dans le domaine de l'eau. Ces outils devraient être mis à profit pour évaluer la qualité des eaux usées brutes et de tracer les pollutions toxiques au sein du réseau d'assainissement.

C. *Drosophila melanogaster*, un modèle d'étude pour l'évaluation de la toxicité des eaux usées brutes

C.1. Pourquoi la drosophile pour étudier la toxicité des eaux usées ?

Dans une étude d'écotoxicité, le choix d'une espèce sentinelle est une option idéale ; c'est une espèce polluo-sensible et représentative du milieu que l'on étudie. Ainsi, plusieurs vertébrés et invertébrés aquatiques (ex. *Danio rerio*, *Daphnia magna*, *Chironomus riparius*) ont fait l'objet d'études d'écotoxicité en tant que bioessais afin d'évaluer la qualité d'eaux naturelles à la suite de contaminations par des polluants (Caballero-Gallardo et al., 2016;Hirano et al., 2004; Planelló et al., 2011). Les eaux usées brutes, qui circulent dans le réseau d'assainissement, ne constituent pas un milieu naturel et ne sont pas viables telles quelles pour la plupart des organismes vivants.Il n'y a pas d'espèces endémiques et donc pas d'espèces sentinelles. En conséquence, l'évaluation de la toxicité des eaux usées ne peut se faire que sur la base de bioessais en laboratoire à l'aide d'une espèce modèle. Les pratiques en laboratoire, différentes de celles réalisées *in natura*, permettent néanmoins de répondre à la question des effets des effluents sur un ou plusieurs organismes vivants.

Le choix du modèle d'étude repose sur plusieurs critères ; le coût économique, l'obligation législative, le type de toxicité à étudier (aiguë, chronique), les moyens à disposition pour le laboratoire. Des bioessais ont été développés et commercialisés en prenant en compte ces différents critères. Il existe actuellement un grand nombre de bioessais qui utilisent comme espèces modèles des procaryotes (bactéries) et des eucaryotes (poissons, crustacés,bivalves, plantes, levures) et permet ainsi de mesurer plusieurs variables (Hassan et al., 2016). Ces variables sont soit observables à l'échelle de l'organisme entier (ex. survie, taux de développement, comportement, taille de la progéniture, luminescence) soit observables à l'échelle moléculaire(ex. activités enzymatiques, expression des gènes, génotoxicité, métabolisme,quantité de protéines, division et différenciation cellulaire). L'utilisation d'un panel de bioessais renforce l'analyse de la toxicité et permet de caractériser un maximum d'effets. Bien que l'interprétation peut être parfois difficile avec un lot conséquent de données, parfois redondantes, ils apportent chacun des informations différentes en raison du protocole utilisé et des niveaux de sensibilité (Hassan et al., 2016; Penru et al., 2017; Sekkat etal., 2001). Cependant, un panel aussi large ne peut être utilisé en routine dans le contexte d'une évaluation régulière de la qualité des eaux usées brutes pour des raisons de coût économique (Sekkat et al., 2001).

De plus, dans ces études, les effluents bruts sont dilués, filtrés ou prétraités avant les essais puisque les organismes aquatiques utilisés comme modèle ne sont pas adaptés à vivre dans de telles conditions. Ces adaptations rendent le temps de mise en place et de mesure plus long (Hassan et al., 2016) et bien qu'elles soient nécessaires, elles changent la nature de la matrice étudiée.

Dans le contexte de cette étude, l'objectif est de pouvoir dresser des profils de toxicité dans le but d'identifier des sites du réseau d'assainissement où les effets toxiques les plus forts sont observés. Il est nécessaire de pouvoir mesurer plusieurs variables plus ou moins sensibles pour établir ces profils de façon plus précise. Dans la mesure du possible, la matrice d'étude doit subir le moins de changements possibles pour étudier sa toxicité telle qu'elle le serait dans le réseau d'assainissement, tout en permettant l'optimisation du protocole d'expérimentation. Les contraintes économiques liées à l'application de ce bioessai et à son utilisation en tant qu'outil de diagnostic pour les structures telles que le SIARP doivent être prises en compte. Ainsi, nous avons pris parti d'utiliser un modèle différent de ceux couramment utilisés comme bioessais sur matrices aqueuses, *Drosophila melanogaster*. Dans ce cas, l'espèce modèle choisie est considérée comme une boîte biologique qui exprime plusieurs phénotypes mesurables à la suite d'une exposition aigüe ou chronique.

C.2. Brève histoire du genre Drosophila

La famille Drosophiladae appartient à l'ordre des Diptera (regroupant espèces de mouches, syrphes, moustiques...) qui est intégré dans l'embranchement phylogénétique des arthropodes parfois désigné sous le nom vernaculaire d'invertébrés. Cette petite mouche est couramment appelée « mouche du fruit » ou « mouche du vinaigre » en raison de sa présence sur les fruits en décomposition sur lesquels elle se nourrit et se reproduit. Espèce commensale aux hommes, *Drosophila melanogaster* est une des espèces les plus étudiées depuis un siècle et est devenue célèbre grâce aux premiers travaux de Thomas Hunt Morgan au début du XX^{e} siècle. A l'origine, la drosophile venait du continent sud-africain duquel elle a émigré vers l'Europe et le reste du monde via notamment le commerce de fruits (Hales et al., 2015). Avec la dispersion de cette espèce dans divers territoires aux caractéristiques climatiques et écologiques différentes, la spéciation de la drosophile s'est ainsi répandue à travers le monde. Aujourd'hui plus de 200 espèces sont connues et la plupart sont très bien décrites bien que le sous-groupe

melanogaster reste actuellement le plus familier dans les domaines de la biologie, l'écologie, le comportement et la génétique (Hales et al., 2015; Singh, 2016). En plus de connaissances complètes sur sa biologie, l'annotation de son génome a été achevée au tout début de notre siècle par Adams M. et al. (2000). Un élevage simple, rapide et peu onéreux en laboratoire et une base de données génomiques en ligne (FlyBase) font partie des avantages de l'utilisation de ce modèle. Environ 40% d'homologie et plus existent entre son génome et celui des mammifères incluant les primates, ce qui en fait également un excellent modèle d'étude pour de nombreuses maladies humaines telles que Parkinson ou Alzheimer (Masamitsu et Hideki, 2018). En raison de ces nombreux avantages, *Drosophila melanogaster* est un véritable outil d'étude dans différents domaines de recherche et se révèle davantage utile en toxicologie environnementale.

C.3. Biologie et cycle de vie : des traits de vie facilement observables

La drosophile est un insecte luciphile, hygrophile et holométabole pouvant vivre en moyenne 50 jours dans des conditions optimales de nourriture et de température (Linford et al., 2013). Les hôtes principaux de cette espèce cosmopolite sont les fruits en décomposition riches en levure émettant un panache d'odeurs attrayantes et la plupart du temps alcoolisées. Cet attrait pour l'alcool, jusqu'à 4% dans sa nourriture, lui confère ainsi une certaine protection pour ces larves contre prédateurs et parasitoïdes (Gibson et al., 1981; Lynch et al., 2017). Les adultes mesurent environ 4 mm, ont une reproduction sexuée et sont dimorphiques (**Figure I-8**).

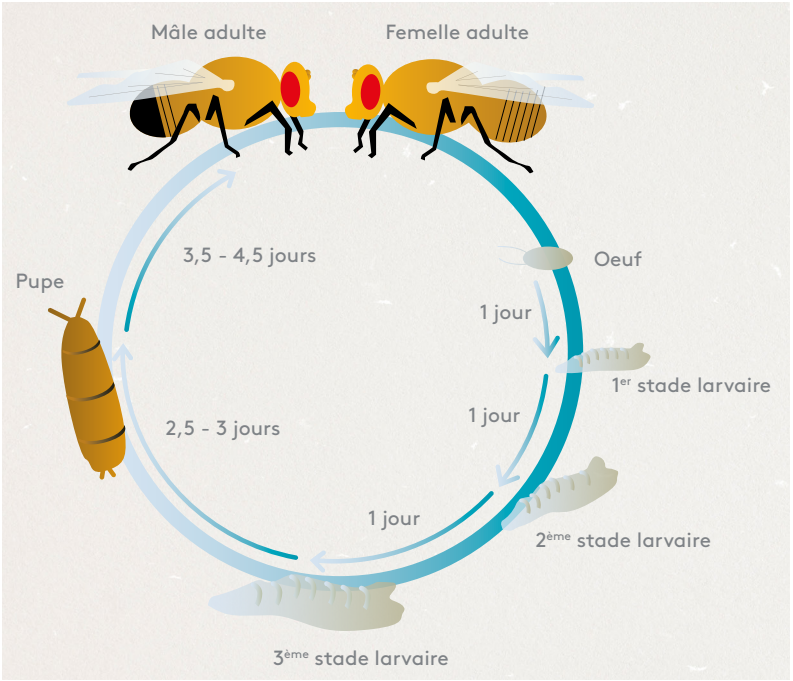


Figure I-8. *Cycle de vie de Drosophila melanogaster. Après l'embryongenèse, la larve éclot pour se nourrir plusieurs jours sur des substrats plus ou moins aqueux afin d'atteindre le stade imago. La pupe constitue le stade intermédiaire qui permettra à l'individu de se métamorphoser.*

Le cycle de développement de la drosophile est rapide puisqu'en une dizaine de jours une nouvelle génération est obtenue. Environ 24H après la ponte, les œufs éclosent et les larves muent trois fois au cours de leur développement afin d'atteindre le stade pupal pour se métamorphoser (**Figure I-8**). Sous la loupe binoculaire, le suivi du développement des tissus de l'imago est facilement observable par transparence. Après émergence, les jeunes adultes sont dépourvus de pigmentation et ont les ailes repliées. Ils atteignent la maturité sexuelle après une dizaine d'heures mais sont plus fertiles et enclins à la reproduction à 3-4 jours après l'émergence (Strømnaes, 1959).

Grâce à la maîtrise et aux connaissances sur sa biologie, un grand nombre de traits de vie sont facilement mesurables chez la drosophile que ce soit à l'état larvaire (ex. survie, temps de développement, comportement locomoteur, poids, taille) ou à l'état adulte (ex. sexe-ratio, reproduction, durée de vie, malformations, géotaxie, toilettage).

C.4. Une panoplie de biomarqueurs moléculaires

Des décennies d'études sur ce modèle et les nouveaux outils de biologie moléculaire ont permis de séquencer le génome de la drosophile et de caractériser plusieurs voies de signalisation génétiques. Les travaux d'Arbeitman et al. (2002) marquent les débuts de l'annotation fonctionnelle des gènes de la drosophile. En effet, l'avancée technologique et la création de nouvelles méthodologies telles que le transfert d'ARN, l'hybridation *in situ* ou encore le clonage ont permis l'étude individuelle de gènes et le lien entre molécule et fonction au sein de l'organisme. A ce jour, *Drosophila melanogaster* est le modèle insecte qui comporte le plus d'études et pour lequel on a la meilleure connaissance des gènes et des réseaux de gènes.

En pharmacologie, grâce à la connaissance des cartes fonctionnelles chez différentes espèces et notamment chez *Homo sapiens*, des acteurs clés identifiés dans des processus pertinents à une étude toxicologique peuvent être suivis pour caractériser l'état de l'organisme, la présence de maladie ou encore l'exposition à un xénobiotique (Aronson et Ferner, 2017). Cette même stratégie est exploitée sur d'autres espèces incluant des invertébrés pour évaluer les dommages de la pollution ou tenter de tracer une substance au travers d'effets biologiques (Carlsson et Tydén, 2018; Herrero et al., 2017; Mantilla et al., 2018; Park et Choi, 2009; Sheweita et al., 2016).

Bien qu'il reste difficile d'identifier le lien de causalité, l'utilisation de biomarqueurs moléculaires d'effet et d'exposition permet d'évaluer l'état de santé d'organismes et populations et à terme pourrait faire partie d'une réglementation (Handy et al., 2003). Ces biomarqueurs peuvent être impliqués dans divers processus - développement et croissance, détoxication, défense immunitaire, réponse aux stress chimiques, reproduction, métabolisme - et sont de natures différentes (gènes, protéines).

Chez la drosophile, la base de données FlyBase permet d'avoir accès un très grand nombre d'informations sur les acteurs moléculaires. De cette manière, ils peuvent être sélectionnés facilement en fonction de leur rôle au sein de l'organisme, de leur patron d'expression et de leurs réponses face à des molécules toxiques. Selon ces critères, plusieurs de ces acteurs sont donc susceptibles d'être utilisés en tant que biomarqueurs d'effet ou d'exposition aux eaux usées. De plus, l'étude à l'échelle moléculaire permet de décrypter quels mécanismes sont sollicités ou inhibés en réponse à une exposition à une ou plusieurs substances toxiques et expliquer, s'il y en a, les modifications de traits de vie.

Une vision globale de plusieurs de ces acteurs impliqués dans des voies de signalisation différentes peut permettre de répondre aux objectifs de cette étude en observant si ces acteurs subissent des perturbations après exposition aux eaux usées. Ces derniers pourraient permettre de tracer des pollutions particulières (ex. modifications suite à un type de polluants) ou d'évaluer le niveau de toxicité et de caractériser le stress (ex. stress général, oxydatif, perturbation endocrinienne, apoptose).

Voie de signalisation hormonale

Comme pour les mammifères, le développement des insectes est sous contrôle hormonal (Jindra et al., 2013). Les principales hormones que l'on trouve chez les insectes sont les ecdysteroïdes – dont la forme majeure est la 20-hydroxyecdysone (20E) – et les hormones juvéniles (JH). Elles régulent les processus de mues mais aussi de la métamorphose. Les jeunes larves vont synthétiser des ecdystéroïdes à partir de phytostérol ingéré, secrétés via les glandes prothoraciques.

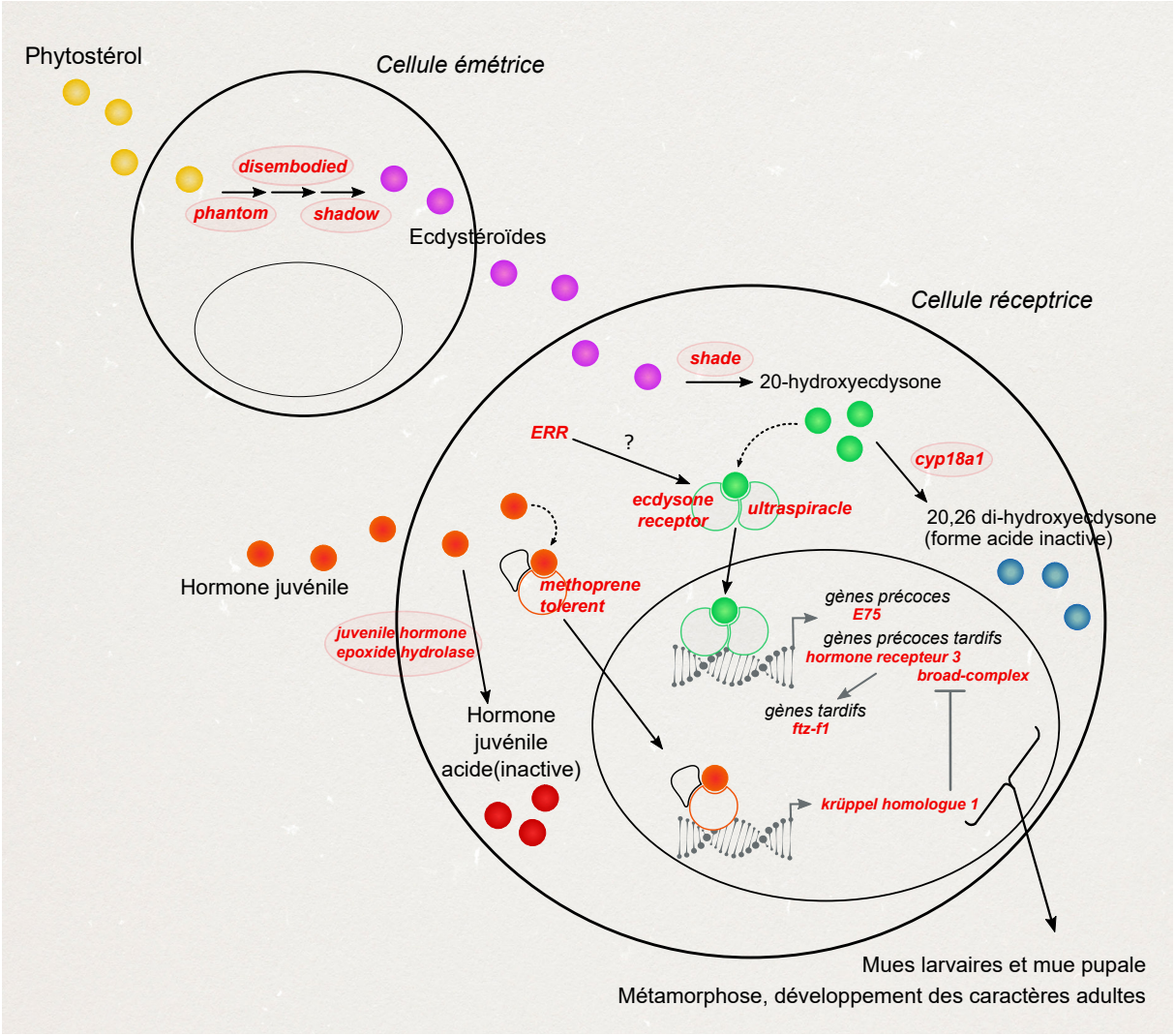


Figure I-9. *Voie de signalisation hormonale chez la drosophile. Le phytostérol permet de former la forme active des ecdystéroïdes (20-hydroxyecdysone ou 20E) qui va réguler les processus de mues et de la métamorphose via le complexe récepteur ecdysone receptor/ultrapsiracle qui va agir sur la transcription de gènes effecteurs. De la même façon que les hormones juvéniles interviennent également dans ces régulations via le récepteur methoprene tolerant qui va également agir sur la transcription de gènes.*
En rouge, plusieurs acteurs moléculaires régulateurs à l'amont et à l'aval de cette voie de signalisation. ERR : estrogen-related receptor ; cyp18a1 : cytochrome P450-18a1 ; ftz-f1 : fushi tarazu factor-1.

Le phytostérol est métabolisé par une famille de gènes surnommée les gènes Halloween pour former la 20E, la forme active des ecdystéroïdes (Nakagawa et Sonobe, 2016) (**Figure I-9**). Sécrétée par pics, la 20E se lie d'abord à son récepteur, l'ecdysone receptor (EcR) qui en complexe avec ultraspiracle (USP) va déclencher une cascade de gènes dits précoces, précoces tardifs. Ces gènes vont contrôler l'expression d'autres gènes effecteurs (gènes tardifs) qui auront des rôles majeurs durant le développement et sur la physiologie des individus (**Figure I-9**). Par exemple, des gènes comme fushi tarazu factor-1 (FTZ-F1) ou broad-complexe (BR-C) sont connus pour permettre le processus de mue en régulant plusieurs acteurs moléculaires impliqués dans la création d'une nouvelle cuticule (Rewitz et al., 2010; Ureña et al., 2014).

Cette voie de signalisation a une dynamique temporelle très précise au cours du développement, impliquant de fines régulations d'induction ou/et de répression des gènes afin de permettre le bon déroulement du développement (Mazina et al., 2017). La forme active des ecdystéroïdes, la 20E, doit être ensuite inactivée et dégradée pour éviter une sur-stimulation du système. Cette étape est réalisée par l'enzyme cytochrome p450-18a1 (*cyp18a1*) qui métabolise la 20E en 20,26 di-hydroxyecdysone (forme biologiquement inactive) (Guittard et al., 2010) (**Figure I-9**). Parallèlement, les hormones juvéniles régulent ces mêmes processus en interagissant avec des cibles sensibles à la 20E mais aussi avec leurs propres cibles (**Figure I-9**). De la même façon que la 20E se lie à son récepteur, la JH va se lier au récepteur méthoprène tolerant (*met*) et activer la transcription du gène krüppel homologue 1 (*kr-h1*), répresseur de la métamorphose (Jindra et al., 2013; Minakuchi et al., 2008; Shinoda, 2015; Ureña et al., 2014). L'hormone juvénile a également été montrée comme capable d'interagir avec BR-C pour diriger le processus vers la formation du bon tissu (larvaire, pupal et adulte) (Zhou et Riddiford, 2002). Et à l'instar de la 20E, elle est nécessairement inactivée par une enzyme, l'époxyde hydrolase (*jheh*). D'autres acteurs que l'on connaît moins bien sont également susceptibles de réguler cette voie de signalisation ; c'est le cas du récepteur orphelin estrogen-related receptor (ERR) qui a été montré pour interagir avec les gènes de la cascade des ecdystéroïdes (Mazina et al., 2017). Une perturbation de la dynamique de cette voie de signalisation et de ces acteurs peut induire des troubles de développement chez la drosophile (Parvy et al., 2014).

Voie de signalisation des protéines chaperonnes ou heat shock proteins (HSPs)

Les protéines de choc thermique de l'anglais *heat shock proteins* (HSPs) tiennent leur nom des premiers résultats d'études dans les années 1960 chez *Drosophila busckii* montrant leur induction en réponse à un changement de température (Ritossa, 1962). La température provoquant la dénaturation des protéines, les chaperonnes évitent le mauvais repliement de ces dernières et leurs agrégations entre elles. On sait à présent que les HSPs répondent à un plus large panel de stress afin de protéger les protéines de façon similaire. Il a été montré que plusieurs HSPs ont été induites en réponse à la présence de polluants chimiques toxiques comme le cadmium, le bisphénol A, le DEHP ou encore le benzo(a)pyrène chez la drosophile et chez d'autres espèces comme le chironome ou la l'huître Australienne (Doğanlar et al., 2014; Lee et al., 2006; Taylor et al., 2013). Leur rôle essentiel fait qu'elles sont hautement conservées dans les trois super-règnes de l'arbre du vivant (Fittipaldi et al., 2014). Leur diversité est grande et elles sont regroupées en fonction de leur poids moléculaire, la mieux caractérisée étant l'HSP70. Cette chaperonne ainsi qu'un bon nombre d'entre elles sont fortement induites dès un stimulus stressant, tandis que certaines sont exprimées de façon constitutive comme l'HSC70 (Fittipaldi et al., 2014).

L'induction des HSPs est médiée par la voie du facteur de transcription *heat shock factor* (*hsf*) présent en condition non stressante dans le cytoplasme. En réponse à la perception du stress, le facteur de transcription *hsf* va phosphoryler puis va transloquer au noyau, se trimériser pour se lier plus fortement aux éléments de réponses *des chaperonnes* (*heat shock element ou HSE*) sur les promoteurs et induire la transcription des gènes (Tower, 2011; Wu, 1995) (**Figure I-10**). Et à l'instar de la voie de signalisation hormonale, il est vital d'inactiver ces réponses pour conserver de l'énergie ; certaines HSPs (HSP40, HSP70, HSP90) sont donc capables de rétroactiver la voie *hsf* (Tower, 2011). D'autres (ex. HSP60) ont même été décrites comme stimulatrices des cellules immunitaires (Li et Srivastava, 2004). et sous forme monomérique en complexe inactif avec d'autres HSPs (**Figure I-10**).

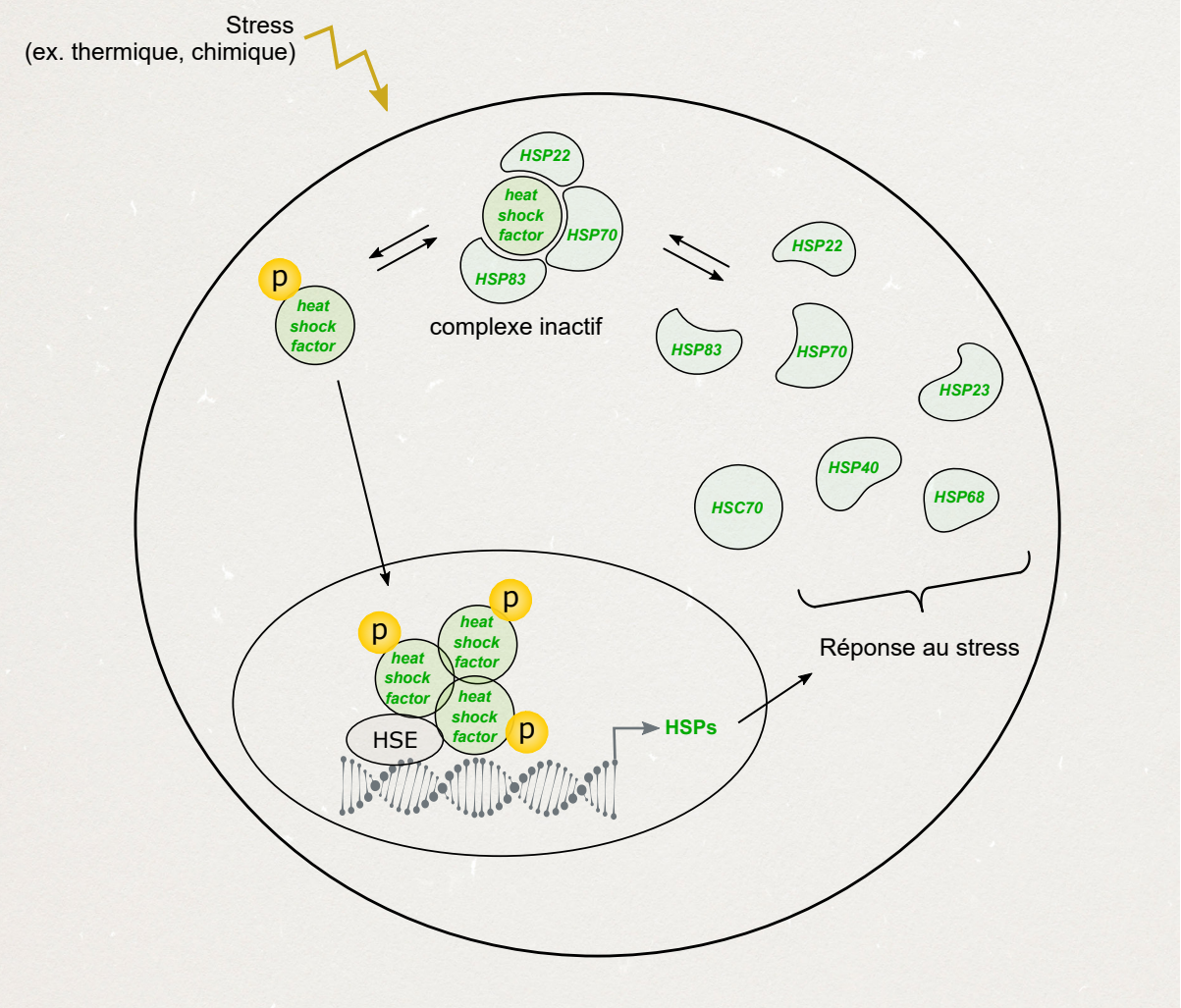


Figure I-10. *Voie de signalisation des protéines chaperonnes HSPs chez la drosophile. Lorsque la cellule perçoit un stress, thermique ou chimique par exemple, le complexe inactif heat shock factor/HSPs se disloque. Le facteur de transcription va alors activer la transcription de gènes codant les protéines chaperonnes sous forme de trimère phosphorylé afin de lutter contre le stress et protéger l'intégrité des protéines essentielles pour l'organisme.*
En vert, les acteurs moléculaires de cette voie de signalisation. HSPs : heat shock proteins ; HSC70 : heat shock cognate 70 ; HSE : heat shock element response. P : phosphorylé.

Voie de signalisation des métallothionéines (MTs)

Les métallothionéines sont des protéines riches en cystéines et groupements thiolates capables de se lier aux métaux. Elles sont connues depuis les années 1950 comme étant les seules à pouvoir capter et contenir les métaux au sein d'un organisme (Kägi, 1991). Et à l'instar des HSPs, les mécanismes régissant la transcription des MTs ont été bien conservés au cours de l'évolution chez les vertébrés et invertébrés (Günther et al., 2012). Les MTs sont inductibles par un certain nombre de facteurs comme les ions métalliques mais aussi par des acteurs du système immunitaire ou encore par des substances comme le DEHP (Kägi, 1991; Vignesh et Deepe, 2017).

En présence de métal libre (non lié aux métallothionéines), le facteur de transcription MTF-1 transloque au noyau cellulaire pour se lier aux éléments de réponses *MRE* (*metal responsive element*) dans le promoteur qui contient aussi des éléments de réponse antioxydants (*ARE*) (**Figure I-11**). Le complexe induit la transcription des métallothionéines, principalement exprimées dans le tractus intestinal et qui s'autorégulent (Egli et al., 2006b; Günther et al., 2012; Haq et al., 2003) (**Figure I-11**). Chez la drosophile, il existe cinq gènes de MTs ; mtnA, mtnB, mtnC et mtnD, mtnE. Les deux premières formes sont prédominantes avec un rôle plus important dans l'homéostasie des métaux. Les métallothionéines ont également des affinités différentes pour les ions métalliques et sont donc induites de façon différentielle en fonction du métal présent (Egli et al., 2006a; Kägi, 1991).

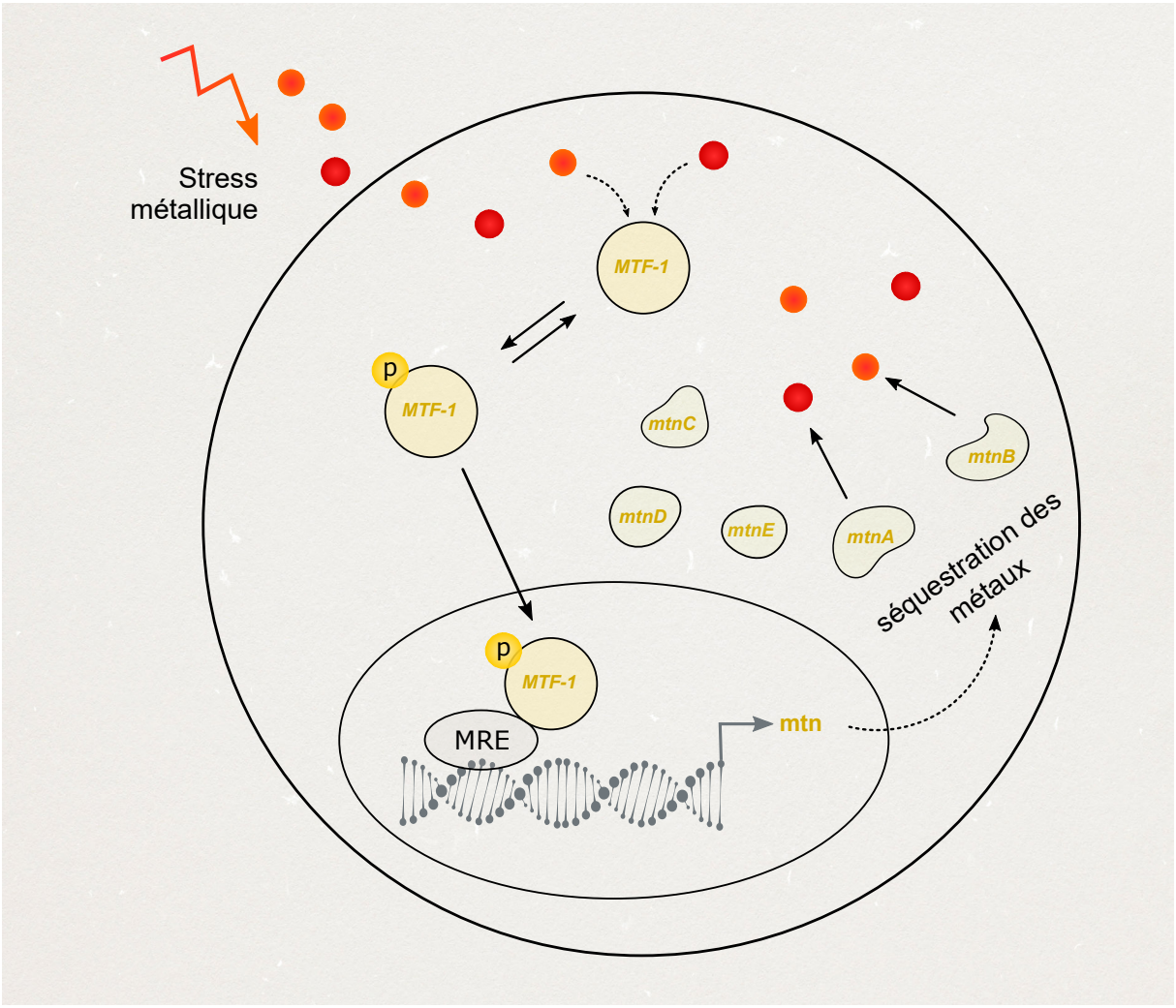


Figure I-11. *Voie de signalisation des métallothionéines (MTs) chez la drosophile. Si des métaux pénètrent la cellule, le facteur de transcription MTF-1 phosphorylé va transloquer au noyau pour activer la transcription des gènes des métallothionéines. Celles-ci vont pouvoir séquestrer les métaux afin d'éviter des dommages à la cellule qui seront ensuite excrétés. Les métallothionéines n'ont pas toutes la même affinité selon le composé métallique.*
MTF-1 : metal trancription factor 1 ; mtn : métallothionéine ; MRE : metal response element; P : phosphorylé.

Voie de signalisation de stress cellulaire hors HSPs et MTs

Comme tous les mécanismes susmentionnés, la cellule dispose de nombreux systèmes de protection contre les menaces externes potentielles. Parmi eux, l'immunité est par excellence un système universel conservé aussi bien dans les clades de vertébrés que d'invertébrés (Hoffmann et al., 1999). Le système immunitaire peut réagir à la suite d'une exposition aux xénobiotiques entraînant des effets variables comme de l'inflammation, de l'apoptose ou encore un dérèglement général du système laissant l'organisme plus vulnérable aux infections (Kouassi et al., 2001; Mokarizadeh et al., 2015; Pohl et al., 2011; Winans et al., 2011).

Chez les insectes, il y deux voies principales inductrices de réponses immunitaires en présence de bactéries ou de champignons : les voies des récepteurs Toll et immune deficiency (*imd*) capables de réguler la production de peptides antimicrobiens tels que la défensine (*def*) ou la drosomycine (**Figure I-12**) (Myllymaki et al., 2014; Valanne et al., 2011). La voie du récepteur immune deficiency interagit avec celle des MAP Kinase régulant elle-même d'autres voies (Stronach et Perrimon, 1999) et dépendante de messagers cellulaires (ou seconds messagers) tels que l'adénosine monophosphate cyclique (*crebA*) (**Figure I-12**) (Mattson et Cheng, 2006).

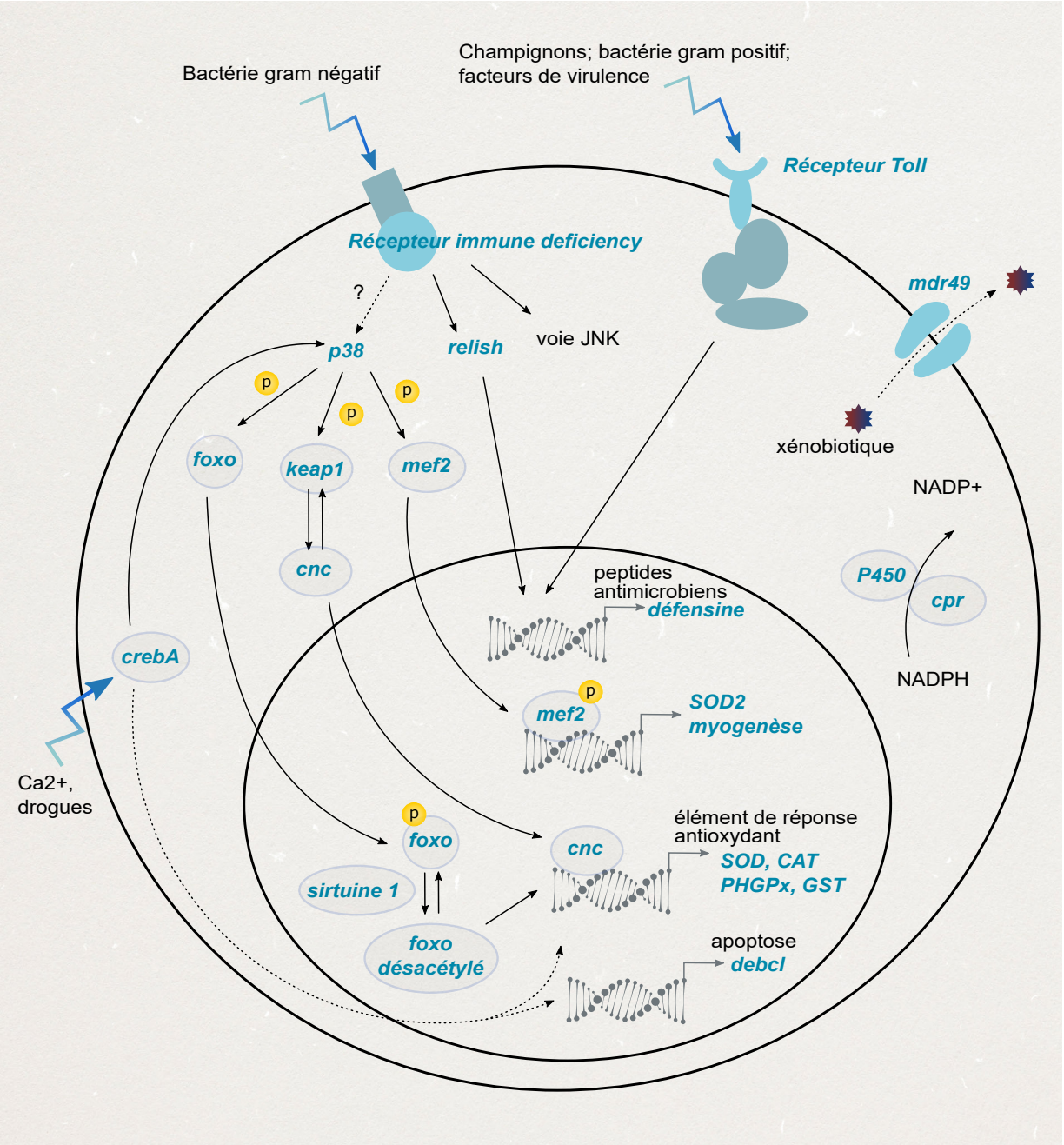


Figure I-12. *Voie de signalisation du stress cellulaire hors HSPs et MTs chez la drosophile. Les voies des réponses immunitaires Toll et immune deficiency interviennent dans la production de peptides antimicrobiens comme la défensine mais aussi dans un certain nombre de voies de signalisation transversales et notamment la voie des Map Kinase par l'intermédiaire de la p38 kinase. Celle-ci phosphoryle de nombreux acteurs moléculaires (foxo, le complexe keap1/cnc ou le facteur de transcription mef2) qui interviennent dans le production d'enzymes antioxydantes (superoxide dismutase, catalasen glutathion-S-transférase etc.) et la myogenèse. La p38 est dépendante de seconds messagers qui permettent également son activation.*
En bleu, de nombreux acteurs moléculaires à l'amont ou à l'aval de ces voies de signalisation et jouant un rôle prépondérant dans la cellule. JNK : kinases c-Jun N-terminal ; cnc : cap-n-collar ; mef2 : myocyte enhancer factor 2 ; crebA : adénosine monophosphate cyclique ; SOD : superoxide dismutase ; CAT : catalase ; PHGPx : gluthatione peroxidase ; GST : glutathione-S-transférase ; debcl : death executioner bcl-2 ; mdr49 : multi drug resistance ; cpr : cytochrome P450 reductase ; NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

L'un des acteurs clés de la voie MAPK, la p38 kinase, permet la phosphorylation de molécules cibles le plus souvent en cascade. La p38 kinase, en plus d'intervenir en cas de stimulation immunitaire, est nécessaire dans la myogenèse par phosphorylation du facteur de transcription *mef2*, dans la régulation de la longévité de la drosophile par l'intermédiaire des voies antioxydantes et apoptotiques (**Figure I-12**) (Keren et al., 2006; Stronach et Perrimon, 1999; Vrailas-Mortimer et al., 2011). Il a été montré que la p38 kinase prépondère dans la régulation des voies foxo et Keap1/Nrf2 (*cnc* chez *Drosophila melanogaster*) menant à la production des enzymes détoxifiantes et antioxydantes (**Figure I-12**) (Brunet et al., 2004; Kobayashi et al., 2004; Sykiotis et Bohmann, 2009). D'autres acteurs « indépendants » participent à la détoxication des xénobiotiques, comme le partenaire des P450, l'enzyme P450 réductase qui catalyse les réactions d'oxydoréduction (*cpr*, **Figure I-12**) (Feyereisen, 1999) et les transporteurs ABC permettant l'excrétion de xénobiotiques toxiques pour la cellule (*multi drug resistance 49 ou mdr49*, **Figure I-12**) (Sharom, 1997; Tapadia et Lakhotia, 2005). Parmi l'ensemble de ces acteurs, il a été montré que plusieurs d'entres eux (ex. catalase, superoxide dismutase, multi drug resistance 49, p38 kinase) voient l'expression de leur gène modifiée à la suite d'expositions à des polluants (ex. DEHP, benzo()pyrène, cadmium) (Park et al., 2012; Vache et al., 2007; Yang et al., 2018).

Conclusion

Drosophila melanogaster apparaît comme un modèle adapté et adaptable à notre étude. Sa biologie permet de travailler sur plusieurs matrices d'études incluant des matrices aqueuses lorsque l'on étudie les stades larvaires. La durée de son développement ainsi que les différents stades de vie (larve, pupe, adulte) en font un atout pour étudier de nombreux traits de vie durant le développement et la vie de cet insecte et ce, sur une échelle de temps relativement courte. De plus, la biologie de ce modèle est très bien référencée dans la littérature et dans le contexte d'exposition à plusieurs familles de polluants pouvant se trouver dans les eaux usées (ex. Abnoos et al., 2013; Atli et Unlu, 2012; Rand et al., 2014; Sorsa et Pfeifer, 1973; Weiner et al., 2014). La possibilité d'étudier plusieurs acteurs moléculaires impliqués dans diverses voies de signalisation cellulaire – régulation hormonale, stress général et spécifique, immunité, détoxication – peut apporter des réponses sur les traits de vie affectés à la suite d'une exposition aux eaux usées (Jennings, 2011; Peterson et Long, 2018; Rand et al., 2014). Bon nombre d'entre eux sont modulés en réponse à une exposition à des substances toxiques. Ils peuvent alors servir de biomarqueurs d'exposition à ces substances ou mélanges de substances dans les eaux usées ou bien servir de biomarqueurs d'effets précoces en réponse à cette exposition.

D. Problématiques, objectifs et stratégie du projet de thèse

Nous avons vu dans ce premier chapitre que les dernières études menées sur le territoire national (plan micropolluants, Recherche de Substance Dangereuses dans l'Eau...) ont montré que les systèmes d'assainissement émettent de façon non négligeable des pollutions impactant la qualité biologique et chimique des cours d'eau (Partaix et al., 2016; UNESCO, 2017). En raison des coûts importants de traitements supplémentaires et à la suite des résultats de ces études, les gestionnaires de réseaux d'assainissement sont désormais dans l'obligation de rechercher les sources d'émission de substances toxiques dans leurs eaux usées (cf. chapitre I – A.2).

Dans la littérature, la plupart des études ont souvent porté sur les eaux traitées en sortie de STEU pour évaluer l'impact de ces rejets sur le milieu naturel ou évaluer l'abattement des polluants en comparant l'entrée/ la sortie (Camacho-Muñoz et al., 2014; Deshayes et al., 2018; Mezzanotte et al., 2016; Morris et al., 2017; Partaix et al., 2016; Petrie et al., 2014; Rogowska et al., 2019). Quelques études ont été réalisées sur les eaux usées brutes dans les réseaux d'assainissement montrant l'importance de les étudier (Bergé et al., 2014; Coquery et al., 2011; Penru et al., 2017; Rule et al., 2006; Sánchez-Avila et al., 2009; Zgheib, 2009). L'approche par la chimie analytique a été privilégiée dans ces études mais peu d'entre elles ont utilisé l'approche toxicologique. Les données de chimie analytique sont très précieuses et nécessaires dans le contexte de suivi des polluants à la source, mais il n'est pas suffisant pour déterminer la toxicité. De plus, les concentrations de ces substances sont généralement faibles (µg/L voire ng/L), ce qui peut rendre difficile leur détection et leur quantification même si les performances analyliques sont de plus en plus efficaces (abaissement des seuils de détection LD et quantification LQ). Des tests toxicologiques permettent parfois de révéler des effets à ces faibles doses (sublétales) ou face à des polluants ayant des courbes de toxicité non monotones. Les eaux usées sont constituées de mélanges de plusieurs composés et donc des interactions (synergie ou antagonisme) de polluants sont possibles (Hennessee et Li, 2016; Hernández et al., 2017; Wang et Fowler, 2008). La chimie analytique ne permet pas de prendre en compte ces intéractions et le danger qu'elles représentent, ni d'évaluer la présence de métabolites biotransformés ou dégradés, ou simplement la présence de polluants non recherchés. Or, un grand nombre de polluants/métabolites sont présents dans les eaux usées (cf. chapitre I – B.2) et tous participent à la toxicité du mélange.

Dans les études d'impact des polluants, il est reconnu que l'utilisation d'essais biologiques renseigne sur la toxicité (Chapman, 1995). Les eaux usées présentent des caractéristiques non vitales voire toxiques pour les organismes aquatiques utilisés dans les études sur l'eau et nécessitent des pré-traitements avant essai expérimental. Des modèles *in vitro* sont donc le plus souvent utilisés car rapide et peu onéreux, montrant différents types de toxicité, mais ils sont souvent très sensibles et moins proches d'une réponse biologique réelle (Benfenati et al., 2010). Le diagnostic est donc dépendant du ou des tests biologiques employés. Un test trop sensible ou trop peu, peut biaiser la conclusion de l'étude.

Drosophila melanogaster a été choisie dans ce contexte en raison de la connaissance riche sur cet animal permettant son utilisation dans divers champs d'application (Jennings, 2011; Tolwinski, 2017) (cf. chapitre I – C). Il reste néanmoins que certains polluants sont moins bien étudiés sur la drosophile ou, de manière générale, sur les insectes comme par exemple le nonylphénol, le DEHP ou encore le glyphosate en comparaison d'autres polluants comme les métaux, mieux documentés. Il y a également un manque d'informations sur le comportement et les effets de ces substances en mélange. Nous avions montré dans une étude préliminaire que la larve de drosophile peut grandir et s'alimenter sur un milieu contaminé aux eaux usées brutes sans traitement pour en étudier la toxicité (Frat, données préliminaires master 2, 2016). Cette découverte nous a permis d'envisager d'utiliser ce modèle comme modèle *in vivo* pour **caractériser la toxicité des eaux usées.**

Cette thèse CIFRE avait pour ligne directrice l'étude et la recherche de substances dangereuses dans les eaux usées d'un réseau d'assainissement par des méthodes physico-chimiques classiques ; et l'évaluation de la toxicité de ces eaux usées en développant un bioessai avec le modèle drosophile dans le but d'améliorer le diagnostic à l'amont des stations d'épuration. Dans cette dynamique, l'Agence de l'Eau Seine-Normandie a apporté un soutien financier et scientifique dans le suivi de ce projet.

LE PREMIER OBJECTIF a été d'évaluer la composition des eaux usées par la chimie analytique. Les recherches ont été orientées sur les eaux usées d'origine industrielle qui transporteraient des charges polluantes plus importantes en raison des activités professionnelles. Quelques effluents domestiques ont aussi été ciblés pour comparaison. Nous avons ainsi pu établir une signature chimique à l'échelle du territoire d'étude et en tirer une analyse critique présentée dans le chapitre II.

LE DEUXIÈME OBJECTIF a été de développer le bioessai et d'éprouver le modèle drosophile soumis à différents stress polluants. Plusieurs familles de polluants présentes dans les eaux usées ont été ciblées et testées en exposition seule ou en mélange. Un autre aspect de cette partie a été la recherche de biomarqueurs d'exposition et d'effet de ces familles. L'ensemble des résultats constitue le chapitre III.

LE TROISIÈME OBJECTIF a été de réaliser les premiers essais biologiques directement avec les eaux usées grâce aux outils développés dans le chapitre III. Ces résultats composent le chapitre IV.

Chapitre II
Caractérisation physico-chimique des eaux usées

«L'eau est la cause matérielle de toute chose,
car l'eau est tout et tout retourne dans l'eau.»

Thalès.

L'essentiel chapitre II *: La caractérisation chimique des eaux usées nécessite quelques prérequis afin d'en tirer des informations pertinentes. La cartographie de son réseau d'assainissement (branchements, emplacement, configuration) et la connaissance de l'environnement du territoire (occupation du sol) font partie de ces prérequis. Ces informations permettent ainsi d'identifier et de définir des bassins de collecte d'eaux usées de nature différente : industrielle, domestique ou mixte. Une fois qu'un maximum d'informations théoriques est rassemblé, une investigation de la qualité chimique des effluents de manière plus approfondie peut être menée. Cette caractérisation nécessite généralement la mesure d'indices de qualité (macropollution, indice de pollution) complétée par des mesures de substances préalablement ciblées. Les paramètres globaux de macropollutions (azote, phoshore, demande chimique et biologique en oxygène) fournissent les premières informations sur la qualité des eaux usées (niveau de pollution globale) et sur la nature des eaux usées (l'azote est un marqueur de l'activité domestique). Cependant, le taux de pollution mesuré au travers de ces paramètres est difficilement corrélable avec la présence de micropolluants en particulier, d'où la nécessité de suivre des substances ciblées qui sont à rechercher en priorité dans la matrice étudiée. Des polluants spécifiques du réseau d'assainissement (ex. graisses, chlorures) peuvent aussi être suivis pour évaluer l'impact sur la qualité et le fonctionnement des ouvrages d'assainissement. Plusieurs substances dangereuses en concentrations « significatives » (concentration du polluant > seuil réglementaire) dans notre réseau ont été identifiées. Et nos résultats semblent indiquer que, de façon globale, les eaux usées non domestiques (industrielles) contiennent davantage de micropolluants en concentrations significatives et seraient donc plus dangereuses et émettrices de substances toxiques. Cependant, quelques unes de ces substances ont été retrouvées de façon ubiquitaire (DEHP, nonylphénol) dans les eaux usées, indiquant que l'origine domestique ne doit pas être négligée dans la recherche de ces substances.*

A. Stratégie pour la caractérisation physico-chimique des eaux usées brutes

A.1. Démarche générale

La démarche de la caractérisation physico-chimique des eaux usées s'inscrit dans la volonté d'améliorer les connaissances sur la composition des eaux usées en réseau d'assainissement et la réduction des sources d'émission de substances toxiques dès que cela est possible. L'objectif à plus long terme est d'assurer via cette démarche, une certaine pérennité de nos écosystèmes aquatiques naturels et le bon état chimique et écologique des masses d'eau.

Le réseau d'assainissement du SIARP est rattaché à la STEU de Cergy-Neuville qui a une capacité supérieure à 10 000 EH. De ce fait, il doit répondre à l'obligation de mettre en place un diagnostic amont dès que des pollutions sont dites « significatives » à la STEU, comme cela est défini par la note technique du 12 août 2016 relative à la recherche et la réduction de micropolluants.

La chimie analytique ne fait pas partie des obligations réglementaires pour répondre à la question de la localisation des sources d'émission de micropolluants, qui se limitent à une étude préalable du réseau d'assainissement et des sources potentielles d'émissions de substances toxiques (étude bibliogaphique). La chimie analytique restant très coûteuse aujourd'hui, elle n'est pas imposée aux gestionnaires de réseaux d'assainissement qui ne bénéficient pas d'un budget supplémentaire dédié. Cependant, cette technique permet de donner du poids aux données bibliographiques et aux connaissances du réseau d'assainissement en permettant de corréler théorie et réalité.

Pour renforcer nos données bibliographiques et obtenir des informations sur la composition de nos eaux usées, nous avons réalisé des mesures chimiques. En raison de la contrainte budgétaire, nous avons fait le choix de mesurer plusieurs micropolluants mais seulement sur un bilan 24H annuel (soit un par an sur trois ans de recherche). L'objectif était de pouvoir confirmer si les sites sélectionnés au préalable étaient bien des sites d'émissions de micropolluants et d'avoir une idée de la composition réelle de nos effluents.

L'expérience acquise par le SIARP au cours de son évolution et de ces travaux de thèse ont conduit à la rédaction d'un *guide pour identifier l'origine des micro-polluants dans les réseaux d'eaux usées et pluviales et mettre en place des actions de réduction à destination des gestionnaires d'assainissement* (Racinais, 2019).

A.2. Connaissances et cartographie du réseau d'assainissement et de son environnement

Avant de se lancer dans la caractérisation physico-chimique des effluents, il est fondamental d'avoir certains prérequis pour que les outils utilisés par la suite soient pertinents à l'étude, d'autant plus quand peu de mesures sont réalisables. La bonne connaissance de son réseau et de son environnement est une des priorités pour débuter la lutte contre les micropolluants. Un réseau d'assainissement est construit par bassins versants fonctionnant par gravité où les eaux usées s'écoulent quasiment sans aide mécanique jusqu'à la STEU. Il est important d'identifier ces bassins et les sous-bassins de collecte des eaux usées, le type d'occupation des sols (particuliers, industriels...), l'emplacement et la configuration du réseau.

Depuis sa création, le SIARP a pu acquérir ces données et mettre en place un système d'information géographique (SIG). Grâce à cet outil, nous avons pu déployer nos moyens d'investigations plus rapidement. Le SIG permet de cartographier ; les communes du territoire, les bassins de collecte d'eaux usées, les linéaires des réseaux d'eaux usées et pluviales et la configuration, les émissaires, les branchements présents, les postes de relevage et la voirie. Avec l'aide de son pôle contrôle, le SIARP a constitué une base de données des entreprises présentes sur son territoire par commune en corrélant les types d'activités et les branchements sur le réseau, et les risques potentiels pour l'environnement et leurs personnels. Le SIARP a ainsi renseigné cette base de données en utilisant sur le terrain des tests à la fluorescéine (marquage fluorescent de l'eau), sonores (vibration), à la fumée ainsi que des inspections télévisuelles pour suivre l'écoulement des effluents dans le réseau et confirmer l'emplacement des branchements mais aussi l'état du revêtement. Les plans locaux d'urbanisation permettent de se renseigner sur le type d'occupation du sol et définir la nature des bassins de collecte. Une fois l'ensemble des informations acquises, des investigations supplémentaires comme des mesures chimiques peuvent être engagées.

A.3. Sélection des sites et des points de prélèvements des eaux usées

Pour le choix des sites et des points de prélèvements, il est indispensable de définir un objectif clair et précis de l'étude à mener pour chaque campagne de prélèvements qui sera réalisée. En fonction de cette question, les types de prélèvements et analyses seront déterminés. Lors de nos campagnes, nous souhaitions avoir une vue d'ensemble de la composition de nos eaux usées lors d'une journée de routine du système d'assainissement (pas de dysfonctionnement ou de déversement ponctuel important de pollutions sur le système d'assainissement, population représentative à l'année) et sur des bassins de collecte majoritairement industriels. Les eaux usées d'origine industrielle sont suspectées d'être plus chargées en polluants toxiques que celles d'origine domestique.

Grâce à la cartographie et la connaissance du réseau d'assainissement et de son environnement, des sites « sensibles » ont été identifiés notamment en raison des activités présentes (clinique hospitalière, métallurgie, aire de lavage de véhicules, laboratoire et industrie pharmaceutique, etc.). *Les caractéristiques de ces sites sont présentées dans la partie B de ce chapitre*.

La sélection des sites de prélèvements doit prendre en compte les contraintes du réseau d'assainissement. Le réseau d'assainissement est constitué de nombreux linéaires en configuration majoritairement séparative. De ce fait, les inversions de branchements présentes non identifiées peuvent amener des eaux pluviales dans le réseau d'assainissement. Or, les eaux pluviales peuvent entraîner des pollutions spécifiques à ce type d'eau (ex. hydrocarbures aromatiques polycycliques) dans le réseau mais aussi diluer les eaux usées brutes (Gasperi et al., 2012; Hwang et Foster, 2006; Weston et al., 2015; Zgheib et al., 2012). Le prélèvement par temps sec permet d'éviter le biais des résultats par l'apport d'eaux pluviales. Et si un bassin de collecte est sur une nappe phréatique, l'étanchéité du réseau d'assainissement doit être confirmée afin de s'assurer qu'il n'y a pas d'infiltration d'eau dites eaux claires parasites permanentes (ECPP) pouvant diluer également les eaux usées brutes et amener d'autres pollutions. Les linéaires du réseau d'assainissement sont amenés à se croiser et se joindre pour acheminer les eaux usées jusqu'à la STEU. Pour éviter le prélèvement partiel ou erroné des sites sélectionnés, il ne doit pas y avoir de nœuds sur le réseau (croisements de plusieurs linéaires). De plus, l'accès à l'intérieur du réseau pour les prélèvements doit être facilité et sécurisé pour le personnel intervenant (localisation sur la voie publique, profondeur, possibilité d'équiper).

Afin de déterminer la période de prélèvements idéale par rapport à notre objectif, nous avons demandé au Comité d'Agglomération de Cergy-Pontoise, le gestionnaire de la STEU de Cergy-Neuville à laquelle le réseau est rattaché, de nous fournir les informations sur les pics de pollutions observés et les débits au cours des dernières années pour réaliser nos bilans 24H. Leurs informations nous ont permis de déterminer que la période la plus optimale était durant le mois de juin ou éventuellement le mois de septembre ; la météo est clémente et la population est représentative de celle présente à l'année. Les mois de juillet et août sont plus problématiques car la population n'est plus représentative en raison de la période de vacances estivales, les entreprises ferment et certains pollueurs malveillants déversent leurs déchets liquides dans le réseau occasionnant de la pollution ponctuelle. Ces malveillances sont parfois connues. Observer ces pics ponctuels peut être intéressant pour tenter de retrouver ces pollueurs mais cela s'écarte de l'objectif initial – qui est de cibler des pollutions permanentes.

A.4. Choix des paramètres physico-chimiques à suivre dans les eaux usées

Les paramètres globaux des macropollutions doivent être systématiquement mesurés pour tirer des informations sur la qualité des eaux usées et le niveau de pollution global. Cependant, ces mesures doivent être complétées par des mesures de substances ciblées car elles sont difficilement corrélables à la présence ou à la quantité de micropolluants qui peuvent être nombreux : métaux, pesticides, alkylphénols, résidus médicamenteux, composés organiques volatiles, etc. (cf. chapitre I – B.2). Il est très difficile de pouvoir tous les suivre d'autant plus que nous sommes limités dans notre choix. Nous avons dirigé nos recherches sur plusieurs des micropolluants de la note technique du 12 août 2016 qui liste les polluants prioritaires à rechercher dans les eaux usées brutes, notre matrice d'étude. En plus de ces micropolluants, des polluants spécifiques du réseau d'assainissement et des installations classés pour l'environnement (ICPE, nombreuses sur notre territoire) ont été suivis. Ces substances peuvent occasionner des dégradations du revêtement et l'obstruction des canalisations et des perturbations des processus épuratoires, ce qui aurait pour conséquences un mauvais fonctionnement des systèmes d'assainissement.

Le **tableau II-4** reprend l'ensemble des paramètres de macro- et micro- pollutions suivis.

Famille	Paramètre	Méthode	Année de prélèvement	Incertitude de mesure
Paramètres globaux	**Azote Kjeldahl (NTK)**	NF EN 25663	2017; 2018; 2019	50%
	Demande biochimique en oxygène (DBO5)	NF EN 1899-1	2017; 2018; 2019	50%
	Demande chimique en oxygène (DCO)	ISO 15705	2017; 2018; 2019	50%
	Matières en suspension (MES)	NF EN 872	2017; 2018; 2019	25%
	Mesure de la température (in situ)	FIQ 75002.04	2017; 2018; 2019	10%
	Mesure du pH (in situ)	NF EN ISO 10523	2017; 2018; 2019	10%
	Volume journalier	NFX10.311	2017; 2018; 2019	-
Alkylphénols	**Nonylphénol**	Méthode interne - LC/MS/MS	2017; 2018; 2019	35%
	Nonylphénol monoéthoxylate (NP1OE)	Méthode interne - LC/MS/MS	2019	45%
	Nonylphénol diéthoxylate (NP2OE)	Méthode interne - LC/MS/MS	2019	40%
	Octylphénol	Méthode interne - LC/MS/MS	2017; 2019	35%
	Octylphénol monoéthoxylate (OP1OE)	Méthode interne - LC/MS/MS	2019	25%
	Octylphénol diéthoxylate (OP2OE)	Méthode interne - LC/MS/MS	2019	35%
Bisphénols	**Bisphénol A**	Méthode interne - LC/MS/MS	2017; 2018; 2019	-
Hydrocarbures aromatiques polycyliques	**Acénaphtène**	NF EN ISO 17993	2017; 2018	30%
	Acénaphthylène	NF EN ISO 17993	2017; 2018	35%
	Anthracène	NF EN ISO 17993	2017; 2018	30%
	Benzo(a)anthracène	NF EN ISO 17993	2017; 2018	35%
	Benzo(a)pyrène	NF EN ISO 17993	2017; 2018; 2019	27%
	Benzo(b)fluoranthène	NF EN ISO 17993	2017; 2018; 2019	25%
	Benzo(g,h,i)perylène	NF EN ISO 17993	2017; 2018; 2019	30%
	Benzo(k)fluoranthène	NF EN ISO 17993	2017; 2018; 2019	25%
	Chrysène	NF EN ISO 17993	2017; 2018	35%
	Dibenz(a,c/a,h)anthracène	NF EN ISO 17993	2017; 2018	25%
	Fluoranthène	NF EN ISO 17993	2017; 2018; 2019	35%
	Fluorène	NF EN ISO 17993	2017; 2018	25%
	Indeno (1,2,3-cd)pyrène	NF EN ISO 17993	2017; 2018; 2019	33%
	Naphtalène	NF EN ISO 17993	2017; 2018	25%
	Phénanthrène	NF EN ISO 17993	2017; 2018	25%
	Pyrène	NF EN ISO 17993	2017; 2018	35%
Métaux et métalloïdes	**Arsenic (As)**	NF EN ISO 11885	2017; 2018; 2019	25%
	Cadmium (Cd)	NF EN ISO 11885	2017; 2018; 2019	25%
	Chrome (Cr)	NF EN ISO 11885	2017; 2018; 2019	38%
	Cuivre (Cu)	NF EN ISO 11885	2017; 2018; 2019	22%
	Fer (Fe)	NF EN ISO 11885	2017; 2018	30%
	Manganèse (Mn)	NF EN ISO 11885	2017; 2018	15%
	Mercure (Hg)	NF EN ISO 17852	2017; 2018; 2019	30%
	Nickel (Ni)	NF EN ISO 11885	2017; 2018; 2019	18%
	Plomb (Pb)	NF EN ISO 11885	2017; 2018; 2019	40%
	Titane (Ti)	NF EN ISO 11885	2017; 2018; 2019	25%
	Zinc (Zn)	NF EN ISO 11885	2017; 2018; 2019	30%
Pesticides	**2,4 MCPA**	Méthode interne - LC/MS/MS	2017	35%
	Acide aminométhylphosphonique (AMPA)	Méthode interne - LC/MS/MS	2017; 2018	40%
	Cypermétrhine	Méthode interne - GC/MS/MS	2017; 2019	30%
	Diuron	Méthode interne - GC/MS/MS	2017; 2018	30%
	Glyphosate	Méthode interne - LC/MS/MS	2017; 2018; 2019	32%
Phtalates	**DEHP**	Méthode interne - GC/MS/MS	2017; 2018; 2019	43%
Chlorophénols	**Pentachlorophénol**	Méthode interne - GC/MS/MS	2017	35%
Polychlorobiphényles (PCB)	**PCB (028, 052, 101, 118, 138, 153, 180)**	Méthode interne - GC/MS/MS	2019	29%
Polybromodiphényléthers (PBDE)	**BDE (028, 047, 099, 100, 153, 154, 183, 209)**	Méthode interne - GC/NCI/MS	2019	37%
Autres polluants et indices	**Acide sulfonique de perfluorooctane (PFOS)**	Méthode interne - LC/MS/MS	2017; 2018; 2019	40%
	Dichlorométhane	Méthode interne - GC/MS/MS	2019	30%
	Halogènes organiques adsorbables (AOX)	NF EN ISO 9562	2017; 2018; 2019	45%
	Indice hydrocarbures C10-C40	NF EN ISO 9377-2	2017; 2018; 2019	25%
	Indice phénol	NF EN ISO 14402	2017; 2018; 2019	25%
	Tributylétain cation	Méthode interne - GC/MS	2019	35%
	Trichlorométhane (chloroforme)	NF EN ISO 10301	2019	25%
Polluants spécifiques du réseau d'assainissement	**Substances extractibles à l'hexane (graisses)**	Méthode interne - Gravimétrie	2017; 2018; 2019	-
	Sulfates	NF EN ISO 10304-1	2017; 2018; 2019	20%
	Chlorures	NF EN ISO 10304-1	2017; 2018; 2019	20%
	Fluorures	NF EN ISO 10304-1	2017; 2018; 2019	40%

Tableau II-4. *Liste des paramètres et méthodes utilisés pour les analyses physico-chimiques réalisées par le laboratoire Eurofins Scientific Est SAS. Les fractions totales des échantillons ont été analysées via des protocoles standardisés ou des méthodes propres au laboratoire. Des incertitudes de mesures sont calculées pour chaque paramètre et représentent la dispersion des valeurs lors des analyses. Ces mesures sont parfois élevées en raison de la complexité de la matrice d'étude à analyser.*

L'objectif des ces mesures n'était pas le suivi de l'évolution des concentrations de pollutions, difficile à réaliser avec peu de répétitions des prélèvements, mais l'obtention d'informations sur la composition chimique des eaux usées, en particulier sur plusieurs sites dont nous suspectons des rejets importants. Ainsi, en fonction des résultats obtenus, des sites de prélèvements, des informations disponibles concernant la STEU de Cergy-Neuville ou encore des contraintes économiques, certains paramètres n'étaient pas toujours mesurés dans les eaux usées en fonction des campagnes de prélèvements.

A.5. Prélèvements des eaux usées et quantification des paramètres suivis

Le prélèvement d'eaux usées doit se faire par un prestataire compétent ou par le gestionnaire d'assainissement s'il dispose des accréditations. Les autorités administratives ne se fiant qu'aux données normées COFRAC, nous avons décidé de faire réaliser les analyses par des prestataires labellisés. Pour nos campagnes, la collecte des échantillons a été réalisée par la société Kalitéo', Gasny (France) tandis que l'ensemble des analyses physico-chimiques a été confiée au laboratoire Eurofins Scientific Est SAS, Maxeville (France), tous deux accrédités COFRAC et agréés dans le cadre de leurs activités.

Méthode de prélèvement

L'échantillonnage est réalisé par des préleveurs automatiques réfrigérés (2 ± 2°C) contenant vingt-quatre flacons. L'utilisation de matériel en téflon permet d'éviter des contaminations extérieures aux prélèvements et des blancs d'échantillonnage de ce matériel ont été réalisés. Le prélèvement est asservi au débit sur une période de 24H et la programmation prévoit le remplissage d'un flacon toutes les heures. Les périodes creuses où le débit est nul ne sont pas prélevées. Un échantillon moyen de la journée est reconstitué par mélange de l'ensemble des flacons et de façon proportionnelle au débit enregistré en continu sur la journée. Cet échantillon moyen est conditionné dans plusieurs contenants appropriés selon les analyses (verre, plastique) qui sont protégés de la lumière et placés à 4°C jusqu'aux analyses par le laboratoire dans les 24h-48h suivant les prélèvements.

Méthodes d'analyse

Le laboratoire en charge des analyses physico-chimiques utilise des protocoles standardisés européens (EN) ou/et français (FR) dits normes d'analyse (**Tableau II-4**). Elles

ont un caractère universel et permettent une comparaison des résultats grâce à l'homogénéité des matériaux et procédures employés. De telles normes ne sont pas disponibles pour tous les micropolluants qui sont alors analysés par des méthodes dites « internes au laboratoire ». Le plus souvent, il s'agit de méthodes performantes comme la chromatographie en phase gazeuse ou liquide couplée à de la spectrométrie de masse en tandem. La note technique du 12 août 2016 prescrit les limites de quantification (LQ) par paramètre et la nécessité d'analyser séparément les fractions dissoutes et particulaires pour chaque paramètre. Le détail des fractions permet d'indiquer si un polluant est plutôt agrégé ou soluble. La fraction totale du polluant regroupant les deux phases des échantillons est donnée dans les résultats (le détail de chaque fraction peut être demandé en fonction de l'objectif de la campagne, il permet d'adapter le traitement STEU et d'informer sur le potentiel devenir des polluants dans l'environnement). Des incertitudes de mesures sont calculées par le laboratoire en raison de la complexité de la matrice étudiée (eaux chargées en matières en suspensions). Ce calcul est réalisé selon quatre approches possibles décrites dans le guide XPT 90-220 qualité de l'eau - *protocole d'estimation de l'incertitude de mesure associée à un résultat d'analyse pour les méthodes d'analyse* physico-chimiques. En pourcentage, ces incertitudes varient de 10% à 50% selon le paramètre mesuré (**Tableau II-4**).

B. Composition physico-chimique des eaux usées brutes

B.1. Campagnes de prélèvements et description des sites

Campagne de prélèvements 2017

Cette première campagne visait une analyse quantitative et qualitative des eaux usées susceptibles d'être polluées, notamment en raison d'activités industrielles. En raison de la taille du territoire, il demeure des secteurs moins contrôlés sur les activités économiques présentes et les inversions de branchements. L'objectif était alors d'obtenir à un instant t, des informations sur la composition de nos eaux usées sur une majorité de sites plus ou moins connus mais considérés comme « sensibles » et donc potentiellement émetteurs de micropolluants. Les eaux usées échantillonnées sur ces sites sont de nature différente ; industrielle ou mixte (mélanges d'eaux usées industrielles et domestiques où l'une des deux origines peut être dominante).

Pour cette campagne, nous avons identifié dix-sept sites d'échantillonnage permettant la collecte d'eaux usées industrielles (● , **Figure II-13**), mixtes à dominante industrielle (● , **Figure II-13**) ou mixtes à dominante domestique (● , **Figure II-13**).

Les prélèvements ont débuté à 12h00 le 27 juin 2017 pour un bilan 24H.

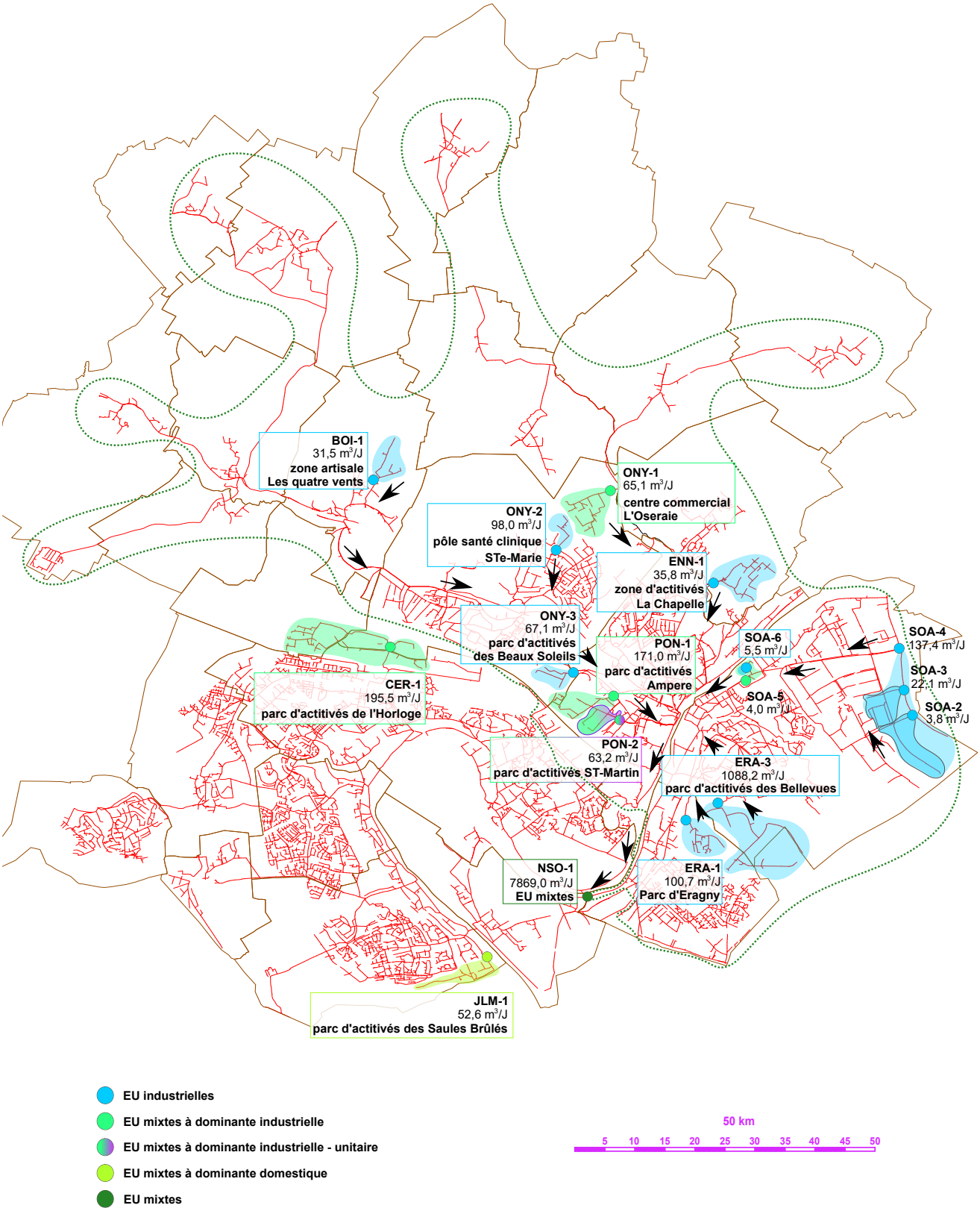


Figure II-13. *Carte de prélèvements des eaux usées récoltées du 27 au 28 juin 2017. Le territoire d'assainissement du SIARP et ses communes est délimité en marron et le réseau d'assainissement est représenté en rouge. Les flèches indiquent le sens de l'écoulement des eaux usées. Dix-sept sites suspectés d'émettre des pollutions on été sélectionnés et leurs débits moyens journaliers sont indiqués (BOI : Boissy l'Aillerie, 1 site de prélèvements ; CER : Cergy , 1 site de prélèvements ; ONY : Osny, 3 sites de prélèvements ; ENN : Ennery, 1 site de prélèvements ; PON : Pontoise, 2 sites de prélèvements ; SOA : Saint-Ouen l'Aumône, 5 sites de prélèvements ; ERA : Eragny, 2 sites de prélèvements ; JLM : Jouy-le-Moutier, 1 site de prélèvements ; NSO : Neuville-sur-Oise, 1 site de prélèvements).*

Boissy l'Aillerie. La commune de Boissy l'Aillerie est située en milieu rural (1 800 habitants environ) hors de l'agglomération de Cergy-Pontoise. La zone artisanale des Quatre Vents rejette des eaux usées industrielles (point BOI-1, **Figure II-13**). En 2017, cette zone restait peu connue de nos services mais plusieurs activités ont ensuite été identifiées : métallurgie, fabrication de peintures, vernis et lubrifiants, mécanique automobile, sérigraphie, transformation de plastique…

Cergy. La commune de Cergy est située dans l'agglomération de Cergy-Pontoise en milieu urbain avec une population d'environ 64 000 habitants. Les eaux usées du bassin de collecte CER-1 (**Figure II-13**) sont mixtes à dominante industrielle. En plus du parc d'activités de l'Horloge (eaux usées industrielles et assimilées domestiques), un certain nombre de logements individuels sont présents sur la partie Puiseux-Pontoise – à l'Ouest (eaux usées domestiques). Certaines activités sont référencées ; restauration collective, mécanique automobile, recherche industrielle et laboratoire de recherche, fabrication de support chromatographique de laboratoire…

Osny. La commune d'Osny est située dans l'agglomération de Cergy-Pontoise en milieu urbain avec une population d'environ 17 500 habitants. Le bassin de collecte ONY-1 (**Figure II-13**) permet d'échantillonner les eaux usées mixtes à dominante industrielle du centre commercial L'Oseraie. Les activités rejettent des eaux assimilées domestiques (vente de mobilier, de vêtements, objets de décoration…) et des eaux usées industrielles (restauration collective, lavage de véhicules, préparation alimentaire de produits bruts type boucherie…). Les autres bassins permettent la collecte d'eaux usées industrielles du pôle de santé « Clinique Sainte Marie » (point ONY-2, **Figure II-13**) (centre radiographie, analyse médicale en circuit ouvert…) et du parc d'activités des Beaux Soleils (point ONY-3, **Figure II-13**) (préparation de repas, industrie automobile, restauration collective…).

Ennery. La commune d'Ennery est située hors de l'agglomération de Cergy-Pontoise en milieu rural avec une population d'environ 2 400 habitants. Le point de collecte ENN-1 (**Figure II-13**) permet l'échantillonnage des eaux usées industrielles de la zone d'activités de la Chapelle Saint Antoine. Des activités de type carrosserie et mécanique automobile, aires de lavage et restauration collective sont présentes.

Pontoise. La commune de Pontoise est située dans l'agglomération de Cergy-Pontoise en milieu urbain avec une population d'environ 31 600 habitants. Une partie du réseau est en configuration unitaire (PON-2, **Figure II-13**). Ces deux bassins

de collecte (PON-1 et -2, **Figure II-13**) permettent l'analyse des eaux usées des parcs industriels Ampere (cosmétiques, restauration collective...) et St-Martin (industrie automobile, restauration collective...) dont quelques activités sont connues de nos services.

Saint-Ouen l'Aumône. La commune de Saint-Ouen l'Aumône est située dans l'agglomération de Cergy-Pontoise en milieu urbain avec une population d'environ 24 700 habitants. Les points d'échantillonnage SOA-2 à -6 (**Figure II-13**) permettent de découper le grand bassin de collecte industriel de cette commune en plusieurs sous-bassins. Il y a plusieurs grands parcs d'activités qui génèrent des eaux usées industrielles avec des activités de type traitement de solvant, incinérateur de déchets avec lavage des fumées, restauration collective, fabrication de parfums et cosmétiques, aires de lavage, transformation du plastique... Des logements collectifs générant des eaux usées domestiques sont présents au niveau du point d'échantillonnage SOA-5 (**Figure II-13**), qui en font un point de collecte d'eaux usées mixtes mais à dominante industrielle.

Eragny. La commune d'Eragny est située dans l'agglomération de Cergy-Pontoise en milieu urbain avec une population d'environ 16 700 habitants. Les bassins de collecte (ERA-1 et -3, **Figure II-13**) permettent l'analyse des eaux usées des parcs industriels d'Eragny (restauration collective, gare ferroviaire, activité électronique, industrie automobile...) et des Bellevues (restauration collective, laboratoire de recherche...).

J***ouy-le-Moutier***. La commune de Jouy-le-Moutier est située dans l'agglomération de Cergy-Pontoise en milieu urbain avec une population d'environ 16 100 habitants. Il y a un très grand nombre d'habitations sur ce bassin de collecte (JLM-1) et un seul parc d'activités (les Saules Brûlés) rejette des eaux usées industrielles (mécanique automobile et de la restauration collective principalement). Les eaux usées de ce bassin de collecte sont considérées mixtes à dominante domestique.

Neuville-sur-Oise. Ce point a été choisi pour avoir une idée de la composition d'un effluent entrant en station d'épuration (STEU Cergy-Neuville). Il permet de collecter les eaux usées de plusieurs communes à l'exception de celles de Cergy et Jouy-le-Moutier. Les eaux usées récoltées au niveau de ce point (NSO-1) sont considérées comme mixtes sans prédominance, difficiles à évaluer (● , **Figure II-13**).

Campagne de prélèvements 2018

À la suite des résultats de l'année 2017, cette seconde campagne visait le suivi de l'évolution d'effluents le long d'une branche du réseau passant par plusieurs communes limitrophes et identifiées comme « prioritaires » (émettrices de pollutions). La campagne de mesure s'est déroulée sur trois communes ; Saint-Ouen l'Aumône, Eragny et Neuville-sur-Oise (**Figure II-14**). C'était également l'occasion d'affiner l'identification de sources d'émission de pollutions sur ces communes.

Onze points de mesures ont été sélectionnés permettant la collecte d'eaux usées industrielles (, **Figure II-14**), mixtes à dominante industrielle (, **Figure II-14**), mixtes à dominante domestique (, **Figure II-14**) ou mixtes (, **Figure II-14**). Les prélèvements ont été réalisés en différé pour suivre l'écoulement des l'effluents durant leur trajet du point de départ au point d'arrivée. Sur une base de vitesse d'écoulement comprise entre 0,8 et 1,0 m/s, les prélèvements ont été déclenchés à des temps différents pour chaque point ; entre 7h00 et 9h15 à Saint-Ouen l'Aumône la première commune du filaire, à 10h50 (ERA-2) et 11h08 (ERA-1) à Eragny la seconde commune et à 12h02 (NSO-1) et 12h10 (NSO-2) à Neuville-sur-Oise la dernière commune.

Initialement la date de prélèvements était prévue en juin comme l'année précédente. Mais cette année, le comité d'agglomération de Cergy-Pontoise a lancé sa campagne d'analyse des micropolluants à la station d'épuration de Cergy-Neuville conformément aux nouvelles dispositions de la note technique du 12 août 2016. Un des prélèvements à la STEU a eu le lieu le 18 juillet 2018. Suite à ces informations, nous avons choisi de décaler nos prélèvements afin d'évaluer la cohérence des polluants présents dans nos eaux usées et ceux identifiés en STEU.

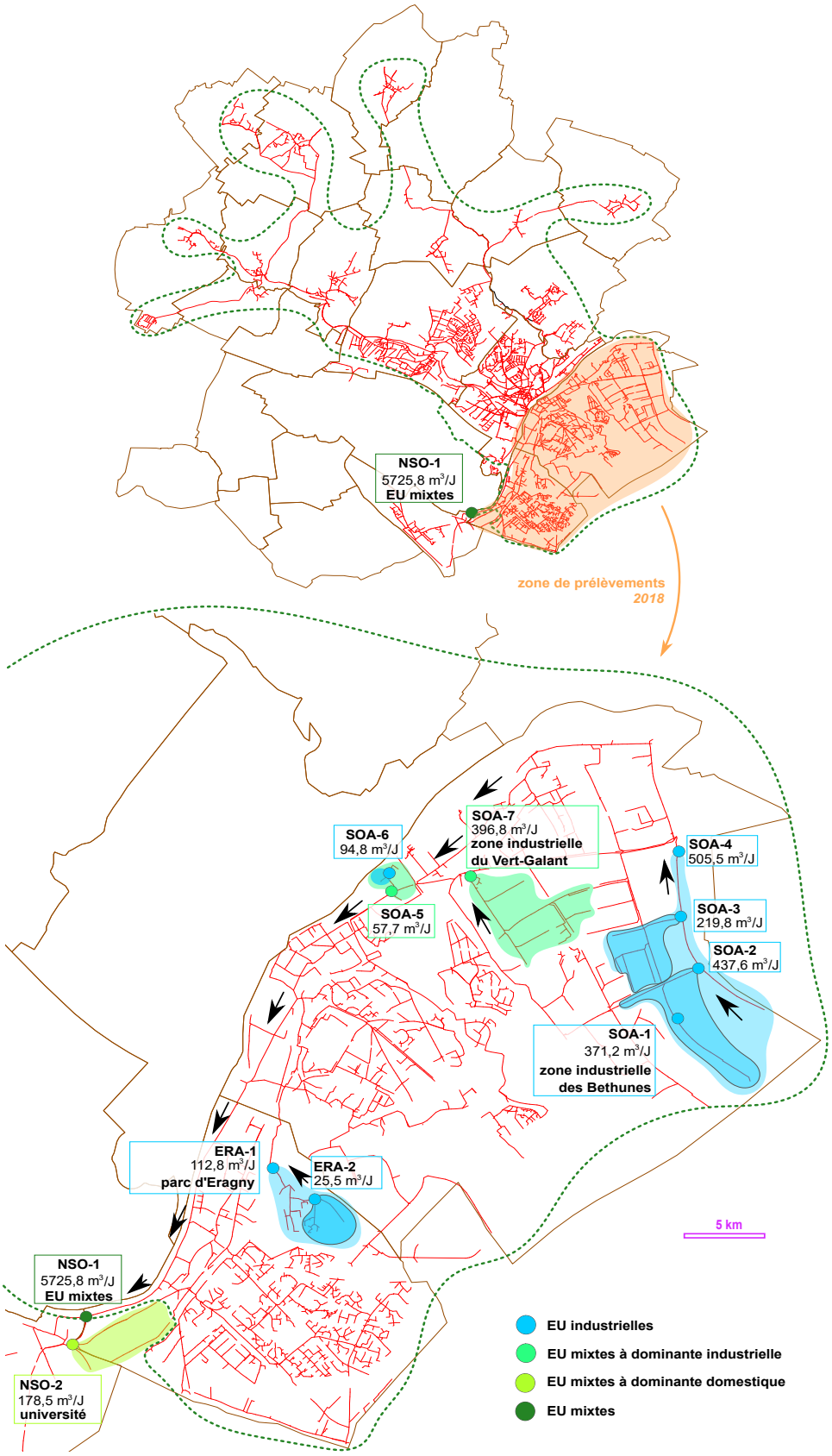


Figure II-14. *Carte de prélèvements des eaux usées récoltées du 17 au 18 juin 2018. Les communes du territoire sont délimitées en marron et le réseau d'assainissement est représenté en rouge. Les flèches indiquent le sens de l'écoulement des eaux usées. Trois communes limitrophes identifiées comme davantage émettrices de pollutions en 2017 ont été sélectionnées pour approfondir les recherches de sources d'émission. Les chiffres indiquent les débits moyens journaliers enregistrés lors des prélèvements. (SOA : Saint-Ouen l'Aumône, 7 sites de prélèvements ; ERA : Eragny, 2 sites de prélèvements ; NSO : Neuville-sur-Oise, 2 sites de prélèvements)*

Saint-Ouen l'Aumône. Les eaux usées de cinq des sept bassins de collectes sélectionnés ont déjà été analysées en 2017 (SOA-2 à -6, **Figure II-14**). Ils ont de nouveau été choisis pour affiner les recherches sur les sources d'émission polluante et de vérifier la conformité des rejets après des contrôles effectués à la suite des résultats en 2017. Le nouveau point SOA-1 permet de créer un nouveau sous-bassin sur le parc industriel des Béthunes (**Figure II-14**). Le point SOA-7 ne fait pas partie du filaire étudié mais permet de prendre en compte une partie du bassin de collecte de la zone industrielle Vert-galant qui regroupe plusieurs activités de type travail des métaux, transports FRET, lavage de véhicules, industrie automobile... (**Figure II-14**).

Eragny. Le point ERA-1 a été une première fois analysé en 2017. Suite aux résultats, il a été décidé de découper ce bassin de collecte en deux (ERA-2, **Figure II-14**) afin de pouvoir identifier une ou plusieurs sources d'émission polluante.

Neuville-sur-Oise. Le grand bassin de collecte NSO-1 a été conservé pour l'observation de la composition chimique d'un effluent en entrée de STEU et récupère les effluents de Saint-Ouen l'Aumône et d'Eragny. Le nouveau point, en dehors du linéaire étudié, permet d'avoir une idée sur la composition des rejets d'une université, de nature généralement assimilée domestique et pouvant contenir des pollutions (NSO-2, **Figure II-14**).

Campagne de prélèvements 2019

Pour cette dernière campagne, il a été décidé d'étudier une branche plus courte du réseau d'assainissement en suivant des effluents de nature initialement différente se rejoignant dans le réseau. Cette stratégie d'étude, similaire à celle appliquée en 2018, peut aider à la compréhension de la dynamique des effluents au sein d'un réseau d'assainissement. En passant par plusieurs secteurs (domestiques/industriels), les eaux usées peuvent se charger en micropolluants ou au contraire se diluer. Le trajet des effluents en 2018 était assez long et les points n'étaient pas assez nombreux pour suivre correctement l'évolution des effluents. Le suivi sur un trajet plus court reste davantage optimal dans nos conditions.

La commune de Boissy l'Aillerie présente une configuration optimale pour réaliser cet objectif et avait été identifiée parmi les communes davantage émettrices de pollutions en 2017. Quatre points de prélèvements ont été choisis per-

mettant l'échantillonnage d'eaux usées industrielles (●, **Figure II-15**), domestiques (● , **Figure II-15**) et mixtes à dominante domestique (● , **Figure II-15**). Les effluents industriels en provenance du secteur industriel (BOI-1) et domestique (BOI-2) se rejoignent et se mélangent au point BOI-3, où il y a un apport domestique supplémentaire venant de quelques habitations après la zone artisanale (**Figure II-15**). Le dernier point à l'aval (BOI-4) permet d'étudier le mélange de nos effluents industriels et domestiques avec un apport important d'eaux usées domestiques (**Figure II-15**).

Les prélèvements ont été déclenchés le 25 juin 2019 pour un bilan 24H en différé pour suivre nos effluents le long du linéaire, de la même manière qu'en 2018. Ainsi Le premier prélèvement a débuté à 8h00 à BOI-1, le second à 8h07 à BOI-2, le troisième à 8h10 à BOI-3 et le dernier à 8h20 à BOI-4 selon l'écoulement des effluents selon une vitesse comprise entre 0,8 et 1,0 m/s.

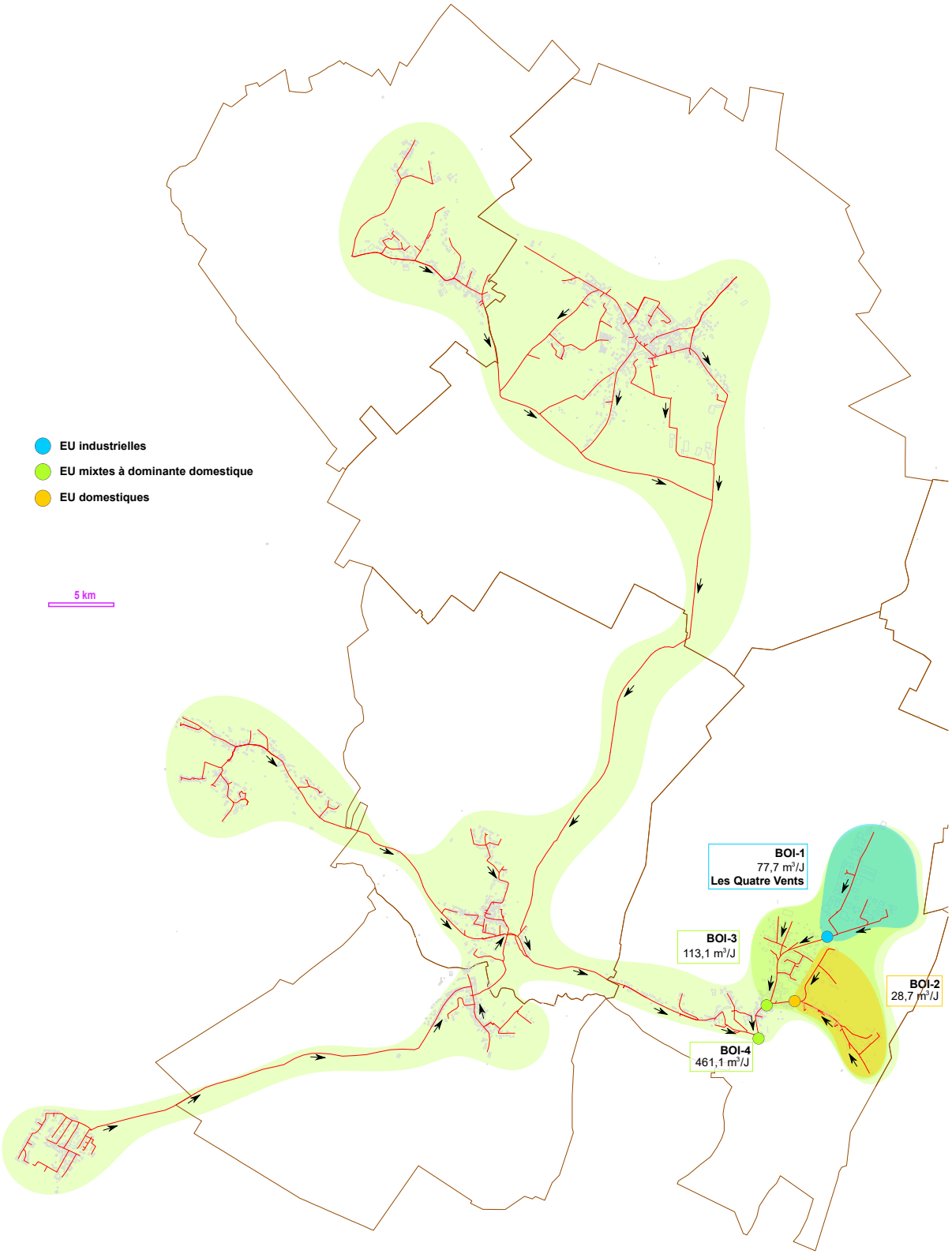
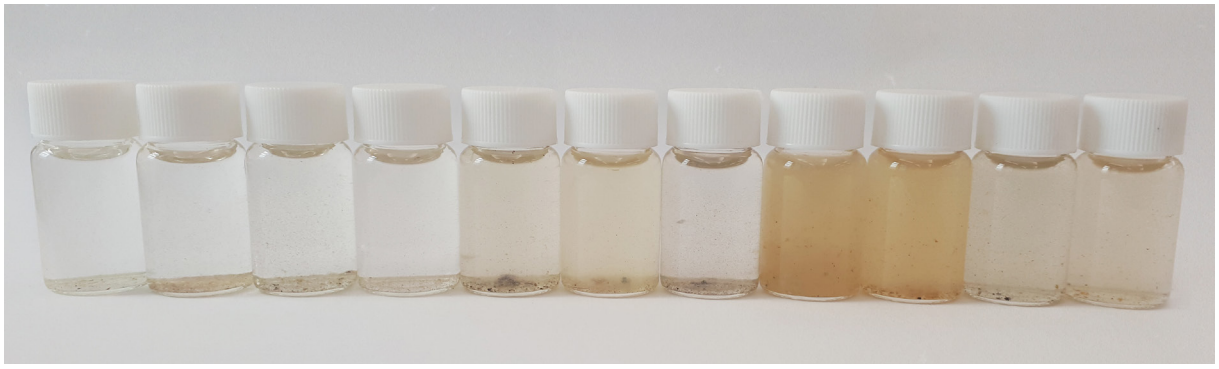


Figure II-15. *Carte de prélèvements des eaux usées récoltées du 25 au 26 juin 2019 sur la commune de Boissy l'Aillerie. La commune et les communes limitrophes de Boissy l'Aillerie sont délimitées en marron et le réseau d'assainissement est représenté en rouge. Les flèches indiquent le sens de l'écoulement des eaux usées et les chiffres indiquent les débits moyens journaliers enregistrés lors des prélèvements. (BOI : Boissy l'Aillerie, 4 sites de prélèvements).*

B.2. Composition physico-chimique des eaux usées

L'aspect des eaux usées peut être un indicateur qualitatif. La couleur et l'odeur peuvent être influencées par différents facteurs. Par exemple, les rejets d'industrie du textile et des cosmétiques qui utilisent des pigments peuvent conférer une couleur reconnaissable aux eaux usées (Verma et al., 2012). Mais la couleur n'est cependant pas un facteur « grave » de pollution et n'est pas un indicateur fiable de la présence de micropolluants. Elle peut cependant avoir des conséquences dans l'environnement (mauvaise pénétration de la lumière, eutrophisation).

Les eaux usées ne sont pas nécessairement opaques et chargées de matières comme le montre la photographie des échantillons prélevés ci-dessous.



B.2.1. Paramètres globaux : les macropollutions

Rappel sur les paramètres globaux

Les eaux usées sont par définition polluées et ces paramètres donnent des informations sur le taux de pollution globale. En cas de trop fortes concentrations dans les eaux usées, ces macropollutions peuvent engendrer des dysfonctionnements auto-épuratoires à la STEU et en baisser le rendement (populations de microorganismes modifiées). Si la charge polluante globale est trop élevée en sortie de STEU pour le milieu naturel, les risques d'eutrophisation et de formation de zones hypoxiques sont plus élevés.

Pour les eaux usées, un flux GEREP est défini pour chacun de ces paramètres et l'on peut s'appuyer sur les valeurs limites d'émission (VLE), tous deux définis réglementairement. Au delà de ces seuils, les concentrations ou flux sont considérés comme « significatif » et des mesures de réductions doivent être prises.

	Flux GEREP *(kg/an)*	VLE *(mg/L)*
DBO5	43000	800
DCO	150000	2000
MES	300000	600
Azote	50000	150
Phosphore	5000	50

Origine EU	Industrielle																			
Année	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2018	2017	2017	2017	2017	2017	2019
Nom du	SOA-1	SOA-2		SOA-3		SOA-4		SOA-6		ERA-1		ERA-2	ERA-3	ONY-2	ONY-3	ENN-1	BOI-1	
DBO5	9,0	70,0	29,0	150,0	73,0	32,0	67,0	170,0	460,0	1900,0	3100,0	530,0	160,0	150,0	1200,0	130,0	470,0	560,0
DCO	125,0	342,0	488,0	487,0	286,0	449,0	281,0	860,0	1670,0	7930,0	4310,0	2200,0	583,0	502,0	2840,0	590,0	8880,0	1460,0
MES	82,0	290,0	170,0	260,0	160,0	210,0	140,0	140,0	210,0	2800,0	3000,0	880,0	450,0	880,0	690,0	340,0	1300,0	640,0
NTK	7,6	30,4	20,4	82,8	35,6	37,8	22,8	113,0	49,6	175,0	139,0	128,0	64,9	56,7	87,0	65,6	103,0	93,9
pH	6,9	7,5	7,4	7,8	7,5	7,6	7,3	7,9	6,3	5,9	6,3	7,3	7,5	7,7	6,1	7,8	4,2	8,2
Phosphore	1,3	4,3	2,8	11,0	15,0	3,2	9,2	11,0	180,0	51,0	25,0	25,0	8,5	11,0	17,0	8,1	25,0	11,0

Origine EU	Mixte à dominante industrielle						Mixte à dominante domestique				Domestique	Mixte avant STEU	
Année	2017	2017	2017	2017	2017	2018	2017	2018	2019	2019	2019	2017	2018
Nom du point	ONY-1	CER-1	PON-1	PON-2	SOA-5	SOA-7	JLM-1	NSO-2	BOI-3	BOI-4	BOI-2	NSO-1	
DBO5	420,0	3100,0	150,0	44,0	4000,0	120,0	100,0	120,0	240,0	960,0	690,0	430,0	200,0	220,0
DCO	985,0	7310,0	780,0	195,0	9100,0	789,0	488,0	569,0	524,0	1960,0	1800,0	970,0	1150,0	754,0
MES	410,0	830,0	150,0	97,0	220,0	280,0	380,0	240,0	230,0	560,0	1100,0	460,0	750,0	310,0
NTK	83,5	200,0	62,6	29,5	104,0	64,5	53,5	87,8	65,0	138,0	123,0	102,0	100,0	68,7
pH	7,3	5,2	8,2	8,1	6,5	6,9	7,3	7,8	7,7	8,0	7,8	7,6	7,5	7,5
Phosphore	6,5	44,0	12,0	3,4	9,2	110,0	5,8	8,4	8,9	19,0	11,0	8,3	13,0	9,3

Tableau II-5. *Concentrations (mg/L) des paramètres globaux des échantillons d'eaux usées analysés au cours des trois campagnes de prélèvements (2017, 2018 et 2019). Les résultats sont classés selon l'origine des eaux usées ; ● industrielle, ● mixte à dominante industrielle, ● mixte à dominante domestique, ● domestique, ● mixte. En rouge, les valeurs significatives selon les critères de l'encadré « rappel sur les paramètres globaux » qui indiquent un dépassement des valeurs seuils réglementaires.*

2017. Les sites majoritairement industrialisés des communes de Boissy l'Aillerie (BOI-1), Eragny (ERA-1 et -3), Osny (ONY-3), Saint-Ouen L'Aumône (SOA-5) et Cergy (CER-1) présentaient de forts dépassements des concentrations (ou en flux) seuils des paramètres globaux – jusqu'à 4000 mg/L de DBO5, 9100 mg/L de DCO, 3000 mg/L de MES, et 200 mg/L de NTK (**Tableau II-5**). Le pH était aussi très acide, inférieur à 5,5 à Boissy l'Aillerie (BOI-1) et Cergy (CER-1), ce qui peut causer des dommages aux canalisations. Du phosphore en concentration significative a été mesuré sur le secteur d'Eragny (ERA-1). Ces résultats indiquent que les rejets industriels pourraient favoriser la concentration de pollution dans le réseau. Cependant, il est notable que des eaux usées de même nature mais prélevées sur d'autres sites (SOA-2, -3, -4 et -6, ONY-2, ENN-1) ne présentaient que peu ou pas de dépassement sur ces paramètres traduisant des flux de macropollutions classiques pour des eaux usées (**Tableau I-2,** page 44). Le secteur du point SOA-5 récupère les effluents industriels des eaux usées du point SOA-6, relativement peu contaminées (**Tableau II-5 et Figure II-13**). De forts dépassements en DBO_5 et DCO étaient observables, ce qui traduit la présence d'une source de pollution industrielle ou domestique ayant contribué à ces dépassements sur ce bassin de collecte ou à l'amont (**Figure II-13**). Les eaux usées mixtes à domiante domestique (JLM-1) présentaient un ensemble de concentrations des macropollutions non significatif (**Tableau II-5**). Les eaux usées d'origine domestique présentent généralement des valeurs de macropollutions plus faibles que les eaux industrielles (à l'exception de l'azote). Enfin, les eaux usées mixtes du point NSO-1 que l'on a voulu représentatives d'un effluent avant entrée de station,

présentaient des flux significatifs de tous les paramètres globaux à l'exception du pH. Ce secteur récupère des volumes d'eaux usées conséquents de l'ensemble du territoire d'assainissement (**Figure II-13**). Ces résultats indiquent que la dilution des eaux usées n'est pas suffisante afin d'avoir des concentrations et des flux non significatifs en entrée de STEU.

2018. Initialement, nous avions voulu suivre le trajet de nos effluents le long d'une branche de notre réseau d'assainissement sur des communes limitrophes. Cependant l'objectif était ambitieux en raison de la longueur de ce linéaire et les points trop éloignés. Nous avons découvert via de récentes inspections télévisuelles (ITV) que le linéaire n'est pas respecté et que le réseau dévie de ces points. Cependant cette campagne nous a permis de redécouper le grand bassin industriel de Saint-Ouen l'Aumône, d'explorer le bassin de collecte du parc industriel d'Eragny (ERA-1) et d'évaluer le rejet de l'université de Neuville-sur-Oise.

Les résultats des sous-bassins de collecte de la zone industrielle des Béthunes de Saint-Ouen l'Aumône montrent qu'il y a peu d'apport de pollution globale le long de cette branche au moment des prélèvements et que les valeurs des concentrations étaient constantes entre 2017 et 2018 (SOA-1 à -4) (**Tableau II-5**). Au point SOA-6, une concentration élevée de phosphore avait été enregistrée. Le phosphore peut provenir des produits nettoyants des cuves de rétention des industriels présents sur ce bassin de collecte. La concentration en phosphore est ensuite diluée mais restait significative au point SOA-5 (**Tableau II-5, Figure II-14**). En comparaison des résultats de 2017, les concentrations des macropollutions sont inférieures aux seuils de significativité à ce point. Sur le secteur du parc industriel de Vert-Galant (SOA-7), aucun des paramètres globaux ne présentait de dépassements des concentrations seuils. A Eragny, les résultats des bassins de collecte du parc industriel (ERA-1 et -2) indiquaient des dépassements des macropollutions en ces deux points de mesures, avec des valeurs relativement constantes entre 2017 et 2018 (**Tableau II-5**). Enfin à Neuville-sur-Oise, le secteur universitaire (NSO-2) ne présentait pas de rejets importants de pollution. Néanmoins, les prélèvements ont été réalisés en juillet et l'activité universitaire est ralentie en l'absence des étudiants. Les travaux de Bergé et al. (2014) ont cependant montré des valeurs similaires d'eaux usées en sortie d'universités. Le secteur NSO-1 présente les mêmes problématiques qu'en 2017.

Pour les points analysés en 2017 puis en 2018, les résultats montraient parfois des concentrations ou flux de pollutions constants ou non. Il est difficile d'en tirer des conclusions en raison du nombre de mesures mais des hypothèses peuvent être posées. Lorsque

les valeurs sont constantes d'une année à l'autre, il est possible que le bassin de collecte émette de façon permanente des pollutions. Tandis qu'une baisse de concentrations ou de flux de pollution pourrait être due à une source d'émission ponctuelle au moment des mesures, mais aussi à une activité réduite sur le réseau d'assainissement (prélèvements lors de la période estivale en 2018) ou à des remises en conformité des installations par les agents du SIARP (ex. contrôles des rejets, installations d'équipements plus performants).

2019. À la suite des résultats en 2017, de nombreux contrôles des installations industrielles avaient été entrepris à Boissy l'Aillerie, notamment au niveau de la zone industrielle. Une nette amélioration des paramètres globaux était observable au point BOI-1 qui pourrait être expliquée par ces contrôles (**Tableau II-5**). En revanche, à l'aval des trois premiers secteurs analysés (BOI-4), des valeurs significatives sont mesurées pour la DBO_5, DCO et les MES. Il s'agit notamment d'un secteur mixte où un grand apport domestique rejoint les eaux usées des bassins de collecte 1, 2 et 3 (**Figure II-15**). L'hypothèse de l'apport de pollutions en ce point peut être appuyée par des rejets contaminés en provenance de la partie Ouest non analysée ou par la présence d'une ou plusieurs sources d'émission le long du trajet de l'effluent en provenance du bassin de collecte n°3 (**Figure II-15**).

Origine des eaux usées. Des informations sur la charge de pollution globale ont été obtenues en moyennant les résultats en fonction de l'origine des eaux usées (industrielle, domestique ou mixte) (**Figure II-16, A**) et une analyse en composante principale permet de quantifier les corrélations entre les données (**Figure II-16, B**).

A

	Origine EU	Industrielle				Mixte à dominante industrielle				Mixte à dominante domestique				Domestique
		min	med	moy	max	min	med	moy	max	min	med	moy	max	-
Paramètres globaux	DBO5	9,0	155,0	514,4	3100,0	44,0	150,0	1133,4	4000,0	120,0	465,0	502,5	960,0	430,0
	DCO	125,0	586,5	1904,6	8880,0	195,0	789,0	2806,7	9100,0	524,0	1184,5	1213,3	1960,0	970,0
	MES	82,0	315,0	702,3	3000,0	97,0	280,0	338,1	830,0	230,0	400,0	532,5	1100,0	460,0
	NTK	7,6	65,3	73,0	175,0	29,5	64,5	85,4	200,0	65,0	105,4	103,5	138,0	102,0
	pH	4,2	7,5	7,1	8,2	5,2	7,3	7,1	8,2	7,7	7,8	7,8	8,0	7,6
	Phosphore	1,3	11,0	23,3	180,0	3,4	9,2	27,3	110,0	8,4	10,0	11,8	19,0	8,3

B

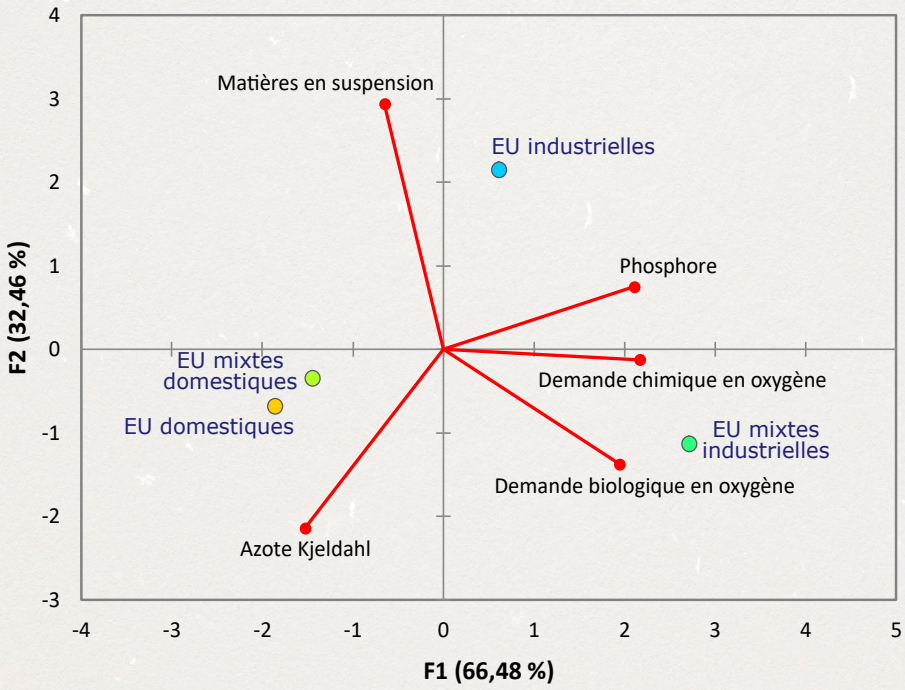


Figure II-16. A) *Moyennes des concentrations (mg/L) des prélèvements des paramètres globaux en fonction de l'origine des eaux usées. Les résultats sont classés selon l'origine des eaux usées ;* ● *industrielle (n=18 mesures),* ● *mixte à dominante industrielle (n=7 mesures),* ● *mixte à dominante domestique (n=4 mesures),* ● *domestique (n=1 mesure).* **B)** *Biplot de l'analyse en composante principale permettant de représenter les variables (macropolluants) et les observations (nature des eaux usées). Cette analyse a été construite à l'aide des données du tableau A de cette figure.*

Les eaux usées d'origine industrielle présentent ainsi les valeurs extrêmes les plus hautes mais aussi les plus faibles, ce qui montre une importante variabilité des flux de pollutions (**Figure II-16, A**). Cette amplitude pourrait être expliquée par la variabilité des volumes d'eaux importants et continus durant la journée dans certains cas. Des équipements de prétraitement sont parfois installés pour prétraiter leurs eaux usées avant le rejet dans le réseau d'assainissement. Ces installations permettent de réduire la charge de pollution entrante. Dans la littérature, Bergé et al. (2014) ont mesuré ces mêmes paramètres sur plusieurs eaux usées industrielles provenant d'activités très diversifiées et ont également obtenu une forte amplitude sur les résultats. La présence d'activités industrielles de natures différentes sur notre territoire peut expliquer également ces amplitudes. Dans les eaux usées de nature domestique, les concentrations de DBO_5, DCO, MES et phosphore tendaient à diminuer, mais les concentrations moyennes d'azote restaient davantage élevées (**Figure II-16, A**). Des valeurs similaires avaient également été rapportées par Zgheib (2009) pour des eaux usées domestiques. Le pH moyen avoisine 7-8 dans les eaux usées, indiquant qu'il n'est ni trop acide ni trop basique et donc non dangereux pour le réseau d'assainissement (**Figure II-16, A**).

L'analyse en composante principale (ACP) permet de représenter l'ensemble des données acquises au cours de ces travaux et de tirer des corrélations entre les différentes variables étudiées, les paramètres physico-chimiques et la nature des eaux usées. La première représentation ciblant la macropollution uniquement permet d'expliquer plus 98,94% de la variabilité observée (**Figure II-16, B**). L'ACP montre que les compositions en macropollutions des eaux usées d'origine industrielle (mixte et stricte) sont corrélées positivement sur l'axe F1, bien que la corrélation reste plus faible pour les eaux industrielles (**Figure II-16, B**). Cet axe est caractérisé par la présence de macropollutions de type DBO_5, DCO, phosphore et l'absence d'azote. Sur l'axe F2, les compositions entre les eaux usées industrielles mixtes et strictes sont corrélées négativement, probablement en raison des concentrations en matières en suspensions plus élevées dans les eaux usées industrielles strictes que dans les autres matrices. Les compositions des eaux usées de nature domestique sont quant à elles, proches et corrélées négativement à l'axe F1 (plus faibles concentrations de macropollutions de type DBO_5, DCO et phosphore, **Figure II-16, B**). L'azote est fortement corrélé négativement à l'axe F2 et positivement aux compositions des eaux usées de nature domestique (**Figure II-16, B**). L'azote est excrété par l'Homme sous forme organique et sera ensuite minéralisé dans le cycle de l'azote par les microorganismes. Il sert ainsi de marqueur de la contamination domestique. L'azote peut

également provenir d'activités agricoles (ex. engrais). Au vu des résultats acquis dans cette étude, les eaux usées à composante industrielle majoritaire sont plutôt caractérisées par la présence de matières en suspensions, DCO, DBO_5 et phosphore tandis que les eaux usées de nature domestique sont plutôt caractérisées par la présence d'azote.

Au cas par cas, les analyses révèlent que les eaux usées industrielles ne transportent pas toutes des charges de pollutions importantes et dépendent de l'environnement (activités, population, etc.). Pris de façon globale, les résultats indiquent néanmoins une tendance de certaines macropollutions (ex. matières en suspension, DCO, phosphore) à être émises davantage dans les eaux usées de nature industrielle. Aussi, la répétabilité de nos mesures est faible et espacée d'une année à l'autre, les secteurs d'activités variés et la présence de sources ponctuelles de pollutions est susceptible de conditionner les résultats. Cependant, cette même tendance avait été observée par Camacho-Muñoz et al. (2014).

En termes de traitement, bien que des concentrations et des flux de macropollutions puissent être importants en entrée de station, comme les concentrations enregistrées au point NSO-1, la STEU de Cergy-Neuville a permis d'abattre respectivement 98,1% et 97,4% de la charge polluante en 2017 et 2018 (Rapport annuel 2018 du délégataire Cya de la STEU de Cergy-Neuville).

B.2.2. Micropolluants et polluants spécifiques

Qu'est-ce qu'un micropolluant « significatif » ?

Le terme « significatif » est repris de la note technique du 12 août 2016 relative à la recherche de micropolluants dans les eaux usées brutes et les eaux traitées. Dans le contexte réglementaire, une substance reconnue significative est une substance qui devient prioritaire dans la recherche et la réduction de micropolluants. Une ou plusieurs sources d'émission de cette substance doivent être identifiées et des solutions de réduction sont à prévoir.

Les critères d'évaluation ont été fixés à partir des connaissances actuelles sur les micropolluants et des objectifs de protection des milieux aquatiques de la directive cadre sur l'eau. Ils reposent alors sur les normes de qualité environnementale (NQE) qui correspondent à des concentrations qui ne doivent pas être dépassées afin d'assurer une bonne qualité du milieu naturel et d'éviter la perturbation des écosystèmes aquatiques.

Dans les eaux usées brutes, un polluant est significatif si l'un des trois critères ci-dessous est rempli :

- *concentration moyenne du polluant dans les eaux usées ≥ 50 x NQE-MA[1]*
- *concentration maximale du polluant dans les eaux usées ≥ 5 x NQE-CMA[2]*
- *flux moyen du polluant dans les eaux usées ≥ flux GEREP[3]*

[1] : correspond à la concentration moyenne annuelle dans le milieu aquatique

[2] : correspond à la concentration maximum admissible par le milieu aquatique

[3] : correspond au flux de pollution annuel calculé (GEREP : gestion électronique du registre des émissions polluantes)

Les normes de qualités environnementales ont été initialement calculées pour un milieu naturel et non pour les eaux usées qui sont, par définition, un milieu non naturel et pollué et qui subit une épuration avant rejet dans l'environnement. De cette manière, un ajustement de ces normes est nécessaire pour suivre les polluants dans un tel milieu. Ainsi, un facteur de pondération est pris en compte.

Il existe des méthodes de calculs par familles de polluants (ex. alkylphénols, HAPs, PBDE…) pour lesquelles une norme de qualité environnementale (généralement la somme des normes des composés de la famille) ou un flux GEREP a été déterminé par famille.

Dans cette étude, les micropolluants sont généralement « significatifs » en concentration et non en flux. Les flux des polluants sont rarement plus élevés que les valeurs seuils GEREP, sauf en cas de forts débits.

B.2.2.1. Concentrations dans le réseau d'assainissement

Alkylphénols. Les principaux alkylphénols suivis dans nos eaux résiduaires sont le nonylphénol et l'octylphénol issus de la dégradation des substances mères APEO (les éthoxylates d'alkylphénols, analysés en 2019 à la suite des résultats d'analyses des micro-polluants significatifs à la STEU en 2018). Le nonylphénol a été quantifié dans 100% des échantillons pour un intervalle de concentration de 0,15 µg/L à 44 µg/L (**Tableau A.II.1,** page 129-130). Les substances mères éthoxylées du nonylphénol, le NP1OE et NP2OE ne sont que très rarement quantifiées. Seul du NP1OE a été mesuré à 0,03 µg/L dans les eaux usées du secteur mixte à dominante domestique de Boissy l'Aillerie (BOI-4) en 2019 (**Tableau A.II.1**). Contrairement au nonylphénol, l'octylphénol a été rarement quantifié dans les eaux usées, seulement une fois dans le secteur domestique de Boissy l'Aillerie (BOI-4, 2019) à 0,14 µg/L. Du OP1OE (une des substances mères de l'octyphénol) a été quantifié sur 3 des 4 points de mesures entre 0,17-0,41 µg/L en 2019 (**Tableau A.II.1**). Dans la littérature, plusieurs auteurs ont rapporté la présence fréquente des composés alkylphénols dans les eaux usées avec des valeurs proches de celles retrouvées dans nos analyses (de 1 µg/L jusqu'à une cinquantaine de µg/L) (Bergé et al., 2014; Camacho-Muñoz et al., 2014; Céspedes et al., 2005; Pasquini et al., 2014) et parfois plus importantes, jusqu'à plusieurs centaines de µg/L (Sánchez-Avila et al., 2009). Le nonylphénol est représentatif de la somme des alkylphénols, dont de fortes concentrations sont parfois observables sur plusieurs sites (SOA-4, -5, -6 et NSO-1, 2017, **Figure II-17**).

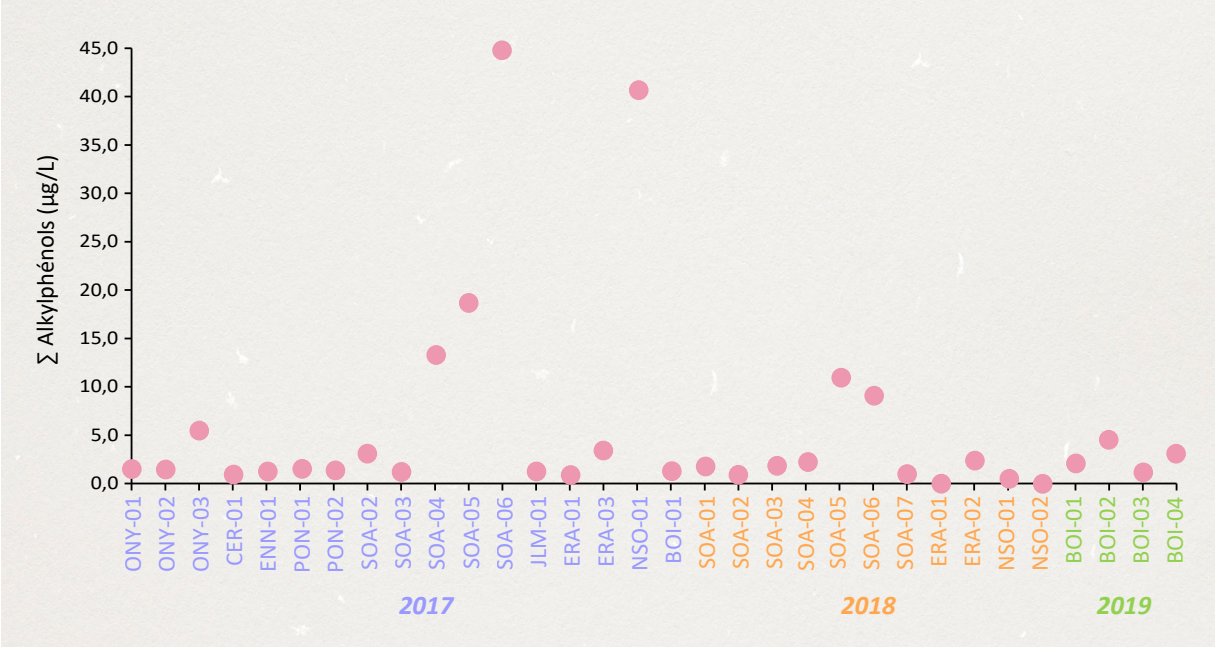


Figure II-17. *Somme des concentrations (µg/L) d'alkylphénols mesurées dans les eaux usées (nonylphénol, octylphénol et composés éthoxylés NP1OE, NP2OE, OP1OE, OP2OE) . Le nonylphénol est le composé représentatif de la somme des alkylphénols, il est le composé le plus quantifié (100% des échantillons).*

Ces concentrations sont d'ailleurs supérieures au seuil réglementaire du nonylphénol. Il y a donc un apport significatif de ce composé sur le secteur de Saint-Ouen l'Aumône et plus largement en provenance de secteurs non analysés dont les eaux usées arrivent à Neuville-sur-Oise (**Figure II-13**). Entre 2017 et 2018, ces concentrations ne sont plus significatives. Cependant, des rejets d'alkylphénols restent visibles sur le secteur de Saint-Ouen l'Aumône aux points SOA-5 et -6 en 2018 (**Figure II-17**).

Bisphénols. Le seul bisphénol qui a été suivi est le bisphénol A (BPA). Le BPA ne fait pas partie de la liste des micropolluants de la note technique du 12 août 2016, mais présente un fort intérêt pour son caractère toxique généralement non monotone. Le BPA n'a jamais été quantifié dans nos eaux usées (**Tableau A.II.1,** page 129-130). De précédentes études ont montré que le BPA n'était pas mesuré dans les eaux usées (Ballesteros et al., 2006) ou à de très faibles concentrations de l'ordre du ng/L (Česen et al., 2018; Noszczyńska et Piotrowska-Seget, 2018). Cependant, d'autres encore ont montré la présence du BPA à des concentrations de l'ordre de plusieurs µg/L dans les eaux usées brutes (Deblonde et al., 2011; Sánchez-Avila et al., 2009). L'ensemble de ces études montre alors l'amplitude des concentrations auxquelles ce composé peut être quantifié ou non dans un réseau d'assainissement.

HAPs. Les HAPs sont des substances reconnues comme très dangereuses, en particulier le benzo(a)pyrène identifié comme substance dangereuse prioritaire dans la DCE

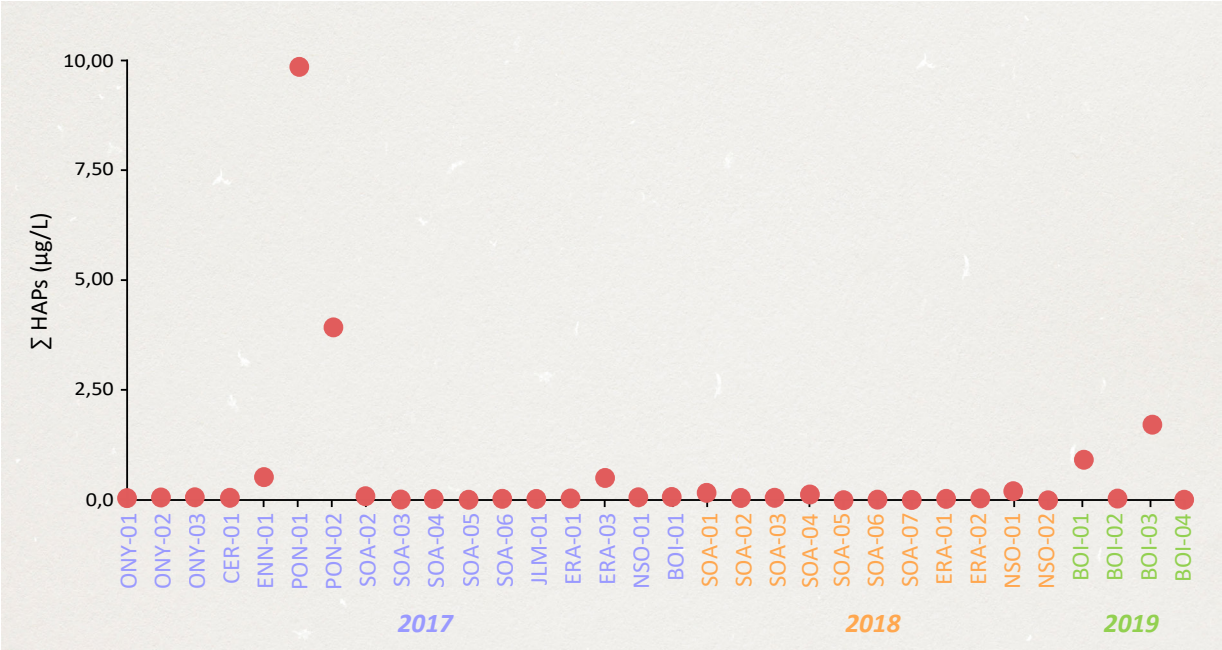


Figure II-18. *Somme des concentrations (µg/L) de HAPs mesurées dans les eaux usées. La somme a été calculée à partir des concentrations des congénères suivants : benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène, benzo(g,h,i)pérylène, benzo(k)fluoranthène, fluoranthène et le indéno(1,2,2-cd)pyrène.*

et reconnu comme traceur de la famille. Les HAPs ont été quantifiés dans l'ensemble des échantillons d'eaux usées et le plus souvent à des concentrations bien inférieures à 1 µg/L (**Tableau A.II.1**). La littérature rapporte également des concentrations de HAPs du même ordre de grandeur (Blanchard et al., 2004; Rule et al., 2006a). Des rejets significatifs de HAPs ont été identifiés sur plusieurs secteurs industriels et mixtes (ENN-1, PON-1, -2, ERA-3, BOI-1 pour 2017 et BOI-3 pour 2019) mais aussi sur un secteur domestique (BOI-2 uniquement le benzo(a)pyrène, pour 2019) (**Tableau A.II.1**). La somme de HAPs reflète ces concentrations significatives, en particulier à Pontoise en 2017 (**Figure II-18**).

En fonction des années, les HAPs n'ont pas toujours été quantifiés pour un même point. Cela pourrait s'expliquer en raison des concentrations très faibles pouvant passer sous le seuil limite de quantification (LQ).

Métaux. Dans notre étude, tous les métaux analysés ont été quantifiés au moins une fois dans les eaux usées (**Tableau A.II.1,** page 129-130). L'arsenic ne dépasse jamais la valeur de 10 µg/L correspondant à sa limite de quantification. Le cuivre, le fer et le zinc étaient les métaux les plus quantifiés (100% des échantillons) et aux plus fortes concentrations, entre 35-910 µg/L, 220-14 000 µg/L et 140-2 400 µg/L respectivement. Ces concentrations sont pratiquement toutes supérieures aux seuils réglementaires, excepté pour le fer (**Tableau A.II.1**). D'autres métaux tels que le manganèse [10-400 µg/L] et le titane [10-220 µg/L] présentent des concentrations rarement significatives mais leurs flux sont significatifs à Neuville-sur-Oise avant de rejoindre la STEU (NSO-1) (**Tableau A.II.1**). Enfin des métaux lourds toxiques (métox) ont également été quantifiés tels que le chrome [5-66 µg/L], le nickel [0,9-310 µg/L], le plomb [5-151 µg/L], le cadmium [1-37 µg/L] et le mercure [0,07-2,05 µg/L] (**Tableau A.II.1**). Le mercure et le cadmium, les métaux les plus toxiques, étaient les moins fréquemment quantifiés sur les bassins de collecte étudiés. Tous ces métaux ont été très souvent retrouvés dans les eaux usées à des concentrations variables et comparables aux nôtres (Mousavi et al., 2013; Östman et al., 2017; Rule et al., 2006a; Sharif et al., 2016). Parmi ces études, le zinc et le cuivre mais également le fer faisaient aussi partie des métaux les plus fréquemment quantifiés et aux plus fortes concentrations.

D'une année à l'autre, les concentrations en métaux lourds toxiques dans les eaux usées sont relativement constantes. Néanmoins, quelques pics de fortes concentrations étaient facilement identifiables et concernaient des eaux usées de nature industrielle

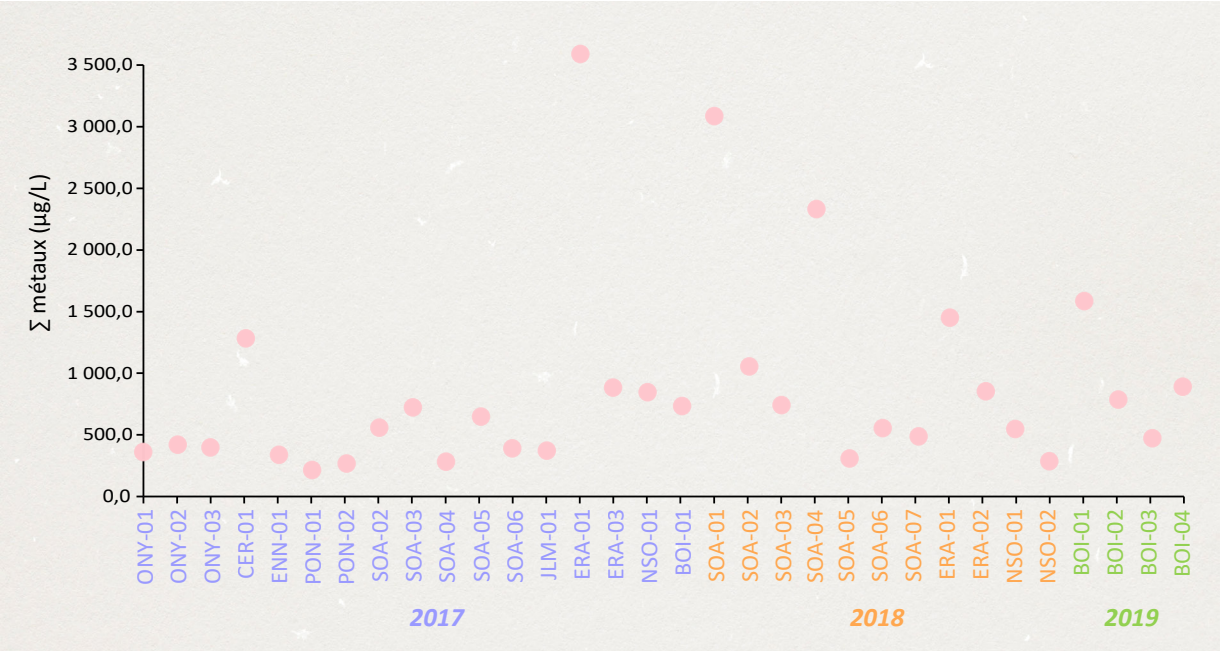


Figure II-19. *Somme des concentrations (µg/L) de métaux lourds toxiques (arsenic, cadmium, cuivre, mercure, nickel, plomb et zinc) mesurés dans les eaux usées.*

(ERA-1, 2017 et 2018, SOA-1 et -4, 2018 et BOI-1, 2019, **Figure II-19**). Lors de ces pics, plusieurs métaux ont vu leurs concentrations augmenter dans les rejets d'eaux usées. Zhou et al. (2019) ont récemment conclu que les métaux sont des substances à suivre en priorité dans les eaux usées en raison de leur occurrence et de leur dangerosité, même au détriment d'autres substances potentiellement toxiques comme les résidus pharmaceutiques.

Pesticides. Parmi quelques pesticides recherchés, le glyphosate (herbicide) est le pesticide le plus fréquemment quantifié à des concentrations de 0,39-83 µg/L (**Figure II-20**). Les concentrations étaient relativement constantes d'un secteur à l'autre, à l'exception de quelques pics parfois observables sur Saint-Ouen l'Aumône (SOA) et Neuville-sur-Oise avant l'entrée en STEU et en sortie d'université (**Figure II-20**). Le métabolite du glyphosate, l'AMPA, est également fréquemment quantifié (96%)entre 0,42 et 24 µg/L (**Tableau A.II.1,** page 129-130). Dans la littérature, ces composés sont moins fréquemment quantifiés dans les eaux usées brutes (de moins de 30% à 70%) et à de plus faibles concentrations comprises entre 0,1-1 µg/L (Coquery et al., 2011). Pour autant, ces concentrations de glyphosate et d'AMPA ne sont pas significatives et respectent les critères réglementaires. La cyperméthrine recherchée en 2017 et 2019, a été quantifiée uniquement lors de notre dernière campagne en 2019 à Boissy l'Aillerie entre 0,09 et 0,12 µg/L, concentrations qui sont considérées comme significatives (**Tableau A.II.1**). Le diuron

(herbicide) uniquement recherché en 2017 n'a été quantifié qu'une seule fois (0,03 µg/L) sur le bassin de collecte de Jouy-le-Moutier (JLM-1). De même que le 2,4-MCPA n'a été quantifié que deux fois entre 0,09-0,13 µg/L (ONY-1, NSO-1). Très peu d'études ont porté sur la recherche de ces pesticides dans les eaux usées. Cependant, certains d'entre eux comme le diruron et d'autres (ex. atrazine) ont été retrouvés dans les différentes matrices de l'assainissement ; les eaux usées brutes, les eaux traitées et les boues d'épuration (Briand et al., 2018; Coquery et al., 2011; Ghanem et al., 2007; Westlund et Yargeau, 2017).

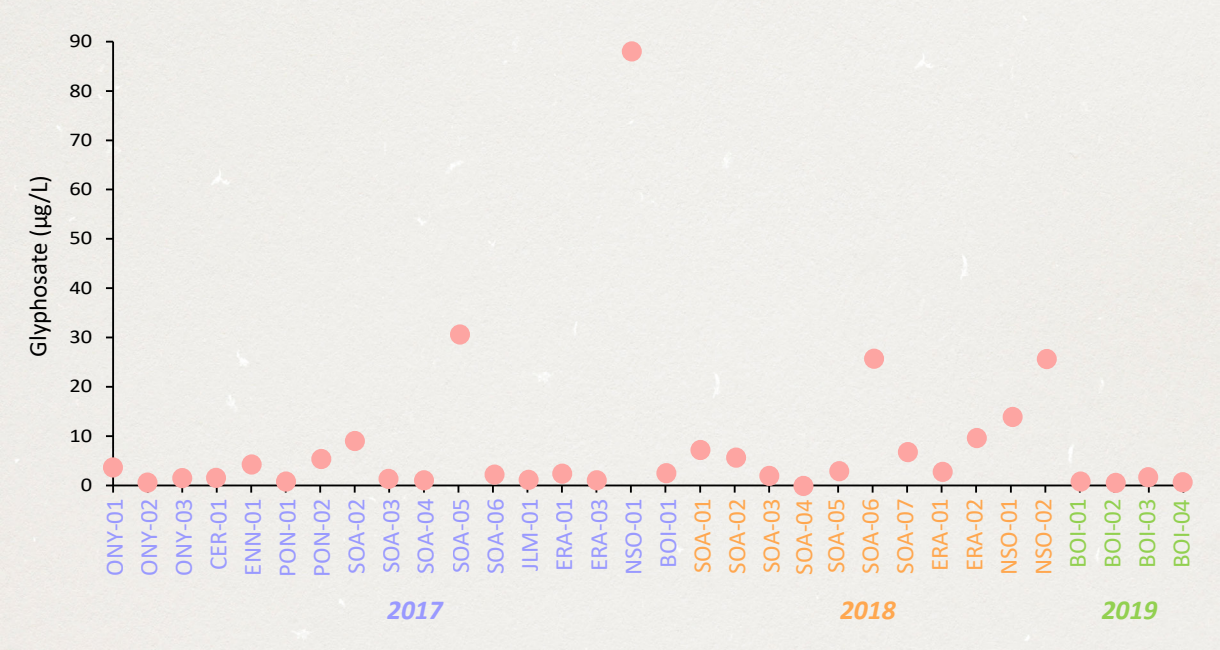


Figure II-20. *Concentrations (µg/L) de glyphosate dans les eaux usées.*

Phtalates. L'unique phtalate suivi dans les eaux usées est le DEHP, qui est le plus connu tant pour son utilisation que ces effets controversés de perturbateur endocrinien (Zolfaghari et al., 2014). Le DEHP a été quantifié dans tous les bassins de collecte analysés hormis dans l'un des secteurs d'Osny (ONY-3). Les concentrations étaient relativement constantes avec de faibles variations d'amplitude (**Tableau A.II.1,** page 129-130 **et Figure II-21**). Des rejets significatifs (flux) de DEHP ont été identifiés sur le secteur industriel d'Eragny (ERA-3) et à Neuville-sur-Oise avant l'entrée en STEU (**Tableau A.II.1**). Dans de précédentes études, les phtalates dont le DEHP sont très fréquemment retrouvés dans les eaux usées brutes de nature domestique et industrielle dans des ordres de grandeurs comparables aux nôtres (Bergé et al., 2014; Deblonde et al., 2011; Sánchez-Avila et al., 2009; Zolfaghari et al., 2014).

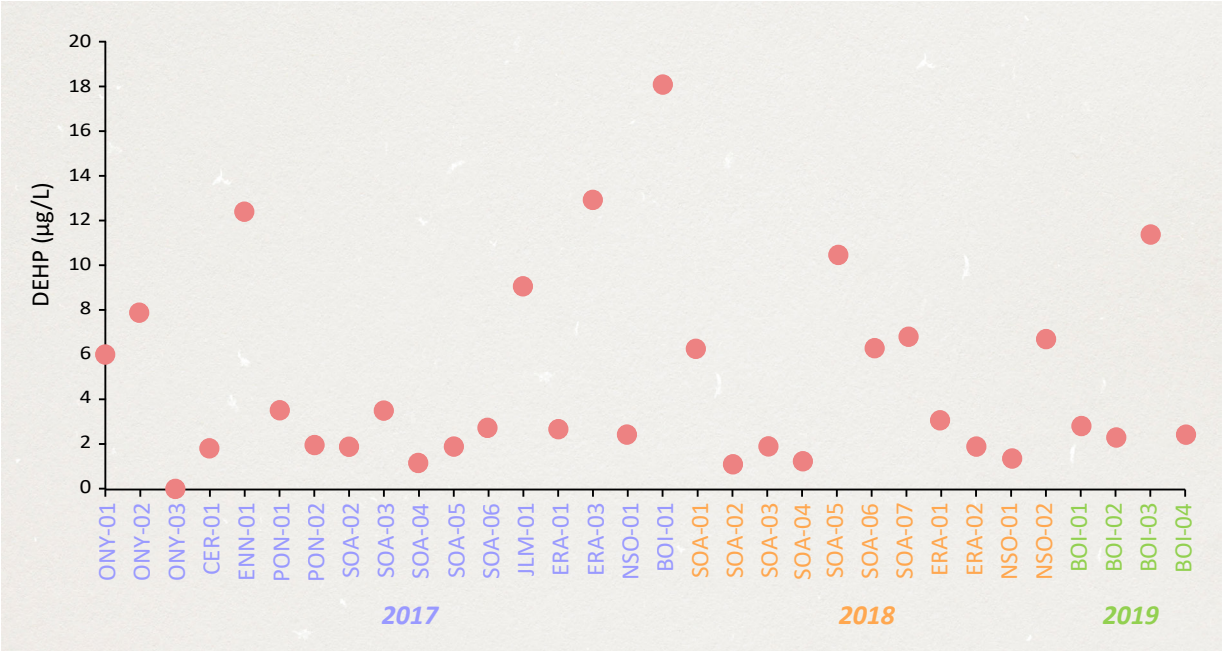


Figure II-21. *Concentrations (µg/L) de DEHP dans les eaux usées.*

Chlorophénols. Le pentachlorophénol a été recherché uniquement en 2017 en raison de sa faible occurrence. Les concentrations mesurées sont assez faibles, entre 0,6 µg/L et 1,1 µg/L (PON-2, SOA-5, NSO-1) hormis au point SOA-4 atteignant 21 µg/L (**Tableau A.II.1,** page 129-130). Néanmoins, les rejets des bassins de collecte de Saint-Ouen l'Aumône (SOA-4) et de Neuville-sur-Oise avant l'entrée en STEU sont significatifs. Peu d'études récentes sont disponibles sur la présence de ce composé mais le pentachlorophénol avait été identifié comme une substance fréquemment mesurée dans les eaux usées brutes à des concentrations inférieures à 0,1 µg/L (Coquery et al., 2011).

Polychlorobiphényles (PCB), Polybromodiphényléther (PBDE). Ces deux familles de polluants n'ont été recherchées qu'en 2019 à la suite des résultats d'analyses à la STEU. Aucun de ces composés n'a été quantifié, mais ces mesures sont limitées à une même zone et concernent quatre points de mesures (**Tableau A.II.1**).

Autres micropolluants et indices globaux. D'autres micropolluants non classés par famille car divers, ont été analysés dans les eaux usées. De l'acide sulfonique de perfluorooctane (PFOS) a été quantifié, seulement en 2017, sur quatre secteurs industriels à des concentrations de 0,06-0,15 µg/L considérées significatives (**Tableau A.II.1**). Il a déjà été retrouvé en sortie de STEU et dans les eaux usées brutes à dominante domestique en faible concentration de l'ordre du ng/L (Pasquini et al., 2014; Zareitalabad et al., 2013).

Le dichlorométhane et le trichlorométhane utilisés comme solvants n'ont été recherchés qu'en 2019 et n'ont jamais été quantifiés à l'instar des PCB et PBDE (**Tableau A.II.1,** page 129-130). Quant au tributylétain recherché uniquement en 2019 également, il a été quantifié sur des secteurs mixtes à dominante domestique (BOI-2 à 4) (**Tableau A.II.1**). Les deux solvants pouvaient être retrouvés assez fréquemment dans les eaux usées brutes à des concentrations de 1-10 µg/L à contrario du tributylétain rarement quantifié (Coquery et al., 2011; Rule et al., 2006a). Peu d'études ont porté sur la recherche de ces composés dans les eaux usées brutes.

Enfin les indices hydrocarbures, phénols et les AOX (halogènes organiques adsorbables) permettent de donner un ordre d'idées sur les composés de ces familles présents dans les eaux usées. Ainsi ces indices ne sont pas mesurés dans les stations d'épuration mais font partie des rejets de polluants qui doivent être limités par les installations classées pour l'environnement (ICPE) (arrêté du 24 août 2017, chapitre I – A.2). Nous avons donc entrepris de les mesurer puisque plusieurs ICPE sont présentes sur notre territoire. Leurs valeurs limites d'émission sont fixées à 10 mg/L, 0,3 mg/L et 1 mg/L respectivement.

Les AOX ont été quantifiés dans une large gamme de concentrations [109-5800 µg/L] et dans toutes nos eaux usées (**Tableau A.II.1**). Les rejets en AOX sont significatifs sur plusieurs secteurs industriels (SOA-2, -4, -5, -6, ERA-1 et -2, **Tableau A.II.1**). Les indices phénols et hydrocarbures ont été mesurés en 2017 et 2019. En 2018, nous n'avons pas décidé de les rechercher pour des raisons budgétaires. Ces composés sont aussi présents dans nos eaux usées à des concentrations de 0-270 µg/L pour les phénols et de 200-6200 µg/L pour les hydrocarbures (**Tableau A.II.1**).

Polluants spécifiques pour le réseau d'assainissement. Des polluants spécifiques au réseau d'assainissement ont été recherchés en raison de possibles dégradations en cas de fortes concentrations ou de flux (**Tableau A.II.2,** page 131). Les substances extractibles à l'hexane représentent les matières graisseuses. Le seuil a été fixé arbitrairement à 150 mg/L pour le réseau du SIARP pour éviter l'obstruction des canalisations (suite aux retours d'expérience d'autres structures). Ces substances sont en larges concentrations dans le grand secteur industriel de Saint-Ouen l'Aumône (SOA-1 à -4) (**Tableau A.II.2**). Les autres composés mesurés, chlorures, sulfates et fluorures peuvent entraîner la dégradation des revêtements des canalisations et ont des seuils abritraires fixés à 600 mg/L, 400 mg/L et 15 mg/L respectivement. A l'instar des graisses, les rejets de chlorures et sulfates sont très importants sur le même secteur (**Tableau A.II.2**).

Certains polluants ont été peu quantifiés dans nos eaux usées comme le pentachlorophénol, la cyperméthrine ou encore l'octylphénol. A l'inverse, d'autres polluants comme le nonylphénol, le cuivre, le zinc, le DEHP ou encore le glyphosate ont été fréquemment retrouvés dans nos échantillons. Malgré l'absence de mesures répétées, la plupart des gammes de concentrations de ces polluants restaient cohérentes avec les données de la littérature. Et certains composés pourraient être caractéristiques d'effluents de nature industrielle ou domestique.

B.2.2.2. Concentrations en fonction de l'origine des eaux usées

A

	Origine EU	Industrielle				Mixte à dominante industrielle				Mixte à dominante domestique				Domestique
		min	med	moy	max	min	med	moy	max	min	med	moy	max	-
Alkylphénols	Nonylphénol	0,15	1,75	4,99	44,00	0,59	1,00	4,49	17,00	0,17	0,70	0,82	1,70	3,60
	Nonylphénol monoéthoxylate (NP1OE)									0,06	0,37	0,37	0,68	0,03
	Nonylphénol diéthoxylate (NP2OE)													
	Octylphénol													0,14
	Octylphénol monoéthoxylate (OP1OE)									0,17	0,32	0,32	0,47	0,41
	Octylphénol diéthoxylate (OP2OE)													
Bisphénols	Bisphénol A													
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)	Acénaphtène	0,02	0,04	0,05	0,10	0,02	0,19	0,28	0,63	0,02	0,02	0,02	0,02	
	Acénaphthylène	0,17	0,23	0,23	0,28	0,07	0,07	0,07	0,07					
	Anthracène	0,02	0,03	0,03	0,04	0,17	0,35	0,35	0,52					
	Benzo(a)anthracène	0,04	0,06	0,06	0,07	0,54	1,12	1,12	1,70					
	Benzo(a)pyrène	0,05	0,06	0,08	0,14	0,50	0,90	0,90	1,30	0,27	0,27	0,27	0,27	0,02
	Benzo(b)fluoranthène	0,07	0,07	0,11	0,18	0,91	1,31	1,31	1,70	0,34	0,34	0,34	0,34	
	Benzo(ghi)Pérylène	0,02	0,05	0,06	0,12	0,24	0,39	0,39	0,53	0,19	0,19	0,19	0,19	
	Benzo(k)fluoranthène	0,03	0,06	0,05	0,07	0,26	0,49	0,49	0,72	0,13	0,13	0,13	0,13	
	Chrysène	0,04	0,07	0,07	0,09	0,56	1,13	1,13	1,70					
	Dibenz(a,c/a,h)anthracène					0,03	0,03	0,03	0,03					
	Fluoranthène	0,02	0,03	0,08	0,25	0,01	0,76	1,33	3,80	0,02	0,03	0,19	0,53	0,02
	Fluorène	0,03	0,11	0,11	0,18	0,03	0,21	0,31	0,68	0,02	0,02	0,02	0,02	
	Indeno (1,2,3,c,d) pyrene	0,02	0,07	0,07	0,12	0,01	0,88	0,76	1,40	0,23	0,23	0,23	0,23	
	Naphtalène	0,23	0,28	0,28	0,32	0,20	0,30	0,39	0,68	0,31	0,31	0,31	0,31	
	Phénanthrène	0,01	0,03	0,06	0,17	0,04	0,26	0,90	3,50	0,07	0,07	0,07	0,07	
	Pyrène	0,01	0,03	0,03	0,08	0,01	0,03	0,15	0,57	0,03	0,03	0,03	0,03	
Métaux et métalloïdes	Arsenic (As)	10,0	10,0	10,0	10,0									
	Cadmium (Cd)	1,0	9,0	13,0	37,0									
	Chrome (Cr)	5,0	15,0	19,2	66,0	6,0	8,0	11,8	29,0	11,0	15,0	15,0	19,0	5,0
	Cuivre (Cu)	45	94	166	910	37	88	103	190	90	93	100	126	185
	Fer (Fe)	350	1500	2726	14000	420	1700	1806	4200	220	240	240	260	
	Manganèse (Mn)	10	70	95	400	20	60	83	220	20	25	25	30	
	Mercure (Hg)	0,50	1,45	1,26	2,05					0,20	0,26	0,26	0,31	0,07
	Nickel (Ni)	10,0	30,0	89,8	310,0	10,0	20,0	16,7	20,0	0,9	8,0	8,0	15,0	6,0
	Plomb (Pb)	10,0	40,0	57,4	151,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	54,0	45,3	72,0	5,0
	Titane (Ti)	10,0	41,0	76,2	220,0	20,0	25,0	25,0	30,0	10,0	16,0	22,7	42,0	18,0
	Zinc (Zn)	150	425	697	2400	140	210	324	890	150	377	371	581	201
Pesticides	2,4-MCPA					0,09	0,09	0,09	0,09					
	Acide aminométhylphosphonique (AMPA)	0,42	2,50	6,10	24,00	1,10	3,8	3,3	5,2	1,20	1,20	1,20	1,20	
	Cypermethrine	0,05	0,05	0,05	0,05					0,12	0,12	0,12	0,12	
	Diuron									0,03	0,03	0,03	0,03	
	Glyphosate	0,39	2,10	4,25	24,00	0,41	3,40	6,77	29,00	0,58	1,10	6,70	24,00	0,41
Phtalates	DEHP	1,13	2,80	5,13	18,00	1,82	3,48	4,59	10,40	2,40	7,82	7,36	11,40	2,30
Chlorophénols	Pentachlorophénol	21,00	21,00	21,00	21,00	0,80	0,95	0,95	1,10					
PCB	∑ Polychlorobiphényles													
PBDE	∑ Polybromodiphényléthers													
Autres	AOX (halogènes organiques adsorbables)	109	440	1367	5800	64	310	805	3270	199	225	262	400	320
	Dichlorométhane													
	Indice hydrocarbures C10-C40	200	520	1689	8300	600	3600	2800	4200	200	860	673	960	
	Indice phénols	20	70	84	270	20	100	106	260	70	80	83	100	240
	PFOS (Acide sulfonique de perfluorooctane)	0,06	0,07	0,07	0,08	0,06	0,11	0,11	0,15					
	Tributylétain cation									0,03	0,04	0,04	0,04	0,05
	Trichlorométhane													

non recherché | < LQ

B

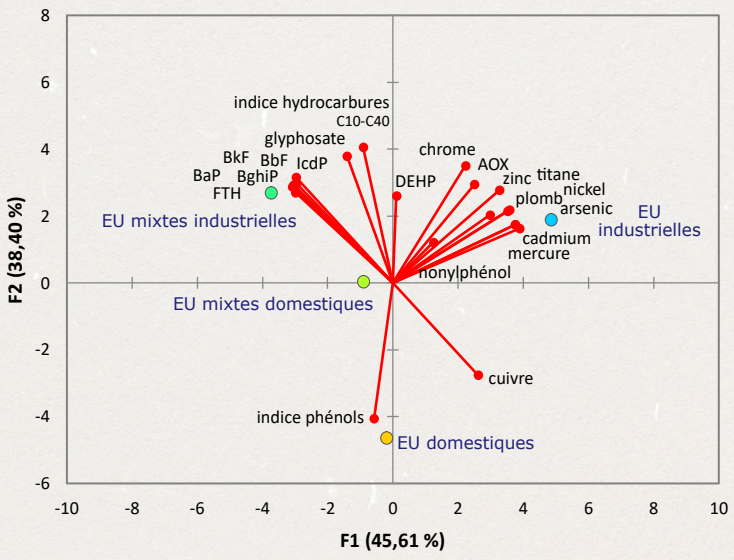


Figure II-22. A) *Moyennes des concentrations (µg/L) des micropolluants en fonction de l'origne des eaux usées. Les résultats sont classés selon l'origine des eaux usées ;* ● *industrielle (n=18 mesures),* ● *mixte à dominante industrielle (n=7 mesures),* ● *mixte à dominante domestique (n=4 mesures),* ● *domestique (n=1 mesure).* **B)** *Biplot de l'analyse en composante principale permettant de représenter les variables (micropolluants) et les observations (nature des eaux usées). Cette analyse a été construite à l'aide des données du tableau A de cette figure. (BaP : benzo(a)pyrène, BbF : benzo(b)fluoranthène, BghiP : benzo(g,h,i)pérylène, BkF : benzo(k)fluoranthène, FTH : fluoranthène et le IcdP : indéno(1,2,2-cd)pyrène).*

Les alkylphénols et en particulier le nonylphénol ont été quantifiés dans des ordres de grandeurs similaires (4 µg/L) entres les différents types d'eaux usées à l'exception des eaux usées mixtes à dominante domestique (**Figure II-22, A**). A l'instar du nonylphénol, le DEHP était présent dans les eaux usées de toutes origines avec des concentrations d'ordres similaires (2,30-7,36 µg/L). Concernant les **HAPs**, les concentrations moyennes restaient relativement faibles. Les différents congénères ont été davantage retrouvés dans de plus fortes concentrations dans les eaux usées mixtes à dominante industrielle (**Figure II-22, A**). En effet, les points analysés à Pontoise (PON-1 et PON-2) présentaient des concentrations élevées de tous les congénères recherchés. Dans les eaux usées domestiques de Boissy l'Aillerie (BOI-2), seulement le benzo(a)pyrène et le fluoranthène ont été quantifiés. **Les métaux** étaient en moyenne plus concentrés dans les eaux usées industrielles à l'exception du cuivre. Le cuivre était en moyenne retrouvé en plus forte concentration dans les eaux usées domestiques (**Figure II-22, A**). **Les pesticides** présentaient des concentrations similaires dans les différents types d'eaux (8-10 µg/L) à l'exception des eaux usées domestiques où il y en avait peu (**Figure II-22, A**). Le **pentachlorophénol** et le **PFOS** n'ont été quantifiés que dans des eaux usées à composante majoritaire industrielle. A l'inverse, le **tributylétain** n'a été quantifié que dans des eaux usées à composante majoritaire domestique. Enfin les **indices globaux AOX** et **hydrocarbures** avaient tendance à être plus élevés dans les eaux usées à composante majoritaire industrielle que dans les eaux usées à composante majoritaire domestique (805-1367 µg/L contre 262-805 µg/L) à l'exception de **l'indice phénols**. Enfin, les **PCB**, **PBDE**, le **dichlorométhane** et le **trichlorométhane** n'ont jamais été retrouvés (**Figure II-22, A**).

De la même façon que pour les macropollutions, une analyse en composante principale (ACP) a été réalisée pour la micropolluants dans les eaux usées afin de visualiser l'ensemble du jeu de données et d'en tirer également des corrélations. Cette représentation graphique indique dans un premier temps que les observations de l'ACP (nature des eaux usées) sont assez dispersées en comparaison avec l'analyse précédente portant sur les macropollutions (**Figure II-22, B et Figure II-16, B**). Les eaux usées industrielles et

mixtes à dominante industrielle voient leurs compositons corrélées sur l'axe F2 (**Figure II-22, B**). Cet axe F2 est plutôt caractérisé par la présence de la majorité des micropolluants suivis. En revanche, elles sont opposées sur l'axe F1. Les eaux usées industrielles sont chargées en métaux lourds et AOX tandis que les eaux usées mixtes ont plutôt tendance à transporter des hydrocarbures et du glyphosate (**Figure II-22, B**). Le type d'activité industrielle pourrait être à l'origine de cette corrélation négative et expliquer l'axe F1 (ex. travail des métaux, industrie automobile). Quant aux eaux usées domestiques, elles sont caractérisées par la présence de phénols et de cuivre (**Figure II-22, B**). Leur composition est strictement différente des eaux usées de nature industrielle (corrélation négative sur l'axe F2, peu de ces micropolluants y sont présents) et n'est pas corrélée avec l'axe F1. De même que, la composition des eaux usées mixtes à dominante domestique est proche du noeud de croisement des deux axes (**Figure II-22, B**). Cela indique que la composition de ces dernières est différente des autres et est peu corrélée aux mesures effectuées dans cette étude. Enfin, deux micropolluants, le nonylphénol et le DEHP présentent des coefficients de corrélation assez faibles et qui se rapprochent davantage du noeud de croisement des axes. Ces observations traduisent plutôt une présence de ces polluants dans les différents types d'eaux usées mais que des tendances en faveur du type industriel peuvent être observables. En termes de micropolluants présents et suivis dans ce contexte, les compositions des eaux usées mixtes ne sont donc pas nécessairement ressemblantes avec les compositions des eaux usées strictes de même nature.

Ces résultats, bien qu'informatifs sur la caractérisation des eaux usées, doivent être considérés avec parcimonie. Nous disposions de moyens limités pour la chimie analytique ; une vingtaine de sites différents ont été investigués et les mesures n'ont été répliquées qu'une seule fois pour la plupart des sites. Des sources ponctuelles d'émission polluantes, qui n'étaient pas l'objectif initial de recherche, peuvent donc interférer dans la caractérisation de nos effluents. Nous nous sommes intéressés davantage aux eaux usées de nature industrielle, donc moins de secteurs domestiques ont été analysés. De plus, il demeure un nombre important de micropolluants dont on ne connaît pas la présence et la concentration et l'éventuelle spécificité de l'origine des eaux usées. Il a cependant été mis en lumière que certaines substances pourraient avoir une origine plutôt industrielle (métaux, AOX, HAPs), plutôt domestique (cuivre, phénols) ou mixte (nonylphénol, DEHP).

Il reste difficile d'estimer l'abattement de ces micropolluants par la station d'épu-

ration de Cergy-Neuville. Néanmoins des études ont montré qu'en fonction du composé suivi, son élimination de l'eau est plus ou moins bonne (Briand et al. 2018). Certains rejets restent importants et « significatifs » en sortie de STEU et les sources de ces micropolluants doivent être identifiées afin de limiter l'impact sur l'environnement. Ces rejets peuvent également être « significatifs » en entrée de la STEU. Ces polluants, même s'ils sont éliminés lors du traitement, peuvent avoir une influence sur les populations microbiennes en charge du traitement épuratoire. C'est la raison pour laquelle les charges de micropolluants importantes en entrée de STEU doivent aussi être réduites.

B.2.2.3. Sources dans le réseau d'assainissement

L'ensemble des micropolluants ayant été identifiés comme « significatif » au moins une fois dans le réseau du SIARP ainsi qu'en entrée et en sortie de la station de Cergy-Neuville (mesures 2018) sont présentés dans le **tableau II-6**. Les sources de ces micropolluants sont à identifier puis réduire voire éliminer.

		SIARP	STEU	
			entrée	*sortie*
Alkylphénols	Nonylphénol	X		
	∑ Nonylphénol et NPOE (éthoxylés)		X	
	∑ Octylphénol et OPOE (éthoxylés)		X	
Hydrocarbures aromatiques polycyliques (HAP)	Anthracène	X		
	Benzo(a)pyrène	X	X	
	Benzo(b)fluoranthène*	X	X	
	Benzo(ghi)Pérylène*	X	X	
	Benzo(k)fluoranthène*	X	X	
	Fluoranthène	X	X	
	Indeno (1,2,3,c,d) pyrene*			
	∑ 4 HAPs*	X	X	
Métaux et métalloïdes	Cadmium (Cd)	X		
	Cuivre (Cu)	X	X	X
	Fer (Fe)	X		
	Mercure (Hg)	X	X	
	Nickel (Ni)	X	X	X
	Plomb (Pb)	X	X	
	Titane (Ti)	X	X	
	Zinc (Zn)	X	X	X
Pesticides	Cyperméthrine	X	X	
Phtalates	DEHP	X	X	
Chlorophénols	Pentachlorophénol	X		
PCB	∑ Polychlorobiphényles		X	
PBDE	∑ Polybromodiphényléthers		X	
Autres	Dichlorométhane		X	
	PFOS (Acide sulfonique de perfluorooctane)	X	X	X
	Tributylétain cation	X	X	
	Trichlorométhane		X	

Tableau II-6. *Micropolluants significatifs dans le réseau d'assainissement du SIARP et dans les eaux usées brutes en entrée et les eaux traitées en sortie de la station de traitement des eaux usées (STEU) de Cergy-Neuville.*

Paramètres significatifs dans le réseau du SIARP et dans les eaux usées et les eaux traitées de la station d'épuration de Cergy-Neuville

Alkylphénols. Les alkylphénols ont été identifiés comme significatifs à la STEU et sur notre territoire (**Figure II-17** et **Tableau II-6**). Lors des trois campagnes de prélèvements, le nonylphénol a été quantifié dans 100% des échantillons (**Tableau A.II.1,** page 129-130) tandis que les autres alkyphénols étaient peu quantifiés et en concentrations non significatives. Les alkylphénols ont des particularités physico-chimiques qui en font d'excellents tensio-actifs dans une majorité de produits tels que les peintures, cosmétiques, biocides, agents mouillants (Sharma et al., 2009; Soares et al., 2008). La présence d'activités industrielles utilisant les alkylphénols comme tensio-actifs peuvent donc contribuer au rejet de ces substances dans les eaux usées. De la même façon que l'utilisation domestique de produits nettoyants à base d'alkylphénols peut aussi y contribuer. Sur notre territoire, le nonylphénol en particulier semble présenter des sources d'émission diffuses, d'autant plus qu'il représente 80% de la production mondiale des APEO (Sharma et al., 2009).

HAPs. Dans notre réseau, les concentrations les plus importante ont été observées dans des secteurs où les eaux usées sont à composante industrielle sur les trois années de prélèvements (Pontoise, Eragny, Ennery et Boissy l'Aillerie, **Figure II-18 et Tableau A.II.1**). Dans ces secteurs, nous avons connaissance d'activités automobiles (garage et industrie) susceptibles de contribuer au rejet de ces substances dans le réseau (Abdel-Shafy et Mansour, 2016). D'autres activités comme la production de charbon, d'aluminium, pétrolière, les usines de gazéification/liquéfaction peuvent aussi y contribuer (Abdel-Shafy et Mansour, 2016) mais ces dernières ne sont pas nécessairement connues ou présentes sur notre territoire. En revanche, un grand nombre d'aires de lavage sont référencées, et il a été montré que ce sont des sources d'émission de HAPs non négligeables (Qamar et al., 2017). Les HAPs sont également émis vers l'atmosphère et contaminent les eaux pluviales (Alegbeleye et al., 2017; Zgheib et al., 2011). Les eaux pluviales sont rejetées dans le réseau en parallèle de celui des eaux usées en configuration séparative, évitant normalement la contamination des eaux usées. Cependant à Pontoise, une partie du réseau est en configuration unitaire. Bien que les prélèvements aient été réalisés par temps sec, le passage des eaux usées peut resuspendre les dépôts unitaires dans le réseau qui contiennent des HAPs (Zgheib et al., 2011) et ainsi augmenter la concentration de ces substances dans le réseau. De plus, nous savons que dans certains secteurs comme à Pontoise, Eragny et

Boissy l'Aillerie, des inversions de branchement entre réseaux d'eaux pluviales et usées ont été identifiées, occasionnant le même problème de resuspension des dépôts.

Métaux. De nombreux métaux ont été identifiés dans notre réseau et de façon relativement constante d'année en année (**Figure II-19 et Tableau A.II.1,** page 129-130), ce qui contribue à leur significativité en entrée de STEU (**Tableau II-6**). Ils ont été mesurés dans des ordres de concentrations supérieurs dans les eaux usées industrielles. La littérature disponible montre également que les métaux et particulièrement les métaux lourds toxiques se concentrent dans les eaux usées industrielles en raison de leur utilisation (Azimi et al., 2017; Rule et al., 2006b; Ukah et al., 2018). Ces observations peuvent être corrélées avec les activités économiques utilisant les métaux et répartis de façon homogène sur notre territoire. Les matériaux des canalisations de transport de l'eau usée dans les immeubles (ex. cuivre) contribuent aussi à l'apport de ces métaux dans le réseau d'assainissement et dans les secteurs domestiques (Rule et al., 2006b).

Pesticides. Parmi les pesticides recherchés, seule la cyperméthrine a présenté des concentrations significatives et seulement sur le secteur de Boissy l'Aillerie en 2019 (**Tableau A.II.1**). Ce même pesticide a été significatif dans les eaux usées en entrée de la STEU en 2018 (**Tableau II-6**), et fait partie des composés souvent identifiés comme tels (plan nationale RSDE). En 2017, la cyperméthrine n'avait pas été quantifiée sur nos communes, d'où l'abandon de ce paramètre en 2018. Généralement, les pesticides ont une utilisation agricole, mais leur usage comme traitement de surfaces peuvent contribuer à leur présence dans les eaux usées brutes (Köck-Schulmeyer et al., 2013).

Phtalates. Le DEHP a été quantifié dans presque tous nos échantillons à l'exception d'un seul site (**Figure II-21** et **Tableau A.II.1**) et il a été identifié comme significatif en entrée de station (**Tableau II-6**). Les phtalates sont utilisés dans un très grand nombre de matériaux plastiques (Wang et al., 2019) susceptibles d'être en contact avec de l'eau et ainsi se retrouver dans le réseau d'assainissement. De plus, plusieurs entreprises travaillent le plastique sur notre territoire, ce qui pourrait expliquer la présence de DEHP et potentiellement d'autres phtalates non analysés. D'autres études évoquent notamment le caractère diffus des sources de phtalates pouvant être domestiques et/ou industrielles (Bergé et al., 2014; Zolfaghari et al., 2014). Dans nos recherches, les amplitudes de concentrations étaient assez proches. Il est donc difficile d'identifier un secteur ou des contributeurs de façon très précise.

PFOS, TBT. De l'acide sulfonique de perfluorooctane ou PFOS, a été identifié sur quatre points de notre réseau d'assainissement en 2017 (**Tableau A.II.1,** page 129-130). En raison de cette faible occurrence, nous avions privilégié d'autres substances en 2018, d'où son absence dans nos recherches. En 2018, il a été identifié significatif en entrée de STEU. En 2019, il a donc de nouveau été recherché à Boissy l'Aillerie et n'avait pas été quantifié. Le PFOS et ses dérivés sont utilisés comme surfactant et agent de protection des surfaces et peuvent donc être présents dans plusieurs types d'eaux usées (Prevedouros et al., 2006). Cergy (CER-1, mixte à dominante industrielle) présentait la concentration mesurée la plus forte (0,15 µg/L) ; il est possible qu'une ou des entreprises utilise cette substance ou bien qu'elle soit présente dans des produits d'usage domestique. Le tributylétain cation (TBT) a également été identifié significatif dans le réseau et en entrée de STEU (**Tableau II-6**). Ce composé n'a été recherché qu'en 2019, car nous ne soupçonnions pas sa présence à l'époque. Il a cependant été quantifié dans les eaux usées de Boissy l'Aillerie à l'exception des eaux usées industrielles. Le TBT est connu pour être utilisé dans les processus industriels de fabrication de coques de bateaux, dans des peintures antisalissures et comme biocides dans divers domaines comme le textile, les systèmes de refroidissement, etc. (Antizar-ladislao, 2008). De ce fait, une origine davantage industrielle était suspectée. Mais son utilisation comme biocide dans plusieurs domaines pourrait contribuer à sa diffusion par des secteurs mixtes et domestiques dans le réseau d'assainissement.

Paramètres significatifs dans le réseau du SIARP ou dans les eaux usées et les eaux traitées de la station d'épuration de Cergy-Neuville

L'anthracène, le cadmium, le fer et le pentachlorophénol ont été identifiés comme significatifs dans le réseau du SIARP mais pas à la STEU. L'anthracène, comme ses congénères HAPs, peut provenir des mêmes sources d'émission. En effet, les HAPs sont émis sous plusieurs formes au même moment, d'où l'intérêt d'avoir un traceur réglementaire de la famille (benzo(a)pyrène). Ce qui sous-entend que si le traceur est identifié dans l'eau, les autres formes sont très probablement présentes. Le fer n'est plus recherché dans le cadre du diagnostic amont contrairement aux études précédentes (plan national RSDE). Nous avions identifié le fer comme l'un des métaux les plus concentrés de nos eaux usées, jusqu'à 14 000 µg/L. Comme expliqué précédemment, le fer est l'un des métaux le plus souvent retrouvé dans ces gammes de concentration. Néanmoins, à l'instar des autres métaux incluant le cadmium, il est davantage

présent dans les eaux usées industrielles (**Tableau A.II.1)**. Le pentachlorophénol a été rarement quantifié, seulement quatre fois en 2017. Dans la littérature, les chlorophénols dont le pentachlorophénol étaient fréquemment retrouvés dans les eaux usées brutes (Coquery et al., 2011). Nous n'avons pas entrepris de le rechercher dans les campagnes suivantes – bien que sur ces quatre concentrations, deux étaient significatives. De plus, n'ayant pas été identifié comme micropolluants prioritaires à la STEU, le pentachlorophénol ne fait pas partie des polluants dont les sources sont à identifier en priorité.

Enfin les PCB, PBDE, dichlorométhane, trichlorométhane ont été identifiés en entrée de STEU mais pas dans nos eaux usées. Ces paramètres n'ont été recherchés qu'en 2019 suite aux résultats de la STEU de 2018. Les PCB ont pourtant une utilisation interdite depuis 1987 en France. Les PBDE sont utilisés comme retardateurs de flamme (Wu et al., 2019) et le dichloro- et trichloro- méthane sont des solvants couramment utilisés. Ces substances feront l'objet de prochaines recherches dans nos eaux usées pour évaluer leurs concentrations et identifier des sources.

Paramètres significatifs dans le réseau du SIARP : polluants spécifiques et indices de pollution

Nous avions analysé des polluants spécifiques pour le réseau ; les chlorures, sulfates, fluorures et graisses (substances extractibles à l'hexane). Les chlorures, sulfates et fluorures (plus rarement) ont principalement été identifiés en fortes concentrations à Saint-Ouen l'Aumône. Les chlorures et sulfates peuvent être utilisés dans les procédés industriels pour laver et traiter l'eau ; les chlorures sont d'ailleurs utilisés dans les stations d'épuration pour traiter les eaux usées. Une entreprise connue à Saint-Ouen l'Aumône pour cette utilisation dispose d'une autorisation de déversement spéciale et une partie du réseau est en grès pour en éviter la corrosion. Les autres sites analysés ne présentent pas d'aussi importantes concentrations pour ces paramètres au moment des mesures et présentent donc peu de risque pour le réseau. De même que ces composés, les graisses ont été identifiées dans des secteurs industriels (**Tableau A.II.2,** page 131). Sur cette partie du réseau, sont branchées des sociétés importantes qui préparent de très grandes quantités de plateaux repas et contribuent au rejet des graisses dans le réseau. Cette zone reste donc à surveiller pour ces matières afin

d'éviter l'obstruction des canalisations. Dans les autres eaux usées du territoire, les concentrations sont moins élevées et suggèrent donc moins de risques à ces endroits.

Enfin les AOX (halogènes organiques adsorbables) et les indices hydrocarbures et phénols ont été analysés. Les AOX sont produits majoritairement au cours de procédés chimiques notamment durant les processus de blanchiment (Savant et al., 2006). Ils peuvent aussi être retrouvés suite à des usages domestiques (Eriksson et al., 2003). Dans nos études, ils ont été quantifiés dans toutes nos eaux usées mais en particulier dans les eaux usées industrielles de façon significative (**Tableau A.II.1,** page 129-130). Cela traduit une utilisation privilégiée dans les industries, en concordance avec leur encadrement réglementaire pour les ICPE. Les mêmes observations peuvent être faites pour l'indice hydrocarbures. En revanche, l'indice phénols indiquait une certaine constance dans les mesures (**Tableau A.II.1**) avec une tendance à se concentrer dans les eaux usées domestiques. Les indices phénols et hydrocarbures étaient en concentrations significatives seulement au point NSO-1 à Neuville-sur-Oise en entrée de STEU. A ce point le flux est important, ce qui explique leur significativité. Il est donc nécessaire de poursuivre nos actions auprès des ICPE pour encadrer leurs rejets et réduire ces polluants autant que possible.

Au cours de ces travaux, nous avons pu identifier des polluants dans notre réseau d'assainissement. Ces polluants sont parfois considérés comme significatifs selon la réglementation. En fonction des composés ou familles de composés, les sources sont plutôt industrielles pour certains (ex. métaux, AOX, HAPs) et pour d'autres elles apparaissent plus diffuses (ex. nonylphénol, DEHP). Nous avons également entrepris la recherche de substances jusqu'ici insoupçonnées (ex. PCB, BPDE, trichlométhane) sans avoir pu identifier de sources claires en l'absence de leur quantification. Aussi, d'autres réseaux d'assainissement et linéaires, qui ne sont pas sous notre responsabilité, arrivent à la station d'épuration de Cergy-Neuville. Il appartient à leurs gestionnaires d'enquêter sur la qualité de leurs propres effluents afin de limiter les pollutions entrantes en STEU.

B.2.2.4. Signature des eaux usées à l'échelle du territoire d'assainissement

En combinant tous les résultats des années de prélèvements, nous pouvons créer la signature des eaux usées à l'échelle du territoire du SIARP pour les micropolluants recherchés (**Figure II-23**).

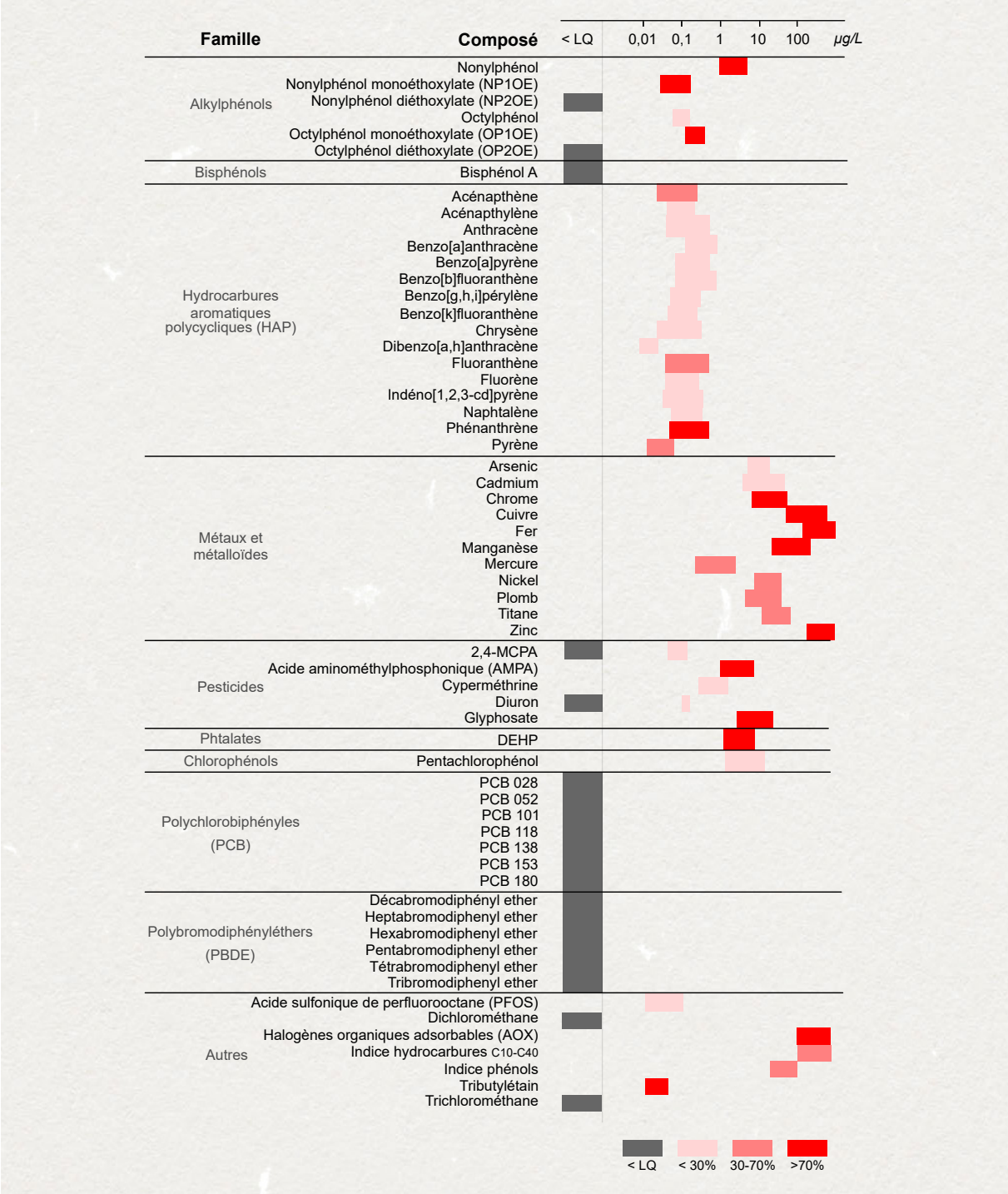


Figure II-23. *Signature chimique des eaux usées à l'échelle du territoire du SIARP. L'échelle horizontale indique la concentration moyenne (µg/L) à laquelle le composé étudié est retrouvé dans les eaux usées toutes origines confondues et le code couleur indique l'occurrence (%) dans les différents échantillons (nombres de mesures compris entre n=4 et n=32 par composé). LQ : limite de quantification.*

Des similitudes sont observables avec le profil des eaux usées obtenu par Briand et al. (2018) selon un assemblage de plusieurs études et à l'échelle de grands bassins urbains (cf chapitre I – B.2.2. page 54-55). Les gammes de concentrations et occurrences sont parfois assez proches entre notre étude et celle de Briand et al. (2018). C'est le cas notamment pour le nonylphénol, les métaux, des PCB et PBDE. Certaines différences sont également notables comme avec les HAPs qui sont plus fréquemment retrouvés chez Briand et al. (2018) mais à des concentrations moins élevées.

Bien que nous n'ayons eu que peu de réplication de mesures entre les points (n=1, voire n=2 en fonction des années), en combinant l'ensemble des résultats toutes eaux usées d'origines confondues (qui portent le nombre d'observations de 4 à 32 sur les trois années), nous avons pu obtenir une signature chimique relativement similaire à ce qui est connu dans la littérature. Ce profil chimique devra être renforcé avec des mesures complémentaires afin de le rendre plus robuste et de pouvoir orienter les recherches suivantes en faveur d'une ou plusieurs familles de polluants. Dans le cas présent, notre premier profil indique notamment que la famille des métaux et métalloïdes est la plus présente dans les eaux usées brutes et la plus concentrée parmi les familles recherchées. Comme expliqué précédemment, Zhou et al. (2019) avaient récemment conclu à leur importance dans les eaux usées. Les occurrences d'autres composés comme le nonylphénol ou le glyphosate qui sont élevées traduisent également la forte présence de ces composés dans les eaux usées brutes. Les sources d'émission de ces composés sont parfois identifiables (activité industrielle relative au travail des métaux) et possiblement réductibles, mais pour d'autres ces sources semblent assez diffuses (DEHP, nonylphénols, pesticides).

B.3. Retour d'expérience

Pour ces travaux nous avons fait appel à un prestataire de prélèvements qui s'est chargé d'envoyer les échantillons au laboratoire. Le prestataire de prélèvements a été relativement transparent sur les protocoles et matériels employés et la communication a été facile. En revanche nous avons rencontré des difficultés avec le laboratoire d'analyses. Les protocoles étant pour la plupart standardisés par des normes, nous n'avons pas eu accès à ces données, ni aux données de prétraitements des échantillons et aux limites de détection (LD). Pour les composés non quantifiés, nous n'avons pas été en mesure de confirmer leur présence ou non. Le laboratoire accrédité semble disposer de moins de

transparence qu'un laboratoire de recherches et de ce fait, être moins adapté dans un contexte comme le nôtre.

Au début de ce projet, nous disposions de peu d'informations sur les eaux usées brutes. Nous avons donc expérimenté plusieurs stratégies au cours de ce projet en prenant en compte les nouvelles informations (prélèvements simultanés ou en différé, période fixe, recherches de substances sur différents types de secteurs limitrophes ou non, liste variable des micropolluants, etc). Nous avions privilégié des prélèvements sur des secteurs industriels considérés hypothétiquement comme étant plus pollueurs en comparaison des secteurs domestiques. Cela semble être le cas de manière globale mais ce n'est pas forcément généralisable. De plus, certaines pollutions ubiquistes suggèrent que le secteur domestique ne doit pas être négligé dans la recherche de sources de pollutions.

En fonction des informations et des moyens financiers et matériels disponibles, la stratégie peut être orientée différemment. Les prochains prélèvements pourraient être répétés à plusieurs moments de l'année (ex. saison) sur des secteurs industriels, domestiques et mixtes pour évaluer l'évolution des concentrations et des flux de micropolluants. Le suivi d'un linéaire de réseau d'assainissement reste assez efficace car si la zone de prélèvements est correctement dessinée (identification des sous-bassins de collecte d'eaux usées), cette stratégie permet d'identifier des évènements de concentration ou de dilution des micropolluants et des secteurs émetteurs. Des prélèvements consécutifs sur une période rapprochée (ex. semaine, mois) peuvent également servir à caractériser les quantités rejetées et déterminer s'il existe une période plus à risques sur cette fenêtre de temps. Pour le choix des paramètres à suivre, les informations sur les polluants présents en entrée et sortie de la station d'épuration constituent une bonne base de travail pour débuter les recherches en plus des textes réglementaires. De plus, le profil chimique obtenu donne des indications sur les substances et leurs occurrences et peuvent permettre d'arrêter le choix sur celles qui doivent être suivies selon l'objectif fixé.

Conclusion

La chimie analytique a permis de révéler la présence et la concentration de plusieurs micropolluants dans les eaux usées brutes d'origine différente. Plusieurs de ces micropolluants ont été identifiés en concentrations ou en flux « significatifs » selon la note technique du 12 août 2016. Et certains de ces micropolluants ont été retrouvés en entrée et en sortie de la station d'épuration de Cergy-Neuville traduisant le caractère prioritaire des ces derniers à être éliminés de l'eau.

Les résultats indiquaient que de façon globale, le secteur industriel est plus sensiblement émetteur de macro- et de micro- polluants (notamment métaux, HAPs) que le secteur domestique. Les effluents industriels pourraient donc être plus dangereux et toxiques que des effluents domestiques. Cependant cette observation n'est pas généralisable. De plus, des substances (DEHP, nonylphénols, phénols) ont été retrouvées de façon homogène dans les différents types d'eaux usées suggérant que le secteur industriel ne peut être le seul élément en cause de la présence de micropolluants dans les eaux usées. Des solutions pour la réduction de ces polluants comme la mise à jour des autorisations de déversement des industriels et des campagnes de sensibilisation des particuliers font partie des options à mettre en place par le SIARP.

La chimie analytique offrant des résultats quantitatifs et qualitatifs à la fois reste cependant une technique limitée par son coût et n'offre qu'une vision parcellaire. L'utilisation d'indices de qualité et les mesures de macropollutions sont difficilement corrélables à la présence des micropolluants (Bergé et al. 2014) ce qui rend les analyses ciblées indispensables. Cette méthode est donc difficilement utilisable en routine pour des organismes tels que le SIARP, en particulier lorsque qu'il n'y a pas de budget spécifiquement alloué à ces recherches. De plus, l'absence de certains polluants sur plusieurs des sites analysés n'est pas indicateur de l'absence de danger en raison de la vision parcellaire que l'on a. Le caractère toxique des eaux usées intimement lié à la présence et la biodisponibilité de ces polluants reste donc difficilement évaluable au travers de ces seules données. Les bioessais peuvent apporter de la complémentarité aux analyses physico-chimiques en prenant en compte la toxicité exercée par un ou plusieurs des polluants présents ainsi que leurs métabolites rarement analysés et pour un coût financier moins élevé.

	Origine EU										Industrielle									
	Année	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2018	2017	2017	2017	2017	2017	2017	2019
	Nom du point	SOA-1	SOA-2		SOA-3		SOA-4		SOA-6		ERA-1		ERA-2	ERA-3	ONY-2	ONY-3	ENN-1	BOI-1		
Alkylphénols	Nonylphénol	1,60	2,70	0,74	1,00	1,60	12,00	1,90	44,00	8,40	0,73	0,15	2,20	3,20	1,00	4,60	0,97	1,10		1,90
	Nonylphénol monoéthoxylate (NP1OE)																			
	Nonylphénol diéthoxylate (NP2OE)																			
	Octylphénol																			
	Octylphénol monoéthoxylate (OP1OE)																			
	Octylphénol diéthoxylate (OP2OE)																			
Bisphénols	Bisphénol A																			
Hydrocarbures aromatiques polycyliques (HAP)	Acénaphtène								0,10		0,28		0,03	0,02	0,17		0,05			
	Acénaphthylène																			
	Anthracène													0,02			0,04			
	Benzo(a)anthracène													0,04			0,07			
	Benzo(a)pyrène													0,06			0,05			0,14
	Benzo(b)fluoranthène													0,07			0,07			0,18
	Benzo(ghi)Pérylène													0,05			0,02			0,12
	Benzo(k)fluoranthène													0,03			0,06			0,07
	Chrysène	0,04												0,07			0,09			
	Dibenz[a,c/a,h]anthracène																			
	Fluoranthène	0,05	0,03		0,02	0,02		0,03	0,02	0,02	0,02			0,13			0,24			0,25
	Fluorène	0,03								0,18										
	Indeno (1,2,3,c,d) pyrene							0,02						0,09			0,05			0,12
	Naphtalène		0,32			0,23														
	Phénanthrène	0,10	0,14		0,03	0,05	0,02	0,08	0,03	0,06	0,02	0,02	0,03	0,10	0,01	0,02	0,17	0,02		
	Pyrène	0,03	0,03		0,02	0,02		0,02		0,03	0,01			0,04			0,08			
Métaux et métalloïdes	Arsenic (As)		10,0				10,0				10,0						10,0	10,0		1,0
	Cadmium (Cd)	37,0		9,0	6,0	18,0		18,0						2,0						
	Chrome (Cr)	27,0	13,0	22,0		5,0	13,0	21,0		15,0	66,0	19,0	12,0	22,0		5,0	5,0	11,0		32,0
	Cuivre (Cu)	98	81	85	91	75	66	81	140	120	910	360	240	170	170	96	45	71		92
	Fer (Fe)	960	870	4 600	680	1 500	350	4 100	650	2 700	14 000	3 500	1 500	6 600	440	1 300	1 100	1 500		
	Manganèse (Mn)	110,0	30,0	70,0	50,0	60,0	10,0	70,0	70,0	70,0	400,0	160,0	110,0	130,0	20,0	50,0	60,0	150,0		
	Mercure (Hg)	1,70	0,60	1,70			0,50	1,70	0,60	1,20										2,05
	Nickel (Ni)	10,0	30,0	10,0	270,0	310,0		210,0		40,0	30,0			20,0				30,0		28,0
	Plomb (Pb)	130,0	10,0	40,0	10,0			150,0			40,0			60,0	10,0		10,0	20,0		151,0
	Titane (Ti)		20,0								90,0			220,0				10,0		41,0
	Zinc (Zn)	2 400	350	770	250	240	150	1 600	190	310	2 100	910	510	500	190	250	220	500		1 098
Pesticides	2,4-MCPA																			
	Acide aminométhylphosphonique (AMPA)	2,8	24	12	0,51	1,5	21	16	3,9	2,2	2	3,2		1,4	1	1,1	4,6	0,42		
	Cyperméthrine																			0,05
	Diuron																			
	Glyphosate	6,5	8,2	5,5	1,1	1,7	0,89		2,1	24	2,1	2,6	8,9	0,8	0,39	1,2	3,7	2		0,53
Phtalates	DEHP	6,18	1,93	1,13	3,46	1,94	1,13	1,23	2,74	6,24	2,52	3	1,9	12,9	7,77		12,3	18		2,8
Chlorophénols	Pentachlorophénol						21													
PCB	∑ Polychlorobiphényles																			
PBDE	∑ Polybromodiphényléthers																			
Autres	AOX (halogènes organiques adsorbables)	460	3250	1400	109	150	4360	420	111	5800		1700	2700	112	742	136	308			120
	Dichlorométhane																			
	Indice hydrocarbures C10-C40		300						1400		8300			300			200	800		520
	Indice phénols		30		40				270		90			20	110		60	70		70
	PFOS (Acide sulfonique de perfluorooctane)		0,06											0,08						
	Tributylétain cation																			
	Trichlorométhane																			
				non recherché		< LQ														

Tableau A.II.1. *Concentrations (µg/L) des micropolluants dans les échantillons d'eaux usées analysés au cours des trois campagnes de prélèvements (2017, 2018 et 2019). En rouge, les concentrations significatives selon les méthodes de calcul de la note technique du 12 août 2016. LQ : limite de quantification.*

	Origine EU		Mixte à dominante industrielle							Mixte à dominante domestique				Domestique	Mixte avant STEU	
	Année	2017	2017	2017	2017	2017	2018	2018	2017	2018	2019	2019	2019	2019	2017	2018
	Nom du point	ONV-1	CER-1	PON-1	PON-2	SOA-5		SOA-7	JLM-1	NSO-2	BOI-3	BOI-4	BOI-2	NSO-1		
Alkylphénols	Nonylphénol	1,20	0,59	1,00	0,87	17,00	10,00	0,75	0,89	0,17	0,51	1,70	3,60	40,00	0,32	
	Nonylphénol monoéthoxylate (NP1OE)										0,06	0,68	0,03			
	Nonylphénol diéthoxylate (NP2OE)															
	Octylphénol												0,14			
	Octylphénol monoéthoxylate (OP1OE)										0,17	0,47	0,41			
	Octylphénol diéthoxylate (OP2OE)															
Bisphénols	Bisphénol A															
Hydrocarbures aromatiques polycyliques (HAP)	Acénaphtène	0,02		0,63	0,19				0,02					0,03	0,02	
	Acénaphthylène		0,07													
	Anthracène			0,52	0,17											
	Benzo(a)anthracène			1,70	0,54											
	Benzo(a)pyrène			1,30	0,50						0,27		0,02			
	Benzo(b)fluoranthène			1,70	0,91						0,34					
	Benzo(ghi)Pérylène			0,53	0,24						0,19					
	Benzo(k)fluoranthène			0,72	0,26						0,13					
	Chrysène			1,70	0,56											
	Dibenz(a,c/a,h)anthracène			0,03	0,03											
	Fluoranthène			3,80	1,50	0,01		0,02	0,02		0,53	0,03	0,02	0,02	0,03	
	Fluorène			0,68	0,21	0,03				0,02					0,02	
	Indeno (1,2,3,cd) pyrene			1,40	0,88		0,01				0,23			0,01	0,03	
	Naphtalène			0,68	0,30	0,20			0,31							
	Phénanthrène	0,07		3,50	1,30	0,44	0,05	0,04		0,07				0,05	0,06	
	Pyrène	0,03		0,57	0,14	0,01		0,02	0,03					0,02		
Métaux et métalloïdes	Arsenic (As)															
	Cadmium (Cd)														2,0	
	Chrome (Cr)	6,0	29,0		9,0	8,0		7,0			19,0	11,0	5,0	14,0		
	Cuivre (Cu)	88	190	37	38	140	77	150	90	91	94	126	185	190	110	
	Fer (Fe)	1700	2200	520	420	4200	1500	2100	260	220				2300	1200	
	Manganèse (Mn)	70	220	20	30	130	60	50	30	20				80	70	
	Mercure (Hg)										0,20	0,31	0,07		0,50	
	Nickel (Ni)		20,0		20,0	10,0					15,0	0,9	6,0	20,0		
	Plomb (Pb)	10,0	10,0	10,0		10,0			10,0		54,0	72,0	5,0	30,0	10,0	
	Titane (Ti)		20,0			30,0			10,0		16,0	42,0	18,0	40,0		
	Zinc (Zn)	210	890	140	170	400	180	280	220	150	534	581	201	480	350	
Pesticides	2,4-MCPA	0,09												0,13		
	Acide aminométhylphosphonique (AMPA)	4,70	2,00	1,10	2,10	5,2	4,2	3,80	1,20	1,20				2,80	4,90	
	Cypermétrhrine										0,12					
	Diuron								0,03							
	Glyphosate	3,40	0,95	0,41	4,80	29	2,7	6,10	1,20	24,00	1,00	0,58	0,41	83,00	13,00	
Phtalates	DEHP	5,78	1,82	3,48	1,98	1,98	10,4	6,69	8,98	6,66	11,40	2,40	2,30	2,29	1,41	
Chlorophénols	Pentachlorophénol				1,10	0,8								0,60		
PCB	∑ Polychlorobiphényles															
PBDE	∑ Polybromodiphényléthers															
Autres	AOX (halogènes organiques adsorbables)	266	184	759	64	3270	780	310	199	400	220	230	320	361	170	
	Dichlorométhane															
	Indice hydrocarbures C10-C40	3600	4200			600			200		960	860		6200		
	Indice phénols	100	260	40	20	110			100		70	80	240	80		
	PFOS (Acide sulfonique de perfluorooctane)		0,15			0,06										
	Tributylétain cation										0,03	0,04	0,05			
	Trichlorométhane															

non recherché | <LQ

Tableau A.II.1. (suite) *Concentrations (µg/L) des micropolluants dans les échantillons d'eaux usées analysés au cours des trois campagnes de prélèvements (2017, 2018 et 2019). En rouge, les concentrations significatives selon les méthodes de calcul de la note technique du 12 août 2016. LQ : limite de quantification.*

Origine EU	Industrielle																		
Année	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2017	2018	2018	2017	2017	2017	2017	2017	2019	
Nom du point	SOA-1	SOA-2		SOA-3		SOA-4		SOA-6		ERA-1		ERA-2	ERA-3	ONY-2	ONY-3	ENN-1	BOI-1		
Substances extractibles à l'hexane	540	530	370	77	180	670	200	48	41	46	60	60	62	61	53	100	81	41	
Sulfates	28	12	17	23	20	11	114	57	43	568	156	91	37	42	137	31	41		
Chlorures	1300	6300	1400	280	370	8800	370	100	52	700	280	94	79	250	170	73	310		
Fluorures	3,10	4,00	1,10																

non recherché | < LQ

Origine EU	Mixte à dominante industrielle							Mixte à dominante domestique				Domestique	Mixte avant STEU	
Année	2017	2017	2017	2017	2017	2018	2018	2017	2018	2019	2019	2019	2017	2018
Nom du point	ONY-1	CER-1	PON-1	PON-2	SOA-5		SOA-7	JLM-1	NSO-2	BOI-3	BOI-4	BOI-2	NSO-1	
Substances extractibles à l'hexane	61	82	65	62	33	51	49	69	65	34	65	29	56	79
Sulfates	92	258	16	11	45	90	28	53	46				68	63
Chlorures	170	310	330	120	66	75	230	440	420				240	230
Fluorures				0,20										0,10

non recherché | < LQ

Tableau A.II.2. *Concentrations (µg/L) des polluants spécifiques pour le réseau d'assainissement dans les échantillons d'eaux usées analysés au cours des trois campagnes de prélèvements (2017, 2018 et 2019). En rouge, les concentrations significatives supérieures aux valeurs seuils réglementaires. Les substances extractibles à l'hexane traduisent la présence des graisses. LQ : limite de quantification.*

Chapitre III
Étude de la réponse du modèle *Drosophila melanogaster* à des polluants présents dans les eaux usées

«Une confrontation permanente entre théorie et expérience est une condition nécessaire à l'expression de la créativité.»

Pierre Joliot-Curie

L'essentiel chapitre III *: La toxicité est une mesure de la capacité d'une ou plusieurs substances chimiques à induire des perturbations physiologiques chez un organisme vivant. La toxicité induite est dépendante du composé et de sa spéciation mais également de la concentration de ce dernier et de la résistance de l'organisme étudié. Drosophila melanogaster est un modèle animal émergent pour des études de toxicité environnementale et se révèle pertinent pour étudier la toxicité d'une matrice aussi complexe que les eaux usées (cf. chapitre I – C.1). Plusieurs polluants connus pour leurs effets délétères sur l'environnement (cadmium, mercure, DEHP, bisphénol A, nonylphénol, glyphosate, benzo(a)pyrène) ont été sélectionnés pour éprouver le modèle et tester notre protocole. Ce protocole avait pour objectif de mesurer les effets toxiques en réponse à une exposition à l'un ou plusieurs de ces polluants et d'identifier des biomarqueurs d'exposition ou d'effet.*

Les polluants testés induisaient une forte mortalité et des perturbations du temps de développement de la drosophile lorsqu'ils ont été testés à de fortes concentrations. A de plus faibles concentrations, la mortalité n'était plus induite mais des retards de développement étaient toujours mesurables chez les larves. Des modifications dans l'expression des gènes ont également été enregistrées pouvant expliquer les perturbations des traits de vie. Au niveau moléculaire, chaque condition polluante présentait des profils spécifiques regroupables en fonction de caractéristiques communes (cluster). De manière générale, les concentrations testées pour un même polluant étaient regroupées ensemble et des tendances sur la régulation des cibles moléculaires étaient observables selon la condition polluante. En mélange, il apparaissait difficile d'attribuer la perturbation des cibles moléculaires à un polluant ou un autre. Cependant, les profils d'expression des gènes en condition mélange étaient regroupés avec ceux des concentrations de bisphénol A, ce qui indiquerait un effet dominant de ce dernier. Mais au vu de ces expériences uniquement, il reste difficile d'affirmer ou non la spécificité de biormarqueurs pour un polluant ou une famille de polluants. En revanche, ils peuvent être révélateurs du niveau de stress subi par les animaux.

Suite aux résultats de chimie analytique, les concentrations des polluants dans les eaux usées s'étaient avérées bien plus faibles que celles sélectionnées au départ sur la base des valeurs réglementaires. Il apparaît donc difficile d'utiliser ces marqueurs pour suivre ces substances dans les eaux usées sans expériences supplémentaires. Cependant, le suivi des traits de vie couplés à celui d'acteurs moléculaires pourrait servir à discriminer le degré de toxicité des différents échantillons d'eaux usées (domestiques, industrielles ou mixtes) et donc d'identifier des sites d'émission de substances toxiques.

A. Mise en place du bioessai

A.1. Sélection des polluants et des concentrations

La toxicité est mesurable au travers de l'observation des perturbations de plusieurs traits phénotypiques à plusieurs échelles (de la molécule à l'organisme entier). La capacité d'une substance chimique à induire des effets délétères dépend de sa spéciation, de sa concentration et de sa fraction biodisponible. En fonction de ces paramètres et du composé étudié, les effets toxiques peuvent être variables puisque les cibles ne sont pas nécessairement les mêmes. Ainsi, la première étape du développement du bioessai visait à tester les réponses du modèle drosophile face à des gammes de concentrations de polluants de nature différente. L'objectif de cette première étape était d'éprouver le modèle par l'utilisation de deux approches : « substance par substance » et mélange. Cette méthodologie avait pour but de vérifier l'existence de signatures toxicologiques spécifiques en fonction des polluants et si ces signatures pouvaient être retrouvées lorsque les polluants étaient mélangés. La seconde étape constituait en l'utilisation de ce même protocole pour mesurer la toxicité des différents échantillons d'eaux usées et évaluer la pertinence des biomarqueurs (cf chapitre IV).

Lors de la mise en place du bioessai, nous ne disposions pas des résultats sur la composition de nos eaux usées et relativement peu de données bibliographiques étaient disponibles. Aussi, la sélection des substances pour la première étape du développement du bioessai a reposé sur leur intérêt et leur possible présence dans les eaux usées (note technique de 12 août 2016) et sur leurs effets toxiques connus dans l'environnement. Sept composés ont ainsi été choisis pour illustrer les effets de plusieurs représentants de familles chimiques : cadmium et mercure (métaux et métalloïdes), DEHP (phtalates), bisphénol A (bisphénols), nonylphénol (alkylphénols), benzo(a)pyrène (hydrocarbures aromatiques polycycliques), glyphosate (pesticides). Les effets de ces polluants sont plus ou moins bien connus chez les invertébrés, notamment chez les insectes (**Tableau II-7**) ; les données les plus étoffées de la littérature portent sur les métaux.

Famille	Composé	Effets connus chez les insectes	*Références*
Métaux et métalloïdes	Cadmium	Mortalité, retard de développement, diminution du poids et/ou de la taille, reprotoxicité, malformation, modification physiologique moléculaire, modification comportementale, génotoxicité	*Bixler et Schnee, 2018; Cervera et al., 2004; Di et al., 2016; Doğanlar et al., 2014; Mirčić et al., 2013; Mogren et Trumble, 2010; Shulman et al., 2017*
Métaux et métalloïdes	Mercure	Mortalité, retard de développement, diminution du poids et/ou de la taille, reprotoxicité, malformation, modification physiologique moléculaire, modification comportementale	*Adedara et al., 2016; Chauhan et al., 2017; Chen et al., 2016; D. Rand et al., 2009; Zaman et al., 1994*
Phtalates	DEHP	Peu ou pas de mortalité (sauf à forte dose), retard de développement, reprotoxicité, modification physiologique moléculaire, effet potentiel sur le comportement *La réponse toxique est parfois non monotone*	*Aviles et al., 2019; Cao et al., 2016; Chen et al., 2018; Herrero et al., 2017; Park et Kwak, 2010*
Bisphénols	Bisphénol A	Peu ou pas de mortalité (sauf à forte dose), effet sur le temps de développement, impact sur le poids et la morphologie, reprotoxicité, modification physiologique moléculaire, effet potentiel sur le comportement *La réponse toxique est généralement non monotone*	*Alti et al., 2012; Kaur et al., 2015; Kontogiannatos et al., 2015; Maria et al., 2019; Planelló et al., 2008; Watts et al., 2003; Weiner et al., 2014*
Alkylphénols	Nonylphénol	Peu ou pas de mortalité (sauf à forte dose), reprotoxicité, effet potentiel sur la morphologie, modification physiologique moléculaire	*Atli, 2013; Kahl et al., 1997; Martínez-Paz et al., 2012; Meregalli et al., 2001; Park et Kwak, 2010; Yuan et al., 2013*
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)	Benzo(a)pyrène	Mortalité, retard de développement, diminution du poids, modification physiologique moléculaire, génotoxicité	*Batiste-Alentorn et al., 1994; Ilijin et al., 2015; Prud'homme et al., 2017; Vache et al., 2007; Vicentini et al., 2017; Zhang et al., 2019*
Pesticides	Glyphosate	Peu ou pas de mortalité, faible retard de développement, impact sur le poids et le microbiote intestinal, réduction fécondité/fertilité, modification physiologique moléculaire, modification comportementale notamment chez l'abeille	*Baglan et al., 2018; Dai et al., 2018; De Aguiar et al., 2016; Herbert et al., 2014; Schneider et al., 2009*

Tableau II-7. *Effets toxiques connus chez les insectes des sept polluants sélectionnés.*

Les gammes de concentrations de chacun des composés à tester ont été déterminées à partir de valeurs réglementaires. Il existe des concentrations seuils spécifiques aux eaux usées. Ces valeurs dites valeurs limites d'émission (VLE) sont répertoriées dans un arrêté préfectoral (arrêté du 2 février 1998) qui prescrit des concentrations seuils pour un petit nombre de substances dans les eaux usées brutes relatives à des activités industrielles spécifiques (cf. chapitre I – A.2). Ces valeurs n'existent donc pas pour tous les composés et sont généralement plus fortes que les normes de qualité environnementale (NQE) puisqu'elles se rapportent aux eaux usées brutes.

Parmi les composés sélectionnés, ces valeurs existent uniquement pour le cadmium, le mercure et le benzo(a)pyrène. Pour les autres composés, ce sont les NQE qui ont été retenues comme concentrations initiales, à l'exception du bisphénol A. En raison de sa toxicité non monotone, il n'existe pas de telles normes à ce jour. Cependant, plusieurs valeurs écotoxicologiques ont été calculées par l'INERIS ; nous avons choisi d'utiliser la PNEC, la concentration prédictive sans effet.

A partir des concentrations initiales choisies, trois multiples de 10 ont été calculés pour obtenir des gammes de concentrations croissantes (**Tableau II-8**). Pour les tests en mélange, nous avons choisi de tester deux modalités. La première était de tester les métaux en co-exposition (**Tableau II-8**) plus rarement étudiés dans la littérature et chez les insectes, ce qui permettait d'aborder cette étude sous un nouvel angle. En raison du nombre de combinaisons possibles entre le reste des composés étudiés, nous avons choisi de mélanger tous les polluants ensemble pour mimer un mélange relativement complexe comme le sont les eaux usées. Nous avons testé trois combinaisons A (concentrations initiales), B (1er multiple de 10 des concentrations initiales) et C (2ème multiple de 10 des concentrations initiales) (**Tableau II-8**).

Famille	Composé	Concentrations testées *(mg/L)*	Effets cocktails métaux *(mg/L)*		Effets cocktails polluants *(mg/L)*		
					A	*B*	*C*
Métaux et métalloïdes	Cadmium (CdCl2)	**0,2** **2** 20 200	0,2	2	**0,2**	**2**	2
Métaux et métalloïdes	Mercure (CH3HgCl)	**0,05** 0,5 **5** 50	0,05	0,5	**0,05**	**0,5**	5
Phtalates	DEHP	**0,0013** **0,13** 13 130			**0,0013**	**0,13**	13
Bisphénols	Bisphénol A	**0,0016** **0,16** 16 160			**0,0016**	**0,16**	16
Alkylphénols	Nonylphénol	**0,002** **2** 20 200			**0,002**	**2**	20
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)	Benzo(a)pyrène	**0,05** **0,5** 5 50			**0,05**	**0,5**	5
Pesticides	Glyphosate	**0,028** **2,8** 28 140			**0,028**	**2,8**	28

Tableau II-8. *Conditions expérimentales du bioessai pour les approches « substance par substance » et mélange. Les formes des composés métalliques sont des sels de chlorures de cadmium ($CdCl_2$) et de méthyl mercure (CH_3HgCl) qui sont les formes les plus couramment utilisées en laboratoire et qui sont solubles. Les concentrations en caractère gras sont les conditions qui ont été testées pour la recherche de marqueurs moléculaires précoces de toxicité (exposition ou effet).*

Lorsque les polluants n'étaient pas solubles dans l'eau comme le cadmium ou le glyphosate, des solutions mères très concentrées (1 g/L) ont été réalisées dans des solvants adaptés à chaque composé (éthanol, méthanol ou acétone) afin de pouvoir réaliser les gammes de concentrations dans l'eau et ainsi limiter la présence du solvant.

A.2. Déroulement général du bioessai

Chez *Drosophila melanogaster*, il y a plusieurs stades de développement sur lesquels travailler (cf chapitre I - C.3). Nous avons choisi d'étudier les perturbations des stades post-embryonnaires à la suite d'expositions à des molécules toxiques et aux eaux usées. Ces stades permettent une exposition directe des animaux par contact et ingestion. En effet, l'embryon qui est le premier stade de développement (l'œuf) chez la drosophile est relativement peu perméable aux molécules toxiques sans préparations au préalable (Rand et al., 2014).

Le protocole du bioessai devait être simple et facilement applicable pour les eaux usées. Aussi, bien que les œufs soient peu perméables, il était important d'avoir un premier dispositif permettant de les échantillonner sans qu'ils soient au contact du milieu contaminé. Des perturbations de l'embryogenèse pouvaient affecter le développement post-embryonnaire des individus et biaiser nos observations. Le second dispositif permettait l'exposition des premiers stades larvaires jusqu'au stade imago.

Le dispositif de ponte consiste en la préparation de supports gélosés 1% à base de jus de raisin et de sucre, appétant pour la drosophile et disposés dans des boîtes de pétri (**Figure III-24**). Mâles et femelles sont placés dans ces dispositifs durant une vingtaine d'heures pendant lesquelles les femelles, stimulées par les phéromones d'agrégation mâles déposées sur les supports (Lin et al., 2015), pouvaient pondre (**Figure III-24**). Une fois que le nombre d'oeufs est connu et homogénéisé sur chacun des supports (environ 40 à 50 œufs), ces derniers sont placés dans les dispositifs d'exposition contenant de la nourriture contaminée (nourriture sèche réhydratée au préalable avec une solution aqueuse) (**Figure III-24**). Après l'éclosion, les larves migrent du support vers le milieu contaminé pour s'en nourrir et s'y développer. Le suivi des individus jusqu'à leur émergence soit une dizaine de jours, se déroulait dans des conditions optimales d'élevage, en étuve thermostatée à 25°C ± 1°C, 60%-80% d'humidité relative et suivant une photopériode de 12h:12h lumière/obscurité. Pendant ce suivi, plusieurs paramètres à l'échelle de l'organisme entier (phénotypes macroscopiques) et à l'échelle moléculaire (cibles moléculaires) étaient mesurés.

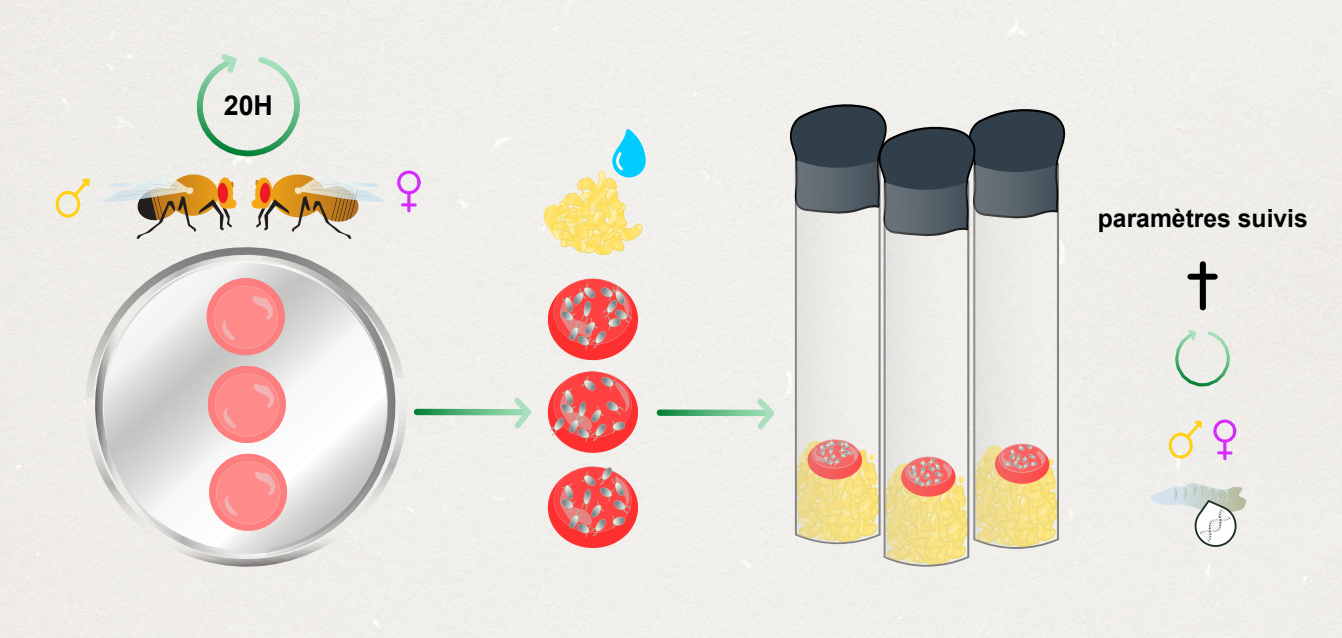


Figure III-24. *Protocole d'exposition de Drosophila melanogaster. Après avoir passé 20h à la ponte, les adultes sont retirés des boîtes. Le nombre d'oeufs est compté et homogénéisé sur chaque support gélosé. Un support contenant un nombre d'oeufs connu est déposé dans un tube d'élevage en polypropylène contenant de la nourriture contaminée. Les oeufs en fin d'embryogenèse éclosent et les larves partent se nourrir du milieu contaminé. Le suivi des individus se déroule jusqu'à leur émergence, soit une dizaine de jours durant lesquels sont mesurés plusieurs paramètres à l'échelle de l'organisme entier et moléculaire.*

A.2.1. Phénotypes macroscopiques

Plusieurs paramètres clés comme le taux de mortalité, le temps de développement ou encore le sex-ratio (biais des expositions en faveur d'un sexe) ont été systématiquement enregistrés durant l'ensemble des expériences. Mais de nombreux traits de vie sont facilement observables et mesurables chez la drosophile. D'autres paramètres qui n'avaient pas été systématiquement enregistrés ont été mesurés et certaines anomalies sur la taille ou la fécondité des individus ont ainsi été détectées lors d'exposition aux eaux usées (cf. chapitre IV). Nous avons également établi une collaboration avec le laboratoire de biologie du développement de l'institut de biologie Paris Seine (IBPS) de Sorbonne Université qui a pour projet de tester sur le modèle drosophile les effets des polluants sur la pigmentation et l'asymétrie fluctuante (cf. chapitre V).

La démarche et la possibilité de caractériser un grand nombre d'effets chez la drosophile et ce, concernant plusieurs types de traits de vie (du développement à la reproduction) permettent d'identifier et de préciser le degré de toxicité selon les polluants ou les eaux usées étudiés.

A.2.2. Recherche de biomarqueurs moléculaires

L'exposition à des xénobiotiques peut engendrer des dérégulations de cibles moléculaires pouvant être utilisées comme marqueurs précoces d'exposition et d'effet. Chez la drosophile de nombreuses possibilités d'études du gène à la protéine sont envisageables. La transcription des gènes est l'une des étapes amonts dans la formation des protéines et est fonction du rôle des gènes au sein de la cellule (régulation minutieuse). Elle peut également dépendre de facteurs extérieurs comme l'exposition à des xénobiotiques. Des perturbations transcripitonnelles peuvent ainsi être interprétées comme un signe précoce de dérégulation d'un processus biologique pouvant porter atteinte à l'intégrité d'un organisme vivant. De plus, ils peuvent fournir des informations sur les mécanismes impliqués en cas de perturbations à l'échelle de l'organisme.

Pour étudier l'expression des gènes, plusieurs méthodes sont possibles et qui fournissent plus ou moins d'informations dans un temps donné. Au vu du nombre de conditions à expérimenter et du temps imparti, nous avons choisi une approche avec *a priori* en sélectionnant une quarantaine de gènes dont la fonction est connue. La connaissance du génome de la drosophile et le grand nombre d'études fonctionnelles disponibles facilitent la sélection d'un premier panel de gènes impliqués dans diverses voies de signalisation d'intérêt (cf. chapitre I – C.3).

La technique de la RT-qPCR a été utilisée afin de suivre l'expression de chacun des candidats dans l'ensemble de nos conditions, polluants (cf chapitre III - B et C) et eaux usées (cf chapitre IV). Ces analyses ont été menées sur des larves de drosophile du troisième stade larvaire, plus facilement manipulables et classiquement utilisées pour ce type d'étude. De plus, elles constituent le dernier stade avant la métamorphose et ont donc été exposées le plus longtemps aux polluants au cours de leur cycle de développement. Nous avons choisi de réaliser ces études dans les conditions polluantes aux plus faibles concentrations des gammes réalisées (caractères gras, **Tableau II-8** page 138).

B. Exposition seule ou en mélange du cadmium et du mercure sur *Drosophila melanogaster* : réponses moléculaires et impacts sur le développement post-embryonnaire

Le but de cette première étude a été de caractériser la réponse de Drosophila melanogaster exposée à deux métaux lourds non-essentiels, le cadmium et le mercure. Les effets de ces métaux sont relativement bien étudiés chez les vertébrés comme chez les invertébrés (Bjørklund et al., 2017; Chauhan et al., 2017; Mogren et Trumble, 2010; Zhang et Reynolds, 2019) et chez la drosophile (Abnoos et al., 2013; Akins et al., 1992; Prince et al., 2014; Sorsa et Pfeifer, 1973). Cependant, nous avons abordé cette question sous un nouvel angle en testant des mélanges de ces métaux. Ce type de conditions est plus rarement étudié dans la littérature alors que cela se rapproche le plus des conditions environnementales (European Environment Agency, 2018).

Ecotoxicology and Environmental Safety 220 (2021) 112377

Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Single and mixed exposure to cadmium and mercury in *Drosophila melanogaster*: Molecular responses and impact on post-embryonic development

Laëtitia Frat [a,b], Thomas Chertemps [b], Elise Pesce [b], Françoise Bozzolan [b], Matthieu Dacher [b,c], Rosario Planelló [d], Oscar Herrero [d], Lola Llorente [d], Didier Moers [a], David Siaussat [b,*,1]

[a] Syndicat Intercommunal pour l'Assainissement de la Région de Pontoise (SIARP), 95000 Pontoise, France
[b] Sorbonne Université, INRA, CNRS, IRD, UPEC, Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris (iEES-Paris), F75005 Paris, France
[c] Sorbonne Université, INRA, CNRS, IRD, UPEC, Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris (iEES-Paris), 78026 Versailles, France
[d] Biology and Environmental Toxicology Group, Faculty of Sciences, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), Paseo de la Senda del Rey 9, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Edited by: Professor Bing Yan

Keywords:
Heavy metals
Mixture
Wastewater
Insect
Sublethal concentration
Gene expression
qPCR

ABSTRACT

Heavy metals, like many other chemical elements, are naturally present in the environment; however, the concentrations of these metals in various environmental matrices have increased through their intensive use in many human activities (such as industry, mining and agriculture). Among the heavy metals, cadmium (Cd) and mercury (Hg) induce a wide variety of defects in animals. While the effects of these heavy metals have been widely documented, a single exposure paradigm is typically used. Few studies have focused on evaluating combined exposure to these metals. However, in the environment, animals are confronted with a plethora of substances simultaneously; thus, the presence and origin of such substances must be determined to reduce the sources of contamination. Using the model of the fruit fly *Drosophila melanogaster*, for which many tools are readily available, we investigated how different concentrations of Cd and Hg in single and combined exposures impact post-embryonic development. In parallel, we evaluated the extended expression pattern of 38 molecular targets used as potential biomarkers of exposure through qPCR. Our results showed that both metals caused developmental delays and mortality in dose-dependent responses. Both metals were able to deregulate genes involved in hormonal control, general stress, and oxidative stress. Importantly, we confirmed synergistic interactions between Cd and Hg. Our results indicate the importance of assessing several biomarkers and their kinetics in mixtures. *Drosophila* represents a useful model for monitoring the toxicity of substances in polluted environments.

1. Introduction

Heavy metals and many others chemical elements are naturally present in environment, with cadmium (Cd) and mercury (Hg) being particularly widespread (Wu et al., 2016). These two metals are intensively used in several human activities, including non-ferrous metal refining and household waste incinerators, resulting in their being discharged in industrial waste and wastewater; consequently, their concentrations are high in various environmental matrices (Caballero-Gallardo et al., 2016; Wu et al., 2016). Cd and Hg are toxic compounds that induce a wide variety of defects in animals. Depending on their mode of action and route of exposure, Cd and Hg can bioaccumulate, induce protein denaturation, disrupt essential enzymes (e.g., DNA methyltransferase), and even damage cell membranes by oxidative stress. These molecular effects disrupt critical functions, including locomotion, digestive activity, and the nervous system (Genchi et al., 2020). Over the last 10 years, Cd and Hg have also been identified as potential endocrine disruptors (EDCs) in vertebrate and invertebrate models, altering the expression of hormone receptor genes and circulating hormone levels, along with disrupting the production in the endocrine gland (Iavicoli et al., 2009; Planelló et al., 2010; Rana, 2014). Yet, the analysis of heavy metals impacts needs refining to

* Correspondence to: Institut d'Ecologie et Sciences de l'Environnement de Paris – Département Ecologie Sensorielle.
E-mail address: david.siaussat@sorbonne-universite.fr (D. Siaussat).
[1] Present address: Sorbonne Université, 4 place Jussieu, Campus Pierre etMarie Curie – Tours 44-45, 3ème étage, boite courrier 237, 75005 Paris, France.

https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112377
Received 23 January 2021; Received in revised form 22 May 2021; Accepted 24 May 2021
Available online 27 May 2021
0147-6513/© 2021 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

incorporate complex environmental matrices, which constitute mixtures of pollutants often at moderate to low concentrations. For instance, wastewater is subject to regulations in some countries, whereby toxicity must be evaluated to trace low concentrations of pollutants and their sources (European Community, 2000).

Bioassays are typically used to detect pollutants (Chapman, 1995), with the presence and toxicity of Cd and Hg being detected using single exposure paradigms (Rana, 2014; Rice et al., 2014). However, very few studies have examined the effect of combined exposure to these metals. Moreover, combined exposure is often difficult to interpret, because the effects are not predictable, potentially being synergistic, additive, or antagonistic depending on complex modified physicochemical parameters, such as bioavailability and affinity (Wu et al., 2016). Thus, the effects of these substances must be tested in mixtures to verify their traceability via currently known biomarkers. Furthermore, the biological impact of heavy metal exposure is usually examined through acute toxicity testing of a given biological model, using high concentrations to trigger a clear phenotype over a short observation time (typically 1 h to 3 days). However, these tests are not well suited for understanding the effects of moderate to low levels of pollutants. In such cases, chronic toxicity tests are more effective in detecting the deleterious effect of lower doses of pollutants. A longer observation time (most of the life cycle of the exposed organism) allows the effects of chronic or continuous exposure to low doses alone or in mixtures to be detected, reflecting the conditions found in complex matrices.

The fruit fly *Drosophila melanogaster* represents a relevant model for short and long –term toxicological studies. This model has many advantages, including high fecundity, short lifespan, ease of rearing, available genetic tools and databases, combined with a good knowledge of the biology, physiology, development and behavior of this species. Because this model offers many opportunities, it has been widely used for many decades to study various biological processes and human diseases (Masamitsu and Hideki, 2018). This model also provides many possibilities for assessing the biological impact of pollutants and environmental change (Atli, 2013; Carmona et al., 2008; Hu et al., 2019). In addition, several studies have been published on the two target metals and their effects at the molecular (Chen et al., 2016; Doğanlar et al., 2014) and organism (Chauhan et al., 2017; Hu et al., 2019) level. Furthermore, changes to both the anatomy and molecular composition must be evaluated to increase the sensitivity of the bioassay.

Thus, this study investigated the impact of Cd and Hg alone and in combination on the post-embryonic development. First, we evaluated the effect of each metal alone on the extended expression pattern of 38 molecular targets *of D. melanogaster* to identify relevant biomarkers during development and for gene expression. Then, we tested the co-exposure of metals, to assess the impact on biomarkers observed during single exposure and their interactions. We used concentrations starting from low doses (defined as regulatory threshold in French wastewater networks) and higher doses. For mixtures, we focused on the low doses that are regularly encountered in wastewater. Finally, we tested the potential of this model for use as a chronic bioassay to analyze the impact of water polluted by Cd and Hg alone or in mixture.

2. Material and methods

2.1. Selection of concentrations

The soluble forms of Cd and Hg (cadmium chloride, methylmercury (II) chloride, Sigma Aldrich France) were used. We started with a lower concentration that corresponded to (and did not exceed) the threshold concentration in wastewater, so as not to contaminate natural aquatic environments after treatment by the wastewater treatment plant (ORF, 1998). Then, we tested higher concentrations based on the threshold value. Four concentrations per metal were tested for Cd (0.2 = Threshold value; 2; 20 and 200 mg/L) and Hg (0.05 = Threshold value; 0.5; 5 and 50 mg/L) (Table 1, left part). For the co-exposure experiments, we mixed the two lowest concentrations of each pollutant (0.2 and 2 mg Cd/L and 0.05 and 0.5 mg Hg/L) to evaluate potential cocktail effects, and because these are more likely found in the matrices of interest (Table 1, right part).

2.2. Insect rearing and experimental procedure for monitoring post-embryonic development

The Canton-S strain of *D. melanogaster* was reared on standard *Drosophila* medium (cornmeal, agar, sugar, yeast and water) at 25 °C ± 1 °C, 60–80% relative humidity and 12:12 h dark/light cycle. Eggs were collected after 20 h of oviposition on 1% agar supplemented with grape juice and sugar (2%). About 45–50 eggs were transferred to vials containing 2 g Nutri Fly Instant medium (GENESEE, France) rehydrated with 8 mL metal-contaminated solution in water (corresponding to day 0 of the experiment). Flies were exposed by contact and ingestion to Cd and Hg, either as single exposure (Table 1, right part) or co-exposure (Table 1, left part). For the control condition and the 12 treated conditions, mortality rates during development, mean duration of larval and pupal stage, and sex-ratio were recorded. we specially focused on larval development, as it is often more disrupted by metals compared to the pupal stage (Abnoos et al., 2013; Akins et al., 1992). We expressed our daily data of newly formed pupae as percent larva-pupa transition and larvae that reached the pupal stage. For each experimental condition, five biological replicates were performed representing a minimum total of 225 eggs initially deposited in control and metal-contaminated tubes.

2.3. Molecular analysis: gene expression with RT-qPCR

2.3.1. Total RNA extraction and cDNA synthesis

About 10 larvae from the control and exposed Cd and Hg single and co-exposure groups (Table 1, conditions with asterisk) were collected per biological replicate 4 days after egg laying. The larvae were stored at −80 °C until total RNA extraction using the TRIzol method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) coupled with the RNAeasy extraction kit (Qiagen,

Table 1
Test conditions of *Drosophila melanogaster*. The experiments took place in two phases: (1) single exposure, and (2) co-exposure (gray background, arrows indicate the selected concentration). Asterisks indicate the conditions used to measure gene expression levels.

Single exposure (1)		Co-exposure (2)
Cadmium ($CdCl_2$)	Mercury (CH_3HgCl)	0.2 + 0.05*
0.2*	0.05*	0.2 + 0.5*
2*	0.5	2 + 0.05*
20	5*	2 + 0.5*
200	50	

USA), according manufacturers protocols. RNA quality was controlled by spectrophotometry (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany). DNase I Treatment (Roche, USA) was implemented following the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 5 μg RNA with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. For each experimental condition, three biological replicates were performed.

2.3.2. RT- qPCR

Five genes were first tested as putative housekeeping genes (*actin5C, αTub84, zw, rpS20,* and *pgk*) by Bestkeeper analysis (Pfaffl et al., 2004). *Pgk* was used as the reference gene, as it had the most stable expression among the experimental groups. Forward and reverse primers (*EcR, USP, met, ERR, BR-C, HR3, dib, cyp18a1, jheh1, hsf, hsp22, hsp23, hsp40, hsp68, hsp70, hsp83, hsc70, mtna, mtnb, TI, imd, def, p38, mef2, sirt1, keap1, cnc, cat, phgpx, sod, debcl, creba, cpr,* and *mdr49*) were designed from Flybase using AmplifX software (Supplementary Data Table S1). In cases where genes were transcribed to several isoforms, specific primers were designed in a shared region, allowing the accurate amplification of all isoforms. PCR reactions were performed on the LightCycler480 Real-Time PCR Detection System (Roche Applied Science, France), adapted from Bigot et al. (2012). Each reaction consisted of 5 μL Absolute Blue SYBR Green Fluor (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 4 μL of cDNA (6.25 ng/μL) and 0.5 μL of each primer (10 μM). The PCR program consisted of an initial step at 95 °C for 5 min, followed by 50 cycles, consisting of 10 s at 95 °C, 15 s at 60 °C, and 15 s at 72 °C. Under these conditions, a single and discrete peak was detected for all primers tested after melting curve analysis, and all primers gave efficiencies of 85–105%. Each run included a fivefold dilution series, candidate genes, reference gene, and negative control. Each condition was evaluated in triplicate. The mean Ct value (cycle threshold) of each triplicate reaction was used to normalize the candidate gene expression level to the geometric mean of *pgk* level in Q-Gene software (Simon, 2003). Expression levels are summarized on a heatmap built on Past 3.14 Software. The raw data were normalized to the housekeeping gene *pgk*, centered to the control group, and were transformed to a logarithmic base 2 scale to emphasize variation between control and treated conditions.

2.4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R 3.5.1 and R Studio 1.1.456 (R Core Team, 2017) and GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc.). The Shapiro–Wilk test was used to check the normality of the data. Mortality rates and sex-ratio of treated groups were analyzed using a Chi-square test to allow comparison with the control group. Larval developmental duration was analyzed with a Gehan–-Breslow–Wilcoxon test to compare developmental curves, and by one-way ANOVA to compare the global duration per stage. The Gehan-Breslow-Wilcoxon method was used to weight the early points, allowing discriminating effects at early larval-pupal transition, as we could only observe pupal molts (not larval molts) (Hazra, 2017). Gene Expression levels were analyzed using ANOVA with a permutation test followed by a Scheffe post-hoc test. Synergy or antagonism between Cd and Hg was analyzed following Ritz et al. (2021), using the delta method in R. Among the two currently models used (Loewe and Bliss; Tang et al., 2015), we chose the Bliss independence criterion with the initial assumption that, if there was an interaction, the effects would be multiplied. We only evaluated the interactive effects of mixtures using 0.2, 2 mg Cd/L and 0.05 mg Hg/L, since we had available references for single exposure. P-values lower than 5% were considered significant (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$).

3. Results

3.1. Impact of heavy metals on post-embryonic development

At the lowest concentrations tested (0.2–2 mg Cd/L and 0.05–0.5 mg Hg/L), mono-exposure to metals had no significant effect on the survival of individuals compared to the control group (Table 2). The highest Cd concentrations (20 mg/L and 200 mg/L) induced 99.04% and 100% larval mortality, respectively. Of the two highest Hg concentrations, 5 mg/L significantly increased larval mortality (10% compared to the control group), and resulted in the death of almost all larvae during the pupal stage, while 50 mg/L resulted in 100% larval mortality, similar to that of Cd (Table 2). Overall, the duration of the pupal stage was not affected by metal exposure. The time required to complete metamorphosis ranged from 4.53 to 5.04 days (Table 2). Conversely, the mean time to reach the pupal stage was affected after exposure to high metal concentrations. At 20 mg Cd/L, this mean time increased significantly, and reached 9.1 days after egg-laying, whereas it was about 6 days for the control group (Table 2). Similarly, at 5 mg Hg/L, this mean time increased to 7.5 days. Looking at the daily percentage of larval-pupal transition, significantly different percentages were obtained for 2 mg Cd/L and 0.5 mg Hg/L compared to the control group (Table 2), indicating that metals induced a developmental delay of a few hours.

During daily monitoring, an unusual phenotype was observed for the 5 mg Hg/L exposure. Indeed, hatching adults died rapidly, with their wings still folded and their abdomen not yet pigmented in contrast to the control group (data not shown). Many flies died during the pupal stage as "black pupa." Also, around 4% of adults failed to hatch and remained trapped in the pupal exuvia (data not shown). In comparison, no flies remained trapped in pupa in the control group. To date, few studies mentioned developmental abnormalities or such morphological changes following metal exposure.

Subsequently, we tested the impact of co-exposures to Cd and Hg at the selected low concentrations (Table 1). We assumed that simultaneous exposure to these metals would have stronger effects, due to possible cocktail effects; thus, we evaluated the lowest concentrations (Table 1). Combinations of 0.2–2 mg Cd/L with 0.05–0.5 mg Hg/L did not affect animal survival when compared to the control group (Table 2). Furthermore, the mean duration of pupal and larval stages did not change after exposure (Table 2). Interestingly, the daily cumulative proportion of larval-pupal transitions was affected by co-exposure to 2 mg Cd/L and 0.5 mg Hg/L in the same manner as that observed with single exposure to these concentrations (Table 2). The combination of 0.5 mg Hg/L and the lowest Cd concentration (i.e. 0.2 mg/L) also induced a delay. The other combinations were not significantly different from the control group.

Finally, sex-ratio remained unchanged between males and females in single and co-exposure groups (Table 2).

3.2. Impact of heavy metals on gene expression levels

We focused on the lowest concentrations more likely to be detected in wastewater, and that corresponded to sublethal concentration ranges (Table 1, right part). Molecular analysis consisted of measuring the expression of 38 genes involved in various signaling pathways: hormone signaling pathway, heat shock proteins (HSPs) signaling pathway, metallothioneines (MTs) signaling pathway, and cell stress signaling pathway. Overall, the results clearly differed between the single and co-exposure groups (Fig. 1). The raw values of gene expression and folding are presented in Table S2. Specifically, Cd modulated gene expression more than Hg. During co-exposure, the interaction between Cd and Hg was consistently synergistic based on Bliss criterion. The statistical results for interaction analyses are presented in Table S3.

3.2.1. Hormone signaling pathway

In larvae exposed to Cd (i.e., 0.2 and 2 mg/L) and 5 mg Hg/L, *EcR*

Table 2
Summary results of metals under single and co-exposure conditions on the developmental time, mortality, and sex ratio of *D. melanogaster* (mean ± standard deviation). C = control; NC = not calculable. P-values lower than 5% were considered significant (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

		C	0.2	2	20	200	0.05	0.5	5	50	0.2 mg Cd/L 0.05	0.2 mg Cd/L 0.5	2 mg Cd/L 0.05	2 mg Cd/L 0.5	
Mortality	Larval stages	13.88% *(±2.48)*	14.83% *(±5.93)*	14.23% *(±5.25)*	99.04% ***(±1.76)*	100%	11.74% *(±7.32)*	11.80% *(±10.03)*	21.03% *** *(±20.95)*	100%	9.33% *(±4.27)*	*(±6.29)*	12.44% *(±10.26)*	9.33% *(±4.82)*	
	Pupal stage	1.81% *(±3.24)*	2.97% *(±4.55)*	1.94% *(±3.45)*	0.60% *(±35.19)*	*NC*	1.94% *(±2.61)*	1.06% *(±2.10)*	77.18% ***(±4.02)*	*NC*	1.78% *(±5.82)*	0%	2.22% *(±4.08)*	0.44% *(±1.06)*	
Developmental time															
Mean duration of larval stages *(days)*		5.94 *(±0.17)*	5.98 *(±0.21)*	6.06 *(±0.18)*	9.13*** *(±0.96)*	*NC*	5.99 *(±0.21)*	6.21 *(±0.20)*	7.47*** *(±0.46)*	*NC*	5.94 *(±0.11)*	6.13 *(±0.07)*	6.01 *(±0.13)*	6.06 *(±0.04)*	
Mean duration of pupal stage *(days)*		5.02 *(±0.08)*	5.01 *(±0.16)*	4.96 *(±0.18)* *	4.88 *(±0.35)* ***	*NC*	5.00 *(±0.19)*	4.80 *(±0.20)* ***	4.53 *(±0.02)* ***	*NC*	5.06 *(±0.01)*	4.87 *(±0.07)* ***	4.98 *(±0.12)*	4.94 *(±0.04)* ***	
Percentages larval-pupal transition *(day after egg-laying)*															
	Day 5	10.51% *(±12.32)*	10.83% *(±16.45)*	4.68% *(±7.65)*	0%	*NC*	11.11% *(±13.19)*	1.20% *(±1.89)*	0%	*NC*	8.82% *(±4.95)*	0.98% *(±3.37)*	5.58% *(±9.01)*	1.96% *(±4.26)*	
	Day 6	84.94% *(±11.31)*	81.24% *(±9.54)*	85.37% *(±11.78)*	0%	*NC*	79.53% *(±11.22)*	78.90% *(±17.57)*	21.71% *(±24.72)*	*NC*	88.73% *(±3.74)*	85.85% *(±6.81)*	88.32% *(±7.30)*	89.70% *(±6.16)*	
	Day 7	4.38% *(±1.45)*	6.96% *(±1.73)*	9.35% *(±1.24)*	0%	*NC*	8.63% *(±1.44)*	18.01% *(±2.51)*	68.75% *(±13.42)*	*NC*	2.45% *(±0)*	12.68% *(±0)*	6.09% *(±0)*	8.33% *(±0)*	
	Day 8	0.18% *(±0)*	0.77% *(±0.64)*	0.60% *(±0)*	0%	*NC*	0.58% *(±0.59)*	1.89% *(±0)*	7.89% *(±4.99)*	*NC*		0.48% *(±0)*			
	Day 9		0.19% *(±0)*		87.5% *(±16.67)*	*NC*	0%		0.99% *(±3.44)*	*NC*					
	Day 10				12.5% *(±0)*	*NC*	0.14% *(±0.59)*		0.33% *(±1.72)*	*NC*					
	Day 11					*NC*			0.33% *(±0)*	*NC*					
Sex-ratio	Male	50.84% *(±6.64)*	50.51% *(±8.46)*	52.87% *(±6.91)*	*NC*	*NC*	46.54% *(±7.43)*	52.76% *(±8.05)*	*NC*	*NC*	51.41% *(±7.88)*	50.76% *(±10.22)*	48.86% *(±6.41)*	51.04% *(±5.42)*	
	Female	49.16%	49.49%	47.13%	*NC*	*NC*	53.46%	47.24%	*NC*	*NC*	48.58%	49.24%	51.14%	48.96%	

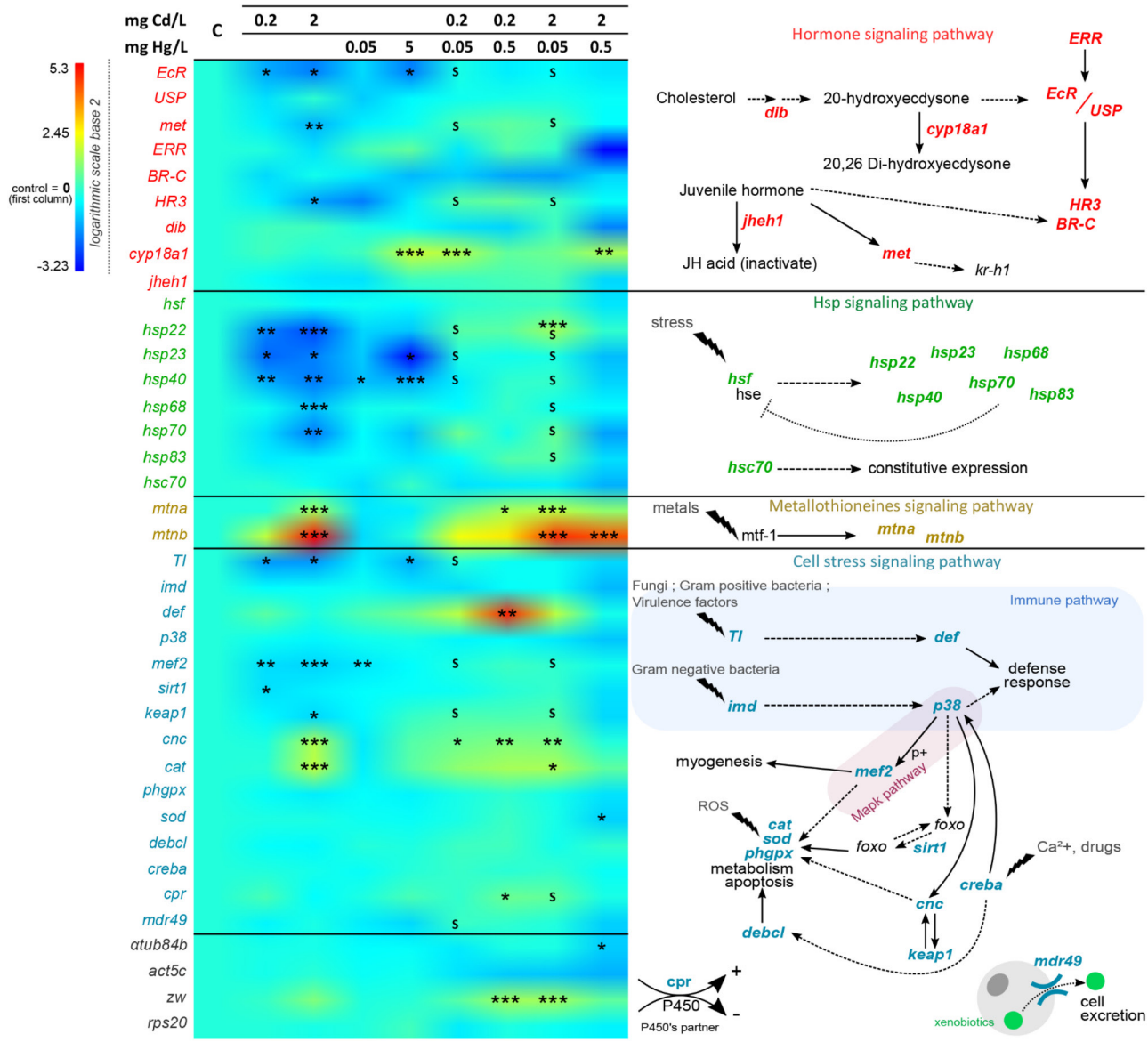


Fig. 1. Heat map representation of changes to expression levels in the third instar larvae of *D. melanogaster* after exposure to heavy metals. The map summarizes the mean normalized expression (MNE) with respect to the *pgk* gene (n = 9, three biological replicates with three technical replicates for each) of 38 genes involved in various metabolic pathways at different Cd and Hg concentrations under single and combined exposure. MNEs are centered to the control group (control = 1) and transformed to a logarithmic base 2 scale (log(control) = 0). Correspondence table between log value and fold value is provided in Supplementary Data S1. Color codes represent fold changes. Gene names are colored according to the signaling pathways represented on the right. Dotted arrows indicate an indirect interaction, while full arrows indicate a direct interaction between genes. C = controls. Asterisks (*) indicate significant differences among MNE in comparison to the control group (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001). Significant results indicating an interaction according to the Bliss criterion are represented by S (synergy). Bliss criterion values and P-values are presented in Supplementary Data S2. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

expression significantly decreased by 2.5–3-fold compared to the control (Fig. 1). The *met* and *HR3* transcripts also decreased at 2 mg/L Cd. While the expression of these genes was not affected in larvae exposed to 5 mg/L Hg, a 3.5-fold increase of cytochrome p450 18a1 (*cyp18a1*) transcript was observed. During co-exposure, only cyp18a1 expression significantly increased in larvae exposed to 0.2 mg Cd/L + 0.05 mg Hg/L and 2 mg Cd/L + 0.5 mg Hg/L. Interactions were detected by statistical analysis for three genes (*EcR*, *met*, *HR3*). The interactions were synergistic based on the Bliss criterion.

3.2.2. *Heat-shock proteins signaling pathway*

Single exposure to Cd induced the down-regulation of almost all tested HSPs genes, especially at 2 mg/L (Fig. 1). Compared to the control group, the expression of *hsp22*, *hsp23,* and *hsp40* decreased by 2.5–5-fold for both Cd concentrations (0.2 and 2 mg/L), whereas the highest dose raised *hsp68* and *hsp70* expression by up to 2.5-fold. For single Hg exposure, we recorded the 2-fold down-regulation of *hsp40* at both concentrations (0.05 and 5 mg/L) and a strong decrease (about 10-fold) of *hsp23* at the highest dose. In contrast, co-exposure to Cd and Hg did not affect these heat-shock genes, except for *hsp22*, which significantly increased (2.5-fold) in larvae exposed to 2 mg Cd/L and 0.5 mg Hg/L. However, synergy between Cd and Hg existed for most of the studied genes, especially when mixtures contained 2 mg Cd/L.

3.2.3. *Metallothioneins signaling pathway*

MTs were the most strongly deregulated genes by the two metals,

particularly Cd. In larvae exposed to 2 mg Cd/L, *mtna* and *mtnb*, transcripts increased from 2.8 to 39-fold compared to the control (Fig. 1). For larvae exposed to 0.2 mg Cd/L there was no statistical difference with the control, but a 3-fold increase in *mtnb* expression was recorded in treated versus untreated larvae. No change in the expression of metallothionein genes was detected after Hg exposure. However, these genes were clearly overexpressed in response to the co-presence of the two metals. *mtna* levels increased by 1.6–2.8-fold, and while *mtnb* levels increased by 5–24-fold (Fig. 1) compared to the control group. However, the Bliss criterion showed no interaction for these genes.

3.2.4. Cellular stress signaling pathway

The transcription activity of the *Toll* receptor (*Tl*) decreased by 3.4-at 0.2 mg Cd/L and 2.7-fold with 5 mg Hg /L. The interaction between metals was positive (synergy) based on the Bliss criterion for the mixture with 0.2 mg Cd/L + 0.05 mg Hg/L. The expression of other genes involved in the immune pathway did not change on single exposure (i.e., *imd, p38, def*). Only *def* was upregulated with 0.2 Cd/L + 0.5 (30 -fold). A significant 0.4-fold decrease in the expression of the transcription factor *mef2* involved in the Mapk pathway was detected for both Cd concentrations and 0.05 mg Hg/L. The immune and Mapk pathways were involved in the regulation of gene expression of detoxification actors, such as *sirt1* and the *cnc/keap1* pair, for which significant differences in expression levels were detected (down-regulation of *sirt1* at 0.2 mg Cd/L, down-regulation of *keap1* with up-regulation of *cnc* at 2 mg Cd/L). *Cnc* was also up-regulated during co-exposure, except for 2 mg Cd/L + 0.5 mg Hg/L. Based on the Bliss criterion, interactions between Cd and Hg were synergistic for the mef2 and keap1 genes (Fig. 1). Among the genes encoding detoxification enzymes that were tested, only catalase (*cat*), super oxide dismutase (*sod*), and cytochrome P450 reductase genes were significantly modulated (up-regulation of *cat* at 2 mg Cd/L and at 2 mg Cd/L + 0.05 mg Hg/L, down-regulation of *sod* at 2 mg Cd/L + 0. 5 mg Hg/L, up-regulation of *cpr* at 0.2 mg Cd/L + 0.5 mg Hg/L.

Only metal co-exposure affected genes originally chosen as putative housekeeping genes (down-regulation of *αtub84b* at 2 mg Cd/L + 0.5 mg Hg/L, up-regulation of *zw* at 0.2 mg Cd/L + 0.5 mg Hg/L and 2 mg Cd/L + 0.05 mg Hg/L), but with no interactions based on the Bliss criterion.

4. Discussion

To develop a biological test to detect metal pollution in water, we used *Drosophila melanogaster* as a simple and robust model of exposure. The simple addition of contaminated water in the culture medium without additional treatment (i.e., no heating, filtration, or dilution) allowed the impact of Cd and Hg on the development and physiology of the animals to be directly measured. Besides the fact that it is an easy-to-use model, existing knowledge on its biology makes it easy to observe modifications of the known phenotypes and the expression of key genes.

We recorded a dose-dependent response of *Drosophila* to heavy metals, supporting previous reports on other insect species for similar ranges of concentrations (Al-Momani and Massadeh, 2005; Rodrigues et al., 2013; Zhan et al., 2017). No mortality was recorded at low doses close to the regulatory threshold value, or for co-exposure to lower doses. Thus, the selected model was not too sensitive to heavy metal pollution, with the dose-dependent response being consistent with the regulatory values of toxicity. Our observation protocol over a life cycle allowed delayed toxic effects to be documented. Indeed, Hg caused both early larval stage mortality and pupal mortality, as previously described for *Chironomus riparius* and *Musca domestica* (Azevedo-Pereira and Soares, 2010; Raina et al., 2001). Thus, in addition to direct toxic effects at high doses, long-term effects could disturb physiological and functional processes. This phenomenon was confirmed by our molecular biology results, as several days of exposure significantly modified the expression levels of genes contributing to vital biological functions.

Developmental delays of a few hours to several days were also recorded for exposure to 2 mg Cd/L and 0.5 mg Hg/L separately and 2 mg Cd/L + 0.05 mg Hg/L combined (Table 2). These delays may be explained by heavy metals affecting gut structures and functioning, and disrupting food digestion and absorption, leading to impaired growth and even death (Maryanski et al., 2002; Vlahović et al., 2001; Wu et al., 2016). These two metals also act as EDCs, as demonstrated by our results showing that they disrupted several crucial regulators of the hormonal signaling pathway. This included the *EcR* the ecdysone receptor or *HR3*, which is a gene of the genetic cascade induced by ecdysteroid in insects, or methoprene-tolerant (*met*), which is involved in regulation by juvenile hormones (Fig. 1)(Jindra et al., 2013; Nakagawa and Sonobe, 2016). Modification of the expression of these hormones alters effector genes, which are responsible for various developmental and physiological processes (Aviles et al., 2019). For example, *cyp18a1* increased after larvae were exposed to 5 mg Hg/L in our study. This gene codes an enzyme that contributes to the metamorphosis of *D. melanogaster*, and is essential for inactivating steroid hormones that regulate correct development and survival of this insect (Guittard et al., 2010).

In our study, Cd and Hg exhibited specific transcriptional profiles for the selected genes, depending on exposure scenario (Fig. 2). Cd specifically modulated more genes compared to Hg (Figs. 2 & S1). This phenomenon might be explained by Cd being less toxic than Hg. At an equivalent concentration (for example 0.2 mg of Cd/L and 0.5 mg/L), deleterious effects were already recorded for Hg (Table 2), reflecting its higher toxicity. Independently of this difference in the number of genes with modulated expression, our results identified several interesting biomarkers of Hg, Cd, and Cd + Hg exposure (Fig. 2). However, one specific marker for each condition was not found. The set of biomarkers and their general profiles were the most informative and representative of any given exposure condition.

Interestingly, we also reported a clear difference in response between single and combined exposure for lower concentrations close to environmental regulatory values. For example, we reported a decrease in

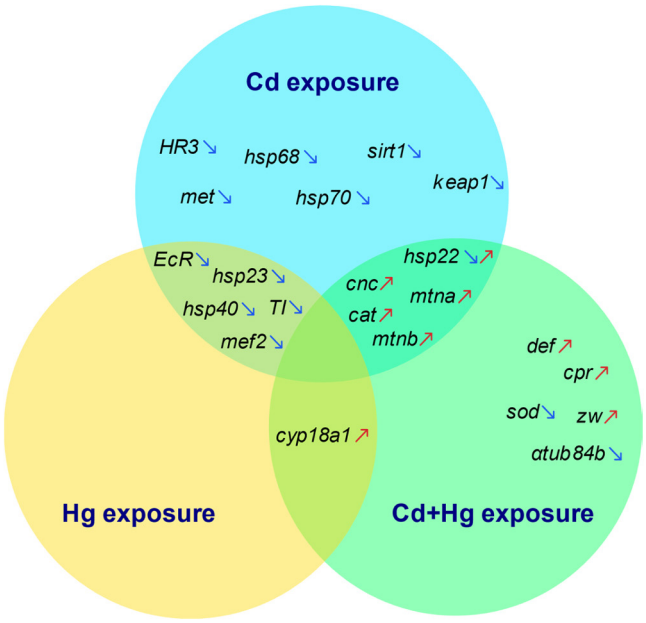


Fig. 2. Venn diagram summarizing the results of the qPCR analyses. The conditions were pooled into 3 groups: cadmium, mercury, and co-exposure to both metals. As soon as the transcription of a gene changes significantly, the gene is presented in the diagram. Blue arrows indicate down-regulation and red arrows indicate up-regulation. The presence of both arrows indicates that a gene underwent both types of transcriptional regulation. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

HSPs expression especially at the lower concentrations (Fig. 1), whereas co-exposure to Cd and Hg did not affect HSPs expression, except for hsp22, which significantly increased in some exposed larvae. Our profiles clearly differed from the induction of HSPs genes, supporting existing reports on insects exposed to heavy metals (Martínez-Paz et al., 2014; Zhang et al., 2015). The molecular and physiological response of individuals seemed to depend on the level of stress. At low concentrations, the response of exposed larvae was moderate, and embryonic development proceeded normally (Table 2 & Fig. 1). A slight increase in concentration of heavy metals altered the level of response (involving many more genes), and affected embryonic development. This type of dose-dependent molecular switch is consistent with the concept of the "growth-defense" trade-off that has been described in plants exposed to environmental stress (Huot et al., 2014). Specifically, there is a trade-off between defense mechanisms (e.g., HSPs detoxication enzymes) and growth mechanisms (e.g., energy production). Environmental stress has a cost to organisms by impacting normal physiological processes, such as development and reproduction. This concept has also been applied to some animals, such as *Microhyla fissipes* tadpoles, which exhibit a trade-off between protein synthesis and energy production under the sublethal concentrations of glyphosate (Wang et al., 2019).

Our results showed that mixtures of Cd/Hg globally have synergistic effects that could be more stressful to *Drosophila* than heavy metals alone. For instance, while stocks of HSP proteins were sufficient to cope with low and moderate Cd and Hg concentrations alone (causing HSPs expression levels to decline), restoration or increased expression of HSPs is needed in response to more severe stress. This phenomenon detected for MT proteins in our study, whereby MTs genes were up-regulated in the presence of metals, particularly Cd. MTs are involved in combating metal stress (Egli et al., 2006; Qiang et al., 2017). For instance, *mtna* expression significantly increased in response to the 0.2 mg Cd/L and 0.5 mg Hg/L mixture compared to 0.3 mg/L Cd alone, indicating that it generated more stress. Even though no statistical difference was reported, we recorded higher MTs expression in all mixtures.

This difference in responses between single and combined exposure was also recorded for genes involved in the immune pathway (e.g., *TI, def*) (Fig. 1). In addition to the direct impact of heavy metal exposure on gene expression (Ciacci et al., 2011; Taylor et al., 2013), indirect disruption occurs, impacting existing interactions between signaling pathways. This interaction was documented in *D. melanogaster* exposed to chromium (VI) (Pragya et al., 2015). Exposure to chromium causes the expression of humoral pathway receptors (*TI*) to decline, reducing resistance to bacterial infection (Pragya et al., 2015). In contrast, the overexpression of humoral immunity genes is beneficial to *Drosophila* through the humoral immunosuppressive effect induced by Cr(VI). Thus, the restoration or increased expression of the immune genes that we observed in the mixtures might cause inflammatory responses or trigger innate defenses to prevent microbial infection when an organism is weakened following metal exposure. With single exposure to low concentrations, expression did not change, or decreased, probably because cellular machinery can cope with stress, and does not require investment in immune pathways. This phenomenon was also observed for oxidative stress with the Mapk pathway.

The only exception was *cnc* (drosophila *Nrf2* ortholog), which activates gene expression to respond to oxidative stress, including catalase (*cat*), which is an oxidoreductase (Sykiotis and Bohmann, 2008) (Fig. 1). Expression increased with 2 mg Cd/L in single and combined exposure, as well as for combinations with lower Cd concentrations. In the same way as the gene encoding *cpr* is transcribed co-exposure induced NADPH–cytochrome P450 oxidoreductase to transfer electrons from NADPH to cytochrome P450 enzymes that catalyze the oxidative modification of organic compounds (Hovemann et al., 1997), probably in response to the higher toxicity of mixtures.

5. Conclusion

Through evaluating the impact of Cd and Hg exposure on *Drosophila melanogaster*, we identified several developmental and molecular biomarkers of single or combined exposure. Developmental time and mortality represented good parameters for analyzing the chronic toxicity of moderate and higher heavy metal concentrations. In comparison, gene expression appeared promising for analyzing low and moderate heavy metal concentrations, close to environmental regulatory values for wastewater. In addition, while Hg appeared more toxic than Cd, mixtures of low concentrations of both metals had a stronger effect on *D. melanogaster* compared to single exposure. This phenomenon was attributed to the synergistic effect of co-exposure. A "growth-defense" trade-off might exist, explaining the different responses across conditions. Analysis of the expression pattern of 38 genes revealed a specific transcriptional profile for each heavy metal, and for each co-exposure condition tested. Thus, it is necessary to conduct integrated studies combining different levels of observation. Overall, our results confirmed that *Drosophila melanogaster* is a useful model organism for toxicity bioassays under standard laboratory conditions. Further experiments with other classes of pollutants are required to challenge the potential use of this model in standardized laboratory bioassays.

CRediT authorship contribution statement

Laëtitia Frat: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Writing - original draft. **Thomas Chertemps:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing. **Elise Pesce:** Investigation. **Françoise Bozzolan:** Methodology, Investigation. **Matthieu Dacher:** Formal analysis, Writing - review & editing. **Rosario Planelló:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing. **Oscar Herrero:** Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing. **Lola Llorente:** Methodology, Writing - review & editing. **Didier Moers:** Resources, Supervision, Funding acquisition. **David Siaussat:** Conceptualization, Methodology, Resources, Data curation, Writing - review & editing, Supervision, Project administration.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We thank the Intercommunal Association for Wastewater in the Region of Pontoise (SIARP- FRANCE) and the Seine and Normandy Water Agency (FRANCE) for their financial support.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112377.

References

Abnoos, H., Fereidoni, M., Mahdavi-Shahri, N., Haddad, F., Jalal, R., 2013. Developmental study of mercury effects on the fruit fly (Drosophila melanogaster). Interdiscip. Toxicol. 6, 34–40. https://doi.org/10.2478/intox-2013-0007.

Akins, J.M., Schroeder, J.A., Browert, D.L., Aposhian, H.V., 1992. Evaluation of Drosophila-melanogaster as an alternative animal for studying the neurotoxicity of heavy-metals. Biometals 5, 111–120. https://doi.org/10.1007/BF01062222.

Al-Momani, F.A., Massadeh, A.M., 2005. Effect of different heavy-metal concentrations on Drosophila melanogaster larval growth and development. Biol. Trace Elem. Res. 108, 271–277. https://doi.org/10.1385/BTER:108:1-3:271.

Atli, E., 2013. The effects of three selected endocrine disrupting chemicals on the fecundity of fruit fly, Drosophila melanogaster. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 91, 433–437. https://doi.org/10.1007/s00128-013-1083-7.

Aviles, A., Boulogne, I., Durand, N., Maria, A., Cordeiro, A., Bozzolan, F., Goutte, A., Alliot, F., Dacher, M., Renault, D., Maibeche, M., Siaussat, D., 2019. Effects of DEHP on post-embryonic development, nuclear receptor expression, metabolite and ecdysteroid concentrations of the moth Spodoptera littoralis. Chemosphere 215, 725–738. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.102.

Azevedo-Pereira, H.M.V.S., Soares, A.M.V.M., 2010. Effects of mercury on growth, emergence, and behavior of Chironomus riparius Meigen (Diptera: Chironomidae). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 59, 216–224. https://doi.org/10.1007/s00244-010-9482-9.

Bigot, L., Shaik, H.A., Bozzolan, F., Party, V., Lucas, P., Debernard, S., Siaussat, D., 2012. Peripheral regulation by ecdysteroids of olfactory responsiveness in male Egyptian cotton leaf worms, Spodoptera littoralis. Insect Biochem. Mol. Biol. 42, 22–31. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.10.003.

Caballero-Gallardo, K., Olivero-Verbel L., J., Freeman, J., 2016. Toxicogenomics to evaluate endocrine disrupting effects of environmental chemicals using the zebrafish model. Curr. Genom. 17, 515–527. https://doi.org/10.2174/1389202917666160513105959.

Carmona, E.R., Kossatz, E., Creus, A., Marcos, R., 2008. Genotoxic evaluation of two mercury compounds in the Drosophila wing spot test. Chemosphere 70, 1910–1914. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.07.032.

Chapman, P.M., 1995. Bioassay testing for Australia as part of water quality assessment programmes. Aust. J. Ecol. 20, 7–19. https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1995.tb00517.x.

Chauhan, V., Srikumar, S., Aamer, S., Pandareesh, M.D., 2017. Methylmercury exposure induces sexual dysfunction in male and female Drosophila melanogaster. Int. J. Environ. Res. Public Health 14, 1108. https://doi.org/10.3390/ijerph14101108.

Chen, Z., Wu, X., Luo, H., Zhao, L., Ji, X., Qiao, X., Jin, Y., Liu, W., 2016. Acute exposure of mercury chloride stimulates the tissue regeneration program and reactive oxygen species production in the Drosophila midgut. Environ. Toxicol. Pharmacol. 41, 32–38. https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.11.009.

Ciacci, C., Barmo, C., Fabbri, R., Canonico, B., Gallo, G., Canesi, L., 2011. Immunomodulation in Mytilus galloprovincialis by non-toxic doses of hexavalent chromium. Fish Shellfish Immunol. 31, 1026–1033. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.09.002.

Doğanlar, Z.B., Doğanlar, O., Tabakçioğlu, K., 2014. Genotoxic effects of heavy metal mixture in Drosophila melanogaster: expressions of heat shock proteins, RAPD profiles and mitochondrial DNA sequence. Water Air Soil Pollut. 225. https://doi.org/10.1007/s11270-014-2104-9.

Egli, D., Domènech, J., Selvaraj, A., Balamurugan, K., Hua, H., Capdevila, M., Georgiev, O., Schaffner, W., Atrian, S., 2006. The four members of the Drosophila metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metal homeostasis and detoxification. Genes Cells 11, 647–658. https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00971.x.

European Community. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 Establishing a Framework for Community Action in the Field of Water Policy. 2000.

ORF, 1998. February 2nd Order 1998 Relating to Water Withdrawals and Consumption as Well as to Emissions of all Kinds from Installations Classified for the Protection of the Environment Subject to Authorization.

Genchi, G., Sinicropi, M., Graziantonio, L., Carocci, A., Catalano, A., 2020. The effects of cadmium toxicity. Int. J. Environ. Res. Public Health 17, 1–24. https://doi.org/10.3390/ijerph17113782.

Guittard, E., Blais, C., Maria, A., Parvy, J.-P., Pasricha, S., Lumb, C., Lafont, R., Daborn, P.J., Dauphin-Villemant, C., 2010. CYP18A1, a key enzyme of Drosophila steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. Dev. Biol. 349, 35–45. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.09.023.

Hazra, A., 2017. Biostatistics series module 8: survival analysis. Indian J. Dermatol. 62, 251–257. https://doi.org/10.4103/ijd.IJD.

Hovemann, B.T., Sehlmeyer, F., Malz, J., 1997. Drosophila melanogaster NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase: pronounced expression in antennae may be related to odorant clearance. Gene 189, 213–219. https://doi.org/10.1016/S0378-1119(96)00851-7.

Hu, X., Fu, W., Yang, X., Mu, Y., Gu, W., Zhang, M., 2019. Effects of cadmium on fecundity and defence ability of Drosophila melanogaster. Ecotoxicol. Environ. Saf. 171, 871–877. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.029.

Huot, B., Yao, J., Montgomery, B.L., He, S.Y., 2014. Growth-defense tradeoffs in plants: a balancing act to optimize fitness. Mol. Plant 7, 1267–1287. https://doi.org/10.1093/mp/ssu049.

Iavicoli, I., Fontana, L., Bergamaschi, A., 2009. The effects of metals as endocrine disruptors. J. Toxicol. Environ. Health Part B 37–41. https://doi.org/10.1080/10937400902902062.

Jindra, M., Palli, S.R., Riddiford, L.M., 2013. The juvenile hormone signaling pathway in insect development. Annu. Rev. Entomol. 58, 181–204. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153700.

Martínez-Paz, P., Morales, M., Martín, R., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2014. Characterization of the small heat shock protein Hsp27 gene in Chironomus riparius (Diptera) and its expression profile in response to temperature changes and xenobiotic exposures. Cell Stress Chaperones 19, 529–540. https://doi.org/10.1007/s12192-013-0479-y.

Maryanski, M., Kramarz, P., Laskowski, R., Niklinska, M., 2002. Decreased energetic reserves, morphological changes and accumulation of metals in carabid beetles (Poecilus cupreus L.) exposed to zinc- or cadmium-contaminated food. Ecotoxicology 11, 127–139. https://doi.org/10.1023/A:1014425113481.

Masamitsu, Y., Hideki, Y., 2018. Drosophila as a modelorganism. In: Drosoph. Model. Hum. Dis., 1076, 1–10. ⟨https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0⟩.

Nakagawa, Y., Sonobe, H., 2016. Ecdysteroids. In: Handbook of Hormones. Elsevier Inc, pp. 557–559. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00485-2.

Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol. Lett. 26, 509–515. https://doi.org/10.1016/j.ejor.2016.09.013.

Planelló, R., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2010. Effect of acute exposure to cadmium on the expression of heat-shock and hormone-nuclear receptor genes in the aquatic midge Chironomus riparius. Sci. Total Environ. 408, 1598–1603. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.01.004.

Pragya, P., Schukla, A., Murthy, R., Abdin, M., Chowdhuri, D.K., 2015. Characterization of the effect of Cr(VI) on humoral innate immunity using Drosophila melanogaster. Environ. Toxicol. 30 (11), 1285–1296. https://doi.org/10.1002/tox.21999.

Qiang, W., Huang, Y., Wan, Z., Zhou, B., 2017. Metal-metal interaction mediates the iron induction of Drosophila MtnB. Biochem. Biophys. Res. Commun. 487, 646–652. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.109.

Raina, R.M., Pawar, P., Sharma, R.N., 2001. Developmental inhibition and reproductive potential impairment in Musca domestica L. by heavy metals. Indian J. Exp. Biol. 39, 78–81.

Rana, S.V.S., 2014. Perspectives in endocrine toxicity of heavy metals - a review. Biol. Trace Elem. Res. 160, 1–14. https://doi.org/10.1007/s12011-014-0023-7.

Rice, K.M., Walker, E.M., Wu, M., Gillette, C., Blough, E.R., 2014. Environmental mercury and its toxic effects. J. Prev. Med Public Health 47, 74–83. https://doi.org/10.3961/jpmph.2014.47.2.74.

Ritz, C., Streibig, J.C., Kniss, A., 2021. How to use statistics to claim antagonism and synergism from binary mixture experiments. Pest Manag. Sci. https://doi.org/10.1002/ps.6348.

Rodrigues, N.R., Nunes, M.E.M., Silva, D.G.C., Zemolin, A.P.P., Meinerz, D.F., Cruz, L.C., Pereira, A.B., Rocha, J.B.T., Posser, T., Franco, J.L., 2013. Is the lobster cockroach Nauphoeta cinerea a valuable model for evaluating mercury induced oxidative stress? Chemosphere 92, 1177–1182. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.084.

Simon, P., 2003. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. Bioinformatics 19, 1439–1440. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg157.

Sykiotis, G.P., Bohmann, D., 2008. Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in Drosophila. Dev. Cell 14, 76–85. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.12.002.

Tang, J., Wennerberg, K., Aittokallio, T., 2015. What is synergy? The Saariselkä agreement revisited. Front. Pharmacol. 6, 1–5. https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00181.

Taylor, D.A., Thompson, E.L., Nair, S.V., Raftos, D.A., 2013. Differential effects of metal contamination on the transcript expression of immune- and stress-response genes in the Sydney Rock oyster, Saccostrea glomerata. Environ. Pollut. 178, 65–71. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.027.

Vlahović, M., Ilijin, L., Lazarević, J., 2001. Acute effect of cadmium on larval growth of Lymantria dispar L. Ekologija 36, 131–137.

Wang, X., Chang, L., Zhao, T., Liu, L., Zhang, M., Li, C., Xie, F., Jiang, J., Zhu, W., 2019. Metabolic switch in energy metabolism mediates the sublethal effects induced by glyphosate-based herbicide on tadpoles of a farmland frog Microhyla fissipes. Ecotoxicol. Environ. Saf. 186, 109794 https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109794.

Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., Yang, L., 2016. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 8244–8259. https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x.

Zhan, H., Zhang, J., Chen, Z., Huang, Y., Ruuhola, T., Yang, S., 2017. Effects of Cd^{2+} exposure on key life history traits and activities of four metabolic enzymes in Helicoverpa armigera (Lepidopteran: Noctuidae). Chem. Ecol. 33, 325–338. https://doi.org/10.1080/02757540.2017.1299714.

Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, J., Guo, Y., Ma, E., 2015. Molecular cloning and mRNA expression of heat shock protein genes and their response to cadmium stress in the grasshopper Oxya chinensis. PLoS One 10, 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131244.

C. Effets d'une exposition unique ou combinée de polluants prioritaires sur l'expression des gènes et le développement post-embryonnaire de *Drosophila melanogaster*

Le but de cette seconde étude était de tester sur notre modèle des polluants autres que les métaux, afin d'évaluer la réponse de D. melanogaster et le degré de spécificité des différents mécanismes impliqués dans la réponse à un xénobiotique. Les polluants étudiés ici - DEHP, bisphénol A, nonylphénol, benzo(a)pyrène, glyphosate - soulèvent de nombreuses questions et présentent un fort intérêt environnemental (Directive Cadre sur l'Eau). Ils ont fait l'objet d'un certain nombre d'études chez des organismes vertébrés (rat, cochon, Homme) (Gill et al., 2017; Kabir et al., 2015; Kim et al., 2013), mais leurs effets restent encore mal compris. Quelques études sur des invertébrés (hexapode, aranéide) ont montré qu'ils sont aussi adaptés afin d'étudier les effets de ces substances (Aviles et al., 2019; Benamú et al., 2010; Vicentini et al., 2017). Elles ont chacune été testées chez la drosophile à des gammes de concentrations croissantes. Et, dans l'environnement comme dans les eaux usées, les polluants sont souvent présents de façon simultanée. Ainsi, des mélanges de ces derniers incluant les métaux étudiés dans la première étude ont également été testés.

Ecotoxicology and Environmental Safety 250 (2023) 114491

Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Impact of single and combined exposure to priority pollutants on gene expression and post-embryonic development in *Drosophila melanogaster*

Laëtitia Frat [a,b], Thomas Chertemps [b], Elise Pesce [b], Françoise Bozzolan [b], Matthieu Dacher [b,c], Rosario Planello [d], Oscar Herrero [d], Lola Llorente [d], Didier Moers [a], David Siaussat [b,*]

[a] Syndicat Intercommunal pour l'Assainissement de la Région de Pontoise (SIARP), 95000 Pontoise, France
[b] Sorbonne Université, INRAE, CNRS, IRD, UPEC, Institut d'Écologie et des Sciences de l'Environnement de Paris (iEES-Paris), F75005 Paris, France
[c] Sorbonne Université, INRAE, CNRS, IRD, UPEC, Institut d'Écologie et des Sciences de l'Environnement de Paris (iEES-Paris), 78026 Versailles, France
[d] Grupo de Biología y Toxicología Ambiental, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Educación a Distancia (UNED), 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Edited by Bing Yan

Keywords:
Endocrine disruptors
Benzo(a)pyrene
Glyphosate
Mixture
Insect
Gene expression
Wastewater

ABSTRACT

Many priority pollutants are concentrated in the environment due to human activity. Most are highly toxic to various organisms, including endocrine disruptors EDCs, aromatic polycyclic hydrocarbons PAHs, pesticides. While the effects of single and binary exposure have been widely explored, several pollutants can be simultaneously present at the same time in the environment, in in more or less polluted matrices. Effective pollution control requires the presence and sources of contamination to be identified. Previously we used *Drosophila melanogaster* to investigate metal pollution. Here, we re-used Drosophila to identify the biomarkers of pollution, and to determine if they can be used for specific types of pollution. Single and combined exposure of Bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), bisphenol A, nonylphenol, benzo(a)pyrene, and glyphosate was investigated. The impact of these pollutants on post-embryonic development and the expression pattern of 38 molecular targets were examined using qPCR. During single exposure, different profiles were observed at the molecular level. In complex mixtures, the expression profile resembled that of bisphenol A. In contrast, relatively specific gene expression profiles were obtained for the effects of each pollutant separately. While direct pollutant-gene profiling remains difficult in mixtures, molecular biology analyses enhance pollution monitoring, and should be incorporated in toxicological studies.

1. Introduction

The environment has become a complex chemical landscape, because of the growing number of chemical substances produced worldwide, sometimes leading to pollution. Depending on their physicochemical characteristics, pollutants are transported over long distances, contaminating the biosphere and potentially adversely affecting living organisms (Planelló et al., 2013; Rathi et al., 2021). Depending on their nature, pollutants have different properties, inducing various damage to organisms depending on their mechanisms of action.

Among the large family of pollutants, several have been focused on due to extensive data on their toxicity, and because of their wide distribution including in water, which is a depletable and precious resource (Caballero-Gallardo et al., 2016). Several dozens of these substances, or groups of substances, have been placed on lists of priority pollutants by different regulatory agencies, and for various environmental matrices. To protect the aquatic environment, the European Water Framework Directive (2000/60/EC) defined pollutant-by-pollutant environmental quality standards (EQS). This framework also applies to wastewater, for which specific thresholds have been established for several pollutants to prevent the contamination of natural water bodies after wastewater plant treatment (ORF, 1998).

There are many examples of priority and toxic chemicals, including Benzo(a)pyrene (BaP) belonging to the Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) family (Kim et al., 2013), and Glyphosate (Gly), a pesticide (Gill et al., 2017). Focus has also been placed on endocrine disruptors, which interfere with the endocrine system, and induce strong physiological disturbance, sometimes at very low doses as for example, Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) of bisphenol A (BPA) or nonylphenol (NP) (Aviles et al., 2019; Oetken et al., 2004, Acir et Guenther, 2018).

* Corresponding author. Present address: Sorbonne Université, 4 place Jussieu, Campus Pierre et Marie Curie – Tours 44–45, 3ème étage, boite courrier 237, 75005 Paris, France.
E-mail address: david.siaussat@sorbonne-universite.fr (D. Siaussat).

https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114491
Received 7 October 2022; Received in revised form 23 December 2022; Accepted 29 December 2022
Available online 3 January 2023
0147-6513/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Despite existing legislation, important gaps remain. First, studies on the effects of mixtures remain limited. Molecular tests are mainly carried out on a molecule-by-molecule basis, as currently available bioassays were developed for this purpose to determine Environmental Quality and Safety (EQS) values. However, a growing number of publications, such as that by Kortenkamp and Faust (2018), have pointed out that EQS values might not be sufficient due to the possible synergistic effect of pollutants in mixtures. Thus, the effects of mixtures need to be investigated; however, to date, tools to assess such cocktail effects are not available.

The development of new bioassays are currently one of the challenges in tracing pollution particularly for wastewater (Handy et al., 2003). Although bioassays cannot indicate "which pollutant at which concentration," they can be used to detect polluted areas with a gradation of effects (e.g., altered molecular expression, developmental disruption, or death). Several studies have investigated the effects of single exposure to a pollutant, showing that such modifications (i.e., physiological, molecular) could be used as biomarkers for pollutants (De Aguiar et al., 2016; Herrero et al., 2017; Park et Kwak, 2010). However, there is still the question of how these biomarkers respond in presence of several co-occurring pollutants. Increasing literature on the impacts of mixtures (Altenburger et al., 2018; Martín-Folgar et Martínez-Guitarte, 2019; Wu et al., 2016) highlights the need to tackle this issue, taking into account scenarios that are naturally encountered in all environmental matrices. Due to the complexity of these scenarios, testing a mixture with as many different pollutants as possible and different combinations of concentrations of these pollutants is ideally required. Thus, appropriate methodologies must still be developed whereby a simple protocol is able to test different biological responses after exposure to pollutants, alone or in combination.

Previously, we confirmed the potential of using the invertebrate model, the fruit fly *Drosophila melanogaster*, in this type of study (Frat et al., 2021). Using this model, we demonstrated the impact of different concentrations of cadmium (Cd) and mercury (Hg) in single and combined exposure of post-embryonic development. Our results showed that both metals cause developmental delays and mortality in dose-dependent responses, and that synergistic interactions between Cd and Hg are possible. We subsequently used the same protocol to investigate the effects of a wider range of pollutants, including DEHP, BPA, NP, BaP, and Gly. Thus, the current study used Drosophila to identify easily observable and non-invasive parameters that can be used as biomarkers of exposure, and to determine if they can be used for specific types of pollution. First, we described the individual effects of these pollutants on the post-embryonic development of drosophila, and on the expression of 38 genes involved in several previously selected signaling pathways (Frat et al., 2021). Second, we tested three mixtures of these pollutants (including Cd and Hg) to evaluate the physiological and molecular responses of the model, and to determine if specific expression or patterns could be observed. This type of results is crucial to develop and validate the use of a potential new toxicity study model with complex exposure conditions.

2. Materials and methods

2.1. Studied pollutants and concentrations

We investigated effects of the single exposure of five pollutants: Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), bisphenol A (BPA), 4-nonyphenol (NP), benzo(a)pyrene (BaP), and glyphosate (Gly). These pollutants were purchased at Sigma Aldrich (France). Products were diluted in acetone for NP and BaP, ethanol for DEHP and BPA, and milliQ water for glyphosate, to make highly concentrated stock solutions (1 g/L). Subsequent dilutions were carried out with milliQ water. We used a wide range of concentrations, starting from a threshold concentration in wastewater, as defined not to contaminate natural aquatic environments after treatment by wastewater treatment plants (ORF, 1998). For pollutants for which threshold concentrations do not exist, we selected the EQS values (European Union, 2013) (Table 1). The selected values were; DEHP 0.0013, 0.13, 13, and 130 mg/L; BPA 0.0016, 0.16, 16, and 160 mg/L; NP 0.002, 2, 20, and 200 mg/L; BaP 0.05, 0.5, 5, and 50 mg/L; and Gly 0.028, 2.8, 28, and 140 mg/L. For the mixtures, we included heavy metals already used in our previous study (Frat et al., 2021). We made mixtures of increasing concentrations with a low concentrated mixture (Mix A), a moderately concentrated mixture (Mix B), and a highly concentrated mixture (Mix C) (Table 1).

2.2. Insect rearing and post-embryonic development analysis

The Canton-S strain of *D. melanogaster* was reared on standard Drosophila medium (cornmeal, agar, sugar, yeast, and water) at 25 °C ± 1 °C, 60–80 % relative humidity, and 12:12 h dark/light cycle. Eggs were collected at 20 h after oviposition on 1 % agar supplemented with grape juice and sugar (2 %). About 45–50 eggs were transferred to vials containing 2 g Nutri Fly Instant medium (GENESEE, Suresnes, France) rehydrated with 8 mL contaminated solutions in water (corresponding to day 0 of the experiment). Flies were exposed by contact and ingestion to Cd and Hg, either as single exposure (Table 1, right part) or co-exposure (Table 1, left part). For the control condition and the 12 treated conditions, mortality rates during development, mean duration of larval and pupal stage, and sex-ratio were recorded. We focused on larval development, as this stage is often more disrupted by pollutants compared to the pupal stage (Abnoos et al., 2013). Daily data of newly formed pupae were expressed as percent larva-pupa transition and larvae that had reached the pupal stage. For each experimental condition, five biological replicates were performed representing a minimum total of 225 eggs, initially deposited in control and contaminated tubes.

2.3. Total RNA extraction and PCR analysis

About 10 larvae from the control and exposed groups to single and co-exposure (Table 1, conditions with asterisk) were collected per biological replicate 4 days after egg laying. The larvae were stored at −80 °C until total RNA extraction using the TRIzol method (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) coupled with the RNAeasy extraction kit (Qiagen, USA), according to the manufacturer's protocols. RNA quality was controlled by spectrophotometry (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg, Germany). DNase I Treatment (Roche, USA) was implemented following the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized from 5 µg RNA with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. For each experimental condition, three biological replicates were performed. Five genes were first tested as putative housekeeping genes (actin5C, αTub84, zw, rpS20, and pgk) using Bestkeeper analysis (Pfaffl et al., 2004). Pgk was used as the reference gene, as it had the most stable expression among the experimental groups. Forward and reverse primers (EcR, USP, met, ERR, BR-C, HR3, dib, cyp18a1, jheh1, hsf, hsp22, hsp23, hsp40, hsp68, hsp70, hsp83, hsc70, mtna, mtnb, TI, imd, def, p38, mef2, sirt1, keap1, cnc, cat, phgpx, sod, debcl, creba, cpr, and mdr49) were designed from Flybase using AmplifX software (Supplementary Data Table S1) (by Nicolas Jullien; Aix-Marseille Univ, CNRS, INP, Inst Neurophysiopathol, Marseille, France; https://inp.univ-amu.fr/en/amplifx-manage-test-and-design-your-primers-for-pcr"). In cases where genes were transcribed to several isoforms, specific primers were designed in a shared region, allowing the accurate amplification of all isoforms. PCR reactions were performed on the LightCycler480 Real-Time PCR Detection System (Roche Applied Science, France), adapted from Bigot et al. (2012). Each reaction consisted of 5 µL Absolute Blue SYBR Green Fluor (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 4 µL cDNA (6.25 ng/µL) and 0.5 µL of each primer (10 µM). The PCR program consisted of an initial step at 95 °C for 5 min, followed by 50 cycles, consisting of 10 s at 95 °C, 15 s at 60 °C, and 15 s at 72 °C. Under these conditions, a single and discrete peak was detected for all primers tested after melting curve analysis, and

Table 1
Tested conditions of *Drosophila melanogaster* (mg/L). The experiments had two phases: (1) single exposure of the 5 pollutants, and (2) multi-exposure of the 7 pollutants with increasing concentrations (Mix A and Mix B). § indicates the conditions used to measure gene expression levels.

	Mercury (CH_3HgCl)	Cadmium ($CdCl_2$)	DEHP	Bisphenol A	4-nonylphenol	Benzo (a)pyrene	Glyphosate	
(2) multi-exposure								
	0.05	0.2	0.0013§	0.0016§	0.002§	0.05§	0.028§	Mix A§
	0.5	2	0.13§	0.16§	2§	0.5§	0.28§	Mix A§
	5	20	13	16	20	5	2.8	Mix C
			130	160	200	50	140	

all primers had efficiencies of 85–105 %. Each run included a fivefold dilution series, candidate genes, reference gene, and negative control. Each condition was evaluated in triplicate. The mean Ct value (cycle threshold) of each triplicate reaction was used to normalize the candidate gene expression level to the geometric mean of pgk level in Q-Gene software (Simon, 2003). Expression levels were summarized on a heatmap constructed using Past 3.14 Software. The raw data were normalized to the housekeeping gene pgk, centered to the control group, and were transformed to a logarithmic base 2 scale to emphasize variation between control and treated conditions.

2.4. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using R 3.5.1 and R Studio 1.1.456 (R Core Team, 2017) and GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc.). Shapiro-Wilk test was used to check the normality of the data, in addition to a Robust regression and Outlier removal test (by GraphPad) to discard possible outliers. We compared the results of the exposed conditions to the internal control group for each experiment. Mortality rates and the sex-ratio of treated groups were analyzed using a Chi-square test to allow comparison with the control group. Larval developmental duration was analyzed with a Gehan–Breslow–Wilcoxon test to compare developmental curves, and by one-way ANOVA to compare the global duration per stage. The Gehan- Breslow-Wilcoxon method was used to weight the early points, allowing discriminating effects at early larval-pupal transition, as we could only observe pupal molts (not larval molts) (Hazra, 2017). Gene Expression levels were analyzed using ANOVA with a permutation test followed by a Scheffe post-hoc test. Heat map clustering was performed using ggplot in R software, with a Euclidian distance method. P-values lower than 5 % were considered significant (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$).

3. Results

3.1. Impact of pollutants on the development of D. melanogaster

Of the five pollutants tested on drosophila, only NP and BaP caused mortality, and only at the highest concentration (Table 2). Two-hundred mg NP/L induced 100 % larval mortality, whereas 50 mg BaP/L induced 40.4 % larval mortality and 6.2 % of pupal mortality. For the other concentrations and pollutants, the results were not significant compared to the control. However, the mean development time of the larval stage was lengthened by all pollutants, except glyphosate (Table 2). Larvae normally required about 6 days to reach the pupal stage (5.9–6.11 days). This mean time was considerably lengthened for the highest concentrations of each pollutant: 10.45 days for 130 mg DEHP/L, 12.82 days for 160 mg BPA/L, 7.09 days for 20 mg NP/L, and 9.96 days for 50 mg BaP/L. The mean duration of the pupal stage remained unchanged for all conditions. Daily monitoring showed a significant change in developmental time was observed based on the percentage of larval-pupal transition; the percentages on day 5 after egg-laying were generally lower, because fewer larvae had reached the pupal stage. The delay in development was significant for 0.13, 13, and 130 mg DEHP/L, 160 mg BPA/L, 2 and 20 mg NP/L, and 2.8, 28, and 140 mg Gly/L.

The five pollutants were then tested in mixture with Cd and Hg at three concentrations ranges (Table 3). Larval and pupal mortality only occurred after exposure to mix C with the highest concentrations of pollutants (18 % and 80 %, respectively). The mean duration of larval and pupal stages was not affected by exposure to mix A and B. However, larvae exposed to mix C needed 5 days longer to reach the pupal stage (5.90 days for control group Vs. 10.71 days for mix C group, Table 3). Daily monitoring showed a significant developmental delay for larvae exposed to mix B. At day 5 after egg-laying, only 1.08 % of larvae exposed to mix B reached the pupal stage versus 13.59 % in the control group.

Sex-ratio was not affected by single or combined exposure of the pollutants.

3.2. Impact of pollutants on gene expression levels

Following Frat et al. (2021), we focused on the lowest concentrations likely to be detected in wastewater, which corresponded to sublethal concentration ranges. We selected several signaling pathways (heat shock protein [HSP] signaling pathway, metallothionein [MTN] signaling pathway, and cell stress signaling pathway), and measured the expression of 38 genes as potential biomarkers (Fig. 1). The numeric values of heat map are presented in Table S2.

3.2.1. Hormone signaling pathway

DEHP significantly up-regulated the Broad-complex gene (*BR-C)* in larvae exposed to 0.0013 mg DEPH/L (2.2-fold), while *cyp18a1* was upregulated in larvae exposed to 0.13 mg DEHP/L (1.6-fold) (Fig. 1). BPA also up-regulated *BR-C* (0.0016 mg/L, 3.5-fold), but down-regulated *cyp18a1* (0.0016 mg/L, 2.8-fold) and *jheh1* (0.16 mg/L, 1.7-fold). NP up-regulated an early-late gene, *HR3* (0.002 mg/L, 4.7-fold), but down-regulated the JH receptor methoprene-tolerant (*met,* 3.1-fold) and Halloween gene *disembodied* (*dib*, 11.3-fold), which is involved in 20E biosynthesis at 2 mg NP/L. Only the lowest concentration of BaP (0.05 mg/L) significantly altered gene expression, upregulating *EcR* (1.7-fold), *USP* (1.8-fold), and *met* (1.4-fold). Both concentrations of Gly (0.028 and 2.8 mg/L) up-regulated *HR3 gene*, while the higher concentration also down-regulated *dib* and *jheh1*genes. *cyp18a1* transcripts also decreased after exposure to Mix A and B. Mix B also caused *EcR* and *met* transcripts to decrease.

3.2.2. HSP signaling pathways

Exposure to both concentrations of DEHP, as a single exposure, had no significant effect on the expression of genes encoding HSPs, except for the hc70 gene (a constitutive HSP), which increased by a factor of 2, but was only significant at the lowest concentration (0.0013 mg/L) (Fig. 1). The transcription of this gene also increased after exposure to NP (both concentrations) and 2.8 mg Gly/L. Other genes encoding HSPs were up-regulated (*hsp22, hsp70,* and *hsp83* at 0.05 mg BaP/L; *hsp40* and *hsp68* at 2.8 mg Gly/L; *hsp68* also as *hsf* gene; transcription factor of HSPs at 0.002 mg NP/L). Both concentrations of BPA significantly down-regulated *hsp22, hsp40, hsp70,* and *hsp83*. In addition to upregulating the transcripts of a few hsps, 0.002 mg NP/L downregulated *hsp22* and *hsp70*. This down-regulation was also observed for 2 mg NP/L (Fig. 1). *hsp23* was downregulated by 0.5 mg BaP/L, whereas *hsp22* was downregulated by 2.8 mg Gly/L. Compared to the control, *hsp23*

Table 2
Summary results of pollutants (mg/L) in single exposure for Drosophila melanogaster (mean ± standard deviation). CTRL = control, NC = no calculable. P-values lower than 5 % were considered significant (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

		CTRL	0.0013	0.13	13	130																mg DEHP/L
							0.0016	0.16	16	160												mg BPA/L
											0.002	2	20	200								mg NP/L
															0.05	0.5	5	50				mg BaP/L
																			0.028	2.8	28	140	mg Gly/L
Mortality	Larval stages	12.66 % (± 7.12)	11.21 % (± 7.93)	14.09 % (± 11.49)	10.63 % (± 6.61)	8.72 % (± 5.84)	12.24 % (± 9.43)	11.76 % (± 7.08)	11.05 % (± 6.67)	11.68 % (± 5.93)	9.43 % (± 6.32)	9.85 % (± 4.78)	13.69 % (± 6.80)	100 %	12.79 % (± 11.22)	13.93 % (± 11.82)	10.93 % (± 8.43)	40.40 % * ** (± 20.41)	12.81 % (± 4.41)	8.37 % (± 4.71)	14.36 % (± 9.55)	9.56 % (± 6.75)	
	Pupal stage	1.75 % (± 3.15)	1.79 % (± 2.23)	1.39 % (± 1.43)	1.27 % (± 2.68)	1.61 % (± 2.52)	1.56 % (± 2.28)	2.71 % (± 4.47)	1.84 % (± 1.32)	3.04 % (± 3.00)	0 %	1.12 % (± 3.32)	1.09 % (± 1.63)	NC	4.35 % (± 3.05)	3.42 % (± 4.15)	2.23 % (± 5.36)	6.20 %* ** (± 6.47)	1.35 % (± 1.81)	0.68 % (± 0.99)	1.03 % (± 1.57)	2.07 % (± 3.57)	
Mean duration of larval stages *(days)*		5.95 (± 0.19)	6.01 (± 0.13)	6.09 (± 0.11)	6.06 (± 0.15)	10.45* ** (± 0.74)	6.04 (± 0.10)	6.09 (± 0.07)	6.09 (± 0.25)	12.82* ** (± 1.37)	5.99 (± 0.23)	6.04 (± 0.22)	7.09* ** (± 0.49)	NC	5.93 (± 0.20)	6.00 (± 0.13)	6.11 (± 0.10)	9.96* ** (± 0.95)	5.90 (± 0.20)	5.94 (± 0.17)	5.99 (± 0.10)	6.08 (± 0.16)	
Mean duration of pupal stage *(days)*		5.04 (± 0.15)	5.00 (± 0.12)	4.93 (± 0.12) * **	4.97 (± 0.15) * **	4.45 (± 0.27) * **	4.98 (± 0.09)	4.98 (± 0.19)	4.93 (± 0.25)	4.71 (± 0.17) ***	5.00 (± 0.20)	4.95 (± 0.17) **	4.82 (± 0.14) ***	NC	5.09 (± 0.21)	5.01 (± 0.12) ***	4.98 (± 0.08) ***	4.66 (± 0.54) ***	5.10 (± 0.16)	5.03 (± 0.13) *	5.03 (± 0.12) ***	4.92 (± 0.15) ***	
Percentages larval-pupal transition *(day after egg-laying)*																							
	Day 5	11.46 % (± 13.30)	7.32 % (± 6.19)	2.69 % (± 3.30)	4.53 % (± 6.32)	0 %	5.93 % (± 7.83)	1.79 % (± 2.76)	0.30 % (± 0.93)	0 %	10.88 % (± 15.91)	7.79 % (± 13.65)	0 %	NC	14.96 % (± 15.68)	5.84 % (± 6.39)	1.82 % (± 3.07)	0 %	12.89 % (± 16.80)	13.57 % (± 13.37)	4.79 % (± 5.51)	3.71 % (± 5.31)	
	Day 6	82.62 % (± 8.72)	84.60 % (± 7.04)	86.56 % (± 7.44)	86.12 % (± 8.43)	0 %	84.57 % (± 4.09)	89.49 % (± 5.99)	90.83 % (± 6.63)	0 %	80.36 % (± 9.18)	82.87 % (± 6.79)	22.80 % (± 26.25)	NC	77.71 % (± 8.52)	84.62 % (± 8.73)	87.05 % (± 8.53)	0 %	83.76 % (± 3.59)	80.09 % (± 6.22)	90.72 % (± 7.09)	85.14 % (± 10.65)	
	Day 7	5.37 % (± 1.36)	7.83 % (± 0.68)	10.22 % (± 0.93)	8.50 % (± 1.56)	1.51 % (± 3.51)	9.20 % (± 0.92)	7.18 % (± 1.35)	8.58 % (± 7.83)	0 %	7.55 % (± 1.52)	7.79 % (± 1.95)	55.37 % (± 19.40)	NC	6.74 % (± 1.35)	9.02 % (± 0.98)	9.32 % (± 2.54)	0.34 % (± 0.72)	3.09 % (± 0.67)	5.91 % (± 1.48)	4.49 % (± 0)	10.29 % (± 1.77)	
	Day 8	0.49 % (± 0.35)	0.25 % (± 0)	0.27 % (± 0.72)	0.28 % (± 1.51)	5.78 % (± 10.39)	0 %	1.03 % (± 0.91)	0.30 % (± 0)	0 %	0.91 % (± 0.82)	0.93 % (± 1.00)	15.96 % (± 5.83)	NC	0.29 % (± 1.67)	0.27 % (± 0.68)	1.59 % (± 0.64)	19.46 % (± 22.17)	0.26 % (± 0)	0.44 % (± 0)		0.86 % (± 0)	
	Day 9	0.06 % (± 0)		0.27 % (± 0)	0.57 % (± 0)	27.39 % (± 23.40)	0.30 % (± 0.92)	0.51 % (± 0)		2.38 % (± 0)	0.30 % (± 0)	0 %	3.58 % (± 2.66)	NC	0.29 % (± 0)	0.27 % (± 0)	0.23 % (± 0)	27.52 % (± 33.29)					
	Day 10					18.51 % (± 10.69)				13.49 % (± 5.73)		0.62 % (± 0)	0.76 % (± 0)	NC				15.77 % (± 7.31)					
	Day 11					18.51 % (± 10.69)				15.87 % (± 28.91)			0.76 % (± 0)	NC				15.77 % (± 7.31)					
	Day 12													NC									

(*continued on next page*)

Table 2 (*continued*)

		CTRL	0.0013	0.13	13	130														mg DEHP/L
						18.51 % (± 10.69)				15.87 % (± 26.78)		0.76 % (± 0)				15.77 % (± 7.31)				
	Day 13					6.53 % (± 5.77)				12.70 % (± 26.78)			NC			5.37 % (± 0)				
	Day 14					3.27 % (± 0)				14.81 % (± 22.81)			NC							
	Day 15									11.11 % (± 14.44)			NC							
	Day 16									9.79 % (± 6.35)			NC							
	Day 17									1.32 % (± 0)			NC							
	Day 18									1.32 % (± 0)			NC							
	Day 19									1.32 % (± 0)			NC							
Sex-ratio																				
	Males	51.11 % (± 7.49)	50.13 % (± 5.80)	48.91 % (± 5.42)	50.29 % (± 8.68)	46.55 % (± 7.85)	49.23 % (± 6.91)	48.41 % (± 7.23)	48.62 % (± 4.61)	49.72 % (± 8.72)	51.62 % (± 7.64)	49.68 % (± 11.00)	52.58 % (± 7.06)	NC	46.60 % (± 6.41)	51.35 % (± 8.43)	53.37 % (± 5.61)	53.08 % (± 11.33)	53.70 % (± 7.29)	48.15 % (± 9.65)	49.03 % (± 10.17)	52.92 % (± 7.46)	
	Females	48.89 %	49.87 %	51.09 %	49.71 %	53.45 %	50.77 %	51.59 %	51.38 %	50.28 %	48.38 %	50.32 %	47.42 %	NC	53.40 %	48.65 %	46.63 %	46.92 %	46.30 %	51.85 %	50.97 %	47.08 %	

Table 3
Summary results of pollutants (mg/L) in the multi-exposure for *Drosophila melanogaster* (mean ± standard deviation). CTRL = control, NC = no calculable. Letters indicate the name of the mixture: A = weakly concentrated, B = moderately concentrated, C = highly concentrated. P-values lower than 5 % were considered significant (*, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001).

			A	***B***	***C***	
		CTRL	**0.2**	**2**	**20**	mg Cd/L
			0.05	**0.5**	**5**	mg Hg/L
			0.0013	**0.13**	**13**	mg DEHP/L
			0.0016	**0.16**	**16**	mg BPA/L
			0.002	**2**	**20**	mg NP/L
			0.05	**0.5**	**5**	mg BaP/L
			0.028	**2.8**	**28**	mg Gly/L
Mortality	Larval stages	8.00 % (± 8.37)	14.00 % (± 5.18)	7.00 % (± 4.81)	18.13 %* (± 3.75)	
	Pupal stage	3.00 % (± 8.66)	1.50 % (± 2.75)	3.50 % (± 5.44)	80.63 %* ** (± 3.13)	
Developmental time						
	Mean duration of larval stages *(days)*	5.96 (± 0.23)	5.99 (± 0.14)	6.07 (± 0.11)	10.71* ** (± 1.37)	
	Mean duration of pupal stage *(days)*	5.04 (± 0.07)	4.95 (± 0.12)	4.93 (± 0.11)	NC	
	Percentages larval-pupal transition			* *	* **	
	(day after egg-laying)					
	Day 5	13.59 % (± 17.21)	10.47 % (± 17.21)	1.08 % (± 2.94)	0 %	
	Day 6	77.17 % (± 8.77)	81.40 % (± 8.77)	91.40 % (± 10.95)	0 %	
	Day 7	8.15 % (± 1.42)	7.56 % (± 1.42)	6.99 % (± 1.32)	0 %	
	Day 8	1.09 % (± 0)	0.58 % (± 0)	0.54 % (± 0)	1.53 % (± 3.72)	
	Day 9				22.14 % (± 50.29)	
	Day 10				22.65 % (± 8.14)	
	Day 11				22.65 % (± 8.14)	
	Day 12				22.65 % (± 8.14)	
	Day 13				6.11 % (± 2.94)	
	Day 14				1.53 % (± 1.70)	
	Day 15				0.76 % (± 0)	
Sex-ratio						
	Males	51.11 % (± 7.49)	41.82 % (± 8.21)	49.01 % (± 10.48)	NC	
	Females	48.89 %	49.87 %	51.09 %	NC	

expression was down-regulated in larvae exposed to Mix A and Mix B, with Mix B also decreasing *hsp23, hsp40, hsp68,* and *hsp83* transcripts.

3.2.3. Metallothionein signaling pathway

Single exposures minimally affected the regulation of MTs genes (Fig. 1). *mtna* transcripts rose at 0.13 mg DEHP/L (1.8-fold), *mtnb* transcripts rose at 0.0016 mg BPA/L (1.4-fold), and *mtna* transcripts declined at 2 mg NP/L (2.3-fold). *mtna* and *mtnb* were significantly overexpressed (1.9- and 10.37-fold respectively) following exposure to Mix B. Other modulations were not significant; however, 1.4 and 2.4-fold more transcripts were produced for each MTN following Mix A exposure compared to the control (Fig. 1 and Table S2).

3.2.4. Cell stress signaling pathway

Only NP and Gly did not significantly modulate the expression of genes in this pathway (Fig. 1). The lowest concentration of DEHP down-regulated *keap1*, whereas the highest concentration down-regulated the gene coding for catalase (*cat*) and up-regulated the transcription factor *mef2* and *debcl*. BPA affected a large number of genes involved in this pathway (Fig. 1). Both tested concentrations of BPA suppressed the transcription of *mef2* (1.5–1.9-fold) and *cpr*, the partner of P450 enzymes (1.9–2.1-fold). After exposure to 0.0016 mg/L BPA, the ABC transporter *mdr49* gene was overexpressed (1.7-fold). Exposure to 0.16 mg/L BPA down-regulated (1.7-fold) the *keap1/cnc* system, which is involved in myogenesis, detoxication processes, and oxidative stress. Only the lowest concentration of BaP (0.05 mg/L) up-regulated *mef2, debcl,* and *mdr49*. Mix A exposure altered the expression of only a few genes (*TI*, *mef2*, and *cnc*), causing down-regulation. In contrast, many genes were down-regulated following Mix B exposure, including *TI, imd, p38, mef2, sirt1, keap1/cnc, cat*, and the gene encoding the superoxide dismutase *sod*.

The expression of genes initially selected as putative housekeeping genes was modified. BPA down-regulated actin (*act5*) at 0.16 mg/L, in addition to glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase gene (*zw*) and ribosomal gene *rps20*, at both tested concentrations. The amount of *act5* transcripts increased in larvae exposed to 0.05 mg BaP/L. *Act5* and tubulin *αtu84b* were underexpressed in larva exposed to Mix B compared to the control.

3.2.5. Cluster analysis of gene expression modifications for all conditions

Cluster analysis of gene expression (Fig. 2) showed that the metals profiles formed a distinct group. For all other pollutants, both tested

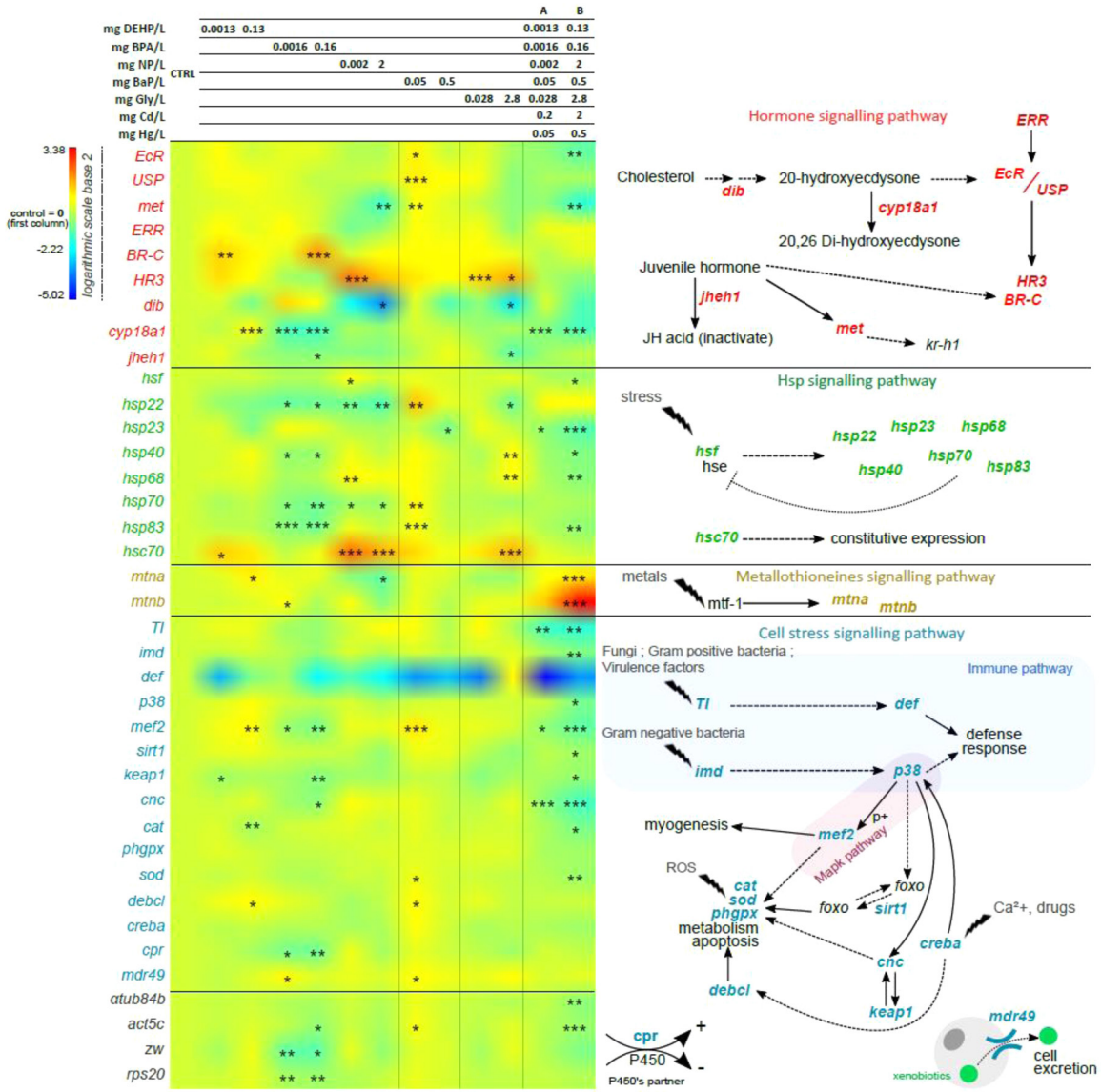


Fig. 1. Heat map representing changes to expression levels of the third instar larvae of *D. melanogaster* after exposure to heavy metals. The map summarizes the mean normalized expression (MNE) with respect to the pgk gene (n = 9, three biological replicates with three technical replicates for each) of 38 genes involved in various metabolic pathways at different Cd and Hg concentrations under single and combined exposure. MNEs are centered on the control group (control = 1), and transformed to a logarithmic base 2 scale (log(control) = 0). Correspondence table between log value and fold value is provided in Supplementary data 2. Color codes represent fold changes. Gene names are colored according to the signaling pathways shown on the right. Dotted arrows represent indirect interactions, while full arrows represent direct interactions between genes. C = controls. Asterisks (*) indicate significant differences among MNE in comparison to the control group (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$).

concentrations were grouped together (BPA and BaP), except for Gly and DEHP. The patterns for the two concentrations of these two pollutants were not similar nor closer to other pollutants. The 0.028 mg Gly/L and 0.0013 mg DEHP/L conditions were grouped together, and were close to the effects of BaP at both concentrations. The lower DEHP concentration was close to the control group, whereas the lower Gly concentration was close to NP at both concentrations. Interestingly, Mix A and Mix B were in the same group.

4. Discussion

We previously developed and tested a bioassay for heavy metals using Drosophila melanogaster, based on the direct addition of contaminated water to Drosophila culture medium without further treatment or dilution, under either single or mixed exposure. Hence, it is possible to measure how these pollutants direct affect various developmental and physiological parameters. This, coupled with molecular analyses, allows the collection of large amounts of information, aiding the better characterization of toxicity in molecules. Here, we obtained original data on DEPH, BPA, BaP, NP, Gly, and mixtures of these pollutants, and confirmed the potential of using this model as a toxicity bioassay.

4.1. Developmental response as a key biological parameter for pollutant impact

Most pollutants appeared to have a dose-dependent effect on the development of Drosophila. Developmental delays of approximately 24 h were first observed in larvae exposed to 0.13 mg DEHP/L, 2 mg NP/L, 0.5 mg BaP/L, and 2.8 mg Gly/L. These developmental delays appeared to lengthen as the dose of each pollutant increased. Indeed, under controlled conditions (fixed temperature, sufficient food, etc.),

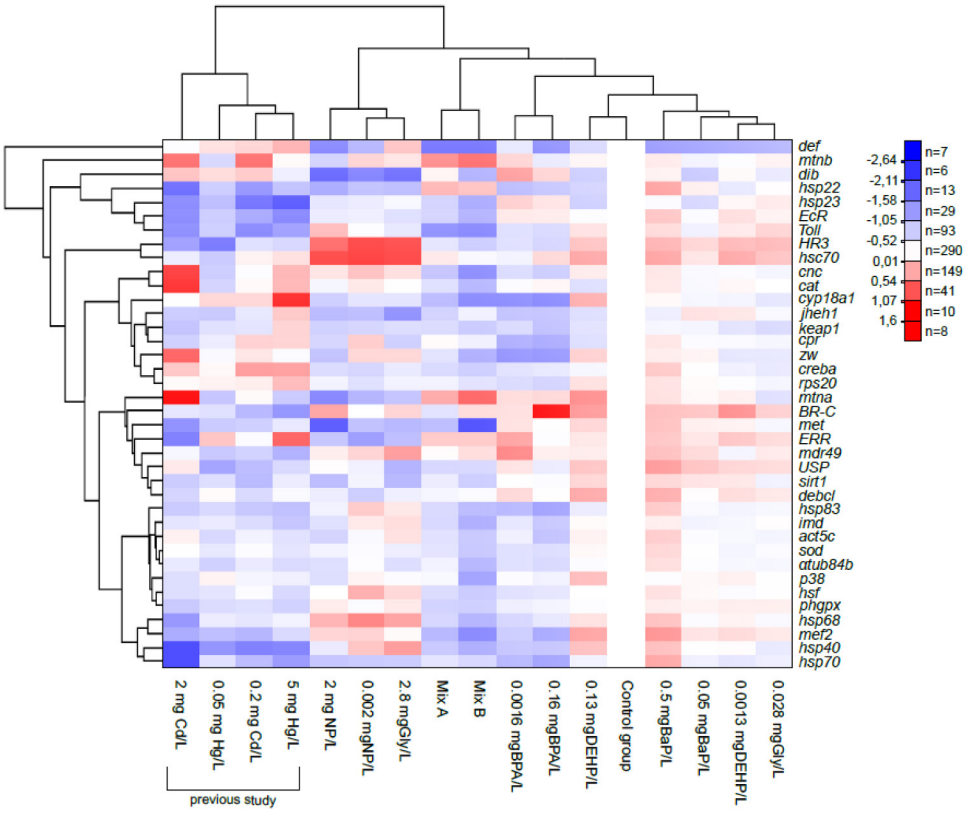


Fig. 2. Cluster of molecular profiles obtained under the different tested conditions. This figure shows expression profiles that are similar or opposite, but also those that minimally differ from the control group (= 0, white). These profiles were grouped in two ways: according to gene expression (i.e., overexpressed [red] versus underexpressed [blue]) and according to the pollutants and their tested concentrations. A color-coded scale indicates the distribution of data and the number of observations by colored categories and the intensity of gene modulation (base 2 logarithmic scale).

the post-embryonic development of insects always takes place with the same duration, which results in an identical and stable duration of each of the stages. The larval/pupal transition parameter is the literal translation of a temporal parameter. This transition is supposed to occur, under controlled conditions, always after the same time. Any change/delay is therefore evidence of a disturbance (in this case due to polluting conditions).

Interestingly, the lowest concentrations, corresponding to the EQS threshold value, did not disrupt development. In contrast, significant increases in larval stage duration, and percentage of larval-pupal transition, were recorded at higher concentrations, which corresponded to values just above EQS thresholds. These concentrations were considered abnormal and hazardous concentrations with respect to EQS standards. This result is of interest because it confirmed that our system was not too sensitive, identifying contamination when present, while recording nothing when contamination is low and within the threshold values of standards that are fixed based on other bioassays.

This delay in development, which we also previously observed for Cd and Hg (Frat et al., 2021), was recorded under almost all tested conditions (single and mixtures). Thus, it seems to be a key characteristic, allowing the easy detection of exposure to concentrations above the thresholds set by standards. The only exception to this response pattern was for BPA, which only induces a delay at the highest concentration. When comparing the effects of the developmental delay between single and combined exposures, Mix A and each separately tested pollutant at the same concentration had no significant effect. Likewise, for Mix B, the observed developmental delay seemed to be consistent with that observed for each tested separately pollutant at the same concentration used in the mix. In contrast, larvae exposed to Mix C required about 5 additional days to reach the pupal stage compared to individual tests at the same concentrations, for which 6 days was necessary to reach the pupal stage, except for larvae exposed to 20 mg NP/L, which needed 7 days. Thus, when a certain concentration threshold is exceeded, the pollutants in the mixture had synergistic effects, causing significant delays in development similar to 10 times higher concentrations for single pollutants.

Our study provides additional information but does not allow us to conclude with certainty on the mechanisms underlying exposure to pollutants. The observed effects are different depending on the nature of the pollutant and its concentration. But when apply in mixtures, we finally have several stimuli of the cellular response which results in the activation of a greater number of signaling pathways and cellular disturbances. This accumulation of altered responses would explain the more pronounced long-term effects of mixtures, which are not observed with single exposure.

4.1.1. *Developmental impact supported by EDC effects of pollutants*

Developmental delay could be caused by various phenomena, such as the malabsorption of nutrients in the digestive system, disruption of energy production or allocation, and endocrine disruption. The molecular mechanisms explaining these changes are multiple and can theoretically correspond to an accumulation of molecular or physiological disturbances. Indeed, these pollutants can, for example, induce cellular stress that affects the proper functioning of the body's cells, induce detoxification responses that represent a metabolic cost for the animal and therefore shift metabolic resources allocated to development towards detoxification, or disrupt hormone levels or hormone receptors, as many of these substances are known as "endocrine disrupting compounds". And hormones such as ecdysteroids are known to control post-embryonic development in insects.

For example, DEHP, BPA, and NP are now recognized as molecules that act on the endocrine system as endocrine disrupting compounds (EDC) (Kabir et al., 2015). This impact on development appears to be consistent with endocrine disrupting effects already reported in vertebrates, as well as insects (Forget-Leray et al., 2005; Gill et al., 2017). DEHP and BPA had similar effects on the post-embryonic development of *Spodoptera littoralis* (Aviles et al., 2019; Maria et al., 2019). These endocrine disruptions on development might be associated with

disruptions in hormone levels and/or the gene expression of hormone receptor or signaling pathways controlled by these hormones. Our results showed that the modulation of gene expression by DEHP, BPA, and NP could be attributed to these types of endocrine disruptions, as previously reported for other organisms, such as *Spodoptera littoralis* and *Chironomus riparius* (Aviles et al., 2019; Maria et al., 2019; Nair et Choi, 2012). Our results also showed the little-known effects of BaP and Gly on the expression of genes in the hormonal signaling pathway. Thus, BaP altered the expression level of the EcR/USP complex and JH receptor, while Gly modulated the expression of *HR3, dib,* and *jheh1* coupled with observed developmental delays, even though BaP and Gly are not classified as endocrine disruptors. Although the status as endocrine disruptors for regulatory agencies is not yet definitive for these two substances, our results coupling the effect on development and gene expression demonstrate the need for this classification. Interestingly, we also observed that glyphosate (Gly) exhibited some endocrine disruption on the development and molecular expression of genes in hormonal signaling. While the mechanisms of Gly action remain poorly understood, our results showed that Gly acted as an EDC at low doses. This result is consistent with previous studies showing that glyphosate induces neurotoxicity, endocrine disruption, and DNA or reproductive system damage at sublethal doses (Gill et al., 2017).

Mortality is not always a relevant parameter especially at low doses.

Mortality occurred in some cases with BaP and NP used under single exposure. The lethal effects of these two chemicals have been previously reported reported (Lee et al., 2018, Batiste-Alentorn et al., 1994; Vicentini et al., 2017); however, in our study, mortality only occurred at the highest concentration. No mortality was observed for any of the other compounds under single exposure. These results highlight that mortality is not necessarily a relevant parameter when working with low concentrations or concentrations close to the EQS thresholds, with previous studies also confirming no mortality following disturbance by these chemicals (Aviles et al., 2019; Forget-Leray et al., 2005; Maria et al., 2019). Interestingly, larval and pupal mortality occurred at low concentrations of Mix C, despite none of the chemicals in this mixture causing mortality under single exposure (18 % and 80 %, respectively, Table 3). The only exception was mercury, for which larval (21 %) and pupal (77 %) mortality increased when use alone at the concentrations used in Mix C (Frat et al., 2021). Therefore, mortality induced by Mix C appears to be mediated by mercury, with no synergistic or cumulative effect, as observed for developmental delay.

4.1.2. EDC disruption and other effects

In addition to the effect on hormone signaling pathways, other molecular disturbances were recorded, including modulation of HSPs, oxidative stress, and apoptosis (Fig. 1). Although molecular data showing how these pollutants impact insects is limited, our results were consistent with previous studies on vertebrates and mammals. Even at very low doses (i.e., EQS values), these pollutants modify the expression of several genes involved in the cellular stress response and the HSP signaling pathway. Thus, looking for strong effects (such as mortality) is not always necessarily a relevant parameter when working with the EQS values and low doses. Instead, it is important to assess the molecular response that occurs, even at low doses. For example, BPA and DEHP increase oxidative stress (Kabir et al., 2015), with our study showing that, *keap1, cnc, and cpr* expression increase at low doses, which could be interpreted as the oxidative stress response being induced (Fig. 1). DEHP drives lipid peroxidation and, thus, membrane destruction, leading to apoptosis (Kabir et al., 2015). The recorded increase in *debcl* expression in our study supported these previous observations (Fig. 1). *mef2* expression for larvae exposed to DEHP, BPA, and BaP was also modified (Fig. 1), reflecting the MAPK pathway, with potential consequences on myogenesis, metabolism, and apoptosis. Existing studies on NP and BaP showed that these compounds, or their metabolites, induce various responses, including reactive oxygen species formation and cell death by necrosis or apoptosis (Jiang et al., 2013, Acir et Guenther, 2018).

Our study also showed the occurrence of new molecular disturbance. Examples included the overexpression of the *mdr49* transporter following exposure to BPA (0.0016 mg/L) and BaP (0.05 mg/L), indicating the capacity of cells to excrete these two toxicants (Tapadia and Lakhotia, 2005). Furthermore, BPA impacted the expression of cpr (partner of the cytochrome P450 enzymes), potentially disruption the detoxification process of exposed larvae. Globally, the presence of these pollutants, even at low concentrations, has consequences on organisms and their cells. Pollutants induce specific defense mechanisms, and disrupt other signaling pathways. Thus, even if organisms survive these doses, trace molecules can be used to detect stressful exposure.

Beyond current knowledge on the effects and modes of action that our protocol provides, we also sought to identify specific biomarkers to pollutants to trace pollution through the Drosophila bioassay. MTNs were the most promising biomarkers, as they were highly expressed after exposure to Mix B. MTN expression was modified in larvae exposed to DEHP, BPA, and NP. However, the intensity of these modulations was lower compared to larvae exposed to Mix B. This significant increase in expression was expected, because we included Hg and Cd in the mixtures, and we previously demonstrated the strong response of *mtna* et *mtnb* to these concentrations (Frat et al., 2021). Thus, we reaffirmed the high potential of these genes as biomarkers of metals exposure (Balamurugan et al., 2004). The immune genes (i.e., *TI* and *imd)* also appeared in our system as biomarkers of Cd and Hg exposure. The lower expression recorded in Mix A and B (versus no modification with non-metallic pollutants, such as DEHP, BPA) indicates specificity to Cd and/or Hg, and, hence, a good biomarker.

However, despite this exception, we were not able to identify specific biomarkers for others pollutants among the 38 tested genes. Furthermore, the modulation of gene expression was not consistent across pollutants or concentrations. Regulating molecular actors is a very finely orchestrated process. Each concentration and each mixture represents a unique condition leading to differential gene regulation, sometimes making comparison difficult, even when trends are present. Cluster analysis of gene expression (Fig. 2) offers new opportunity to compare results, particularly under complex scenarios. Moreover, our study highlighted that pollutant toxicity must be assessed at several levels of organization, combining molecular biomarkers and biological phenotypes, to obtain comprehensive insights.

4.1.3. Usefulness of integrative and one-shot protocols

Integrative studies strictly based on molecular analyses have limits. For example, analyses of gene expression should be ideally coupled with quantifying the amount of corresponding proteins to account for post-transcriptional and translational regulations, as well as protein catabolism. A good example of this is HSPs, which, for certain subfamilies, have constitutive forms with cellular stocks that allow them to manage moderate stress without needing to re-transcribe corresponding genes (Arad et al., 2010). This type of metabolism leads to a discrepancy between transcript and protein levels. We also hypothesize that it could lead to specific regulation, potentially inhibiting the expression of some genes to allocate energy to the production of other higher priority cellular factors. We also observed this phenomenon with Cd and Hg, with a balance possibly existing among signaling pathways, which is altered depending on polluting conditions (Frat et al., 2021). The time of exposure and time at which expression is quantified might also influence interpretation, as many genetic regulations occur over time (Herrero et al., 2017). Some genes are temporarily or permanently induced or repressed by biotic or abiotic factors. Therefore, analysis at a given time point only provides partial information. Given these limitations, bioassay protocols that record information on both molecular mechanisms and biological responses in the same experiment are required.

By obtaining an integrative and global vision, the current study showed that more genes were involved in mix B, with a greater difference in expression, compared to when pollutants were tested separately at the same concentrations. These significant molecular perturbations

were associated with a developmental delay, which was strongly accentuated in Mix C. Even though we did not analyze gene expression at higher concentrations, we hypothesize that the number of genes and intensity of the responses would be equivalent to, or even greater than, those in Mix B. This strong molecular response, coupled with a clear phenotype at low doses, supports the argument that pollutants have synergistic effects that increase the toxicity of the mixture compared to single exposure. Of note, the profiles of the two mixtures were clustered (Fig. 2). Although more genes were involved in the response to mix B, several genes were similar genes in both cases, with the same disruption to expression and mixture-specific profile.

5. Conclusions

The present work confirmed the importance of using multilevel integrative studies to analyze the toxicity of pollutants alone and in mixtures. Such studies facilitate critical and comparative evaluations of protocols that are currently used to evaluate the danger of these molecules or organisms, particularly at low doses or close to EQS threshold values. Monitoring new types of phenotypes, such as the post-embryonic development of insects, coupled with the study of a large panel of biomarkers (38 genes) shows promise, opening new opportunities for understanding the toxic effects of various pollutants, as well as detecting and prioritizing their toxicities.

The sensitivity of the test allowed assumptions to be made about the presence of certain types of pollutants, especially those with EDC effects. Profiles of other pollutants are required, along with refining our protocol, develop a reliable model. Various tools (large-scale transcriptomics) and other parameters (reproduction, size and weight, locomotion etc.) could help strengthen our diagnosis of pollutant toxicity. In conclusion, our study validated the potential of Drosophila to trace pollution, with promising initial results.

Moreover, our study highlighted that pollutant toxicity must be assessed at several levels of organization, combining molecular biomarkers and biological phenotypes, to obtain comprehensive insights. However, the use of a model species such as *Drosophila melanogaster* opens up the possibility of establishing standardized exposure and analysis protocols that could be the basis for setting new standards for whole-organism testing, in addition to other analyses on cellular models that cannot reproduce the complexity of an organism-wide response, nor account for realistic environmental contamination. Given these limitations, bioassay protocols that record information on both molecular mechanisms and biological responses in the same experiment are required.

Drosophila melanogaster, one of the most widely used model organisms in the biomedical sciences, allows these multi-levels approaches. The advantages of using Drosophila are numerous: it is easy and inexpensive to grow in laboratory conditions allowing access to many animals, it has a short life cycle, and it can be easily genetically modified. Thus the future may see the advent of this model organism in new disciplinary fields, such as ecophysiology and ecotoxicology.

CRediT authorship contribution statement

Laëtitia FRAT, Conceptualization, Methodology, Visualization, Writing - Original Draft, Thomas CHERTEMPS, Conceptualization, Methodology, Writing - Review & Editing, Elise PESCE, Methodology, Françoise BOZZOLAN, Methodology, Matthieu DACHER, Formal analysis, Rosario PLANELLO, Formal analysis, Writing - Review & Editing, Oscar HERRERO, Formal analysis, Writing - Review & Editing, Lola LLORENTE, Methodology, Formal analysis, Writing - Review & Editing, Didier MOERS, Project administration, Funding acquisition, David SIAUSSAT, Conceptualization, Writing - Review & Editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of Competing Interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: David Siaussat reports financial support was provided by Sorbonne University.

Data Availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

We thank the intercommunal association for sewage in the Pontoise region (SIARP) and the Seine-Normandie water agency for providing financial support.

Supplementary materials

Supplementary Table 1. Primers used for quantitative RT-PCR of the genes studied in *Drosophila melanogaster*.

Supplementary Table 2. Heat map correspondence table of log values and fold changes. For each gene (lines) and condition (columns), the log value of the mean normalized expression (centered to the control group) is indicated with the fold value (in parentheses) for controls (C) versus single and combined exposure.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.ecoenv.2022.114491.

References

Acir, I.H., Guenther, K., 2018. Endocrine-disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates – a critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation. Sci. Total Environ. 635, 1530–1546. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.079.

Altenburger, R., Scholze, M., Busch, W., Escher, B.I., Jakobs, G., Krauss, M., Krüger, J., Neale, P.A., Ait-Aissa, S., Almeida, A.C., Seiler, T.B., Brion, F., Hilscherová, K., Hollert, H., Novák, J., Schlichting, R., Serra, H., Shao, Y., Tindall, A., Tolefsen, K.E., Umbuzeiro, G., Williams, T.D., Kortenkamp, A., 2018. Mixture effects in samples of multiple contaminants – an inter-laboratory study with manifold bioassays. Environ. Int. 114, 95–106. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.013.

Arad, Z., Mizrahi, T., Goldenberg, S., Heller, J., 2010. Natural annual cycle of heat shock protein expression in land snails: desert versus Mediterranean species of Sphincterochila. Oct 15 J. Exp. Biol. 213 (Pt 20), 3487–3495. https://doi.org/10.1242/jeb.047670.

Aviles, A., Boulogne, I., Durand, N., Maria, A., Cordeiro, A., Bozzolan, F., Goutte, A., Alliot, F., Dacher, M., Renault, D., Maibeche, M., Siaussat, D., 2019. Effects of DEHP on post-embryonic development, nuclear receptor expression, metabolite and ecdysteroid concentrations of the moth *Spodoptera littoralis*. Chemosphere 215, 725–738. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.102.

Balamurugan, K., Egli, D., Selvaraj, A., Zhang, B., Georgiev, O., Schaffner, W., 2004. Metal-responsive transcription factor (MTF-1) and heavy metal stress response in Drosophila and mammalian cells: a functional comparison. Biol. Chem. 385, 597–603. https://doi.org/10.1515/BC.2004.074.

Batiste-Alentorn, M., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R., 1994. Further studies with the somatic white-ivory system of Drosophila melanogaster: genotoxicity testing of ten carcinogens. Environ. Mol. Mutagen. 24, 143–147. https://doi.org/10.1002/em.2850240210.

Bigot, L., Shaik, H.A., Bozzolan, F., Party, V., Lucas, P., Debernard, S., Siaussat, D., 2012. Peripheral regulation by ecdysteroids of olfactory responsiveness in male Egyptian cotton leaf worms, *Spodoptera littoralis*. Insect Biochem. Mol. Biol. 42, 22–31. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.10.003.

Caballero-Gallardo, K., Olivero-Verbel, J., Freeman, J, L., 2016. Toxicogenomics to evaluate endocrine disrupting effects of environmental chemicals using the zebrafish model. Curr. Genom. 17, 515–527. https://doi.org/10.2174/1389202917666160513105959.

De Aguiar, L.M., Figueira, F.H., Gottschalk, M.S., Da Rosa, C.E., 2016. Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly Drosophila melanogaster. Comp. Biochem. Physiol. Part - C. Toxicol. Pharm. 185–186, 94–101. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.03.006.

European Union (2013) Directive 2013/39/EU of the European Parliament and of the Council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy. Off J Eur Union L 226:1–17, 24 Sep 2013.

Forget-Leray, J., Landriau, I., Minier, C., Leboulenger, F., 2005. Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). Ecotoxicol. Environ. Saf. 60, 288–294. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.06.008.

Frat, L., Chertemps, T., Pesce, É., Bozzolan, F., Dacher, M., Planelló, R., Herrero, Ó., Llorente, L., Moers, D., Siaussat, D., 2021. Single and mixed exposure to cadmium and mercury in Drosophila melanogaster: Molecular responses and impact on post-embryonic development. Ecotoxicol. Environ. Saf. 220. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112377.

Gill, J.P.K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., Girdhar, M., 2017. Glyphosate toxicity for animals. Environ. Chem. Lett. 16, 401–426. https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0.

Handy, R.D., Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2003. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. Ecotoxicology 12, 331–343. https://doi.org/10.1023/A:1022527432252.

Hazra, A., 2017. Biostatistics series module 9: survival analysis. Indian J. Dermatol.· https://doi.org/10.4103/ijd.IJD.

Herrero, Ó., Morcillo, G., Planelló, R., 2017. Transcriptional deregulation of genetic biomarkers in *Chironomus riparius* larvae exposed to ecologically relevant concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). PLoS One 12, 6–8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171719.

Jiang, Y., Chen, X., Yang, G., Wang, Q., Wang, J., Xiong, W., Yuan, J., 2013. BaP-induced DNA damage initiated p53-independent necroptosis via the mitochondrial pathway involving Bax and Bcl-2. Hum. Exp. Toxicol. 32, 1245–1257. https://doi.org/10.1177/0960327113488613.

Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. Environ. Toxicol. Pharmacol. 40, 241–258. https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009.

Kim, K.H., Jahan, S.A., Kabir, E., Brown, R.J.C., 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. Environ. Int. 60, 71–80. https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019.

Kortenkamp, A., Faust, M., 2018. Regulate to reduce chemical mixture risk. Science 361 (80), 224–226. https://doi.org/10.1126/science.aat9219.

Lee, D.H., Jo, Y.J., Eom, H.J., Yum, S., Rhee, J.S., 2018. Nonylphenol induces mortality and reduces hatching rate through increase of oxidative stress and dysfunction of antioxidant defense system in marine medaka embryo. Mol. Cell. Toxicol. 14, 437–444. https://doi.org/10.1007/s13273-018-0048-7.

Maria, A., Malbert-Colas, A., Boulogne, I., Braman, V., Boitard, C., Dacher, M., Chertemps, T., Maibeche, M., Blais, C., Siaussat, D., 2019. Effects of bisphenol A on post-embryonic development of the cotton pest *Spodoptera littoralis*. Chemosphere 235, 616–625. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.073.

Martín-Folgar, R., Martínez-Guitarte, J.L., 2019. Effects of single and mixture exposure of cadmium and copper in apoptosis and immune related genes at transcriptional level on the midge *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae). Sci. Total Environ. 677, 590–598. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.364.

Nair, P.M.G., Choi, J., 2012. Modulation in the mRNA expression of ecdysone receptor gene in aquatic midge, *Chironomus riparius* upon exposure to nonylphenol and silver nanoparticles. Environ. Toxicol. Pharmacol. 33, 98–106. https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.09.006.

Oetken, M., Bachmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., 2004. Evidence for endocrine disruption in invertebrates. Int. Rev. Cytol. 236, 1–44. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)36001-8.

ORF, 1998. February 2nd Order 1998 Relating to Water Withdrawals and Consumption as Well as to Emissions of all Kinds from Installations Classified for the Protection of the Environment Subject to Authorization.

Park, K., Kwak, I.S., 2010. Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. Chemosphere 79, 934–941. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.002.

Planelló, R., Servia, M.J., Gómez-Sande, P., Herrero, Ó., Cobo, F., Morcillo, G., 2013. Transcriptional responses, metabolic activity and mouthpart deformities in natural populations of *Chironomus riparius* larvae exposed to environmental pollutants. Environ. Toxicol. 30, 383–395. https://doi.org/10.1002/tox.

Rathi, B.S., Kumar, P.S., Vo, D.-V.N., 2021. Critical review on hazardous pollutants in water environment: occurrence, monitoring, fate, removal technologies and risk assessment. Sci. Total Environ. 797, 149134 https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149134.

Simon, P., 2003. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. Bioinformatics 19, 1439–1440. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg157.

Tapadia, M.G., Lakhotia, S.C., 2005. Expression of mdr49 and mdr65 multidrug resistance genes in larval tissues of *Drosophila melanogaster* under normal and stress conditions. Cell Stress Chaperon. 10, 7–11. https://doi.org/10.1379/CSC-67R.1.

Vicentini, M., Morais, G.S., Rebechi-Baggio, D., Richardi, V.S., Santos, G.S., Cestari, M. M., Navarro-Silva, M.A., 2017. Benzo(a)pyrene exposure causes genotoxic and biochemical changes in the midge larvae of *Chironomus sancticaroli* strixino & strixino (Diptera: Chironomidae). Neotrop. Entomol. 46, 658–665. https://doi.org/10.1007/s13744-017-0505-3.

Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., Yang, L., 2016. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 8244–8259. https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x.

D. Des biomarqueurs pour le suivi de la pollution dans les eaux usées ?

L'objectif de ces deux précédentes études dans des conditions contrôlées (connaissances des polluants et des concentrations testés) était d'identifier des biomarqueurs d'exposition ou d'effet afin d'étudier la toxicité des eaux usées et y suivre la présence de micropolluants.

Phénotypes macroscopiques

Trois paramètres fondamentaux ont été systématiquement suivis dans ces expériences : la mortalité, le temps de développement et la proportion entre mâle et femelle (sex-ratio de 1:1 chez la drosophile). Dans les eaux usées, ces paramètres peuvent permettre de hiérarchiser les sites de prélèvements des eaux usées étudiés en fonction du degré de toxicité infligé aux animaux. La mortalité étant définie comme le paramètre le plus grave dans l'atteinte de l'intégrité d'un individu, elle signalerait une toxicité très importante des eaux usées. Ce paramètre apparaissant peu sensible aux faibles concentrations et dépendant du polluant (cf études précédentes), il pourrait plutôt indiquer la présence de fortes concentrations de polluants toxiques ; bien que l'hypothèse de la potentialisation des effets en cas de mélange ne peut pas être écartée. Si le taux de mortalité n'est pas augmenté, le temps de développement des animaux est une information complémentaire. Plus il est modifié, plus on peut considérer un effet fort sur les animaux. En revanche, la mesure du sex-ratio ne semble pas être pertinente pour tracer des effets toxiques des substances. Même lors d'expositions à de fortes concentrations et aux mélanges, aucun des sexes n'a été spécifiquement affecté. Cependant, les eaux usées constituent une matrice d'étude très complexe dont la composition complète reste inconnue. Il n'est donc pas à écarter que le sex-ratio pourrait être basculé à la suite d'une exposition à ces dernières. Ces trois paramètres ne permettent pas de tracer une pollution particulière (polluant ou famille du polluant) mais ils permettent de rendre compte de l'effet toxique global.

Cibles moléculaires

L'étude de cibles moléculaires permettait d'augmenter la sensibilité du modèle drosophile en servant de marqueurs précoces de toxicité, notamment en réponse à de faibles concentrations. De plus, ces marqueurs peuvent donner des informations supplémentaires sur les mécanismes impliqués. Afin de visualiser plus globalement les résultats des

expériences menées, nous avons réalisé un cluster à double entrée qui permet de regrouper les profils d'expression de l'ensemble des gènes selon les conditions polluantes (polluants et concentrations) et le niveau de modulation dans l'expression des gènes (**Figure III-25**).

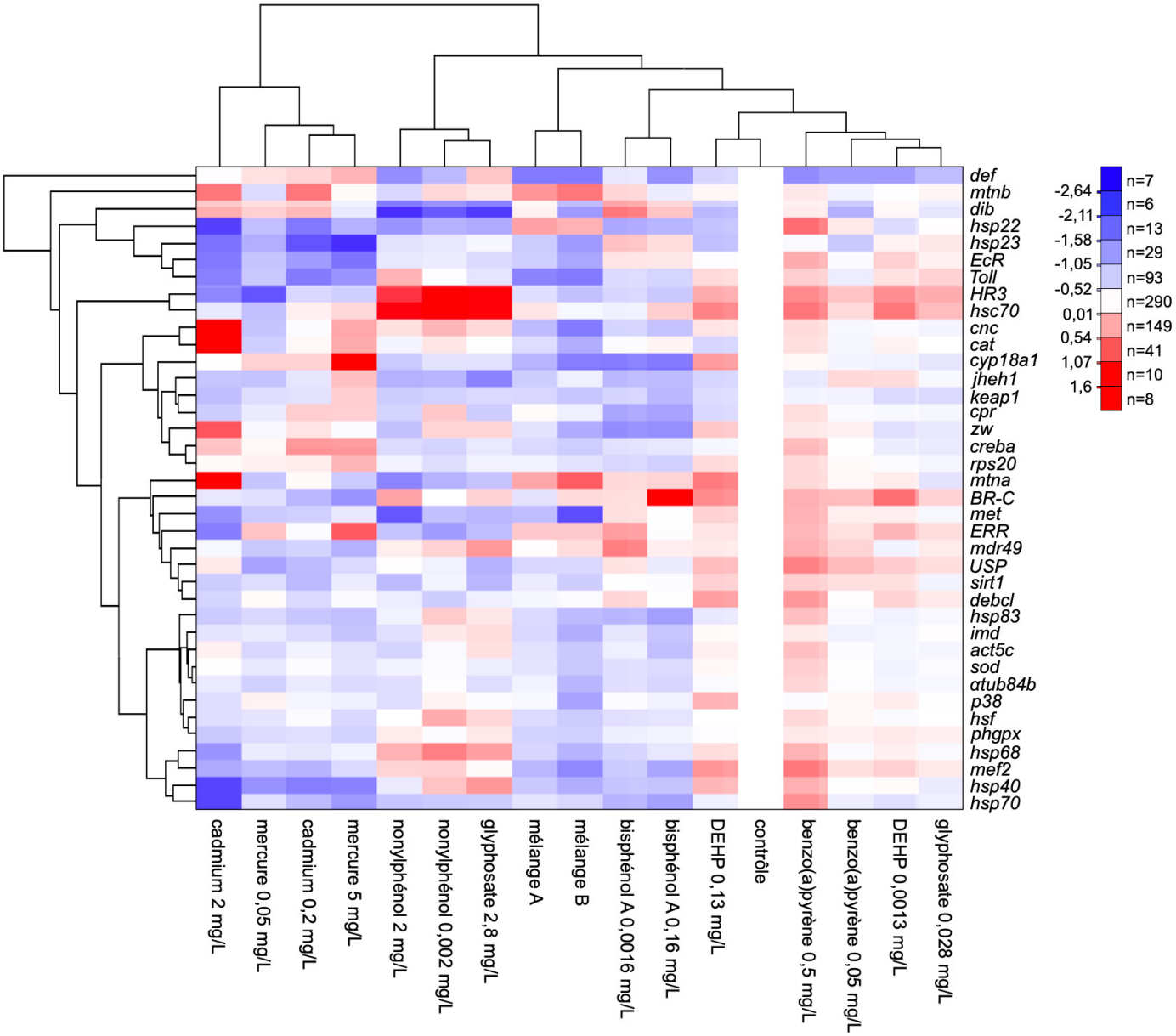


Figure III-25. *Cluster des profils d'expression des gènes étudiés chez la drosophile en fonction du niveau d'expression et des conditions testées. Cette figure permet d'apprécier les profils d'expression qui se ressemblent ou sont au contraire opposés, mais également ceux qui diffèrent peu du groupe contrôle (=0, blanc). Ces profils ont été regroupés de deux façons : selon l'expression des gènes, qu'ils soient surexprimés (rouge) ou sous exprimés (bleu) et selon les polluants et leurs concentrations testées. Une échelle reprenant le code couleur indique la distribution des données et le nombre d'observations par catégories colorées et l'intensité de la modulation des gènes (échelle logarithmique base 2) tiré de Frat et al 2023.*

Comme indiqué, cette figure présente deux voies d'entrée, les conditions polluantes que nous traiterons dans un premier temps et les gènes que nous traiterons dans un second temps.

De manière générale, les deux concentrations étudiées par polluant sont regroupées ensemble à l'exception de celles du glyphosate et du DEHP (**Figure III-25**). Les concentrations de ces deux polluants n'étant pas regroupées ensemble, traduisent plutôt un effet non dose réponse dépendant entres les conditions. Le cluster permet d'identifier deux groupes majoritaires avec dans la partie gauche les métaux et dans la partie droite les autres conditions (**Figure III-25**). Le contrôle étant dans le groupe de droite, les profils qui y sont associés sont donc similaires, en particulier lorsqu'ils font partie des mêmes sous-groupes. Ces conditions polluantes ont alors modulé l'expression de peu de gènes et/ou de manière peu intense. C'est le cas de la plus forte concentration du DEHP testée dans ces expériences (0,130 mg/L). Plusieurs autres profils sont associés, celui de la plus faible concentration du glyphosate (0,028 mg/L) et du DEHP (0,0013 mg/L) et ceux du benzo(a) pyrène (0,05 et 0,5 mg/L). Plus les profils d'expression sont situés sur la gauche de la figure, plus ils vont différer du groupe contrôle (**Figure III-25**). Le bisphénol A a une signature très proche entre les deux concentrations testées (0,0016 et 0,16 mg/L) et est associé aux deux mélanges A et B. Ce regroupement indique que le profil des polluants en mélange ressemble à celui du bisphénol A, traduisant potentiellement un effet majoritaire de ce dernier. Le dernier sous-groupe associé est composé du nonylphénol (0,002 et 2 mg/L) et de la seconde concentration du glyphosate (2,8 mg/L) (**Figure III-25**). La forte similarité entre les effets du glyphosate et du nonylphénol pourrait signifier un même mode d'action chez la drosophile. Les métaux, cadmium et mercure, composent le second grand groupe du cluster. Ils ont des profils similaires entre eux mais très différents des autres conditions et du groupe contrôle (**Figure III-25**). L'intensité des effets paraît plus importante, en particulier pour la concentration la plus forte de cadmium (2 mg/L). Les métaux qui se distinguent par leurs profils pourraient s'apparenter aux substances les plus toxiques testées dans ces expériences, hypothèse soutenue dans la littérature dans le contexte des eaux usées (Zhou et al. 2019). Nous pouvons noter par ailleurs que la majorité de la figure est « bleue » témoignant de régulations à la baisse de l'expression des gènes. En effet, ce sont des sous-expression que nous avons majoritairement observés dans les conditions testées. Etant donné que nous avons regardé l'expression des gènes chez les larves 4 jours après l'éclosion, ce qui correspond environ à 3-4 jours d'exposition, les mécanismes moléculaires qui peuvent avoir été sollicités sont rétrocontrolés à ce temps d'exposition. Une sous-expression génique peut également être le signe de la « non nécessité » d'un mécanisme ou

d'un dysfonctionnement en lien avec l'exposition à une ou plusieurs substances toxiques.

La deuxième entrée de la figure, les gènes, indique que ceux classés en haut du cluster ont subi la plus forte intensité de modulation et parfois dans plusieurs conditions (**Figure III-25**). Parmi ces gènes, il y a la défensine (*def*), la métallothionéine B (*mtnB*), disembodied (*dib*), les chaperonnes 22 et 23 (*hsp22* et *hsp23*), ecdysone receptor (*EcR*) et le réceptor *Toll*. Certains de ces gènes apparaissent peu spécifiques comme la défensine ou encore les protéines chaperonnes qui ont subi des régulations dans plusieurs conditions et d'autres plus spécifiques comme la métallothionéine B avec le cadmium. Les gènes classés plus bas dans le cluster (**Figure III-25**), ont été peu modulés (couleurs moins intenses proches du blanc) ou fortement modulés dans certaines conditions (couleur plus intenses) et ce, de manière plus ou moins spécifique comme hormone receptor 3 (*HR3*) et la chaperonne constitutive 70 (*hsc70*) pour le glyphosate et le nonylpéhol ou encore broad complex (*BR-C*) pour le DEHP et le bisphénol A.

Comme démontré ici et égalemetn conclu précédemment (partie C chapitre III), il est difficile d'identifier un gène spécifique d'une pollution donnée, ceci étant le reflet des différents mécanismes étudiés dans ces travaux. En revanche, des profils se distinguent entre eux selon les conditions et l'intensité des effets. Par exemple, le cadmium a tendance à provoquer la sur-expression des gènes des métallothionéines et la sous-expression des gènes de plusieurs Hsps au temps d'exposition choisi. Si dans un environnement complexe où l'on ne connait pas la composition chimique, ce profil chimique pourrait indiquer la présence de cadmium. De plus, ces profils peuvent être indicateurs du stress subi par les animaux avec pour corollaire, la corrélation positive entre intensité des effets et toxicité. Cela pourrait également suggérer que tant que les mécanismes sont modulés, l'organisme est toujours capable de lutter contre le xénobiotique. Mais les effets ne sont pas toujours dose réponse dépendant comme dans le cas du benzo(a)pyrène. Dans ce cas, nous mettons en avant l'hypothèse suivante : lorsque l'expression des gènes revient à un niveau basal, l'organisme n'arrive plus à lutter contre le xénobiotique et des effets peuvent être observés à l'échelle de l'individu entier (ex. retard de développement, changement dans la taille ou le poids des individus, capacité reproductrice diminuée). C'est ce que l'on a pu observer globalement dans ces expériences.

Enfin pour répondre à la question initiale, ces seules expériences ne suffisent pas pour confirmer ou non l'efficacité des biomarqueurs pour suivre une pollution

particulière dans les eaux usées. L'expérience des mélanges, voulue pour mimer les eaux usées, a montré que les profils d'expression de ces conditions sont regroupés ensemble dans un sous-groupe apparenté au bisphénol A et non au cadmium comme on pourrait s'y attendre selon les expériences (condition ayant modulé le plus fortement les gènes). La cinétique de toxicité est donc changée lorsque les polluants sont en mélange. Afin de décrypter le rôle des acteurs moléculaires impliqués ici en tant que biomarqueurs, des expériences supplémentaires sur leur toxicocinétique sont nécessaires. Toutefois à ce stade de l'étude, les étudier lors d'exposition aux eaux usées peut permettre d'améliorer la sensibilité de la drosophile (effet précoce de toxicité) et de ce fait, aider dans la hiérarchisation des sites émetteurs de substances toxiques.

Conclusion

Le protocole mis en place dans ces expériences pour identifier des marqueurs de toxicité et étudier les effets de substances et mélanges de substances semble approprié. Les résultats de ces études ont montré que la mortalité a été induite aux plus fortes concentrations. Dans le contexte d'une utilisation pour les eaux usées, cet effet grave pourrait donc être interprété comme marqueur de la présence de fortes concentrations de substances ou d'un effet cocktail de ces dernières. Le temps de développement apparaît comme un second marqueur pertinent. Les effets sur ce paramètre sont considérés comme moins graves dans l'atteinte de l'intégrité d'un individu, mais les troubles développementaux peuvent être plus ou moins forts traduisant donc une toxicité plus ou moins importante. Les effets sur le développement étaient globalement doses réponses dépendants pour les gammes croissantes des concentrations et induits à de plus faibles concentrations que la mortalité. Ce paramètre est donc plus sensible aux faibles concentrations que la mortalité, ce qui est primordial puisque les eaux usées sont un mélange de polluants très peu concentrés (cf chapitre II). Enfin, aucun des sexes chez la drosophile n'a été affecté spécifiquement. L'observation du sex-ratio n'apparaît pas pertinent bien qu'il sera nécessaire de l'évaluer dans les conditions « eaux usées » avant de le confirmer. A l'échelle moléculaire, les gènes ont servi à augmenter le seuil de sensibilité de notre modèle. En effet, les mécanismes moléculaires sont généralement altérés en premier et à l'origine de futurs dérèglements à l'échelle de l'organisme entier, ce qui a été observé ici. Aucun des gènes ne semblait spécifique à une condition polluante à l'exception des métallothionéines pour la classe des métaux et la toxicocinétique des polluants a été changée entre les conditions d'exposition seule ou combinée. En revanche, selon la similarité des effets induits au niveau des gènes étudiés ici, des regroupements par conditions ont été réalisés et des signatures on été identifiées. Les métaux présentaient des profils similaires et différents des autres conditions polluantes. Les autres polluants étaient eux, plus ou moins apparentés au groupe contrôle traduisant des effets moins forts. Et certains d'entre eux regroupés ensemble pourraient avoir un même mode d'action chez la drosophile (ex. cas du nonylphénol et du glyphosate).

Ces seules expériences apportent quelques éléments de réponse sur la question des biomarqueurs pertinents pour la recherche de substances toxiques dans les eaux usées. En revanche, elles ne sont pas suffisantes pour confirmer ou non l'efficacité de ces biomarqueurs pour l'identification du type de pollution. Des expériences supplémentaires sont nécessaires sur la cinétique des acteurs moléculaires pour mieux comprendre leur rôle dans les expositions seules et combinées.

Chapitre IV
Caractérisation toxicologique des eaux usées brutes

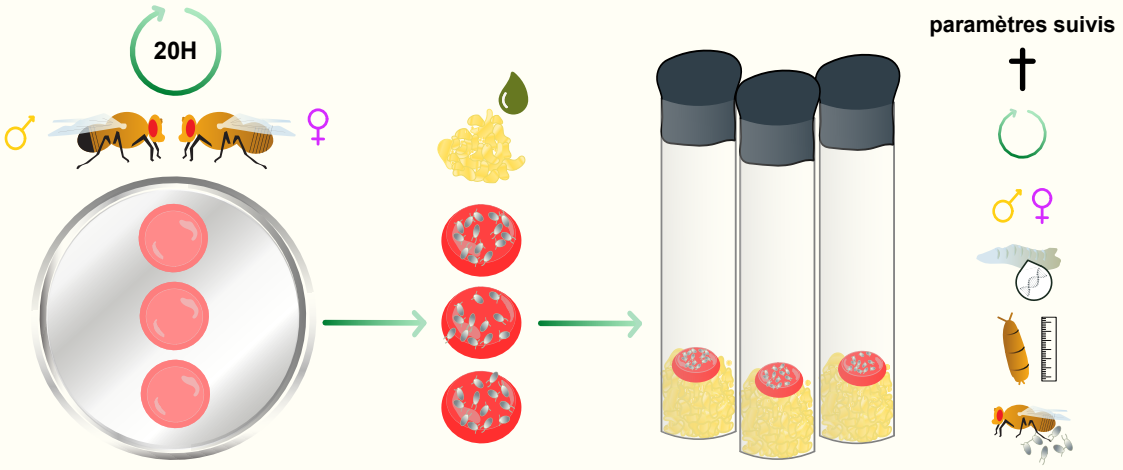
«La vérité scientifique sera toujours plus belle que les créations de notre imagination et que les illusions de notre ignorance.»

Claude Bernard

L'essentiel chapitre IV *: Les paramètres utilisés dans le chapitre précédent ont été utilisés ici pour l'évaluation de la toxicité des eaux usées. Selon leur origine, les eaux usées ont parfois induit la mortalité des individus mais ont aussi contribué à leur survie de manière significative. Ce paramètre permet déjà de fournir une première appréciation de la toxicité des différents échantillons d'eaux usées. Le temps de développement a été prolongé pour l'ensemble des échantillons testés à l'exception d'un seul d'origine industrielle. En revanche, d'autres échantillons d'origine industrielle ont induit des effets négatifs sur la taille des individus et sur la fertilité des femelles exposées lors des stades larvaires. Les résultats ont montré que l'on pouvait hiérarchiser les prélèvements d'eaux usées en fonction de plusieurs caractéristiques toxiques observées. Bien que certaines eaux usées industrielles soient classées parmi les plus toxiques, d'autres d'origine domestique se sont montrées nocives également. Le seul critère d'origine ne peut permettre de discriminer à lui seul la toxicité des eaux usées. Au niveau moléculaire, les résultats en 2018 étaient peu informatifs en raison de la variabilité des mesures. En revanche en 2019, les profils d'expression ont pu être comparés à ceux obtenus avec les polluants seuls et en mélanges. Les profils d'expression des eaux usées étaient regroupés ensemble et avec celui du contrôle indiquant peu de gènes affectés ou à des niveaux peu intenses par rapport aux autres conditions. Cependant, quelques gènes ont été fortement régulés (cnc, hsc70) indiquant un stress subi par les animaux exposés. De façon intéressante, les eaux usées industrielles ont montré des profils d'expression des gènes peu changés par rapport aux autres échantillons mais présentaient des effets toxiques très marqués. Ces observations permettent d'étayer notre hypothèse posée au chapitre III sur le fait d'un retour à un niveau basal de l'expression des gènes de détoxication/défense à la suite d'une exposition trop importante de substances toxiques se traduisant par des effets forts à l'échelle de l'individu. Enfin, il apparaît difficile de corréler toxicité et mesures physico-chimiques, d'autant plus que nous ne disposons pas assez de répétitions de mesures. Ces deux outils sont complémentaires mais ne peuvent pas expliquer l'un ou l'autre.*

Rappel matériels et méthodes

Le protocole utilisé pour les essais de toxicité et les analyses statistiques sont les mêmes que décrits au chapitre III. Un schéma pour l'application aux eaux usées est présenté ci-dessous.



De la même façon que dans le chapitre précédent, les supports gélosés contenant des nombres d'œufs connus sont déposés dans les dispositifs d'exposition constitués de nourriture réhydratée avec les eaux usées brutes sans aucun prétraitement. Le suivi des individus a lieu jusqu'à leur émergence. Cinq réplicats au minimum sont réalisés par échantillons d'eaux usées pour le suivi des paramètres macroscopiques. Pour l'analyse de l'expression des gènes, trois réplicats d'une dizaine de larves pour chacun sont réalisés par conditions.

De nouveaux paramètres ont été analysés : la taille des pupes et la fertilité des femelles qui illustre la composante reproduction. La taille des pupes a été mesurée à l'aide d'un logiciel de traitement d'images (Image J) pour certains individus exposés à un échantillon d'eaux usées apparaissant comme très toxique. Et la fertilité des femelles correspond dans ces expériences aux nombres d'œufs pondus en une journée. Les jeunes adultes sont placés dans des milieux non contaminés pendant 48H-72H, le temps d'atteindre la maturité sexuelle et de s'accoupler. Puis, ils sont placés dans les mêmes dispositifs de ponte durant 24H et les œufs sur chaque support gélosé sont comptés après ce laps de temps.

Problèmes liés à la charge bactérienne des eaux usées

Dans ces expériences, les eaux usées sont testées telles quelles sur Drosophila melanogaster. Or, elles contiennent un certain nombre de microorganismes qui peuvent être pathogènes. Lors de la conception du protocole, plusieurs essais avaient été menés en présence d'antibiotiques (pénicilline, streptomycine, ampicilline et amphotéricine B). La filtration des eaux usées ou la décantation n'était pas envisageable en raison du changement de nature des eaux usées et le risque de perte de polluants adsorbés sur les particules. Cependant les antibiotiques se sont avérés toxiques pour les larves et ont été exclus du protocole. Sans antibiotique ni traitement des microorganismes, l'évolution du milieu semble stable ; pas d'évolution de la couleur ni de la texture du milieu en présence des larves, ce qui pourrait indiquer un effet limité de ce paramètre. Néanmoins, il reste plausible que les effets toxiques soient liés à la présence de ces microorganismes ; c'est aussi la raison pour laquelle des marqueurs moléculaires du système immunitaire ont été suivis.

A. Caractérisation toxicologique des eaux usées brutes de la campagne 2018

Bref rappel de la campagne de prélèvements 2018

Nous avons étudié des prélèvements d'eaux usées sur trois communes limitrophes du territoire, Saint-Ouen l'Aumône, Eragny et Neuville-sur-Oise, identifiées comme émettrices de polluants lors de la campagne 2017 (cf chapitre II, page 94). La nature des eaux usées des ces sites était majoritairement industrielle et mixte à dominante industrielle.

A.1. Phénotypes macroscopiques

A.1.1. Mortalité

La mortalité n'est pas systématiquement observée en présence des eaux usées. Lorsqu'elle est observée, elle peut être significativement augmentée (valeurs en rouge, **Figure IV-26**) ou, curieusement, être significativement diminuée (valeurs en bleu**, Figure IV-26**).

		C	SOA-2	SOA-1	SOA-3	SOA-4	SOA-7	SOA-5	SOA-6	ERA-1	ERA-2	NSO-1	NSO-2
Mortalité	Stades larvaires	13,74% (± 9,32)	5,54%*** (± 6,88)	6,42%*** (± 6,21)	3,95%*** (± 4,42)	6,27%*** (± 6,71)	5,10%*** (± 4,70)	11,39% (± 6,90)	72,40%*** (± 24,08)	6,50%*** (± 4,98)	7,33%*** (± 4,09)	5,24%*** (± 5,21)	7,16%*** (± 4,77)
	Stade pupal	1,53% (± 3,05)	0,12%** (± 0,49)	1,71% (± 3,18)	0,56% (± 0,93)	0,26%** (± 0,62)	0,65% (± 1,97)	7,33%*** (± 5,12)	27,60%***	2,45% (± 3,40)	0,98% (± 2,84)	0,49%* (± 0,86)	0,14%* (± 0,52)
Temps de développement													
	Durée moyenne des stades larvaires (*jours*)	6,05 (± 0,48)	5,90 (± 0,26)	6,23 (± 0,34)	6,44 (± 0,30)	6,29 (± 0,60)	6,74 (± 0,57)	7,48*** (± 0,60)	7,30** (± 0,58)	7,23** (± 0,41)	7,59*** (± 0,40)	7,39*** (± 0,46)	7,39*** (± 0,75)
	Durée moyenne du stade pupal (*jours*)	4,91 (± 0,40)	4,99 (± 0,22)	4,75 (± 0,24)	4,59 (± 0,24)	4,62 (± 0,45)	4,68 (± 0,48)	*NC*	*NC*	4,57 (± 0,36)	4,79 (± 0,27)	4,91 (± 0,26)	4,96 (± 0,43)
Taille de la pupe	(*millimètres*)	3,16 (± 0,16)	-	-	-	-	-	-	2,38*** (± 0,14)	-	-	-	-
Sex-ratio	Mâle	47,65% (± 11,49)	48,39% (± 7,97)	51,02% (± 6,89)	49,92% (± 6,25)	48,66% (± 8,78)	52,48% (± 5,88)	*NC*	*NC*	52,45% (± 8,91)	48,48% (± 7,39)	48,27% (± 7,58)	48,42% (± 5,16)
	Femelle	52,35%	51,61%	48,98%	50,08%	51,34%	47,52%	*NC*	*NC*	47,55%	51,52%	51,73%	51,58%

Figure IV-26. *Effets des eaux usées de la campagne 2018 sur Drosophila melanogaster. Les échantillons d'eaux usées peuvent être répartis en trois groupes en fonction de l'intensité des effets toxiques mesurés chez les individus exposés. L'origine des eaux usées est indiquée par le code couleur suivant : ● industrielle, ● mixte à dominante industrielle, ● mixte à dominante domestique, ● mixte. P <0,05, **: P <0,01, ***: P <0,001 et ± écart type. La significativité des courbes de pupaison repose sur des régressions calculées par le test de gehan breslow wilcoxon et comparées avec le groupe contrôle. (C : contrôle ; SOA : Saint-Ouen l'Aumône ; ERA : Eragny ; NSO : Neuville-sur-Oise).*

Les eaux usées mixtes à dominante industrielle échantillonnées au point SOA-5 n'ont pas eu d'incidence sur la mortalité des larves mais ont induit la mortalité des pupes (7,33%) (**Figure IV-26**). Les pupes restantes ont donné de jeunes adultes qui sont morts rapidement après l'émergence en restant collés au milieu nutritif. Ce même phénotype avait été observé à la suite d'une exposition au mercure à 5 mg/L (cf chapitre III – B) et avait été interprété comme un signe potentiel d'une déficience locomotrice. Les eaux usées SOA-6 également d'origine industrielle ont induit un très fort taux de mortalité chez les larves (72,40%) et les pupes (27,60%) (**Figure IV-26**). Grâce à la cartographie, nous avons repéré qu'au point SOA-6 était présente une industrie de traitement de solvants. Nous savons que cette dernière n'est pas toujours conforme à son autorisation de déversement et peut rejeter notamment de nombreux AOX, tensio-actifs, solvants et autres matières toxiques expliquant ces résultats. C'est d'ailleurs ce qu'avait révélé la physico-chimie (nonyphénol, AOX, métaux lourds). Au point SOA-5, sont récupérées les eaux usées industrielles de SOA-6 ainsi qu'un apport important en provenance du grand bassin de Saint-Ouen l'Aumône. Les résultats physico-chimiques indiquaient une dilution des AOX et des métaux à ce point. Par ailleurs, seulement le cuivre apparaissait significatif. Il semble donc que d'autres substances non mesurées ou que des effets cocktails ont médié la toxicité des eaux usées.

L'exposition aux eaux usées des points SOA-2, -4, NSO-1, -2 a provoqué une diminution de la mortalité larvaire par deux en moyenne et une diminution de la mortalité pupale par rapport aux animaux non exposés (**Figure IV-26**). Cette baisse de mortalité peut apparaître surprenante puisque les eaux usées brutes contiennent une part de matières nocives (Bergé et al., 2014; Deblonde et al., 2011; Rule et al., 2006; Sánchez-Avila et al., 2009). Rares sont les études qui se penchent sur la toxicité des eaux usées dans les réseaux d'assainissement. Le plus souvent il s'agit d'évaluer le rendement des STEU (Yu et al., 2019). Les résultats de ces tests montrent une large variété d'effets sur la mortalité des organismes testés. Ainsi, par exemple, une étude sur les eaux usées de STEU sur une culture d'algues a montré que la mortalité n'était pas dose dépendante (Harbi et al., 2017; Libralato et al., 2016). Des études utilisant des modèles gastéropodes, *Potamopyrgus antipodarum et Lymnaea stagnalis* ont montré que des eaux traitées n'affectaient pas la survie des individus (Boisseaux et al., 2018; Gust et al., 2010). Ainsi, ces études mettent en avant la variabilité des effet létaux des eaux usées et des eaux traitées qui pourrait être expliquer par la capacité de détoxication des organismes (Kraus et al., 2014; Nickla et al., 1983), des effets inhibiteurs ou synergiques des polluants en mélange (Altenburger et al., 2018) mais aussi la présence non négligeable de nutriments dans les eaux usées brutes (Gorini et al., 2014).

Les faibles concentrations de polluants dans les eaux usées de l'ordre du µg/L ou et du ng/L (cf. chapitre II) pourraient aussi induire des effets hormétiques entraînant une stimulation des défenses des organismes et un maintien de leur homéostasie (Calabrese et al., 2015).

A.1.2. Durée du développement

Les durées moyennes de développement des stades larvaires n'ont pas été affectées par les eaux usées des points SOA-1 à -4 et -7 tandis que ces durées ont augmenté d'environ 1,5 jours en moyenne pour les autres (SOA-5, -6, ERA-1, -2, NSO-1, -2) (**Figure IV-26**). Les durées moyennes de la métamorphose n'ont jamais été affectées.

En s'intéressant plus en détail aux courbes de transition larves-pupes, les eaux usées n'ont pas toutes eu les mêmes effets et peuvent être classées en trois groupes (**Figure IV-26**). Les eaux usées prélevées à SOA-2 n'ont pas perturbé le développement des individus (1er groupe sans effet). Les eaux usées SOA-1 à -4 et SOA-7 qui n'avaient pas eu d'effets significatifs sur la durée moyenne des stades larvaires ont retardé l'entrée en pupe des larves (2nd groupe avec « faibles effets »). Enfin, les eaux usées des points SOA-5, -6, ERA-1, -2, NSO-1, -2, ont eu les effets les plus forts retardant l'entrée en pupe des larves et présentant des courbes de pupaison fortement décalées de celles des animaux non exposés (3ème groupe avec « forts effets ») (**Figure IV-26**).

Ces retards de développement pourraient être liés à une perturbation endocrinienne induite par des substances présentes dans les eaux. En effet, comme indiqué dans les chapitres précédents, le développement de *D. melanogaster* est sous régulation hormonale (Jindra et al., 2013). Les travaux de Gust et al. (2010) ont montré des perturbations des taux d'hormones à la suite d'une exposition à des eaux contaminées par des rejets de STEU, chez le gastéropode *Potamopyrgus antipodarum*. Les eaux usées brutes contenaient plusieurs molécules connues pour être des perturbateurs endocriniens (DEHP, nonylphénol...) pouvant étayer cette hypothèse. Et hormis ces molécules qui ont fait l'objet d'un dosage, les eaux usées pourraient contenir d'autres substances non recherchées induisant une perturbation endocrinienne. Aussi, il n'est pas négligeable qu'un effet toxique global d'un ou plusieurs polluants ou du mélange des eaux usées puisse impacter la durée du développement. Ce type de résultat a également été observé dans nos précédentes expériences (cf chapitre III).

A.1.3. Taille de la pupe

La taille de la pupe n'était pas un paramètre systématiquement suivi. Lors des expériences, les pupes exposées aux eaux usées du point SOA-6 apparaissaient très petites. La taille des pupes de ces animaux a ainsi été mesurée et elle était en moyenne de 2,38 mm contre 3,16 mm pour les animaux non exposés, soit une diminution de 25% de la taille (**Figure IV-26**). Cette diminution est de nouveau la traduction d'un effet toxique fort des eaux usées sur le développement. Parmi les molécules présentes dans cet échantillon, le nonylphénol et les métaux lourds ont été montré comme induisant du nanisme, des malformations des ailes et du corps chez plusieurs insectes, comme *Sesamia nonagrioides*, *Chironomus riparius* et *Calliphora vicina* (Kontogiannatos et al., 2015; Meregalli et al., 2001; Shulman et al., 2017). Les travaux de Planelló et al. (2013) ont également montré que des eaux de surface contaminées par des rejets d'eaux usées brutes ont induit des malformations du rostre chez le chironome. Ces observations étaient corrélées à la présence d'alkylphénols, de pesticides, de produits pharmaceutiques et de métaux dans ces eaux. Dans les eaux usées, un effet de ces substances ou du mélange de celles-ci pourrait expliquer ces observations. Quoi qu'il en soit, la taille de la pupe pourrait s'avérer être un élément pertinent dans l'évaluation de la toxicité des eaux usées.

A.1.4. Sex-ratio

Le sex-ratio est resté inchangé dans toutes les conditions (**Figure IV-26**) et il n'y a pas eu de déséquilibre de la mortalité en faveur d'un des deux sexes. Ce résultat rejoint ceux observés dans les études précédentes à la suite d'une exposition de substances toxiques seules et en mélange (cf chapitre III).

A.2. Cibles moléculaires

Les premières analyses ont porté sur quelques échantillons afin d'obtenir des résultats préliminaires sur les niveaux d'expressions des gènes étudiés précédemment en conditions contrôlées (cf chapitre III). Nous avons ainsi choisi les points SOA-1 à -4, permettant le suivi d'un effluent sur un même linéaire (**Figure II-14**, chapitre II page 94) et SOA-5 et -6, qui présentaient des résultats toxicologiques marquants.

Les premiers résultats des marqueurs moléculaires sur les eaux usées de 2018 ont montré que peu d'entre eux ont été dérégulés. Le manque de significativité statistique est pour beaucoup expliqué par une très forte variabilité entre les échantillons, que nous n'avons pas pu expliquer à ce jour (**Figure IV-27**).

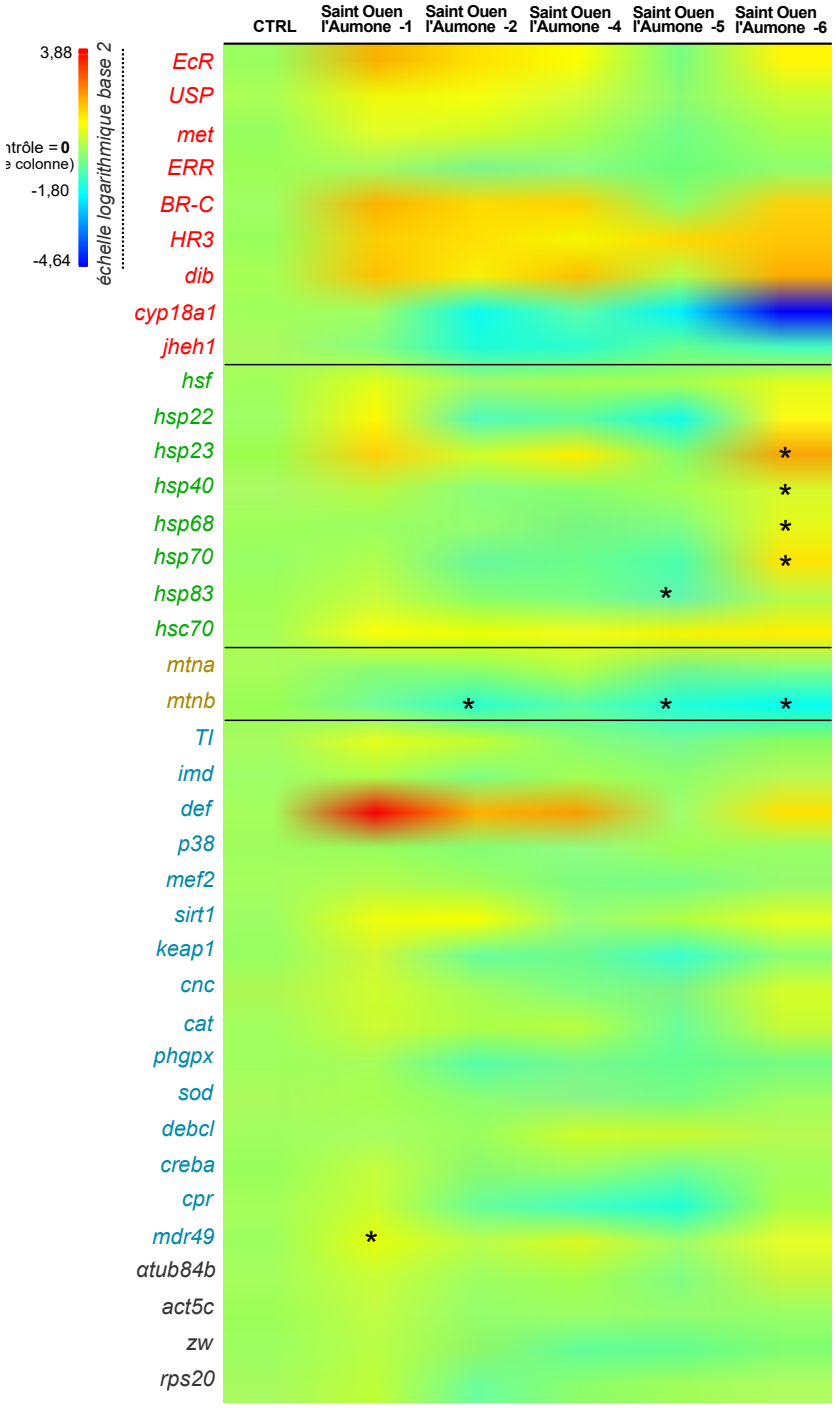


Figure IV-27. *Heat map représentant les niveaux d'expression de plusieurs gènes chez D. melanogaster après exposition aux eaux usées. Cette représentation montre l'expression moyenne normalisée (MNE) des gènes cibles, normalisée au gène de référence pgk (n = 9, trois répétitions biologiques en trois temps). Les MNE sont centrées sur le groupe témoin (contrôle = 1) et transformées en échelle logarithmique base 2 (log (contrôle) = 0). Le code couleur permet d'évaluer l'amplitude de variation en accord avec l'échelle centrée sur le groupe contrôle. C = contrôle. Les astérisques (*) indiquent des différences significatives entre les MNE par rapport au groupe témoin dès que P < 0,05.*

Les eaux usées du point SOA-6 ont augmenté l'expression des gènes *hsp23* (4,4-fold, P<0.05), *hsp40* (1,5-fold, P<0.05), *hsp68* (1,7-fold, P<0.001), et *hsp70* (2,7-fold, P<0.05) tandis que les eaux usées du point SOA-5 ont induit une baisse d'expression de *hsp83* (1,8-fold, P<0.01) par rapport au groupe contrôle (**Figure IV-27**). Plusieurs auteurs ont montré l'induction d'HSPs tels que l'*hsp70* chez le chironome (*Chironomus riparius*) et deux espèces de poissons (*Oryzias melastigma et Oncorhynchus mykiss*) après exposition à des eaux de surface contaminées par des eaux usées (Chen et al., 2016; Ings et al., 2012; Planelló et al., 2013). Ces résultats montraient donc que les individus ont subi un stress à la suite d'une exposition aux eaux usées.

Le gène *mtnb*, une des métallothionéines permettant de lutter principalement contre le stress métallique (Balamurugan et al., 2004) a vu son expression diminuer après expositions aux eaux usées des points SOA-2 (2,3-fold, P<0.01), SOA-5 (2,5-fold, P<0.01), SOA-6 (3,3-fold, P<0.001) (**Figure IV-27**). Dans l'ensemble des échantillons, nous avons pu mesurer plusieurs métaux tels que le fer, le cuivre le zinc, les trois métaux les plus concentrés mais aussi du plomb, du nickel, du cadmium et du mercure, du manganèse et du titane, qui ont pu être ingérés par les larves de drosophile. Et, le cuivre et le zinc ont été identifiés comme de bons inducteurs des métallothionéines (Amiard et al., 2006) de même que le cadmium dans nos expériences (cf chapitre – B). Si les métaux ont été liés par les métallothionéines, une boucle de rétrocontrôle négative s'opère alors et inactive la transcription des gènes (Egli et al., 2006).

Enfin, le transporteur ABC *mdr49* a vu son expression augmenter à la suite d'une exposition aux eaux usées du point SOA-1 (1,7-fold, P<0.05). Nous avons pu montrer précédemment que l'expression de ce transporteur impliqué dans la détoxication des cellules (Tapadia et Lakhotia, 2005) était plus forte après une exposition au bisphénol A et au benzo(a)pyrène (cf chapitre III – B et C). Cependant ces deux composés n'ont pas été quantifiés dans ces eaux usées mais d'autres composés toxiques ou un effet de mélange pourraient contribuer à l'induction de ce type de transporteurs afin d'éviter la mort cellulaire.

Dans cette expérience, la majorité des gènes ayant subi une modification étaient des chaperonnes suite à l'exposition des eaux usées du point SOA-6. Ces modifications indiquant un stress sont corrélées avec la forte toxicité observée à l'échelle de l'individu. Néanmoins, l'absence de modulations des gènes dans les autres conditions ne signifie pas une absence de toxicité. Il est possible que les gènes aient retrouvés un niveau basal d'ex-

pression après la lutte contre des substances toxiques, hypothèse soutenue au chapitre III. Durant l'échantillonnage, plusieurs difficultés s'étaient présentées en raison du nombre d'eaux usées à tester et des réplications à obtenir. Ces échantillonnages ont dû être étalés dans le temps et réalisés en plusieurs fois. Ainsi, les échantillons d'eaux usées ont pu sédimenter entre les différents réplicats, pouvant ainsi changer de nature et donc de toxicité et expliquer une partie de la variabilité des résultats, outre la variabilité biologique.

Conclusion

Les marqueurs phénotypiques étudiés au chapitre précédent ont permis ici de discriminer les échantillons d'eaux usées entre eux. Les résultats ont aussi montré que la mortalité n'est pas systématiquement induite, elle est même parfois diminuée. Cette observation indique alors que les eaux usées brutes ne sont pas hautement toxiques, tout du moins pour la drosophile. La plupart des eaux usées ont néanmoins provoqué des retards de développement des larves plus ou moins importants selon les échantillons. De plus, nous avons pu caractériser un nouvel effet sur la taille des pupes (réduction), paramètre qui pourra être pris en compte dans le futur pour l'évaluation de la toxicité des eaux usées. Au niveau moléculaire, peu de modifications significatives ont pu être observées. Quelques marqueurs du stress (protéines chaperonnes et métallothionéines) ont cependant été induits et sous exprimés selon les conditions. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour établir un rôle et une utilité précise des marqueurs moléculaires dans ce type d'étude.

Que traduisent les résultats de toxicité en termes de sources d'émission de substances toxiques sur le périmètre étudié (Figure II-14, chapitre II page 94)

A Saint-Ouen l'Aumône, des effets toxiques sont mesurés sur SOA-1 mais disparaissent en arrivant à SOA-2, laissant supposer une dilution des matières toxiques entre les deux points. En arrivant plus à l'aval du réseau (SOA-3 et -4), des effets toxiques sont de nouveau mesurés ce qui suggère ici une émission de substances toxiques sur cette portion. Quant aux point SOA-5 et SOA-6, ils présentaient les résultats toxiques les plus forts et sont donc considérés comme des secteurs prioritaires sur lesquels enquêter. A Eragny, les eaux usées du bassin de

collecte étudié et de son sous-bassin (ERA-1 et -2) expriment une toxicité très similaire entre elles suggérant l'homogénéité des émissions polluantes sur ce secteur. De nouvelles investigations sont donc nécessaires pour cibler précisément l'endroit d'où pourraient provenir ces dernières. Enfin à Neuville-sur-Oise, les rejets de l'université s'avéraient plutôt toxiques bien que les résultats de la chimie analytique montraient peu de micropolluants présents.

Il est donc possible de tracer la toxicité des effluents au sein du réseau d'assainissement, en particulier lorsque le linéaire est bien défini. De plus, des rejets assimilés domestiques comme ceux de l'université peuvent également être toxiques en comparaison de rejets industriels. Le territoire étant vaste, il est important de hiérarchiser les secteurs selon leur priorité. Ainsi, ceux de SOA-6 et -5 sont classés en tête de liste. Les sources d'émission polluante et la nature de ces émissions restent encore à identifier. Aussi, si l'on met en perspective les résultats de la chimie et de la toxicologie, la significativité des paramètres physico-chimiques selon la réglementation (arrêté du 12 août 2016) ne semble pas concorder avec la toxicité mesurée à certains points du réseau d'assainissement (ex. SOA-2).

B. Caractérisation toxicologique des eaux usées brutes de la campagne 2019

L'objectif de cette sous-partie est de rassembler l'ensemble des éléments méthodologiques et des analyses afin d'obtenir une vision d'ensemble sur la caractérisation d'eaux usées avec les approches utilisées et développées au cours de ces travaux.

Bref rappel sur la campagne de prélèvements 2019
Nous avons entrepris d'étudier une branche du réseau d'assainissement sur un périmètre géographique étroit afin de suivre la toxicité d'effluents d'origines variées (domestique et industrielle) qui viennent ensuite à se mélanger dans le réseau d'assainissement. La commune de Boissy l'Aillerie a été sélectionnée pour la configuration du réseau adaptée à cet objectif et qui plus est, avait été identifiée comme « prioritaire » en 2017. Quatre points de mesures permettant d'échantillonner des eaux usées industrielles, domestiques et mixtes à dominante domestique ont été choisis (Figure II-15, page 97 et figure IV-28 ci après).

Caractérisation et toxicité d'eaux usées domestiques et industrielles

Laëtitia FRAT[1,2], Thomas CHERTEMPS[2], Élise PESCE[2], Françoise BOZZOLAN[2], Didier MOERS[1], David SIAUSSAT[2]

[1] *Syndicat Intercommunal pour l'Assainissement de la Région de Pontoise (SIARP), 95000 Pontoise, France*
[2] *Sorbonne Université, INRA, CNRS, IRD, UPEC, Institut d'Ecologie et des Sciences de l'Environnement de Paris (iEES-Paris), F75005 Paris, France*

Corresponding author:
Institut d'Ecologie et Sciences de l'Environnement de Paris – Département Ecologie Sensorielle
Email address: david.siaussat@sorbonne-universite.fr
Present address: Sorbonne Université, 4 place Jussieu, Campus Pierre et Marie Curie – Tours 44-45, 3ème étage, boite courrier 237, 75005 Paris (France)

Résumé :

Les eaux usées représentent une source majeure de contamination des plans d'eau. Si elles ne sont pas bien traitées lors de la phase d'épuration au sein des stations de traitements des eaux usées (STEU), les rejets de ces dernières peuvent avoir des conséquences néfastes sur l'environnement en raison de la présence de substances dangereuses non éliminées. Ainsi la recherche des sources de pollutions à l'amont de ces rejets, dans les réseaux d'assainissement, est cruciale pour réduire la présence de ces substances chimiques et ainsi limiter la contamination de l'environnement. Pour rechercher ces substances dans un réseau d'assainissement, la chimie analytique est un outil robuste mais qui peut présenter certaines limites. Ainsi, nous avons caractérisé nos eaux usées brutes par cette approche couplée à des mesures de toxicité permettant de compléter le diagnostic sur la présence de substances dangereuses. Nous avons suivi le développement de *Drosophila melanogaster* ainsi que des cibles moléculaires pouvant servir de marqueurs précoces d'effet ou d'exposition. Les résultats ont indiqué que les eaux usées d'origines industrielles du secteur étudié apparaissent comme plus toxiques que les eaux usées domestiques. Certains marqueurs moléculaires du stress et de la détoxication ont été fortement régulés à la suite des expositions aux eaux usées. Les résultats physico-chimiques n'évoluaient pas toujours dans une même perspective avec la toxicité mesurée. Le bioessai mis en place dans ces expériences semble prometteur pour identifier des secteurs émetteurs de substances toxiques dans le réseau d'assainissement.

Mots clés :

eaux usées, toxicité, micropolluants, réseau d'assainissement, bioessai, insecte

1. Introduction

Les eaux usées représentent une source importante de contamination du milieu aquatique et terrestre (Caballero-Gallardo et al., 2016; Ghanem et al., 2007). En effet, elles transportent une importante quantité de substances toxiques rejetées dans les réseaux d'assainissement des secteurs industriels et/ou domestiques (Marttinen et al., 2003). Certaines de ces substances ne sont pas toujours correctement éliminées par les stations de traitements des eaux usées (STEU) et passent au travers des traitements épuratoires (Das et al., 2016; Rogowska et al., 2019). Une fois dans l'environnement, ces molécules peuvent induire divers effets toxiques comme la mortalité, le développement de maladies, des dérèglements des systèmes endocrinien et reproducteur, du stress oxydatif, etc. Et cette toxicité peut être augmentée du fait des effets cocktails, car les eaux usées sont par définition un mélange de polluants (Hernando et al., 2005; König et al., 2017; Pottinger et Matthiessen, 2016; UNESCO, 2017). Pour toutes ces raisons, il est crucial de déterminer les sources d'émission de ces substances dans les réseaux d'assainissement et de les réduire.

Pour la protection du milieu aquatique, l'adoption et la mise à jour régulière de la Directive Européenne Cadre sur l'Eau (DCE) (UE, 2013) permettent d'établir une liste de substances prioritaires à rechercher dans les eaux de surface, souterraines et marines (hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), phtalates, pesticides, polychlorobiphényles (PCB), métaux lourds...). En lien avec cette directive, de nouvelles réglementations ont été mises en place dans certains pays européens pour mieux maîtriser les pollutions des réseaux d'assainissement. Ainsi, les eaux usées ont fait l'objet de programmes d'analyses physico-chimiques pour définir des normes de qualité et *in fine* limiter (1) les dysfonctionnements auto-épuratoires de la STEU et (2) le rejet de substances toxiques vers les eaux de surface. En France et depuis 2015, les gestionnaires de réseaux d'assainissement et de STEU doivent s'assurer du bon fonctionnement des systèmes d'assainissement. Depuis 2016, ces mêmes gestionnaires doivent rechercher et identifier les sources d'émissions polluantes dans leur réseau d'assainissement (FR, 2016). Cette recherche dite « en amont » (diagnostic amont) est indispensable pour protéger la ressource en eau à long terme (Bowles et al., 2015).

Pour évaluer la charge polluante d'une eau usée, des indices globaux de pollution de type demande chimique et biologique en oxygène (DCO et DBO_5), azote Kjeldahl total (NTK) et les matières en suspension (MES) sont couramment mesurés. Ces paramètres donnent des indications sur le caractère domestique ou industriel des eaux usées puisqu'en fonction de cette origine, les valeurs de ces indicateurs oscillent à des niveaux de concentrations différents (Bergé et al., 2014). Mais en raison de la difficulté

de corréler cette charge polluante à la présence de substances toxiques ou micropolluants (Vasquez et Fatta-Kassinos, 2013), des mesures physico-chimiques supplémentaires ciblées de ces substances sont indispensables. La chimie analytique requiert des précautions d'application comme établir une stratégie de prélèvements optimale et faire attention aux matériaux utilisés pour éviter toutes contaminations, etc. (Ort et al., 2010). De plus, elle ne permet pas une évaluation exhaustive des substances présentes ni d'évaluer la toxicité. De ce fait, les analyses physico-chimiques doivent être couplées à des bioessais (Kortenkamp et Faust, 2018; Vasquez et Fatta-Kassinos, 2013). Ces outils sont disponibles pour le suivi des pollutions en milieu naturel ou l'étude des rejets d'eaux traitées mais ils ne sont pas nécessairement adaptés pour les eaux usées brutes.

Ainsi, l'objectif de cette étude est de proposer un nouvel outil pour évaluer la toxicité des eaux usées brutes en plus de la réalisation d'analyses physico-chimiques pour quantifier les micropolluants. Nous avons ainsi suivi un linéaire de réseau d'assainissement où s'écoulent des effluents d'eaux d'origine industrielle et domestique. *Drosophila melanogaster* a été choisie pour réaliser un bioessai de toxicité. Ce modèle a été montré comme pertinent dans de précédentes études pour évaluer la toxicité de polluants seuls ou en mélange (cf chapitre III). Ce modèle a également été utilisé avec succès pour tester la génotoxicité d'eaux usées (Do Amaral et al., 2005). Nous avons suivi différents paramètres tels que la mortalité, le temps de développement, le sex-ratio et la fertilité des femelles. Et nous avons aussi choisi d'étudier le niveau d'expression de 38 gènes clés impliqués dans des voies de signalisation diverses (développement, stress, immunité). Certains de ces gènes pourraient être utilisés à terme comme biomarqueurs précoces d'exposition ou d'effet tout en apportant des réponses sur les effets des eaux usées à l'échelle moléculaire.

2. Matériels et méthodes

2.1. Collecte d'échantillons d'eaux usées et analyses physico-chimiques

Des échantillons d'eaux usées industrielles, domestiques et mixtes à dominante domestique ont été collectés en quatre points du réseau d'assainissement de la commune rurale de Boissy l'Aillerie (1 800 habitants, région Île-de-France, France) (**Figure IV-28**). Le réseau d'assainissement est séparatif et les eaux usées de la commune rejoignent la station d'épuration de Cergy-Neuville à plusieurs dizaines de kilomètres à l'aval. Le premier point BOI-1 est situé au point de convergence des eaux usées du grand secteur industriel nord (bleu, **Figure IV-28**). Des activités industrielles de métallurgie, fabrication de peintures, vernis et lubrifiants, mécanique automobile,

sérigraphie, transformation du plastique ont été identifiées. Le deuxième point BOI-2 permet de collecter des eaux usées strictement domestiques (jaune, **Figure IV-28**). Enfin, nous avons choisi deux points, BOI-3 et BOI-4 qui représentent le mélange des effluents industriels et domestiques : l'un à la zone de mélange (BOI-3) et le second à l'aval (BOI-4) avec un apport d'eaux usées domestiques majoritaire (vert, **Figure IV-28**).

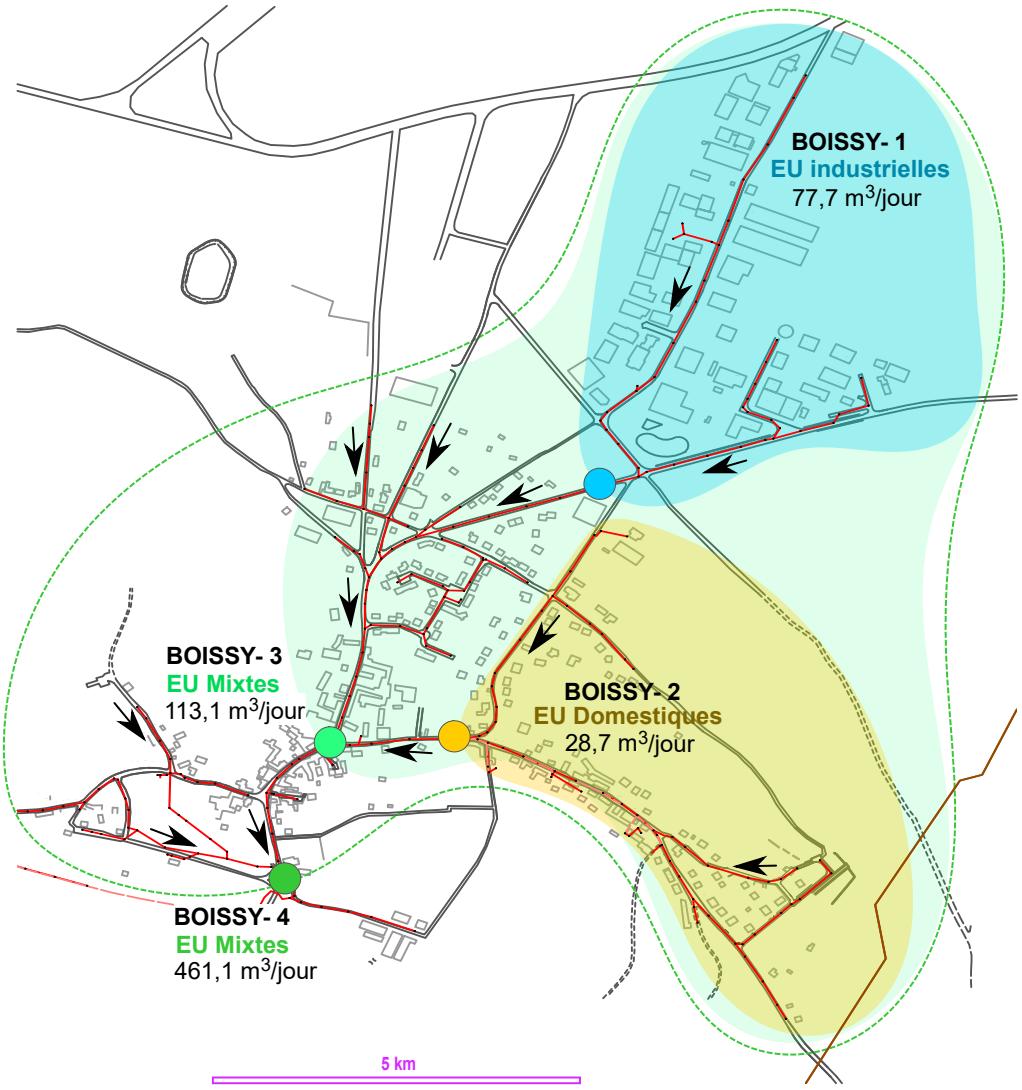


Figure IV-28. *Carte de prélèvements des eaux usées récoltées du 25 au 26 juin 2019 sur la commune de Boissy l'Aillerie. Le réseau d'assainissement est représenté en rouge. Le code couleur permet d'identifier l'origine des eaux usées (bleu : industrielle, jaune : domestique, vert : mixte à dominante domestique). Les flèches indiquent le sens de l'écoulement des eaux usées et les chiffres indiquent les débits moyens journaliers enregistrés lors des prélèvements au niveau des sites étudiés. (BOI : Boissy l'Aillerie, WW : wastewaters).*

La collecte des eaux usées a été réalisée par la société accréditée Kalitéo' (Gasny, France) du 25 au 26 juin 2019 dans le réseau d'assainissement. Des préleveurs automatiques réfrigérés ISCO 3700 contenant vingt-quatre flacons ont été posés dans le réseau d'assainissement. Ils ont été programmés pour collecter un flacon d'eaux usées par heure

pendant 24H en fonction du débit. Un échantillon moyen de la journée est ensuite reconstitué de manière proportionnelle au débit enregistré à chaque site. Cet échantillon moyen à été homogéneisé et réparti entre notre laboratoire pour les tests de toxicité et le laboratoire Eurofins Scientific Est SAS (Maxeville) accrédité pour les analyses physico-chimiques. Ces analyses ont porté sur les paramètres globaux (NTK, DCO, DBO_5, MES, phosphore, pH), et des micropolluants (HAPs, métaux, pesticides, perturbateur endocrinien (EDCs), PCBs, polybromodiphényléthers (PBDEs), chloroforme, dichlorométhane, tributylétain), des indices globaux de pollutions des phénols (indice phénols) et des halogènes organiques adsorbables (AOX) (**Tableau IV-9**). Ces analyses ont été réalisées conformément aux normes analytiques européennes et françaises ou via des méthodes de haute performance telles que la chromatographie en phase gazeuse ou liquide (**Tableau IV-9**). Le laboratoire Eurofins Scientific Est SAS a réalisé toutes les étapes depuis le prétraitement des échantillons jusqu'à l'analyse finale des fractions dissoutes et particulaires et le calcul de la fraction totale.

Famille	Composé	Norme	Technique
Paramètre globaux	**Demande biologique en oxygène (DBO5)**	NF EN 1899-1	Dilution et inoculation avec ajout d'allylthiourée
	Demande chimique en oxygène (DCO)	ISO 15705	Titrimétrie
	pH	NF EN ISO 10523	Potentiométrie
	Azote total Kjeldahl (TKN)	NF EN 25663	Minéralisation au sélénium
	Matières en suspension (MES)	NF EN 872	Filtration sur filtre en fibre de verre
	Volume journalier	NF X10.311	débitmètre
Alkylphénols	**Nonylphénols** **Nonylphénols monoéthoxylate (NP1OE)** **Nonylphénols diéthoxylate (NP2OE)** **Octylphénols** **Octylphénols monoéthoxylate (OP1OE)** **Octylphénols diéthoxylate (OP2OE)**	-	Chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS)
Bisphénols	**Bisphénol A**	-	Chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS)
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)	**Benzo(a)pyrène** **Benzo(b)fluoranthène** **Benzo(g,h,i)perylène** **Benzo(k)fluoranthène** **Fluoranthène** **Indéno (1,2,3-cd)pyrène**	NF EN ISO 17993	Chromatographie liquide haute performance (HPLC) et détection par fluorescence
Métaux	**Arsenic (As)** **Cadmium (Cd)** **Chrome (Cr)** **Cuivre (Cu)** **Mercure (Hg)** **Nickel (Ni)** **Plomb (Pb)** **Titane (Ti)** **Zinc (Zn)**	NF EN ISO 11885	Spectroscopie d'émission optique par plasma induit à haute fréquence (ICP-OES)
Pesticides	**Cyperméthrine**	-	Chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse en tandem (GC/MS/MS)
	Glyphosate	-	Chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS)
Phtalates	**DEHP**	-	Chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse en tandem (GC/MS/MS)
Polychlorobiphényles	**PCB (028, 052, 101, 118, 138, 153, 180)**	-	Chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse en tandem (GC/MS/MS)
Polybromodiphényléthers	**PBDE (028, 047, 099, 100, 153, 154, 183, 209)**	-	Chromatographie gazeuse, ionisation chimique négative et spectrométrie de masse en tandem (GC/NCI/MS)
Autres substances	**Acide sulfonique de perfluorooctane (PFOS)**	-	Chromatographie liquide et spectrométrie de masse en tandem (LC/MS/MS)
	Halogène organique adsorbable(AOX)	NF EN ISO 9562	Colométrie (Adsorption, Combustion)
	Chloroforme	NF EN ISO 10301	Chromatographie gazeuse
	Dichlorométhane	-	Chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse en tandem (GC/MS/MS)
	Indice Phénol	NF EN ISO 14402	Analyses de flux en continu
	Tributylétain cation	-	Chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse (GC/MS)

Tableau IV-9. *Paramètres analysés et méthodes utilisées par le laboratoire Eurofins Scientific Est SAS pour les analyses d'eaux usées.*

2.2. Elevage des insectes, traitement aux eaux usées et mesures toxicologiques

La souche Canton-S de *D.melanogaster* a été élevée sur un milieu standard pour drosophile (farine de maïs, gélose, sucre, levure et eau) à 25°C ± 1°C, 60% -80% d'humidité et 12h:12h cycle lumière/obscurité . Les œufs ont été collectés après 20H de ponte sur des supports gélosés supplémentés en jus de raisin et sucre (2%). Chaque support avec environ 45 œufs a été transféré dans des flacons contenant 2g de milieu Nutri Fly Instant (GENESEE, France) réhydratés avec 8 mL d'eau minérale (eau de bouteille *Cristalin*e) ou d'eaux usées brutes correspondant au jour 0 de l'expérience. Le taux de survie et la durée des stades de développement ont été enregistrés quotidiennement pendant le développement post-embryonnaire jusqu'à ce que tous les individus émergent ou meurent. Quatre à cinq réplicats ont été réalisés par conditions. Les jeunes adultes fraîchement émergés ont été sexués puis placés pendant 48H à 72H sur le milieu conventionnel pour drosophile afin d'atteindre la maturité sexuelle et être capable de se reproduire. Huit couples d'individus par conditions ont été placés dans le même dispositif de ponte que précédemment, sur un milieu d'agar supplémenté de jus de raisin et de sucre. La fertilité des femelles a ensuite été évalué par le nombre d'œufs pondus en 24H et ces expériences ont été répétées quatre fois par conditions.

2.3. Extraction des ARN totaux des insectes et synthèse des brins d'ADNc en vue d'analyse par qPCR

Des larves (témoins ou exposées) ont été échantillonnées quatre jours après la ponte et stockées à -80°C jusqu'à l'extraction totale des ARN par la méthode TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) couplée à l'extraction du kit RNAeasy (Qiagen, USA). La qualité des ARN a été vérifiée par spectrophotométrie (BioPhotometer, Eppendorf, Hambourg, Allemagne) et un traitement à la DNase I (Roche, États-Unis) a été effectué conformément aux instructions du fabricant. Les ADNc ont été synthétisés à partir de 5 µg d'ARN à l'aide de la transcriptase inverse Superscript II (Invitrogen). Pour chaque condition expérimentale, trois répétitions biologiques constituées d'une dizaine de larves ont été effectuées.

2.4. PCR et qPCR

L'expression de cinq gènes de ménage (*actin5C, aTub84, zw, rpS20* et *pgk*) a été analysée par la méthode Bestkeeper (Pfaffl et al., 2004). *Pgk* a été utilisé comme gène de référence, en raison de son niveau d'expression stable et proche des gènes cibles via cette méthode. Les amorces sens et antisens des gènes (*EcR, USP, met, ERR, BR-C, HR3,*

dib, cyp18a1, jheh1, hsf, hsp22, hsp23, hsp40, hsp68, hsp70, hsp83, hsc70, mtna, mtnb, Tl, imd, def, p38, mef2, sirt1, keap1, cnc, cat, phgpx, sod, debcl, creba, cpr and mdr49) ont été désignées à partir de Flybase à l'aide du logiciel AmplifX. Dans les cas où les gènes sont transcrits en plusieurs isoformes, des amorces spécifiques ont été conçues dans une région partagée, permettant l'amplification précise de toutes les isoformes. Les réactions de PCR ont été effectuées sur le système de détection PCR en temps réel LightCycler480 (Roche Applied Science, France) via le protocole adapté de Bigot et al. (2012). Chaque réaction était réalisée avec 5 µL de Absolute Blue SYBR Green Fluor (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 4 µL d'ADNc (6,25 ng/µL) et 0,5 µL de chaque amorce (10 µM). Le programme de PCR comportait une étape initiale de 5 min à 95°C suivie de 50 cycles de 10s à 95°C, 15s à 60°C et 15s à 72°C. Dans ces conditions, un pic unique et discret a été détecté pour toutes les amorces testées après l'analyse de la courbe de fusion et l'efficacité de toutes les amorces testées était comprise entre 80% et 120%. La valeur moyenne des cycles seuils (Ct) de chaque réaction a été utilisée pour normaliser le niveau d'expression du gène candidat par rapport à la moyenne géométrique du niveau du gène de ménage *pgk* dans le logiciel Q-Gene (Simon, 2003). Chaque condition a été répliquée trois fois. Pour représenter les résultats, une « heat map » a été construite avec le logiciel Past 3.14. Les niveaux d'expression des gènes des conditions exposées obtenus sur Q-Gene ont été normalisés par rapport à ceux du groupe contrôle et transformés en échelle logarithmique 2. De cette manière, c'est la variation du niveau d'expression des gènes qui a été représentée.

2.5. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des logiciels R 3.5.1 et R Studio 1.1.456 (R Core Team, 2017) et GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc.). Le test de Shapiro-Wilk a été utilisé pour vérifier la normalité des données. Les taux de mortalité et le sex-ratio ont été analysés à l'aide d'un test du chi 2. La durée de développement des larves a été analysée par régression à l'aide du test de Gehan-Breslow-Wilcoxon pour comparer les courbes de développement et une ANOVA unidirectionnelle pour comparer les durées moyennes des stades de développement. Les niveaux d'expression des gènes ont été analysés à l'aide d'une ANOVA par permutation suivie d'un test post-hoc de Scheffe. Enfin, un test non apparié a été réalisé pour analyser la fertilité des femelles en comparant le nombre d'œufs en condition exposée par rapport au groupe témoin. Les P-values inférieures à 5% ont été considérées comme significatives (*: P <0,05, **: P <0,01, ***: P <0,001).

3. Résultats et discussion

3.1. Composition des eaux usées

3.1.1. Paramètres globaux

Les résultats des paramètres globaux sont donnés dans le **tableau IV-10**. Les eaux usées domestiques du point BOI-2 présentaient les valeurs les plus faibles de ces paramètres. Ces valeurs sont comparables aux valeurs d'eaux usées d'origine domestique connues de la littérature (Bergé et al., 2014; Zgheib, 2009). Les eaux usées industrielles du point BOI-1 révélaient des concentrations plus élevées, en particulier pour la DCO (1460 mg/L), ce qui traduisait une charge polluante plus importante. Bergé et al. (2014) ont montré qu'en fonction des activités économiques, une augmentation des concentrations de ces paramètres dans les eaux usées industrielles pouvait être observée. La concentration en azote (NTK) à BOI-1 est un peu plus faible que pour les autres points. L'azote est un traceur des rejets domestiques, d'où l'augmentation des concentrations dans des secteurs domestiques (BOI-2) ou à dominante domestique (BOI-3 et -4). Les eaux usées des points BOI-3 et BOI-4 présentent des valeurs similaires sur l'ensemble des paramètres globaux, en moyenne plus élevées que pour les autres eaux usées. Un apport important d'eaux usées domestiques à ces points (**Figure IV-28**) devrait en théorie diluer les concentrations de DCO caractéristiques de pollutions importantes souvent industrielles. Ces résultats montrant l'effet inverse, pourraient traduire la présence de sources d'émission non identifiées qui concentrent la pollution globale aux points de mélanges d'autant plus que les débits sont plus élevés.

	BOI-1	BOI-2	BOI-3	BOI-4
DBO5	560	430	960	690
DCO	1460	970	1960	1800
pH	8.2	7.6	8.0	7.8
Phosphore	11	8.3	19	11
NTK	93.9	102	138	123
MES	640	460	560	1100

Tableau IV-10. *Résultats des analyses des paramètres globaux dans les eaux usées (mg/L). Le code couleur permet d'identifier l'origine des eaux usées (bleu : industrielle, jaune : domestique, vert : mixte à dominante domestique). (DBO5 : demande biologique en oxygène, DCO : demande chimique en oxygène, NTK : azote Kjeldahl, MES : matières en suspensions, BOI : Boissy l'Aillerie).*

3.1.2. Micropolluants

Les concentrations mesurées dans les fractions dissoutes et particulaires sont données dans le **tableau IV-11.** Connaître les concentrations dans les deux fractions est important pour adapter le traitement en STEU et comprendre comment est transporté le polluant dans le réseau. Cela peut également donner une indication sur la biodisponibilité

d'un polluant, car un polluant adsorbé sur les particules n'est pas nécessairement biodisponible pour les organismes aquatiques. Les micropolluants recherchés ont été ciblés pour leur caractère prioritaire et toxique selon la note technique du 12 août 2016 relative à la recherche de micropolluants.

		BOI-1			BOI-2			BOI-3			BOI-4		
		D (µg/L)	P (µg/kg)	D+P (µg/L)	D (µg/L)	P (µg/kg)	D+P (µg/L)	D (µg/L)	P (µg/kg)	D+P (µg/L)	D (µg/L)	P (µg/kg)	D+P (µg/L)
Alkylphénols	Nonylphénols	0,0019	< LQ	1,90	3,6	< LQ	3,60	0,51	< LQ	0,51	1,70	< LQ	1.70
	NP1OE	< LQ	< LQ	< LQ	1,0	< LQ	1.00	0,50	< LQ	0,50	0,68	< LQ	0,68
	NP2OE	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Octylphénols	< LQ	< LQ	< LQ	0,14	< LQ	0,14	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	OP1OE	< LQ	< LQ	< LQ	0,41	< LQ	0,41	0,17	< LQ	0,17	0,47	< LQ	0,47
	OP2OE	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Bisphénols	Bisphénol A	-	-	< LQ	-	-	< LQ	-	-	< LQ	-	-	< LQ
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)	Benzo(a)pyrène	< LQ	220	0,14	< LQ	24	0,02	< LQ	480	0,27	< LQ	< LQ	< LQ
	Benzo(b)fluoranthène	< LQ	280	0,18	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	600	0,34	< LQ	< LQ	< LQ
	Benzo(g,h,i)perylène	< LQ	190	0,12	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	340	0,19	< LQ	< LQ	< LQ
	Benzo(k)fluoranthène	< LQ	110	0,07	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	230	0,13	< LQ	< LQ	< LQ
	Fluoranthène	0.01	370	0,25	< LQ	44	0,02	0,01	920	0,53	0,01	17	0,03
	Indéno (1,2,3-cd)pyrène	< LQ	190	0,12	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	410	0,23	< LQ	< LQ	< LQ
Métaux	Arsenic (As)	-	-	< LQ	-	-	< LQ	-	-	< LQ	-	-	< LQ
	Cadmium (Cd)	-	-	1,0	-	-	< LQ	-	-	< LQ	-	-	< LQ
	Chrome (Cr)	-	-	32,0	-	-	5,0	-	-	19,0	-	-	11,0
	Cuivre (Cu)	-	-	92,0	-	-	185,0	-	-	94,0	-	-	126,0
	Mercure (Hg)	-	-	2,05	-	-	0,1	-	-	0,2	-	-	0,3
	Nickel (Ni)	-	-	28,0	-	-	6,0	-	-	15,0	-	-	9,0
	Plomb (Pb)	-	-	151,0	-	-	5,0	-	-	54,0	-	-	72,0
	Titane (Ti)	-	-	41,0	-	-	18,0	-	-	16,0	-	-	42,0
	Zinc (Zn)	-	-	1098,0	-	-	201,0	-	-	534,0	-	-	581,0
Pesticides	Cyperméthrine	< LQ	40	0,05	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	210	0,12	< LQ	< LQ	< LQ
	Glyphosate	0,30	360	0,53	0,25	350	0,41	0,62	670	1,0	0,58	< LQ	0,58
Phtalates	DEHP	< LQ	2800	2,80	2,3	1100	2,30	3,8	13000	11,40	< LQ	1200	2,40
Polybromodiphényléthers	∑ PBDE	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Polychlorobiphényles	∑ PCB	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Autres substances	PFOS	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	AOX	-	-	120	-	-	320	-	-	220	-	-	230
	Chloroforme	-	-	< LQ	-	-	< LQ	-	-	< LQ	-	-	< LQ
	Dichlorométhane	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	0,04	0,06	< LQ	< LQ	< LQ
	Indice Phénol	-	-	70	-	-	240	-	-	70	-	-	80
	Tributylétain cation	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	110	0,05	< LQ	53	0,03	< LQ	35	0,04

Tableau IV-11. *Résultats des analyses des micropolluants. Le code couleur permet d'identifier l'origine des eaux usées (bleu : industrielle, jaune : domestique, vert : mixte à dominante domestique). (BOI : Boissy l'Aillerie, D : fraction dissoute, P : fraction particulaire, D+P : fraction totale, LQ : limite de quantification).*

Hydrocarbures aromatiques polycliques (HAPs).

Les HAPs étaient présents à de très faibles concentrations (0,12-0,53 µg/L) dans les eaux usées et dans la fraction particulaire **(Tableau IV-11)**. Ils étaient majoritairement présents au niveau des points BOI-1 et BOI-3. Les HAPs sont hydrophobes et sont souvent quantifiés dans la phase particulaire (Sally Zgheib et al., 2012) ce qui les rend plus facilement éliminables de l'eau mais amène à la contamination des boues et sédiments (Blanchard et al., 2004). Les eaux usées peuvent être contaminées par les HAPs via des rejets industriels mais aussi domestiques (Alegbeleye et al., 2017). Généralement, ce sont des concentrations inférieures à 1 µg/L qui sont mesurées dans les eaux usées (Blanchard et al., 2004; Rule et al., 2006) comme observé dans nos résultats. De plus, les congénères HAPs étaient quantifiés ensemble dans nos échantillons.

Métaux.

A l'exception de l'arsenic et du cadmium, les métaux ont été quantifiés à tous les points avec des niveaux de concentrations de 5-32 µg/L pour le chrome, 92-185 µg/L pour le cuivre, 0,1-2,05 µg/L pour le mercure, 6-28 µg/L pour le nickel, 5-151 µg/L pour le plomb, 16-42 µg/L pour le titane et de 201-1098 µg/L pour le zinc (**Tableau IV-11**). Les données de la littérature montrent que ces métaux sont très souvent retrouvés dans les eaux usées à des concentrations parfois plus faibles que les nôtres (Östman et al., 2017; Rule et al., 2006). Les eaux usées industrielles (BOI-1) présentaient des concentrations en moyenne plus élevées en métaux que les autres eaux usées à composante domestique à l'exception du cuivre.

Pesticides.

Le glyphosate a été quantifié dans toutes les eaux usées à des concentrations relativement proches 0,41-1 µg/L (**Tableau IV-11**). Le glyphosate était présent dans les phases particulaire et dissoute indiquant une certaine mobilité dans l'eau. La cyperméthrine est, quant à elle, uniquement dans la phase particulaire et quantifiée dans les eaux usées des points BOI-1 et BOI-3 à l'instar des HAPs (**Tableau IV-11**). Très peu d'études sont disponibles sur la présence des pesticides dans les eaux usées brutes mais lorsqu'ils ont été mesurés, ils apparaissaient souvent présents dans les eaux usées brutes (Coquery et al., 2011). Les utilisations non agricoles (ex. traitement de surfaces) pourraient favoriser et expliquer leur présence dans les eaux usées (Köck-Schulmeyer et al., 2013).

Composés perturbateurs endocriniens.

Parmi ces composés, le DEHP et le nonylphénol ont été quantifiés à tous les points entre 2,3-11,4 µg/L et 0,51-3,60 µg/L respectivement (**Tableau IV-11**). Du NP1OE (substance mère éthoxylée du nonylphénol) a également été quantifié entre 0,5-1,0 µg/L aux points BOI-2, -3 et -4. Au point domestique (BOI-2), de l'octyphénol a été mesuré à 0,14 µg/L ainsi que du OP1OE (substance mère éthoxylée de l'octylphénol) à 0,41 µg/L. L'OP1OE a aussi été retrouvé au point BOI-3 à 0,17 µg/L et au point BOI-4 à 0,47 µg/L. Le nonylphénol comme l'octylphénol sont des produits issus de la dégradation des alkylphénols éthoxylés (APEO) largement utilisés comme tensioactifs, ce qui pourrait expliquer leur présence (Pal et al., 2014). De façon générale, les alkylphénols étaient retrouvés dans la phase dissoute indiquant un transport facilité dans l'eau et donc une forte probabilité d'être biodisponible s pour les organismes. A l'inverse, le DEHP était retrouvé dans la phase particulaire. Plusieurs auteurs ont rapporté la présence ubiquitaire de ces composés, notamment du nonyphénol et du DEHP dans les eaux usées domestiques comme industrielles dans des ordres de grandeur proches des nôtres (Bergé et al., 2014; Deblonde et al., 2011; Sánchez-Avila et al., 2009). Le bisphénol A n'a jamais été quantifié dans les échantillons d'eaux usées.

Polychlorobiphényles (PCB) et Polybromodiphényléthers (PBDE).

Aucun des composés des deux familles n'a été quantifié dans les eaux usées (**Tableau IV-11**). Dans la littérature, ces composés sont retrouvés de façon aléatoire dans les eaux usées et ne sont pas toujours détectés et quantifiés ou alors à très faibles concentrations de l'ordre du ng/L (Blanchard et al., 2004; Sánchez-Avila et al., 2009; Wu et al., 2019; Zgheib, 2009). Les PCBs étaient notamment présents dans la composition des fluides diélectriques, condensateurs, transformateurs, quasiment ininflammables. Mais leur production et leur utilisation ont été interdites dans plusieurs pays suite à la ratification de la convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants (Vorkamp, 2016). Ces interdictions peuvent expliquer entre autres la raison pour laquelle ils ne sont pas quantifiés dans les eaux usées.

Autres micropolluants et indices globaux.

Le dichlorométhane et le chloroforme (ou trichlorométhane) utilisés comme solvants n'ont jamais été quantifiés (**Tableau IV-11**). Du tributylétain (TBT) a été mesuré uniquement sur les points domestiques dans la fraction particulaire (BOI-2 à -4) alors qu'il est principalement utilisé dans l'industrie (Antizar-ladislao, 2008) (**Tableau IV-11**). Les trois substances peuvent cependant être retrouvées assez fréquemment dans les eaux usées brutes (Coquery et al., 2011; Rule et al., 2006). Enfin, les phénols et les AOX ont été quantifiés dans tous les échantillons à de fortes concentrations, 70-240 µg/L et 120-320 µg/L respectivement (**Tableau IV-11**).

3.1.3 Bilan sur la composition chimique des eaux usées et substances significatives

Plusieurs substances dangereuses ont été mesurées dans nos eaux usées. Les activités présentes de type mécanique automobile, métallurgie, fabrication de plastique, peintures et lubrifiants sur le territoire étudié sont fortement susceptibles de rejeter l'ensemble de ces micropolluants ciblés dans les eaux usées industrielles (BOI-1). En effet, les HAPs, métaux, pesticides, perturbateurs endocriniens, phénols et AOX ont été identifiés comme étant produits et utilisés au cours de tels processus (Alegbeleye et al., 2017; Alizadeh et al., 2018; Kabir et al., 2015; Savant et al., 2006; Sharma et al., 2009). Pourtant ces composés ont également été retrouvés dans des eaux usées à composante domestique tels que des HAPs, plusieurs métaux, le glyphosate, le DEHP, les phénols et les AOX. L'utilisation de ces substances dans des produits finaux à usages domestiques et des cosmétiques pourrait expliquer également leur présence dans les eaux usées domestiques (Eriksson et al., 2003; Grandcoin et al., 2017; Soares et al., 2008; Zolfaghari et al., 2014). Initialement, nous avons supposé que les eaux usées industrielles transportaient davantage de substances dangereuses en raison des diverses activités et que les eaux usées domestiques permettraient de les diluer. Au niveau du

linéaire suivi, il ne semble pas y avoir de dilution particulière des micropolluants et certains se retrouvent parfois même concentrés comme les HAPs et la cyperméthrine (BOI-3 > BOI-1). Ces observations impliquent alors que des sources d'émission sont présentes sur le trajet des effluents et que les eaux usées domestiques ne transportent pas nécessairement moins de substances dangereuses que les eaux usées industrielles.

Certains polluants ont tendance à être présents dans la fraction particulaire (DEHP, cyperméthrine, HAPs) tandis que d'autres sont plutôt retrouvés dans la fraction dissoute (nonylphénol, octylphénol, NPOE1, OPOE1) (Tableau IV-11). En effet, les polluants hydrophobes comme les HAPs auront plus de probabilité d'être retrouvés dans les boues (Blanchard et al., 2004) tandis que les polluants hydrophiles tels que le nonylphénol (Das et al., 2016) auront plus de probabilité de se retrouver dans l'eau. D'autres produits montrent une affinité partagée entre les deux fractions (ex. glyphosate). Le partage entre ces deux phases est cependant conditionné par les formes et les interactions entre polluants. Ainsi il a été montré que des polluants plutôt hydrophiles peuvent aussi se retrouver dans les boues (Ghanem et al., 2007). Ces particularités des polluants influent sur leur mode transport et donc leur biodisponibilité lorsqu'ils sont relargués dans l'environnement. Ainsi, ils peuvent ou non être transportés sur de longues distances et biodisponibles pour un organisme vivant.

En s'en tenant aux directives de la note technique du 12 août 2016, les résultats physico-chimiques indiquent que les eaux usées des points industriels BOI-1 et BOI-3 transportent le plus grand nombre de micropolluants avec chacune 10 substances significatives dont certaines redondantes entre les deux points (Tableau IV-11). Ces micropolluants ne sont pas toujours les mêmes entre ces points. Des sources d'émission de micropolluants sont donc présentes au niveau de ces deux bassins de collecte (Figure 4-28). Le périmètre minimum d'étude correspondant donc au bassin de collecte BOI-3. Il est notable que les analyses physico-chimiques ne sont pas une obligation réglementaire en raison des moyens et du coût que cela peut représenter pour les maitres d'ouvrages. En revanche, elles fournissent une information précieuse qualitative sur le composé et sa concentration. Néanmoins, en raison du caractère non exhaustif des mesures, ces analyses ne permettent pas de trancher sur le caractère toxique des eaux usées analysées, qui est discriminant lors de la recherche d'émission de substances dangereuses.

3.2. Effets des eaux usées sur *Drosophila melanogaster*

Les eaux usées n'ont eu aucun effet sur la mortalité des individus et sur la durée moyenne du stade pupal mais elles ont pour certaines affecté le temps de développement moyen des stades larvaires (**Tableau IV-12**).

		C	BOI-1	BOI-2	BOI-3	BOI-4
Mortalité	Stades larvaires	10,63% *(± 5,47)*	6,67% *(± 7,93)*	8,23% *(± 11,49)*	6,67% *(± 6,61)*	6,18% *(± 5,84)*
	Stade pupal	0,32% *(± 1,09)*	0,83% *(± 2,23)*	0%	0%	0,84% *(± 2,52)*
Temps de développement						
	Durée moyenne des stades larvaires *(jours)*	5,77 *(± 0,47)*	6,88*** *(± 0,43)*	6,23 *(± 0,45)*	6,41 *(± 0,32)*	5,90 *(± 0,48)*
	Durée moyenne du stade pupal *(jours)*	3,89 *(± 0,18)*	4,08 *(± 0,09)*	4,03 *(± 0,36)*	4,07 *(± 0,14)*	4,04 *(± 0,08)*
Sex-ratio	Mâle	49,62% *(± 8,33)*	50,00% *(± 5,80)*	50,00% *(± 5,42)*	49,50% *(± 8,68)*	49,20% *(± 7,85)*
	Femelle	50,38%	50,00%	50,00%	50,50%	50,80%
Nb. œufs						
	Par femelle	28,19 *(± 4,45)*	20,25* *(± 4,46)*	23,05 *(± 4,34)*	25,72 *(± 4,58)*	24,88 *(± 6,23)*

Tableau IV-12. *Effets des eaux usées sur Drosophila melanogaster. Le code couleur permet d'identifier l'origine des eaux usées (bleu : industrielle, jaune : domestique, vert : mixte à dominante domestique). * : P<0,05 et *** : P<0,001. (C : contrôle, BOI : Boissy l'Aillerie).*

Les animaux non exposés ont mis en moyenne 5,77 jours pour atteindre le stade pupal (**Tableau IV-12**).Cette durée moyenne n'a pas été modifiée lorsque les animaux ont été exposés aux eaux usées domestiques (BOI-2) ou mixtes à dominante domestique (BOI-3 et -4). En revanche, les animaux exposés aux eaux usées industrielles (BOI-1) ont mis en moyenne 1 jour supplémentaire pour atteindre le stade pupal (6,88 jours) (**Tableau IV-12**). Cette augmentation a été confirmée par le relevé quotidien des pourcentages de transition larve-pupe (**Figure IV-29**). Le suivi quotidien a également permis de montrer que les eaux usées domestiques (BOI-2) et mixtes à dominante domestique (BOI-3 et -4) retardent la pupaison des larves (**Figure IV-29**), même si cela n'a pas affecté significativement la durée moyenne du développement larvaire (**Tableau IV-12**).Ces effets de retard de développement sont aussi connus chez le gammare *Gammarus fossarum et le têtard Physalaemus cuvieri* à la suite d'expositions à des eaux traitées et industrielles (Flores et al., 2017; Wigh et al., 2017).

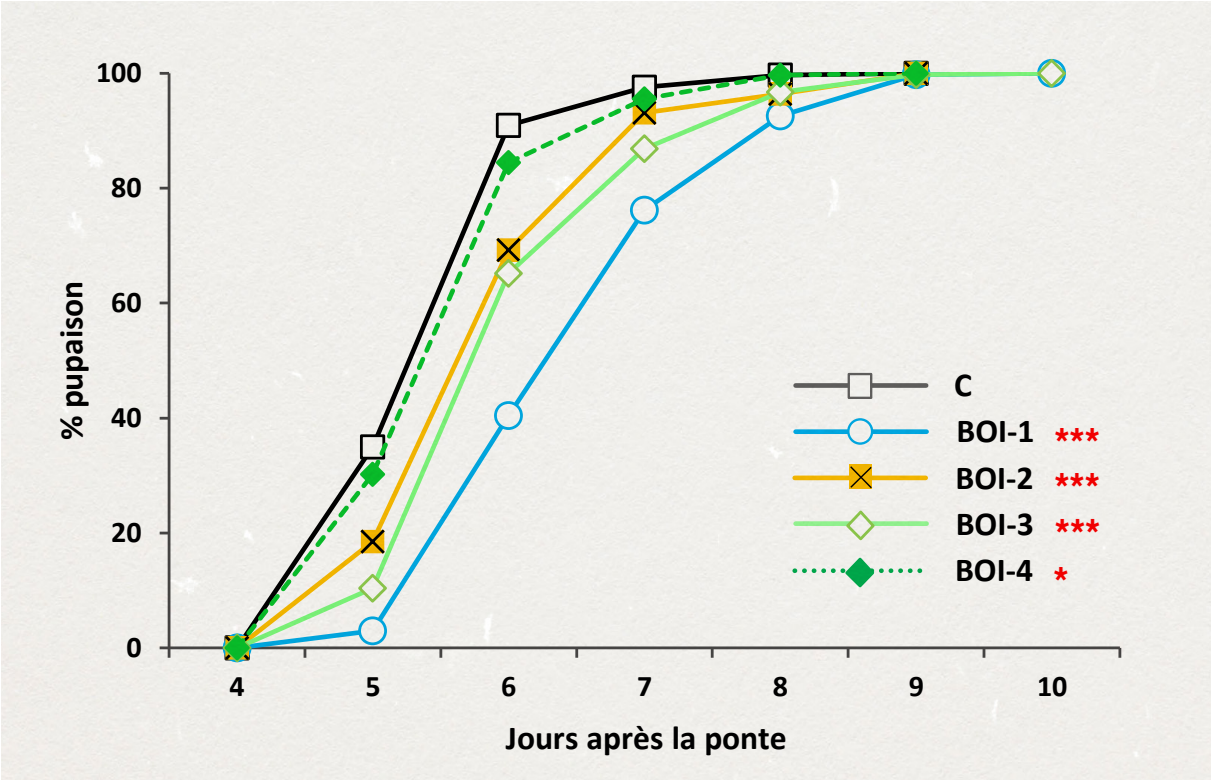


Figure IV-29. *Courbes de pupaison des larves de drosophiles exposées aux eaux usées. * : P<0,05 et *** : P<0,001. (C : contrôle, BOI : Boissy l'Aillerie).*

Les courbes de pupaison ont montré des différences de toxicité entre les eaux usées en fonction de leur origine **(Figure IV-29)**. Les eaux usées industrielles (BOI-1) ont eu l'effet le plus fort sur le temps de développement des larves en comparaison des eaux usées à composante domestique majoritaire (BOI-2, -3 et -4). Les courbes de pupaison des drosophiles exposées eaux usées domestiques (BOI-2) et à celles du point de mélange (BOI-3) sont presque accolées **(Figure IV-29)**, les effets sont donc comparables. La courbe de pupaison des individus exposés aux eaux usées à l'aval de la zone de mélange (BOI-4), tend à se rapprocher de celle des individus non exposés. Il semble donc qu'un effet dilutif dans les eaux usées a permis d'en diminuer la toxicité entre les points à l'amont et à l'aval du secteur étudié. La physico-chimie a révélé la présence de HAPs, de métaux, des pesticides, du DEHP, du nonylphénol, des AOX et des phénols, si l'on compare en premier les eaux usées industrielles (BOI-1) et domestiques (BOI-2). Dans les eaux usées domestiques, les HAPs, les métaux, le DEHP, étaient moins concentrés, tandis que les AOX, les phénols, le nonylphénol et l'octylphénol étaient plus concentrés **(Tableau IV-11)**. La différence entre les courbes de pupaison **(Figure IV-29)** pourrait donc être expliquée par les concentrations plus fortes de métaux, de HAPs et de DEHP dans les eaux usées industrielles. Cependant, à la zone de mélange (BOI-3), les HAPs et le DEHP étaient de nouveau concentrés dans les eaux usées **(Tableau IV-11)** pourtant le temps de développement des insectes

était moins affecté. Il est donc difficile d'expliquer les effets toxiques mesurés avec les seules analyses physico-chimiques réalisées. La toxicité des eaux usées pourrait être médiée par des polluants non recherchés ou par un effet cocktail du mélange.

Aucun effet sur le sex-ratio n'a été observé **(Tableau IV-12)**. En revanche, la fertilité des femelles a été réduite **(Tableau IV-12)**. Le nombre d'œufs pondus est significativement plus faible lors d'une exposition aux eaux usées industrielles (28 œufs par femelles non exposées contre 20 pour les femelle exposées). Plusieurs études ont montré que les eaux traitées et les eaux de rivière contaminées par des eaux usées pouvaient induire des effets négatifs sur la reproduction de plusieurs espèces aquatiques de poissons, gammares et escargots comme l'augmentation ou la diminution du nombre d'oeufs, des changements dans le comportement reproducteur ou encore la diminution de la fécondité (Cavallin et al., 2016; Chen et al., 2016; Gust et al., 2010; Mazzitelli et al., 2018; Overturf et al., 2015; Wigh et al., 2017). Certaines de ces études ont aussi mis en avant que le changement dans les taux d'hormones (Gust et al., 2010) ou la présence de substances œstrogéniques (Cavallin et al., 2016) n'était pas nécessairement en lien avec la perturbation de la reproduction. Ainsi, les mécanismes sous-jacents impliqués dans ces dérèglements sont difficiles à identifier et nécessitent des études complémentaires pour être identifiés.

A l'échelle moléculaire des individus, les analyses des expressions des gènes des drosophiles exposées ont révélé que plusieurs acteurs dans différentes voies ont été affectées. Sur neuf gènes testés impliqué dans la signalisation hormonale, trois ont été modulés après exposition aux eaux usées. L'enzyme responsable de l'inactivation de la 20E (Guittard et al., 2010) a été surexprimée de 1,3-1,6 fois (P <0,001) dans toutes les conditions d'exposition. L'expression du récepteur de la 20E, EcR, a été réduite 1,8-2,2 fois (P <0,001) par les eaux usées domestiques (BOI-2) et à dominante domestique (BOI-3 et -4). Enfin le gène précoce-tardif de la cascade des ecdystéroïdes, HR3, a été surexprimé 2,6-3,0 fois (P <0,001) après une exposition aux eaux usées industrielles (BOI-1) et à dominante domestique (BOI-3 et -4). Effectivement, ces dérèglements dans l'expression des gènes étayent l'hypothèse d'une perturbation endocrinienne bien que des expériences complémentaires soient nécessaires pour valider cette hypothèse. Parmi la voie de signalisation des HSPs, souvent sollicitées en réponse à un stress (Fittipaldi et al., 2014) **(Figure IV-30 partie droite, vert)**, l'hsc70 exprimée de façon constitutive a été fortement surexprimée dans toutes les conditions d'expositions (de 2,4-4,3 fois P <0,001) **(Figure IV-30).** Alors que les effluents industriels n'ont eu aucun effet sur l'expression des autres HSPs, nous avons observé une baisse de l'expression des chaperonnes hsp23 de 1,9-2,9 fois (P <0,05 à 0,01) pour les trois points d'eaux usées domestiques (BOI-2) et mixtes (BOI-3 et -4), hsp40 (1,4-1,5 fois, P <0,05 à 0,01) pour les points BOI-2 et -3 et hsp70 (2,8 fois, P <0,001) pour le point BOI-4 **(Figure IV-30)**.

Quelques études ont montré que l'exposition à de l'eau de surface contaminée par des eaux usées peut induire l'expression de hsp70, hsp90 et hsc70 chez les espèces de poissons *Oryzias melastigma* et *Oncorhynchus mykiss* et chez le chironome *Chironomus riparius* (Chen et al., 2016; Ings et al., 2012; Planelló et al., 2013). La modulation de ces acteurs reflète un stress global subit par les larves de *D. melanogaster* après exposition à des eaux usées. La troisième voie étudiée est celle des métallothionéines (MTs), des protéines généralement induites lors d'un stress métallique et contrôlées par le facteur de transcription mft-1 (Haq et al., 2003) **(Figure IV-30 partie droite, jaune)**. L'expression de mtna n'a pas été modifiée après exposition aux eaux usées mais une augmentation significative a été mesurée pour mtnb après exposition aux eaux usées BOI-2 (2,0 fois P<0,01). Bien que la surexpression de cette métallothionéine ne soit pas significative pour les points BOI-3 et BOI-4, nous avons noté une augmentation du niveau de son transcrit (1,7-1,8 fois). Les MTs sont généralement connues pour être induites en cas de présence des métaux, en particulier le zinc et le cuivre qui en sont de très bon inducteurs (Amiard et al., 2006). Le métal libre active ainsi la voie de signalisation des MTs (Egli et al., 2006). Au regard des résultats de la physico-chimie, nous pouvons supposer que les métaux présents dans les eaux usées sont responsables de la hausse d'expression de mtnb. Les concentrations des métaux des points BOI-2, -3 et -4 peuvent être corrélées à la réponse de la mtnb, bien que le test statistique n'indique pas d'induction significative chez les larves exposées aux eaux usées des point BOI-3 et -4. En revanche, les métaux étaient davantage concentrés dans les eaux usées industrielles de BOI-1 **(Tableau IV-11)**. Amiard et al. (2006) ont mis en lumière que parfois les MTs ne sont pas systématiquement induites, en raison des turnovers entre ARNm et quantités de protéines, de l'affinité des MTs avec certains métaux ou de la toxicité des mélanges. Par exemple le cadmium et le mercure ne modulent pas l'expression des gènes de la même façon (Frat et al., 2021). Ainsi, des mécanismes de rétrocontrôles, des taux de protéines plus ou moins grands ou encore la composition du mélange pourraient expliquer l'absence de modulation de l'expression des gènes MTs au niveau du point BOI-1. Nous avons regardé des acteurs moléculaires de la voie immunitaire, la voie des MapK, et des acteurs de la détoxication et de l'apoptose (Myllymaki et al., 2014; Stronach et Perrimon, 1999; Tapadia et Lakhotia, 2005; Valanne et al., 2011; Vrailas-Mortimer et al., 2011) **(Figure IV-30 partie droite, bleu).** Aucun des gènes impliqués dans les voies immunitaires et Mapk n'ont été modulés par les eaux usées **(Figure IV-30)**. En revanche, le gène cnc a été fortement régulé à la hausse dans toutes les conditions et de manière significative pour les eaux usées du point BOI-4 (3,9 fois P <0,05). Le facteur de transcription cnc agit en complexe avec keap1 afin de réguler l'expression des gènes codant des enzymes pour lutter et protéger les tissus contre le stress oxydatif induit par les polluants (Kobayashi et al., 2004 ; Legan et al., 2008).

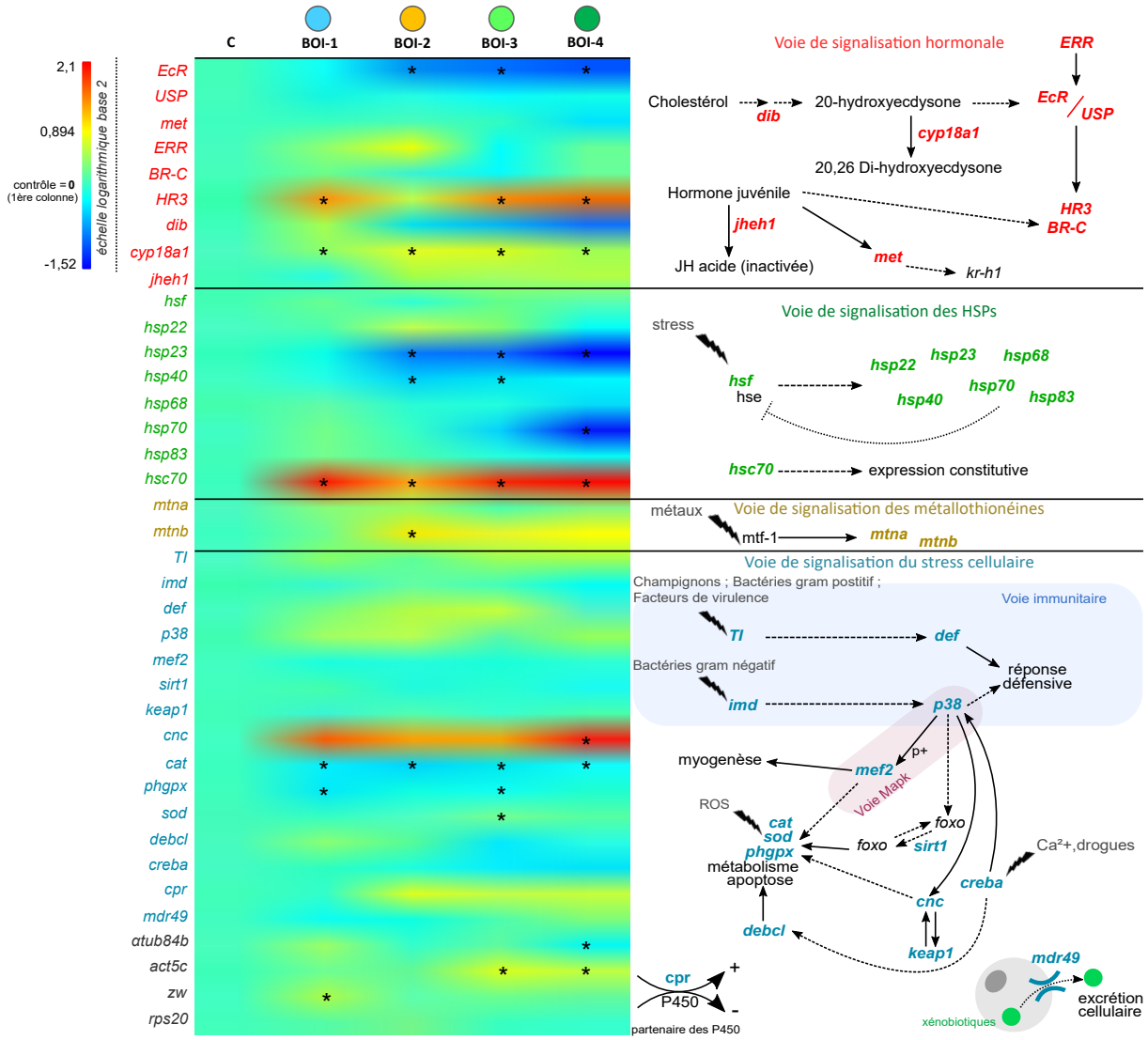


Figure IV-30. *Heat map représentant les niveaux d'expression de plusieurs gènes chez D.melanogaster après exposition aux eaux usées. Cette représentation montre les expressions moyennes normalisées (MNE) des gènes cibles normalisées au gène de référence pgk (n = 9, trois répétitions biologiques en trois temps). Les MNE sont centrées sur le groupe témoin (contrôle = 1) et transformées en échelle logarithmique base 2 (log (contrôle) = 0). Le code couleur permet d'évaluer l'amplitude de variation en accord avec l'échelle centrée sur le groupe contrôle. C = contrôle. Les astérisques (*) indiquent des différences significatives entre les MNE par rapport au groupe témoin dès que P < 0,05.*

Il est donc intéressant de voir que les réponses de ces enzymes ont été également modulées dans notre étude. En effet, nous avons pu voir une baisse de l'expression de la catalase (cat) dans toutes les conditions (1,2 à 1,4 fois P <0,001) et de phgpx pour les points BOI-1 et BOI-3 (1,2- 1,4 fois P <0,05 à 0,001) **(Figure IV-30)**. Le gène de la superoxyde dismutase (sod) a été surexprimé après exposition aux eaux usées du point BOI-3 (1,2 fois, P <0,05) ainsi que celui de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (zw) (1,4 fois, P <0,05) après expositions aux eaux usées industrielles (BOI-1) **(Figure IV-30)**. La régulation de ces gènes

est un signe notable de la production de stress oxydatif à la suite d'une exposition aux eaux usées. Des études ont également montré une diminution ou une augmentation dans l'expression des gènes et l'activité de ces enzymes après exposition aux eaux usées chez la truite arc-en-ciel, la carpe et le rat (Gagné et al., 2013; Neri-Cruz et al., 2015; Sharif et al., 2016). Les eaux usées ont aussi eu des effets sur les processus cellulaires. En effet, les eaux usées du point BOI-4 ont induit une baisse de l'expression de la tubuline (atub84b) (1,3 fois, P <0,05) et une hausse de l'actine (act5c) (1,6 fois, P <0,001) **(Figure IV-30)**. Cette hausse a été également observée pour le point BOI-3 (1,5 fois, P <0,001). L'actine et la tubuline sont des acteurs majeurs du cytosquelette (Small, 1988). Une modification de l'expression de leurs gènes est alors la démonstration d'un effet plus global de stress sur les cellules. et al., 2004 ; Legan et al., 2008).

De manière générale, les individus exposés aux eaux usées ont vu l'expression de plusieurs de leurs gènes modulés à la hausse ou à la baisse **(Figure IV-30).** Il reste difficile d'expliquer quels polluants et quels mécanismes sont intervenus au cours de ces expériences avec un mélange complexe comme les eaux usées. Néanmoins, en affinant les résultats à l'aide d'expériences supplémentaires, la partie moléculaire pourrait devenir un atout en isolant des marqueurs précoces de toxicité.

Conclusion

Le bioessai est un bon outil complémentaire aux analyses physico-chimiques en permettant d'évaluer la toxicité des eaux usées. Notre outil biologique a permis de définir si les eaux usées industrielles, domestiques et mixtes induisaient des effets toxiques. Les eaux usées, selon leur origine, n'ont pas eu le même degré de toxicité sur *Drosophila melanogaster*. Les eaux usées industrielles présentaient un risque toxique plus important en induisant les effets les plus sévères sur le développement des larves et la fertilité des femelles. L'approche moléculaire, elle, nous a permis de mettre en lumière certains mécanismes mis en jeu lors de l'exposition à des eaux usées. Plusieurs acteurs moléculaires ont été affectés dans la voie hormonale et dans la voie de détoxication et de réponse antioxydante, ce qui était corrélé à des troubles développementaux des larves. A terme, certains de ces acteurs moléculaires pourraient servir de biomarqueurs précoces d'effet ou d'exposition aux eaux usées et certaines molécules qui y sont transportées.

Le bioessai permet de façon intégrative et peu coûteuse de détecter si une eau usée présente un danger. La chimie analytique nous a permis d'avoir une première idée sur la toxicité des eaux usées sur la base de la composition chimique. Cependant, cette vision n'est pas exhaustive et la chimie ne permet pas d'expliquer la totalité des effets toxiques observés. Wigh et al. (2017) ont également conclu que les outils biologiques sont pertinents et sensibles dans l'étude de la toxicité des mélanges de polluants et qu'il est nécessaire de les utiliser car la présence des micropolluants uniquement recherchés n'est pas directement corrélable aux effets toxiques mesurés. De plus, les approches avec la chimie analytique sont encore très coûteuses, particulièrement lorsqu'il faut passer par des laboratoires agréés COFRAC. Les analyses physico-chimiques pourraient venir compléter dans un second temps le diagnostic toxicologique pour tenter d'identifier les substances dangereuses potentiellement responsables des effets observés. L'approche toxicologique semble être une option pertinente dans la recherche de sources d'émission polluante.

Références

Alegbeleye, O.O., Opeolu, B.O., Jackson, V.A., 2017. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation. Environ. Manage. 60, 758-783. https://doi.org/10.1007/s00267-017-0896-2

Alizadeh, B., Delnavaz, M., Shakeri, A., 2018. Removal of Cd (I I) and phenol using novel cross-linked magnetic EDTA/chitosan/TiO2 nanocomposite. Carbohydr. Polym. 181, 675-83. https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.11.095

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquat. Toxicol. 76, 160-202. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015

Antizar-ladislao, B., 2008. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT) -contaminated marine environment . A review. Environ. Int. 34, 292-308. https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.09.005

Bergé, A., Gasperi, J., Rocher, V., Gras, L., Coursimault, A., Moilleron, R., 2014. Phthalates and alkylphenols in industrial and domestic effluents: Case of Paris conurbation (France). Sci. Total Environ. 488-489, 26-35. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.081

Bigot, L., Shaik, H.A., Bozzolan, F., Party, V., Lucas, P., Debernard, S., Siaussat, D., 2012. Peripheral regulation by ecdysteroids of olfactory responsiveness in male Egyptian cotton leaf worms, Spodoptera littoralis. Insect Biochem. Mol. Biol. 42, 22-31. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.10.003

Blanchard, M., Teil, M.J., Ollivon, D., Legenti, L., Chevreuil, M., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in wastewaters and sewage sludges from the Paris area (France). Environ. Res. 95, 184-197. https://doi.org/10.1016/j.envres.2003.07.003

Bowles, D.C., Butler, C.D., Morisetti, N., 2015. Climate change , conflict and health. J. R. Soc. Med. 108(10), 390-5. https://doi.org/10.1177/0141076815603234

Caballero-Gallardo, K., Olivero-Verbel, J., L. Freeman, J., 2016. Toxicogenomics to Evaluate Endocrine Disrupting Effects of Environmental Chemicals Using the Zebrafish Model. Curr. Genomics 17, 515-527. https://doi.org/10.2174/1389202917666160513105959

Cavallin, J.E., Jensen, K.M., Kahl, M.D., Villeneuve, D.L., Lee, K.E., Schroeder, A.L., Mayasich, J., Eid, E.P., Nelson, K.R., Milsk, R.Y., Blackwell, B.R., Berninger, J.P., Lalone, C.A., Blanksma, C., Jicha, T., Elonen, C., Johnson, R., Ankley, G.T., 2016. Pathway-based approaches for assessment of real-time exposure to an estrogenic wastewater treatment plant effluent on fathead minnow reproduction. Environ. Toxicol. Chem. 35, 702-716. https://doi.org/10.1002/etc.3228

Chen, T., Chou, S., Tang, C., Chen, C., Meng, P., Ko, F., Cheng, J., 2016. Endocrine disrupting effects of domestic wastewater on reproduction, sexual behavior, and gene expression in the brackish medaka Oryzias melastigma. Chemosphere 1-10. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.057

Coquery, M., Pomies, M., Martin-Ruel, S., Budzinski, H., Miege, C., Esperanza, M., Soulier, C., Choubert, J.M., 2011. Mesurer les micropolluants dans les eaux usées brutes et traitées. Protocoles et résultats pour l'analyse des concentrations et des flux. Tech. - Sci. - Methodes 25-43.

Das, S., Ray, N.M., Wan, J., Khan, A., Chakraborty, T., Ray, M.B., 2016. Micropollutants in wastewater: fate and removal processes. IntechOpen Physico-Chemical Wastewater Treat. Resour. Recover. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/57353

Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., 2011. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. Int. J. Hyg. Environ. Health 214, 442-448. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002

Do Amaral, V.S., Da Silva, R.M., Reguly, M.L., De Andrade, H.H.R., 2005. Drosophila wing-spot test for genotoxic assessment of pollutants in water samples from urban and industrial origin. Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen. 583, 67-74. https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.02.002

Egli, D., Yepiskoposyan, H., Selvaraj, A., Balamurugan, K., Rajaram, R., Simons, A., Multhaup, G., Mettler, S., Vardanyan, A., Georgiev, O., others, 2006. A family knockout of all four Drosophila metallothioneins reveals a central role in copper homeostasis and detoxification. Mol. Cell. Biol. 26, 2286. https://doi.org/10.1128/MCB.26.6.2286-2296.2006

Eriksson, E., Auffarth, K., Eilersen, A.M., Henze, M., Ledin, A., 2003. Household chemicals and personal care products as sources for xenobiotic organic compounds in grey wastewater. Water SA 29, 135-146. https://doi.org/10.4314/wsa.v29i2.4848

Fittipaldi, S., Dimauro, I., Mercatelli, N., Caporossi, D., 2014. Role of exercise-induced reactive oxygen species in the modulation of heat shock protein response. Free Radic. Res. 48(1), 52-70. https://doi.org/10.3109/10715762.2013.835047

Flores, M., Luis, A., Sueli, A., Rodrigues, D.L., Oliveira, B. De, Malafaia, G., 2017. Environment Impacts of tannery effluent on development and morphological characters in a neotropical tadpole. Sci. Total Environ. 538, 23-37. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.134

Frat, L., Chertemps, T., Pesce, E., Bozzolan, F., Dacher, M., Planello, R., Herrero, O., Llorente, L., Moers, D., & Siaussat, D. (2023). Impact of single and combined exposure to priority pollutants on gene expression and post-embryonic development in Drosophila melanogaster. Ecotoxicology and Environmental Safety, 250(Janary 2023). https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114491

Frat, L., Chertemps, T., Pesce, É., Bozzolan, F., Dacher, M., Planelló, R., Herrero, Ó., Llorente, L., Moers, D., & Siaussat, D. (2021). Single and mixed exposure to cadmium and mercury in Drosophila melanogaster: Molecular responses and impact on post-embryonic development. Ecotoxicology and Environmental Safety, 220. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112377

Gagné, F., Smyth, S.A., André, C., Douville, M., 2013. Stress-related gene expression changes in rainbow trout hepatocytes exposed to various municipal wastewater treatment influents and effluents. Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 1706-1718. https://doi.org/10.1007/s11356-012-1174-8

Ghanem, A., Bados, P., Rua, A., Felippe, L., Alencastro, D., Taibi, S., Einhorn, J., Mougin, C., 2007. Concentrations and specific loads of glyphosate, diuron, atrazine, nonylphenol and metabolites thereof in French urban sewage sludge. Chemosphere 69, 1368-1373. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.022

Grandcoin, A., Piel, S., Baures, E., 2017. AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate. Water Res. 117, 187-97. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.055

Guittard, E., Blais, C., Maria, A., Parvy, J.-P., Pasricha, S., Lumb, C., Lafont, R., Daborn, P.J., Dauphin-Villemant, C., 2010. CYP18A1, a key enzyme of Drosophila steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. Dev. Biol. 349, 35-45. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.09.023

Gust, M., Buronfosse, T., Geffard, O., Mons, R., Queau, H., Mouthon, J., Garric, J., 2010. In situ biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail Potamopyrgus antipodarum (Gray) exposed to waste water treatment plant (WWTP) effluent discharges. Water Res. 44, 4517-4528. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.019

Haq, F., Mahoney, M., Koropatnick, J., 2003. Signaling events for metallothionein induction. Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 533, 211-226. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.014

Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., Tauler, R., Barceló, D., 2005. Toxicity assays applied to wastewater treatment. Talanta 65, 358-366. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.07.012

Ings, J.S., Oakes, K.D., Vijayan, M.M., Servos, M.R., 2012. Temporal changes in stress and tissue-specific metabolic responses to municipal wastewater effluent exposure in rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. Part C 156, 67-74. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.04.002

Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. Environ. Toxicol. Pharmacol. 40, 241-258. https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009

Kobayashi, A., Ohta, T., Yamamoto, M., 2004. Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes. Methods Enzymol. 378, 273-286. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)78021-0

Köck-Schulmeyer, M., Villagrasa, M., López de Alda, M., Céspedes-Sánchez, R., Ventura, F., Barceló, D., 2013. Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. Sci. Total Environ. 458-460, 466-476. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.010

König, M., Escher, B.I., Neale, P.A., Krauss, M., Hilscherová, K., Novák, J., Teodorović, I., Schulze, T., Seidensticker, S., Kamal Hashmi, M.A., Ahlheim, J., Brack, W., 2017. Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of in vitro bioassays and chemical analysis. Environ. Pollut. 220, 1220-1230. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.011

Kortenkamp, A., Faust, M., 2018. Regulate to reduce chemical mixture risk. Science (80-.). 361, 224-226. https://doi.org/10.1126/science.aat9219

Legan, S.K., Rebrin, I., Mockett, R.J., Radyuk, S.N., Klichko, V.I., Sohal, R.S., Orr, W.C., 2008. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase extends the life span of Drosophila melanogaster. J. Biol. Chem. 283, 32492-32499. https://doi.org/10.1074/jbc.M805832200

Marttinen, S.K., Kettunen, R.H., Rintala, J.A., 2003. Occurrence and removal of organic pollutants in sewages and landfill leachates. Sci. Total Environ. 301, 1-12. https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00302-9

Mazina, M.Y., Kocheryzhkina, E. V., Nikolenko, J. V., Krasnov, A.N., Georgieva, S.G., Vorobyeva, N.E., 2017. Nuclear receptors EcR, Usp, E75, DHR3, and ERR regulate transcription of ecdysone cascade genes. Dokl. Biochem. Biophys. 473, 145-147. https://doi.org/10.1134/S1607672917020144

Mazzitelli, J.Y., Budzinski, H., Cachot, J., Geffard, O., Marty, P., Chiffre, A., François, A., Bonnafe, E., Geret, F., 2018. Evaluation of psychiatric hospital wastewater toxicity: what is its impact on aquatic organisms? Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 26090-26102. https://doi.org/10.1007/s11356-018-2501-5

Myllymaki, H., Valanne, S., Ramet, M., 2014. The Drosophila Imd signaling pathway. J. Immunol. 192, 3455-3462. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303309

Naoki Yamanaka, Kim F. Rewitz, Michael B. O'Connor, 2013. Ecdysone control of developmental transitions: lessons from Drosophila research. Annu. Rev. Entomol. 58, 497-516. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153608.Ecdysone

Neri-Cruz, N., Leobardo, M.G.-O., Galar-Martínez, M., Del Socorro Romero-Figueroa, M., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Jiménez-Vargas, J.M., SanJuan-Reyes, N., 2015. Oxidative stress in Cyprinus carpio induced by hospital wastewater in Mexico. Ecotoxicology 24, 181-193. https://doi.org/10.1007/s10646-014-1371-y
Ort, C., Lawrence, M.G., Rieckermann, J., Joss, A., 2010. Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems : are your conclusions valid ? A critical review. Environ. Sci. Technol. 44, 6024-6035. https://doi.org/10.1021/es100779n

Östman, M., Lindberg, R.H., Fick, J., Björn, E., Tysklind, M., 2017. Screening of biocides, metals and antibiotics in Swedish sewage sludge and wastewater. Water Res. 115, 318-328. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.011

Overturf, M.D., Anderson, J.C., Pandelides, Z., Beyger, L., Holdway, D.A., 2015. Pharmaceuticals and personal care products: A critical review of the impacts on fish reproduction. Crit. Rev. Toxicol. 45, 492-530. https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1038499

Pal, A., He, Y., Jekel, M., Reinhard, M., Gin, K.Y.H., 2014. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. Environ. Int. 71, 46-62. https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.025

Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol. Lett. 26, 509-515. https://doi.org/10.1016/j.ejor.2016.09.013

Planelló, R., Servia, M.J., Gómez-Sande, P., Herrero, Ó., Cobo, F., Morcillo, G., 2013. Transcriptional responses, metabolic activity and mouthpart deformities in natural populations of Chironomus riparius larvae exposed to environmental pollutants. Environ. Toxicol. 30, 383-395. https://doi.org/10.1002/tox.

Pottinger, T.G., Matthiessen, P., 2016. Disruption of the stress response in wastewater treatment works effluent-exposed three-spined sticklebacks persists after translocation to an unpolluted environment. Ecotoxicology 25, 538-547. https://doi.org/10.1007/s10646-016-1612-3

Rogowska, J., Cieszynska-Semenowicz, M., Ratajczyk, W., Wolska, L., 2019. Micropollutants in treated wastewater. Ambio. https://doi.org/10.1007/s13280-019-01219-5

Rule, K.L., Comber, S.D.W., Ross, D., Thornton, A., Makropoulos, C.K., Rautiu, R., 2006. Survey of priority substances entering thirty English wastewater treatment works. Water Environ. J. 20, 177-184. https://doi.org/10.1111/j.1747-6593.2005.00016.x

Sánchez-Avila, J., Bonet, J., Velasco, G., Lacorte, S., 2009. Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs and PAHs in an industrial sewage grid discharging to a Municipal Wastewater Treatment Plant. Sci. Total Environ. 407, 4157-4167. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.03.016

Savant, D. V., Abdul-Rahman, R., Ranade, D.R., 2006. Anaerobic degradation of adsorbable organic halides (AOX) from pulp and paper industry wastewater. Bioresour. Technol. 97, 1092-1104. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.013

Schumann, I., Kenny, N., Hui, J., Hering, L., Mayer, G., 2018. Halloween genes in panarthropods and the evolution of the early moulting pathway in Ecdysozoa. R. Soc. Open Sci. 5. https://doi.org/10.1098/rsos.180888

Sharif, A., Ashraf, M., Javeed, A., Anjum, A.A., Akhtar, M.F., Akhtar, B., Saleem, A., 2016. Oxidative stress responses in Wistar rats on subacute exposure to pharmaceutical wastewater. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 24158-24165. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7717-7

Sharma, V.K., Anquandah, G.A.K., Yngard, R.A., Kim, H., Fekete, J., Bouzek, K., Ray, A.K., Golovko, D., 2009. Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: A review on occurrence, fate, and treatment. Environ. Sci. Heal. Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng. 44, 423-442. https://doi.org/10.1080/10934520902719704

Simon, P., 2003. Q-Gene: Processing quantitative real-time RT-PCR data. Bioinformatics 19, 1439-1440. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg157

Small, J. V., 1988. The actin cytoskeleton. Electron Microsc. Rev. 1, 155-174. https://doi.org/10.1016/S0892-0354(98)90010-7

Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J.N., 2008. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. Environ. Int. 34, 1033-1049. https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.01.004

Stronach, B.E., Perrimon, N., 1999. Stress signaling in Drosophila. Oncogene 18, 6172-6182. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203125

Sullivan, A.A., Thummel, C.S., 2003. Temporal Profiles of Nuclear Receptor Gene Expression Reveal Coordi-

nate Transcriptional Responses during Drosophila Development. Mol. Endocrinol. 17, 2125-2137. https://doi.org/10.1210/me.2002-0430

Tapadia, M.G., Lakhotia, S.C., 2005. Expression of mdr49 and mdr65 multidrug resistance genes in larval tissues of Drosophila melanogaster under normal and stress conditions. Cell Stress Chaperones 10, 7-11. https://doi.org/10.1379/CSC-67R.1

UNESCO, 2017. WWAP (Programme mondial pour l'évaluation des ressources en eau). 2017. Rapport mondial des Nations Unies sur la mise en valeur des ressources en eau.

Valanne, S., Wang, J.-H., Ramet, M., 2011. The Drosophila toll signaling pathway. J. Immunol. 186, 649-656. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002302

Vasquez, M.I., Fatta-Kassinos, D., 2013. Is the evaluation of « traditional » physicochemical parameters sufficient to explain the potential toxicity of the treated wastewater at sewage treatment plants? Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 3516-3528. https://doi.org/10.1007/s11356-013-1637-6

Vorkamp, K., 2016. An overlooked environmental issue? A review of the inadvertent formation of PCB-11 and other PCB congeners and their occurrence in consumer products and in the environment. Sci. Total Environ. 541, 1463-1476. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.019

Vrailas-Mortimer, A., del Rivero, T., Mukherjee, S., Nag, S., Gaitanidis, A., Kadas, D., Consoulas, C., Duttaroy, A., Sanyal, S., 2011. A Muscle-Specific p38 MAPK/Mef2/MnSOD Pathway Regulates Stress, Motor Function, and Life Span in Drosophila. Dev. Cell 21, 783-795. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.09.002

Wigh, A., Geffard, O., Abbaci, K., Francois, A., Noury, P., Bergé, A., Vulliet, E., Domenjoud, B., Gonzalez-Ospina, A., Bony, S., Devaux, A., 2017. Gammarus fossarum as a sensitive tool to reveal residual toxicity of treated wastewater effluents. Sci. Total Environ. 584-585, 1012-1021. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.154

Wu, Z., Han, W., Yang, X., Li, Y., Wang, Y., 2019. The occurrence of polybrominated diphenyl ether (PBDE) contamination in soil, water/sediment, and air. Environ. Sci. Pollut. Res. 26, 23219-23241. https://doi.org/10.1007/s11356-019-05768-w

Yu, Y., Wu, B., Jiang, L., Zhang, X.X., Ren, H.Q., Li, M., 2019. Comparative analysis of toxicity reduction of wastewater in twelve industrial park wastewater treatment plants based on battery of toxicity assays. Sci. Rep. 9, 1-10. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40154-z

Zgheib, S., 2009. Flux et sources des polluants prioritaires dans les eaux urbaines en lien avec l'usage du territoire. Ecole des Ponts ParisTech.

Zgheib, S., Moilleron, R., Saad, M., Chebbo, G., 2011. Partition of pollution between dissolved and particulate phases: What about emerging substances in urban stormwater catchments? Water Res. 45, 913-925. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.09.032

Zolfaghari, M., Drogui, P., Seyhi, B., Brar, S.K., Buelna, G., 2014. Occurrence , fate and effects of Di (2-ethylhexyl) phthalate in wastewater treatment plants : A review. Environ. Pollut. 1-13. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.07.014

C. Bilan sur les paramètres de toxicité mesurés en tant que biomarqueurs du suivi de la pollution dans les eaux usées

Au chapitre III, nous avions conclu sur la pertinence des paramètres mesurés lors des conditions expérimentales en conditions contrôlées de concentrations et de polluants. Ici, il s'agit de faire le bilan des ce paramètres ainsi que des nouveaux paramètres mesurés dans le contexte d'une utilisation en tant que biomarqueurs d'effet et d'exposition aux eaux usées.

Phénotypes macroscopiques

Les résultats ont montré que le taux de mortalité des individus exposés peut être affecté de façon négative et positive. Le résultat sur l'augmentation de la survie des individus était plutôt inattendu compte tenu de la nature de la matrice étudiée. Le caractère extrêmement toxique des eaux usées n'est donc pas toujours justifiable au vu de ces résultats. Les eaux usées, en dehors du fait qu'elles transportent plusieurs micropolluants dont certains très toxiques, transportent également des nutriments (Gorini et al., 2014) d'où l'intérêt de leur épandage (cf chapitre I - A). Lorsque de la mortalité est ainsi observée, cela peut indiquer une contamination importante des eaux usées à une ou plusieurs substances toxiques. La mortalité est un paramètre que nous savons inductible surtout à de fortes concentrations (cf chapitre III). Cependant, les analyses d'eaux usées réalisées n'ont pas indiqué la présence en fortes concentrations d'une substance ou groupe de substances (cf chapitre II) par rapport aux sites où la mortalité n'a pas été induite ou a été réduite. La cause reste donc inconnue, mais il est envisagé que des substances non suivies ou qu'un effet cocktail sont à l'origine de la mortalité des individus exposés.

Des troubles développementaux chez les larves ont été mesurés dans ces expériences. Des retards de développement ont été induits suite à l'exposition d'eaux usées, de la même façon qu'à la suite d'exposition à des polluants seuls ou mélangés. Selon le site où ont été prélevées les eaux usées, les résultats étaient différents. La sensibilité de ce paramètre est donc intéressante pour discriminer la toxicité des eaux usées provenant des différents sites étudiés.

Enfin, des individus exposés ont perdu environ 1/4 de leur taille au stade pupal et d'autres ont été affectés dans leur capacité à se reproduire. Ces observations permettent de rajouter un niveau supplémentaire dans cette étude. Et comme déjà conclu au chapitre III, le sex-ratio ne semble pas être un paramètre pertinent puisqu'il n'a pas non plus été affecté par les eaux usées.

La mesure de plusieurs traits de vie des individus permet d'obtenir des informations sur la toxicité globale exercée par les eaux usées contaminées par des substances toxiques. En fonction du trait de vie affecté par l'exposition, l'intégrité des individus n'est pas atteinte de la même façon. De cette manière et selon les observations, il est possible de discriminer les sites étudiés en fonction de la toxicité exercée et de l'intensité de celle-ci. Toutefois, l'évaluation des différentes capacités d'un individu à se développer et se reproduire n'est pas suffisante pour idendifier quelles substances pourraient être à l'origine de ces effets. De plus, certaines observations ont été très similaires parfois entre plusieurs sites étudiés, ce qui rend nécessaire la mesure de paramètres supplémentaires.

Cibles moléculaires

L'approche à l'échelle moléculaire peut s'avérer utile au sens où elle permet d'augmenter le seuil de sensibilité du modèle et de potentiellement identifier des biomarqueurs spécifiques. Les eaux usées ont eu des effets chez les larves sur plusieurs des acteurs moléculaires précédemment étudiés. Nous avons de nouveau hiérarchisé les profils d'expression des différents gènes en comparant les conditions contrôlées (cf chapitre III) avec les conditions eaux usées afin de pouvoir identifier d'éventuelles signatures moléculaires (**Figure IV-31**).

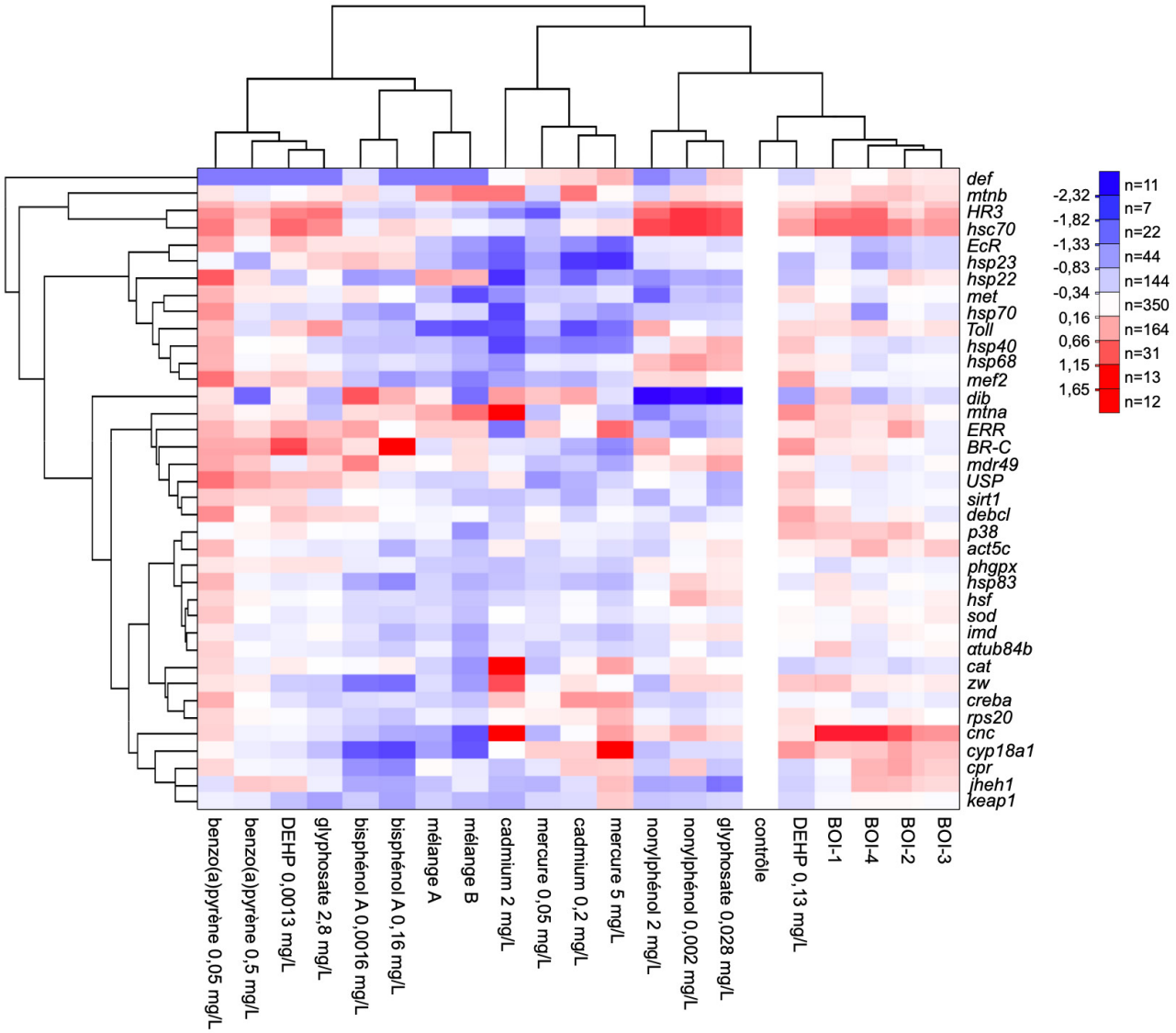


Figure IV-31. *Cluster des profils d'expression des gènes étudiés chez la drosophile en fonction du niveau d'expression et des conditions testées. Cette figure permet d'apprécier les profils d'expression des conditions contrôlées et eaux usées. Ces profils ont été regroupés de deux façons : selon l'expression des gènes, qu'ils soient surexprimés (rouge) ou sous exprimés (bleu) et selon les conditions expérimentales. Seule les données de 2019 pour les eaux usées ont été utilisés en raison de la pertinence des effets observés. Une échelle reprenant le code couleur indique la distribution des données et le nombre d'observations par catégories colorées et l'intensité de la modulation des gènes (échelle logarithmique base 2). (BOI : Boissy l'Aillerie).*

Les signatures des conditions eaux usées de Boissy l'Aillerie sont toutes regroupées ensemble à droite de la figure (**Figure IV-31**), ce qui montre que les profils sont similaires entre eux mais qu'ils sont différents des autres conditions polluantes testées. Les profils des eaux usées sont apparentés à celui du groupe contrôle. Cela indique que les effets étaient plutôt peu intenses par rapport aux autres conditions. Aussi, dans les eaux usées, peu des polluants des conditions testées en laboratoire étaient présents aux mêmes concentrations que celles utilisées dans les expériences, ce qui peut expliquer la différence marquée entre les profils. Mais les eaux usées constituent une matrice très complexe en raison de l'ensemble des substances transportées et pourraient alors avoir leur propre signature.

Sans comparer les conditions eaux usées aux autres conditions polluantes testées, l'expression de quelques gènes a été augmentée ou réduite (ex. cnc, hsc70, hsp23, hsp70, cyp18a1, mtnB). Ces gènes, au-delà du fait qu'ils fournissent des informations sur les mécanismes affectés en réponse à l'exposition, pourraient servir de biomarqueurs.

La toxicocinétique des substances contenues dans les eaux usées est très importante et il est donc nécessaire de complémenter les expériences en étudiant la cinétique de ces acteurs moléculaires à des temps et stades de développement différents de la drosophile pour confirmer cette utilisation. Les mécanismes moléculaires sont généralement les premiers affectés avant l'apparition d'effets à l'échelle de l'organisme puisqu'ils sont les témoins d'une réponse physiologique d'adaptation à une condition stressante. Quand cette réponse n'est plus suffisante, des effets à l'échelle de l'organisme entier sont visibles (hypothèse déjà évoquée au chapitre III). C'est en ce sens que cette approche permet d'abaisser le seuil de sensibilité de la drosophile. De plus, en fonction des mécanismes touchés ou induits, les effets pourraient être plus ou moins importants par la suite. Enfin la spécificité des mécanismes n'est pas assez forte pour différencier les effets entre polluants contenus dans les eaux usées. Certaines familles pourraient cependant être suivies à l'aide de ces biomarqueurs comme les métaux à l'aide des métallothionéines. Et, si des effets perturbateurs endocriniens sont avérés, les acteurs de la voie hormonale pourraient servir de biomarqueurs d'effet. Les acteurs moléculaires qui ont répondu de façon plus générale comme les protéines chaperonnes, pourraient servir de biomarqueurs d'intensité du stress subi par les animaux.

Ainsi, ces travaux ont permis de montrer que l'utilisation d'approches combinées pouvait mettre en évidence des variations biologiques (de l'échelle moléculaire à l'échelle de l'organisme entier) et donc de suivre la toxicité des pollutions transportées par les eaux usées au travers de nos animaux utilisés comme biosenseurs. Ces travaux ne sont qu'une première étape dans la caractérisation d'outils d'aide à la décision. L'approfondissement de ces premières recherches est donc nécessaire pour affiner ces outils, qui se révèlent clairement comme une solution envisageable à long termes pour la surveillance de la contamination des eaux usées.

Conclusion

Ces travaux ont montré que la drosophile peut être utilisée comme bioindicateur de la toxicité des eaux usées traduite par la présence de contaminations à des substances dangereuses. Selon les paramètres affectés par l'exposition aux eaux usées et leur importance dans l'intégrité des individus, il est possible d'attribuer aux sites étudiés un degré de toxicité plus ou moins important. L'approche moléculaire nécessite plus de calibration à la suite de ces travaux. En complétant les données ici recueillies, cette approche apporterait plus de sensibilité pour établir le diagnostic et dans la mesure du possible, identifier des effets ou une exposition à des familles de polluants et l'intensité du stress que peut occasionner une exposition à des eaux usées.

Les résultats de toxicité viennent compléter les analyses physico-chimiques mais sont assez difficilement corrélables. Globalement, ces travaux mettent en avant le caractère toxique des eaux usées industrielles mais qui n'est pas nécessairement généralisable. Le secteur de prélèvements et l'occupation du sol mais aussi la connaissance et les contrôles réguliers d'installations par le gestionnaire du réseau d'assainissement influencent grandement les résultats de toxicité. Et il est notable que l'origine des eaux usées n'est pas un critère suffisant pour affirmer qu'une eau usée est toxique ou non. Le secteur domestique ne doit pas être exclu dans la recherche de sources d'émission polluante. Les particuliers ne disposent pas d'autorisation de déversement et ont un droit acquis de raccordement au réseau en raison de la production d'eaux usées non industrielles. Pourtant des molécules toxiques (phtalates, perturbateurs endocriniens, alkylphénols…) y sont retrouvées. Il apparaît que le diagnostic uniquement physico-chimique peut sous-évaluer ou sur-évaluer la qualité des eaux usées, en particulier si l'on se fie uniquement aux paramètres dits « significatifs » selon la réglementation.

Après l'identification de secteurs à risques, des programmes de sensibilisation de la population pourraient être une solution envisageable pour réduire les substances toxiques dans les eaux usées domestiques. Quant aux eaux usées industrielles, des stations d'alertes et des mises à jour des autorisations de déversement pourraient aider à réduire certaines pollutions mesurées ou non par la physico-chimie. Le bioessai à l'aide de la drosophile s'avérerait être opportun pour une utilisation en amont d'analyses physico-chimiques afin de cibler plus précisément un secteur rejetant des substances dangereuses.

Chapitre V
Discussion générale et perspectives

«Le savant n'est pas l'homme qui fournit de vraies réponses ; c'est celui qui pose les vraies questions.»

Claude Lévi-Strauss

Les eaux usées représentent un enjeu actuel et futur. L'eau polluée perd en qualité et peut avoir des conséquences néfastes sur les écosystèmes aquatiques et terrestres. Il est crucial de comprendre le transport et d'identifier les sources de molécules dangereuses dans les réseaux en amont des STEU pour réduire les problèmes de contamination de cette précieuse ressource.

Ainsi, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des eaux usées en mesurant les concentrations de molécules toxiques (chapitre II). Les résultats ont permis de constater que des polluants (ex. DEHP, nonylphénol, glyphosate, cuivre) étaient présents de manière ubiquitaire au travers de plusieurs secteurs analysés, industriels comme domestiques. Les eaux usées industrielles transportaient des concentrations plus fortes de certaines familles de polluants comme les métaux. Mais la physico-chimie ne permet pas de mesurer les concentrations ou même la présence d'autres molécules non ciblées par cette approche. Quant à la quantification des substances recherchées, cela permet d'entrevoir le potentiel danger des eaux, mais qui reste à être démontré par des tests de toxicité sur des organismes. Des bioessais existent pour évaluer le danger des pollutions dans les eaux de surface (ex. rivière, lac) et sont parfois utilisés pour les eaux brutes. Cependant, ils ne sont pas nécessairement adaptés à ce type de matrice plus chargée en matières en suspension.

Aussi, nous avons entrepris le développement d'un nouvel outil biologique (chapitre III) afin d'évaluer la toxicité des eaux usées à l'aide d'un organisme modèle et sur plusieurs niveaux d'organisation. L'un des questionnements était d'évaluer la réponse de ce modèle face à des polluants connus pour certains (cadmium, mercure) et moins étudiés pour d'autres (glyphosate, benzo(a)pyrène) lorsqu'ils sont seuls ou mélangés. Les résultats ont montré l'importance de mesurer plusieurs paramètres pour évaluer l'effet global de la toxicité exercée par les polluants seuls ou en mélange et d'avoir une vision intégrée pour discriminer la dangerosité de chacune des conditions testées. Cet outil et le protocole mis en place ont permis d'étudier la toxicité des effluents dans le réseau d'assainissement pour identifier des sites d'émission de substances toxiques (chapitre IV).

Les prochains paragraphes ont donc pour objectif de faire la synthèse de ces résultats, de les discuter et de répondre à la question de l'utilisation possible de notre modèle dans la caractérisation des eaux usées.

1. Quelle est la pertinence d'un bioessai pour l'évaluation de la toxicité des eaux usées brutes ?

La question est de savoir si cet outil est réellement pertinent dans ce contexte. Pour y répondre, la méthodologie et les outils utilisés sont évidemment importants. Pour la physico-chimie, la toxicité est prédite par la présence de substances dangereuses, en particulier celles ciblées par la DCE. Et la toxicité de ces substances a été prouvée via des bioessais en laboratoire qui ont permis la mise en place des normes de qualité environnementale (NQE). Or, ces études de toxicité reposent le plus souvent sur des mono-expositions ne prenant pas en compte les effets toxiques des mélanges comme dans le cas des eaux usées. Altenburger et al. (2018) avaient argumenté pour étudier les cocktails de polluants en laboratoire en faveur d'un panel de plusieurs bioessais. De plus, plusieurs auteurs ont largement encouragé l'évaluation de la toxicité des effluents de manière intégrative, avec l'utilisation d'un outil biologique en complément des analyses physico-chimiques (Dizer et al., 2002; European Environment Agency, 2018; König et al., 2017; Vasquez et Fatta-Kassinos, 2013). C'est l'une des raisons pour laquelle, le développement d'un bioessai s'avère pertinent dans ce contexte.

Cette stratégie de multi-outils d'évaluation est d'ores et déjà utilisée dans les programmes de protection de l'eau en milieu naturel. Il est en effet prôné du « Whole effluent assessment » pour laquelle il est préconisé d'utiliser de multiples techniques (de la physico-chimie aux essais biologiques) (Power et Boumphrey, 2004). Par exemple, en France, la qualité d'une eau de surface est évaluée par des approches physico-chimiques et écologiques (cf. chapitre I – A.2). Pourtant, l'évaluation du danger n'est pas prise en compte dans ces évaluations. Kittinger et al. (2013) ont d'ailleurs remis en cause cette omission en démontrant que le bon état écologique de l'eau n'est pas nécessairement en accord avec les effets toxicologiques observés en laboratoire. Par conséquent, ce retour d'expérience est en phase avec les recommandations des écotoxicologues qui préconisent d'évaluer la qualité des eaux par trois approches complémentaires : l'évaluation de l'exposition des milieux par la physico-chimie, l'évaluation du danger (toxicité) par les bioessais de laboratoire et l'évaluation sur site par les indicateurs écologiques. Les réseaux d'assainissement ne sont pas des « milieux » peuplés par nature et peu propices à l'implantation et au développement d'organismes. Il s'agit de déchets créés par l'Homme, des études in situ ne peuvent être réalisées sur des

macro-organismes. Donc sur la seule base d'analyses physico-chimiques, la qualité des eaux usées ne peut être correctement mesurée et caractérisée. Il apparaît indispensable d'inclure l'emploi de bioessais dans la démarche d'analyse de qualité.

Le développement d'un bioessai pertinent pourrait aussi permettre de remettre en cause la stratégie d'évaluation des eaux usées. Effectivement, on procède actuellement à la mesure et à la quantification de substances parce qu'elles ont été montrées comme toxiques dans différentes études. Or cette stratégie n'est-elle pas inversée ? En effet, du fait de la complexité des mélanges de polluants dans les eaux usées et des limites des méthodes, un diagnostic de la toxicité devrait être établi avant de déclencher la poursuite des investigations avec des méthodes ciblées et onéreuses.

2. Quelles sont les limites des outils appliqués ?

La physico-chimie

J'avais évoqué au chapitre II, la stratégie et les prérequis nécessaires pour se lancer dans l'analyse physico-chimique des effluents (cartographie du réseau, connaissances du territoire, des activités industrielles, etc.). Mais cette technique présente tout de même certaines limites. La première étant le nombre de mesures. Le manque de réplications de ces mesures est discutable scientifiquement parlant, mais est plutôt courant dans le contexte opérationnel des gestionnaires de réseaux du fait du coût financier des prestations et analyses. Ainsi, il faut prendre des précautions sur l'analyse et l'interprétation des résultats. Cela amène tout de même une information quantitative exploitable mais nécessite de faire des choix, surtout quand le territoire est large et fait plusieurs centaines de kilomètres carrés. Le coût financier, comme précisé plus tôt, est donc un facteur prépondérant et limitant. Ainsi, à budget équivalent, les gestionnaires ont plusieurs choix : soit faire peu ou pas de mesures répétées mais un grand nombre de points analysés sur le territoire ou le linéaire (comme décidé pour ce projet de thèse), soit faire plusieurs mesures répétées et peu de points. En combinant tous les résultats d'analyses, le nombre de répétitions par substances était compris entre n=4 et n=32, ce qui a permis d'établir la signature des eaux usées à l'échelle du territoire du SIARP (chapitre II) pour un coût total d'environ 55 000 € HT sur les trois années. Les informations obtenues sont très précieuses et utiles mais, comme

discuté plus haut, elles n'offrent qu'une vision parcellaire des polluants dans nos eaux usées. Une mauvaise appréciation du caractère toxique des eaux usées peu empêcher de s'intéresser à des secteurs sources de fortes pollutions. De plus, Briand et al. (2018) soulignent également que la physico-chimie ne peut pas permettre d'identifier la spéciation du polluant qui détermine sa toxicité, ni de prendre en compte l'ensemble des éléments du mélange incluant les métabolites de dégradation. De ce fait, les effets cocktails ne sont également pas pris en compte. Il ne faut pas non plus négliger que les limites de quantification et de détection des appareillages utilisés peuvent aussi être restreignantes pour mesurer la présence de micropolluants parfois faiblement concentrés.

Le bioessai

Les bioessais permettent de répondre à des questionnements auxquels la physico-chimie ne peut pas. Ils sont par ailleurs reconnus comme importants pour le contrôle des sources d'émissions polluantes (Chapman, 1995). Un bioessai peut permettre d'évaluer la biodisponibilité des polluants par la mesure d'un effet toxique et prendre en compte la totalité de la matrice étudiée. En revanche, il ne permet pas d'indiquer quelles substances sont présentes dans la matrice étudiée et lesquelles provoquent les effets.

Un test biologique doit pouvoir être assez sensible pour évaluer la qualité d'une matrice, sans trop l'être pour ne pas déclencher de « faux positif ». La qualité du diagnostic repose sur la capacité d'un polluant à induire une réponse claire et mesurable. Des phénotypes macroscopiques sont donc souvent utilisés pour cela. Parfois, ces indicateurs ne permettent pas de comprendre les effets et il est donc nécessaire de les coupler au suivi de biomarqueurs moléculaires qui permettent de s'informer sur le mode d'action. Ainsi, le mode d'action peut parfois renseigner sur le type de molécule présent.

Pour la caractérisation des biomarqueurs moléculaires, nous avons privilégié la technique de la PCR quantitative en temps réel (qPCR). Cette technique est largement utilisée pour la mesure de l'expression des gènes. Comme pour toute technique, la limite de détection peut être, elle-même, une limite à la méthode (Burns et Valdivia, 2008). Sous conditions stressantes, les gènes peuvent subir des répressions parfois fortes de sorte qu'il est difficile voire impossible de les détecter puisque les ARN à amplifier ne sont pas présents ou trop dilués dans l'échantillon biologique. De même que certains gènes non

exprimés peuvent être activés par la condition polluante. Ces biomarqueurs on/off sont extrêmement utiles pour la caractérisation d'une condition stressante mais sont difficiles à trouver sans utiliser d'approche globale comme la transcriptomique (approche à laquelle nous avions pensé dans ce projet pour identifier des acteurs spécifiques des eaux usées).

Le fait d'avoir travaillé sur corps entier, comme dans ces travaux, permet de simplifier le protocole et d'éviter des dissections fastidieuses pour un non-expert. C'est un avantage dans l'optique d'utiliser la drosophile comme « kit » de diagnostic par différents laboratoires, comme le sont les tests normalisés OCDE ou AFNOR. Ce choix a tout de même des conséquences sur le suivi d'expression de certains gènes. S'ils sont faiblement exprimés ou exprimés préférentiellement dans certains tissus, la visualisation de leur expression peut être difficile en raison de la dilution des ARNm moins facile à amplifier.

La normalisation des données pour la qPCR est une étape cruciale pour l'interprétation des résultats (Shakeel et al., 2018). La sélection du gène de ménage a été réalisée par régression via la méthode Bestkeeper (Pfaffl et al., 2004) en choisissant le gène le plus stable dans chacune des conditions. Il est important de réaliser ce type d'analyse car un gène de ménage dans une condition n'est pas nécessairement le même dans une condition différente (Ponton et al., 2011). Par exemple, aux cours de ces travaux, l'actine, la tubuline, la glucose-6-phosphate déshydrogénase, la phosphoglycérate kinase et la protéine ribosomale 20 ont été sélectionnées comme gènes candidats. Et nous avons pu voir dans les précédents chapitres, que certains d'entre eux ont été modulés sous conditions stressantes. Enfin, quelques études préconisent même l'utilisation de plusieurs gènes de ménages à la fois (Shakeel et al., 2018). La normalisation de l'expression des gènes a été faite sous qGene (Simon, 2003) mais d'autres calculs de normalisation sont aussi possibles.

Afin d'obtenir une base solide pour les résultats sur l'expression des gènes, nous avions suivi des recommandations du « MIQE » (*Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments*) (Bustin et al., 2009). En effet, plusieurs études pourraient être remises en question du fait de ne pas prendre en compte toutes les conditions liées à la réaction d'amplification comme l'efficacité réelle de la réaction.

Enfin, le contrôle de l'étude consistait à ne pas exposer les animaux en ajoutant de l'eau minérale potable. L'analyse des publications sur l'évaluation de la toxicité des effluents montre que plusieurs types d'eau « contrôle » peuvent être utilisés comme de

l'eau souterraine (Boisseaux et al., 2018; Gust et al., 2010), de l'eau du robinet (Smolders et al., 2003), de l'eau déchlorée (Flores et al., 2017) ou encore de l'eau distillée (Sharif et al., 2016). Ces choix ont été faits en fonction de la matrice de référence étudiée pour normaliser les résultats. Le choix du contrôle est donc crucial. Or il est difficile de définir une eau de référence pour les eaux usées brutes tant leurs compositions et origines sont différentes. Il est apparu plus pertinent, au départ, de choisir une eau minérale commercialisée (*Cristaline*) comme eau de référence parce que sa composition est souvent très stable même sur plusieurs années et elle ne nécessite pas d'équipements coûteux pour la produire (comme c'est le cas pour l'eau distillée ou déchlorée).

3. Quelle relation entre la physico-chimie et la toxicité mesurée ?

Au total, la toxicité de quinze échantillons d'eaux usées avec des origines et des compositions chimiques différentes a été mesurée (chapitre II). Des effets toxiques ont parfois été corrélés avec la présence de polluants en plus fortes concentrations (chapitre IV). En effet en 2018, les eaux usées du site 6 de Saint-Ouen l'Aumône (SOA-6) ont induit une importante mortalité des individus et la réduction de la taille des pupes. Ces eaux usées contenaient plusieurs métaux toxiques et des AOX. En 2019, les eaux usées industrielles de Boissy l'Aillerie (BOI-1) ont induit les effets retards les plus sévères et une baisse de la fertilité des adultes. Elles contenaient des fortes concentrations de HAPs et métaux. Cependant, nous avons aussi vu que certaines eaux usées affichaient des concentrations élevées de polluants sans nécessairement induire des effets toxiques (ex. eaux usées industrielles du site 2 de Saint-Ouen l'Aumône). Il apparaît donc que d'autres éléments que ceux mesurés entrent en compte dans l'expression de la toxicité chez la drosophile.

Si l'on s'intéresse uniquement à la significativité des micropolluants (ce qui déclenche la prise de mesures réglementaires selon la note technique du 12 août 2016), l'information peut être trompeuse. Les eaux usées industrielles du site 5 de Saint-Ouen l'Aumône, SOA-5 2018, ne présentaient qu'un seul paramètre significatif (cuivre) et pourtant les eaux usées ont induit la mortalité des pupes et des effets importants de retard de développement chez les larves. Les substances précédemment étudiées en laboratoire ont permis de mettre en lumière que les modifications macroscopiques s'observent généralement à fortes concentrations, bien au-delà de

celles mesurées dans les eaux usées. Ainsi, soit de fortes concentrations de substances non analysées étaient présentes, soit des effets synergiques s'opéraient.

Sarakinos et al. (2000) ont montré que les mesures physico-chimiques ne peuvent pas expliquer la totalité des effets toxiques observés. Et, de surcroît, la physico-chimie pouvait avoir tendance à surestimer ou sous-estimer la toxicité des effluents. Des expériences menées avec des tests « kits » de toxicité standardisés basés sur des modèles crustacés (*D. magna*) ou algues (*P. subcapitata*) ont permis d'obtenir les mêmes conclusions ; les résultats toxicologiques n'étaient pas toujours en phase avec les prédictions faites par l'analyse des polluants présents (Mendonça et al., 2009; Vasquez et Fatta-Kassinos, 2013; Yu et al., 2019). Notre modèle drosophile semble avoir des réponses similaires à ces tests, montrant que physico-chimie et toxicologie ne sont pas systématiquement en phase. L'utilisation d'un bioessai en plus de la physico-chimie pour la recherche de substances toxiques apporte donc une plus-value à l'étude.

4. Quelle est la place de la drosophile en tant que bioessai ?

Au cours de mes travaux de thèse, j'avais réfléchi à l'utilisation de plusieurs modèles. Comme le font remarquer Power et Boumphrey (2004), l'agence de protection de l'environnement américaine (US EPA) recommande l'utilisation de plusieurs espèces de niveaux trophiques différents pour l'évaluation toxicologique en milieu naturel. Les juridictions européennes et françaises ont plus récemment émis les mêmes recommandations. Le contexte des eaux usées est assez différent puisqu'il n'y a pas réellement d'espèces endémiques hormis des microorganismes.

Dans de nombreuses études, ce sont des batteries de bioessais qui sont utilisées pour l'évaluation des effets de mélanges ou des eaux usées (Carvalho et al., 2014; Harbi et al., 2017; Yu et al., 2019). La plupart du temps un seul phénotype ou biomarqueur est suivi par bioessai. Il faut donc cumuler le résultat de plusieurs de ces outils pour avoir le plus d'informations possibles sur les effets toxiques des pollutions. De plus, définir une stratégie avec des organismes de plusieurs niveaux trophiques n'apparaissait pas pertinent dans le contexte des eaux usées brutes ; il semblait plus intéressant de développer un bioessai multi-échelles permettant d'analyser diffé-

rents traits de vie couplés à l'analyse de marqueurs moléculaires. Les organismes dont le génome et transcriptome sont connus représentent de ce fait un atout.

Les approches *in vivo* sur organismes entiers sont souvent privilégiées dans le contexte réglementaire de la protection des milieux (Power et Boumphrey, 2004) car ils sont plus proches des conditions *in natura* et permettent une extrapolation à l'échelle des populations et écosystèmes. Les tests *in vitro* sur un tissu ou une culture cellulaire sont donc moins représentatifs de ce qui se passe en milieu naturel mais permet plus facilement de caractériser un effet toxique précis grâce à des protocoles simples et reproductibles (Power et Boumphrey, 2004). Cependant, au même titre que les bioessais normés, ces analyses in vitro permettent souvent d'analyser qu'un seul paramètre à la fois offrant une vision plus réductrice de la toxicité (Corvi et al., 2016). Par ailleurs, pour que l'outil *in vitro* soit pertinent, il faut aussi s'assurer que les réponses des tissus ou cellules extraites de l'organisme soient représentatives de ce qui se passe dans l'organisme concerné (Futran Fuhrman et al., 2015). Ainsi, cela est souvent compensé par l'utilisation d'une batterie de bioessais. Dans le contexte des eaux usées, nous cherchions plutôt à évaluer la toxicité de manière simplifiée dans le cadre de la recherche de plusieurs sources d'émission polluante. Il y avait donc plus de liberté dans le choix des modèles et de la méthode (*in vivo/in vitro*). La problématique se situe surtout sur la réduction du nombre de bioessais ou organismes à tester pour éviter les études longues, fastidieuses et coûteuses qui ne pourraient pas être employées en routine.

Enfin, Vasquez et Fatta-Kassinos (2013) ont décrit que le principe d'un test biologique repose sur l'évaluation d'un effluent sans traitement ni dilution au préalable. Notre protocole d'exposition permet de directement tester un effluent brut.

Le modèle drosophile répond à beaucoup de ces critères. Même s'il y a encore du travail au niveau du développement de cet outil, nos résultats ont montré son potentiel d'utilisation dans la recherche de substances toxiques au travers d'une large gamme de paramètres macroscopiques et moléculaires.

5. Quel retour d'expérience pour une structure telle que le SIARP ?

Le retour d'expérience dans ce type de contexte est souvent précieux et permet de prendre du recul dans l'exercice de son activité et d'anticiper des besoins futurs. Un projet de recherche et développement à l'interface du monde académique et de l'opérationnel doit pouvoir satisfaire les exigences de chacun. Aussi, la communication entre les acteurs de ce projet a été un point clé.

Au cours des programmations de nos campagnes, nous avons pu rencontrer quelques difficultés entre l'attente de résultats pour la partie recherche d'une part et celle pour l'opérationnel d'autre part. Cela a été le cas pour la campagne de prélèvements de 2018. Des objectifs se sont entremêlés empêchant d'atteindre de façon optimale le but initialement fixé. C'est ainsi qu'un outil supplémentaire tel qu'un cahier des clauses techniques particulières s'avère pertinent. Au travers de cet outil, nous avons pu définir et expliciter nos exigences de façon bien plus précise et centrée et ce, entre les différents organismes concernés par le projet. Nous avons pu aussi affiner la précision de nos plans de prélèvements pour que la lecture soit rendue plus simple pour les prestataires et les personnes moins familières avec ce type de document. Ainsi, un plan de prélèvements doit idéalement contenir une vue du bassin de collecte échantillonné, une vue de la voirie et de l'emplacement précis du point de mesure, une vue de l'intérieur du réseau avec les dimensions et le sens de l'écoulement et enfin une photographie de son emplacement. Une base de données a été créée pour répertorier la méthodologie, les outils et les résultats permettant une organisation plus aisée des prochaines campagnes de prélèvements. Et aussi, faciliter la démarche pour les agents et personnes n'ayant pas nécessairement participé au projet depuis le départ.

Si l'on se place dans le contexte réglementaire, les gestionnaires des STEU – ouvrages davantage surveillés en raison de l'impact direct sur le milieu récepteur – doivent réaliser au moins six mesures espacées dans l'année sur leurs eaux usées en entrée et sortie de STEU. Idéalement, le gestionnaire du réseau pourrait faire autant de mesures et aux mêmes dates, pour tenter de comparer les résultats des micropolluants significatifs dans le réseau d'assainissement et en STEU, comme nous avons pu le faire en 2018 (nous avions décalé notre campagne de prélèvements la veille de ceux réalisés à la STEU). Evidemment, il est difficile de réaliser autant de mesures pour les raisons précédemment

énumérées, mais cette stratégie apparaît plutôt optimale pour la physico-chimie. Aussi, la communication avec les gestionnaires des systèmes d'assainissement (réseaux et STEU) est capitale pour établir ce type de stratégie. Au cours de ces travaux, nous avons parfois rencontré quelques difficultés à communiquer avec le gestionnaire délégataire de la STEU de Cergy-Neuville et ce, parfois pour des raisons politiques extérieures au projet de recherche. Ainsi, si le gestionnaire du réseau d'assainissement n'est pas également celui de la STEU, la communication doit être établie entre les deux parties lors de l'initiation du projet pour être en accord sur la méthodologie et les stratégies employées.

L'une des forces de mener un projet avec plusieurs acteurs de secteurs différents a été le partage d'expériences respectives de chacune des structures pilotes, le SIARP et le laboratoire. Le déploiement du bioessai et les analyses physico-chimiques ont permis au SIARP d'obtenir des résultats qualitatifs et quantitatifs de leur eaux usées. Via la physico-chimie, ils ont pu identifier et confirmer la présence de plusieurs pollutions dans leur réseau. Et via la toxicologie, ils ont pu cibler de nouveaux secteurs où la physico-chimie ne semblait pas indiquer de pollutions. Déployer un outil biologique a un coût réduit et permet une certaine rapidité de diagnostic en comparaison des analyses physico-chimiques qui nécessitent une forte technicité et qui mettent plus de temps à être obtenues – en plus du coût financier.

A terme, un tel outil pourrait faciliter la caractérisation des eaux usées pour une structure telle que le SIARP. Au cours de ce projet et au vu des résultats, le guide rédigé par le SIARP pourrait contenir une synthèse de la méthodologie à appliquer dans la recherche de sources d'émission dans les eaux usées brutes, avec plusieurs niveaux incluant le bioessai. En effet, le premier niveau intégrerait les connaissances et prérequis prioritaires (cartographie du réseau, déploiement des contrôles d'installations industrielles etc.). Le second niveau, en fonction des suspicions d'émission polluante ou non, consisterait à réaliser les essais de toxicité pour tenter d'identifier des bassins de collecte et sous-bassins sensibles. Et enfin, en fonction des résultats précédents et des étapes de réflexion, des mesures physico-chimiques pourraient être réalisées pour tenter d'identifier quelques types de substances potentiellement émises par rapport à ce que recommande la réglementation (note technique du 12 août 2016). La dernière étape, qui peut au final être appliquée à chacun de ces niveaux, serait la mise en place d'actions de réduction des pollutions – mise à jour des autorisations de déversements, renforcement des contrôles d'installations, inspections télévisuelles pour contrôler l'état du réseau, etc.

6. Quelles perspectives pour le bioessai ?

Ce bioessai peut servir d'outil de surveillance pour la qualité des eaux usées et l'identification de sources d'émission de substances dangereuses dans le réseau d'assainissement. Par ailleurs, plusieurs partenaires nous ont approchés en raison de l'idée innovante de ce bioessai. Mais avant de pouvoir être utilisé en routine, du développement est encore nécessaire.

Consolidation du protocole expérimental

De façon générale, le protocole appliqué dans les essais de toxicité semble porter ses fruits. L'une des premières choses à vérifier est de s'assurer de la répétabilité et de la reproduction des mesures. Les eaux usées, utilisées ici sans traitement, ont une nature qui peut évoluer rapidement. Les mesures doivent être effectuées rapidement et avec des fractions homogène de l'échantillon. De plus, la souche génétique du modèle choisi à sa part d'importance. Il faut que cette souche soit homogène afin de limiter la variabilité biologique comme nous avons tenté de le faire dans nos expériences avec la souche canton-S de laboratoire.

Les résultats reposent sur la comparaison avec un groupe contrôle, c'est un élément crucial dans une étude. Au cours de ces travaux, nous avons utilisé une seule eau contrôle pour comparer nos résultats. Mais il est envisageable de tester plusieurs conditions contrôles avec des eaux « propres » différentes (ex. souterraines, eaux traitées) afin d'évaluer et de caractériser la variabilité des réponses de la drosophile dans toutes ces conditions. De cette manière, des seuils dits de significativité biologique pourraient être mis en place. Si ces seuils sont dépassés, cela indique alors un effet toxique significatif pour l'organisme. Ils pourraient être fixés comme étant les moyennes des valeurs obtenues avec des eaux « propres » ou les valeurs supérieures pour chacun des paramètres mesurés. Ces seuils permettraient de n'avoir plus nécessairement besoin d'utiliser un contrôle interne à chaque expérience et de limiter les résultats à une significativité biologique.

Dans ces travaux, nous avons utilisé un milieu sec que nous avons réhydraté avec les eaux usées brutes directement. Bien que nous n'ayons pas prétraité les eaux usées avant les expériences, la biodisponibilité des polluants peut être changée avec ce milieu.

Nous n'avons pas mesuré la concentration des polluants dans la nourriture. Cependant, nous avons pu observer des effets en conditions contrôlées (polluants et concentrations connus) et en conditions eaux usées. Le mode d'exposition étant par contact et ingestion permet de contourner cette éventuelle limite. En effet, même si le polluant n'est pas biodisponible dans le milieu, il peut le redevenir après absorption par la larve. Evaluer la fraction biodisponible dans le milieu et la quantité ingérée par les larves apporterait cependant des informations intéressantes pour consolider le protocole d'exposition des animaux.

Enfin reste la question des effets de la charge bactérienne des eaux usées. Cette charge est probablement présente et n'a pas été éliminée avant les expériences, bien que cela a été envisagé par la filtration ou l'ajout d'antibiotiques. Nous avions suivi des marqueurs de l'immunité chez la drosophile afin de vérifier si un stress immunitaire pouvait être induit des effets sur notre animal. Les effets de pathogènes potentiellement présents ne doivent pas interférer avec nos résultats afin de suivre la pollution chimique dans les eaux usées. Les marqueurs d'immunité n'ont pas été affectés suite à l'exposition aux eaux usées, ce qui pourrait indiquer que les animaux n'ont pas subi de stress immunitaire. Ces résultats restent cependant à consolider avec des expériences complémentaires.

Caractérisation des biomarqueurs d'exposition et d'effet

Les traits de vie de la drosophile

Nous avons vu que plusieurs traits de vie suivis régulièrement comme la mortalité et le temps de développement apportent des informations essentielles pour établir le diagnostic toxicité. Mais de nouveaux paramètres peuvent venir agrandir la panoplie de biomarqueurs pour suivre la pollution dans les eaux usées et rendre plus robuste le diagnostic. De plus, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour confirmer le rôle et l'utilité des acteurs notamment moléculaires en tant que biomarqueurs de la pollution.

Dans un premier temps, étudier des nouvelles substances ou mélanges de substances pourrait aider à caractériser de nouveaux biomarqueurs et confirmer le rôle de ceux étudiés ici. De nombreuses substances sont présentes dans les eaux usées (ex. résidus pharmaceutiques) (Deblonde et al., 2011). Kortenkamp (2019) recommande dans un contexte réglementaire de tester en mélange des

substances en raison de leur importance et toxicité. De tels mélanges pourraient être testés pour continuer de caractériser et affiner les réponses des biomarqueurs macroscopiques et surtout moléculaires. Cependant, en raison du nombre illimité de combinaisons, les études pourraient devenir fastidieuses et longues, bien que notre protocole le permettrait. Aussi, des essais sur mélanges « recommandés » ou sur des mélanges très similaires aux eaux usées sont plutôt privilégiés. En fonction des résultats, des ajustements pourraient être effectués selon les besoins (ex. tests substances seules).

D'autres traits de vie, comme ceux que nous avons commencé à étudier aux cours de ces travaux tels que la taille des individus et la fertilité des adultes, sont pertinents pour caractériser des effets toxiques. La reproduction est une fonction essentielle chez un organisme vivant et plusieurs des modalités illustrant cette fonction sont observables chez la drosophile. En plus de la fertilité, la fécondité ou les comportements d'accouplement peuvent aussi être affectés par une exposition à des polluants contenus dans les eaux usées. La taille et le poids des individus peuvent également apporter une plus-value à l'étude. Une perte de poids ou une réduction de la taille par exemple, pourrait signifier une mauvaise croissance ou alimentation des individus exposés. Le comportement locomoteur s'avère également être un bon biomarqueur d'exposition de substances toxiques chez la drosophile (Kaur et al., 2015).

Au cours de ce projet, nous avons pu collaborer avec des collègues du laboratoire de biologie du développement de l'institut de biologie Paris-Seine. Ces chercheurs travaillent sur les mécanismes qui contrôlent le développement, la méiose et la fécondation chez *D. melanogaster*. Parmi ces mécanismes étudiés, l'asymétrie fluctuante et la pigmentation sont des critères qui peuvent être affectés par des drogues et substances durant le développement. Nous, organismes bilatéraux, ne sommes pas parfaitement symétrique entre les côtés droit et gauche. Et cette imperfection est appelée asymétrie fluctuante (Debat, 2016). Cette variabilité est due à des évènements aléatoires durant le développement. Ainsi, si la symétrie d'un individu est d'autant plus imparfaite (basculée), cela peut être le signe d'une instabilité développementale due à des changements d'expression des gènes (Debat et Peronnet, 2013). Une exposition à des substances chimiques pourrait influencer la symétrie des organismes bilatéraux et être utilisée comme marqueur de stress. Par exemple, Flores et al. (2017) ont mesuré l'asymétrie fluctuante chez des têtards de l'espèce P. cuvieri exposés à des eaux usées industrielles. La symétrie des individus a été changée suite à cette exposition, ce qui montre que ce paramètre peut donc

servir de biomarqueur d'exposition. Nous avons alors commencé des essais sur la drosophile en condition simple avec un seul polluant à la fois avant de passer aux eaux usées.

L'approche moléculaire

La cinétique de toxicité des substances va agir sur la cinétique d'expression des gènes. Pour confirmer le rôle et l'utilité de certaines biomarqueurs moléculaires dans la capacité d'identifier une perturbation endocrinienne par exemple ou encore un stress lié à la présence de métaux, il est nécessaires d'enquêter plus globalement sur la cinétique de ces acteurs moléculaires et de façon plus globale sur les mécanismes moléculaires qui pourraient être affectés à la suite d'une exposition.

Dans ces travaux, l'expression des gènes chez les larves a été regardée 4 jours après l'éclosion des œufs, ce qui correspond à environ 3 jours d'exposition. De ce fait, des effets court et long termes sur l'expression des gènes ont été plusieurs fois discutés sur les données de biologie moléculaire. Il serait intéressant d'étudier la cinétique de l'expression de ces gènes, tout du moins ceux qui présentent des résultats intéressant dans un premier temps, à différents stades de vie de la drosophile et à des temps plus ou moins courts d'exposition. De cette manière, il sera possible d'évaluer si des mécanismes de récupération ou si une expression différentielle sont observés à ces différents moments. Ces résultats seraient très éclairant pour comprendre les modes d'actions des polluants des eaux usées et confirmer ainsi le rôle des biomarqueurs d'exposition et d'effets (ex. marqueur d'une perturbation endocrinienne, stress métal, stress général, etc.).

Avec l'équipe du laboratoire de Madrid, l'UNED, qui travaille sur le chironome, des essais de comet assay ont été entrepris afin de pouvoir développer des biomarqueurs de génotoxicité chez les larves de la drosophile. La génotoxicité permettrait d'obtenir des informations sur l'intégrité du matériel génétique. De plus, c'est un des critères utilisés dans le classement de substances dangereuses à l'instar de la reproduction (produit CMR pour cancérogène, mutagène et reprotoxique) et donc pertinent dans les études toxicologiques.

Les travaux de Kohane (1994) sur la drosophile suggèrent une relation étroite entre l'énergie et l'expression des gènes. En supplémentant les milieux avec la coenzyme NAD (impliquée dans le métabolisme de l'énergie), le temps de développement de la drosophile a été réduit dans les expériences de Kohane (1994). L'allo-

cation de l'énergie peut donc directement influencer l'expression des gènes et le temps de développement. Des marqueurs du métabolisme énergétique pourraient être ainsi mesurés. Et nous pourrions aussi nous tourner vers l'étude du protéome pour compléter les résultats sur l'expression des gènes. En effet, en raison des liens existants entre ARNm, protéines et molécules signales, une vue d'ensemble pourrait aider à mieux comprendre les mécanismes impliqués et à mieux les caractériser.

Les études moléculaires occupent une place de choix dans une étude. Elles permettent d'avoir une approche plus intégrée et de lier des effets observables à l'échelle de l'individu à des mécanismes affectés ou mis en place. Les possibilités d'évolution sont nombreuses, en particulier chez la drosophile où les connaissances sont riches. Aussi, les outils pour étudier les molécules sont en constante évolution et deviennent de plus en plus facilement performants et accessibles. Par exemple et pour pallier à certaines limites des techniques utilisées comme la qPCR et compléter voire renforcer nos analyses, d'autres techniques peuvent être envisagées suite aux dernières avancées technologiques. Par exemple, la PCR digitale permet une quantification absolue de la quantité de gènes transcrits et a l'avantage de limiter la variabilité liée aux manipulations de l'expérimentateur. La technologie NanoString permet également et de manière rentable d'établir le profil de plusieurs centaines de séquences d'ARNm ou d'ADN avec précisions. Cette technologie utilise des « codes barres » moléculaires afin de compter le nombre de plusieurs molécules ciblées directement (ex. transcrits) dans une seule réaction. L'un des avantages de cette méthode est aussi l'absence de de rétrotranscription et d'amplification qui peuvent représenter des biais dans l'analyse.

Un système de score

*In fin*e, un système de score devra être mis en place avec l'ensemble des biomarqueurs choisis, tel que cela a déjà été fait pour d'autres bioessais (Libralato et al., 2010). En fonction de l'ensemble des critères toxiques mesurés et de leurs scores, une note sera attribuée à chaque secteur étudié sur le réseau. En fonction de cette note, la priorité sera donnée ou non pour approfondir la recherche sur les sources d'émission polluante. De plus, la représentation cartographique des indices avec les scores apportera de la clarté pour apprécier l'ensemble des résultats. Ce système largement inspiré de la procédure DCE et des indices écologiques et chimiques aura pour avantage d'être clair et parlant.

Glossaire

Adsorption : rétention à la surface d'une matière solide, de molécules en phase gazeuse ou liquide.

Assainissement : ensemble des moyens de collecte, de transport et de traitement des eaux usées avant leur restitution au milieu récepteur. L'assainissement peut être collectif lorsqu'il y a raccordement à un réseau d'égout ou non collectif lorsqu'une zone est autonome non raccordée à un réseau.

Bioaccumulation : processus par lequel les organismes vivants absorbent et stockent dans leurs tissus des substances exogènes présentes dans l'environnement.

Bioamplification : ou biomagnification, transfert des substances exogènes bioaccumulées au travers du réseau trophique (« chaine alimentaire »).

Biodégradation : dégradation de substances par les organismes vivants.

Biodisponibilité : fraction d'une substance pouvant être absorbée par un organisme vivant.

Biomarqueur : caractéristique biologique mesurable sur un organisme vivant permettant d'évaluer si des constantes physiologiques sont considérées « normales » ou non. Il peut permettre, dans un cadre toxicologique, d'évaluer la présence, l'effet ou la sensibilité à un ou plusieurs polluants. Ces caractéristiques peuvent se voir de la plus petite échelle à la plus grande (de la molécule aux populations).

Débit d'étiage : débit moyen le plus faible d'un cours d'eau.

Développement durable : organisation et développement de la société de manière à assurer sa pérennité en répondant aux besoins actuels sans compromettre les besoins futurs (ex. préservation de l'environnement, droits sociaux- économiques...).

Diagnostic amont : diagnostic pour identifier les points d'apports potentiels de micropolluants dans les réseaux d'assainissement et définir un programme d'actions pour les réduire.

Eaux usées : eaux ayant été utilisées par l'homme. On distingue généralement les eaux usées d'origine domestique, industrielle ou agricole. Ces eaux sont rejetées dans le milieu naturel directement ou par l'intermédiaire de systèmes de collecte avec ou sans traitement. On parle également d'eaux résiduaires.

Ecosystème : communauté d'être vivant au sein d'un milieu spécifique en constante interaction entre eux.

Effet cocktail : désigne un mélange de plusieurs substances chimiques pouvant être nocif pour les organismes vivants. Les effets de ces mélanges sont souvent inattendus et peuvent accroître la toxicité des substances du fait de cette combinaison.

Effluent : ensemble des eaux usées transitant dans le réseau d'assainissement.

Equivalent-habitant (EH) : unité de mesure basé sur la quantité de pollution émise par une personne et permettant ainsi l'évaluation de la capacité de la station d'épuration. 1 EH représente 60 grammes de demande biologique en oxygène (DBO_5) par jour.

Eutrophisation : phénomène d'origine anthropique d'accumulation de nutriment dans un milieu privant d'oxygène les êtres vivants y habitants.

Exposition aiguë : exposition d'une substance sur un temps très court par rapport à la durée de vie de l'organisme (de quelques secondes à quelques jours pour un être humain). Exposition chronique : exposition d'une substance sur temps long ou continue par rapport à la durée de vie d'un organisme (de quelques mois à quelques années ou toute sa vie pour un être humain).

Exposition chronique : exposition d'une substance sur un temps long ou continu par rapport à la durée de vie d'un organisme (de quelques mois à quelques années ou toute sa vie pour un être humain).

Facteur de transcription : une protéine nécessaire à l'initiation ou à la régulation de la transcription d'un gène dans l'ensemble du vivant.

Floculant : permet la floculation. Procédé permettant l'agglomération des matières en suspensions dans un liquide pour permettre leur épuration via une décantation plus rapide.

Holométabole : ou endoptérygote caractérise les insectes capables de réaliser une métamorphose complète. Les stades juvéniles étant très différents des stades imagos.

Gène : unité de base d'hérédité portant l'information génétique déterminant un trait précis d'un individu.

Gène de ménage : ou gène de référence. Gène qui s'exprime de façon ubiquiste dans les tissus et cellules de façon peu variable et dont la fonction est vitale et souvent conservé par plusieurs espèces dans l'évolution. Les gènes de ménages permettent ainsi une normalisation de l'expression génétique d'autres gènes en comparaison.

Macropolluant : en opposition au micropolluant. Ensemble de substances comprenant les matières en suspension, les matières organiques et les nutriments, comme l'azote et le phosphore. Leur impact est visible à des concentrations relativement élevées.

Micropolluant : en opposition au macropolluant. Substance minérale et organique, synthétique ou naturelle susceptible d'engendrer des effets indésirables sur les milieux aquatiques et la santé humaine même à très faible concentration (µg/L et ng/L) en raison de sa toxicité, de sa persistance et ou de sa bioaccumulation.

Micropolluant significatif : micropolluant quantifié au-dessus de seuils de référence tels qu'une NQE ou un flux GEREP selon l'annexe 6 de la note technique ministérielle du 12 août 2016.

Milieu récepteur : lieu où les eaux usées et traitées sont déversées (lac, rivière, fleuve, océan, mer...).

Norme de Qualité Environnementale (NQE) et Valeur Limite d'Emission (VLE) : concentration d'un micropolluant (ou d'un groupe de micropolluants) définie pour l'eau, les sédiments ou le biote qui ne doit pas être dépassé, afin de protéger la santé humaine et l'environnement. Les NQE et les VLE sont définies par la réglementation et sont des seuils distincts en fonction de la matrice de référence.

Phéromone : molécule chimique produite par un individu qui induit un comportement spécifique chez un autre individu appartenant à la même espèce.

PCR : de l'anglais « polymerase chain reaction », est une technique de biologie moléculaire qui vise à amplifier un fragment de gène spécifiquement choisi afin d'en visualiser sa présence ou quantité lorsque le suivi est réalisé au cours des cycles d'amplification à l'aide d'un fluorochrome.

Perturbateur endocrinien : se dit d'une substance pouvant agir sur le système endocrinien d'un organisme vivant. Toutes molécules capables de s'attaquer aux systèmes hormonaux des êtres vivants incluant l'Homme, peut être considérées comme un perturbateur endocrinien.

Polluant émergent : ou micropolluant émergent, se dit d'une substance présente dans l'environnement dont on n'avait pas conscience avant l'amélioration des techniques analytiques. Ce ne sont donc pas de « nouveaux » polluants à proprement parlé mais des polluants déjà existants. On peut citer par exemple les résidus médicamenteux.

Réseau d'assainissement : canalisations chargées de collecter et transporter les eaux résiduaires jusqu'aux émissaires menant à la station d'épuration. Il existe plusieurs configurations ; l'unitaire ou le séparatif permettant ou non le transport des eaux pluviales séparément des eaux usées.

Rural : en opposition à urbain. Qualificatif des secteurs en dehors des zones urbanisées, des villes. La densité de population est plus faible qu'en ville et les métiers moins variés. Souvent l'agriculture est fortement présente. La plupart du temps, hormis quelques zones d'activités commerciales, c'est plutôt de l'habitat qu'on y retrouve.

Sex-ratio : ratio entre le nombre d'individus de sexe mâle et de sexe femelle dans une population. Chez *Drosophila melanogaster*, le sex-ratio est de 1 :1.

Spéciation : forme chimique et structurale d'un élément.

Station de traitement des eaux usées : (ou station d'épuration) ouvrage d'assainissement capable de dépolluer les eaux usées brutes en provenance des réseaux d'assainissement avant leur rejet au milieu aquatique. Plusieurs niveaux de traitement peuvent être appliqués en fonction des eaux usées reçues.

Surverse unitaire : déversement par temps de pluie du mélange eaux pluviales et eaux usées directement dans l'environnement afin d'éviter une surcharge du réseau unitaire.
Toxicocinétique : en toxicologie, il s'agit de la cinétique d'un xénobiotique à travers l'organisme. Il dépend notamment du processus ADME (absorption, digestion, métabolisation, excrétion).

Toxicodynamique : en toxicologie, c'est la capacité d'un xénobiotique à induire une réponse toxique sur un organisme. Cette capacité dépend de la toxicocinétique de ce dernier (parcours dans l'organisme).

Urbain : en opposition à rural. Terme qualifiant un territoire urbanisé, qui est relatif à la ville et aux activités qui y sont liées. La densité de population y est importante tout autant que la variabilité de métiers.

Xénobiotique : molécule étrangère et souvent toxique à un organisme vivant, n'étant généralement pas présente dans son environnement habituel.

Références bibliographiques

Abdel-Shafy, H.I., Mansour, M.S.M., 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. Egypt. J. Pet. 25, 107-123. https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011

Abnoos, H., Fereidoni, M., Mahdavi-Shahri, N., Haddad, F., Jalal, R., 2013. Developmental study of mercury effects on the fruit fly (*Drosophila melanogaster*). Interdiscip. Toxicol. 6, 34-40. https://doi.org/10.2478/intox-2013-0007

Adams, M.D., Celniker, S., Holt, R., Evans, C.A., Gocayne, J., Amanatides, P., Scherer, S.E., Li, P.W., Hoskins, R.A., Galle, R.F., George, R.A., Lewis, S.E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S.N., Sutton, G.G., Wortman, J.R., Yandell, M.D., Zhang, Q., Chen, L.X., Brandon, R.C., Rogers, Y.-H.C., Blazej, R.G., Champe, M., Pfeiffer, B.D., Wan, K.H., Doyle, C., Baxter, E.G., Helt, G., Nelson, C.R., Bayraktaroglu, L., Beasley, E.M., Beeson, K.Y., Benos, P. V., Berman, B.P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M.R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K.C., Doup, L.E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B.C., Dunn, P., Durbin, K.J., Evangelista, C.C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A.E., Gar, N.S., Gorrell, J.H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N.L., Harvey, D., Heiman, T.J., Hernandez, J.R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K.A., Howland, T.J., Wei, M.-H., Ibegwam, C., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A.A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T.C., McLeod, M.P., McPherson, D., Merkulov, G., Mil, N. V., Puri, V., Reese, M.G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R.D.C., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B.C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M.P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A., Venter, J.C., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science (80-.). 287, 2196-2204. https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2011.06.004

Adedara, I.A., Rosemberg, D.B., Souza, D.O., Farombi, E.O., Aschner, M., Rocha, J.B.T., 2016. Neuroprotection of luteolin against methylmercury-induced toxicity in lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*. Environ. Toxicol. Pharmacol. 42, 243-251. https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.02.001

AESN-Aquascop, 2018. Guide pratique des micropolluants dans les eaux du bassin Seine-Normandie.

Ahel, M., Giger, W., Koch, M., 1994. Behaviour of Alkylphenol Polyethoxylate Surfactants in the Aquatic Environment-I. Occurrence and Transformation in Sewage Treatment. ~ Pergamon Wat. Res 28, 1131-1142.

Akins, J.M., Schroeder, J.A., Browert, D.L., Aposhian, H. V, 1992. Evaluation of Drosophila-Melanogaster As an Alternative Animal for Studying the Neurotoxicity of Heavy-Metals. Biometals 5, 111-120. https://doi.org/10.1007/BF01062222

Alegbeleye, O.O., Opeolu, B.O., Jackson, V.A., 2017. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Critical Review of Environmental Occurrence and Bioremediation. Environ. Manage. 60, 758-783. https://doi.org/10.1007/s00267-017-0896-2

Altenburger, R., Scholze, M., Busch, W., Escher, B.I., Jakobs, G., Krauss, M., Krüger, J., Neale, P.A., Ait-Aissa, S., Almeida, A.C., Seiler, T.B., Brion, F., Hilscherová, K., Hollert, H., Novák, J., Schlichting, R., Serra, H., Shao, Y., Tindall, A., Tolefsen, K.E., Umbuzeiro, G., Williams, T.D., Kortenkamp, A., 2018. Mixture effects in samples of multiple contaminants – An inter-laboratory study with manifold bioassays. Environ. Int. 114, 95-106. https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.013

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. Aquat. Toxicol. 76, 160-202. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.08.015

Antizar-ladislao, B., 2008. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT) -contaminated marine environment . A review. Environ. Int. 34, 292-308. https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.09.005

Arbeitman, M.N., Furlong, E.E.M., Imam, F., Johnson, E., Null, B.H., Baker, B.S., Krasnow, M.A., Scott, M.P., Davis, R.W., White, K.P., 2002. Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. Science (80-.). 297, 2270-2275. https://doi.org/10.1126/science.1072152

Aronson, J.K., Ferner, R.E., 2017. Biomarkers — a general review. Curr. Protoc. Pharmacol. 2017, 9.23.1-9.23.17. https://doi.org/10.1002/cpph.19

Atli, E., 2013. The effects of three selected endocrine disrupting chemicals on the fecundity of fruit fly, *Drosophila melanogaster*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 91, 433-437. https://doi.org/10.1007/s00128-013-1083-7

Atli, E., Unlu, H., 2012. Developmental and Reproductive Effects of Bisphenol A (Bpa) in *Drosophila Melanogaster*. Biol. & Chem. 40, 61-68.

Aviles, A., Boulogne, I., Durand, N., Maria, A., Cordeiro, A., Bozzolan, F., Goutte, A., Alliot, F., Dacher, M., Renault, D., Maibeche, M., Siaussat, D., 2019. Effects of DEHP on post-embryonic development, nuclear receptor expression, metabolite and ecdysteroid concentrations of the moth *Spodoptera littoralis*. Chemosphere 215, 725-738. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.102

Azevedo-Pereira, H.M.V.S., Abreu, S.N., Lemos, M.F.L., Soares, A.M.V.M., 2012. Bioaccumulation and elimination of waterborne mercury in the midge larvae, *Chironomus riparius* meigen (diptera: Chironomidae). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 89, 245-250. https://doi.org/10.1007/s00128-012-0674-z

Azimi, A., Azari, A., Rezakazemi, M., Ansarpour, M., 2017. Removal of Heavy Metals from Industrial Wastewaters: A Review. ChemBioEng Rev. 4, 37-59. https://doi.org/10.1002/cben.201600010

Baglan, H., Lazzari, C.R., Guerrieri, F.J., 2018. Glyphosate impairs learning in *Aedes aegypti* mosquito larvae at field-realistic doses. J. Exp. Biol. 221. https://doi.org/10.1242/jeb.187518

Balamurugan, K., Egli, D., Selvaraj, A., Zhang, B., Georgiev, O., Schaffner, W., 2004. Metal-responsive transcription factor (MTF-1) and heavy metal stress response in Drosophila and mammalian cells: a functional comparison. Biol Chem. 385, 597-603. https://doi.org/10.1515/BC.2004.074

Ballesteros, O., Zafra, A., Navalón, A., Vílchez, J.L., 2006. Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples. J. Chromatogr. A 1121, 154-162. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.014

Batiste-Alentorn, M., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R., 1994. Further studies with the somatic white-ivory system of Drosophila melanogaster: genotoxicity testing of ten carcinogens. Environ. Mol. Mutagen. 24, 143-147. https://doi.org/10.1002/em.2850240210

Beauvais-flück, R., Slaveykova, V.I., Cosio, C., 2017. Cellular toxicity pathways of inorganic and methyl mercury in the green microalga Chlamydomonas reinhardtii. Sci. Rep. 7(1), 8034. https://doi.org/10.1038/s41598-017-08515-8

Benamú, M.A., Schneider, M.I., Sánchez, N.E., 2010. Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae), in laboratory. Chemosphere 78, 871-876. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.027

Benfenati, E., Gini, G., Hoffmann, S., Luttik, R., 2010. Comparing In Vivo , In Vitro and In Silico Methods and Integrated Strategies for Chemical Assessment : Problems and Prospects. Altern. to Lab. Anim. 38, 153-166.

Bergé, A., Gasperi, J., Rocher, V., Gras, L., Coursimault, A., Moilleron, R., 2014. Phthalates and alkylphenols in industrial and domestic effluents: Case of Paris conurbation (France). Sci. Total Environ. 488-489, 26-35. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.081

Besnault, S., Choubert, J.-M., Miège, C., Martin-Ruel, S., Noyon, N., Esperanza, M., Budzinski, H., Le Menach, K., Dherret, L., Bados, P., Coquery, M., 2015. Devenir des micropolluants adsorbables à travers les procédés de traitement des boues. TSM 84-102. https://doi.org/10.1051/tsm/201503084

Bisson, M., Diderich, R., Dujardin, R., Hulot, C., Laroix, G., Lamy, M.., Lefevre, J.., Leveque, S., Magaud, H., Tissot, S., 2006. Benzo[a]pyrène. Ineris 1-44.

Bisson, M., Diderich, R., Houeix, N., Hulot, C., Lacroix, G., Lefevre, J.., Leveque, S., Magaud, H., Morin, A., Pépin, G., Pichard, A., 2011. Cadmium et ses dérivés, Ineris.

Bixler, A., Schnee, F.B., 2018. The effects of the timing of exposure to cadmium on the oviposition behavior of Drosophila melanogaster. BioMetals 31, 1075-1080. https://doi.org/10.1007/s10534-018-0148-9

Bjørklund, G., Dadar, M., Mutter, J., Aaseth, J., 2017. The toxicology of mercury: Current research and emerging trends. Environ. Res. 159, 545-554. https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.051

Blanchard, M., Teil, M.J., Ollivon, D., Legenti, L., Chevreuil, M., 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in wastewaters and sewage sludges from the Paris area (France). Environ. Res. 95, 184-197. https://doi.org/10.1016/j.envres.2003.07.003

Boisseaux, P., Noury, P., Delorme, N., Perrier, L., Thomas-Guyon, H., Garric, J., 2018. Immunocompetence analysis of the aquatic snail Lymnaea stagnalis exposed to urban wastewaters. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 16720-16728. https://doi.org/10.1007/s11356-018-1790-z

Bomboi, M.T., Hernández, A., 1991. Hydrocarbons in urban runoff: Their contribution to the wastewaters. Water Res. 25, 557-565. https://doi.org/10.1016/0043-1354(91)90128-D

Booc, F., Thornton, C., Lister, A., MacLatchy, D., Willett, K.L., 2014. Benzo[a]pyrene effects on reproductive endpoints in *Fundulus heteroclitus*. Toxicol. Sci. 140, 73-82. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu064

Borowska, J., Pyza, E., 2011. Effects of heavy metals on insect immunocompetent cells. J. Insect Physiol. 57, 760-770. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.02.012

Briand, C., Bressy, A., Chebbo, G., Deroubaix, J.-F., Deshayes, S., Deutsch, J.-C., Gasperi, J., Gromaire, M.-C., Le Roux, J., Moilleron, R., Tassin, B., 2018. Que sait-on des micropolluants dans les eaux urbaines ?

Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., Hu, L.S., Cheng, H.-L., Jedrychowski, M.P., Gygi, S.P., David, A., Alt, F.W., Greenberg, M.E., 2004. Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. Science (80-.). 303, 2011-2015. https://doi.org/10.1126/science.1094637

Burns, M., Valdivia, H., 2008. Modelling the limit of detection in real-time quantitative PCR. Eur. Food Res. Technol. 226, 1513-1524. https://doi.org/10.1007/s00217-007-0683-z

Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. Clin. Chem. 55, 611-622. https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797

Caballero-Gallardo, K., Olivero-Verbel, J., L. Freeman, J., 2016. Toxicogenomics to Evaluate Endocrine Disrupting Effects of Environmental Chemicals Using the Zebrafish Model. Curr. Genomics 17, 515-527. https://doi.org/10.2174/1389202917666160513105959

Calabrese, E.J., Dhawan, G., Kapoor, R., Iavicoli, I., Calabrese, V., 2015. What is hormesis and its relevance to healthy aging and longevity ? Biogerontology 16, 693-707. https://doi.org/10.1007/s10522-015-9601-0

Camacho-Muñoz, D., Martín, J., Santos, J.L., Aparicio, I., Alonso, E., 2014. Occurrence of surfactants in wastewater: Hourly and seasonal variations in urban and industrial wastewaters from Seville (Southern Spain). Sci. Total Environ. 468-469, 977-984. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.020

Cao, H., Wiemerslage, L., Marttila, P.S.K., Williams, M.J., Schiöth, H.B., 2016. Bis-(2-ethylhexyl) phthalate increases insulin expression and lipid levels in *Drosophila melanogaster*. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 119, 309-316. https://doi.org/10.1111/bcpt.12587

Carlsson, G., Tydén, E., 2018. Development and evaluation of gene expression biomarkers for chemical pollution in common frog (Rana temporaria) tadpoles. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 33131-33139. https://doi.org/10.1007/s11356-018-3260-z

Carvalho, R.N., Arukwe, A., Ait-Aissa, S., Bado-Nilles, A., Balzamo, S., Baun, A., Belkin, S., Blaha, L., Brion, F., Conti, D., Creusot, N., Essig, Y., Ferrero, V.E.V., Flander-Putrle, V.V., Fürhacker, M., Grillari-Voglauer, R., Hogstrand, C., Jonáš, A., Kharlyngdoh, J.B., Loos, R., Lundebye, A.K., Modig, C., Olsson, P.E., Pillai, S., Polak, N., Potalivo, M., Sanchez, W., Schifferli, A., Schirmer, K., Sforzini, S., Stürzenbaum, S.R., Søfteland, L., Turk, V., Viarengo, A., Werner, I., Yagur-Kroll, S.S., Zounkova, R., Lettieri, T., 2014. Mixtures of chemical pollutants at European legislation safety concentrations: How safe are they? Toxicol. Sci. 141, 218-233. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu118

Cervera, A., Maymó, A.C., Sendra, M., Martínez-Pardo, R., Garcerá, M.D., 2004. Cadmium effects on development and reproduction of *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae). J. Insect Physiol. 50, 737-749. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2004.06.001

Česen, M., Lenarčič, K., Mislej, V., Levstek, M., Kovačič, A., Cimrmančič, B., Uranjek, N., Kosjek, T., Heath, D., Dolenc, M.S., Heath, E., 2018. The occurrence and source identification of bisphenol compounds in wastewaters. Sci. Total Environ. 616-617, 744-752. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.252

Céspedes, R., Lacorte, S., Raldúa, D., Ginebreda, A., Barceló, D., Piña, B., 2005. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain). Chemosphere 61, 1710-1719. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.03.082

Chapman, P.M., 1995. Bioassay testing for Australia as part of water quality assessment programmes. Aust. J. Ecol. 20, 7-19. https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1995.tb00517.x

Chauhan, V., Srikumar, S., Aamer, S., Pandareesh, M.D., 2017. Methylmercury exposure induces sexual dysfunction in male and female *Drosophila melanogaster*. Int. J. Environ. Res. Public Health 14, 1108. https://doi.org/10.3390/ijerph14101108

Chen, M.Y., Liu, H.P., Liu, C.H., Cheng, J., Chang, M.S., Chiang, S.Y., Liao, W.P., Lin, W.Y., 2018. DEHP toxicity on vision, neuromuscular junction, and courtship behaviors of Drosophila. Environ. Pollut. 243, 1558-1567. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.063

Chen, T., Chou, S., Tang, C., Chen, C., Meng, P., Ko, F., Cheng, J., 2016. Endocrine disrupting effects of domestic wastewater on reproduction, sexual behavior, and gene expression in the brackish medaka Oryzias melastigma. Chemosphere 1-10. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.057

Chen, Z., Wu, X., Luo, H., Zhao, L., Ji, X., Qiao, X., Jin, Y., Liu, W., 2016. Acute exposure of mercury chloride stimulates the tissue regeneration program and reactive oxygen species production in the *Drosophila* midgut. Environ. Toxicol. Pharmacol. 41, 32-38. https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.11.009

Coquery, M., Pomies, M., Martin-Ruel, S., Budzinski, H., Miege, C., Esperanza, M., Soulier, C., Choubert, J.M., 2011. Mesurer les micropolluants dans les eaux usées brutes et traitées. Protocoles et résultats pour l'analyse des concentrations et des flux. Tech. - Sci. - Methodes 25-43.

Corvi, R., Vilardell, M., Aubrecht, J., Piersma, A., 2016. Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing Series; Ensuring the Quality of Stem Cell-Derived In Vitro Models for Toxicity Testing. Adv. Exp. Med. Biol. 856, 55-132. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33826-2

Costa, L.G., Giordano, G., Guizzetti, M., Vitalone, A., 2008. Neurotoxicity of pesticides: a brief review. Front. Biosci. 1240-1249. https://doi.org/10.2741/2758

D. Rand, M., C. Dao, J., Clason A., T., 2009. Methylmercury disruption of embryonic neural development in Drosophila. Natl. Institutes Heal. 6, 2166-2171. https://doi.org/10.1021/nl061786n.Core-Shell

Dai, P., Yan, Z., Ma, S., Yang, Y., Wang, Q., Hou, C., Wu, Y., Liu, Y., Diao, Q., 2018. The Herbicide Glyphosate Negatively Affects Midgut Bacterial Communities and Survival of Honey Bee during Larvae Reared in Vitro. J. Agric. Food Chem. 66, 7786-7793. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02212

De Aguiar, L.M., Figueira, F.H., Gottschalk, M.S., Da Rosa, C.E., 2016. Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol. 185-186, 94-101. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2016.03.006

Debat, V., 2016. Symmetry is beauty - Or is it? the rise and fall of fluctuating asymmetry. Medecine/Sciences 32, 774-780. https://doi.org/10.1051/medsci/20163208028

Debat, V., Peronnet, F., 2013. Asymmetric flies: The control of developmental noise in Drosophila. Fly (Austin). 7. https://doi.org/10.4161/fly.23558

Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., 2011. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. Int. J. Hyg. Environ. Health 214, 442-448. https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2011.08.002

Denis, J., Nectoux, J., Lamy, P.-J., Sciellour, C., Guermouche, H., Anne Sophie, A., Kosmider, O., Sarafan-Vasseur, N., Jovelet, C., Busser, B., Nizard, P., Valerie, T.A., Fina, F., 2018. Development of digital PCR molecular tests for clinical practice: principles, practical implementation and recommendations.

Deshayes, S., Eudes, V., Droguet, C., Gasperi, J., Mailler, R., Rocher, V., Moilleron, R., 2018. Devenir des micropolluants au sein de la station d'épuration de Seine Centre : étude simultanée des filières eau et boue. TSM 33-44. https://doi.org/10.1051/tsm/20186p33

Di, N., Hladun, K.R., Zhang, K., Liu, T.X., Trumble, J.T., 2016. Laboratory bioassays on the impact of cadmium, copper and lead on the development and survival of honeybee (*Apis mellifera L.*) larvae and foragers. Chemosphere 152, 530-538. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.033

Dickerson, S.M., Gore, A.C., 2007. Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. Rev. Endocr. Metab. Disord. 8, 143-159. https://doi.org/10.1007/s11154-007-9048-y

Diderich, R., Doornaert, B., Lacroix, G., Lefèvre, J.P., Lévêque, S., Magaud, H., Morin, A., Oberson, D., Pépin, G., Tissot, S., 2010. Mercure et ses dérivés, Ineris.

Dizer, H., Wittekindt, E., Fischer, B., Hansen, P.D., 2002. The cytotoxic and genotoxic potential of surface water and wastewater effluents as determined by bioluminescence, umu-assays and selected biomarkers. Chemosphere 46, 225-233. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00062-5

Doğanlar, Z.B., Doğanlar, O., Tabakçioğlu, K., 2014. Genotoxic effects of heavy metal mixture in *Drosophila melanogaster*: Expressions of heat shock proteins, RAPD profiles and mitochondrial DNA sequence. Water. Air. Soil Pollut. 225. https://doi.org/10.1007/s11270-014-2104-9

Dziewirska, E., Hanke, W., Jurewicz, J., 2018. Environmental non-persistent endocrine-disrupting chemicals exposure and reproductive hormones levels in adult men. Int. J. Occup. Med. Environ. Health 31, 551-573. https://doi.org/10.13075/ijomeh.1896.01183

Egli, D., Domènech, J., Selvaraj, A., Balamurugan, K., Hua, H., Capdevila, M., Georgiev, O., Schaffner, W., Atrian, S., 2006a. The four members of the Drosophila metallothionein family exhibit distinct yet overlapping roles in heavy metal homeostasis and detoxification. Genes to Cells 11, 647-658. https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2006.00971.x

Egli, D., Yepiskoposyan, H., Selvaraj, A., Balamurugan, K., Rajaram, R., Simons, A., Multhaup, G., Mettler, S., Vardanyan, A., Georgiev, O., others, 2006b. A family knockout of all four Drosophila metallothioneins reveals a central role in copper homeostasis and detoxification. Mol. Cell. Biol. 26, 2286. https://doi.org/10.1128/MCB.26.6.2286-2296.2006

Ellis, J.B., Revitt, D.M., Lundy, L., 2013. Behaviour of selected emerging pollutants in stormwater best management practices (BMPs). Novatech 1-10.

Eriksson, E., Auffarth, K., Eilersen, A.M., Henze, M., Ledin, A., 2003. Household chemicals and personal care products as sources for xenobiotic organic compounds in grey wastewater. Water SA 29, 135-146. https://doi.org/10.4314/wsa.v29i2.4848

European Environment Agency, 2018. Chemicals in European waters knowledge developments. https://doi.org/10.2800/265080

Eymery, F., Choubert, J.., Lepot, B., Gasperi, J., Lachenal, J., Coquery, M., 2011. Guide technique operationnel : Pratiques d'échantillonnage et de conditionnement en vue de la recherche de micropolluants prioritaires et emergent en assainissement collectif et industriel, Première version. Irstea/Cemagref.

Fatta-Kassinos, D., Meric, S., Nikolaou, A., 2011. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: Current state of knowledge and future research. Anal. Bioanal. Chem. 399, 251-275. https://doi.org/10.1007/s00216-010-4300-9

Feyereisen, R., 1999. Insect P450 enzymes. Annu. Rev. Entomol. 44, 507-533. https://doi.org/10.1146/annurev.ento.44.1.507

Fittipaldi, S., Dimauro, I., Mercatelli, N., Caporossi, D., 2014. Role of exercise-induced reactive oxygen species in the modulation of heat shock protein response. Free Radic. Res. 48(1), 52-70. https://doi.org/10.3109/10715762.2013.835047

Flores, M., Luis, A., Sueli, A., Rodrigues, D.L., Oliveira, B. De, Malafaia, G., 2017. Environment Impacts of tannery effluent on development and morphological characters in a neotropical tadpole. Sci. Total Environ. 538, 23-37. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.134

Focazio, M.J., Kolpin, D.W., Barnes, K.K., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Zaugg, S.D., Barber, L.B., Thurman, M.E., 2008. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources. Sci. Total Environ. 402, 201-216. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.02.021

Forquet, N., Boutin, C., Breul, P., 2012. Contrôle des installations d'assainissement non collectif : l'apport déterminant des outils de diagnostic non destructifs. Sci. Eaux Territ. Numéro 9, 98-101. https://doi.org/10.3917/set.009.0007

Foster, W.G., Evans, J.A., Little, J., Arbour, L., Moore, A., Sauve, R., León, J.A., Luo, W., Foster, W.G., Evans, J.A., Little, J., Arbour, L., Sauve, R., León, J.A., Luo, W., 2016. Human exposure to environmental contaminants and congenital anomalies : a critical review. Crit. Rev. Toxicol. https://doi.org/10.1080/10408444.2016.1211090

Futran Fuhrman, V., Tal, A., Arnon, S., 2015. Why endocrine disrupting chemicals (EDCs) challenge traditional risk assessment and how to respond, Journal of Hazardous Materials. Elsevier B.V. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.12.012

Gao, H.T., Xu, R., Cao, W.X., Qian, L.L., Wang, M., Lu, L., Xu, Q., Yu, S.Q., 2017. Effects of six priority controlled phthalate esters with long-term low-dose integrated exposure on male reproductive toxicity in rats. Food Chem. Toxicol. 101, 94-104. https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.01.011

Gasperi, J., Zgheib, S., Cladière, M., Rocher, V., Moilleron, R., Chebbo, G., 2012. Priority pollutants in urban stormwater: Part 2 - Case of combined sewers. Water Res. 46, 6693-6703. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.09.041

Ghanem, A., Bados, P., Rua, A., Felippe, L., Alencastro, D., Taibi, S., Einhorn, J., Mougin, C., 2007. Concentrations and specific loads of glyphosate, diuron, atrazine, nonylphenol and metabolites thereof in French urban sewage sludge. Chemosphere 69, 1368-1373. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.022

Gibson, J.., May, T.., Wilks, A.., 1981. Genetic variation at the alcohol dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster* in relation to environmental variation: Ethanol levels in breeding sites and allozyme frequencies. Oecologia 191-198. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/BF00540600

Gill, J.P.K., Sethi, N., Mohan, A., Datta, S., Girdhar, M., 2017. Glyphosate toxicity for animals. Environ. Chem. Lett. 16, 401-426. https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0

Gorini, D., Choubert, J., Pimpec, P., Héduit, A., 2014. Caractérisation et biodégradabilité des eaux résiduaires. Tech. Sci. Méthodes 65-82. https://doi.org/10.1051/tsm/2010011065

Gouzy, A., 2012a. Ibuprofène, Ineris

Gouzy, A., 2012b. Diclofénac, Ineris.

Greaud-Hoveman, L., Barré, H., Houeix, N., Lepot, B., Lehnhoff, C., Schneider, M., Aguerre-Charol, O., Morin, A., 2008. Les substances dangereuses pour le milieu aquatique dans les rejets industriels et urbains. Bilan de l'action nationale de recherche et de réduction des rejets de substances dangereuses dans l'eau par les installations classées et autres installations.

Guittard, E., Blais, C., Maria, A., Parvy, J.-P., Pasricha, S., Lumb, C., Lafont, R., Daborn, P.J., Dauphin-Villemant, C., 2010. CYP18A1, a key enzyme of Drosophila steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. Dev. Biol. 349, 35-45. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.09.023

Gunderson, M.P., Nguyen, B.T., Reyes, J.C.C., Holden, L.L., French, J.M.T., Smith, B.D., Lineberger, C., 2018. Response of phase I and II detoxification enzymes, glutathione, metallothionein and acetylcholine esterase to mercury and dimethoate in signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*). Chemosphere 208, 749-756. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.183

Günther, V., Lindert, U., Schaffner, W., 2012. The taste of heavy metals: Gene regulation by MTF-1. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 1823, 1416-1425. https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.01.005

Gust, M., Buronfosse, T., Geffard, O., Mons, R., Queau, H., Mouthon, J., Garric, J., 2010. In situ biomonitoring of freshwater quality using the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray) exposed to waste water treatment plant (WWTP) effluent discharges. Water Res. 44, 4517-4528. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.019

Hales, K.G., Korey, C.A., Larracuente, A.M., Roberts, D.M., 2015. Genetics on the fly: A primer on the drosophila model system. Genetics 201, 815-842. https://doi.org/10.1534/genetics.115.183392

Handy, R.D., Galloway, T.S., Depledge, M.H., 2003. A proposal for the use of biomarkers for the assessment of chronic pollution and in regulatory toxicology. Ecotoxicology 12, 331-343. https://doi.org/10.1023/A:1022527432252

Haq, F., Mahoney, M., Koropatnick, J., 2003. Signaling events for metallothionein induction. Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. 533, 211-226. https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.014

Harbi, K., Makridis, P., Koukoumis, C., Papadionysiou, M., Vgenis, T., Kornaros, M., Ntaikou, I., Giokas, S., Dailianis, S., 2017. Evaluation of a battery of marine species-based bioassays against raw and treated municipal wastewaters. J. Hazard. Mater. 321, 537-546. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.09.036

Hassan, S.H.A., Van Ginkel, S.W., Hussein, M.A.M., Abskharon, R., Oh, S.E., 2016. Toxicity assessment using different bioassays and microbial biosensors. Environ. Int. 92–93, 106–118. https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.003

Haubruge, É., Amichot, M., 1998. Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les insectes et les acariens. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2, 161-174.

Hennessee, C.T., Li, Q.X., 2016. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures on degradation, gene expression, and metabolite production in four Mycobacterium species. Appl. Environ. Microbiol. 82, 3357-3369. https://doi.org/10.1128/AEM.00100-16

Herbert, L.T., Vázquez, D.E., Arenas, A., Farina, W.M., 2014. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. J. Exp. Biol. 217, 3457-3464. https://doi.org/10.1242/jeb.109520

Hernández, A.F., Gil, F., Lacasaña, M., 2017. Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. Arch. Toxicol. 91, 3211-3223. https://doi.org/10.1007/s00204-017-2043-5

Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., Tauler, R., Barceló, D., 2005. Toxicity assays applied to wastewater treatment. Talanta 65, 358-366. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2004.07.012

Herrero, Ó., Morcillo, G., Planelló, R., 2017. Transcriptional deregulation of genetic biomarkers in *Chironomus riparius* larvae exposed to ecologically relevant concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). PLoS One 12, 6-8. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171719

Hirano, M., Ishibashi, H., Matsumura, N., Nagao, Y., Watanabe, N., Watanabe, A., Onikura, N., Kishi, K., Arizono, K., 2004. Acute Toxicity Responses of Two Crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to Endocrine Disrupters. J. Heal. Sci. 50, 97-100. https://doi.org/10.1248/jhs.50.97

Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway Jr, C.A., B Ezekowitz, R.A., 1999. Phylogenetic perspectives in innate immunity. Science (80-.). 284, 1313-1318.

Hu, X., Fu, W., Yang, X., Mu, Y., Gu, W., Zhang, M., 2019. Effects of cadmium on fecundity and defence ability of *Drosophila melanogaster*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 171, 871-877. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.029

Hwang, H.M., Foster, G.D., 2006. Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban stormwater runoff flowing into the tidal Anacostia River, Washington, DC, USA. Environ. Pollut. 140, 416-426. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.003

Ilijin, L., Mrdaković, M., Todorović, D., Vlahović, M., Gavrilović, A., Mrkonja, A., Perić-Mataruga, V., 2015. Life history traits and the activity of antioxidative enzymes in *Lymantria dispar L.* (lepidoptera, lymantriidae) larvae exposed to benzo[a]pyrene. Environ. Toxicol. Chem. 34, 2618-2624. https://doi.org/10.1002/etc.3116

Ineris, 2011. Méthodologie utilisée pour la détermination de normes de qualité environnementale (NQE).

Ings, J.S., Oakes, K.D., Vijayan, M.M., Servos, M.R., 2012. Temporal changes in stress and tissue-specific metabolic responses to municipal wastewater effluent exposure in rainbow trout. Comp. Biochem. Physiol. Part C 156, 67-74. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.04.002

Jennings, B.H., 2011. Drosophila-a versatile model in biology & medicine. Mater. Today 14, 190-195. https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70113-4

Jindra, M., Palli, S.R., Riddiford, L.M., 2013. The Juvenile hormone signaling pathway in insect development. Annu. Rev. Entomol. 58, 181-204. https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153700

Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I., 2015. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. Environ. Toxicol. Pharmacol. 40, 241-258. https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009

Kägi, J.H.R., 1991. Overview of metallothionein. Methods Enzymol. 205, 613-626. https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)05145-L

Kahl, M.D., Ankley, G.T., Kosian, P.A., Makynen, E.A., 1997. Toxicity of p-nonylphenol in a life-cycle test with the freshwater macroinvertebrate, Chironomus tentans. Ecotoxicol. Environ. Saf. 38, 155-160.

Kaur, K., Simon, A.F., Chauhan, V., Chauhan, A., 2015. Effect of bisphenol A on *Drosophila melanogaster* behavior - A new model for the studies on neurodevelopmental disorders. Behav. Brain Res. 284, 77-84. https://doi.org/10.1016/j.bbr.2015.02.001

Keren, A., Tamir, Y., Bengal, E., 2006. The p38 MAPK signaling pathway: A major regulator of skeletal muscle development. Mol. Cell. Endocrinol. 252, 224-230. https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.03.017

Kienzler, A., Bopp, S.K., van der Linden, S., Berggren, E., Worth, A., 2016. Regulatory assessment of chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives. Regul. Toxicol. Pharmacol. 80, 321-334. https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.05.020

Kier, L.D., Kirkland, D.J., 2013. Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. Crit. Rev. Toxicol. 43, 283-315. https://doi.org/10.3109/10408444.2013.770820

Kim, J., Kim, S., 2017. State of the art in the application of QSAR techniques for predicting mixture toxicity in environmental risk assessment. SAR QSAR Environ. Res. ISSN 26:1, 41-59. https://doi.org/10.1080/1062936X.2014.984627

Kim, K.H., Jahan, S.A., Kabir, E., Brown, R.J.C., 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. Environ. Int. 60, 71-80. https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019

Kittinger, C., Marth, E., Reinthaler, F.F., Zarfel, G., Pichler-Semmelrock, F., Mascher, W., Mascher, G., Mascher, F., 2013. Water quality assessment of a Central European River - Does the Directive 2000/60/EC cover all the needs for a comprehensive classification? Sci. Total Environ. 447, 424-429. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.01.015

Kobayashi, A., Ohta, T., Yamamoto, M., 2004. Unique function of the Nrf2-Keap1 pathway in the inducible expression of antioxidant and detoxifying enzymes. Methods Enzymol. 378, 273-286. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(04)78021-0

Köck-Schulmeyer, M., Villagrasa, M., López de Alda, M., Céspedes-Sánchez, R., Ventura, F., Barceló, D., 2013. Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. Sci. Total Environ. 458-460, 466-476. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.010

Kohane, M.J., 1994. Energy, development and fitness in Drosophila melanogaster. Proc. R. Soc.B Biol. Sci. 257, 185-191. https://doi.org/10.1098/rspb.1994.0114

König, M., Escher, B.I., Neale, P.A., Krauss, M., Hilscherová, K., Novák, J., Teodorović, I., Schulze, T., Seidensticker, S., Kamal Hashmi, M.A., Ahlheim, J., Brack, W., 2017. Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of in vitro bioassays and chemical analysis. Environ. Pollut. 220, 1220-1230. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.011

Kontogiannatos, Dimitris, Swevers, L., Zakasis, G., Kourti, A., 2015. The molecular and physiological impact of bisphenol A in *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). Ecotoxicology 24, 356-367. https://doi.org/10.1007/s10646-014-1384-6

Kontogiannatos, Dimitrios, Zakasis, G., Kourti, A., 2015. The physiological impact of bisphenol A on the developmental and reproductive processes of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) under LD and SD photoperiods. Toxicol. Environ. Chem. 97, 1003-1016. https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1068316

Kortenkamp, A., 2019. Which chemicals should be grouped together for mixture risk assessments of male reproductive disorders? Mol. Cell. Endocrinol. 499, 110581. https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110581

Kouassi, E., Ayotte, P., Roy, R., Fournier, M., Revillard, J.-P., 2001. Effets des contaminants de l'environnement sur le système immunitaire. Bull. d'information en santé environnementale 1-7.

Kraus, J.M., Walters, D.M., Wesner, J.S., Stricker, C.A., Schmidt, T.S., Zuellig, R.E., 2014. Metamorphosis alters contaminants and chemical tracers In insects: Implications for food webs. Environ. Sci. Technol. 48, 10957-10965. https://doi.org/10.1021/es502970b

Le Goff, G., Hilliou, F., Siegfried, B.D., Boundy, S., Wajnberg, E., Sofer, L., Audant, P., Ffrench-Constant, R.H., Feyereisen, R., 2006. Xenobiotic response in Drosophila melanogaster : Sex dependence of P450 and GST gene induction. Insect Biochem. Mol. Biol. 36, 674-682. https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2006.05.009

Lee, D.H., Jacobs, D.R., Park, H.Y., Carpenter, D.O., 2017. A role of low dose chemical mixtures in adipose tissue in carcinogenesis. Environ. Int. 108, 170-175. https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.08.015

Libralato, G., Gentile, E., Volpi Ghirardini, A., 2016. Wastewater effects on *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin): Setting up a classification system. Ecol. Indic. 60, 31-37. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.06.014

Libralato, G., Ghirardini Annamaria, V., Francesco, A., 2010. How toxic is toxic? A proposal for wastewater toxicity hazard assessment. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 1602-1611. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.03.007

Lin, C.C., Prokop-Prigge, K.A., Preti, G., Potter, C.J., 2015. Food odors trigger Drosophila males to deposit a pheromone that guides aggregation and female oviposition decisions. Elife 4, 1-26. https://doi.org/10.7554/eLife.08688.001

Linares, V., Bellés, M., Domingo, J.L., 2015. Human exposure to PBDE and critical evaluation of health hazards. Arch. Toxicol. 89, 335-356. https://doi.org/10.1007/s00204-015-1457-1

Linford, N.J., Bilgir, C., Ro, J., Pletcher, S.D., 2013. Measurement of lifespan in Drosophila melanogaster. J. Vis. Exp. 1-9. https://doi.org/10.3791/50068

Lintelmann, J., Katayama, A., Kurihara, N., Shore, L., Wenzel, A., 2003. Endocrine disruptors in the environment: (IUPAC technical report). Pure Appl. Chem. 75, 631-681. https://doi.org/10.1351/pac200375050631

Lynch, Z.R., Schlenke, T.A., Morran, L.T., de Roode, J.C., 2017. Ethanol confers differential protection against generalist and Specialist parasitoids of *Drosophila melanogaster*. PLoS One 12, 1-19. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180182

MacKay, D., Fraser, A., 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. Environ. Pollut. 110, 375-391. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00162-7

Mantilla, J.G., Gomes, L., Cristancho, M.A., 2018. The differential expression of Chironomus spp genes as useful tools in the search for pollution biomarkers in freshwater ecosystems. Brief. Funct. Genomics 17, 151-156. https://doi.org/10.1093/bfgp/elx021

Marcel, C., Ghelmi, G., 2012. De Lutèce à l'agglomération parisienne 2000 ans d'assainissement.

Marcel, C., Pastor, F., 2013. L'assainissement des eaux usées en agglomération parisienne : principe et procédés.

Marcel, C., Pastor, F., 2011. L'assainissement en région parisienne et la préservation de l'environnement.

Maria, A., Malbert-Colas, A., Boulogne, I., Braman, V., Boitard, C., Dacher, M., Chertemps, T., Maibeche, M., Blais, C., Siaussat, D., 2019. Effects of bisphenol A on post-embryonic development of the cotton pest *Spodoptera littoralis*. Chemosphere 235, 616-625. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.06.073

Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2012. Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics (tributyltin, nonylphenol, bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic larvae. Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol. 155, 333-343. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.10.001

Masamitsu, Y., Hideki, Y., 2018. Drosophila as a model organism. Drosoph. Model. Hum. Dis. 1076, 1-10. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0529-0

Mattson, M.P., Cheng, A., 2006. Neurohormetic phytochemicals: low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. Trends Neurosci. 29, 632-639. https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.09.001

Mazina, M.Y., Kocheryzhkina, E. V., Nikolenko, J. V., Krasnov, A.N., Georgieva, S.G., Vorobyeva, N.E., 2017. Nuclear receptors EcR, Usp, E75, DHR3, and ERR regulate transcription of ecdysone cascade genes. Dokl. Biochem. Biophys. 473, 145-147. https://doi.org/10.1134/S1607672917020144

Mendonça, E., Picado, A., Paixão, S.M., Silva, L., Cunha, M.A., Leitão, S., Moura, I., Cortez, C., Brito, F., 2009. Ecotoxicity tests in the environmental analysis of wastewater treatment plants: Case study in Portugal. J. Hazard. Mater. 163, 665-670. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.07.012

Mendoza, A., Aceña, J., Pérez, S., López de Alda, M., Barceló, D., Gil, A., Valcárcel, Y., 2015. Pharmaceuticals and iodinated contrast media in a hospital wastewater: A case study to analyse their presence and characterise their environmental risk and hazard. Environ. Res. 140, 225-241. https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.04.003

Meregalli, G., Pluymers, L., Ollevier, F., 2001. Induction of mouthpart deformities in *Chironomus riparius* larvae exposed to 4-n-nonylphenol. Environ. Pollut. 111, 241-246. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00068-3

Mezzanotte, V., Anzano, M., Collina, E., Marazzi, F.A., Lasagni, M., 2016. Distribution and Removal of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Two Italian Municipal Wastewater Treatment Plants in 2011–2013. Polycycl. Aromat. Compd. 36, 213-228. https://doi.org/10.1080/10406638.2014.957409

Miller, K.P., Ramos, K.S., 2001. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. Drug Metab. Rev. 33, 1-35. https://doi.org/10.1081/DMR-100000138

Minakuchi, C., Zhou, X., Riddiford, L.M., 2008. Krüppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. Mech. Dev. 125, 91-105. https://doi.org/10.1016/j.mod.2007.10.002

Mirčić, D., Blagojević, D., Perić-Mataruga, V., Ilijin, L., Mrdaković, M., Vlahović, M., Lazarević, J., 2013. Cadmium effects on the fitness-related traits and antioxidative defense of *Lymantria dispar* L. larvae. Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 209-218. https://doi.org/10.1007/s11356-012-1057-z

Miyagawa, S., Sato, T., Iguchi, T., 2016a. Subchapter 101B - Octylphenol, in: Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K.B.T.-H. of H. (Éd.), . Academic Press, San Diego, p. 575-576. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00240-3

Miyagawa, S., Sato, T., Iguchi, T., 2016b. Subchapter 101A - Nonylphenol, in: Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K.B.T.-H. of H. (Éd.), . Academic Press, San Diego, p. 573-574. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00239-7

Miyagawa, S., Sato, T., Iguchi, T., 2016c. Subchapter 101C - Bisphenol A, in: Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K.B.T.-H. of H. (Éd.), . Academic Press, San Diego, p. 577-578. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00241-5

Mogren, C.L., Trumble, J.T., 2010. The impacts of metals and metalloids on insect behavior. Entomol. Exp. Appl. 135, 1-17. https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2010.00967.x

Mokarizadeh, A., Faryabi, M.R., Rezvanfar, M.A., Abdollahi, M., 2015. A comprehensive review of pesticides and the immune dysregulation: Mechanisms, evidence and consequences. Toxicol. Mech. Methods 25, 258-278. https://doi.org/10.3109/15376516.2015.1020182

Morris, L., Colombo, V., Hassell, K., Kellar, C., Leahy, P., Long, S.M., Myers, J.H., Pettigrove, V., 2017. Municipal wastewater effluent licensing: A global perspective and recommendations for best practice. Sci. Total Environ. 580, 1327-1339. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.096

Mousavi, S.R., Balali-Mood, M., Riahi-Zanjani, B., Yousefzadeh, H., Sadeghi, M., 2013. Concentrations of mercury, lead, chromium, cadmium, arsenic and aluminum in irrigation water wells and wastewaters used for agriculture in mashhad, northeastern Iran. Int. J. Occup. Environ. Med. 4, 80-86. https://doi.org/10.5114/fn.2013.35954

Murata, M., Kang, J.H., 2018. Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. Biotechnol. Adv. 36, 311-327. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.002

Myllymaki, H., Valanne, S., Ramet, M., 2014. The Drosophila Imd signaling pathway. J. Immunol. 192, 3455-3462. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303309

Nakagawa, Y., Sonobe, H., 2016. Subchapter 98A - 20-Hydroxyecdysone, in: Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K.B.T.-H. of H. (Éd.), . Academic Press, San Diego, p. 560-562. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00238-5

Néfau, T., 2014. Analyse des résidus de drogues illicites dans les eaux de stations d'épuration : rendements d'élimination et évaluation de l'impact écotoxique. Contribution à l'estimation des consommations.

Nickla, H., Anderson, J., Palzkill, T., 1983. Enzymes involved in oxygen detoxification during development of Drosophila melanogaster. Experientia 39, 610-612. https://doi.org/10.1007/BF01971122

Noszczyńska, M., Piotrowska-Seget, Z., 2018. Bisphenols: Application, occurrence, safety, and biodegradation mediated by bacterial communities in wastewater treatment plants and rivers. Chemosphere 201, 214-223. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.179

Oberdörster, E., Cottam, D.M., Wilmot, F.A., Milner, M.J., McLachlan, J.A., 1999. Interaction of PAHs and PCBs with ecdysone-dependent gene expression and cell proliferation. Toxicol. Appl. Pharmacol. 160, 101-108. https://doi.org/10.1006/taap.1999.8745

Oetken, M., Bachmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Oehlmann, J., 2004. Evidence for endocrine disruption in invertebrates. Int. Rev. Cytol. 236, 1-44. https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)36001-8

Ort, C., Lawrence, M.G., Rieckermann, J., Joss, A., 2010. Sampling for pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and illicit drugs in wastewater systems : are your conclusions valid ? A critical review. Environ. Sci. Technol. 44, 6024-6035. https://doi.org/10.1021/es100779n

Östman, M., Lindberg, R.H., Fick, J., Björn, E., Tysklind, M., 2017. Screening of biocides, metals and antibiotics in Swedish sewage sludge and wastewater. Water Res. 115, 318-328. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.011

Overturf, M. D., Anderson, J. C., Pandelides, Z., Beyger, L., & Holdway, D. A. (2015). Pharmaceuticals and personal care products: A critical review of the impacts on fish reproduction. *Critical Reviews in Toxicology*, *45*(6), 492–530. https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1038499

Pal, A., He, Y., Jekel, M., Reinhard, M., Gin, K.Y.H., 2014. Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. Environ. Int. 71, 46-62. https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.025

Park, K., Kwak, I.S., 2010. Molecular effects of endocrine-disrupting chemicals on the *Chironomus riparius* estrogen-related receptor gene. Chemosphere 79, 934-941. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.03.002

Park, S.Y., Choi, J., 2009. Genotoxic effects of nonylphenol and bisphenol a exposure in aquatic biomonitoring species: Freshwater crustacean, *Daphnia magna*, and aquatic midge, *Chironomus riparius*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 83, 463-468. https://doi.org/10.1007/s00128-009-9745-1

Parvy, J.P., Wang, P., Garrido, D., Maria, A., Blais, C., Poidevin, M., Montagne, J., 2014. Forward and feedback regulation of cyclic steroid production in *Drosophila melanogaster*. Dev. 141, 3955–3965. https://doi.org/10.1242/dev.102020

Partaix, H., Barre, H., Greaud, L., Guarnieri, J., Lepot, B., Ughetto, E., Gaucher, R., Ramel, M., 2016. Les substances dangereuses pour le milieu aquatique dans les rejets industriels et urbains. Action nationale de recherche et de réduction des rejets des substances dangereuses dans l'eau par les stations de traitement des eaux usées urbaines (RSDE) - Synt.

Pasquini, L., Munoz, J.F., Pons, M.N., Yvon, J., Dauchy, X., France, X., Le, N.D., France-Lanord, C., Görner, T., 2014. Occurrence of eight household micropollutants in urban wastewater and their fate in a wastewater treatment plant. Statistical evaluation. Sci. Total Environ. 481, 459-468. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.02.075

Penru, Y., Guillon, A., Ait aissa, S., Couteau, J., 2017. Projet MiCROPOLIS Indicateurs : Caractérisation de la toxicité des eaux usées à Sophia Antipolis. Livrable n°1.

Perron, V., Hébert, M., 2007. Caractérisation des boues d'épuration municipales Partie II : éléments traces métalliques. Vecteur Environ. 42-46.

Peterson, E.K., Long, H.E., 2018. Experimental protocol for using drosophila as an invertebrate model system for toxicity testing in the laboratory. J. Vis. Exp. 2018, 1-11. https://doi.org/10.3791/57450

Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2014. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. Water Res. 72. https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053

Petrie, B., Proctor, K., Youdan, J., Barden, R., Kasprzyk-Hordern, B., 2017. Critical evaluation of monitoring strategy for the multi-residue determination of 90 chiral and achiral micropollutants in effluent wastewater. Sci. Total Environ. 579, 569-578. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.059

Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. Biotechnol. Lett. 26, 509-515. https://doi.org/10.1016/j.ejor.2016.09.013

Piren-Seine, P., s. d. Programme interdisciplinaire de recherches sur l'environnement [WWW Document]. 2009.

Planelló, R., Herrero, O., Martínez-Guitarte, J.L., Morcillo, G., 2011. Comparative effects of butyl benzyl phthalate (BBP) and di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on the aquatic larvae of Chironomus riparius based on gene expression assays related to the endocrine system, the stress response and ribosomes. Aquat. Toxicol. 105, 62-70. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.05.011

Planelló, R., Servia, M.J., Gómez-Sande, P., Herrero, Ó., Cobo, F., Morcillo, G., 2013. Transcriptional responses, metabolic activity and mouthpart deformities in natural populations of *Chironomus riparius* larvae exposed to environmental pollutants. Environ. Toxicol. 30, 383-395. https://doi.org/10.1002/tox.

Pohl, H.R., Roney, N., Abadin, H.G., 2011. Metal ions affecting the neurological system. Met. Ions Life Sci. 8, 247-262. https://doi.org/10.1039/978184973211600157

Ponton, F., Chapuis, M.P., Pernice, M., Sword, G.A., Simpson, S.J., 2011. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in Drosophila melanogaster. J. Insect Physiol. 57, 840-850. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.014

Power, E. a., Boumphrey, R.S., 2004. International Trends in Bioassay Use for Effluent Management: UK DTA Demonstration Programme. Ecotoxicology 13, 377-398.

Prevedouros, K., Cousins, I.T., Buck, R.C., Korzeniowski, S.H., 2006. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. Environ. Sci. Technol. 40, 32-44. https://doi.org/10.1021/es0512475

Prince, L., Korbas, M., Davidson, P., Broberg, K., Rand, M.D., 2014. Target organ specific activity of drosophila MRP (ABCC1) moderates developmental toxicity of methylmercury. Toxicol. Sci. 140, 425-435. https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu095

Prud'homme, S.M., Chaumot, A., Cassar, E., David, J.P., Reynaud, S., 2017. Impact of micropollutants on the life-history traits of the mosquito *Aedes aegypti*: On the relevance of transgenerational studies. Environ. Pollut. 220, 242-254. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.056

Qamar, Z., Khan, S., Khan, A., Aamir, M., Nawab, J., Waqas, M., 2017. Appraisement, source apportionment and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in vehicle-wash wastewater, Pakistan. Sci. Total Environ. 605-606, 106-113. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.152

Qiu, Y.W., Zeng, E.Y., Qiu, H., Yu, K., Cai, S., 2017. Bioconcentration of polybrominated diphenyl ethers and organochlorine pesticides in algae is an important contaminant route to higher trophic levels. Sci. Total Environ. 579, 1885-1893. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.192

Rabitsch, W.B., 1997. Tissue-specific accumulation patterns of Pb, Cd, Cu, Zn, Fe, and Mn in workers of three ant species (Formicidae, hymenoptera) from a metal-polluted site. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32, 172-177. https://doi.org/10.1007/s002449900171

Ramade, F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie - Fondements et applications, Tec & Doc. ed.

Rana, S.V.S., 2014. Perspectives in endocrine toxicity of heavy metals - A review. Biol. Trace Elem. Res. 160, 1-14. https://doi.org/10.1007/s12011-014-0023-7

Rand, M.D., Montgomery, S.L., Prince, L., Vorojeikina, D., 2014. Developmental Toxicity Assays Using the *Drosophila* Model. Curr. Protoc. Toxicol. 1.12.1-1.12.20. https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0112s59

Ren, J., Wang, Xiaoping, Wang, C., Gong, P., Wang, Xiruo, Yao, T., 2017. Biomagnification of persistent organic pollutants along a high-altitude aquatic food chain in the Tibetan Plateau: Processes and mechanisms. Environ. Pollut. 220, 636-643. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.019

Rencüzoğulları, E., Aydın, M., 2019. Genotoxic and mutagenic studies of teratogens in developing rat and mouse. Drug Chem. Toxicol. 42, 409-429. https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1465950

Rewitz, K.., Yamanaka, N., O'Connor, M.B., 2010. Steroid hormone inactivation is required during the juvenile- adult transition in Drosophila. Dev. Cell 19, 895-902. https://doi.org/doi:10.1016/j.devcel.2010.10.021

Rice, K.M., Walker, E.M., Wu, M., Gillette, C., Blough, E.R., 2014. Environmental mercury and its toxic effects. J. Prev. Med. Public Heal. 47, 74-83. https://doi.org/10.3961/jpmph.2014.47.2.74

Richards, D.J., Shieh, W.K., 1986. Biological fate of organic priority pollutants in the aquatic environment. Water Res. 20, 1077-1090. https://doi.org/10.1016/0043-1354(86)90054-0

Ritossa, F., 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. Experientia 55, 571-573. https://doi.org/10.1007/BF02172188

Rocher, V., Azimi, S., 2017. Evolution de la qualité de la Seine en lien avec les progrès de l'assainissement.

Rochester, J.R., Bolden, A.L., 2015. Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol a substitutes. Environ. Health Perspect. 123, 643-650. https://doi.org/10.1289/ehp.1408989

Rogowska, J., Cieszynska-Semenowicz, M., Ratajczyk, W., Wolska, L., 2019. Micropollutants in treated wastewater. Ambio. https://doi.org/10.1007/s13280-019-01219-5

Rule, K.L., Comber, S.D.W., Ross, D., Thornton, A., Makropoulos, C.K., Rautiu, R., 2006a. Survey of priority substances entering thirty English wastewater treatment works. Water Environ. J. 20, 177-184. https://doi.org/10.1111/j.1747-6593.2005.00016.x

Rule, K.L., Comber, S.D.W., Ross, D., Thornton, A., Makropoulos, C.K., Rautiu, R., 2006b. Diffuse sources of heavy metals entering an urban wastewater catchment. Chemosphere 63, 64-72. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.07.052

Sánchez-Avila, J., Bonet, J., Velasco, G., Lacorte, S., 2009. Determination and occurrence of phthalates, alkylphenols, bisphenol A, PBDEs, PCBs and PAHs in an industrial sewage grid discharging to a Municipal Wastewater Treatment Plant. Sci. Total Environ. 407, 4157-4167. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.03.016

Sarakinos, H.C., Bermingham, N., White, P.A., Rasmussen, J.B., 2000. Correspondence between whole effluent toxicity and the presence of priority substances in complex industrial effluents. Environ. Toxicol. Chem. 19, 63-71. https://doi.org/10.1002/etc.5620190107

Savant, D. V., Abdul-Rahman, R., Ranade, D.R., 2006. Anaerobic degradation of adsorbable organic halides (AOX) from pulp and paper industry wastewater. Bioresour. Technol. 97, 1092-1104. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.12.013

Schmidt, G.H., Ibrahim, N.M.M., Abdallah, M.D., 1992. Long-term effects of heavy-metals in food on developmental stages of *Aiolopus thalassinus* (Saltatoria, Acrididae). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 23, 375-382. https://doi.org/10.1007/BF00216248

Schneider, M.I., Sanchez, N., Pineda, S., Chi, H., Ronco, A., 2009. Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of <i>Chrysoperla externa<i> (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. Chemosphere 76, 1451-1455. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.05.029

Sekkat, N., Guerbet, M., Jouany, J.M., 2001. Étude comparative de huit bioessais à court terme pour l'évaluation de la toxicité de lixiviats de déchets urbains et industriels. Rev. des Sci. l'eau 14, 63–72. https://doi.org/10.7202/705409ar

Shakeel, M., Rodriguez, A., Tahir, U. Bin, Jin, F., 2018. Gene expression studies of reference genes for quantitative real-time PCR: an overview in insects. Biotechnol. Lett. 40, 227-236. https://doi.org/10.1007/s10529-017-2465-4

Sharif, A., Ashraf, M., Anjum, A.A., Javeed, A., Altaf, I., Akhtar, M.F., Abbas, M., Akhtar, B., Saleem, A., 2016. Pharmaceutical wastewater being composite mixture of environmental pollutants may be associated with mutagenicity and genotoxicity. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 2813-2820. https://doi.org/10.1007/s11356-015-5478-3

Sharma, V.K., Anquandah, G.A.K., Yngard, R.A., Kim, H., Fekete, J., Bouzek, K., Ray, A.K., Golovko, D., 2009. Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: A review on occurrence, fate, and treatment. Environ. Sci. Heal. Part A Toxic/Hazardous Subst. Environ. Eng. 44, 423-442. https://doi.org/10.1080/10934520902719704

Sharom, F.J., 1997. The P-glycoprotein efflux pump: How does it transport drugs? J. Membr. Biol. 160, 161-175. https://doi.org/10.1007/s002329900305

Sheweita, S.A., Al-Shora, S., Hassan, M., 2016. Effects of benzo[a]pyrene as an environmental pollutant and two natural antioxidants on biomarkers of reproductive dysfunction in male rats. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 17226-17235. https://doi.org/10.1007/s11356-016-6934-4

Shin, H.K., Kang, Y.M., No, K.T., 2016. Predicting ADME properties of chemicals, in: Springer, Dordrecht (Éd.), Handbook of Computational Chemistry. p. 2265-2301. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6169-8_59-1

Shinoda, T., 2016. Chapter 99 - Juvenile Hormone, in: Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K.B.T.-H. of H. (Éd.), . Academic Press, San Diego, p. 563-564. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801028-0.00099-4

Shulman, M. V., Pakhomov, O.Y., Brygadyrenko, V. V., 2017. Effect of lead and cadmium ions upon the pupariation and morphological changes in *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae). Folia Oecologica 44. https://doi.org/10.1515/foecol-2017-0004

Simon, P., 2003. Q-Gene: Processing quantitative real-time RT-PCR data. Bioinformatics 19, 1439-1440. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg157

Singh, B.N., 2016. The genus Drosophila is characterized by a large number of sibling species showing evolutionary significance. J. Genet. 95, 1053-1064. https://doi.org/10.1007/s12041-016-0699-x

Smolders, R., De Boeck, G., Blust, R., 2003. Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. Chem. 22, 890-899. https://doi.org/10.1897/1551-5028(2003)022<0890:CICEBA>2.0.CO;2

Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J.N., 2008. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. Environ. Int. 34, 1033-1049. https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.01.004

Sorsa, M., Pfeifer, S., 1973. Effects of cadmium on development time and prepupal puffing pattern of Drosophila melanogaster. Hered. 75. https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1973.tb01169.x

Streit, B., 1992. Bioaccumulation processes in ecosystems. Experientia 48, 955-970. https://doi.org/10.1007/BF01919142

Strømnaes, Ø., 1959. Maturity in Drosophila. Nature 183, 409-410. https://doi.org/10.1038/183055a0

Stronach, B.E., Perrimon, N., 1999. Stress signaling in Drosophila. Oncogene 18, 6172-6182. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203125

Sykiotis, G.P., Bohmann, D., 2008. Keap1/Nrf2 Signaling Regulates Oxidative Stress Tolerance and Lifespan in Drosophila. Dev. Cell 14, 76-85. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.12.002

Tanford, C., 1980. The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes. J. Polym. Sci. Polym. Lett. Ed. 18, 687-687. https://doi.org/10.1002/pol.1980.130181008

Tapadia, M.G., Lakhotia, S.C., 2005. Expression of mdr49 and mdr65 multidrug resistance genes in larval tissues of *Drosophila melanogaster* under normal and stress conditions. Cell Stress Chaperones 10, 7-11. https://doi.org/10.1379/CSC-67R.1

Taylor, D.A., Thompson, E.L., Nair, S. V., Raftos, D.A., 2013. Differential effects of metal contamination on the transcript expression of immune- and stress-response genes in the Sydney Rock oyster, *Saccostrea glomerata*. Environ. Pollut. 178, 65–71. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.027

Tissier, C., Morvan, C., Bocquené, G., James, A., 2005. Les substances prioritaires de la directive cadre sur l'eau (DCE), Institut Ifremer.

Tolwinski, N.S., 2017. Introduction: Drosophila-A model system for developmental biology. J. Dev. Biol. 5, 10-11. https://doi.org/10.3390/jdb5030009

Tower, J., 2011. Heat shock proteins and Drosophila aging. Exp. Gerontol. 46, 355-362. https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.09.002

Ukah, B.U., Igwe, O., Ameh, P., 2018. The impact of industrial wastewater on the physicochemical and microbiological characteristics of groundwater in Ajao- Estate Lagos, Nigeria. Environ. Monit. Assess. 190. https://doi.org/10.1007/s10661-018-6600-z

UNESCO, 2017. WWAP (Programme mondial pour l'évaluation des ressources en eau). 2017. Rapport mondial des Nations Unies sur la mise en valeur des ressources en eau.

Ureña, E., Manjón, C., Franch-Marro, X., Martín, D., 2014. Transcription factor E93 specifies adult metamorphosis in hemimetabolous and holometabolous insects. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 111, 7024-7029. https://doi.org/10.1073/pnas.1401478111

Vache, C., Camares, O., Cardoso-Ferreira, M.-C., Dastugue, B., Creveaux, I., Vaury, C., Bamdad, M., 2007. A potential genomic biomarker for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbon pollutants: multidrug resistance gene 49 in Drosophila melanogaster. Environ. Toxicol. Chem. 26, 1418. https://doi.org/10.1897/06-552R.1

Valanne, S., Wang, J.-H., Ramet, M., 2011. The Drosophila toll signaling pathway. J. Immunol. 186, 649-656. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002302

Vasquez, M.I., Fatta-Kassinos, D., 2013. Is the evaluation of « traditional » physicochemical parameters sufficient to explain the potential toxicity of the treated wastewater at sewage treatment plants? Environ. Sci. Pollut. Res. 20, 3516-3528. https://doi.org/10.1007/s11356-013-1637-6

Verderame, M., Limatola, E., Scudiero, R., 2017. Metallothionein expression and synthesis in the testis of the lizard *Podarcis sicula* under natural conditions and following estrogenic exposure. Eur. J. Histochem. 61, 80-85. https://doi.org/10.4081/ejh.2017.2777

Verma, A.K., Dash, R.R., Bhunia, P., 2012. A review on chemical coagulation/flocculation technologies for removal of colour from textile wastewaters. J. Environ. Manage. 93, 154-168. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2011.09.012

Vicentini, M., Morais, G.S., Rebechi-Baggio, D., Richardi, V.S., Santos, G.S., Cestari, M.M., Navarro-Silva, M.A., 2017. Benzo(a)pyrene Exposure Causes Genotoxic and Biochemical Changes in the Midge Larvae of *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino (Diptera: Chironomidae). Neotrop. Entomol. 46, 658-665. https://doi.org/10.1007/s13744-017-0505-3

Vignesh, K.S., Deepe, G.S., 2017. Metallothioneins: Emerging modulators in immunity and infection. Int. J. Mol. Sci. 18. https://doi.org/10.3390/ijms18102197

Vizuete, J., Pérez-López, M., Míguez-Santiyán, M., Hernández-Moreno, D., 2019. Mercury (Hg), lead (Pb), cadmium (Cd), selenium (Se), and arsenic (As) in liver, kidney, and feathers of gulls: A Review. Environ. Contam. Toxicol. 247, 85-146. https://doi.org/10.1007/398_2018_16

Voutsas, E., 2007. Estimation of the volatilization of organic chemicals from soils, in: Thermodynamics solubility and environmental issues. Elsevier B.V., p. 205-227. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52707-3.50013-6

Vrailas-Mortimer, A., del Rivero, T., Mukherjee, S., Nag, S., Gaitanidis, A., Kadas, D., Consoulas, C., Duttaroy, A., Sanyal, S., 2011. A Muscle-Specific p38 MAPK/Mef2/MnSOD Pathway Regulates Stress, Motor Function, and Life Span in Drosophila. Dev. Cell 21, 783-795. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.09.002

Walker, C., Sibly, R., Hopkin, S., Peakall, D., 2012. Principles of ecotoxicology, Fourth Edition, CRC press. ed.

Wang, G., Fowler, B.A., 2008. Roles of biomarkers in evaluating interactions among mixtures of lead, cadmium and arsenic. Toxicol. Appl. Pharmacol. 233, 92-99. https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.01.017

Wang, Y., Zhu, H., Kannan, K., 2019. A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. Toxics 7, 21. https://doi.org/10.3390/toxics7020021

Weiner, A.K., Ramirez, A., Zintel, T., Rose, R.W., Wolff, E., Parker, A.L., Bennett, K., Johndreau, K., Rachfalski, C., Zhou, J., Smith, S.T., 2014. Bisphenol A affects larval growth and advances the onset of metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 101, 7-13. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.12.008

Werner, J., Wautier, K., Evans, R.E., Baron, C.L., Kidd, K., Palace, V., 2002. Waterborne ethynylestradiol induces vitellogenin and alters metallothionein expression in lake trout (*Salvelinus namaycush*). Aquat. Toxicol. 62, 321-328. https://doi.org/10.1016/s0166-445x(02)00104-2

Westlund, P., Yargeau, V., 2017. Investigation of the presence and endocrine activities of pesticides found in wastewater effluent using yeast-based bioassays. Sci. Total Environ. 607-608, 744-751. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.032

Weston, D.P., Chen, D., Lydy, M.J., 2015. Stormwater-related transport of the insecticides bifenthrin, fipronil, imidacloprid, and chlorpyrifos into a tidal wetland, San Francisco Bay, California. Sci. Total Environ. 527-528, 18-25. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.095

Winans, B., Humble, M.C., Lawrence, B.P., 2011. Environmental toxicants and the developing immune system: A missing link in the global battle against infectious disease? Reprod. Toxicol. 31, 327-336. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.09.004

Wu, C., 1995. Heat shock transcription factors : structure and regulation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 11, 441-469. https://doi.org/10.1146/annurev.cb.11.110195.002301

Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., Yang, L., 2016. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 8244-8259. https://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x

Wu, Z., Han, W., Yang, X., Li, Y., Wang, Y., 2019. The occurrence of polybrominated diphenyl ether (PBDE) contamination in soil, water/sediment, and air. Environ. Sci. Pollut. Res. 26, 23219-23241. https://doi.org/10.1007/s11356-019-05768-w

Ying, G.G., Williams, B., Kookana, R., 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - A review. Environ. Int. 28, 215-226. https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00017-X

Yu, Y., Wu, B., Jiang, L., Zhang, X.X., Ren, H.Q., Li, M., 2019. Comparative analysis of toxicity reduction of wastewater in twelve industrial park wastewater treatment plants based on battery of toxicity assays. Sci. Rep. 9, 1-10. https://doi.org/10.1038/s41598-019-40154-z

Yuan, H.X., Xu, X., Sima, Y.H., Xu, S.Q., 2013. Reproductive toxicity effects of 4-nonylphenol with known endocrine disrupting effects and induction of vitellogenin gene expression in silkworm, *Bombyx mori*. Chemosphere 93, 263-268. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.075

Yves Perrodin, 2013. 16. Pollution des milieux aquatiques, in: Le développement durable à découvert. p. 242-243. https://doi.org/10.4000/books.editionscnrs.10558

Zaman, K., Batcabe, J.P., MacGill, R.S., Ahmad, S., Pardini, R.S., 1994. An insect model for assessing mercury toxicity: Mercury-induced lipid peroxidation, depletion of glutathione, and induced protein oxidation in the housefly (*Musca domestica*) and cabbage looper moth (*Trichoplusia ni*). Toxic Subst. J. 13, 114-118. https://doi.org/10.1007/BF00209463

Zarean, M., Keikha, M., Poursafa, P., Khalighinejad, P., Amin, M., Kelishadi, R., 2016. A systematic review on the adverse health effects of di-2-ethylhexyl phthalate. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 24642-24693. https://doi.org/10.1007/s11356-016-7648-3

Zareitalabad, P., Siemens, J., Hamer, M., Amelung, W., 2013. Perfluorooctanoic acid (PFOA) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) in surface waters, sediments, soils and wastewater - A review on concentrations and distribution coefficients. Chemosphere 91, 725-732. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.024

Zgheib, S., 2009. Flux et sources des polluants prioritaires dans les eaux urbaines en lien avec l'usage du territoire. Ecole des Ponts ParisTech.

Zgheib, S., Moilleron, R., Chebbo, G., 2012. Priority pollutants in urban stormwater: Part 1 - Case of separate storm sewers. Water Res. 46, 6683-6692. https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.12.012

Zgheib, S., Moilleron, R., Saad, M., Chebbo, G., 2011. Partition of pollution between dissolved and particulate phases: What about emerging substances in urban stormwater catchments? Water Res. 45, 913-925. https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.09.032

Zhang, H., Reynolds, M., 2019. Cadmium exposure in living organisms : A short review. Sci. Total Environ. 678, 761-767. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.395

Zhang, Q.L., Guo, J., Deng, X.Y., Wang, F., Chen, J.Y., Lin, L.B., 2019. Comparative transcriptomic analysis provides insights into the response to the benzo(a)pyrene stress in aquatic firefly (*Luciola leii*). Sci. Total Environ. 661, 226-234. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.156

Zhang, Y., Liu, Y., Zhang, J., Guo, Y., Ma, E., 2015. Molecular cloning and mRNA expression of heat shock protein genes and their response to cadmium stress in the grasshopper *Oxya chinensis*. PLoS One 10, 1-16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131244

Zhang, Y., Lu, X., Wang, N., Xin, M., Geng, S., Jia, J., Meng, Q., 2016. Heavy metals in aquatic organisms of different trophic levels and their potential human health risk in Bohai Bay, China. Environ. Sci. Pollut. Res. 23, 17801-17810. https://doi.org/10.1007/s11356-016-6948-y

Zhou, X., Riddiford, L.M., 2002. Broad specifies pupal development and mediates the « status quo » action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in Drosophila and Manduca. Development 129, 2259-2269.

Zhou, Y., Meng, J., Zhang, M., Chen, S., He, B., Zhao, H., Li, Q., Zhang, S., Wang, T., 2019. Which type of pollutants need to be controlled with priority in wastewater treatment plants: Traditional or emerging pollutants? Environ. Int. 131. https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104982

Zolfaghari, M., Drogui, P., Seyhi, B., Brar, S.K., Buelna, G., 2014. Occurrence , fate and effects of Di (2-ethylhexyl) phthalate in wastewater treatment plants : A review. Environ. Pollut. 1-13. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.07.014

Zoroddu, M.A., Aaseth, J., Crisponi, G., Medici, S., Peana, M., Nurchi, V.M., 2019. The essential metals for humans: a brief overview. J. Inorg. Biochem. 195, 120-129. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.013

Characterization of wastewaters from a sewerage network for a diagnosis of pollution upstream of wastewaters treatment plants : from a physico-chemical analysis to the development of a new toxicological bioassay

Keywords : Environmental toxicology ; Wastewaters ; Bioassay ; Insect ; Regulatory ; Biomarkers, Physico-chemical analyses

Abstract :

Wastewaters represent major source of contamination for the environment due to the presence of different toxics (heavy metals, polycyclic aromatic hydrocarbons, pesticides, endocrine disruptors, etc.) which could affect organisms. Some of these anthropic substances are rejected in wastewaters collection systems, the sewerage networks, and can be release in the environment due to faults during their transport or treatment in the wastewaters treatment plant (WWTP). As well as their chemical nature making them difficult to remove from water. Thus, numerous studies are carried out on the toxicity of wastewaters, either after or during their treatment in WWTP, but few studies focused on analysis of chemical composition and toxicity of crude wastewaters before treatment in WWTP. This knowledge would allow implementation of preventive actions in treatment systems and reduction of emission sources in order to limit the contamination of environment. In addition, in some countries including France, regulatory authorities ask to the companies managing sanitation networks to detect and identify toxic substances in crude wastewaters. Physico-chemical analyses are efficient in order to detect and quantify pollutants but cannot allow to define the toxicity of polluted wastewaters. This toxicity has to be determinate but there is currently a lack of tools for this type of matrix. The development of a bioassay to analyse the toxicity of wastewater is crucial since this information is lacking in majority of the current diagnostics.

This CIFRE thesis funded and supervised by the Intercommunal Association for Sewage in Pontoise Region (SIARP), the Paris Institute of Ecology and Environmental Sciences (iEES-Paris) and the Seine-Normandie water agency aimed to characterize chemically the crude wastewaters in order to improve the knowledge on pollutants found in sewage network and to develop a new bioassay for toxicity analysis by using *Drosophila melanogaster* model.

Caractérisation des eaux usées d'un réseau d'assainissement pour un diagnostic des pollutions en amont des stations d'épuration : de l'analyse physico-chimique au développement d'un nouveau bioessai toxicologique

Mots-clés : Toxicologie environnementale ; Eaux usées ; Insecte ; Réglementation ; Biomarqueurs ; Analyses physico-chimiques

Résumé :

Les eaux usées représentent un danger majeur pour l'environnement car elles véhiculent différentes substances plus ou moins toxiques pour tout organisme vivant (métaux lourds, hydrocarbures aromatiques polycycliques, pesticides, perturbateurs endocriniens…). Certaines de ces substances que nous produisons, utilisons et rejetons dans les systèmes de collectes des eaux usées, les réseaux d'assainissement, peuvent se retrouver dans le milieu naturel suite à des failles de ces systèmes lors de leur transport ou de leur traitement et de par leur nature parfois difficile à éliminer de l'eau. De nombreuses études sont ainsi menées sur la toxicité des rejets des eaux usées, soit après ou durant leur traitement au sein des stations d'épuration (STEU) mais réciproquement peu d'études rapportent des informations sur le transport et les sources d'émission de substances ou sur le caractère toxique des eaux usées avant traitement en STEU. Connaître ces informations permettrait la mise en place d'actions préventives et curatives au niveau des systèmes de traitement et la réduction des sources d'émission afin de limiter la contamination de l'environnement. De plus, le regard des institutions réglementaires s'est tourné vers les sources d'émission incluant les eaux usées, qui doivent être identifiées et réduites dans la mesure du possible. Ainsi, les gestionnaires d'ouvrages de système d'assainissement se doivent de rechercher et d'identifier des substances toxiques présentes dans les eaux usées. Des outils couramment utilisés tels que la physico-chimie sont efficaces dans la quantification de ces substances mais présentent quelques limites. De plus, le caractère toxique est difficilement déchiffrable via ces outils et constitue pourtant l'information capitale désirée. Les outils et informations sont manquants dans ce contexte. Le développement d'un bioessai pour analyser la toxicité des eaux usées est crucial car cette information fait défaut dans la majorité des diagnostics actuels.

La présente thèse CIFRE financée et encadrée par le Syndicat Intercommunal pour l'Assainissement de la Région de Pontoise (SIARP), l'institut d'Écologie et des Sciences de l'Environnement de Paris (iEES-Paris) et l'Agence de l'Eau Seine Normandie vise à caractériser les eaux usées transitant dans un réseau d'assainissement afin d'améliorer les connaissances sur leur toxicité intrinsèque et d'identifier des effluents transportant des molécules toxiques pour en identifier la ou les sources et contribuer à leur réduction.