

U.F.R SCIENCES ET TECHNIQUES

Laboratoire Chrono-Environnement (UMR UFC/CNRS 6249 INRA)

ECOLE DOCTORALE « ENVIRONNEMENT- SANTE »

Thèse en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

SPECIALITÉ : SCIENCES DE LA VIE ET DE L'ENVIRONNEMENT

**EVALUATION DE LA VARIABILITE TEMPORELLE DES
IMPACTS DE REJET DE STATIONS D'EPURATION
DANS LES RIVIERES CALCAIRES**

Présentée et soutenue publiquement par

Axelle CHIFFRE

Le 12 septembre 2016

Thèse dirigée par : Pierre Marie Badot (HDR) et François Degiorgi

Composition du jury :

Marc BABUT	Directeur de recherche	IRSTEA, Lyon	Rapporteur
Cyril FEIDT	Professeur des Universités	Université de Lorraine	Rapporteur
Jérôme CACHOT	Professeur des Universités	Université de Bordeaux	Examinateur
Myriam EUVRARD	Maitre de conférences	Institut UTINAM	Examinateur
Pierre-Marie BADOT	Professeur des Universités	UBFC	Directeur de thèse
Francois DEGIOGI	Maître de conférence associé	UBFC	Co-directeur

Résumé

La majorité des stations d'épuration (STEP) sont conçues pour limiter l'apport en excès de matière organique, de nutriments et de matières en suspension (MES), mais ne sont pas adaptées pour éliminer tous les micropolluants présents dans les eaux usées. Ainsi, en déversant continuellement leurs rejets dans les cours d'eau, les STEP engendrent un apport continu de matière organique, de nutriments et de nombreux micropolluants organiques et inorganiques. La variabilité de la qualité des rejets associée aux variabilités hydrologiques et de flux de contaminants dans le milieu récepteur, engendre une variabilité temporelle des impacts de STEP dans les cours d'eau. Ces travaux ont pour principaux objectifs d'étudier les flux de contaminants issus des STEP dans le Doubs et dans la Loue dans les phases dissoutes et particulaires, et de caractériser les facteurs de variabilité de leurs concentrations. Afin de caractériser la variabilité des impacts, nous avons combiné des échantillonnages ponctuels d'eaux de surface, d'effluents et de sédiments avec des échantillonnages passifs et intégrateurs de MES et des mesures en continu de turbidité et de conductivité. L'étude des paramètres globaux (matière carbonée, nutriments et MES) réalisée par une série d'échantillonnage ponctuel des eaux de surface et des rejets a mis en évidence un impact des STEP sur l'augmentation des concentrations en ammonium dans le Doubs et dans la Loue. Toutefois, la variation des teneurs des différents paramètres est principalement influencée par les variabilités saisonnières des régimes hydrologiques du Doubs et de la Loue, notamment en période de crues pendant lesquelles les concentrations de COT et de MES sont les plus élevées. En parallèle, la mise en place d'un système de prise de données de la conductivité et de la turbidité à pas de temps très court en amont et en aval des STEP, a mis en évidence un effet de la STEP de Pontarlier sur l'augmentation de la conductivité en période hivernale. L'étude de la contamination des phases particulaires nous a permis de mettre en évidence une augmentation des concentrations en phosphore et en HAP dans les MES en aval des rejets des STEP. De plus, la mise en évidence d'une variabilité saisonnière des concentrations en HAP est vraisemblablement en lien avec la variabilité des sources d'émissions atmosphériques (combustion biomasse, trafic routier) et diffuses (goudron et bitume) influencée par les conditions météorologiques, notamment les basses températures hivernales qui accentuent l'adsorption particulière des HAP et leur dépôt, ainsi que les phénomènes de dégradation et d'érosion des routes. Les résultats obtenus avec deux contaminants aux propriétés physico-chimiques et origines différentes, ont démontré l'intérêt d'utiliser les MES pour l'évaluation de la qualité de l'eau en complément de l'étude des phases aqueuses et sédimentaires. Par ailleurs,

l'étude de la contamination des MES en lien avec le suivi de la turbidité nous a permis d'estimer des flux moyens de HAP allant de 5,0 à 10,1 kg an⁻¹ dans le Doubs et de 14,1 à 19,5 kg an⁻¹ dans la Loue. En outre, l'existence d'une contamination chronique par les HAP associée à des contaminations ponctuelles de pyréthrinoides reconnus comme étant particulièrement toxique pour les amphipodes nous ont amené à évaluer les effets de ces micropolluants en mélange sur *G. pulex*, espèce d'amphipode autochtone des cours d'eau européens. Cette étude a permis de caractériser les effets toxiques sur *G. pulex*, de sédiments contaminés séparément par du benzo(a)pyrène (BaP) (CL₅₀ = 11 mg kg⁻¹) et de la cyperméthrine (CL₅₀ = 17 µg kg⁻¹), et de montrer l'additivité des effets de mélanges entre le BaP et la cyperméthrine. Ces résultats montrent par ailleurs, la nécessité de disposer de techniques analytiques présentant une limite de quantification inférieure aux seuils de toxicité pour une évaluation pertinente de la qualité de l'eau, notamment lors des évaluations réglementaires. Enfin, ces travaux de thèse ont mis en évidence l'occurrence de substances médicamenteuses dans les eaux du Doubs et de la Loue dont les molécules retrouvées en plus fortes concentrations sont un anti-inflammatoire (diclofénac) et un antibiotique (sulfaméthoxazole). Les STEP ont été identifiées comme la principale voie d'entrée de ces substances, toutefois ces contaminations peuvent provenir d'autres sources tels que des rejets domestiques non raccordés aux réseaux, ainsi que de rejets liés aux activités de pâturage et d'épandage sur le bassin versant. Pour conclure, les STEP peuvent être considérées comme des points de concentrations de contaminants dans le Doubs et dans la Loue, quand bien même les sources d'émissions sont multiples et diffuses. De plus, les niveaux de contamination des eaux et des matrices particulières mesurés *in situ* et les seuils de toxicité mesurés pour des mélanges de contaminants présents de façon récurrente ou ponctuelle dans la Loue et le Doubs indique que les risques pour les organismes aquatiques ne peuvent être négligés.

Table des matières

RESUME	3
TABLE DES MATIERES	I
LISTE DES FIGURES	VI
LISTE DES TABLEAUX	X
LISTE DES ABREVIATIONS ET DES SIGLES	I
INTRODUCTION GENERALE	1
ETAT DES CONNAISSANCES ET CONTEXTE DE L'ETUDE	6
1 ETAT DES CONNAISSANCES DE LA VARIABILITE TEMPORELLE DES IMPACTS DES STEP DANS LES COURS D'EAU	7
1.1 LES STEP : FONCTIONNEMENT ET CARACTERISATION DES REJETS	7
1.1.1 Principe du traitement biologique à boues activées.....	7
1.1.2 Composition des eaux résiduaires	8
1.2 LES REJETS DE STEP : SOURCE DE MICROPOLLUANTS.....	11
1.2.1 Les HAP.....	12
1.2.2 Les résidus médicamenteux.....	14
1.2.3 Variabilité temporelle des rejets de STEP.....	15
1.3 IMPACTS DES STEP DANS LES COURS D'EAU SUR LA CONTAMINATION EN MICROPOLLUANTS.....	18
1.3.1 Les résidus médicamenteux.....	18
1.3.2 Les HAP.....	19
1.4 IMPACTS DES STEP DANS LES COURS D'EAU : APPROCHE BIOLOGIQUE	20
1.5 VARIABILITE SPATIO-TEMPORELLE A L'ECHELLE DU BASSIN VERSANT.....	23
2 BASSIN VERSANT HAUT DOUBS HAUTE LOUE	25
2.1 GEOLOGIE	25
2.2 HYDROGRAPHIE.....	26
2.3 CLIMAT.....	27
2.4 PRESSIONS ANTHROPIQUES.....	27
2.5 ASSAINISSEMENT	29
2.6 AGRICULTURE	30
2.7 ARTISANAT ET INDUSTRIE.....	31
2.8 PRELEVEMENTS D'EAUX POTABLE	32
2.9 PRESSIONS DIFFUSES.....	32

SITES D'ETUDE ET METHODOLOGIE.....	33
3 SITES D'ETUDE.....	34
3.1 STEP DE PONTARLIER.....	36
3.2 STEP D'ORNANS.....	39
3.3 ECHANTILLONNAGE.....	39
3.3.1 <i>Echantillonnage des eaux de surfaces et des effluents</i>	39
3.3.2 <i>Echantillonnage des matrices solides</i>	41
3.3.3 <i>Prélèvements de sédiments</i>	43
3.4 LES SONDES.....	43
3.5 MESURES PHYSICO-CHIMIQUES.....	44
3.5.1 <i>Mesures hydrauliques</i>	44
3.5.2 <i>Mesures chimiques</i>	45
3.6 ESTIMATION DES FLUX.....	50
3.7 MATERIEL BIOLOGIQUE: <i>GAMMARUS PULEX</i>	51
3.8 PRELEVEMENTS DE GAMMARES <i>IN SITU</i>	52
3.9 TEST ECOTOXICOLOGIQUE.....	53
3.9.1 <i>Prélèvements et maintien en laboratoire de gammaridae</i>	53
3.9.2 <i>Exposition et contamination des sédiments</i>	53
3.9.3 <i>Modélisation des courbes concentrations-réponses</i>	55
3.9.4 <i>Toxicité des mélanges</i>	55
RESULTATS ET DISCUSSION.....	57
CHAPITRE 1. ETUDE DE LA VARIABILITE TEMPORELLE DES PARAMETRES GLOBAUX.....	58
4 VARIABILITE SPATIO-TEMPORELLE DES DESCRIPTEURS GLOBAUX DANS LES EAUX DE SURFACE ET DANS LES REJETS.....	58
4.1 EAUX DE SURFACE.....	59
4.1.1 <i>Rivière Doubs</i>	59
4.1.2 <i>Rivière Loue</i>	62
4.1.3 <i>Comparaison des échantillons prélevés dans le Doubs et dans la Loue</i>	65
4.2 REJETS DE STEP.....	67
4.2.1 <i>STEP de Pontarlier</i>	67
4.2.2 <i>STEP d'Ornans</i>	68
4.2.3 <i>Comparaison du rejet du Doubs et de la Loue</i>	69
4.3 ESTIMATION DES FLUX.....	72
4.3.1 <i>Rapport de dilution entre les débits de STEP et les débits de rivière</i>	72
4.3.2 <i>Estimation des flux</i>	72
4.4 ANALYSE DES MESURES EN CONTINU DE LA CONDUCTIVITE ET DE LA TURBIDITE.....	74

4.4.1	<i>Le Doubs</i>	74
4.4.2	<i>Rivière Loue</i>	75
4.5	CONCLUSION	78
5	CHAPITRE 2 : ETUDE DE L'IMPACT DES STEP SUR LA CONTAMINATION EN RESIDUS MEDICAMENTEUX DANS LE DOUBS ET DANS LA LOUE	80
5.1	INTRODUCTION.....	81
5.2	MATERIALS AND METHODS	83
5.2.1	<i>Study of area</i>	83
5.2.2	<i>Compounds</i>	85
5.2.3	<i>Analysis</i>	86
5.2.4	<i>Environmental risk assessment</i>	87
5.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	88
5.3.1	<i>Occurrence of selected pharmaceuticals in the effluents</i>	88
5.3.2	<i>Occurrence of selected pharmaceuticals in river water</i>	90
5.3.3	<i>Toxicity</i>	95
5.4	CONCLUSION	100
5.5	SUPPLEMENTARY DATA	101
5.5.1	<i>Analysis</i>	101
5.5.2	<i>Limit of quantification</i>	102
5.5.3	<i>Toxicity references : PNEC</i>	103
5.5.4	<i>Mixing of effluent with river water</i>	104
6	CHAPITRE 3 : INTERET DES MES ET DES SEDIMENTS POUR L'EVALUATION DE LA CONTAMINATION PAR LES HAP DANS LE DOUBS ET DANS LA LOUE	105
6.1	INTRODUCTION.....	106
6.2	MATERIALS AND METHODS	108
6.2.1	<i>Study area</i>	108
6.2.2	<i>Sample collection</i>	110
6.2.3	<i>Gammaridae collection</i>	111
6.2.4	<i>Analyses</i>	112
6.2.5	<i>Diagnostic ratios</i>	113
6.2.6	<i>PAHs toxicity</i>	113
6.2.7	<i>Statistics</i>	114
6.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	114
6.3.1	<i>Conductivity, TOC, OM, and pH analyses</i>	114
6.3.2	<i>PAHs in surface water</i>	115
6.3.3	<i>PAHs in WWTP effluent</i>	117
6.3.4	<i>PAHs in suspended particulate matter</i>	117

6.3.5	<i>PAHs in sediment</i>	117
6.3.6	<i>PAH toxicity</i>	121
6.3.7	<i>Sources of PAHs</i>	121
6.3.8	<i>Gammarids population density</i>	122
6.4	CONCLUSION	124
7	CHAPITRE 4 : VARIABILITE TEMPORELLE DES IMPACTS DE STEP SUR LA CONTAMINATION DES MES DANS LES RIVIERES CALCAIRES	125
7.1	RIVIERE LOUE : ARTICLE 3	125
7.2	INTRODUCTION.....	127
7.3	MATERIALS AND METHODS	130
7.3.1	<i>Area of study</i>	130
7.3.2	<i>Sampling</i>	131
7.3.3	<i>Sample preparation and analysis</i>	131
7.3.4	<i>Data analysis</i>	132
7.4	RESULTS.....	133
7.4.1	<i>Physical-chemical proprieties</i>	133
7.4.2	<i>Phosphorus</i>	135
7.4.3	<i>PAHs</i>	136
7.4.4	<i>PAHs origins</i>	140
7.5	DISCUSSION	142
7.6	CONCLUSION	145
7.7	RIVIERE DOUBS	146
7.7.1	<i>Les HAP</i>	146
7.7.2	<i>Le phosphore</i>	148
7.8	CONCLUSIONS	149
8	CHAPITRE 5 : TOXICITE DU BENZO(A)PYRENE ET DE LA CYPERMETHRINE SEULS ET EN MELANGE SUR L'AMPHIPODE GAMMARUS PULEX	153
8.1	INTRODUCTION.....	154
8.2	MATERIALS AND METHODS	156
8.2.1	<i>Organisms sampling and maintenance</i>	156
8.2.2	<i>Sediment spiking</i>	156
8.2.3	<i>Gammaridae exposition</i>	157
8.2.4	<i>Contaminants analysis of sediment</i>	157
8.2.5	<i>PAH analysis</i>	157
8.2.6	<i>Statistical analysis and models</i>	158
8.3	RESULTS AND DISCUSSION.....	158
8.3.1	<i>Chemical concentration after 10 days of exposure</i>	158

8.3.2	<i>Single and mixture toxicity of BaP and cypermethrin</i>	159
8.4	CONCLUSION	162
	DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSION	163
	BIBLIOGRAPHIE	173
	LISTE DES PUBLICATIONS	194

Liste des figures

Etat des connaissances et contexte de l'étude

Figure 1-1 Concentrations moyennes de 90 molécules recherchées (excepté l'acésulfame à $14,3 \mu\text{g L}^{-1}$), d'après Loos et al. (2013).....	12
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Sites d'étude et méthodologie

Figure 2-1 Cartographie du bassin versant Haut Doubs-Haute Loue, EPTB.....	25
Figure 2-2 Schéma hydrogéomorphologique des bassins karstiques (Bichet et Campy, 2008)	26
Figure 2-3 Carte d'occupation des sols (EPTB Saône et Doubs, 2010, Corine Land Cover, 2006).....	28
Figure 2-4 Carte de la densité de population (EPTB Saône et Doubs, 2010).....	29
Figure 2-5 Carte des STEP (EPTB Saône et Doubs 2009).....	30
Figure 2-6 Interpolation du nombre d'UGB par commune, bassin versant SAGE Haut-Doubs/Haute-Loue (données CA25, 2010). Plus les couleurs sont chaudes plus le nombre d'UGB est important (bleu foncé = 0 à 270, vert = 270 à 380, jaune = 380 à 600 et orange/rouge = 600 à 1860) (Chanez et al. 2014).....	31
Figure 3-1 Localisation des sites d'étude sur le bassin versant Haut-Doubs/ Haute-Loue.....	34
Figure 3-2 Localisation des stations de prélèvements et de la STEP de Doubs et des déversoirs d'orage soumis à autosurveillance ().....	35
Figure 3-3 Localisation des stations de prélèvements et de la STEP d'Ornans.....	35
Figure 3-4 Chronique du débit moyens journaliers ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$) dans le Doubs et dans la Loue. Les croix rouges correspondent à chaque prélèvement ponctuel.....	40
Figure 3-5 Vue latérale d'un Gammaridae (d'après Xuereb 2009 adaptée d'après Roux, 1970). pc 1-7 : plaques coxales 1-7 ; Pe 1-7 : périomères 1-7 ; Pl 1-3 : pléomères 1-3 ; Ur 1-3 : uropomères 1-3.....	52
Figure 4-1 ACP (axes 1 et 2) : cercle de corrélation des paramètres mesurés dans les eaux de surface du Doubs.....	60

Résultats et discussion, Chapitre 1

Figure 4-2 ACP : projections des échantillons du Doubs selon les débits et les saisons.....	60
Figure 4-3 ACP (axes 1 et 2) : cercle de corrélation des paramètres mesurés dans les eaux de surface de la Loue	63
Figure 4-4 ACP : projections des échantillons de la Loue selon les débits et les saisons	63
Figure 4-5 ACP (axes 1 et 2) : cercle de corrélation des paramètres mesurés dans les eaux de surface du Doubs et de la Loue	66
Figure 4-6 ACP : projections des échantillons du Doubs et de la Loue	66

<i>Figure 4-7 ACP (axes 1 et 2) : cercle de corrélation des paramètres mesurés dans les effluents de la STEP de Pontarlier</i>	67
<i>Figure 4-8 ACP : projections des échantillons de l'effluent de la STEP de Pontarlier selon les saisons</i>	68
<i>Figure 4-9 ACP (axes 1 et 2) : cercle de corrélation des paramètres mesurés dans les effluents de la STEP d'Ornans</i>	69
<i>Figure 4-10 ACP : projections des échantillons de l'effluent de la STEP d'Ornans selon le débit de la Loue</i>	69
<i>Figure 4-11 ACP (axes 1 et 2) : cercle de corrélation des paramètres mesurés dans les effluents de la STEP de Pontarlier et d'Ornans</i>	70
<i>Figure 4-12 ACP : projections des échantillons des rejets de la STEP de Pontarlier et d'Ornans</i>	70
<i>Figure 4-13 Conductivité et turbidité enregistrée par les sondes YSI en amont et en aval des STEP dans le Doubs et débit moyen journalier du Doubs</i>	76
<i>Figure 4-14 Conductivité et turbidité enregistrée par les sondes YSI en amont et en aval des STEP dans la Loue et débit moyen journalier de la Loue</i>	76
<i>Figure 4-15 Corrélations entre les concentrations en MES mesurées dans les échantillons d'eau de surface, et les valeurs de turbidité enregistrées par les sondes correspondant aux prélèvements. Le « r² » correspond au coefficient de corrélation entre les deux variables.</i>	77

Résultats et discussion, Chapitre 2

<i>Figure 5-1 Location of sampling site indicating land use</i>	84
<i>Figure 5-2 Concentration (Y axis log scale) for the selected pharmaceuticals in the water of the River Doubs and the River Loue for the two sampling campaigns</i>	92
<i>Figure 5-3 Concentration of pharmaceuticals downstream of WWTP A in the River Doubs near the karstic losses, in the karst spring of the Loue river and upstream of WWTP B in the River Loue</i>	95
<i>Figure 6-1 Location of sampling sites of the Loue (site A) and the Doubs (site B) river in the French Jura (France)</i>	110
<i>Figure 6-2 Loue river flow (site A) and Doubs river flow (site B) during the sampling period (from December 2013 to March 2014) of surface water, effluent, sediment, SPM and invertebrates</i>	111
<i>Figure 6-3 Sum of the 16 US EPA PAH concentrations ($\sum_{16} \text{PAHs}$, ng L⁻¹) in effluent and surface water from the Loue (site A; La, Lb and Lc) and the Doubs river (site B; Da, Db and Dc), sampled in winter 2013 and spring 2014</i>	116
<i>Figure 6-4 Correlation between PAHs contents (ng g⁻¹) in SPM and sediment samples for both sites</i>	120
<i>Figure 6-5 Comparison of FLT/FLT+PYR versus IP/IP+BghiPL ratios, and ANT/ANT+PHE versus BaANT/BaANT+CHY. Data from the present study (dots) and the literature (triangles; data from Kanzari et al. 2014; Zhou et al. 1999; Guo et al. 2007; Yunker et al. 1996)</i>	122
<i>Figure 6-6 Density of Gammaridae (ind m⁻²) upstream and downstream of the WWTPs for each developmental stage: juveniles (< 3 mm) in black, immature (3-6 mm) in grey, adults (6-9 mm) in dotted lines and old adults (white)</i>	123

Résultats et discussion, Chapitre 3

Figure 7-1 Map showing location of the Loue river indicating sampling sites upstream (Up), near downstream (Nd) and far downstream (Fd) of the WWTP. 130

Figure 7-2 Phosphorus concentrations mg kg⁻¹dw in SPM (A) and sediment (B) in upstream (white), near downstream (black) and far downstream (dashed lines) from March to December 2014. SPM sampled in June, September and December concentrations are expressed in mean (\pm standard deviation). In SPM, no significant differences were found between sites for each campaign (Repeated measured anova, $p > 0.05$). Significant differences occurred between sampling campaigns (Repeated measured anova, $p < 0.05$). 135

Figure 7-3 PAH concentrations in $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw in SPM (A) and sediment (B) in upstream (white), near downstream (black) and far downstream (dashed lines) from March to December 2014. For the SPM sampled in June, September and December concentrations are expressed in mean (\pm standard deviation). In SPM, significant differences were found between sites for each campaign (*) (Repeated measured anova, $p > 0.05$). Significant differences occurred between sampling campaigns (letters) (Repeated measured anova, $p < 0.05$). 137

Figure 7-4 Relationship between the 16 PAH concentrations in sediment and SPM in $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw in upstream (circles), near downstream (square) and far downstream (triangle) in June 2014. Significant correlations were noted for each site (Spearman test, $p < 0.05$). 138

Figure 7-5 $\Sigma 16$ PAHs normalized to TOC upstream, near downstream and far downstream of the WWTP for each campaign in SPM (left) and sediment (right). 138

Figure 7-6 $\Sigma 16$ PAHs normalized to the specific surface area upstream, near downstream and far downstream of the WWTP for each campaign in SPM (left) and sediment (right). 139

Figure 7-7 The loading plot of PCA of PAHs from samples in the literature data from SPM and sediment from the Loue river. ("Bitumen" (Brandt and de Groot 2001)); "Brake linings" (Rogge et al. 1993); "Brown coal smoke" (Oros and Simoneit 2000); "Diesel engine smoke" (Khalili et al. 1995); "WWTP Effluent" (Buseti et al. 2006); "Gasoline engine smoke" (Khalili et al. 1995); "Lignite coal smoke" (Oros and Simoneit 2000); "Oak wood smoke" (Rogge et al. 1998); "Road dust particles" (Rogge et al. 1993); "Sediment downstr. WWTP" (Kanzari et al., 2011); Sludge (Jauzein et al. 1995); "Synthetic smoke" (Rogge et al. 1998); "Tunnel smoke" (Khalili et al. 1995); "Used motor oil" (Wang et al. 2009); "Wood combustion" (Khalili et al. 1995)). 141

Résultats et discussion, Chapitre 4

Figure 7-8 Concentrations en HAP dans les MES (gauche) et dans les sédiments (droite) du Doubs au cours des différentes campagnes d'échantillonnage en amont (blanc), en aval proche (noir) et en aval lointain (hachures). Les concentrations en HAP dans les MES en juin (n=5), septembre (n=5) et décembre (n=4) sont représentées par la moyenne pour chaque station et les écart-types. Les différences significatives (Anova à mesures répétées,

p < 0,05) de concentrations moyennes en HAP selon les différentes campagnes d'échantillonnages sont représentées par des lettres. 147

Figure 7-9 Concentrations en HAP rapporté au COT dans les MES (gauche) et dans les sédiments (droite) du Doubs au cours des différentes campagnes d'échantillonnage en amont (blanc), en aval proche (noir) et en aval lointain (hachures). 148

Figure 7-10 Concentrations en phosphore dans les MES (gauche) et dans les sédiments (droite) du Doubs au cours des différentes campagnes d'échantillonnage en amont (blanc), en aval proche (noir) et en aval lointain (hachures). Dans les MES, les concentrations en phosphores sont significativement plus élevées en aval proche (*) (anova à mesures répétées *p* < 0,05). 149

Figure 7-11 Concentrations moyenne en HAP et en phosphore dans les MES pour les différentes campagnes d'échantillonnage dans le Doubs (bleu) et dans la Loue (vert). Pour chaque de campagne, les concentrations correspondent à la moyenne des trois stations de prélèvements (amont, aval proche et lointain), et les barres d'erreur aux écart-types. En avril, mai, juin, septembre et décembre, le nombre de réplicas est respectivement *n*=3, *n*=3, *n*=15 et *n*=10. 150

Résultats et discussion, Chapitre 5

Figure 8-1 Concentration-response curve obtained by Hill's model after ten days of exposure to *G. pulex* to BaP (A), cypermethrin (B) and a mixture of BaP and cypermethrin (C). Percentages correspond to *G. pulex* mortality (%). BaP and mixture concentrations are expressed in mg kg⁻¹ and cypermethrin in µg kg⁻¹. Plots represent mean and standard error of six replicats. 160

Figure 8-2 Concentration-reponse curve obtained for *G. pulex* exposed to BaP and mixture of BaP and cypermethrin after ten days of exposure, expressed in terms of BaP (mg kg⁻¹). Percentages correspond to *G. pulex* mortality (%). Predicted concentration–response curves calculated by CA, IA models. 162

Discussion générale et conclusion

Figure 8-3 Densité total de gammares (ind m⁻²) en amont, aval proche et aval lointain des STEP de Doubs et d'Ornans dans respectivement le Doubs et la Loue pour chacune des campagnes de prélèvements en février 2013, juillet 2013, mars 2014 et septembre 2014, et à Oye et Pallet et Montegesoye pour les campagnes de 2014. 170

Liste des tableaux

Etat des connaissances et contexte de l'étude

Tableau 1-1 Performances minimales des stations d'épuration devant traiter une charge brute de pollution organique supérieure à 120 kg j ⁻¹ de DBO5.....	10
Tableau 1-2 Principales caractéristiques physico-chimiques des 16 HAP étudiés (Douben 2003)	13
Tableau 1-3 \sum_{16} HAP mesurés dans les effluents de STEP selon différentes études	14
Tableau 1-4 Concentration en ng L ⁻¹ de résidus médicamenteux appartenant à différentes familles dans les rejets de STEP.....	17
Tableau 1-5 Concentrations (ng L ⁻¹) de résidus médicamenteux dans les rejets de STEP et dans les eaux de surfaces en Amérique du nord, en Europe et en Asie selon Pal et al. (2010)	19
Tableau 1-6 Concentrations en HAP dans les MES et les sédiments mesurées pour différentes études.....	20
Tableau 1-7 Synthèse des impacts des rejets de STEP in situ sur différent taxons.....	22

Sites d'étude et méthodologie

Tableau 3-1 Caractéristiques des stations d'étude	36
Tableau 3-2 Normes de rejet selon l'arrêté préfectoral du 16 février 2001 et du SAGE Haut-Doubs Haute-Loue approuvé en date du 7 mai 2013	37
Tableau 3-3 Volumes déversés par les DO en 2014.....	37
Tableau 3-4 Résultats des campagnes 2013 et 2014 réalisée sur les sédiments, sur quatre stations du Doubs ..	37
Tableau 3-5 Résultats de suivi des substances significatives de la RSDE STEP de 2012 à 2014	38
Tableau 3-6 Classe granulométrique des particules.....	41
Tableau 3-7 Caractéristiques des stations hydrologiques.....	44
Tableau 3-8 Méthode d'analyse chimique pour les paramètres globaux	46
Tableau 3-9 Liste des substances pharmaceutiques sélectionnées et leur consommation annuelle en France (ANSM 2014). (1): métabolite de l'enrofloxacin ; (a): médicament vétérinaire utilisé et approuvé en France (http://www.ircp.anmv.anses.fr/results.aspx); b: médicament vétérinaire non approuvé en France (Bártíková et al. 2016)	49
Tableau 3-10 Concentration en BaP et cyperméthine dans les sédiments pour chaque expérimentation	54

Résultats et discussion, Chapitre 1

Tableau 4-1. Moyenne (Moy), écart type (Et), valeur minimale (Min) et valeur maximale (Max) des concentrations des variables mesurées au cours des campagnes d'échantillonnage dans le Doubs (n=28 pour	
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

<i>chaque station). Les différences significatives entre les stations amont et aval proche sont indiquées par «*», (Anova ou test de Kruskal Wallis, $p < 0,05$).....</i>	61
<i>Tableau 4-2 Moyenne (Moy), écart type (Et), valeur minimale (Min) et valeur maximale (Max) des concentrations des variables mesurées au cours des campagnes d'échantillonnage dans la Loue (n=28 pour chaque station). Les différences significatives entre les stations amont et aval proche sont indiquées par «* », (Anova ou test de Kruskal Wallis, $p < 0,05$).....</i>	64
<i>Tableau 4-3 Valeurs moyennes des différents paramètres mesurées dans le Doubs (n=84) et dans la Loue (n=84), Les différences significatives entre les stations amont et aval proche sont indiquées par «* », (Anova ou test de Kruskal Wallis, $p < 0,05$).....</i>	65
<i>Tableau 4-4 Moyenne (Moy), écart type (Et), valeur minimale (Min) et valeur maximale (Max) des concentrations des variables mesurées au cours des campagnes d'échantillonnage dans les rejets de la STEP de Doubs (n=28) et d'Ornans (n=28). Les différences significatives entre les stations amont et aval proche sont indiquées par «*», (Anova ou test de Kruskal wallis, $p < 0,05$).....</i>	71
<i>Tableau 4-5 Débit moyen du Doubs, de la Loue et des rejets de STEP pendant la campagne d'échantillonnage (de décembre 2013 à juin 2015). Moyenne (\pm erreur standard).....</i>	72
<i>Tableau 4-6 Flux moyens annuels en tonne an⁻¹ des différents paramètres dans les eaux du Doubs et de la Loue et dans les rejets des STEP de Doubs et d'Ornans.....</i>	73

Résultats et discussion, Chapitre 2

<i>Tableau 5-1 Characteristics of both WWTP.....</i>	85
<i>Tableau 5-2 List of the pharmaceuticals analyzed classified by their therapeutic activity, identification number (CAS); annual consumption in France; veterinary use and approved or not approved in France. All human pharmaceuticals use are approved in France.....</i>	86
<i>Tableau 5-3 Concentrations of pharmaceuticals in effluents of WWTP A and WWTP B.....</i>	89
<i>Tableau 5-4 Concentrations of pharmaceuticals in the River Loue (values in bold exceed threshold values a, b, c). PNEC correspond to the predicted no-effect concentration, MAC-EQS correspond to environmental quality standard relative to the maximum allowable concentration and AA-EQS is relative to annual average concentration.....</i>	98
<i>Tableau 5-5 Concentrations of pharmaceuticals ($\mu\text{g L}^{-1}$) in the River Doubs. PNEC correspond to the predicted no-effect concentration, MAC-EQS correspond to environmental quality standard relative to the maximum allowable concentration and AA-EQS is relative to annual average concentration.....</i>	99
<i>Tableau 5-6 Predicted no-effect concentration (PNEC $\mu\text{g L}^{-1}$) and corresponding risk quotients (RQs) for the selected compounds in both WWTP effluents.....</i>	100
<i>Tableau 5-7 LQ and LD for each compound.....</i>	102
<i>Tableau 5-8 PNEC values for each compound with references.....</i>	103
<i>Tableau 5-9 Electric conductivity measured in both sites.....</i>	104

Résultats et discussion, Chapitre 3

Tableau 6-1 Location of the experimental sites	109
Tableau 6-2 TOC, Conductivity, SPM content and pH in surface water and effluent samples taken from the experimental sites (Loue river: La, Lb, Lc; Doubs river: Da, Db, Dc), mean (standard error).....	114
Tableau 6-3 TOC, Conductivity, OM, DM and pH in SPM and sediment samples taken from the experimental sites (Loue river: La, Lb, Lc; Doubs river: Da, Db, Dc).....	115
Tableau 6-4 PAH concentrations (ng g^{-1}) in SPM and sediment samples taken upstream and downstream of the WWTPs A and B, and sediment Quality Guidelines for PAHs: TEC (Threshold Effect Concentration) and PEC (Probable Effect Concentration) were from MacDonald et al. (2000). EQS refer to Environmental Quality Standards from the European Water Framework Directive (2000/60/CE)	119

Résultats et discussion, Chapitre 4

Tableau 7-1 Number of samples of SPM and sediment for each site and sampling campaign	131
Tableau 7-2 Particle size and total organic content in sediment upstream, near downstream and far downstream of the WWTP for each campaign	134
Tableau 7-3 Particle size and total organic content in SPM upstream, near downstream and far downstream of the WWTP for each campaign, (mean \pm SD).....	134
Tableau 7-4 Total phosphorus concentration (mg L^{-1}) in surface water samples Up, Nd and Fd of the WWTP. In surface water samples and effluent, total phosphorus was measured according to standard NF EN ISO 11885.	136
Tableau 7-5 Relationship between the 16 PAH concentrations in sediment and SPM for each site and sampling campaign.....	139
Tableau 7-6 Molecular ratios for SPM and sediment samples.....	141
Tableau 7-7 Concentrations moyennes (erreur standard) en COT et taux de MO dans les MES et les sédiments du Doubs pour les différentes campagnes d'échantillonnage	148

Résultats et discussion, Chapitre 5

Tableau 8-1 Nominal and average measured concentration of BaP in sediment after 10 days of exposure (d_{10}), mean (SD), (n=3).....	159
Tableau 8-2 Nominal and average measured concentration of BaP in water after 10 days of exposure (d_{10}), mean (SD), (n=3).....	159
Tableau 8-3 LC_{50} values for BaP and cypermethrin considering median TOC content ($17.4 \text{ g TOC kg}^{-1} \text{ dw}$) measured in 5 replicates in both experiments.	161

Discussion générale et conclusion

<i>Tableau 8-4 Concentrations en HAP ($\mu\text{g kg}^{-1}$) dans les MES en amont et en aval des STEP de Doubs et d'Ornans dans le Doubs et dans la Loue.</i>	<i>166</i>
<i>Tableau 8-5 Estimation des flux moyens annuels de HAP (kg an^{-1}) en amont et en aval des STEP de Doubs et d'Ornans dans le Doubs et dans la Loue, pour les valeurs médiane, 10^{ème} percentile et 90^{ème} percentile des concentrations en HAP dans les MES.</i>	<i>167</i>

Liste des abréviations et des sigles

ACE : acénaphène
ACP : analyse en composantes principales
AFNOR : Association française de normalisation
AMM : autorisation de mise sur le marché
AMPA : acide aminométhyl phosphonique
AMPERES Analyse des Micropolluants Prioritaires et Emergents dans les Rejets et les
ANMV : Agence nationale du médicament vétérinaire
ANSES Agence Nationale de Sécurité Sanitaire, Alimentation, Environnement et
ANT : anthracène
AOC : Appellation d'origine contrôlée
ASTM : American society for testing and materials
Azote ammoniacal : NH_4^+
Azote Kjeldahl : Nk
BaANT: benzo(a)anthracène
BaP: benzo(a)pyrène
BbFLT: benzo(b)fluoranthène
BghiPL: benzo(g,h,i)pérylène
BkFLT: benzo(k)fluoranthène
BTP : Bâtiment et travaux publics
CA : Concentration addition
CA25 : Chambre d'agriculture du Doubs
CCL : Communauté de Communes du Larmont
CHY : chrysène
COD : Carbone organique dissout
COFRAC : Comité d'accréditation
COT : Carbone organique total
d'orthophosphates (PO_4^{3-})
DBO : demande biochimique en oxygène
DBO : Demande biologique en oxygène
DCE Directive cadre sur l'eau
DCO : demande chimique en oxygène
DO : déversoir d'orage
DREAL : Direction régionale de l'environnement de l'aménagement et du logement
EH Equivalent habitant
EPTB : Etablissement public territorial du bassin Saône et Doubs
ESI Ionisation électrospray
ETM : éléments traces métalliques
FLT : fluoranthène
FLU: fluorène
GC MS : Chromatographie en phase gazeuse – spectrométrie de masse
HAP : hydrocarbure(s) aromatique(s) polycyclique(s)

HPLC : High Performance Liquid Chromatography
 HTR : temps de rétention hydraulique
 IA : Independent action
 IcdPYR: indeno[1,2,3-cd]pyrène
 ISO : Organisation internationale de normalisation
 Koc : Coefficient de partage carbone organique/eau, donne une indication de l'aptitude de la
 Kow : Coefficient de partage octanol/eau, mesure l'hydrophobie d'une molécule
 LC-MS/MS Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
 LD : Limite de détection
 LD Limite de détection
 LEMA : Loi sur l'eau et les milieux aquatiques
 MEDDE : Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie
 MES Matières en suspension
 MO : Matière organi
 MRM Multiple reaction monitoring
 MS Matières sèches
 NAP : naphthalène
 NF : Normes françaises
 NGL : Azote global
 Nitrates NO_3^-
 Nitrites NO_2^-
 NQE Norme de qualité environnementale
 ONEMA Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques
 PBDE : polybromodiphényléthers
 PCB : Polychlorobiphényle
 PCDD : polychlorodibenzo-p-dioxines
 Perfluoroalkyles : PFASs
 PHE : phénanthrène
 PIREN-Seine : Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine
 PNEC: *predicted no effect concentration*
 Pt: Phosphore total
 PYR : pyrène
 QMNA₅: valeur du débit mensuel d'étiage atteint par un cours d'eau pour 5 ans
 RUTP : rejets urbains de temps de pluie
 SAGE : Schéma d'aménagement et de la gestion des eaux
 SAU : Surface agricole utile
 SAU : surface agricole utile
 SDAGE : Schéma directeur d'aménagement et de gestion des eaux
 SPE : Solid Phase Extraction, Extraction sur phase solide
 SPF : Surface fourragère principale
 STEP : Station d'épuration des eaux usées
 STR : temps de séjour des boues
 UE : Union Européenne
 UGB : Unité gros bétail
 UPLC ® Chromatographie liquide ultra performant

Introduction générale

La qualité de l'eau est à la fois essentielle pour le fonctionnement des écosystèmes aquatiques et pour la garantie des usages tel que l'alimentation en eau potable. Toutefois, de nombreux écosystèmes aquatiques sont dégradés par des pollutions d'ordre biologique, chimique et/ou physique. Depuis de nombreuses années une prise de conscience des risques liés à la présence de divers contaminants, de nombreuses études ont porté sur l'identification, les comportements, les transferts et le devenir de multiples substances chimiques dans l'environnement (Banjac et al. 2015; Osorio et al. 2016; Fairbairn et al. 2016). Elle a aussi mené à la mise en place d'une politique de l'eau s'inscrivant dans un cadre européen à travers plusieurs conventions internationales parmi lesquelles les conventions d'Oslo et de Paris (1978). En France la première loi sur l'eau est établit en décembre 1964 puis renouvelée par la loi sur l'eau de janvier 1992. En 2000, la directive cadre sur l'eau (DCE) du (directive 2000/60) vise à donner une cohérence à l'ensemble de la législation avec une politique communautaire globale dans le domaine de l'eau. Elle définit un cadre pour la gestion et la protection des eaux par grand bassin hydrographique au plan européen. La DCE fixe notamment des objectifs pour la préservation et la restauration de l'état des eaux superficielles. La transposition de la DCE en droit français a été effectuée en 2006 avec la troisième loi sur l'eau (loi sur l'eau et les milieux aquatiques) et l'arrêté du 25 janvier 2010 relatif aux méthodes et critères d'évaluation de l'état écologique, de l'état chimique et du potentiel écologique des eaux de surface. A une échelle plus locale, les gestionnaires ont mis en place les SDAGE (Schéma directeur d'aménagement et de gestion des eaux) et les SAGE (Schéma d'aménagement et de la gestion des eaux) qui définissent les orientations pour une gestion équilibrée de la ressource en eau, ainsi que les objectifs de qualité des eaux pour chaque territoire.

L'utilisation de l'eau dans les process industriels, pour l'agriculture et les usages domestiques a pour conséquence une introduction continue de contaminants organiques et inorganiques dans l'environnement. Les eaux usées d'origine domestique, industrielle et pluviale sont acheminées et traitées vers les stations d'épurations (STEP) dont le but est de limiter l'apport en excès de matières en suspension (MES), matière organique et substances minérales telles que les nitrates et les phosphates dans le milieu récepteur. Toutefois, de nombreux micropolluants tels que les éléments traces métalliques (ETM), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les détergents et les résidus médicamenteux par exemple, sont présents dans les eaux brutes en entrée de STEP. Or, la majorité des STEP en France ne sont actuellement pas conçues pour éliminer ces micropolluants, de ce fait les STEP sont considérées comme une des principales voies d'entrée des micropolluants dans les écosystèmes aquatiques. Par ailleurs selon leurs propriétés physico-chimiques, les différents contaminants sont répartis entre la phase

dissoute et la phase particulaire où ils sont susceptibles d'être adsorbés. Bien que les MES soient impliquées dans le transport de nombreux micropolluants et impactent les organismes aquatiques (Bilotta and Brazier 2008), la majorité des analyses destinées à évaluer la qualité chimique des eaux est effectuée sur la phase dissoute de l'échantillon et ainsi ne prend pas en compte les contaminants de la phase particulaire (Vignati et al. 2009) .

Contexte scientifique

Le bassin versant du Haut Doubs et de la Haute Loue en Franche Comté constitue un patrimoine de haute valeur écologique et paysagère et se distingue par le caractère exceptionnel des écosystèmes aquatiques et humides tels que les lacs de Saint Point et de Remoray, les tourbières de Frasne, les vallées de la Loue et du Lison ainsi que de nombreux affluents. La vallée de la Loue reconnue pour sa richesse halieutique avec la présence d'espèces de poissons réputées à forte valeur patrimoniale telles que le chabot, la lamproie de Planer et le blageon inscrits à l'annexe II de la directive Habitat, est classée « zone d'intérêt communautaire » au titre du programme NATURA 2000. Selon les normes en vigueur en France et la synthèse des données résultants de l'ensemble des compartiments biologiques, l'état écologique de la Loue est en bon état. Or depuis plusieurs dizaines d'années, de nombreuses mesures et observations amènent à penser que les rivières franc-comtoises subissent une érosion lente et continue de leurs fonctions biologiques (Badot et al. 2014). Cette dégradation écologique se manifeste notamment par des épisodes récurrents de proliférations algales, des phénomènes de colmatage des fonds par des fines, des changements de couleurs des eaux en période de crues, ainsi qu'une raréfaction voire une disparition des espèces réputées sensibles tels que les grands plécoptères, les écrevisses pieds blancs, les éphémères et les trichoptères. De plus au cours des dernières années, cette dégradation s'est traduite par de spectaculaires épisodes de mortalité piscicole dans la Loue mais aussi dans d'autres rivières franc-comtoises telles que le Dessoubre, le Doubs et l'Ain (ONEMA et al. 2012). Ces mortalités affectent les salmonidés (truites et ombres) dont les cadavres sont bien visibles, ainsi que les populations de chabots et de loche franche. Ces événements récurrents ont attiré l'attention de l'état, des collectivités et du public sur la détérioration de la qualité des rivières franc-comtoises, et ont mené à mobiliser diverses institutions publiques, des bureaux d'études et l'université de Franche-Comté dans le but de mieux comprendre les causes et les conséquences de ces perturbations.

Le SAGE a retenu diverses actions ayant pour objectif d'atteindre pour 2021 « un état optimal pour la vie biologique pour les cours d'eau possédant un potentiel élevé tels que la Loue et de la partie amont du Doubs » (EPTB 2013). Ainsi, les principales actions retenues ont pour

objectifs de limiter la pollution organique et toxique issue de sources ponctuelles (assainissement) et diffuses (effluents d'élevage), de réduire les rejets de micropolluants et de développer les connaissances sur ces derniers afin d'engager une stratégie adaptée. Par ailleurs le SAGE recommande un travail de recherche scientifique permettant d'identifier l'origine des HAP retrouvés dans les eaux superficielles, d'évaluer leur impact sur le milieu aquatique, de prévoir leur comportement, ainsi qu'une évaluation des impacts des substances présentes dans les produits de synthèse couramment utilisés (médicaments humain et bétail), pesticides et autres produits accessibles aux particuliers et professionnels. Dans ce contexte, une équipe de chercheurs du laboratoire Chrono Environnement de l'UMR 6249 UFC CNRS a initié en 2012 un vaste programme de recherche centré sur les dysfonctionnements des rivières karstiques plus particulièrement ciblé sur la Loue, grâce au soutien financier de l'Agence de l'eau, de la région Franche Comté et du département du Doubs. En effet, les caractéristiques géologiques du bassin versant de la Haute Loue rendent cette rivière particulièrement vulnérable aux pollutions diverses en raison de la faible épaisseur des sols et de la nature karstique du substratum géologique.

Ce travail de thèse s'inscrit donc dans le cadre de ce programme de recherche sur la Loue mené par le laboratoire Chrono-environnement qui a pour principaux objectifs de caractériser l'état de santé actuel de la Loue, d'élucider les mécanismes des perturbations des fonctions biologiques du cours d'eau, et d'identifier les sources de pollution et leurs voies de transferts à l'échelle du bassin versant. Dans ce cadre, le but du présent travail est d'étudier plus particulièrement les impacts de deux STEP dans le Doubs et dans la Loue. Ces travaux visent notamment à identifier, quantifier et comparer les flux de contaminants issus des STEP dans le Doubs et dans la Loue dans les phases dissoutes et particulaires, de caractériser les facteurs de variabilité des concentrations en éléments carbonés, nutriments, MES et micropolluants ainsi que d'évaluer leur impact sur les organismes aquatiques.

Dans ce contexte, nous avons étudié deux STEP différant par leur capacité de traitement et rejetant leurs eaux traitées dans le Doubs et dans la Loue. La variabilité temporelle de la qualité des rejets associée aux variabilités hydrologiques et de flux de contaminants dans le milieu récepteur, engendre une variabilité temporelle des impacts de STEP dans les cours d'eau, variabilités qu'il importe de caractériser.

Dans le but de caractériser les impacts des STEP de Pontarlier et d'Ornans sur la qualité du Doubs et de la Loue, nous avons étudié la variabilité temporelle des teneurs en éléments carbonés, en nutriments, MES, ainsi que les concentrations de différents micropolluants tels que les résidus médicamenteux, les HAP et les pesticides dans les phases solubles et sédimentaires.

Les résultats obtenus ayant montré l'occurrence fréquente de contamination par les HAP et certains pesticides (notamment les pyréthrinoides) nous avons décidé d'évaluer la toxicité de ces molécules seules ou en mélange afin d'évaluer les risques écologiques associés à ces contaminations.

Le premier chapitre est consacré à un état des connaissances sur les impacts des STEP sur la contamination des cours d'eau, ainsi qu'à une description du bassin versant et de ses caractéristiques.

Le chapitre 2 présente les sites d'étude, la méthodologie employée pour les prélèvements et les analyses effectuées.

Le chapitre 3 traite de l'étude de la variabilité spatio-temporelle des impacts des STEP sur les concentrations et les flux d'éléments carbonés, des nutriments et des MES dans les eaux du Doubs et de la Loue.

Le chapitre 4 est consacré à la première étude sur la contamination des eaux du Doubs et de la Loue et des effluents des deux STEP par les résidus médicamenteux.

Le chapitre 5 porte sur l'étude de la variabilité temporelle de la contamination des HAP et en phosphore, et sur l'intérêt d'utiliser les MES et les sédiments pour l'évaluation de la qualité de l'eau.

Le chapitre 6 présente les résultats sur l'étude de la toxicité de sédiments artificiels contaminés par BaP et de la cyperméthrine seuls et en mélange sur un amphipode *Gammarus pulex*.

Le chapitre 7 est consacré à la discussion générale des résultats et à la conclusion de cette étude.

Etat des connaissances et contexte de l'étude

1 Etat des connaissances de la variabilité temporelle des impacts des STEP dans les cours d'eau

Les eaux résiduaires domestiques et industrielles sont reconnues comme des sources ponctuelles majeures de substances polluantes dans les cours d'eau (Coquery et al. 2011). L'identification et la quantification de ces substances dans les rejets et dans les cours d'eau est donc nécessaire afin d'évaluer les risques associés à leur présence dans les milieux aquatiques.

1.1 Les STEP : fonctionnement et caractérisation des rejets

Les eaux usées issues des activités domestiques, industrielles et urbaines sont collectées puis acheminées vers une STEP pour être traitées. Les eaux résiduaires de type « domestique » sont composées d'eaux grises issues des usages quotidiens des habitations et des eaux vannes issues du rejet des toilettes. Ces eaux résiduaires domestiques sont à l'origine d'apport de substances carbonées, azotées, phosphorées, ainsi que des substances plus ou moins biodégradables (désinfectants, solvants, résidus de médicaments...) dans les réseaux de collecte. Les eaux usées industrielles peuvent également être collectées dans les systèmes d'assainissement publics avec l'autorisation des maîtres d'ouvrage concernés. De plus, dans le cas de réseaux unitaires, les eaux pluviales sont mélangées aux résiduaires puis acheminées vers les STEP.

1.1.1 Principe du traitement biologique à boues activées

L'objectif premier d'une station d'épuration est de limiter l'apport dans le milieu récepteur de pollution organique, azotée, phosphorée et particulaire. Bien qu'il existe différentes méthodes de traitement des eaux usées (lagunage, lits bactériens, biofiltrations...), nous nous sommes intéressés pour ce travail de thèse spécifiquement au traitement biologique à boues activées en usage dans les STEP étudiées.

Une station d'épuration des eaux usées classique est généralement composée (Degrémont 2004) :

- D'une étape de prétraitement afin d'éliminer les déchets, les sables et les graisses par des étapes de dégrillage, de dessablage et de déshuilage.
- D'une étape de traitement primaire qui permet d'éliminer une majeure partie des matières en suspension par simple décantation (boue primaire).
- D'un traitement secondaire composé d'un traitement biologique pour éliminer la pollution organique et azotée considérée comme source de nutriment pour les

microorganismes, et d'un traitement chimique pour éliminer le phosphore par ajout de chlorure ferrique ou de polymères.

- Certaines stations d'épurations sont équipées d'un traitement tertiaire chimique ou physique (ozonation, charbon actif, nanofiltration) qui permet d'améliorer la qualité des rejets en diminuant notamment les concentrations en micropolluants.

Le traitement par voie biologique des eaux usées est principalement basé sur l'activité bactérienne. Les boues activées sont composés de microorganismes eucaryotes (protozoaires, métazoaires et champignons) et procaryotes (bactéries). Pour se développer ces microorganismes ont besoin de sources d'énergie (molécules carbonées) et de nutriments, nécessaires à la synthèse de nouveau matériel cellulaire. Les eaux usées arrivant à la station d'épuration contiennent entre autres du carbone organique, de l'azote organique (urée) et minéral (ammoniaque), du phosphore minéral (orthophosphate) et organique (polyphosphate). Les microorganismes naturellement présents dans les eaux usées transforment la pollution organique biodégradable en composés inorganiques en conditions aérobie ou anaérobie (Degrémont 2005) :

- En condition aérobie : le carbone et l'azote sont biodégradés :
Pollution + microorganismes + O₂ -> Biomasse + H₂O + CO₂ + NH₄⁺
- L'azote ammoniacal est ensuite oxydé en nitrites puis en nitrates :
Nitrification : 2NH₄⁺ + 3O₂ -> 2NO₂⁻ + 4H⁺ + 2H₂O
2NO₂⁻ + O₂ -> 2NO₃⁻
- En condition anaérobie le milieu devient réducteur, ainsi les nitrates sont réduits en azote gazeux (N₂)

Les rejets de STEP sont déversés en continu dans le milieu récepteur, cependant la qualité et la quantité des rejets sont variables à différentes échelles de temps (jour, semaine, et année). Cette variabilité temporelle est due à la qualité des effluents entrants et dans le cas de réseaux unitaires au régime hydrologique (temps sec / temps de pluie).

1.1.2 Composition des eaux résiduaires

1.1.2.1 Paramètres globaux

- Les matières en suspension

Dans les eaux usées, les matières solides sont dispersées en fonction de leur taille et sont présentes sous forme dissoute, colloïdale ou sédimentable. Les MES sont sous forme organique et inorganique. Les processus de filtration ou de décantation sont les plus efficaces pour éliminer les MES. Cependant, une fraction des MES (notamment les colloïdes) n'est pas totalement

éliminée par la STEP et se retrouve rejetée dans le milieu récepteur. Par ailleurs, les MES jouent un rôle important dans le transfert de polluants du fait de leur capacité d'adsorption avec de nombreux contaminants (ions, molécules organiques) et d'agents biologiques.

Les MES rejetées dans le milieu récepteur en concentrations trop élevées peuvent par exemple être défavorables aux peuplements piscicoles en colmatant leur branchies, induire une baisse de l'oxygène dissous, diminuer la pénétration de la lumière (Nisbet and Verneaux 1970 ; Rodier et al.).

- **La matière organique**

La matière organique (MO) regroupe de nombreuses substances hétérogènes carbonées plus ou moins dégradables. Ainsi, la pollution rapidement biodégradable est décomposée par les bactéries hétérotrophes en conditions aérobies ou anaérobies. La pollution lentement ou non biodégradable est caractérisée par des molécules de haut poids moléculaire et des substrats organiques colloïdaux ou particulaires ainsi que des micropolluants. L'élimination de la MO est mesurée par la demande chimique en oxygène (DCO) et la demande biologique en oxygène (DBO₅). La valeur de la DCO mesure la matière organique totale présente en quantité importante dans les eaux usées. L'analyse de la DBO₅ permet de mesurer la demande d'oxygène des microorganismes pour l'oxydation de la matière organique. En cinq jours, la majeure partie de la matière biodégradable sera oxydée. Enfin, le carbone organique total (COT) représente la totalité du carbone organique après transformation en CO₂.

- **L'azote**

Dans les eaux usées l'azote est présent sous forme organique –NH₂, fonction amine contenue dans les urées et les protéines, et sous forme inorganique : azote ammoniacal (NH₄⁺), et en faible concentration les nitrites (NO₂⁻) et les nitrates (NO₃⁻). L'azote Kjeldahl (Nk) est égal à la somme de l'azote ammoniacal et de l'azote organique. Dans les écosystèmes aquatiques, l'azote peut se trouver sous forme organique dissoute ou particulaire, et sous forme de composés inorganiques principalement à l'état dissout. L'azote organique peut être d'origine naturelle (protéines, chlorophylles et autres composés organiques) et/ou avoir des origines anthropiques (effluents domestiques et industriels, engrais et excréments d'animaux d'élevage...).

- **Le phosphore**

Dans les eaux usées, le phosphore se trouve principalement sous forme d'orthophosphates (PO₄³⁻) et sous forme de phosphore organique soluble et particulaire. Le phosphore est naturellement présent dans les eaux de surface, il se trouve sous différentes formes

inorganiques et organiques, dissoute, colloïdale et/ou particulaire. La fraction dissoute/filtrée du phosphore comprend une fraction dissoute inorganique composée d'orthophosphates (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) et de polyphosphates condensés, ainsi qu'une fraction organique dissoute composée de molécules de phosphates associées à des molécules à bases carbonées (McKelvie et al. 1995). La fraction particulaire du phosphore est constituée par le phosphore organique particulaire et le phosphore inorganique particulaire. Un excès de phosphore conduit à des proliférations algales : phénomène d'eutrophisation des eaux. Dans ce contexte, les STEP jouent un rôle essentiel pour limiter l'apport de phosphore dans les écosystèmes aquatiques.

1.1.2.2 Législation

Les STEP d'une capacité de plus de 2000 équivalent habitants (EH) doivent être conformes à l'arrêté du 22 juin 2007 qui fixe les concentrations maximales et les rendements minimaux à atteindre en STEP pour l'élimination de la pollution classique : DBO₅, DCO, phosphore, azote, et MES (Tableau 1-1). Cet arrêté est relatif à la collecte, au transport et au traitement des eaux usées des agglomérations d'assainissement ainsi qu'à la surveillance de leur fonctionnement et de leur efficacité. Il définit également les obligations en matière d'autosurveillance du réseau qui a pour finalité une meilleure maîtrise des rejets des effluents et des déchets. Les déversoirs d'orage et dérivations éventuelles situés sur un tronçon destiné à collecter une charge brute de pollution organique par temps sec supérieure à 600 kg/j de DBO₅ font l'objet d'une surveillance, permettant de mesurer en continu le débit et d'estimer la charge polluante (MES, DCO) déversée par temps de pluie ou par temps sec.

Tableau 1-1 Performances minimales des stations d'épuration devant traiter une charge brute de pollution organique supérieure à 120 kg j⁻¹ de DBO₅.

Concentration en sortie de STEP		Rendement minimal d'épuration
DBO ₅	25 mg L ⁻¹	pour 120 à 600 kg/j : 70 % pour plus de 600 kg/j : 80 %
DCO	125 mg L ⁻¹	75 %
MES	35 mg L ⁻¹	90 %
NGL	15 mg/L pour une charge brute de 600 à 6000 kg/j	
Azote global	10 mg/L pour une charge brute > 6000 kg/j	70%
PT	2 mg/l pour une charge brute de 600 à 6000 kg/j	
Phosphore	1 mg/L pour une charge brute > 6000 kg/j	80 %

1.2 Les rejets de STEP : source de micropolluants

La production et la consommation de nombreuses substances utilisées dans les domaines industriel, agricole et domestique se traduisent par l'introduction de nombreux micropolluants dans les systèmes d'eau usées et dans l'environnement. Les STEP n'étant pas conçues pour éliminer les micropolluants, les rejets de STEP contiennent des cocktails de nombreuses substances à des concentrations variables (Moon et al. 2008 ; Ratola et al. 2012 ; Luo et al. 2014). En France, les résultats obtenus avec le projet AMPERES « Analyse de micropolluants prioritaires et émergents dans les rejets et les eaux superficielles » ont permis de dresser un bilan de la contamination et des flux de nombreux micropolluants dans les rejets de 21 STEP (Coquery et al. 2011). Les micropolluants retrouvés aux plus fortes concentrations sont :

- les ETM (concentration $> 10 \mu\text{g L}^{-1}$)
- les substances pharmaceutiques (kétoprofène), les alkylphénols (éthoxylates et éthoxylates et di(2-ethylhexyl), le glyphosate et son principal métabolite l'acide aminométhyl phosphonique (AMPA) ($1 < \text{concentration} < 10 \mu\text{g L}^{-1}$)
- les hormones, le nonylphénol, le triclosan, des substances pharmaceutiques (paracétamol, ibuprofène...), des composés bromés et chlorés, les HAP et les composés organiques volatils (COV) (concentration $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$)

A l'échelle européenne, Loos et al. (2013) ont analysés 156 micropolluants organiques dans 90 STEP. Les principaux groupes de substances analysés étaient les produits pharmaceutiques à usage domestiques et vétérinaire, des perfluoroalkyles (PFASs), des retardateurs de flamme bromés, des pesticides et quelques métabolites. Les résultats ont montré la présence de 125 substances à des concentrations allant du nano au milligramme par litre. Les molécules retrouvées aux plus fortes concentrations étaient les édulcorants, les anticorrosifs (benzotriazoles), les retardateurs de flammes et les résidus pharmaceutiques.

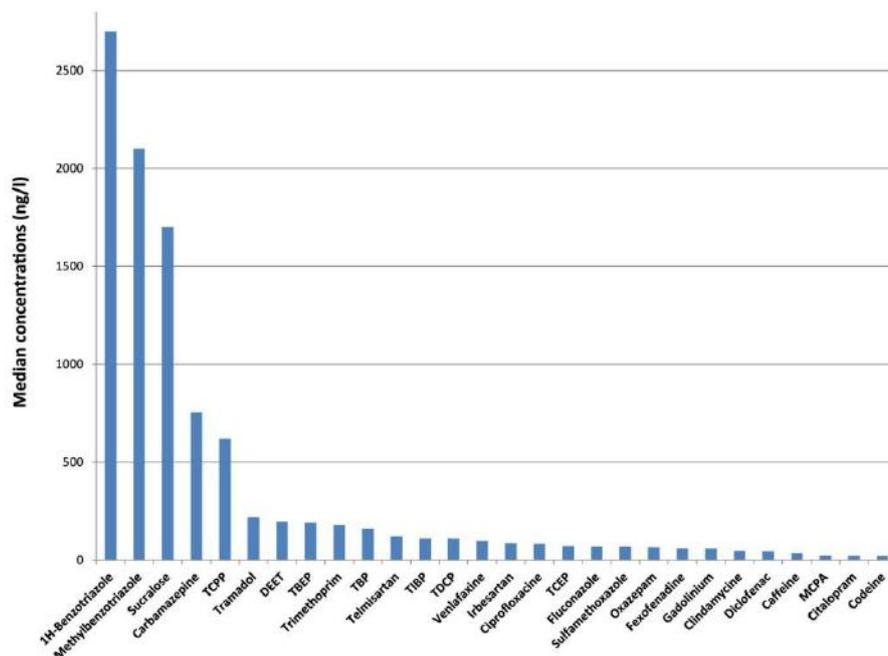


Figure 1-1 Concentrations moyennes de 90 molécules recherchées (excepté l'acésulfame à 14,3 $\mu\text{g L}^{-1}$), d'après Loos et al. (2013).

Deblonde et al. (2011) ont analysé une base de données sur divers micropolluants dans les STEP provenant de 45 publications internationales. Ils ont mis en évidence des taux d'élimination très variables allant de 0% (produits de contraste) à 97% (psychotropes). Les concentrations les plus faibles dans les rejets ont observées pour l'ofloxacine (7 à 816 ng L^{-1}). Le taux d'élimination des antibiotiques est d'environ 50 %, alors que les analgésiques, les anti-inflammatoires et les bêtabloquants sont les molécules les plus résistantes au traitement (30 à 40 % d'élimination).

Ces différentes études mettent en évidence une multicontamination des effluents de STEP par des substances aux origines et aux propriétés physico-chimiques différentes. Dans le cadre de cette thèse, nous allons nous intéresser plus particulièrement aux HAP et aux résidus médicamenteux présents dans les rejets de STEP.

1.2.1 Les HAP

Les HAP sont des composés organiques constitués de deux ou plusieurs noyaux aromatiques condensés. Les molécules sont planes, rigides, non polaires. Les noyaux aromatiques rendent les HAP très hydrophobes. Leur hydrophobie augmente avec le nombre de cycles aromatiques, alors que leur solubilité et leur volatilité diminuent. Les HAP susceptibles d'être présents dans le milieu aquatique ont entre deux et dix noyaux aromatiques. Du fait de leur toxicité sur de nombreux organismes vivant et de leur persistance dans l'environnement, l'ensemble des HAP appartient aux substances prioritaires définies dans la Directive Cadre

Européenne sur l'eau (2000/60/CE) et de l'Environmental Protection Agency américaine (US EPA 1993). Le Tableau 1-2 présente les seize HAP principalement étudiés et recherchés dans l'environnement car déclarés comme substances prioritaires par l'US EPA. Leurs propriétés physico-chimiques sont en lien avec le coefficient octanol-eau (K_{ow}) indicateur de l'hydrophobicité, le coefficient de partage carbone organique/eau (K_{oc}) et le poids moléculaire. Plus les valeurs de K_{ow} et de K_{oc} sont élevées, plus la molécule aura tendance à s'adsorber aux matrices solides organiques.

Tableau 1-2 Principales caractéristiques physico-chimiques des 16 HAP étudiés (Douben 2003)

HAP	Poids moléculaire (g mol ⁻¹)	Solubilité (mg L ⁻¹)	Log K_{ow}	Log K_{oc}
Naphtalène	128,19	3,17 x10 ⁻¹	3,4	2,97
Acénaphtylène	154,21	3,93	4,07	3,59 - 3,83
Acénaphène	152,20	3,9	4,2	4,15-5,47
Fluorène	152,20	1,98	4,2	4,15 - 5,47
Phénanthrène	178	1,1	4,57	4,31
Anthracène	178,23	7,3 x10 ⁻²	4,57	4,42
Fluoranthène	202,26	2,60 x10 ⁻¹	5,22	4,58 - 6,38
Pyrène	202,26	1,35 x10 ⁻¹	5,18	3,11 - 6,51
Benzo(a)anthracène	228,29	1,4 x10 ⁻²	5,61	6,30
Chrysène	228,29	2,0 x10 ⁻³	5,91	5,3
Benzo(b)fluoranthène	252,31	1,2 x10 ⁻³	6,12	
Benzo(k)fluoranthène	252,31	7,6 x10 ⁻⁴	6,84	5,74-5,99
Benzo(a)fluoranthène	252,31	4,5 x10 ⁻²		
Benzo(a)pyrène	252,31	3,8 x10 ⁻²	6,50	6,26
Dibenzo(a,h)anthracène	278,35	5,0 x10 ⁻⁴	6,50	5,20-6,52
Indéno(1,2,3-cd) pyrène	276,33	6,2 x10 ⁻²	6,58	6,8

- Principales sources et transport des HAP

Les HAP sont principalement produits à la suite de la combustion incomplète de la matière organique (origine pyrolytique) ou à la suite de la lente maturation de la MO (origine pétrogénique). Les principales sources anthropiques de HAP sont le déversement de produits pétroliers et la combustion de MO (biomasse ou combustibles fossiles) liée à la production d'énergie, à la circulation automobile, revêtements urbains et à certains processus industriels (Yunker et al. 2002 ; Mahler et al. 2005). Le devenir des HAP d'origine pyrolytiques émis dans l'atmosphère est déterminé par les processus d'adsorption sur les particules et de volatilisation. Les concentrations en HAP dans l'atmosphère sont fonction des zones géographiques (zone rurale, urbaine ou industrielle), et des conditions climatiques (influence de la température). Les concentrations en HAP particulières sont généralement plus élevées en saison hivernale du fait de

L'augmentation des activités de chauffage et de la diminution des processus de dégradation en lien avec de faibles températures (Odabasi et al. 1999). Les HAP parviennent ensuite au milieu aquatique à la suite de dépôts sec ou humide directement sur les masses d'eau ou sur les sols du bassin versant. Ils sont ensuite lessivés et entraînés dans les réseaux d'assainissement vers les STEP. Or la majorité des STEP ne sont pas conçues pour éliminer les micropolluants notamment les HAP. Plusieurs études ont montré un niveau de contamination de l'ordre du ng L^{-1} (de < 50 jusqu'à 418 ng L^{-1}) dans les rejets de STEP (Tableau 1-4).

Tableau 1-3 \sum_{16} HAP mesurés dans les effluents de STEP selon différentes études

Site d'étude	Concentrations moyenne \sum_{16} HAP (ng L^{-1})	Références
Canada (Montréal)	418 ± 181	Pham and Proulx 1997
Jordanie	303 à 496	Jiries et al. 2000
Grèce (Thessaloniki)	745	Manoli and Samara 1999
Italy (Venise)	76	Buseti et al. 2006
Italy (5 STEP)	<50 - <195	Fatone et al. 2011
Chine (Pékin, 5 STEP)	245 – 404	Qi et al. 2013
Chine (Pékin)	182 - 241	Qiao et al. 2014)
Japon (Hiroshima)	$43,5 \pm 42,5$	Ozaki et al. 2015
Japon (Tokyo)	ND - 3	Ren et al. 2009

1.2.2 Les résidus médicamenteux

Actuellement il existe plus de 3000 médicaments à usage humain sur le marché mondial dont la France est le 4^{ème} consommateur au niveau mondial en termes de quantité brute. Les 3000 molécules sont classées en différents groupes selon leur mode d'action dont les plus utilisés sont les analgésiques, les antibiotiques, les antidiabétiques, les bêtabloquants, les contraceptifs, les hypolipémiants et les psychotropes. En France, le paracétamol est la molécule la plus consommée (3303 tonnes), suivi d'un antidiabétique (717 tonnes) et de la troxérutine utilisée pour les troubles de la circulation sanguine (444 tonnes) (AFFSAPS 2011). En parallèle, la France est classé dans les premiers consommateurs de médicaments vétérinaires en Europe avec 1208,2 tonnes devant l'Espagne avec 741,6 tonnes (Kools et al. 2008).

Après avoir été absorbé par l'organisme, les composés pharmaceutiques sont métabolisés à différents degrés et sont ensuite excrétés inchangés ou sous formes de métabolites. Ces résidus médicamenteux se retrouvent ensuite dans les eaux usées domestiques acheminés vers les STEP, ou dans les effluents d'élevage dans le cas d'une consommation vétérinaire. Selon les propriétés

physico-chimiques des molécules et le type de traitement, l'élimination des résidus de médicaments par les STEP est très variable (Miège et al. 2009). Dans le cas de STEP à traitement biologique, les micropolluants sont dans un premier temps partiellement éliminés des eaux brutes par simple sorption sur les particules constituant les boues primaires. Lors du traitement secondaire (boues activées), les micropolluants sont partiellement ou totalement biodégradés, métabolisés, minéralisés et adsorbés aux MES. Ainsi les principaux facteurs influençant la répartition des micropolluants entre la phase aqueuse et la phase particulaire sont d'une part intrinsèques à chaque molécule (solubilité, Kow, Koc...), et d'autre part dépendant des conditions physico-chimiques du milieu (pH, température,..). Le coefficient de distribution K_d permet de prédire le devenir d'une molécule entre la phase aqueuse et particulaire en prenant en compte à la fois le Kow et le pKa (Ternes et al. 2004). Les résidus pharmaceutiques sont rejetés directement dans le milieu récepteur via les rejets de STEP qui sont considérées comme une source ponctuelle de contamination. Parmi les nombreuses molécules potentiellement présentes dans les rejets de STEP, Besse et Garric (2008) ont établi une liste de substances prioritaires en prenant en compte par les données de consommation de médicaments en France, les concentrations prédites dans l'environnement, les propriétés physico-chimiques et les données écotoxicologiques des molécules. Ces molécules ont été quantifiées à des concentrations variables dans les effluents de STEP allant du ng L^{-1} à parfois des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tableau 1-4). La variabilité des concentrations dans les rejets est d'une part dépendante des concentrations initiales, elles-mêmes liées aux usages (nature et quantité de produits consommés), et d'autre part fonction du type de la configuration de la STEP (Verlicchi et al. 2012). En effet les caractéristiques de la STEP telles que la configuration du réacteur, le temps de séjour des boues (SRT), le temps de rétention hydraulique (HTR) et la température agissent sur le taux d'abattement des différentes molécules. Toutefois, l'influence de ces paramètres peut être variable selon les molécules. Par exemple un SRT de 10 à 20 jours est suffisant pour éliminer une majorité d'antibiotiques et d'anti-inflammatoires, mais ne permet pas l'abattement des anticonvulsivants (Verlicchi et al. 2012). De même, le HRT est variable selon les molécules dont l'intervalle optimum semble se situer entre 12 et 15 heures (Aquaref et al. 2009).

1.2.3 Variabilité temporelle des rejets de STEP

La variabilité temporelle de la qualité des rejets de STEP est principalement dépendante des caractéristiques de l'effluent entrant dont la composition varie en fonction de l'origine des eaux usées : domestiques, industrielles, eaux pluviales ayant lessivées les dépôts présents sur la chaussée et les routes et lessivage de terrains agricoles (Manoli and Samara 1999 ; Hemming et al.

2004 ; Musolff et al. 2009 ; Ratola et al. 2012). Les eaux usées provenant des usages domestiques peuvent varier à différentes échelles de temps : journalière, hebdomadaire (fins de semaines), saisonnières (vacances, évènements culturels ou sportifs). Dans son étude Le Nang (2013) montre par exemple que les charges polluantes en MES générées quotidiennement par habitant varie de 25 à 100 g hab⁻¹ j⁻¹, en DBO₅ de 30 à 80 g hab⁻¹ j⁻¹ et en azote de 6 à 15 g hab⁻¹ j⁻¹. La variabilité des charges polluantes est principalement imputée aux types d'activité des secteurs concernés (résidentiel, commercial / industriel). Les zones résidentielles seront par exemple caractérisée par une augmentation des flux les soirs et fins de semaines. La variabilité saisonnière des concentrations de résidus médicamenteux peut être influencée par différents facteurs tels que taux de consommation, les débits et par la température. En effet, plusieurs auteurs ont montré une diminution des rendements des STEP pour les résidus médicamenteux en hiver qui peut atteindre jusqu'à 25% par rapport aux saisons printanières et estivales (Vieno et al. 2005 ; Conley et al. 2008 ; Verlicchi et al. 2012). Par temps de pluie, les réseaux unitaires transportent un mélange d'eaux usées domestiques et pluviales vers la STEP ou en cas de surcharge directement dans le milieu via les déversoirs d'orage. Les caractéristiques de ces rejets sont en partie dépendantes de l'intensité des pluies, de l'occupation du sol (surfaces imperméabilisées) et du réseau de voirie (Gromaire 1998). En temps de pluie, les MES s'avèrent être le principal vecteur de la MO, DCO, DBO₅, des éléments métalliques et des HAP du fait d'une remise en suspension des dépôts présent dans les réseaux lors d'évènement pluvieux (Chebbo et al. 2001; Zgheib, 2009; Rossi et al. 2013). Par exemple, dans le cas du Marais (Paris), Gromaire (1998) montre que 30 à 80% de la masse polluante en MES, DCO et DBO₅ est attribuable aux stocks du réseau. Goodson et al. (2012) ont montré que les eaux stockées en bassin d'orage redirigées vers la STEP augmentent le débit de l'effluent et les concentrations en HAP et résidus médicamenteux.

Tableau 1-4 Concentration en ng L⁻¹ de résidus médicamenteux appartenant à différentes familles dans les rejets de STEP

famille		Loos et al. 2013	Luo et al. 2014	De la Cruz et al. 2012	Rosa et al. 2010	Miège et al. 2009	Kasprzyk-Hordern et al. 2009	Gros et al. 2010	Petrie et al 2015	Togola et Budzinski 2008
Antibiotique	Ciprofloxacine	96,3				72				
	Metronidazole						353			
	Ofloxacine							225		
	Roxithromycine					50				
	Sulfamethoxazole	142	3-1150	578	231	115			10	
Anti-épileptique	Trimethoprim	229	10-3050	131	148	118			128	
	Carbamazepine	832	5- 4600	263	173	674			826	157-293
Anti-inflammatoire	Diclofenac	50	<1 - 690	518	220	680			58-599	210-486
	Ibuprofène	80.5	nd - 55000	112	135	1960			143	17-219
	Ketoprofen	86	3-3920	123	392	325				21,8-1080
	Naproxen	26.7	2-5090	178	923	1890			170	42-289
	Paracetamol					na				108-11309
Beta bloquant	Atenolol		130 - 7600			154			2123	
	Propranolol					341			93-388	
Diuretique	Furosemide						1161000		629	
Fongicide	Econazole									
Hormone	17 α estradiol					0.8			0,2 - 0,47	
	17 β estradiol		<1 - 7			2.8			0,4-1,3	
	Estriol					13				
	Estrone		1 - 80			21			4,3	
Hypolipémiant	Bezafibrate	25	30 - 670	426	128	816	418		177	
	Fénofibrate	1,1								
Psychotrope	Oxazepam	162							33-58	

1.3 Impacts des STEP dans les cours d'eau sur la contamination en micropolluants

L'impact engendré par les rejets de STEP dans le milieu récepteur est dépendant de nombreux facteurs dont de la qualité chimique et microbiologique du rejet, des volumes déversés et des caractéristiques du milieu récepteur (Chambers et al. 1997). Depuis de nombreuses années, l'amélioration des techniques de traitements des eaux usées a conduit à une réduction des rejets de MO et de nutriments (azote et phosphore) dans les eaux de surface. Les STEP sont toutefois considérées comme une source d'introduction de MO, nitrates, d'ammonium et de phosphates dans le milieu récepteur (Andersen et al. 2004 ; Vandenberg et al. 2005). Par ailleurs, les rejets de STEP représentent une des principales sources d'introduction de micropolluants dans les écosystèmes aquatiques (Kasprzyk-Hordern et al. 2009 ; Luo et al. 2014). Une fois rejeté dans le milieu récepteur et selon leurs propriétés physico-chimiques, les micropolluants vont être partiellement ou totalement dégradés, se retrouver dans la colonne d'eau ou adsorbés aux MES et sédiments. De nombreuses études ont été réalisées pour évaluer les impacts de STEP sur l'introduction de divers micropolluants tels que les résidus médicamenteux, les pesticides, les HAP, les polychlorobiphényle (PCB) dans les écosystèmes aquatiques (Pham and Proulx 1997 ; Gómez et al. 2007 ; Moon et al. 2008 ; Kanzari et al. 2011 ; Madoux-Humery et al. 2013 ; Gabet-Giraud et al. 2014). Du fait de leurs propriétés hydrophobes, les contaminants organiques tels que les HAP, les polychlorodibenzo-p-dioxines (PCDD) et les polybromodiphényléthers (PBDE) se retrouvent généralement adsorbés aux MES et dans les sédiments. De ce fait, de nombreuses études ont utilisé ces matrices pour évaluer l'impact de rejet de STEP (Moon et al. 2008 ; Patrolecco et al. 2010 ; Qi et al. 2013).

1.3.1 Les résidus médicamenteux

La contamination des écosystèmes aquatiques par les substances pharmaceutiques a été mise en évidence dès les années 80 (Richardson and Bowron 1985), et s'est ensuite développée grâce à l'amélioration des instruments et des techniques analytiques permettant d'atteindre des limites de quantification compatibles avec les concentrations environnementales de ces substances. Les résidus pharmaceutiques sont rejetés directement dans le milieu récepteur via les effluents de STEP et/ou sont introduits de façon diffuse dans les eaux de surface après lessivage des sols ayant reçu des urines et fèces ou après épandage de fumier, de lisier ou de boues de STEP. D'après Heberer (2002), plus de 80 principes actifs et métabolites ont été retrouvés à des niveaux de concentration supérieurs au $\mu\text{g L}^{-1}$ dans les eaux résiduaires et les eaux de surfaces situées à proximité d'effluents. Leurs concentrations et répartitions dans les écosystèmes aquatiques sont fonction principalement des concentrations dans les

rejets, du rapport de dilution entre les rejets de STEP et les cours d'eau, ainsi que de leurs propriétés physico-chimiques (hydrophobicité, temps de demi-vie, pKa,...).

De ce fait les concentrations dans le milieu récepteur sont très variables pour une même molécule d'un site d'étude à l'autre (Tableau 1-5). En Europe, les molécules retrouvées en concentrations les plus élevées (de 12 à 777 ng L⁻¹) sont le diclofénac, l'acétanomiphène, l'aténolol et le bézafibrate.

Tableau 1-5 Concentrations (ng L⁻¹) de résidus médicamenteux dans les rejets de STEP et dans les eaux de surfaces en Amérique du nord, en Europe et en Asie selon Pal et al. (2010)

Compounds	Range in concentration (ng/l)					
	North America		Europe		Asia and Australia	
	Effluent, WWTP/ STP	Freshwater-rivers, canals	Effluent, WWTP/ STP	Freshwater-rivers, canals	Effluent, WWTP/ STP	Freshwater-rivers, canals
<i>Antibiotics</i>						
Trimethoprim	<0.5-7900	2-212	99-1264	0-78.2	58-321	4-150
Ciprofloxacin	110-1100	-	40-3353	-	42-720	23-1300
Sulfamethoxazole	5-2800	7-211	91-794	<0.5-4	3.8-1400	1.7-2000
<i>Analgesics and anti-inflammatory</i>						
Naproxen	<1-5100	0-135.2	450-1840	<0.3-146	128-548	11-181
Ibuprofen	220-3600	0-34.0	134-7100	14-44	65-1758	28-360
Ketoprofen	12-110	-	225-954	<0.5-14	-	<0.4-79.6
Diclofenac	<0.5-177.1	11-82	460-3300	21-41	8.8-127	1.1-6.8
Salicylic acid	47.2-180	70-121	40-190	<0.3-302	9-2098	-
Mefenamic acid	-	-	1-554	<0.3-169	4.45-396	<0.1-65.1
Acetaminophen	-	24.7-65.2	59-220	12-777	1.8-19	4.1-73
<i>Antiepileptic</i>						
Carbamazepine	111.2-187	2.7-113.7	130-290	9-157	152-226	25-34.7
<i>Beta-blockers</i>						
Propranolol	-	-	30-44	20	50	-
Atenolol	879	-	1720	314	-	-
<i>Blood lipid regulators</i>						
Clofibrac acid	ND-33	3.2-26.7	27-120	1-14	154	22-248
Gemfibrozil	9-300	5.4-16	2-28,571	-	3.9-17	1.8-9.1
Bezafibrate	ND-260	-	233-340	16-363	-	-

1.3.2 Les HAP

Les niveaux de contamination dans les différentes matrices des écosystèmes aquatiques sont très variables, et peuvent varier du ng L⁻¹ à µg L⁻¹ dans la phase dissoute (Fernandes et al. 1997 ; Manoli and Samara 1999) et du µg kg⁻¹ au mg kg⁻¹ dans les sédiments de différents cours d'eau (Blanchard et al. 2001; Zhang et al. 2004). Les HAP sont essentiellement adsorbés au matériel particulaire (MES et sédiments) et associés à la MO du fait de leur propriétés physico-chimiques (faible solubilité, valeurs élevées de K_{ow} et K_{oc}). L'affinité des HAP pour les MES augmente avec la teneur en carbone organique et les matériels les plus fins. Les processus de dégradations des HAP peuvent être d'ordre biologique via les micro-organismes et/ou abiotique via la photodégradation et notamment les radiations ultraviolettes. Plusieurs auteurs ont montré un niveau de contamination en HAP plus important dans les

MES et les sédiments par rapport aux eaux de surface (Guo et al. 2007 ; Qi et al. 2010 ; Patrolecco et al. 2010), ainsi qu'un impact des STEP sur l'augmentation des HAP dans les matrices particulières (Patrolecco et al. 2010; Kanzari et al. 2011). Les concentrations en HAP sont très variables d'un site d'étude à l'autre. Les concentrations des \sum_{16} HAP varient du $\mu\text{g kg}^{-1}$ jusqu'à plusieurs mg kg^{-1} (Tableau 1-6). Ces études montrent par ailleurs l'importance de considérer les MES en complément des sédiments et des eaux de surface pour une évaluation pertinente de la qualité de l'eau (Guo et al. 2007 ; Patrolecco et al. 2010).

Tableau 1-6 Concentrations en HAP dans les MES et les sédiments mesurées pour différentes études

Site d'étude	Matrice	\sum_{16} HAP Concentration en HAP ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Références
Rivière Tibre (Italy)	Sédiment	(\sum_6 HAP) : 157.8 – 271.6	Patrolecco et al. 2010
Rivière l'Arc (France)	Sédiment (en aval de STEP)	1,257	Kanzari et al. 2011
Estuaire de la Seine (France)	Sédiment	13–12,210	Cachot et al. 2006
Rivière Gao-ping (Chine)	Sédiment	8–356	Doong and Lin 2004
Rivière Dalio (Chine)	MES	317-23851	Guo et al. 2007
Estuaire de la Seine (France)	MES	1000 – 14000	Fernandes et al. 1997
Rivière Tibre (Italy)	MES	(\sum_6 HAP) 1663- 15472	Patrolecco et al. 2010

1.4 Impacts des STEP dans les cours d'eau : approche biologique

De nombreux contaminants rejetés par les STEP se retrouvent dans les phases dissoutes et particulières des cours d'eau à des concentrations pouvant causer des effets dommageables sur la survie et sur la structure des communautés d'organismes aquatiques (Kosmala et al. 1999 ; Schirling et al. 2005 ; Canobbio et al. 2009 ; Bunzel et al. 2013). Les études *in situ* de la biocénose aquatique permettent d'intégrer les variabilités spatio-temporelles des impacts de rejet de STEP et peuvent être réalisées à plusieurs échelles : individu, population, communauté. Plusieurs études menées à long terme ont montré une modification des structures des communautés de macro-invertébrés en aval des STEP et de déversoirs d'orage qui se traduisent par une diminution de la richesse taxonomique, une diminution de l'abondance de taxons et plus particulièrement d'espèces sensibles telles que les éphéméroptères, plécoptères et trichoptères ainsi qu'une modification du sex ratio (Canobbio et al. 2009 ; Peschke et al. 2014). Toutefois, Ladewig et al. (2006) ont montré des effets variables des impacts des STEP en

observant une augmentation des densités de gammares en aval du rejet. A l'échelle de l'individu, Peschke et al. (2014) a mis en évidence une diminution de la fécondité et une augmentation des concentrations de la protéine de choc thermique hsp70 indicatrice de stress chez les gammares prélevés en aval d'une STEP en Allemagne. Des perturbations au niveau des appareils de reproduction et dans la régulation des taux d'hormones peuvent être provoquées par la présence de perturbateurs endocriniens en aval des STEP. Par exemple, des déformations des oocystes chez les femelles de gammares ont été observées par Gross (2001). Chez la truite arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*) Harries et al. (1996) a mis en évidence une augmentation des taux de vitellogénine dans le plasma. Les rejets de substances médicamenteuses dans le milieu peuvent aussi être en lien avec leur bioaccumulation chez des espèces de macroinvertébrés (Grabicova et al. 2015). En rejetant de façon continue des mélanges de contaminants, les STEP impactent significativement la biocénose aquatique de façon chronique à différents niveaux trophiques et à différentes échelles. L'étude des organismes aquatiques *in situ* constitue une approche complémentaire de l'évaluation de la contamination chimique des différentes matrices.

Tableau 1-7 Synthèse des impacts des rejets de STEP *in situ* sur différent taxons

Taxon	Paramètres étudiés	Exposition	Effets	Localisation	Références
Gammaridae	- Taux de la protéine de choc thermique hsp70 - Parasitisme - Sex ratio - Fécondité	Prélèvements <i>in situ</i>	- Proportion de femelles plus élevée - Augmentation du taux de hsp70 - Baisse de la fécondité	Schussen river, Allemagne	(Peschke et al. 2014)
Macroinvertébrés (EPT)	- Densité		- Diminution de la diversité taxonomique - Diminution des abondances de taxons sensibles		
<i>G. fossarum</i>	Structure de population	Prélèvements <i>in situ</i>	- Pas d'effets sur le sex ratio - Augmentation de l'abondance de gammares en aval	Rivière Körsch et Lockwitzbach, Allemagne	(Ladewig et al. 2006)
<i>G. pulex</i>	Caractéristiques des gonades	Prélèvements <i>in situ</i>	- Déformations des oocystes chez les femelles - Diminution de la taille des individus		(Gross 2001)
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Taux de vitellogénine	Exposition <i>in situ</i>	Augmentation des taux de vitellogénine dans le plasma	Rivière Lea, Angleterre	(Harries et al. 1996)
Macroinvertébrés	Structure des communautés de macroinvertébrés	Prélèvements <i>in situ</i>	Modification des structures de communauté de macroinvertébrés	328 sites dans la regio de l'Hesse, Allemagne	(Bunzel et al. 2013)
Macroinvertébrés	Structure des communautés de macroinvertébrés	Prélèvements <i>in situ</i>	- Modification des structures de communauté de macroinvertébrés en aval - Diminution de la richesse taxonomique - Impact des rejets en étiage, en crue et des déversoirs d'orage associés aux rejets en continu	Rivière Lura, Italie	(Canobbio et al. 2009)
<i>Hydropsyche</i> sp. et <i>Erpobdella octoculata</i>	Bioaccumulation de 70 substances pharmaceutiques		- 6 et 4 molécules ont été quantifiées dans Hydrpsyche et Erpobdella - BCF > 2000 pour l'azithromycin	Rivière Zivny, (République tchèque)	(Grabicova et al. 2015)

1.5 Variabilité spatio-temporelle à l'échelle du bassin versant

Bien que les STEP soient identifiées en tant qu'une des principales voies d'introduction de contaminants dans les milieux aquatiques, de nombreux autres rejets diffus d'origine agricole et péri-urbain représentent des sources de contamination de diverses substances telles que les résidus médicamenteux à usage vétérinaire, les pesticides et les HAP (Brown and Peake 2006; Weston and Lydy 2010; Bártíková et al. 2016). La diversité des sources de contamination associée aux caractéristiques du bassin versant (occupation des sols, régime hydrologique) ainsi qu'aux nombreux processus physico-chimiques (température, solubilité, biodégradabilité,..) ne permet pas toujours de prévoir les impacts potentiels sur les écosystèmes et sont difficilement transposables d'un site d'étude à l'autre (Barber et al. 2006; Musolff et al. 2009; Osorio et al. 2016; Fairbairn et al. 2016). Par ailleurs, Fairbairn et al. (2016) souligne l'importance de prendre en compte la variabilité saisonnière du fait des variabilités d'émission des sources de contamination, notamment d'origine agricole. C'est pourquoi une meilleure compréhension des variabilités spatio-temporelles des concentrations de micropolluants est nécessaire afin de caractériser les sources, les voies de transfert et les risques d'exposition.

- Vulnérabilité des systèmes karstiques

Les bassins versant karstiques dans lesquelles évoluent les rivières calcaires sont caractérisés par des sols peu épais et des roches très perméables, ce qui entraîne une faible capacité d'épuration naturelle des sols et des flux d'eaux très rapides. De ce fait les systèmes karstiques sont particulièrement vulnérables aux contaminations chimiques et biologiques (Andreo et al. 2006; Heinz et al. 2008). Plusieurs études ont mis en évidence des contaminations des réseaux karstiques par de nombreux contaminants tels que les nitrates, les chlorures, le COT, les pesticides, les fongicides et les produits pharmaceutiques (Einsiedl et al. 2010; Morasch 2013). Les sources potentielles de contaminations peuvent être d'origine agricole via les épandages de fumier/lisier et l'application de pesticides et/ou liés aux ruissellements urbains et routiers (Zhou et al. 2003). Par ailleurs, les rejets de STEP et d'eaux pluviales dans les eaux de surfaces ou dans le karst ainsi que les écoulements de décharges constituent des sources ponctuelles potentielles d'introduction de contaminants (Heinz et al. 2008).

- Substances vétérinaires

Les substances vétérinaires sont largement utilisées dans les élevages de façon chronique ou ponctuelle et représentent une source potentielle de contamination des bassins versants. En France, c'est l'Agence nationale du médicament vétérinaire (ANMV) qui est chargée de l'évaluation des d'autorisation de mise sur le marché (AMM) des médicaments vétérinaires. Ces substances appartiennent à différentes classes thérapeutiques (antibiotiques, anti-parasitaires, anti-inflammatoires, hormones, vaccins,...) et sont parfois communes avec l'usage humain (AFSSA 2006). Les antiparasitaires et les antibiotiques sont les classes thérapeutiques les plus consommées avec respectivement 22 % et 18 % de la part de chiffre d'affaire des médicaments vétérinaires (BRGM 2009). Parmi les antibiotiques, les principaux groupes de molécules utilisés sont les tétracyclines, les sulfonamides, les β -lactamines, les macrolides, les quinolones, les aminosides et les polypeptides. Concernant les autres familles de molécules utilisées en élevage, l'acide acétylsalicylique, le kétoprofène et le paracétamol sont aussi utilisés en médecine humaine. Parmi les anti-parasitaires, les avermectines, les benzimidazoles et les pyrimidines sont les molécules les plus utilisées (AFSSA-ANMV, 2009). Cependant plusieurs produits anti-parasitaires tels que les pyréthinoïdes, classe d'insecticides de synthèse, ne nécessitent pas d'autorisation de l'ANMV pour leur emploi dans les élevages. De plus, de nombreuses autres molécules tels que les organophosphorés, les fongicides, les antibactériens peuvent être utilisés en tant que produits phytosanitaires, sans qu'ils puissent être identifiés comme substance vétérinaire. Il est donc impossible pour ces molécules de connaître précisément leur consommation à des fins vétérinaires.

Les résidus de médicaments vétérinaires sont introduits dans l'environnement soit de manière directe dans le milieu (cas de l'aquaculture) soit de façon indirecte suite à la métabolisation et à l'élimination fécale ou urinaire ou via l'épandage de fumures. Les métabolites peuvent être issus de la biotransformation des composés parents puis être excrétés directement par les animaux, soit issus de la biotransformation par les bactéries présentes dans les effluents, dans les eaux et dans les sols. L'ensemble de ces produits sont en parallèle soumis à des dégradations physico-chimiques (oxydation, photodégradation, pH,...) qui sont variables selon la nature de la molécule et le milieu. Plus particulièrement dans les lisiers, fumier et sols, l'humidité, la température du milieu, la teneur en matière organique ainsi que la nature des sols influencent fortement sur la dégradabilité des molécules, qui va aussi dépendre des conditions et de la durée de stockage du fumier et du lisier. Ainsi, des températures et des taux d'humidité élevés, ainsi que des conditions anaérobies induisent une meilleure efficacité de biodégradation des bactéries et une plus grande biodisponibilité des molécules.

2 Bassin versant Haut Doubs Haute Loue

Le bassin versant Haut Doubs Haute Loue d'une superficie d'environ 2330 km² est situé dans le département du Doubs et du Jura. Il comprend l'amont des bassins versants du Doubs et de la Loue reliés par des circulations d'eau souterraines.

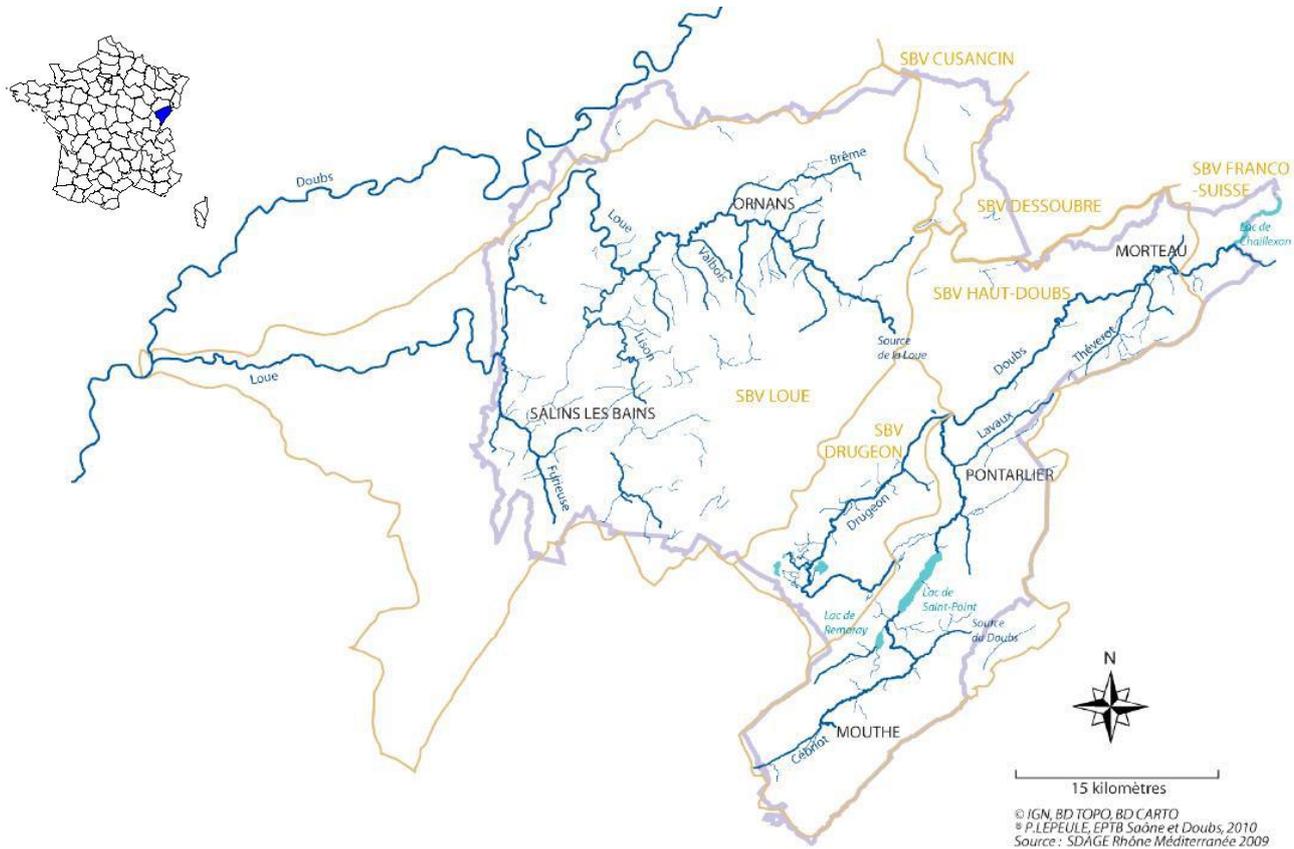


Figure 2-1 Cartographie du bassin versant Haut Doubs-Haute Loue, EPTB

2.1 Géologie

Le territoire Haut Doubs Haute Loue est situé sur le massif jurassien constitué de zones tabulaires (plateaux) séparées par des zones plissées. Le premier plateau est situé à 500-600 m suivi du second plateau à 800-900 m. Au cours des temps géologiques les formations calcaires ont subi de profondes modifications notamment l'action de l'eau qui s'écoule dans les porosités sédimentaires et les porosités de fracture liées au mouvement des plaques tectoniques. La présence d'un banc calcaire fissuré et fracturé favorise par conséquent l'infiltration rapide des eaux et leur résurgence en des sources qui drainent de larges territoires. L'eau qui circule entraîne leur dissolution partielle et conduit à la création de formations karstiques, très nombreuses dans le Jura. L'érosion chimique et mécanique crée

un paysage karstique dont les figures superficielles se présentent sous forme de dolines, de gouffres et de vallées sèches.

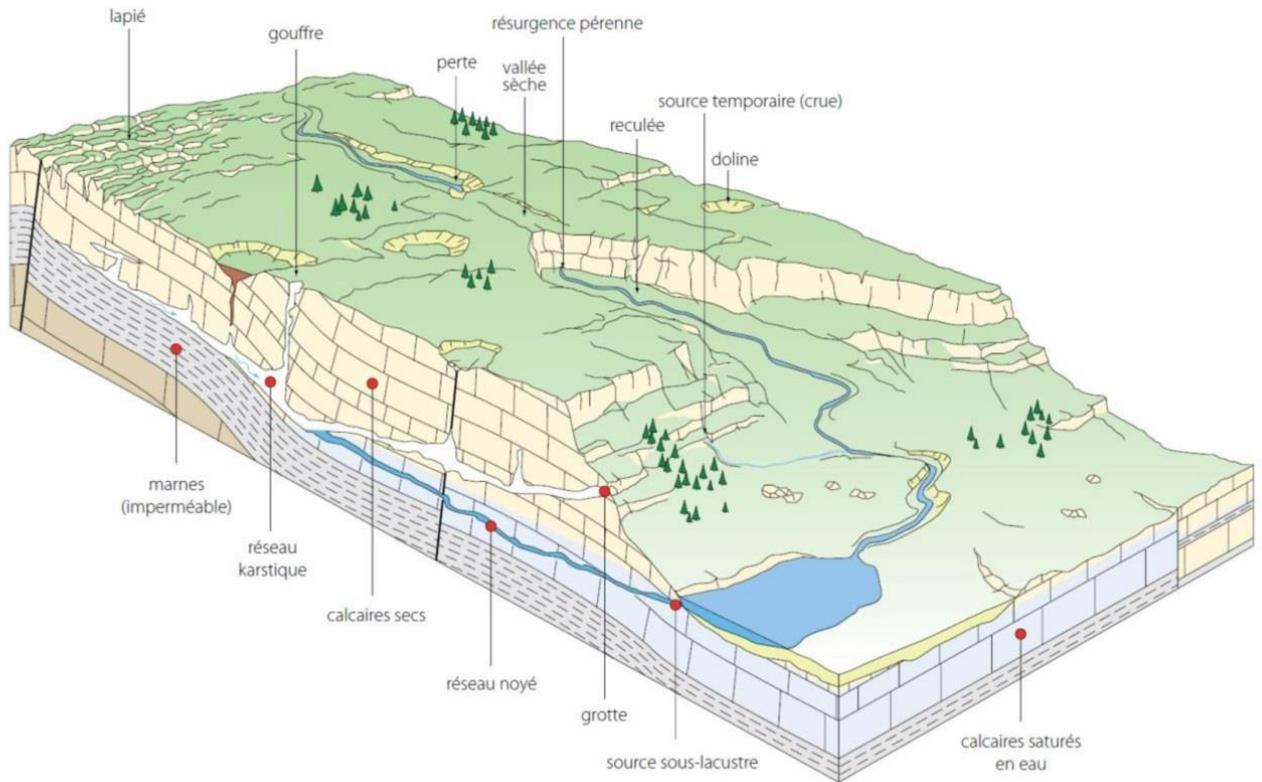


Figure 2-2 Schéma hydrogéomorphologique des bassins karstiques (Bichet et Campy, 2008)

Le bassin versant est ainsi caractérisé par un réseau hydrographique principal qui draine l'ensemble des formations aquifères du Jurassique moyen et supérieur, qui représente le principal exutoire de l'ensemble des systèmes hydrographiques.

2.2 Hydrographie

Les deux principaux cours d'eau du territoire sont le Doubs et la Loue. La Loue prend sa source dans la commune d'Ouhans à 543 m d'altitude et conflue avec le Doubs dans la commune de Parcey (193 m d'altitude) après avoir parcouru 126 km. Le plateau de Levier et les pertes du Doubs en aval de Pontarlier constituent les principaux apports karstiques. La résurgence de la Loue se situe dans les calcaires du Kimméridgien pour aller inciser les couches du Séquanien dans les gorges de Nouailles. Entre l'usine hydro-électrique de Mouthier-Haute-Pierre jusqu'à la sortie du village, le lit de la Loue s'inscrit entre les marnes liasiques et calcaires du Jura moyen. De Ouhans à Vuillafans, la Loue s'écoule dans des gorges sur environ 25 km et collecte une quinzaine d'exurgences et de résurgences, puis s'élargit dans la vallée. La Loue peut être divisée en trois secteurs : la Haute Loue de la source à Lods est caractérisée par une vallée étroite encaissée avec les caractéristiques d'un torrent (pente moyenne 20

‰ , substrat grossier) ; de Lods à Quingey se situe la moyenne Loue où son lit s'élargit progressivement avec une diminution de la pente moyenne (2 ‰) tout en gardant un caractère érosif ; le dernier secteur correspondant à la Basse Loue se situe entre Quingey et la confluence avec le Doubs est caractérisé par une vaste plaine alluviale (pente moyenne de 1 ‰) (Verneaux 1973).

De plus, plusieurs études sur les peuplements piscicoles de la Haute Loue montrent d'une part une détérioration des peuplements par rapport au référentiel et à la structuration 10 ans auparavant, et d'autre part une érosion des densités de poissons depuis les années 70 (ONEMA et al. 2012).

La source de la Loue est une résurgence karstique située à l'amont de la reculée des gorges de Nouailles. La source émerge au pied d'un cirque rocheux spectaculaire haut d'une centaine de mètres (calcaires du Kimméridgien). Le débit moyen de la source est d'environ $6 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ mais le débit de crue peut atteindre $100 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$. La source de la Loue est alimentée par son bassin hydrogéologique d'une surface de 196 km^2 et ainsi que par les infiltrations des eaux du Doubs au sein d'une zone de pertes situées entre Pontarlier et Ville-du-Pont. L'étude du BRGM (2014) sur le rôle et la contribution des eaux souterraines d'origine karstique dans les crues de la Loue a permis d'améliorer la compréhension des relations entre pertes du Doubs et sources de la Loue. Il s'avère que la recharge localisée des pertes du Doubs semble être la principale composante importante du débit de crue, qui de plus engendre des flux souterrains provenant du karst potentiellement très élevés lors des crues de la Loue.

Le Doubs prend sa source à Mouthe, à 945 m d'altitude puis parcourt 453 km pour rejoindre la Saône en rive gauche à Verdun-sur le Doubs, à une altitude de 746 m. Son bassin versant a une superficie d'environ 7700 km^2 . A l'aval de Pontarlier, le Doubs est affecté par des pertes karstiques localisées et diffuses sur près de 5 kms entre Arçon et Ville-du-Pont. Ces pertes dont le débit global moyen est estimé à $1,5$ et $3 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ sont en relation avec les sources de la Loue. Elles sont de première importance dans le système karstique du bassin Doubs-Loue.

2.3 Climat

Le bassin versant est caractérisé par un climat continental en direction de la Haute chaîne, avec une pluviométrie qui augmente d'ouest en est du massif. Le gradient est d'environ 170 mm pour 100 m et peut atteindre 2000 voire 2500 mm pour les plus hautes altitudes (Blant 2001). Le bassin versant est soumis à de fortes amplitudes thermiques annuelles avec des étés chauds et des hivers rudes.

2.4 Pressions anthropiques

Le bassin versant du Haut Doubs et de la Haute Loue subit de nombreuses pressions anthropiques liées à une importante activité agricole, à l'exploitation du bois, de nombreux rejets domestiques, une filière métallurgique importante, au tourisme et aux activités de service. En effet, la

surface agricole utile (SAU) représente environ 42 % de la surface du bassin versant qui est quasi-exclusivement dominée par l'élevage de vaches laitières. Par ailleurs, il a été recensé 160 établissements industriels potentiellement impactant pour l'eau, principalement liés à l'industrie du lait, du bois et aux activités mécaniques. De plus, de nombreux anciens sites industriels pollués ainsi que 211 décharges recensées dont 66 considérées comme impactant fortement le milieu constituent des sources de pollutions supplémentaires. Ainsi l'ensemble des données disponibles conduisent à considérer en première hypothèse que l'origine de la dégradation progressive et continue du cours d'eau est vraisemblablement multifactorielle. Une cause possible de la dégradation de la qualité de la Loue est l'impact de rejets de stations d'épuration (STEP) qui se déversent directement et continuellement dans la Loue. La majorité des communes du territoire sont rattachées à un système d'assainissement collectif et possèdent des STEP de petites tailles (75 % > 2000 EH). Le bassin versant est majoritairement rural, dominé par des couverts forestiers et agricoles (Figure 2-3). L'agriculture est principalement tournée vers l'élevage laitier, notamment pour la production fromagère AOC (Comté, Morbier...). L'activité industrielle et artisanale, centrée sur la mécanique, les microtechniques et la transformation du bois est très présente dans le haut Doubs et dans le secteur de la ville d'Ornans. Le territoire est caractérisé par une densité de population moyenne de 35,6 habitant km⁻² (Figure 2-4). Cependant les secteurs frontaliers proches de la Suisse (villes de Pontarlier, Morteau) et quelques communes proches de Besançon sont les plus densément peuplés.

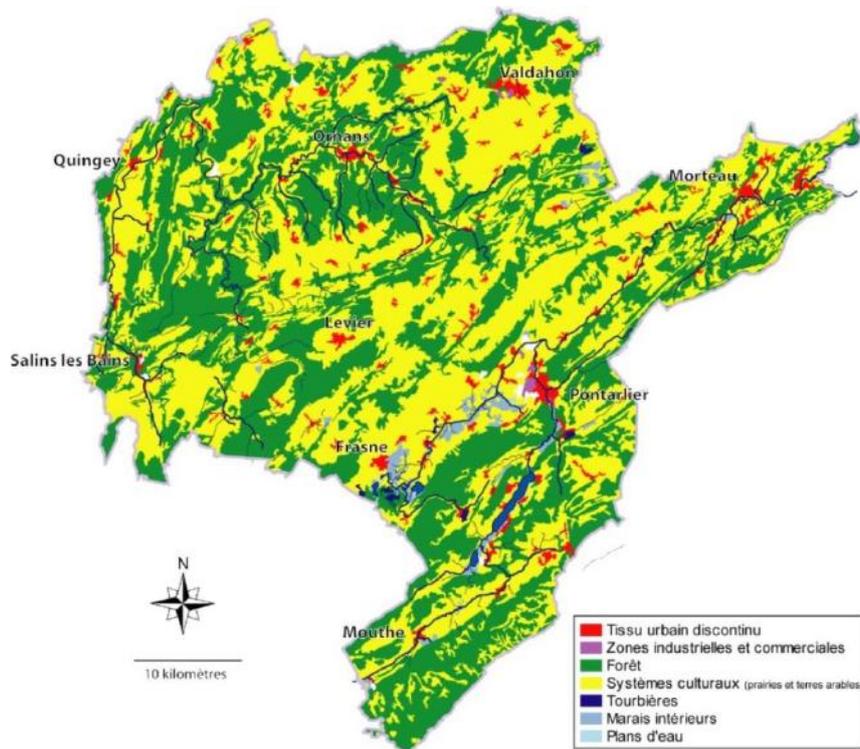


Figure 2-3 Carte d'occupation des sols (EPTB Saône et Doubs, 2010, Corine Land Cover, 2006)

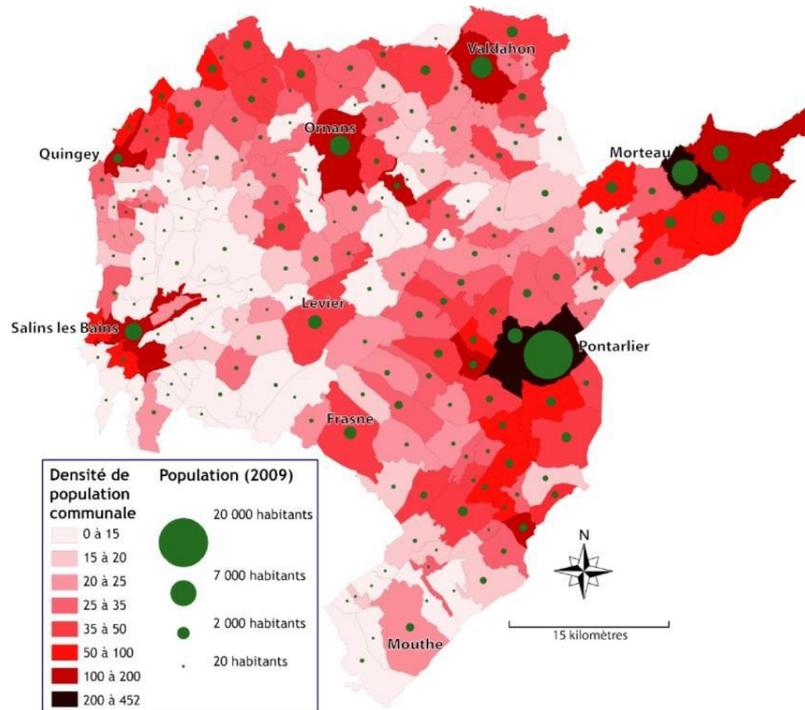


Figure 2-4 Carte de la densité de population (EPTB Saône et Doubs, 2010)

2.5 Assainissement

Environ 70 % des communes du territoire sont rattachées à un système d'assainissement collectif soit environ 75 STEP (Figure 2-5). La majorité de ces STEP sont de petite taille (85 % des STEP du bassin versant ont une capacité < à 2000 EH) et seulement 4 sont supérieures à 10 000 EH (Doubs, Morteau, Valdahon et Vercel). Les STEP de petites taille représentent jusqu' à 65 % des flux traités rejetés dans le milieu par les STEP. Le secteur du Haut Doubs est caractérisé par des STEP intercommunales de grande taille alors que la Haute Loue est composée par de nombreuses petites STEP. Les sources domestiques et industrielles sont responsables d'un apport de 17% en azote et 21 % en phosphates dans le milieu (EPTB 2013). Pour l'assainissement non collectif, les EH non raccordés des communes dotées de systèmes d'assainissement collectif sont supérieures à l'ensemble des EH des communes sans réseau d'assainissement collectif.

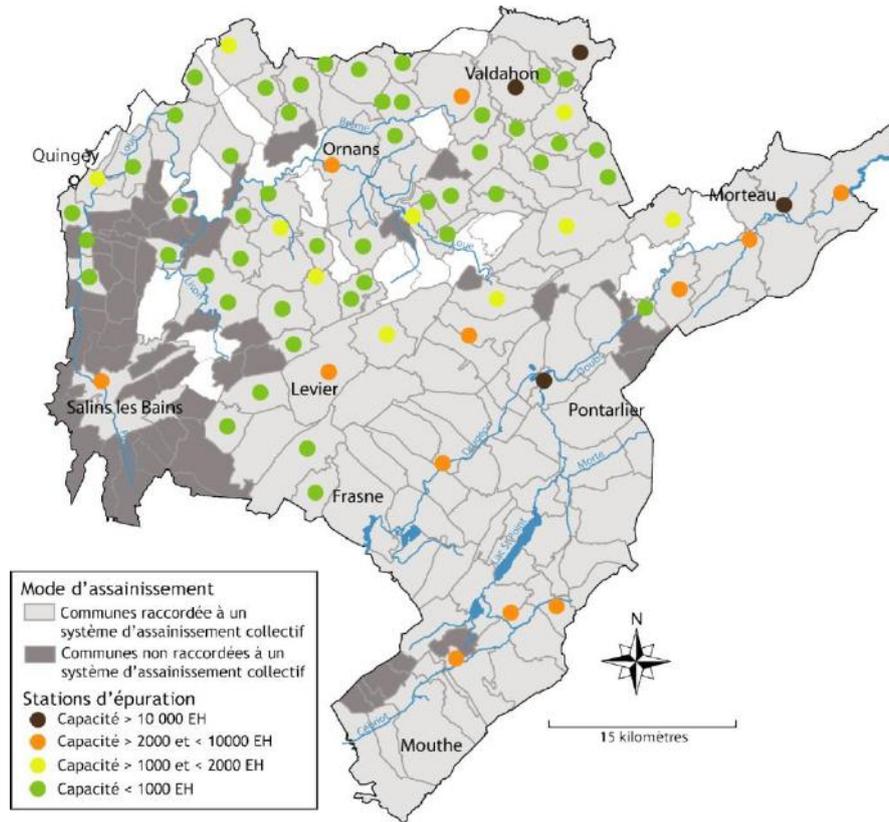


Figure 2-5 Carte des STEP (EPTB Saône et Doubs 2009)

2.6 Agriculture

L'activité agricole est très présente sur le bassin versant avec une surface agricole utile (SAU) équivalente à 42 % soit environ 54000 ha de la surface totale du bassin, ainsi que 44115 unité gros bétail (UGB). Il a été répertorié 1175 élevages dont 38 porcheries, néanmoins le secteur est quasi exclusivement tourné vers l'élevage de vache laitières. Le taux de superficie toujours en herbe varie de moins de 50 % dans la vallée de la Loue à plus de 90 % sur les communes du Haut-Doubs. Les autres surfaces sont dédiées principalement à la culture fourragère et en minorité de céréales. Le chargement moyen est de 0,9 UGB bovin/ha de surface fourragère principale, avec une moyenne atteignant 1,6 UGB/ha de surface fourragère principale (SFP) pour les 10 valeurs supérieures (Figure 2-6). Les bovins représentent plus de 80 % de ces UGB, le reste étant principalement des UGB porcins et des UGB volailles. Il a été estimé que les effluents d'élevage représentent une charge organique brute de l'ordre de 2 543 000 EH, une production de 3750 tonnes d'azote par an, équivalent à 85 kg d'azote par an et par UGB. Par ailleurs, il est important de souligner que les pratiques agricoles ont évolué depuis les années 1970. En effet bien que le nombre d'UGB ait diminué d'environ 11 % (Descamps and Poupenev 2013), la production laitière s'est intensifiée, passant de 5051 à 6451 kg de lait an⁻¹ vache⁻¹ entre 1986 et 2006 (EPTB 2013). Cette intensification de production passe par une augmentation de

l'apport d'azote par la fertilisation des prairies et les déjections de vaches passant de 70 à 85 unité d'azote UGB⁻¹ an⁻¹ entre 1980 et 2011 (Tourenne 2011). En outre, les pratiques culturales ont aussi été modifiées avec un accroissement du système lisier ou mixte qui augmente les transferts de nutriment au détriment du système fumier.

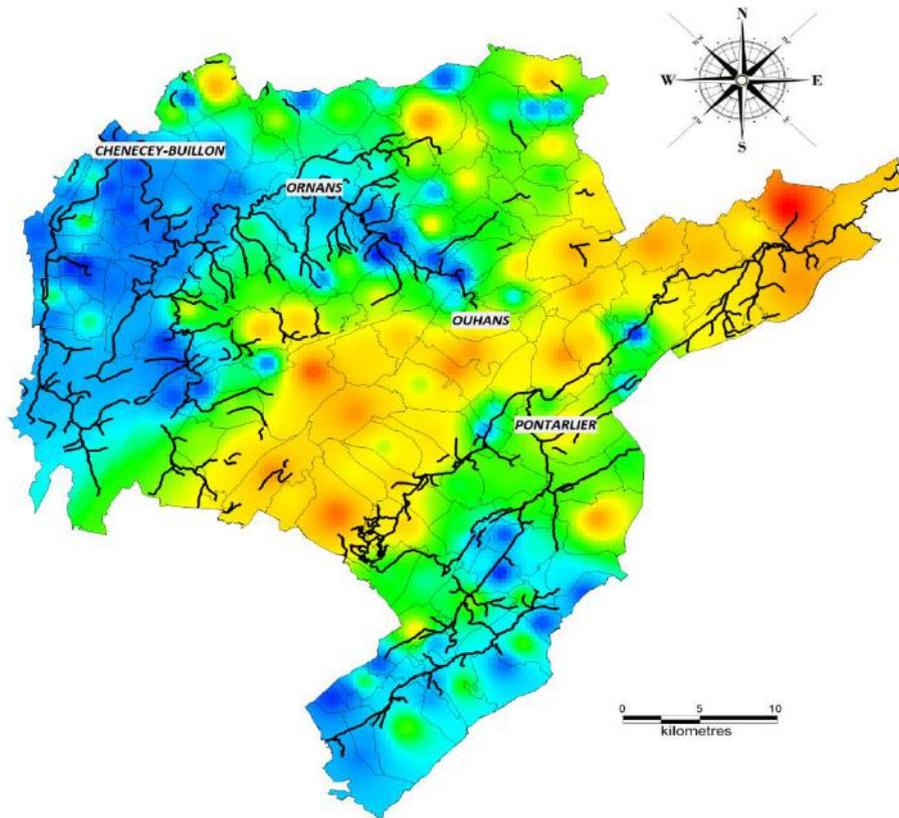


Figure 2-6 Interpolation du nombre d'UGB par commune, bassin versant SAGE Haut-Doubs/Haute-Loue (données CA25, 2010). Plus les couleurs sont chaudes plus le nombre d'UGB est important (bleu foncé = 0 à 270, vert = 270 à 380, jaune = 380 à 600 et orange/rouge = 600 à 1860) (Chanez et al. 2014)

2.7 Artisanat et industrie

Environ 160 établissements industriels ont été répertoriés comme potentiellement impacts sur la qualité de l'eau dont 126 soumis à autorisation au titre des installations classées principalement concentrés entre Pontarlier, Morteau et le secteur d'Amancey-Ornans. La majorité de ces établissements sont liés à l'industrie du lait (46 %) en lien avec la fabrication de fromage AOC, l'industrie de transformation du bois (17 %) et les activités mécaniques (16 %). La majeure partie des flux d'effluents sont dirigés vers les réseaux collectifs (70 %) alors qu'environ 30 % des flux sont rejetés dans les milieux naturels après traitement.

2.8 Prélèvements d'eaux potable

Les prélèvements pour l'eau potable représentent environ 19 millions de mètres cubes par an et représentent environ 90 % des prélèvements totaux. Les principales ressources en eau potables sont la Loue et sa nappe d'accompagnement, exploité par les captages de Lods et Montgesoye ; le lac Saint Point ; les alluvions du Drugeon et de l'Arlier, exploités par les captages à la Rivière-Drugeon et aux alentours de la ville de Morteau ; les alluvions du Doubs, exploités autour de la ville de Morteau et les calcaires jurassiques de la chaîne du Jura, exploité au niveau de nombreuses sources et de quelques forages. Une turbidité trop importante ainsi que la présence de nitrates ou de pesticides sont les principales causes de problèmes de qualité des eaux brutes.

2.9 Pressions diffuses

Le bassin versant karstique est composé de nombreuses dolines qui sont l'expression de surface de dissolution de l'épikarst et des réseaux karstiques profonds. Pendant de nombreuses années, les dolines ont été utilisées comme décharges sauvages, comblées par des remblais ou utilisées comme exutoire de rejets de STEP.

Sites d'étude et Méthodologie

Dans ce chapitre nous présentons les stations et les STEP sélectionnées pour notre étude, ainsi que les méthodes d'échantillonnage et d'analyses mises en œuvre.

3 Sites d'étude

Nous avons choisi d'étudier les impacts des STEP de Pontarlier et d'Ornans qui rejettent respectivement les eaux usées traitées dans le Doubs et dans le Loue (Figure 3-1). Nous avons choisi d'étudier la STEP de Pontarlier car c'est la plus importante en termes d'EH sur le bassin versant, et qu'elle est localisée en amont des pertes karstiques qui alimentent la source de la Loue. La STEP d'Ornans est la principale station en termes d'EH du secteur de la Haute Loue qui rejette ses eaux usées traitées dans le Loue. Les deux STEP appliquent un traitement à boues activées mais ont des capacités de traitement qui diffèrent d'un facteur 10.

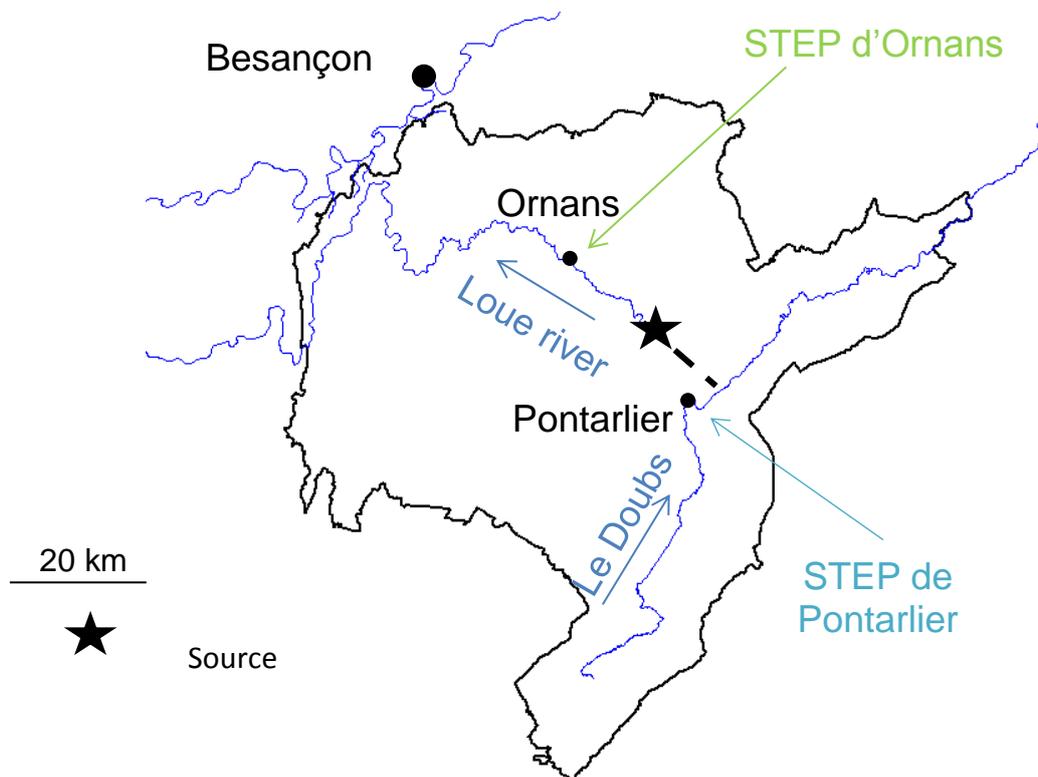


Figure 3-1 Localisation des sites d'étude sur le bassin versant Haut-Doubs/ Haute-Loue

Pour chaque site d'étude, trois stations ont été définies : en amont, en aval proche et en aval lointain du rejet des STEP (Figure 3-2, Figure 3-3 et Tableau 3-1)

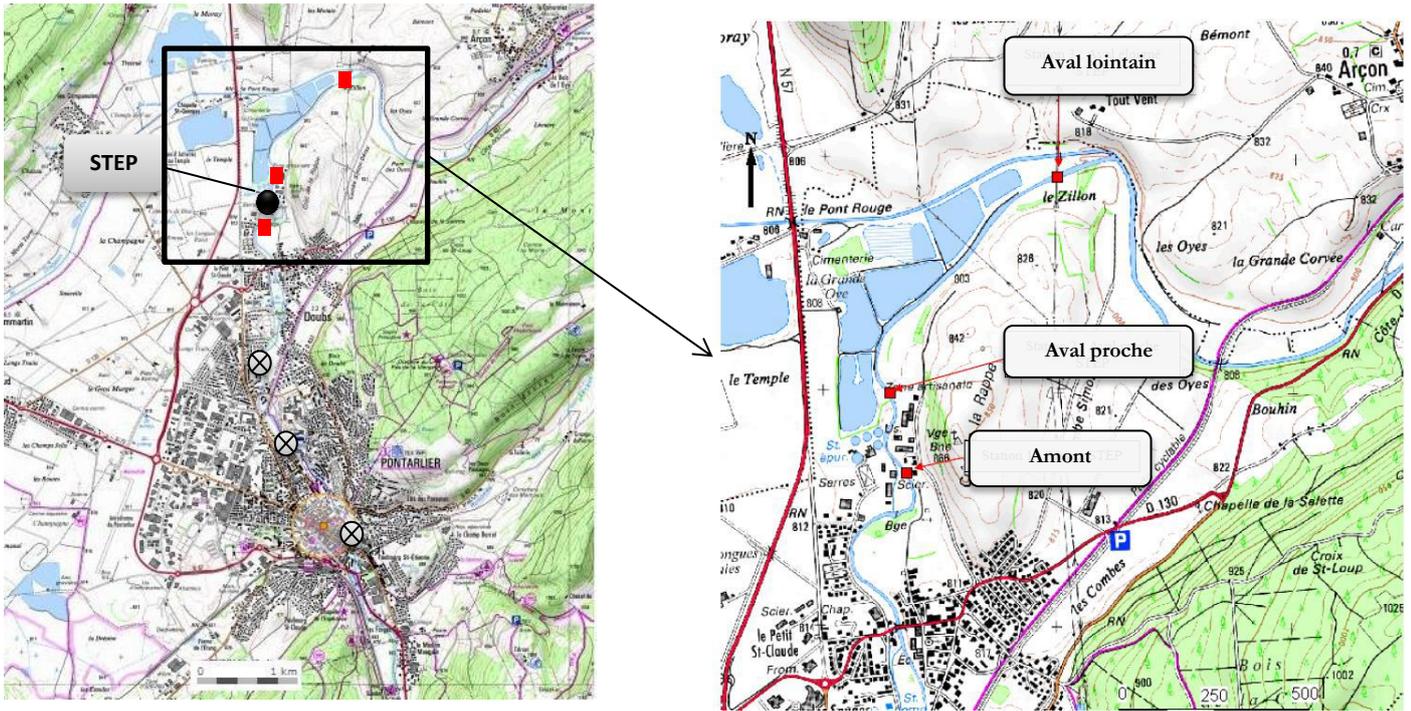


Figure 3-2 Localisation des stations de prélèvements et de la STEP de Doubsset des déversoirs d'orage soumis à autosurveillance (⊗)

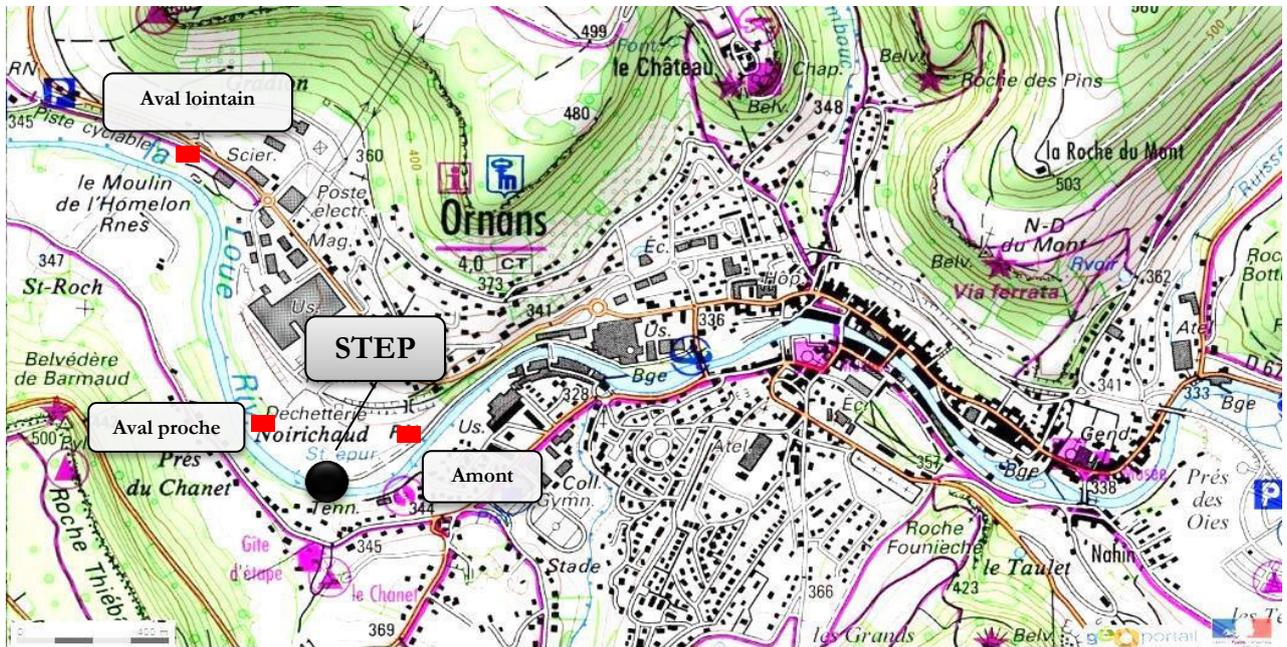


Figure 3-3 Localisation des stations de prélèvements et de la STEP d'Ornans

Tableau 3-1 Caractéristiques des stations d'étude

Paramètres	Site A			Site B		
	Amont	Aval proche	Aval loint.	Amont	Aval proche	Aval loint.
Abréviation	Da	Db	Dc	La	Lb	Lc
Latitude et Longitude (Lambert II)	N46°55'55.2"	N46°56'09.4"	N46°56'24.4"	N47°06'07.5"	N47°06'08.2"	N47°06'35.9"
Altitude (m)	807	805	802	326	329	329
Distance à la STEP (m)	- 351	+120	+765	-101	+30	+1000

3.1 STEP de Pontarlier

Le service assainissement est assuré en régie par la Communauté de Communes du Larmont (CCL) dans le secteur du Haut Doubs. La quasi-totalité des habitants de la Communauté de Communes est raccordée au réseau d'eaux usées mis à part les habitants isolés des secteurs hors agglomération. Le traitement des effluents est assuré par la CCL depuis le 1^{er} janvier 2000. La station d'épuration de Pontarlier traite les effluents de dix-neuf communes, ce qui représente une population sédentaire de 30 000 habitants et une population saisonnière de 12 000 habitants. Rénovée en septembre 2005, la STEP est de type aération prolongée. Elle est prévue pour traiter la pollution carbonée, azotée et phosphorée, éléments responsables de l'eutrophisation des milieux aquatiques. Sa capacité de traitement est de 53 000 équivalents-habitants (EH) et sa capacité hydraulique de pointe est de 31 000 m³.j⁻¹.

Le prétraitement se compose de 2 dégrilleurs courbes suivi de 2 bassins dessableurs – degreisseurs. L'effluent se sépare ensuite sur les 2 files de traitement biologique. Chacune se compose d'un bassin d'aération de 6 550 m³, comportant une zone anaérobie et une zone aérobie, et d'un clarificateur de 38 m de diamètre, assurant la séparation des eaux traitées et des boues activées.

Le traitement du phosphore est de nature biologique et, est complété par une déphosphatation chimique à l'aide de chlorure ferrique. La filière boue est assurée quant à elle par une grille d'épaississement, permettant d'augmenter la concentration. Les boues, qui sont ensuite traitées à la chaux éteinte et au chlorure ferrique, sont envoyées finalement dans un filtre presse permettant une déshydratation plus poussée. La siccité des boues à la fin du process est de l'ordre de 30%. Les boues produites sont ensuite revalorisées en épandage agricole ou évacuées en centre de compostage normalisé. L'eau, une fois épurée par la station d'épuration, est rejetée dans le Doubs. La STEP de Pontarlier doit respecter les normes de rejets concernant les MES, DBO₅, DCO, NGL et Pt (Tableau 3-2).

Tableau 3-2 Normes de rejet selon l'arrêté préfectoral du 16 février 2001 et du SAGE Haut-Doubs Haute-Loue approuvé en date du 7 mai 2013

Paramètres	Concentrations (mg L ⁻¹)		Rendements (%)
MES	35	ou	90
DBO5	25	ou	85
DCO	90	ou	76
NGL	13	ou	75
PT	1	ou	90

Trois déversoirs d'orage (DO) soumis à autosurveillance sont localisés en amont de la STEP. Le Tableau 3-3 détaille les volumes déversés par les DO pour l'année 2014.

Tableau 3-3 Volumes déversés par les DO en 2014

Année	Pluviométrie (mm)	Volume déversé	Volume déversé	Volume déversé	Volume déversé
		(m ³) Longennes 2	(m ³) 11 Novembre	(m ³) Pont des Chèvres	(m ³) TOTAL
2014	1 307,4	367 026,0	22 917,8	NA	389 943,8

Divers secteurs d'activité sont raccordés au réseau d'assainissement et sont susceptibles d'introduire de nombreuses substances : agroalimentaire, blanchisserie – pressing ; imprimerie ; BTP ; nettoyage bâtiment ; traitement des déchets

Dans le cadre des campagnes de Recherche des Substances Dangereuses dans l'Eau (RSDE), 6 prélèvements en 2013 et 6 prélèvements en 2014 ont été réalisés en sortie de la STEP de Pontarlier (Tableau 3-5). Par ailleurs, dans le cadre d'un suivi de l'impact de la STEP de Pontarlier, des analyses de trois HAP ont été réalisées par Sciences Environnement dans les sédiments de l'amont de Pontarlier jusque l'aval de la STEP (Tableau 3-4). Cette étude révèle une variabilité spatio-temporelle des concentrations des différents HAP, et met en évidence une contamination dès l'amont de Pontarlier.

Tableau 3-4 Résultats des campagnes 2013 et 2014 réalisée sur les sédiments, sur quatre stations du Doubs

	Amont Pontarlier		ZI – Aval DO		Amont STEP		Aval STEP	
	2013	2014	2013	2014	2013	2014	2013	2014
Benzo(a)pyrène (mg kg ⁻¹ MS)	0,35	0,196	0,266	0,425	0,325	0,749	0,323	0,501
Benzo(b)fluoranthène (mg kg ⁻¹ MS)	0,416	0,187	0,353	0,415	0,398	0,721	0,415	0,483
Fluoranthène (mg kg ⁻¹ MS)	0,523	0,285	0,482	0,898	0,487	1,138	0,531	1,171

Tableau 3-5 Résultats de suivi des substances significatives de la RSDE STEP de 2012 à 2014

Paramètre	Sources potentielles	Campagne RSDE STEP 2012		Campagne RSDE STEP 2013		Campagne RSDE STEP 2014	
		Moyenne concentration	Moyenne flux journalier (g/j)	Moyenne concentration	Moyenne flux journalier (g/j)	Moyenne concentration	Moyenne flux journalier (g/j)
4nonylphenol diethoxylat		-	-	0,0197 µg/L	0,6094	-	-
4nonylphenolmoetoxya		-	-	0,0800 µg/L	2,2108	0,008 µg/L	0,059
para-tert-Octylphenol		-	-	-	-	-	-
Nonylphénols lin ou ramif		0,200 µg/L	2,380	0,1162 µg/L	2,1257	0,058 µg/L	0,916
4octylphenol diethoxylate	Industrie textile Traitement de surface Industrie papetière	0,113 µg/L	0,995	-	-	0,018 µg/L	0,181
4octylphenol monoethoxya		-	-	-	-	-	-
Di(2-ethylhexyl)phtalate	Composé du plastique	0,600 µg/L	5,676	-	-	2 µg/L	21,658
HCH gamma	Insecticide Produits antiparasites	0,011 µg/L	0,059	-	-	-	-
Chrome	Métallurgie Industrie du bois / chimique Industrie du cuivre et des métaux	0,700 mg/L	13,210	0,0148 mg/L	279,2213	0,002 mg/L	28,3
Cuivre	Industrie du bois Incinération des ordures ménagères Fabrication de fertilisants	1,031 mg/L	8,946	0,0020 mg/L	39,6670	0,003 mg/L	26,316
Zinc	Industrie métallurgique Epanchage agricole Biocide et désinfectant dans :	97,633 mg/L	679,274	0,0517 mg/L	1 060,5298	0,061 mg/L	752,81
Tributyletain+	Industrie du textile Industrie papetière	0,008 µg/L	0,136	-	-	-	-
Diuron	Pesticides	0,040 µg/L	0,631	0,0083 µg/L	0,0653	0,033 µg/L	0,273
Isoproturon	Herbicide Pesticides	0,03625 µg/L	0,6145	-	-	-	-

3.2 STEP d'Ornans

La STEP d'Ornans traite les eaux résiduaires des communes d'Ornans et de Montgesoye. Le réseau d'assainissement est de type mixte unitaire/ séparatif. Elle est dotée d'une capacité de traitement de 5500 EH. Le prétraitement des eaux usées est effectué grâce au dégrilleur, dessableur et dégraisseur. Les eaux usées sont envoyées dans le bassin d'aération où un traitement à boues activées à aération prolongée est appliqué pour la dégradation de la pollution carbonée et azotée. Le traitement du phosphore est réalisé par une étape de déphosphatation au chlorure ferrique. Enfin, l'étape de décantation permet la séparation physique de l'eau épurée de la pollution résiduelle solide. Le HTR moyen est de 40 heures et le SRT de 14 jours. Selon les données d'autosurveillance, le débit moyen journalier du rejet est de $505 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$.

3.3 Echantillonnage

3.3.1 Echantillonnage des eaux de surfaces et des effluents

Depuis décembre 2013 jusqu'en juin 2015, 40 campagnes d'échantillonnage ont été menées sur les deux sites d'études. A chaque campagne, des prélèvements ponctuels ont été réalisés sur chaque station d'étude : à l'amont, dans le rejet de STEP, en aval proche et en aval lointain des STEP. Les prélèvements ponctuels d'eau de surface ont été réalisés au milieu du cours d'eau dans les zones de courants. Différents types de flaconnage ont été utilisés en fonction des analyses à effectuer. Pour l'analyse des paramètres classiques, les échantillons d'eau et d'effluent ont été prélevés dans des bouteilles de 2 litre en polyéthylène préalablement rincés trois fois avec l'eau de prélèvement. Pour l'analyse des HAP, les eaux de surface et les effluents ont été prélevés avec des bouteilles ambrées de 300 mL préalablement lavées au décon, rincées à l'acétone puis rincées trois fois avec l'eau de prélèvement. Après chaque prélèvement, les échantillons sont conservés à l'obscurité à 4°C dans un délai n'excédant pas 48 heures après le prélèvement.

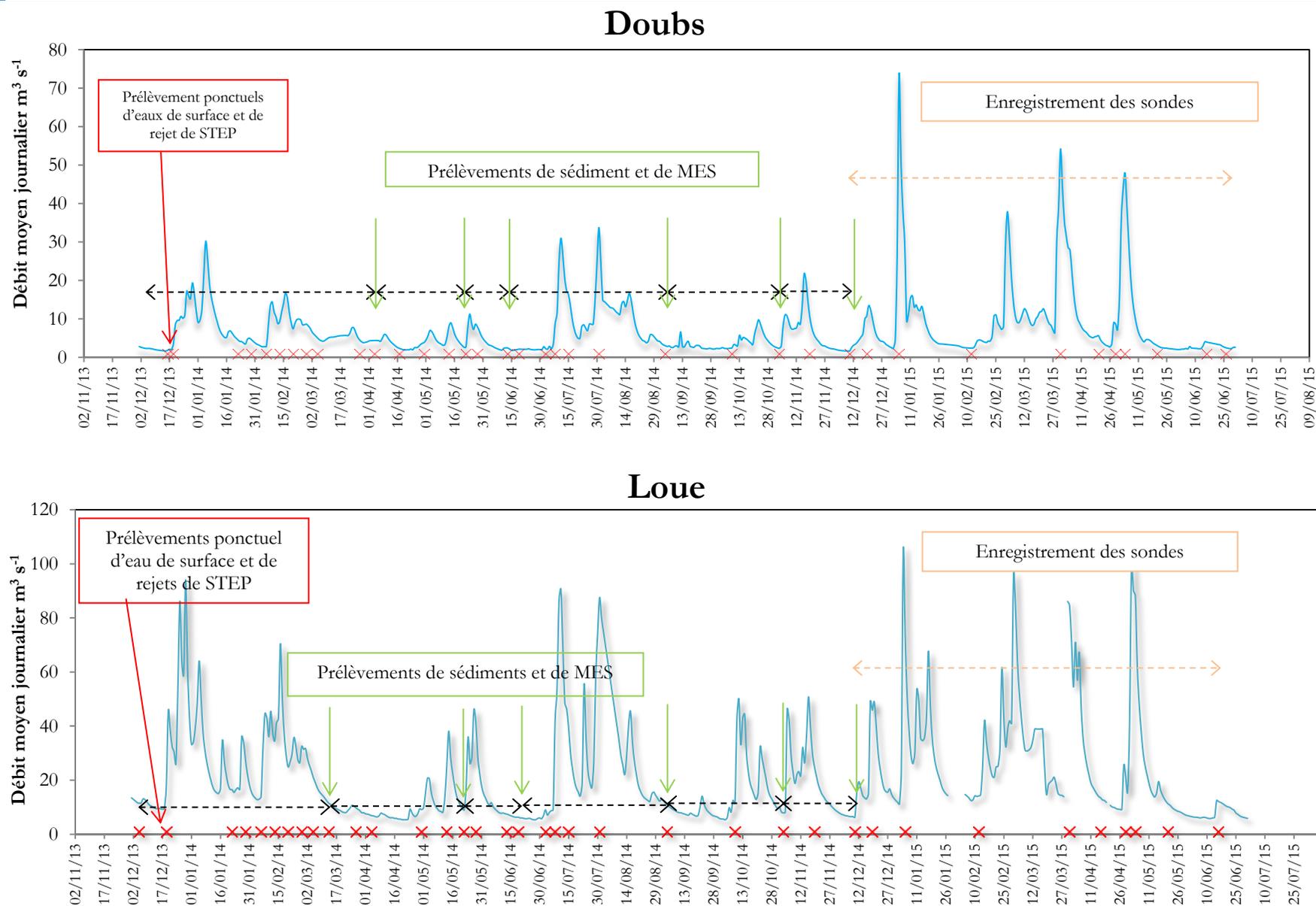


Figure 3-4 Chronique du débit moyens journaliers (m³ s⁻¹) dans le Doubs et dans la Loue. Les croix rouges correspondent à chaque prélèvement ponctuel

3.3.2 Echantillonnage des matrices solides

Des échantillons de sédiments et de MES ont été collectés au cours de 6 campagnes d'échantillonnage (Figure 3-4) aux stations amont, aval proche et aval lointain des STEP de Pontarlier et d'Ornans respectivement dans le Doubs et dans la Loue.

3.3.2.1 Définition et nature des MES

Les cours d'eau véhiculent des matières en solution ainsi que des matières solides. Parmi les substances solides, on distingue les MES légères pouvant être maintenue en suspension, et les MES lourdes qui nécessitent des processus de type saltation et charriage pour être transportées. Les colloïdes étant de très petites tailles forment un mélange homogène et peuvent être transportés sous forme liquide. De manière arbitraire, dans un échantillon d'eau, la norme AFNOR NF T 90-105 (1996) définit les MES par des critères opérationnels : les MES sont obtenues soit par filtration sur une membrane poreuse de 0,45 μm , soit par centrifugation (15 min, accélération moyenne de 2800 à 3200 g). Les MES comprennent des fractions organiques et des fractions minérales dont les contributions respectives varient selon les saisons et les cours d'eau. Les particules organiques sont issues de la décomposition d'animaux ou de végétaux et de micro-organismes planctoniques (phytoplancton et zooplancton). Les particules minérales sont classées selon leur granulométrie allant de 0 à plus de 2 mm de diamètre (Tableau 3-6).

Tableau 3-6 Classe granulométrique des particules

Classe granulométrique des particules de sédiments		Granulométrie (μm)
Sables	Grossiers	1000 - 2000
	Moyens	250-500
	Fins	62-250
Limons	Grossiers	31-62
	Fins	4-16
Argiles	Grossiers	1-4
	Fins	0,5-2

- Origine des MES

Les MES peuvent provenir de l'érosion des sols du bassin versant, de l'érosion des berges, du développement du plancton ainsi que rejets issus des activités urbaines et industrielles. Les particules organiques sont issues de la décomposition d'animaux, de végétaux et de micro-organismes planctoniques (phytoplancton et zooplancton). Les MES peuvent aussi provenir de l'érosion des sols qui dépend de plusieurs facteurs tels que la couverture pédologique (capacité d'infiltration et l'érodabilité), les modes d'occupation des sols (nature et distribution spatiale du couvert végétal), la

topographie (pente et longueur de pente) et des précipitations et du contexte hydrologique (évolution de la structure et de l'état hydrique de sols). L'érosion des sols sont des processus naturels mais qui peuvent être amplifiés par des actions anthropiques. La modification de l'usage des sols (pratiques culturales) et l'intensification de l'agriculture sont à l'origine d'une augmentation des flux de sédiments. Par exemple, une étude dans l'Iowa a montré que les pâtures permanentes exportent plus de particules que les parcelles cultivées, exportant elles-mêmes plus que des prairies non pâturées ou des bois (Zaimes et al. 2005). Par ailleurs, l'augmentation des surfaces imperméable (route, toits, parkings) a entraîné une diminution des surfaces d'infiltration de l'eau dans les sols et une augmentation du ruissellement.

- Transport et dynamique des MES

La mise en mouvement ou le dépôt d'une particule est fonction du diamètre de la particule et d'une force de traction critique au-delà de laquelle la particule se met en mouvement. Une fois la particule mise en mouvement, elle peut adopter plusieurs modes de déplacement qui va dépendre de la taille de la particule. Le charriage concerne les matériaux grossiers qui se déplacent en roulant sur le fond est plutôt favorisé par les débits élevés. La saltation concerne des matériaux suffisamment légers pour être soulevés du fond mais trop lourds pour être maintenues en suspension, et la suspension concerne les matériaux les plus fins (argiles et limons) qui peuvent être maintenus en suspension grâce à la turbulence de l'eau. Les MES étant issues de processus d'érosion et de transport, leur concentration varie selon les conditions hydrologiques et les débits.

3.3.2.2 Echantillonnage des MES

L'échantillonnage des MES est réalisé généralement par filtration ($MES > 0,45 \mu m$) d'échantillons prélevés ponctuellement dans l'espace et dans le temps. Ce type d'échantillonnage permet de récolter qu'une faible quantité de matières souvent insuffisante pour analyser leur teneur en polluants. Par ailleurs, les zones de dépôts de sédiments sont généralement localisées et peuvent avoir des propriétés physico-chimiques différentes (granulométrie, COT,...) selon les stations de prélèvements. C'est pourquoi l'échantillonnage des MES par centrifugation ou décantation a été développées afin de pallier à ces inconvénients. L'utilisation de trappes à MES *in situ* permet de recueillir une masse de MES plus importante nécessaires pour les différentes analyses et d'intégrer les MES transitant dans le cours d'eau pendant une période de temps connue. Ce type d'outils peu onéreux permet ainsi d'acquérir des données simultanée et intégrée dans le temps de la qualité des MES.

Des collecteurs de MES ont été installés sur chaque station d'étude. Afin de collecter une quantité suffisante de MES et de pallier à une éventuelle variabilité, six répliques ont été installés sur toute la largeur du cours d'eau. Les collecteurs sont des tubes en PVC de 50 cm de hauteur et de 50 mm fixés

verticalement à des fers à béton qui ont été préalablement insérer dans le fond du lit du cours d'eau. Les dimensions des tubes ont été choisies de telle manière que le rapport d'aspect (longueur du tube / diamètre) soit supérieur à 9, qui permet de récolter par simple sédimentation un maximum de MES selon Bloesch et Burns (1980). Les tubes sont positionnés au fond du cours d'eau, totalement immergés dans un secteur d'écoulement régulier, de largeur et de hauteur suffisante. Les collecteurs échantillonnent en permanence les MES transportées. Après une ou plusieurs crues, les MES échantillonnées sont récupérées et les pièges vides sont réinstallés pour une nouvelle campagne d'échantillonnage. Selon les campagnes, les MES collectées dans chaque réplique sont séparés ou mélangés en seul échantillon représentatif de la station. Les différents échantillons sont ensuite mélangés et collectés dans des bocaux en verres préalablement nettoyés avec un détergent ou à l'éthanol.

3.3.3 Prélèvements de sédiments

A chaque campagne de collecte des MES, trois répliques de sédiments ont été prélevés à l'aide d'un piochon dans trois zones de sédimentation différentes. Les répliques de sédiments sont ensuite mélangés et stockés à 4°C dans des bocaux en verre. Au laboratoire tous les échantillons ont été stockés à -20 °C, puis ont été lyophilisés, broyés et tamisés à 2 mm afin d'éliminer les macros débris.

3.4 Les sondes

Des sondes multiparamétriques ont été installés en décembre 2014 en amont et en aval de chaque STEP, ainsi qu'à la source de la Loue. Ces sondes mesurent :

- La turbidité

La turbidité est la mesure indirecte de la concentration des matières en suspension dans l'eau. Elle se détermine en émettant un faisceau lumineux sur la solution échantillon, puis en mesurant la lumière diffusée par les particules présentes. La concentration des matières en suspension est un facteur déterminant pour le contrôle de la qualité de l'eau et pour la mesure des variations du milieu.

Le capteur de turbidité utilise un rayonnement proche infrarouge et détecte la diffusion sous un angle de 90 degrés par rapport au faisceau lumineux incident. Conformément à la méthode ASTM (American society for testing and materials) D7315, ce type de capteur est appelé turbidimètre néphélométrique dans le proche infrarouge. Les valeurs sont exprimées en unité de turbidité néphélométrique (NTU). La plage de prise de données varie de 0 à 1000 NTU, à une résolution de $\pm 2\%$. L'étalonnage est réalisé avec une solution étalon conformes aux méthodes normalisées pour tester la qualité de l'eau, calibrée à 126 NTU.

- La conductivité et la température

Le capteur de conductivité et de température est utilisable dans une sonde qui couvre la quasi-totalité des applications. Ce capteur fournit des données extrêmement précises avec un temps de réponse très court. Les données de conductivité sont utilisées pour calculer la conductance spécifique et les matières dissoutes totales. Le capteur de température utilise une thermistance à haute stabilité fonctionnant à des températures de -5 à +50° C. La plage de mesure de la conductivité est de 0 à 200 mS cm⁻¹ avec une résolution de 0,0001 mS cm⁻¹. L'étalonnage de la conductivité est réalisé en laboratoire avec une solution étalon YSI 3167 de 1000 µS cm⁻¹.

Les sondes ont été fixées sur une berge dans un tube en PVC pour les protéger des embâcles qui circulent dans les cours d'eau, et en période d'étiage de chaque cours d'eau pour qu'elles soient immergées toute l'année. Les sondes sont munies d'un racleur qui permet de limiter son encrassement par adsorption de particules fines ou développement de microalgues.

3.5 Mesures physico-chimiques

Les analyses physico-chimiques décrites ci-après détaillent les méthodes d'analyses physico-chimiques sur les différents compartiments étudiés : eau de surface, effluents, MES, sédiments.

3.5.1 Mesures hydrauliques

Les débits moyens journaliers du Doubs et de la Loue ont été obtenus par la banque hydro (DREAL). Nous avons pris les données enregistrées à la station Doubs pour le Doubs, à Vuillafans et à la source pour la Loue (Tableau 3-7).

Tableau 3-7 Caractéristiques des stations hydrologiques

	Site A	Source	Site B
Cours d'eau	Doubs	Loue	Loue
Code station DREAL	U2022020	U2604060	U2604030
Coordonnées Lambert II	X : 905 340 Y : 2 222 000	X : 901 140 Y : 2 231 100	X : 895 452 Y : 2 235 720
Module inter annuel (m ³ s ⁻¹)	7.69	3.06	21.0
QMNA ₅ (débit mensuel d'étiage atteint pour 5 ans)	0.990	0.760	4.20

Les débits journaliers moyens des rejets des STEP ont été fournis par l'Agence de l'eau et le département du Doubs.

3.5.2 Mesures chimiques

3.5.2.1 Paramètres globaux

Les mesures chimiques ont été réalisées dans différents laboratoires selon la nature des éléments à analyser. Les paramètres globaux tels que la matière carbonée, azotée et phosphorées ainsi que les matières en suspension ont été réalisées par le laboratoire Qualio (Besançon, France) accrédité par le COFRAC et agréé par les Ministères des Affaires sociales et de la Santé ainsi que du Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie. Le Tableau 3-8 synthétise les paramètres analysés par le laboratoire ainsi que les méthodes et normes correspondantes.

Tableau 3-8 Méthode d'analyse chimique pour les paramètres globaux

Paramètre	Matrice	Norme	Méthode
Ammonium	Eau	NF T 90-015-2	- Réaction colorée - Dosage en spectrophotométrie d'adsorption moléculaire
Ammonium	Effluent	NF T 90-015-1	- Dosage volumétrique - Dosage titrimétrique avec un acide titré
Azote Kjeldahl	Eau / rejet	NF EN 25663	- Minéralisation de l'azote organique, - Ajout de NaOH puis distillation dans une solution d'acide borique - Dosage titrimétrique par un acide
Azote Kjeldahl	MES / sédiments	NF EN 13342	- Minéralisation
Carbone Organique Dissout	Eau / rejet	NF EN 1484	- Filtration à 0,45 µm - méthode de dosage du COT
Carbone Organique Total	Eau / rejet	NF EN 1484	- Oxydation par combustion - Dosage du CO2 par spectrométrie infrarouge
Carbone Organique Total	MES / sédiments	Méthode Anne – Norme interne P30 MO08B	- Ajout de bichromate de potassium en présence d'acide sulfurique
Chlorures	Eau / rejet	NF EN ISO 10304-1	- Chromatographie en phase liquide
Conductivité	Eau / rejet	NF EN 27888	- Mesure de la conductance entre deux électrodes
DBO5	Eau / rejet	NF EN 1899-2	- Quantité d'oxygène consommée dans les conditions de l'essai après une incubation durant 5 jours à 20°C et dans l'obscurité

Matières En Suspension Organiques	Eau / rejet	Gravimétrie	- Gravimétrie
Matières En Suspension Totales	Eau / rejet	NF EN 872	- Filtration après séchage à 105°C
Matière organique	MES / sédiments	NF EN 12879	- Détermination de la perte au feu de la matière sèche
Nitrates	Eau / rejet	NF EN ISO 10304-1	- Chromatographie en phase liquide
Nitrites	Eau / rejet	NF EN ISO 10304-1	- Chromatographie en phase liquide
Oxygène dissous	Eau / rejet	NF EN 25814	- Méthode électrochimique à la sonde
pH	Eau / rejet	NF EN ISO 10523	- Mesure potentiométrique
Phosphates	Eau / rejet	NF EN ISO 10304-1	- Chromatographie en phase liquide
Phosphore	MES / sédiments	NF EN ISO 11885	- Spectroscopie d'émission optique avec plasma induit par haute fréquence
Phosphore total	Eau / rejet	P31MO01C/NF EN ISO 6878	- Spectrométrie au molybdate d'ammonium
Pourcentage de saturation	Eau / rejet	NF EN 25814	- Idiométrie
DCO	Eau / rejet	ISO 15705	- Oxydation en tube fermé

3.5.2.2 Les HAP

Les dosages de HAP dans les différentes matrices ont été réalisés au laboratoire Chrono Environnement. Les méthodes d'extraction et d'analyses ont été réalisées selon Morin-Crini et al. (2014) et Morin-Crini et al. (2015). Nous avons sélectionnés les 16 HAP désignés comme prioritaires par la DCE et par l'agence de l'environnement des Etats-Unis (US-EPA): naphthalène (NAP), acenaphthène (ACE), acenaphthylène (ACY), fluorène (FLU), phenanthrène (PHE), anthracène (ANT), fluoranthène (FLT), pyrène (PYR), benzo[a]anthracène (BaANT), chrysène (CHY), benzo[b]fluoranthène (BbFLT), benzo[k]fluoranthène (BkFLT), benzo[a]pyrène (BaP), dibenzo[a,h]anthracène (DahANT), indeno[1,2,3-cd]pyrène (IcdPYR), benzo[g,h,i]perylène (BghiPL).

Dans les sédiments et les MES, l'extraction des HAP a été réalisée par un procédé d'extraction liquide à l'hexane (SpeedExtractor E-914 Büchi, Rungis, France). Pour les échantillons d'eaux de surface et d'effluents, une extraction liquide-liquide dans l'hexane sous agitation magnétique pendant 30 min a été réalisée. Puis pour les deux méthodes, les fractions de HAP extraites de chaque échantillon sont concentrées par évaporation du solvant dans l'évaporateur Syncore Analyst (Büchi, Rungis, France). Les échantillons sont ensuite analysés par GC-MS/MS (Agilent, Massy, France). L'analyseur est équipé d'un système GC 7890A, un spectromètre de masse triple quadripôle 7000 GC et d'un échantillonneur Combipal 80 GC combiné avec une colonne (5 % phenyl)-methylpolysiloxane HP5MS. Les méthodes d'extraction et de détection ont été validées pour tous les échantillons par rapport aux paramètres de linéarité, de recouvrement, des limites de détection ou de quantification (LOD ou LQD) et des contrôles qualité réalisés tous les 10 échantillons. Dans les cas où le contrôle de qualité est inférieur à 80 % ou supérieur à 120 % de la valeur attendue, l'étape de calibration est ré effectuée et les échantillons sont ré analysés. L'estimation des recouvrements, a été réalisée par l'ajout au préalable d'une solution standard de HAP à différentes concentrations dans chaque échantillon.

3.5.2.3 Les résidus médicamenteux

Le dosage des résidus médicamenteux dans les eaux de surface et dans les effluents ont été réalisés à l'institut des sciences analytiques (ISA) de Villeurbanne selon le protocole de Vulliet and Cren-Olivé (2011). Les substances analysées ont été sélectionnées selon les taux de consommation de produits pharmaceutiques en France et selon leur concentration environnementales prédites proposées par Besse et Garric (2008), estimées selon leur propriété physico-chimique, pharmacologique et écotoxicologique (Tableau 3-9).

Tableau 3-9 Liste des substances pharmaceutiques sélectionnées et leur consommation annuelle en France (ANSM 2014). (1): métabolite de l'enrofloxacin ; (a): médicament vétérinaire utilisé et approuvé en France (<http://www.ircp.anmv.anses.fr/results.aspx>); b: médicament vétérinaire non approuvé en France (Bártíková et al. 2016)

Famille	Molécule	Numéro CAS	Consommation annuelle (kg) en France (ANSM 2014)	Origine et utilisation
Antibiotique	Ciprofloxacine	85721-33-1	12186	H / V ¹
	Ofloxacine	82419-36-1	4137	H / V ^b
	Roxithromycine	80214-83-1	3404	H / V ^b
	Sulfaméthoxazole	723-46-6	16730	H / V ^a
	Triméthoprim	738-70-5	3346	H / V ^a
Anti convulsifant	Carbamazépine	298-46-4	33514	H
Anti-inflammatoire	Diclofenac	15307-86-5	39000	H
	Ibuprofène	15687-27-1	240024	H
	Ketoprofène	22071-15-4	21697	H / V ^a
	Naproxène	22204-53-1	37332	H
	Paracetamol	103-90-2	3303077	H / V ^a
Anti-parasitaire	Metronidazole	443-48-1	36545	H / V ^a
Diurétique	Furosemide	54-31-9	21288	H / V ^a
Fongicide	Econazole	27220-47-9		H
Hormone	α estradiol	57-63-6		H
	Androstenedione	63-05-8		H
	β estradiol	50-28-2		H
	Estriol	50-27-1		H
	Estrone	53-16-7		H / V
	Gestodène	60282-87-3		H
	Levonorgestrel	17489-40-6		H
	Norethindrone	68-22-4		H
	Progesterone	57-83-0		H / V
	Testosterone	58-22-0		H / V
Régulateur lipidique	Fenofibrate	49562-28-9	86000	H
	Bezafibrate	41859-67-0	20852	H
Psychotropes	Fluvoxamine	54739-18-3		H
	Lorazepam	846-49-1		H
	Oxazepam	604-75-1	6195	H
Béta-bloquant	Aténolol	29122-68-7	18337	H
	Propranolol	4199-09-1		H

Les substances pharmaceutiques ont été extraites selon la méthode d'extraction en phase solide (SPE) avec l'AutoTrace SPE workstation. Les échantillons ont été ensuite analysés par chromatographie liquide à très haute performance (UHPLC, Agilent®) associé à un spectromètre de masse (QqQn ABSciex) en utilisant le mode MRM (multiplexe réaction-monitoring). Le volume d'injection est de 40 μ L avec un débit de 400 μ L min⁻¹. La température source est de 550°C. Chaque substance est caractérisée par son temps de rétention, par deux transitions MRM et par le

ratio entre les aires MRM 1 et MRM 2. Les performances analytiques ont été validées par l'injection de contrôles qualité, et d'étalon internes. Les limites LD et LQ ont été réévaluées pour chaque matrice (eau de surface, effluent).

3.5.2.4 La granulométrie

La distribution granulométrique a été déterminée sur les sédiments humides grâce à un granulomètre laser Malvern Mastersizer 2000. Au cours de la mesure, les particules sédimentaires passent au travers du faisceau focalisé d'un laser hélium / néon. Ces particules provoquent une diffusion et une diffraction de la lumière sous un angle qui est fonction de leur diamètre. Une série de détecteurs photosensibles mesure l'intensité de la lumière diffusée en fonction de l'angle et permet ainsi de calculer la taille des particules, dans une gamme comprise entre 0,02 et 2000 μm .

3.6 Estimation des flux

Le facteur de dilution (Fd) est défini comme le rapport entre le débit de l'effluent (Qe) et le débit du cours d'eau (Qr) (Équation 3-1).

Équation 3-1
$$Fd = \frac{Qe}{Qe+Qr}$$

Pour les calculs des flux flux de nutriments, d'éléments carbonés et de MES, nous avons utilisé la méthode basée sur les moyennes DWC (discharge wieghted concentration method) (Raymond, 2011). La méthode DWC est basée sur le calcul de la concentration moyenne pondérée par les débits qui ensuite multiplié par le débit moyen :

Équation 3-2
$$\text{Flux annuel} = K \frac{\sum_{i=1}^n C_i Q_i}{\sum_{i=1}^n Q_i} \bar{Q}$$

avec : C_i = concentration instantané au moment du prélèvement i (mg L^{-1}), Q_i = débit instantané au moment du prélèvement i ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$) ; \bar{Q} = module annuel ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$), déterminé à l'aide de la chronique journalière des débits ; n = nombre de prélèvements sur une année ; K = facteur de conversion du flux pour un résultat en tonnes an^{-1} (pour C_i en mg L^{-1} et Q_i en $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$; $K= 31.536$). Nous avons utilisés la même formule pour les calculs de flux dans les rejets en utilisant la moyenne des débits annuels à la place du module annuel pour les eaux de surface.

3.7 Matériel biologique: *Gammarus pulex*

Les crustacés amphipodes Gammaridae sont largement répandus dans les eaux douces françaises et européennes (Bloor and Banks 2006). Les gammares vivent sur différents types de substrats minéraux (graviers, galets) et organiques (litière, bryophytes, végétation) à des densités pouvant atteindre plusieurs milliers d'individus au m² (Felten et al. 2006). Le régime alimentaire des gammares se compose de matériel végétal détritique, de biofilms, de chironomidés et de petits isopodes (Macneil et al. 1997). Ils jouent donc un rôle clef dans l'incorporation du matériel organique terrestre fixé dans les réseaux trophiques d'eau douce et dans la redistribution de la matière et de l'énergie (Maltby et al. 2002). Les gammares sont aussi une proie privilégiée pour de nombreuses espèces de macroinvertébrés, de poissons et d'amphibiens (Macneil et al. 1997). Les gammares peuvent s'adapter à des conditions environnementales très variées depuis les petits ruisseaux de tête de bassin jusqu'aux grands fleuves. Leur large répartition est principalement liée à de faibles exigences vis-à-vis de la qualité physico-chimique de l'eau et de la température de l'eau (de 0 à 25°C). Toutefois, une eau relativement oxygénée est nécessaire à leur survie (Maltby 1995).

L'anatomie des gammares est caractérisée par une convexité dorsale régulière composée de 4 régions distinctes : le prosoma (tête), le mésoma (thorax), ainsi que le métasoma et l'urosoma (abdomen) (Roux 1970) (Figure 3-5). *Gammarus pulex* se distingue par une cuticule non carénée, de petites ocelles de formes ovales, la taille de l'endopodite correspondant au deux tiers de l'exopodite. Les gammares ont une croissance discontinue s'effectuant par mues successives. Les nouveaux-nés deviennent adultes après environ 10 cycles de mues. Les cycles de mues sont dépendants de la température du milieu et du sexe des individus. La durée de vie des femelles est estimée entre 17 et 23 mois, alors que les mâles peuvent vivre jusqu'à 3 ans (Maitland 1966; Welton and Clarke 1980).

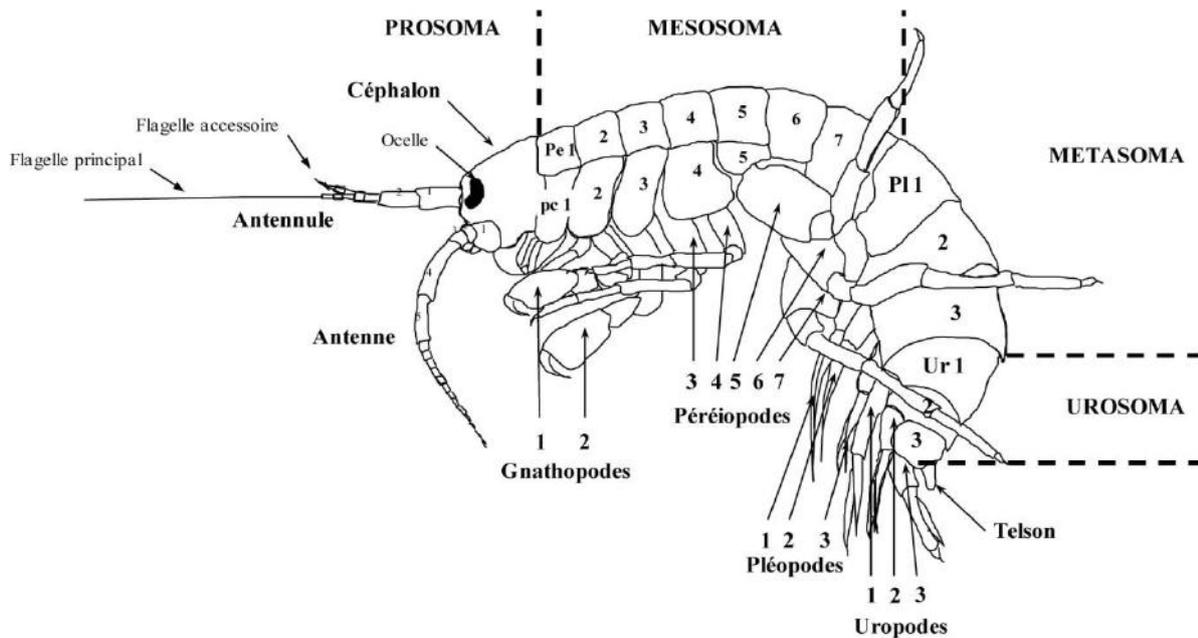


Figure 3-5 Vue latérale d'un Gammaridae (d'après Xuereb 2009 adaptée d'après Roux, 1970). pc 1-7 : plaques coxales 1-7 ; Pe 1-7 : périomères 1-7 ; Pl 1-3 : pléomères 1-3 ; Ur 1-3 : uropomères 1-3.

Les périodes de reproduction des gammarides ont lieu plusieurs fois dans l'année avec un maximum en avril-mai et un ralentissement en période hivernale. Lors de la phase de reproduction le couple forme un amplexus précopulatoire où le mâle est agrippé au dos de la femelle au moyen de ses gnathopodes. Le sperme des mâles est déposé via les papilles génitales dans la poche marsupiale de la femelle où plusieurs fécondations sont effectuées en quelques heures. Une fois la femelle fécondée, les œufs vont se développer et éclore dans le marsupium. A la fin du développement embryonnaire, les juvéniles éclos sortent du marsupium juste avant l'exuviation de leur mère. Suite à cette exuviation, un nouveau cycle d'ovulation et de fécondation peut recommencer.

3.8 Prélèvements de gammarides *in situ*

L'échantillonnage des macroinvertébrés a été réalisé grâce à un filet Surber, de maille 500 μm et d'une surface de 1/20 m^2 aux stations amont, aval proche et aval lointain de chaque site d'étude. Sur chaque station, trois répliques ont été prélevées pour chacun des 3 types de substrats échantillonnés, en privilégiant, au sein de chaque type, le plus attractifs pour les Gammarides :

- type végétal avec Bryophytes > Spermaphytes émergents > Algues > Hélophytes (vitesse associée = 25-50 > 50-100 > 5-25 > 0-5 cm/s)
- type minéral avec Gravier > galets > sables minéraux (vitesse associée = 50-100 >

25-50 > 100-150 > 5-25 > 0-5 cm/s)

- type organique avec Litière > sables organiques > vases (vitesse associée = 0-5 > 5-25 > 25-50 > 50-100 cm/s).

Pour chaque station, les prélèvements se composent de 3 bryophytes, de 3 graviers et de 3 litières. Lorsque l'un des substrats considéré comme favori était manquant, les échantillons ont été prélevés sur un substrat appartenant au même type, par ordre d'attractivité décroissante. Les vitesses de courant, ainsi que la profondeur ont aussi été mesurées. Chaque échantillon a été placé dans un bocal en verre totalement immergé avec de l'alcool à 95° et fermé hermétiquement.

Les gammarus ont ensuite été triés par structure de taille (Roux 1970 ; Welton & Clarke 1980) : < 3mm (juvéniles), 3 à 6 mm (immatures), 6 à 9 mm (adultes) et > 9 mm (adulte de plus d'un an). De plus, le sexe des gammarus est déterminé pour tous les gammarus d'une taille supérieure à 6 mm (adultes).

3.9 Test écotoxicologique

Nous avons réalisé des tests écotoxicologiques en laboratoire afin d'évaluer la toxicité de sédiments artificiels contaminé par du BaP et de la cyperméthrine seul et en mélange sur l'amphipode *Gammarus pulex*.

3.9.1 Prélèvements et maintien en laboratoire de gammaridae

Les amphipodes utilisés pour les bio-essais ont été prélevés *in natura* dans un petit cours d'eau forestier faiblement anthropisé (ruisseau de la Fontaine des Ermites, France, N47°24'43"E006°03'32"). Au laboratoire, les gammarus sont triés et séparés des autres macro-invertébrés. Ils sont ensuite maintenus en aquarium de 30 litres dans de l'eau d'évian oxygénée à 16°C avec un cycle jour/nuit de 16 et 8 heures. Ils sont continuellement nourris par des feuilles d'aulne provenant du lieu de prélèvement. Une semaine avant le début des expérimentations, environ 400 gammarus mâles d'environ 6 mm sont triés et séparés des autres individus (femelles, juvéniles).

3.9.2 Exposition et contamination des sédiments

Nous avons réalisé trois séries de tests écotoxicologiques :

- Expérimentation 1 : exposition des gammarus au BaP
- Expérimentation 2 : exposition des gammarus à la cyperméthrine
- Expérimentation 3 : exposition des gammarus à un mélange de BaP et de cyperméthrine

Toutes les expérimentations ont été réalisées avec du sédiment artificiel réalisé au laboratoire. Le sédiment artificiel composé de sable à 74,04 %, de kaolin à 22 %, de tourbe blonde à 3 %, et de carbonate de calcium (CaCO₃) à 0,06 % de la quantité totale du sédiment. Le sable a été préalablement broyé à 650 tr.min⁻¹ pendant 30 secondes au microbroyage PM 200, tamisé à 500 µm, lavé puis séché. La tourbe a été lyophilisée pendant 72 heures et tamisée à 500 µm.

Chaque expérimentation comprend six conditions d'exposition, et six réplicas par condition. Un réplica correspond à un bécher de 600 mL en verre, contenant 100 g de sédiment artificiel complété avec 400 mL d'eau d'Evian. Pour chaque expérimentation, nous avons préalablement contaminé les sédiments selon les gammes de concentrations reportées dans le Tableau 3-10 Concentration en BaP et cyperméthine dans les sédiments pour chaque expérimentation.

Tableau 3-10 Concentration en BaP et cyperméthine dans les sédiments pour chaque expérimentation

Experimentation 1	Experimentation 2	Experimentation 3	
BaP (mg kg ⁻¹)	Cyperméthrine (µg kg ⁻¹)	BaP (mg kg ⁻¹)	Cyperméthrine (mg kg ⁻¹)
0	0	0	0
0 + solvant	0 + solvant	0 + solvant	0 + solvant
5	0,001	5	0,005
20	0,005	10	0,005
40	0,02	20	0,005
100	0,04	40	0,005

La contamination au BaP est réalisée à partir d'une solution stock à 1 g L⁻¹ dilué dans l'acétone. Dans chaque bécher contenant 100 g de sédiment, 10 ml de solution de BaP dilué dans l'acétone sont déposés sur le sédiment. La contamination à la cyperméthrine est réalisée à partir d'une solution stock à 0,5 g L⁻¹ diluée dans l'acétone. La contamination des sédiments par le mélange est réalisée à partir d'une solution mère de BaP et de cyperméthrine diluée dans l'acétone. Pour chaque expérimentation, les volumes de solution stock à diluer sont fonction des concentrations finales dans les sédiments souhaité (Tableau 3-10). Pour les réplicas de la condition « 0-solvant », 10 mL d'acétone sont introduit dans chaque bécher.

Les sédiments sont ensuite homogénéisés manuellement et mis à l'étuve à 38°C pour l'évaporation du solvant. Après évaporation, 400 ml d'eau d'Evian sont introduit dans chaque bécher. Les béchers sont ensuite laissé à stabiliser pendant 7 jours à 16°C. Ensuite, 48h avant

l'introduction des gammars, chaque béccher est mis sous bullage pour une bonne oxygénation du milieu et protégé par du parafilm pour limiter l'évaporation.

Au premier jour de l'expérimentation, 10 gammars mâles sélectionnés aléatoirement sont introduits dans chaque béccher. Le test est mené sur 10 jours avec une photopériode jour/nuit de 16 h/8 h sans nourriture, sous oxygénation à 16°C. A la fin du test les gammars vivants sont triés et comptés. Pour chaque béccher, l'eau et les sédiments sont séparés et stockés dans des flacons préalablement nettoyés au décon et à l'acétone. Les échantillons d'eau sont stockés à -20 °C et les échantillons de sédiments sont lyophilisés avant d'être analysés.

3.9.3 Modélisation des courbes concentrations-réponses

Les résultats obtenus lors des bioessais ont été modélisés à l'aide d'un modèle logistique basé sur l'équation de Hill (1910). La macro Regtox (open source) a été utilisée pour le calcul des concentrations d'effet (CE_x).

3.9.4 Toxicité des mélanges

Les effets toxiques des mélanges peuvent être modélisés par des modèles de prédiction basés sur des données de toxicité des substances seules. Les modèles de prédiction les plus utilisés pour l'évaluation des risques sont les modèles d'addition des concentrations (CA) ou d'indépendance d'action (IA).

- Modèle d'addition des concentrations (CA)

La prédiction des effets toxiques d'un mélange est établie en calculant la somme des équivalents toxiques relatifs des substances en mélange. Ce modèle est applicable aux substances en mélange ayant le ou les même(s) mécanisme(s) d'action de toxicité sur l'organisme testé. Faust et al. (2003) proposent l'équation suivante pour calculer les effets du mélange:

Équation 3-3
$$ECx_{mix} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{EC_{xi}} \right)^{-1}$$

avec ECx_{mix} qui correspond aux concentrations d'effets équivalent de l'ensemble du mélange où les concentrations individuelles c_i sont ajoutées pour obtenir c_{mix} et p_i est la proportion de la substance i dans le mélange $p_i = c_i/c_{mix}$.

- Modèle d'indépendance d'action (IA)

Dans ce modèle, les substances en mélange sont considérées comme ayant des mécanismes d'action strictement différents et indépendants. Cela signifie que l'effet relatif d'une substance

reste inchangé en présence d'une autre substance toxique. Le modèle IA prend en compte les proportions relatives entre chaque réponse probable de l'organismes-test face aux différentes substances en mélange. Bliss (1939) a proposé l'équation suivante pour le calcul de l'effet toxique d'un mélange :

Équation 3-4
$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)]$$

Résultats et discussion

CHAPITRE 1. Etude de la variabilité temporelle des paramètres globaux

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer la variabilité des impacts des STEP dans le Doubs et la Loue sur les concentrations de différents paramètres décrivant la qualité de l'eau.

Dans une première partie, nous avons étudié pour chaque site les relations entre les concentrations des descripteurs de la matière carbonée (COT, COD, DBO₅, DCO), les concentrations des différentes formes de l'azote (nitrates, nitrites, azote ammoniacal, ammonium), des phosphates et du phosphore, ainsi que des concentrations en oxygène dissous, MEST et MESO dans les stations amont et aval de chaque STEP au cours des différentes campagnes d'échantillonnage. Ensuite, nous avons analysé les caractéristiques de la composition des rejets de chaque STEP et comparé la composition des deux rejets.

Dans une deuxième partie, nous avons estimé et comparé les flux moyens de chaque paramètre dans les rejets de STEP ainsi que dans le Doubs et dans la Loue.

Enfin dans une troisième partie, nous avons analysé les variations des mesures de conductivité et de turbidité enregistrées en continu à l'aide de sondes multiparamétriques en amont et en aval des STEP.

4 Variabilité spatio-temporelle des descripteurs globaux dans les eaux de surface et dans les rejets

Afin d'évaluer les variations des différents descripteurs tout en intégrant la variabilité spatio-temporelle des prélèvements, nous avons réalisé des Analyses en Composante Principale (ACP).

Cette méthode statistique est un outil d'observation qui permet d'identifier les relations entre les paramètres en les représentant sur un cercle des corrélations. L'ACP porte uniquement sur les variables, indépendamment des grandeurs que l'on cherche à modéliser. Les variables initiales sont remplacées par de nouvelles variables, appelées composantes principales, deux à deux non corrélées, et telles que les projections des données sur ces composantes soient de variance maximale. Les variables éloignées du centre du cercle sont statistiquement bien expliquées dans le système, les variables proches les unes des autres sont en corrélation normale, celles opposées de 180° sont en corrélation inverse, et celles placées à 90° sont indépendantes. Par ailleurs, l'ACP est une méthode couramment utilisée pour caractériser les facteurs de variabilité de la qualité de l'eau dans un bassin versant et particulièrement pour identifier des sources de polluant telles que les STEP (Olsen et al. 2012).

4.1 Eaux de surface

Au cours des campagnes de prélèvements réalisées depuis décembre 2013 jusqu'en janvier 2015, nous avons mesuré les concentrations des paramètres décrivant la qualité de l'eau dans les eaux de surface du Doubs et de la Loue, en amont et en aval des STEP. Chaque échantillon est associé au régime hydrologique instantané ainsi qu'à la saison au moment du prélèvement. Pour analyser la variabilité des différents paramètres, nous avons réalisé des ACP en considérant les variables caractérisant les sites d'étude (Doubs, Loue), les stations de prélèvements (amont, aval proche et aval lointain), le régime hydrologique (étiage, débit moyen ou crue) et les saisons (printemps, été, automne et hiver) comme des variables qualitatives.

4.1.1 Rivière Doubs

D'après le Tableau 4-1, les valeurs de pH, oxygène, nitrites, nitrates, COD, COT, DBO₅, phosphore et phosphates présentent des valeurs similaires entre les stations amont et aval, ce qui suggère que la STEP n'a pas d'impact sur la variation de ces paramètres. Toutefois, les différences significatives des concentrations en ammonium aux stations aval témoignent d'un impact sur de la STEP sur ce paramètre, caractéristique des pollutions d'origine domestiques. Les valeurs de conductivité ne sont pas statistiquement différentes mais sont cependant plus élevées aux stations aval. Enfin les concentrations en MES et MESO sont très variables car dépendantes des variations du débit du Doubs.

L'analyse ACP des différents paramètres mesurés dans les eaux de surface du Doubs lors des différentes campagnes de prélèvements a été réalisée. Les deux premiers axes de composante principale (axes 1 et 2) expliquent 45,8 % de la variabilité des données. D'après la Figure 4-1, les concentrations en COD, COT et DCO sont corrélées entre elles et à l'axe 1, et sont aussi anti corrélées aux concentrations nitrates, oxygène, DBO₅ et nitrites. Par ailleurs, les concentrations en MEST, MESO, phosphore, phosphates varient indépendamment des autres descripteurs. La projection des individus selon les axes 1 et 2 montre une répartition des échantillons selon les saisons (Figure 4-2). Les prélèvements effectués en saison estivale et en période de crue correspondent aux plus fortes teneurs en COD et COT par rapport aux échantillons prélevés en hiver caractérisés par de fortes concentrations en nitrates. En revanche, nous n'avons pas observé de répartition des échantillons selon les stations de prélèvements pour les campagnes de prélèvements considérées, ce qui témoigne d'un faible impact de la STEP sur la variabilité temporelle des concentrations des différents paramètres dans le Doubs.

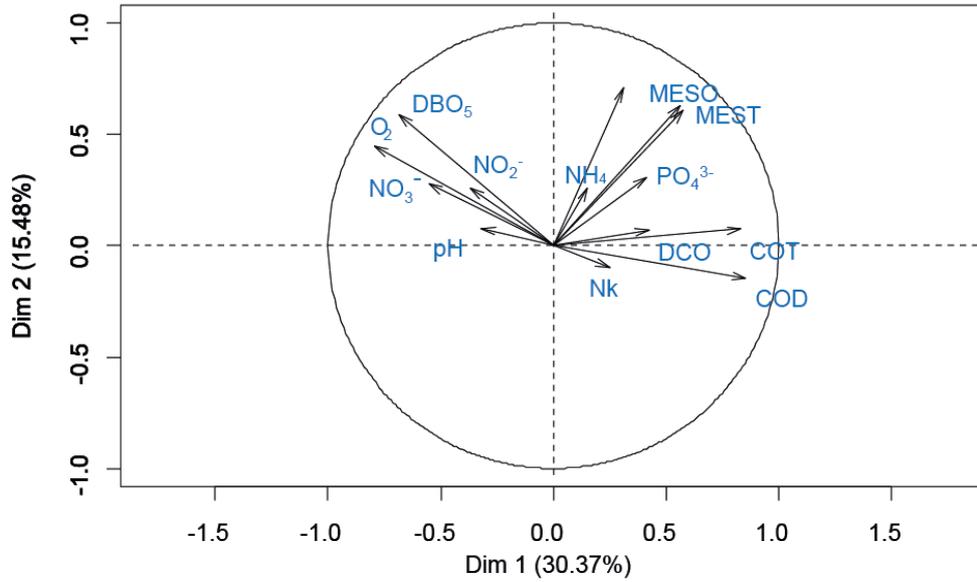


Figure 4-1 ACP (axes 1 et 2) : cercle de corrélation des paramètres mesurés dans les eaux desurfaces du Doubs.

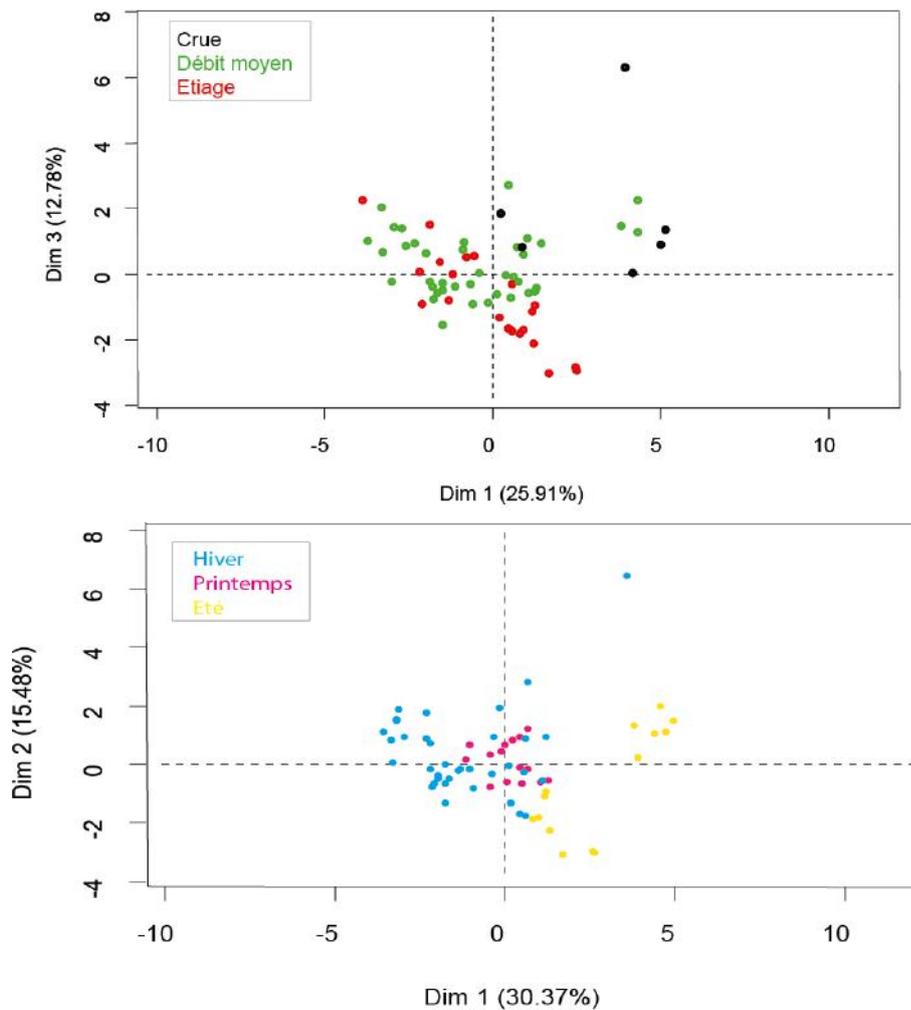


Figure 4-2 ACP : projections des échantillons du Doubs selon les débits et les saisons

Tableau 4-1. Moyenne (Moy), écart type (Et), valeur minimale (Min) et valeur maximale (Max) des concentrations des variables mesurées au cours des campagnes d'échantillonnage dans le Doubs (n=28 pour chaque station). Les différences significatives entre les stations amont et aval proche sont indiquées par «*», (Anova ou test de Kruskal Wallis, $p < 0,05$)

Variable	Unité	Amont				Aval proche				Aval lointain			
		Moy	Et	Min	Max	Moy	Et	Min	Max	Moy	Et	Min	Max
Ammonium*	mg L ⁻¹	0,01	0,01	0,01	0,04	0,03	0,03	0,01	0,15	0,07	0,15	0,01	0,74
COD	mg C L ⁻¹	2,26	0,26	1,95	2,83	2,33	0,28	1,98	2,89	2,43	0,47	2,00	4,09
Conductivité	μS cm ⁻¹	372	56	186	418	381	55	216	442	394	59	254	535
COT*	mg C L ⁻¹	2,32	0,26	1,97	2,92	2,42	0,30	2,01	3,14	2,58	0,68	2,02	5,51
DBO5	mg O ₂ L ⁻¹	1,66	0,73	0,70	3,40	1,55	0,75	0,70	3,30	1,69	0,85	0,70	4,20
DCO	mg C L ⁻¹	7,50	3,34	4,40	20,20	6,50	1,61	3,60	11,70	7,05	2,85	3,20	16,70
MESO	mg L ⁻¹	2,23	0,98	2,00	6,50	2,04	0,14	2,00	2,60	2,31	1,11	2,00	7,10
MEST	mg L ⁻¹	5,23	8,60	2,00	41,00	3,65	3,22	2,00	12,00	4,24	3,53	2,00	12,00
Nitrates	mg L ⁻¹	2,55	0,57	1,40	3,50	2,57	0,62	1,40	3,50	2,61	0,67	1,50	3,60
Nitrites	mg L ⁻¹	0,02	0,02	0,01	0,11	0,02	0,02	0,01	0,11	0,03	0,03	0,01	0,15
Nk	mg L ⁻¹	1,34	0,78	1,00	4,50	1,54	1,97	1,00	12,20	1,17	0,37	1,00	2,90
Oxygène	mg L ⁻¹	10,37	1,68	7,74	14,20	10,33	1,61	7,51	13,80	10,33	1,53	7,60	13,60
pH		8,22	0,39	6,90	8,50	8,23	0,37	6,90	8,50	8,22	0,34	7,00	8,50
Phosphates	mg L ⁻¹	0,02	0,01	0,01	0,05	0,02	0,01	0,02	0,05	0,02	0,00	0,02	0,04
Phosphore	mg L ⁻¹	0,03	0,03	0,01	0,16	0,02	0,01	0,01	0,05	0,03	0,03	0,01	0,18

4.1.2 Rivière Loue

D'après le Tableau 4-2, les concentrations en ammonium sont significativement plus élevées en aval proche, ce qui montre un impact de la STEP sur ce paramètre. Toutefois, dès l'aval lointain les concentrations sont similaires à l'amont. Les valeurs moyennes de pH, oxygène, nitrites, nitrates, DBO₅, phosphore et phosphates présentent des valeurs similaires entre les stations amont et aval, ce qui suggère que la STEP n'a pas d'impact sur la variation de ces paramètres. Les valeurs moyennes de conductivité, COD et COT sont un peu plus élevées aux stations aval mais ne sont pas statistiquement différentes. Enfin, les concentrations moyennes de MEST, MESO et DCO apparaissent très variables.

L'ACP réalisée sur les concentrations des différents paramètres mesurés au cours des campagnes d'échantillonnage est représentée sur la Figure 4-3. Les trois premiers axes permettent d'expliquer 56,3 % de la variabilité des données. Nous utiliserons pour la suite de l'analyse les deux premiers axes (axe 1 et 2) qui expliquent 45 % de la variabilité des données. Les concentrations en COT, DCO, COD, phosphore et ammonium sont les plus expliqués par les deux axes. De plus l'analyse permet de mettre en évidence les corrélations suivantes :

Les concentrations élevées en COT, COD, DCO, MEST, MESO et phosphore sont corrélés à l'axe 1 et aux épisodes de crues. Les concentrations de DBO₅, d'ammonium, de nitrites et de phosphates (indicateurs de pollution organique d'origine domestique) sont corrélés à l'axe 2. Ainsi, l'axe 2 semble correspondre à l'impact de la STEP d'Ornans alors que l'axe 1 semble être en relation avec les variations induites à l'échelle du bassin versant, notamment en période de crues. La projection des individus sur les deux premiers axes selon les stations (Figure 4-4) ne permet pas de distinguer clairement de différences entre les groupes. La variabilité des descripteurs ne dépend pas des stations d'étude, cependant elle est influencée par le régime hydrique de la Loue. La Figure 4-4 montre une répartition des individus en fonction du débit de la Loue (étiage, débit moyen, crue). De plus, Les épisodes de crues correspondent avec les variations de concentrations maximales mesurées en COT, DCO, COD, phosphore, MEST et MESO.

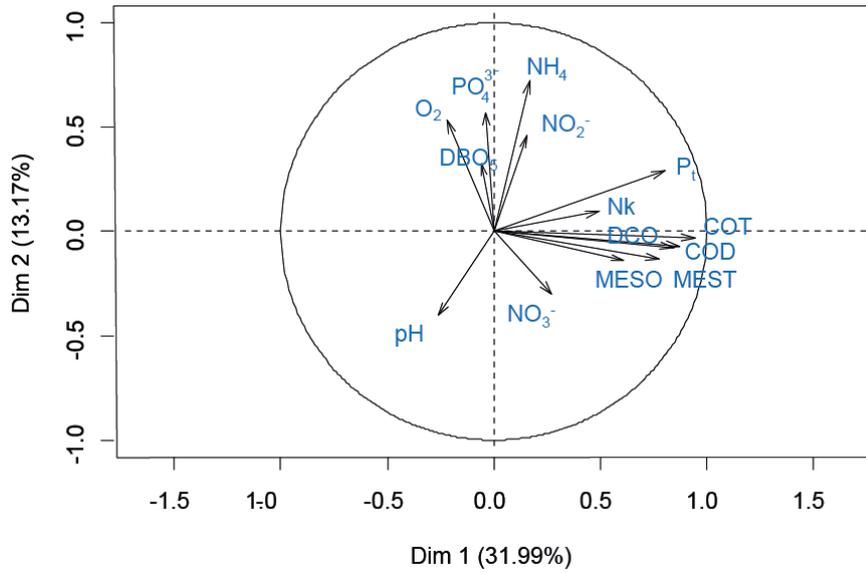


Figure 4-3 ACP (axes 1 et 2) : cercle de corrélation des paramètres mesurés dans les eaux de surface de la Loue

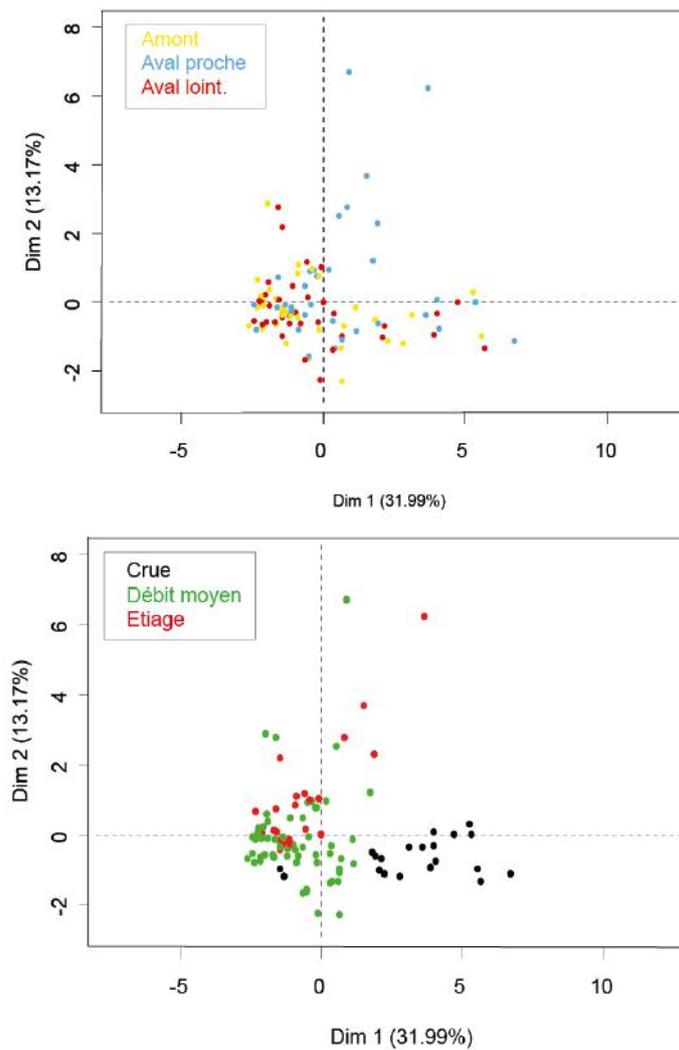


Figure 4-4 ACP : projections des échantillons de la Loue selon les débits et les saisons

Tableau 4-2 Moyenne (Moy), écart type (Et), valeur minimale (Min) et valeur maximale (Max) des concentrations des variables mesurées au cours des campagnes d'échantillonnage dans la Loue (n=28 pour chaque station). Les différences significatives entre les stations amont et aval proche sont indiquées par «*», (Anova ou test de Kruskal Wallis, $p < 0,05$)

Variable	Unité	Amont				Aval proche				Aval lointain			
		Moy	Et	Min	Max	Moy	Et	Min	Max	Moy	Et	Min	Max
Ammonium*	mg L ⁻¹	0,01	0,01	0,01	0,04	0,19	0,40	0,01	2,00	0,02	0,02	0,01	0,11
COD	mg C L ⁻¹	1,42	0,39	1,01	2,45	1,59	0,38	0,99	2,53	1,44	0,41	0,96	2,48
Conductivité	µS cm ⁻¹	445	68	213	512	465	71	318	622	439	73	215	534
COT	mg C L ⁻¹	1,54	0,59	0,01	2,79	1,82	0,57	1,00	2,92	1,57	0,54	0,98	2,79
DBO5	mg O2 L ⁻¹	1,39	0,76	0,50	3,90	1,33	0,74	0,50	3,60	1,27	0,77	0,50	3,10
DCO	mg C L ⁻¹	4,48	2,85	2,00	12,40	5,64	3,02	2,00	14,40	4,54	2,74	2,00	13,80
MESO	mg L ⁻¹	4,4	11,1	2,0	64,0	5,5	12,9	2,0	73,0	4,6	11,1	2,0	64,0
MEST	mg L ⁻¹	8,1	10,3	2,0	35,0	9,9	11,8	2,0	52,0	8,4	10,4	2,0	36,0
Nitrates	mg L ⁻¹	5,02	0,76	3,80	7,00	4,99	1,11	0,50	6,90	4,97	1,08	0,50	7,20
Nitrites*	mg L ⁻¹	0,02	0,02	0,01	0,12	0,04	0,05	0,01	0,30	0,02	0,02	0,01	0,11
Nk	mg L ⁻¹	1,50	1,34	6,80	1,00	1,37	0,69	3,90	1,00	1,25	0,95	6,60	1,00
Oxygène	mg L ⁻¹	10,66	1,10	7,89	12,12	10,56	1,02	8,43	11,95	10,58	1,14	8,11	12,10
pH		8,15	0,32	6,70	8,50	8,16	0,30	7,00	8,50	8,15	0,37	6,70	8,40
Phosphates*	mg L ⁻¹	0,04	0,08	0,02	0,50	0,06	0,07	0,02	0,37	0,04	0,08	0,02	0,51
Phosphore*	mg L ⁻¹	0,03	0,03	0,01	0,15	0,06	0,05	0,01	0,19	0,04	0,03	0,01	0,13

4.1.3 Comparaison des échantillons prélevés dans le Doubs et dans la Loue

La comparaison des valeurs moyennes montrent des concentrations en COD, DCO et COT significativement plus élevées dans le Doubs que dans la Loue (Tableau 4-3) ; A l'inverse, les concentrations en nitrates sont significativement plus élevées dans les échantillons prélevés dans la Loue.

Tableau 4-3 Valeurs moyennes des différents paramètres mesurés dans le Doubs (n=84) et dans la Loue (n=84), Les différences significatives entre les stations amont et aval proche sont indiquées par «* », (Anova ou test de Kruskal Wallis, $p < 0,05$)

Variable		Doubs		Loue	
		Moyenne	Et	Moyenne	Et
Ammonium	mg L ⁻¹	0,04	0,06	0,08	0,14
COD*	mg C L ⁻¹	2,34	0,34	1,49	0,39
Conductivité	μS cm ⁻¹	382	57	450	71
COT*	mg C L ⁻¹	2,44	0,41	1,64	0,56
DBO5	mg O ₂ L ⁻¹	1,63	0,78	1,33	0,76
DCO*	mg C L ⁻¹	7,02	2,60	4,88	2,87
MESO	mg L ⁻¹	2,20	0,74	4,84	11,70
MEST	mg L ⁻¹	4,37	5,12	8,79	10,82
Nitrates*	mg L ⁻¹	2,58	0,62	4,99	0,98
Nitrites	mg L ⁻¹	0,02	0,02	0,02	0,03
Nk	mg L ⁻¹	1,35	1,04	1,38	0,99
Oxygène	mg L ⁻¹	10,35	1,61	10,60	1,09
pH		8,22	0,37	8,15	0,33
Phosphates	mg L ⁻¹	0,02	0,01	0,05	0,08
Phosphore	mg L ⁻¹	0,02	0,02	0,04	0,03

Une ACP sur les échantillons d'eau de surface du Doubs et de la Loue a été réalisée avec les mêmes variables que les précédentes analyses. Les deux premiers axes (axe 1 et 2) expliquent 41,9 % de la variabilité des paramètres (Figure 4-5). La projection des échantillons sur les deux axes montre des différences de concentrations des descripteurs mesurés dans le Doubs et dans la Loue (Figure 4-6). L'analyse montre que les concentrations en DCO, COT et COD sont corrélés et que ce sont les échantillons prélevés dans le Doubs qui correspondent aux valeurs maximales. Alors que les échantillons prélevés dans la Loue correspondent à des concentrations élevées en MEST, MESO et phosphore, ainsi que des teneurs élevées en nitrates et phosphates.

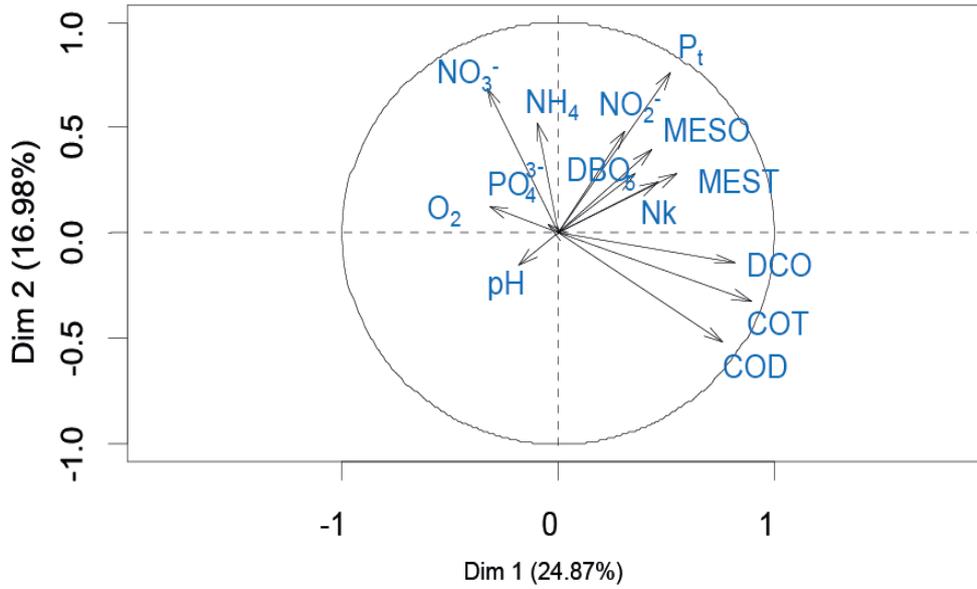


Figure 4-5 ACP (axes 1 et 2) : cercle de corrélation des paramètres mesurés dans les eaux de surface du Doubs et de la Loue

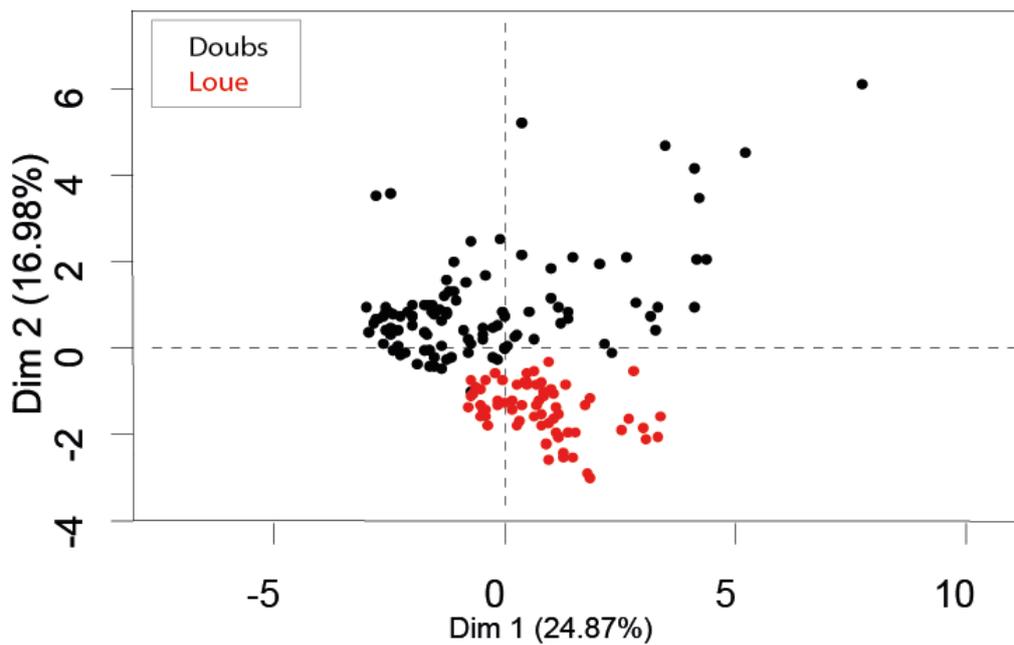


Figure 4-6 ACP : projections des échantillons du Doubs et de la Loue

4.2 Rejets de STEP

Dans cette partie, nous avons analysé les concentrations des mêmes paramètres dans les échantillons de rejets des STEP de Doubs et d'Ornans prélevés au cours des mêmes campagnes d'échantillonnage. Nous avons intégré en outre les débits des rejets de STEP en tant que variable quantitative.

4.2.1 STEP de Pontarlier

Une ACP des échantillons du rejet de la STEP de Pontarlier sur les différents descripteurs a été réalisée. L'analyse montre que les deux premiers axes expliquent 53 % de la variabilité des paramètres (Figure 4-8). On observe que les valeurs de COT, COD, DCO, phosphore et Nk sont corrélés positivement à l'axe 1, et sont indépendantes des concentrations en MEST et MESO. De plus, les nitrates sont anti corrélés aux valeurs de débit du rejet. La projection des échantillons selon les saisons de prélèvements montre que les échantillons prélevés en période estivale sont anti corrélés aux concentrations maximales de MEST et MESO et que seulement quelques échantillons prélevés en hiver correspondent à des fortes concentrations COT, COD et conductivité. Ainsi il semble que l'augmentation du débit du rejet entraîne une diminution des concentrations en nitrates et phosphates par effet de dilution, et que les concentrations en MES soient plus faibles en été (Figure 4-8). La projection des échantillons selon le régime hydrologique du Doubs n'a pas montré d'influence des débits du Doubs sur les variations des descripteurs dans les rejets.

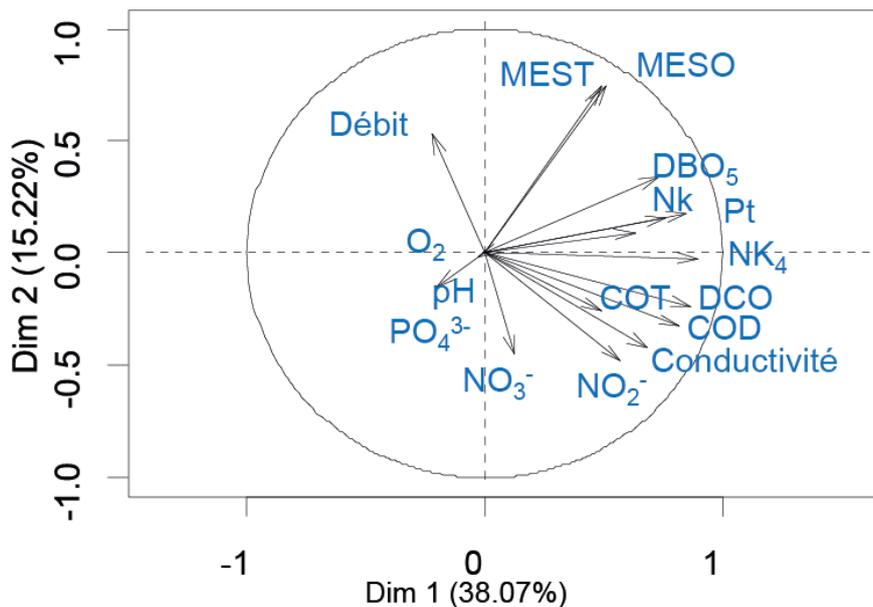


Figure 4-7 ACP (axes 1 et 2) : cercle de corrélation des paramètres mesurés dans les effluents de la STEP de Pontarlier

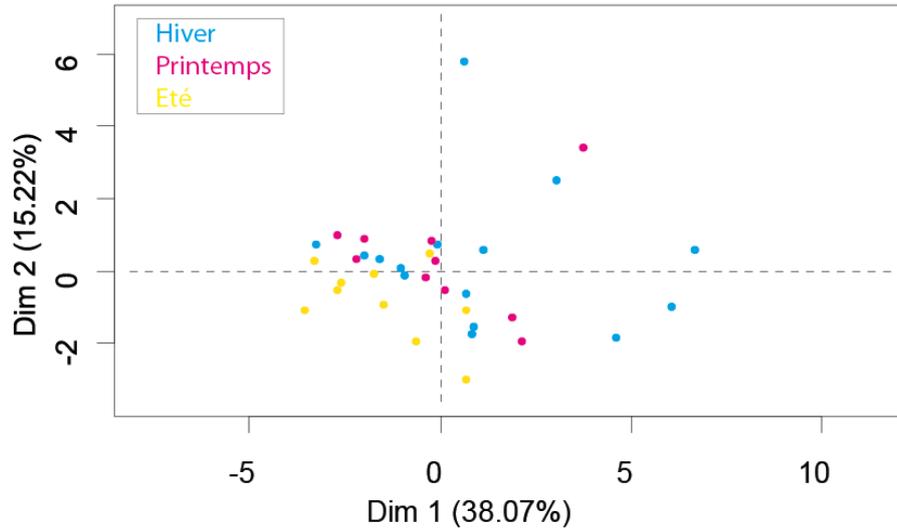


Figure 4-8 ACP : projections des échantillons de l'effluent de la STEP de Pontarlier selon les saisons

4.2.2 STEP d'Ornans

Une ACP des échantillons prélevés dans le rejet de la STEP d'Ornans sur les différents paramètres a été réalisée (Figure 4-9). L'analyse montre que les deux premiers axes expliquent 49 % de la variabilité des descripteurs. On observe que la conductivité et les concentrations en COT, COD, DCO, DBO5, ammonium et Nk sont corrélés à l'axe 1. Ce groupe de paramètres est aussi anti corrélé aux teneurs en phosphates et au débit. Les teneurs en MEST, MESO, phosphore, nitrates et nitrites sont corrélées et indépendantes des autres groupes de variables. La Figure 4-10 présente la répartition des échantillons selon le régime hydrologique de la Loue au moment où ils ont été prélevés. Ainsi, les épisodes crue de la Loue correspondent à des valeurs élevées de débit du rejet et de phosphates. A l'inverse, les valeurs maximales de COT, COD et de conductivité sont plutôt observées lorsque les débits du rejet et de la Loue sont faibles. Enfin, les concentrations en MES, phosphore et nitrates dans le rejet semblent indépendantes des valeurs de débits du rejet et de la Loue.

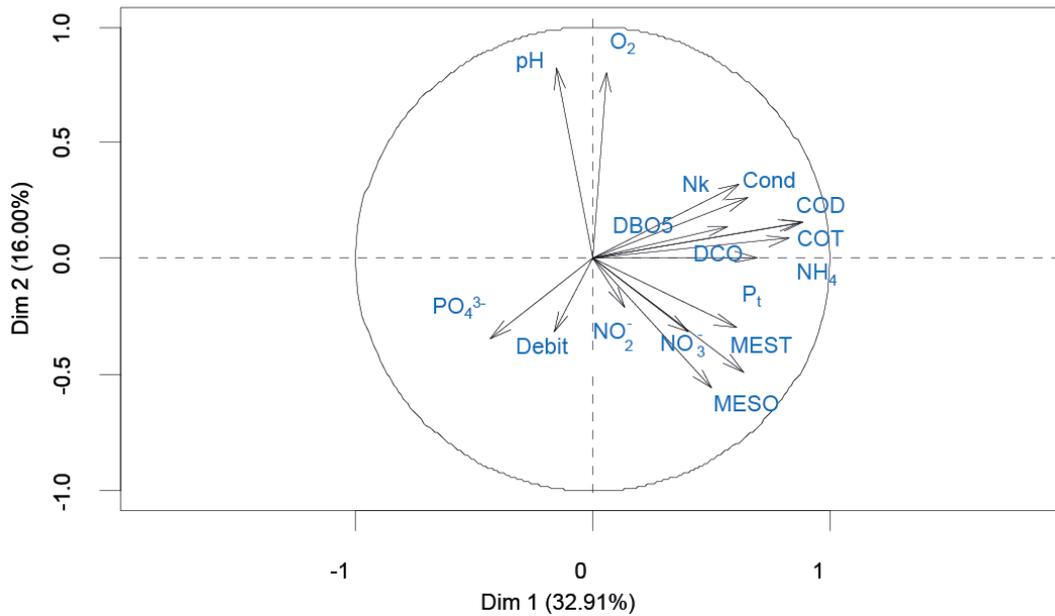


Figure 4-9 ACP (axes 1 et 2) : cercle de corrélation des paramètres mesurés dans les effluents de la STEP d'Ormans

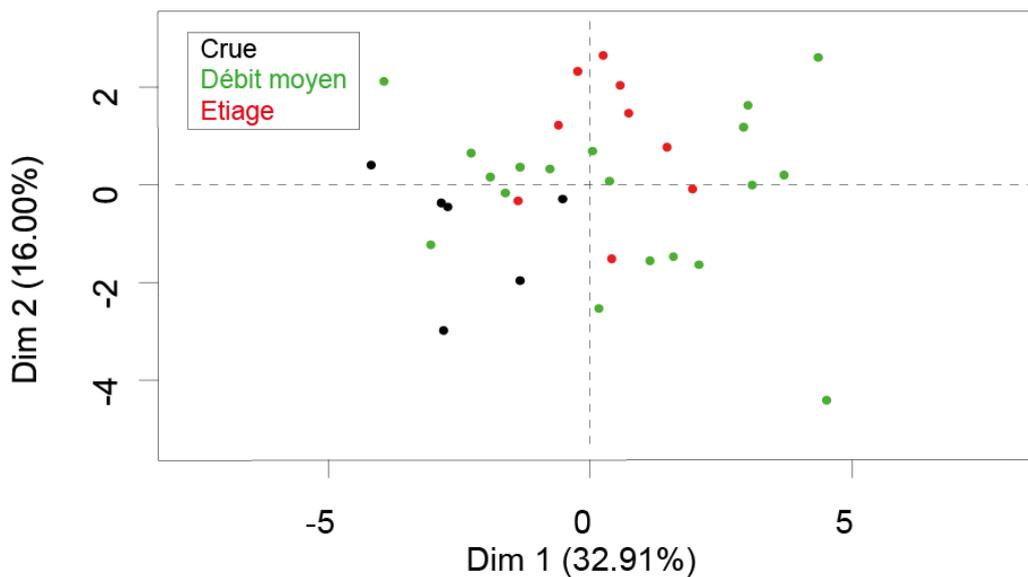


Figure 4-10 ACP : projections des échantillons de l'effluent de la STEP d'Ormans selon le débit de la Loue

4.2.3 Comparaison du rejet du Doubs et de la Loue

Une ACP des échantillons du rejet de la STEP de Doubs et d'Ormans sur les différents paramètres a été réalisée. Les deux premiers axes expliquent 56 % de la variabilité des descripteurs. D'après la Figure 4-121, les concentrations en phosphates, nitrates et phosphore sont anti corrélées aux valeurs de débit et indépendantes des concentrations en MESO et MEST. La

projection des échantillons selon leur origine permet de mettre en évidence que la STEP de Doubs est caractérisée par un débit de rejet plus élevé que celui d'Ornans et que le rejet d'Ornans montre des concentrations en phosphates, nitrates et phosphore significativement plus importantes que le rejet de la STEP de Doubs (Figure 4-12, Tableau 4-4). D'après ces résultats, on suppose que le rendement épuratoire de la STEP de Pontarlier est plus élevé que celui de la STEP d'Ornans.

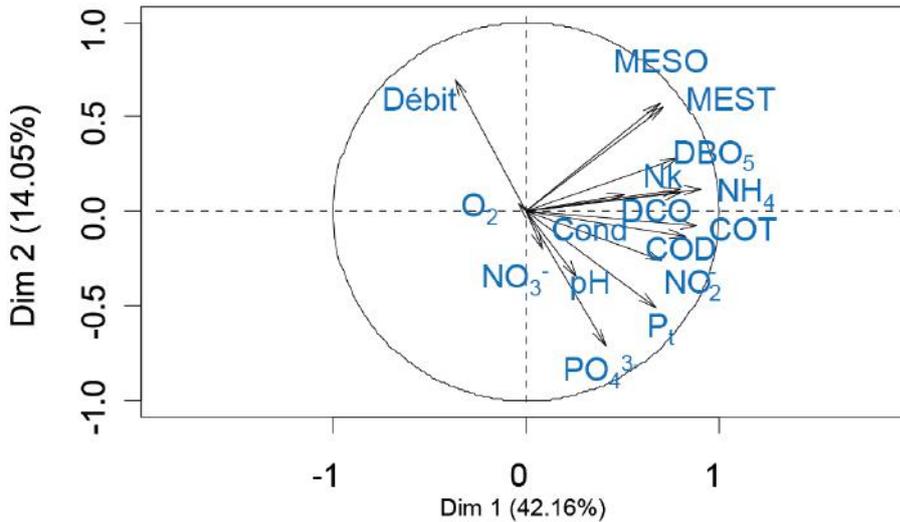


Figure 4-11 ACP (axes 1 et 2) : cercle de corrélation des paramètres mesurés dans les effluents de la STEP de Pontarlier et d'Ornans

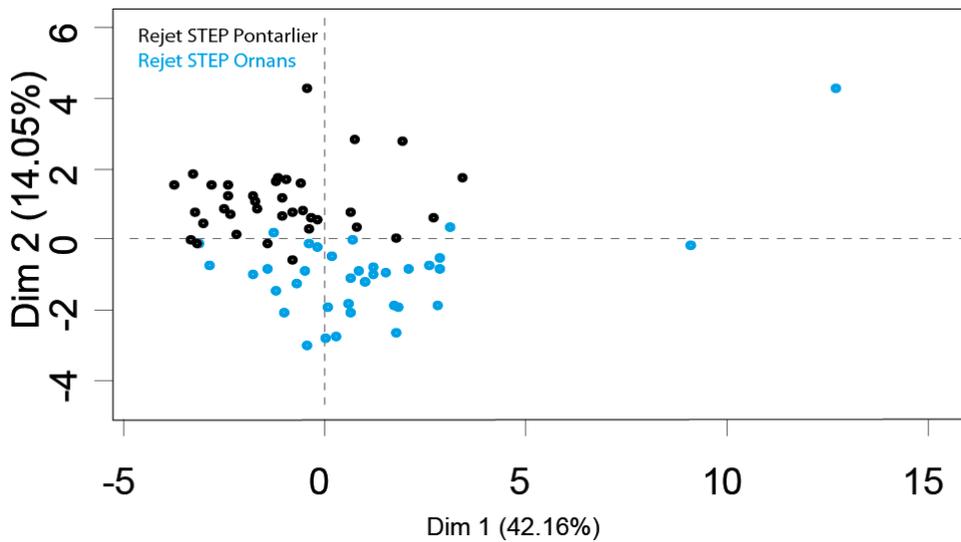


Figure 4-12 ACP : projections des échantillons des rejets de la STEP de Pontarlier et d'Ornans

Tableau 4-4 Moyenne (Moy), écart type (Et), valeur minimale (Min) et valeur maximale (Max) des concentrations des variables mesurées au cours des campagnes d'échantillonnage dans les rejets de la STEP de Doubs (n=28) et d'Ornans (n=28). Les différences significatives entre les stations amont et aval proche sont indiquées par «*», (Anova ou test de Kruskal wallis, $p < 0,05$)

	Variable	pH	Oxygène	Conductivité	COD*	COT*	DBO5	DCO*	MEST	MESO	Phosphore*	Phosphates *	Ammonium*	Nk*	Nitrites*	Nitrates
	Unité		mg L ⁻¹	μS cm ⁻¹	mg C L ⁻¹	mg C L ⁻¹	mg O ₂ L ⁻¹	mg C L ⁻¹	mg L ⁻¹							
STEP de Doubs	Moy	7,45	8,06	799	5,77	6,59	3,68	21,44	5,92	7,39	0,20	0,16	0,80	3,18	0,17	4,76
	Et	0,25	1,11	317	2,21	2,42	2,11	10,53	3,98	16,71	0,16	0,29	1,62	3,29	0,25	4,03
	Min	6,80	5,58	304	2,38	2,62	0,60	4,70	2,00	2,00	0,02	0,01	0,01	1,00	0,01	0,84
	Max	8,30	9,57	1530	9,96	10,80	9,70	59,00	17,00	99,00	0,82	1,07	6,40	18,00	1,00	17,00
STEP d'Ornans	Moy	7,63	7,98	776	7,28	8,34	4,53	26,29	5,61	4,56	0,70	1,27	3,93	6,75	0,54	8,46
	Et	0,25	1,97	212	2,81	3,16	3,07	13,57	5,51	4,68	0,34	0,79	7,01	7,22	0,43	10,14
	Min	7,30	4,12	410	1,63	1,70	0,50	5,00	2,00	2,00	0,02	0,02	0,01	28,50	0,01	0,62
	Max	8,40	11,38	1260	12,40	16,70	15,00	78,00	33,00	27,00	1,42	2,90	35,80	1,00	1,96	40,00

4.3 Estimation des flux

4.3.1 Rapport de dilution entre les débits de STEP et les débits de rivière

Le débit moyen du rejet de la STEP de Doubs ($0,090 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$) est en moyenne dix fois plus élevé que celui de la STEP d’Ornans ($0,009 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$) (Tableau 4-55). Toutefois les débits moyens du Doubs et de la Loue étant différents, il faut prendre en compte le facteur de dilution (Équation 3-1) du rejet dans le milieu récepteur.

Équation 3-1
$$Fd = \frac{Qe}{Qe+Qr}$$

Tableau 4-5 Débit moyen du Doubs, de la Loue et des rejets de STEP pendant la campagne d’échantillonnage (de décembre 2013 à juin 2015). Moyenne (\pm erreur standard)

	Doubs	Rejet STEP Doubs	Loue	Rejet STEP Ornans
Débit moyen $\text{m}^3 \text{ j}^{-1}$	7,5 (\pm 0,33)	0,090 (\pm 0,01)	22,3 (\pm 0,77)	0,009 (\pm 0,0002)
Facteur de dilution		0,012		0,0004

Les calculs de Fd montrent que le rejet de la STEP de Doubs dans le Doubs est 30 fois moins dilué que celui de la STEP d’Ornans dans la Loue. Ainsi, les débits de rejets de STEP et des cours d’eau étant différents, il est nécessaire de prendre en compte les flux dans les eaux de surface et dans les rejets.

4.3.2 Estimation des flux

Après avoir étudié les variations des différents paramètres dans les eaux de surface et dans les rejets, nous avons estimé les flux des principales substances dans les rejets de STEP ainsi que dans les eaux de Doubs et de la Loue à partir de la méthode DWC. Les flux de chaque descripteur ont été calculés à partir de leur concentration moyenne mesurée dans les échantillons collectés aux cours des campagnes de prélèvements et des débits moyens journaliers des rejets obtenus avec les données d’autosurveillance pondérés par le débit moyen annuel (Équation 3-2).

$$Flux\ annuel = K \frac{\sum_{i=1}^n C_i Q_i}{\sum_{i=1}^n Q_i} \bar{Q}$$

Dans les rejets de STEP, les flux annuels des paramètres sont 3 à 80 fois plus élevés pour la STEP de Pontarlier par rapport à la STEP d'Ornans. Cette différence s'explique principalement par un débit beaucoup plus élevé pour la STEP de Pontarlier (Tableau 4-6). Les flux des paramètres issus des rejets de la STEP d'Ornans sont très inférieurs aux flux dans la Loue, ce qui est en accord avec le taux de dilution très élevé du rejet. Les différences observées entre la station amont et aval sont principalement attribuables à la variabilité temporelle des concentrations des paramètres et des débits de la Loue. Bien que les flux des différents paramètres issus des STEP soient inférieurs aux flux dans les eaux de surface, il est possible qu'à certaines périodes notamment lors de dysfonctionnement de la STEP ou en étiage, les STEP contribuent à des flux plus importants. Dans le Doubs le facteur de dilution du rejet étant plus élevé, le rejet de la STEP peut contribuer de 2 à 70 % (MEST et ammonium respectivement) aux flux moyens estimés dans le Doubs en aval proche. Ces résultats montrent que les flux de matières carbonées, de nutriments et de MES dans la Loue sont principalement issus du bassin versant, alors que dans le Doubs, la STEP contribue à l'apport de matière carbonée et de MES. Cependant les flux de tous les paramètres étudiés (carbone, azote, phosphore et particulaire) sont en moyenne environ deux à cinq fois plus élevés dans la Loue que dans le Doubs.

Tableau 4-6 Flux moyens annuels en tonne an⁻¹ des différents paramètres dans les eaux du Doubs et de la Loue et dans les rejets des STEP de Doubs et d'Ornans

	Site de Doubs				Site d'Ornans			
	Amont	Rejet STEP	Aval p.	Aval loin.	Amont	Rejet STEP	Aval p.	Aval loin.
Ammonium	2	6	8	18	7	1	66	10
Azote total	298	27	318	226	1393	2	1493	1097
COD	514	33	527	558	903	2	997	919
COT	595	41	634	682	1199	2	1361	1209
DBO5	394	23	400	467	698	1	718	632
DCO	2145	144	1795	2166	3235	7	4413	3469
MESO	55	98	747	1005	3558	1	5031	3739
MEST	636	38	1587	2166	8294	2	9354	8284
Nk	167	21	189	102	634	2	764	328
Nitrates	571	25	561	543	3355	2	3194	3396
Nitrites	5	0,8	5	6	5	0,2	25	7
Phosphates	2	1,2	2	2	24	0,4	37	23
Phosphore	5	1,3	7	7	26	0,2	50	31

4.4 Analyse des mesures en continu de la conductivité et de la turbidité

Les sondes multiparamétriques installées en décembre 2014 en amont et en aval des STEP de Doubs et d'Ornans ont permis d'acquérir des données en continu des variations de conductivité indicatrice de la minéralisation du cours d'eau, et de turbidité indicatrice de la présence de substances biotiques ou abiotiques en suspension ou dissoute.

Dans le Doubs, au cours de la période du 1^{er} au 11 février 2015, suite à des problèmes techniques, les sondes n'ont pas mesuré et enregistré les données de conductivité et de turbidité. De même dans la Loue, où seulement la période du 12 décembre au 19 mai 2015 a été prise en compte.

4.4.1 Le Doubs

4.4.1.1 Conductivité

En amont et en aval de la STEP, la conductivité varie selon les saisons avec des valeurs plus élevées en hiver (405 à 446 $\mu\text{S cm}^{-1}$) et une diminution au printemps et en été (317 à 405 $\mu\text{S cm}^{-1}$) (Figure 4-13). En aval de la STEP, la conductivité est significativement plus élevée qu'en amont (Test t, $p < 0,05$) et particulièrement jusqu'en avril 2015. L'augmentation de la conductivité en amont peut être en partie attribuable aux flux d'azote et de phosphore rejeté par la STEP qui sont plus élevés en saison hivernale. Effectivement les basses températures peuvent diminuer l'activité bactérienne et la dégradation de l'azote organique. A cette période, l'augmentation de la conductivité peut être aussi en lien avec une augmentation des sels dissous, notamment les chlorures utilisés pour le salage des chaussées. Les variations de conductivité ne sont pas statistiquement corrélées avec le débit du Doubs (Spearman, $p > 0,05$). Au cours d'épisodes de forte crue (pic de débit) la conductivité diminue juste avant le pic de crue. Cette baisse de conductivité correspond à phénomène de dilution suite à l'augmentation du débit. Par ailleurs, la conductivité en amont est parfois supérieure à la station aval. Cette différence peut s'expliquer par l'influence en amont de rejets diffus ou ponctuels tels que les déversoirs d'orage qui introduisent des eaux usées non traitées dans le milieu.

4.4.1.2 Turbidité

En amont et en aval, la turbidité est significativement corrélée au débit du Doubs (Spearman, $p < 0,05$). De plus, au cours de la période étudiée la turbidité en aval de la STEP est significativement plus élevée qu'à l'amont, ce qui met en évidence un apport de matières dont une majorité de MES issues de la STEP dans le Doubs (Figure 4-13). Par ailleurs, pour les plus forts épisodes de crue, les pics de turbidité en amont et en aval ont lieu juste avant les pics de débit

indiquant un lessivage rapide des particules issues du bassin versant en amont en lien avec les épisodes de pluie. Ensuite, la turbidité ou les concentrations en MES diminuent rapidement par effet de dilution. A certaines périodes et notamment en février, les valeurs élevées de turbidité en aval témoignent de la présence de particules en fortes concentrations. Ce qui laisse supposer un apport plus important de flux de matière issu de la STEP.

4.4.2 Rivière Loue

4.4.2.1 Conductivité

La conductivité dans la Loue est en moyenne plus élevée en hiver (de 440 à 517 $\mu\text{S cm}^{-1}$) et diminue au printemps et en été (388 à 440 $\mu\text{S cm}^{-1}$) (Figure 4-14). Les données recueillies de décembre 2014 à mai 2015 montrent que la conductivité en aval proche est significativement plus élevée par rapport à l'amont (Test t, $p < 0,05$). La conductivité n'est pas corrélée au débit de la Loue, cependant on observe une faible diminution de la conductivité au cours d'épisodes de fortes crues.

4.4.2.2 Turbidité

Les valeurs de turbidité en amont et en aval de la STEP d'Ornans sont significativement corrélées au débit de la Loue (Spearman, $p < 0,05$) (Figure 4-14). Contrairement au Doubs, la turbidité augmente en même temps ou juste après l'augmentation du régime hydrologique. Ainsi les pics de turbidité qui correspondent aux plus fortes concentrations en MES correspondent aux débits les plus élevés. Même si la turbidité est en moyenne supérieure en aval de la STEP, les variations de turbidité, c'est-à-dire des flux de MES sont principalement influencés par le régime hydrologique de la Loue et donc du fonctionnement global du bassin versant. La STEP d'Ornans est alors considérée comme une source ponctuelle.

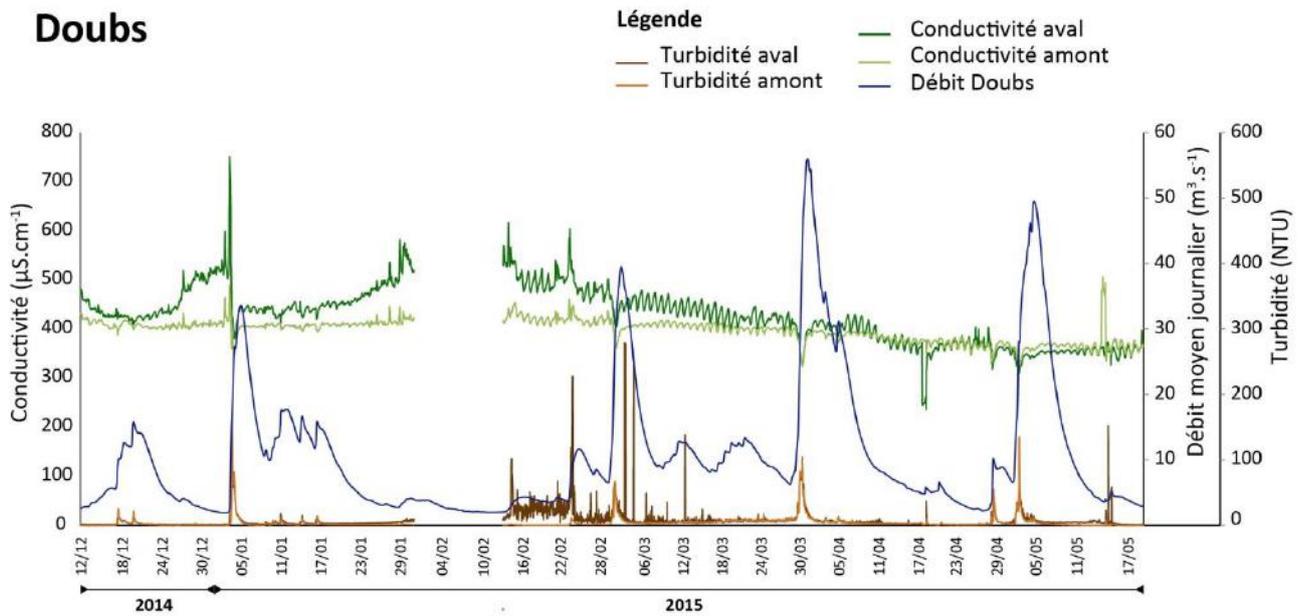


Figure 4-13 Conductivité et turbidité enregistrée par les sondes YSI en amont et en aval des STEP dans le Doubs et débit moyen journalier du Doubs

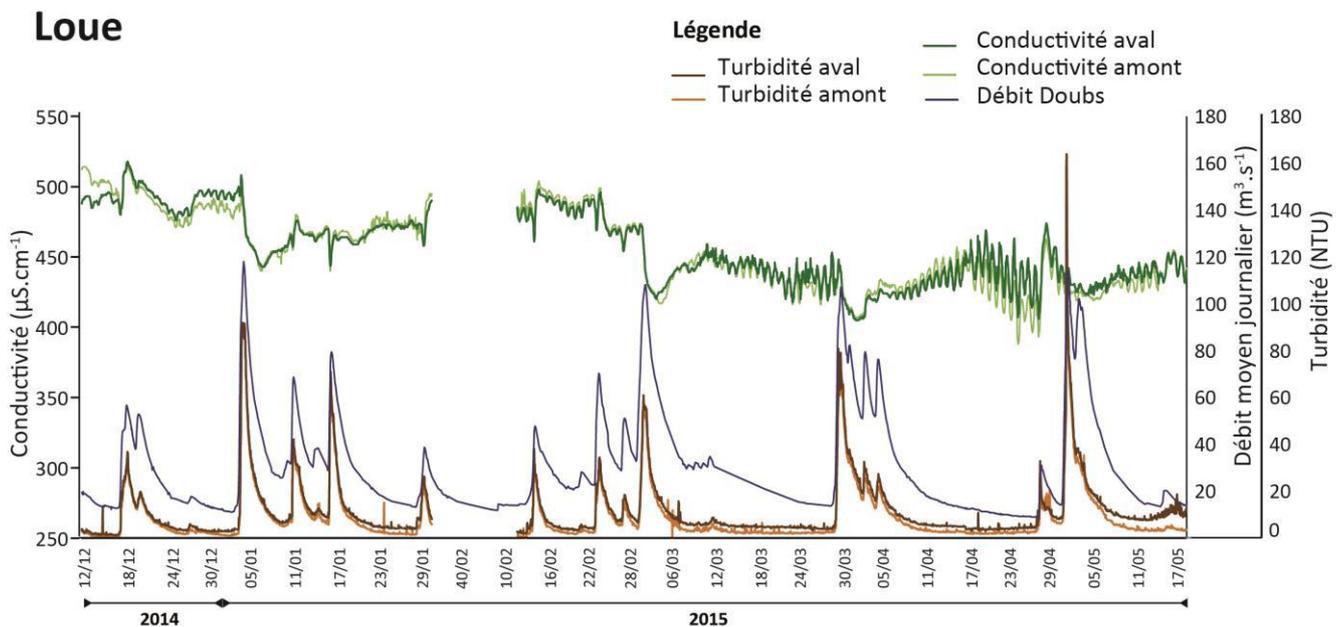


Figure 4-14 Conductivité et turbidité enregistrée par les sondes YSI en amont et en aval des STEP dans la Loue et débit moyen journalier de la Loue

4.4.2.3 Relation entre la turbidité et les concentrations en MES

Les concentrations et flux de MES peuvent être estimés par la mesure de turbidité dans le cours d'eau. A chaque mesure ponctuelle de concentration en MES correspond une valeur de turbidité enregistré par les sondes *in situ*. La relation entre les deux paramètres permettra de mettre en relation la turbidité et les MES, et ainsi de pouvoir estimer les flux de polluants. Dans le Doubs et dans la Loue, les concentrations de MES sont significativement et positivement corrélés aux valeurs de turbidité (Pearson, $p < 0,05$) (Figure 4-15).

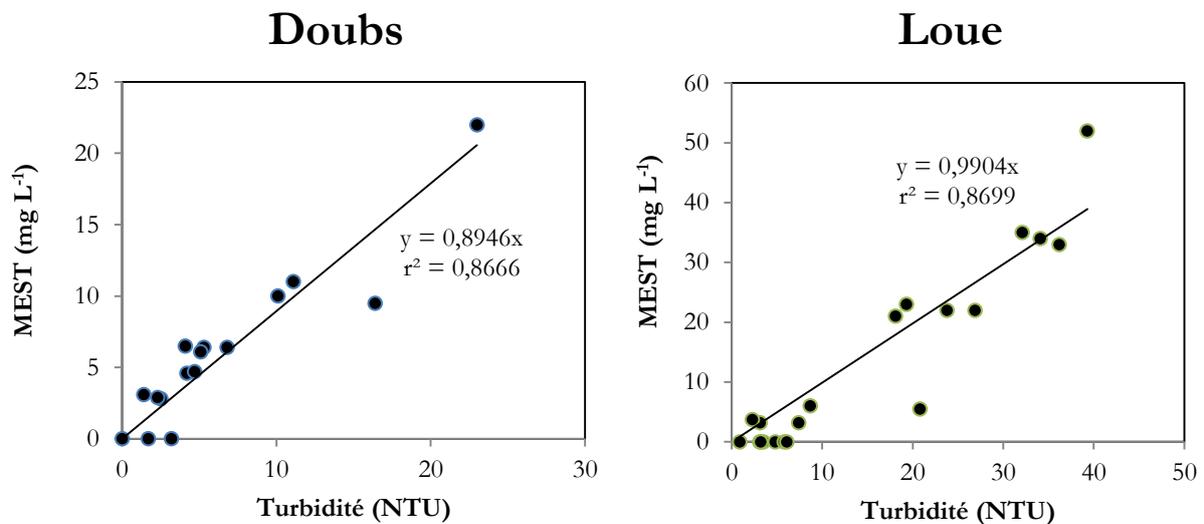


Figure 4-15 Corrélations entre les concentrations en MES mesurées dans les échantillons d'eau de surface, et les valeurs de turbidité enregistrées par les sondes correspondant aux prélèvements. Le « r^2 » correspond au coefficient de corrélation entre les deux variables.

Cependant, du fait du faible nombre de données récoltées (concentration de MES), ces résultats sont considérés comme préliminaires et nécessitent d'être complétés par d'autres campagnes d'échantillonnage afin de compléter la courbe de calibration. Par ailleurs l'estimation des concentrations de MES à partir de la mesure de la turbidité peut être affectée de nombreuses incertitudes liées à la forme, la composition et la taille des particules (Clifford et al. 1995). Néanmoins dans le cadre de cette thèse, nous utiliserons ces relations pour estimer à titre exploratoire les flux de polluants dans le Doubs et dans la Loue.

4.5 Conclusion

Globalement, d'après les mesures réalisées lors des campagnes de prélèvements ponctuels, nous avons mis en évidence des impacts des deux STEP sur les concentrations en ammonium dans le Doubs et dans la Loue. Toutefois, les STEP n'ont pas d'impacts pour tous les autres paramètres. Ces résultats montrent que les STEP ont vraisemblablement peu d'impact sur la variabilité des concentrations des différents paramètres qui sont principalement influencés par la variabilité saisonnière et hydrologique des cours d'eau. Cette hypothèse est en accord avec les résultats des analyses multivariées sur les concentrations des différents paramètres dont les variations sont principalement influencées par les débits et notamment pendant les crues. Ces variations sont dues aux variabilités saisonnières marquées par notamment des hivers longs, froids et souvent enneigés (étiages hivernaux), ainsi que des étés secs et chauds caractérisés par des étiages longs et des épisodes orageux intenses. En effet, les crues sont généralement caractérisées par une remobilisation des éléments stockés dans la biomasse et dans les sédiments accumulés pendant les périodes d'étiage (Bowes et al. 2005). Toutefois les épisodes de crues entraînent aussi des déversements d'eau usées non traitées qui génèrent des pics de pollution.

L'étude des flux des différents paramètres montre de même une très faible contribution de la STEP d'Ornans sur la variabilité des flux dans la Loue. Du fait d'un rapport de dilution moins important, la STEP de Pontarlier peut contribuer de 1 à 70% des flux estimés dans le Doubs en aval de la STEP et participe à l'augmentation de la conductivité en aval.

Les flux d'éléments carbonés, de phosphore, d'azote et de MES circulant dans la Loue sont en moyenne deux à cinq fois plus élevés que dans le Doubs. En comparaison avec une étude menée sur les flux de phosphore et d'azote dans la Loue à Chencey Buillon (Chanez et al. 2014), les flux estimés de phosphore total et d'azote total dans la Loue sont inférieurs mais du même ordre de grandeur que les flux moyens estimés dans cette étude (40 à 100 t an⁻¹ de phosphore total et 3700 t an⁻¹ d'azote total). Les mêmes tendances sont observées si l'on rapporte les flux à la surface topographique du bassin versant : les flux moyens estimés d'azote et de phosphore dans la Loue à Ornans (3,4 kg N ha⁻¹ an⁻¹ et 0,09 kg P ha⁻¹ an⁻¹) sont aussi inférieurs aux flux moyens estimés à Chenecey Buillon (22 kg N ha⁻¹ an⁻¹ et 0,5 kg P ha⁻¹ an⁻¹). Les différences observées sont principalement dues aux apports du bassin versant plus importants à Chenecey Buillon où la surface topographique du bassin versant est presque deux fois plus grande (1074 km²) par rapport à Ornans (392 km²). Une autre étude menée sur deux bassins versant du lac du Bourget (France) a estimé d'importants flux de phosphore (2 kg P ha⁻¹ an⁻¹) et de nitrates (19 kg N ha⁻¹ an⁻¹) dans un bassin versant agricole, témoignant d'une pression agricole non négligeable et des

régimes de fertilisations relativement importants (Pezet 2014). Cette étude a aussi estimé des flux de phosphore plus faibles ($1,1 \text{ kg P ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) dans un bassin versant peri-urbain par rapport au bassin versant agricole, dont plus de 40% des émissions sont attribuables à des sources ponctuelles. Les flux de phosphore estimés sur la Loue et sur le Doubs sont comparables à des flux dans des zones naturelles non perturbées (Pezet 2014).

Ces résultats montrent que les STEP contribuent de façon variables aux flux de matière et de nutriments dans le Doubs et dans la Loue. Néanmoins, les résultats de cette étude ne reflètent que les flux de la STEP d'Ornans et qu'une partie des variabilités de concentrations des descripteurs car ils ne reflètent que des concentrations instantanées. De ce fait, en omettant des événements particuliers tels que des pics de pollution par exemple, l'analyse des résultats peut sous-estimer les impacts de STEP.

Enfin, il conviendrait d'intégrer plus de campagnes de prélèvements reflétant des conditions hydrologiques particulières telles que de longs étiages estivaux et hivernaux qui n'ont pas eu lieu pendant la période d'échantillonnage. Afin de palier à ces lacunes, des sondes multiparamétriques mesurant et enregistrant en continu ont donc été installées. Ainsi, les données obtenues de décembre 2014 à juin 2015 ont permis de mettre en évidence des valeurs de conductivité et de turbidité significativement plus élevées en aval des deux STEP dans le Doubs et dans la Loue.

5 Chapitre 2 : Etude de l'impact des STEP sur la contamination en résidus médicamenteux dans le Doubs et dans la Loue

La présence de résidus médicamenteux dans les écosystèmes aquatiques suscite depuis de nombreuses années des inquiétudes croissantes du fait de leurs effets potentiels sur les organismes non cibles et sur la santé humaine. Cette étude dresse un premier bilan de l'état de la contamination en résidus médicamenteux des deux principales STEP et plus importants cours d'eau du bassin versant karstique du Haut-Doubs et de la Haute-Loue.

L'objectif de chapitre est :

- d'étudier la contamination en résidus médicamenteux dans les rejets de STEP de Doubs et d'Ornans
- d'évaluer leurs impacts sur la contamination des eaux du Doubs et de la Loue
- d'analyser les sources de contaminations dans le bassin versant

Résumé de l'article soumis (en révision) dans le journal *Environmental Sciences and Pollution Research* (2016)

Dans cette étude, nous avons analysés 31 substances pharmaceutiques dans les rejets de STEP ainsi que dans les eaux du Doubs et de la Loue en amont et en aval des STEP. Les molécules ayant les concentrations les plus élevées dans les rejets de STEP de Doubs et d'Ornans sont respectivement : le diclofenac (965 and 2,476 ng L⁻¹), le sulfaméthoxazole (655 and 1,380 ng L⁻¹) et la carbamazépine (566 and 1,007 ng L⁻¹). Les concentrations de diclofenac étaient également les plus élevées dans le Doubs et dans la Loue (respectivement 300 and 166 ng L⁻¹), suivis du paracétamol (273 and 158 ng L⁻¹) et du sulfaméthoxazole (126 and 73 ng L⁻¹). De plus pour une majorité de substances, les plus fortes concentrations ont été mesurés en aval des STEP, ce qui permet de considérer les rejets de STEP comme principale source de contamination de résidus médicamenteux dans les eaux du Doubs et de la Loue. Cependant certaines molécules mesurées à des concentrations plus élevées en amont de la STEP témoignent de l'impact d'autres sources de contaminations telles que des rejets domestiques non raccordés aux réseaux, ainsi que de rejets liés aux activités de pâturage et d'épandage existant sur le bassin versant. Par ailleurs, cette étude a montré que malgré une faible densité de population vivant sur le bassin versant, les concentrations mesurées sont du même ordre de grandeur que d'importantes agglomérations urbaines. Enfin l'évaluation des risques a mis en évidence que les antibiotiques sulfaméthoxazole (QR de 23,7 à 51,1) et l'ofloxacine (QR de 1,1 à 18,9) présente le risque le plus élevé pour les organismes aquatiques.

Occurrence of pharmaceuticals in WWTP effluents and their impact in a karstic rural catchment of Eastern France

Axelle Chiffre¹, François Degiorgi¹, Audrey Buleté², Loïc Spinner², Pierre-Marie Badot¹

¹ University of Bourgogne Franche-Comté, Chrono-environnement, UMR 6249 UFC/CNRS usc INRA, 16 route de Gray, 25030 Besançon cedex, France

² University of Lyon, Institut des Sciences Analytiques, UMR 5280, CNRS, 5 rue de la Doua, 69100 Villeurbanne, France

Abstract

The occurrence of pharmaceuticals in freshwater ecosystems provokes increasing concern due to their potential risk to non-target organisms and to human health. Pharmaceuticals are used in both human and veterinary medicine and are essentially released into the environment via wastewater treatment plants (WWTP) and from livestock. In this study, 31 pharmaceuticals were analyzed in effluent and surface water upstream and downstream of two WWTPs in the Loue – Doubs rural karstic catchment in Eastern France. Diclofenac (965 and 2,476 ng L⁻¹), sulfamethoxazole (655 and 1,380 ng L⁻¹) and carbamazepine (566 and 1,007 ng L⁻¹) displayed the highest levels in the effluents of both WWTP. Diclofenac levels were also high in surface water samples 300 and 166 ng L⁻¹ in the River Doubs and the River Loue respectively, followed by paracetamol (273 and 158 ng L⁻¹) and sulfamethoxazole (126 and 73 ng L⁻¹). In both rivers, the most critical compounds were found to be the antibiotic sulfamethoxazole (RQ from 23.7 to 51.1) and ofloxacin (RQ from 1.1 to 18.9) which reached levels inducing toxic effects in aquatic organisms. This study showed that WWTP effluents are the major sources of the pharmaceuticals, but raw discharge from human residences, pastures and livestock manure represent significant sources of contamination of surface water and groundwater. The aim of this study was to assist scientists and authorities in understanding occurrence and sources of pharmaceuticals in order to improve water quality management in chalk streams.

Keywords: pharmaceuticals, chalk streams, WWTP, veterinary use, risk assessment

5.1 Introduction

About 4,000 pharmaceuticals including antibiotics, lipid regulators, beta-blockers and antidepressants are currently consumed by humans in the European Union. France is the fourth largest consumer of human pharmaceuticals in the world with over €26.8 billion spent on prescription drugs in 2013 (ANSM 2014). It is also the largest consumer of veterinary compounds in the European Union with more than 300 veterinary pharmaceuticals like antibiotics, antiparasitics and hormones (Kools et

al. 2008). From the large number of molecules available, several compounds (antibiotics, anti-inflammatories) are used in both human and veterinary medicine.

Once administered, pharmaceuticals are only partially metabolized by the human body and are excreted as parent compounds or as a mixture with metabolites which find their way into the water cycle (Jjemba 2006). Most municipal wastewater treatment plants are unable to totally eliminate either parent or metabolized pharmaceuticals from wastewaters (Joss et al. 2006; Verlicchi et al. 2012). Removal efficiency depends on the treatment process used and on the chemical and physical properties of the various pharmaceuticals (Kasprzyk-Hordern et al. 2009 ; Luo et al. 2014; Patrolecco et al. 2014). Therefore, WWTPs are considered to be the principal source of pharmaceuticals in aquatic ecosystems (Kolpin et al. 2002; Choi et al. 2008 ; Conley et al. 2008). However, besides human input via wastewater, livestock production has been recognized as a major source of contamination (Kemper 2008; Bártíková et al. 2016). In addition, a recent study conducted in Spain showed that average concentrations of pharmaceuticals were positively related to the population density and the livestock units (Osorio et al. 2016). Veterinary pharmaceuticals are released into the environment through the excretion of drugs and/or their metabolites in urine and faeces of livestock, the discharge of aquaculture products or the spreading of manure and slurry from treated animals (Boxall et al. 2003; Kümmerer 2009; Iglesias et al. 2013).

Due to the risks for aquatic life, attention is now being paid to the occurrence of pharmaceuticals in the environment worldwide. Monitoring of pharmaceuticals in aquatic ecosystems was recognized in European Union in the Water Framework Directive (Directive 2000/60/EC) with the addition of three compounds (17α -ethinylestradio, 17β -estradiol, diclofenac) to the watch list of substances. However, studies have reported the occurrence of more than a hundred pharmaceuticals at concentrations ranging from ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$ in municipal wastewater effluents (Al Aukidy et al. 2012; Patrolecco et al. 2014), surface water (Kasprzyk-Hordern et al. 2008; Kolpin et al. 2002; Conley et al. 2008) and groundwater (Fent et al. 2006).

Low levels of pharmaceuticals are known to exert short-term and long-term toxicity on non-target organisms in the aquatic environment depending on their biological effect and their bioavailability (Ferrari et al. 2003; Brooks et al. 2005; Boxall et al. 2004; Fent et al. 2006; Santos et al. 2010). For example, natural and synthetic hormones have been reported to cause adverse effects like feminization of fish in large rivers (Santos et al. 2010). Chronic toxicity trials performed on brown trout (*Salmo trutta f. fario*) showed cytological damage and a reduction of hematocrit values after 21 days of exposure to 0.5 g L^{-1} of diclofenac (Hoeger et al. 2005).

Despite increased knowledge about the occurrence of pharmaceuticals in France (Togola and Budzinski 2008; Vuillet and Cren-Olivé 2011) there are still little data available about the occurrence of

pharmaceuticals in specific areas like karstic rural catchments. Indeed, karstic groundwater systems are known to be highly vulnerable to contamination and many micropollutants from agriculture, livestock farming and private households, can be transported in conduits over long distances (Heinz et al. 2008 ; Einsiedl et al. 2010). In the study area (the French Jura mountains), the watershed is characterized by a thin layer of soil and a karstic geological formation with alternating large conduits and smaller fractures with two main chalk streams: the Rivers Doubs and Loue (Bichet and Campy 2008). These rivers are renowned for trout fishing and invertebrate diversity and density. Although the Loue river is still considered by national authorities (<http://www.rhone-mediterranee.eaufrance.fr>) as being in good ecological status, fish mortality and loss of macroinvertebrates has been occurring for several years (ONEMA et al. 2012). Furthermore, local authorities need to increase their knowledge about source and impact of pharmaceutical contamination in the catchment in order to improve water quality management.

The Loue-Doubs watershed is covered by agricultural and forest areas and population density is low. The agricultural areas are mainly composed of permanent grasslands used for dairy farming and production of protected designation of origin cheese. Considering the high rates of consumption of numerous pharmaceuticals in France and/or their potential eco-toxicological effects on aquatic communities, assessing risk requires additional data on the occurrence of pharmaceuticals in chalk streams situated in rural catchments and identifying the risk situation. The aims of this study were (1) to quantify 31 pharmaceuticals in the effluents of two WWTPs of the karstic Doubs-Loue catchment and in the receiving waters (2) to evaluate upstream and downstream levels in order to discriminate pollution sources and (3) to assess the risk for aquatic organisms by calculating the risk quotient of the main pharmaceuticals.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Study of area

The study was conducted in the Haut-Doubs Haute-Loue catchment (Eastern France) which drains an area of about 2320 km². The substratum of the watershed is dominated by limestone with many karst structures and large conduits (Bichet and Campy 2008). According to the agricultural census, the land used for agriculture in 2010 represented 860 km² mainly composed of pastures and grassland (94 %). This corresponds to 42 % of the catchment. Livestock is dominated by dairy cows for cheese production. In addition, about 84 % of the agricultural land receives amendments in the form of manure (53 %), a mixture of manure and pig slurry (46 %) and sludge from WWTP (1 %). Two

conventional activated sludge plants (WWTP A and WWTP B) discharge their effluent into the Rivers Doubs and the Loue respectively and were monitored in this study (Figure 5-1).

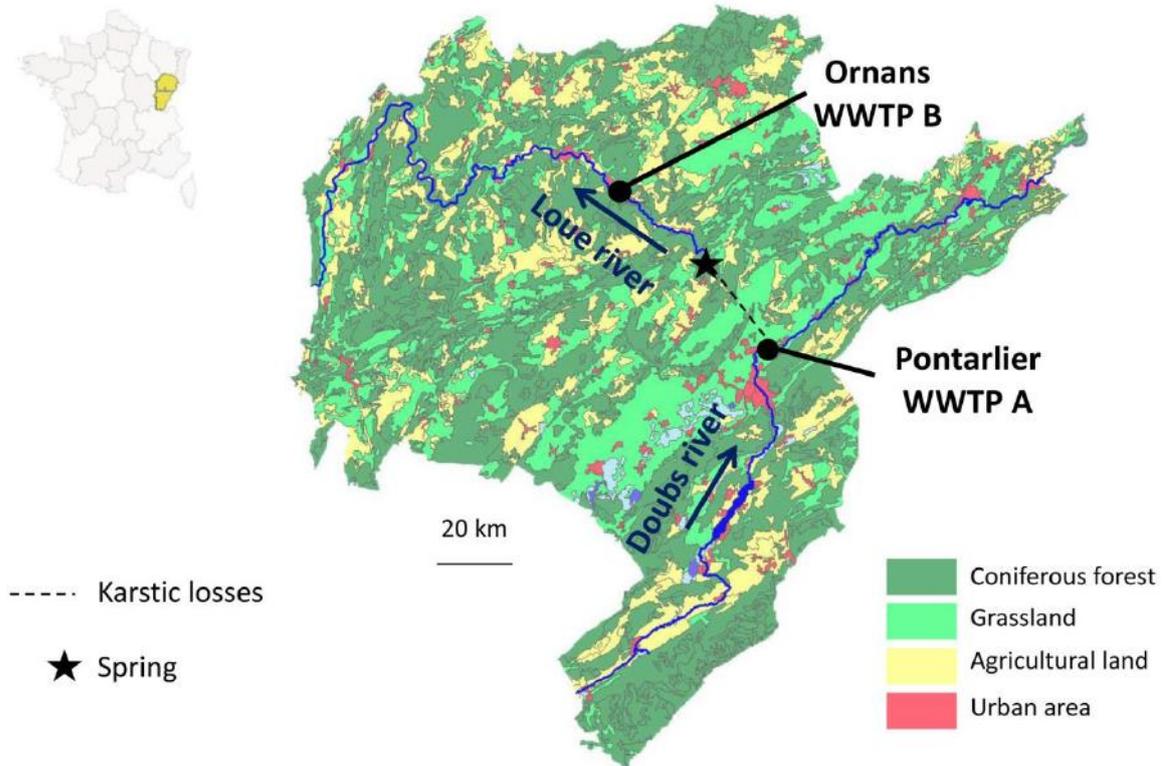


Figure 5-1 Location of sampling site indicating land use

Water of the River Doubs was sampled upstream and downstream of WWTP A which treats domestic and industrial wastewater of the town of Pontarlier and its agglomeration of 55,000 people equivalent (PE). In the Loue river water were sampled upstream and downstream of the WWTP B which collects wastewater from the town of Ornans (5,000 PE). Characteristics of each WWTP are summarised in Tableau 5-1. We also sampled the karst spring of the Loue river which mainly corresponds to losses from the Doubs river downstream of the WWTP A (Jacquemin 1984). Sampling was carried out in April 2014 and in May 2015 in the River Doubs and in March 2014 and May 2015 in the River Loue. Effluent and river discharge were relatively constant during both sampling campaigns. The daily average flow velocity of WWTP A and WWTP B discharge were respectively $14,900 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$ and $505 \text{ m}^3 \text{ j}^{-1}$. The daily mean flow rates were 2.38 and $3.06 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ in the River Doubs and 11.5 and $11.2 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ in the River Loue for the first and the second campaigns respectively. In each campaign, grab surface water subsamples were collected upstream ($n=6$) and downstream ($n=6$) of both WWTP discharges and in the River Loue spring ($n=6$). Precisely in each site two replicates of 1 liter water

samples were taken at three points along the channel transects in order to reduce spatial variability. Subsamples of river water and effluent were mixed and then putted in three 2-liter amber glass flasks. For effluents, we collected several grab samples ($n=6$) in 1-liter glass bottle which were mixed and putted in three 2-liter amber glass flasks. All bottles were previously cleaned with hydrochloric acid and ultrapure water. All the samples were immediately refrigerated and kept at 4°C until analysis. Well mixing of effluents in surface water were verified by measuring electric conductivity upstream and downstream of the WWTP (Supporting information).

Tableau 5-1 Characteristics of both WWTP

	WWTP A	WWTP B
People equivalent	55000	5000
Effluent flow rate ($m^3 j^{-1}$)	20800	430
Sewer	Combined sewer system	Combined sewer system
Treatment	Activated sludge:	Activated sludge
	- Primary treatment	- Primary treatment
	- Secondary aerobic treatment	- Secondary aerobic treatment
	- dephosphatation	- dephosphatation
Biological reactor (m^3)	6550	900
HRT (hours)	181	40
SRT (days)	19	14
Type of sewage	Domestic / industrial	Domestic / industrial
Effluent daily discharge flow rate ($m^3 j^{-1}$) for the first campaign	7618	702
Effluent daily discharge flow rate ($m^3 j^{-1}$) for the second campaign	7640	505
Dilution rate in river (%) for the first campaign	3	0.1
Dilution rate in river (%) for the second campaign	2	0.1

5.2.2 Compounds

The compounds selected for study belong to different drug families: antibiotics, anti-convulsants, anti-inflammatories, fungicides, hormones, lipid regulators, psychotropics and β -blockers

(Tableau 5-2). The choice of these compounds was based upon their occurrence in previous environmental surveys and their toxicities.

Tableau 5-2 List of the pharmaceuticals analyzed classified by their therapeutic activity, identification number (CAS); annual consumption in France; veterinary use and approved or not approved in France. All human pharmaceuticals use are approved in France.

Class	Compound	CAS number	Annual consumption kg in France (ANSM 2014)	Use or origin
Antibiotic	Ciprofloxacin	85721-33-1	12186	H / V ¹
	Ofloxacin	82419-36-1	4137	H / V ^b
	Roxithromycin	80214-83-1	3404	H / V ^b
	Sulfamethoxazole	723-46-6	16730	H / V ^a
	Trimethoprim	738-70-5	3346	H / V ^a
Anticonvulsant	Carbamazepine	298-46-4	33514	H
Anti-inflammatory	Diclofenac	15307-86-5	39000	H
	Ibuprofen	15687-27-1	240024	H
	Ketoprofen	22071-15-4	21697	H / V ^a
	Naproxen	22204-53-1	37332	H
	Paracetamol	103-90-2	3303077	H / V ^a
Antiparasitic	Metronidazole	443-48-1	36545	H / V ^a
Diuretic	Furosemide	54-31-9	21288	H / V ^a
Fungicide	Econazole	27220-47-9		H
Hormone	α estradiol	57-63-6		H
	Androstenedione	63-05-8		H
	β estradiol	50-28-2		H
	Estriol	50-27-1		H
	Estrone	53-16-7		H / V
	Gestodene	60282-87-3		H
	Levonorgestrel	17489-40-6		H
	Norethindrone	68-22-4		H
	Progesterone	57-83-0		H / V
	Testosterone	58-22-0		H / V
	Lipid regulator	Fenofibrate	49562-28-9	86000
Bezafibrate		41859-67-0	20852	H
Psychotropic	Fluvoxamine	54739-18-3		H
	Lorazepam	846-49-1		H
	Oxazepam	604-75-1	6195	H
β -blocker	Atenolol	29122-68-7	18337	H
	Propranolol	4199-09-1		H

5.2.3 Analysis

Analytical methods were adapted from Vulliet and Cren-Olivé (2011) for pharmaceuticals and hormones. These analytical methods were evaluated with the appropriate matrix (e.g. effluent and surface water), resulting in an updated Limit of Detection (LD) and Limit of Quantification (LQ).

Recoveries were between 60 and 120%. Regarding the pollutants analyzed, two different analytical procedures were used for the different pollutant groups: α estradiol, β estradiol, estriol, estrone, ibuprofen, furosemide compounds were analysed in electrospray ionization positive mode and other compounds in negative mode. Depending on the physico-chemical properties of the compounds, in order to get suitable results in terms of sensitivity and recovery, extraction process had to be divided into several extractions with different extraction solvents. River water and effluent samples were filtered in fiberglass (142 mm diameter, pore 0.7 μm). They were similar overall for the solid phase extraction (SPE). The water samples were extracted by SPE using the AutoTrace SPE workstation (Supplementary data). Finally, samples were analysed by Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC, Agilent®) coupled with a tandem mass spectrometer (QqQ ABSciex®) in multiple reaction-monitoring (MRM) mode. The injection volume was 40 μL at a flow rate of 400 $\mu\text{L min}^{-1}$. The source temperature was 550°C. Each compound was characterized by its retention time, two MRM transitions and the ratio between the areas of MRM 1 and MRM 2. In a batch, each sample was injected twice. Instrumental performance was checked with the injection of Quality Control samples (pharmaceuticals dissolved in methanol). Extraction performance was checked following the signal areas of internal standards. Matrix matched calibration was used for quantification. All compounds were obtained from Sigma–Aldrich with purity higher than or equal to 97% (St. Quentin Fallavier, France). LC–MS grade CAN and methanol, ammonium formate, formic acid, citric acid were obtained from Fluka (Sigma–Aldrich). The water used was purified by a Milli-Q water system (Millipore, France).

5.2.4 Environmental risk assessment

The levels of each compound were compared to acute and chronic quality standards proposed by the Swiss Ecotox Centre (www.centreecotox.ch). Levels of pharmaceuticals in surface water and effluent were compared to the maximum allowable concentration (MAC) which corresponded to acute quality standards, and to annual average concentration (AA) which corresponded to chronic quality standards. The chronic quality standard is particularly relevant for the assessment of the impact of long-term pollution on aquatic organisms. Furthermore, the potential risk of each pharmaceutical was assessed by calculating its risk quotient (RQ) defined as the ratio between the maximum measured environmental concentration and the predicted no-effect concentration (PNEC). PNEC is the concentration below which no adverse effects of exposure in an ecosystem are measured and is calculated by applying an assessment factor (10 or 1000) on the lowest ecotoxicological values reported in the literature (NOEC or EC_{50} respectively) for the most sensitive species assayed.

5.3 Results and discussion

5.3.1 Occurrence of selected pharmaceuticals in the effluents

In the effluent from WWTP A, 13 and 12 pharmaceuticals of the selected compounds were quantified respectively in April 2014 and May 2015 (Tableau 5-3). For both campaigns diclofenac (965 and 467 ng L⁻¹), sulfamethoxazole (655 and 615 ng L⁻¹) and carbamazepine (442 and 566 ng L⁻¹) displayed the highest concentrations. Concentrations of anti-inflammatories (diclofenac, naproxen), antibiotics (sulfamethoxazole, trimethoprim, metronidazole), estrogen (estrone) and beta-blocker (propranolol) decreased in May 2015 compared to April 2014. The anti-inflammatory naproxen was among the most concentrated (254 ng L⁻¹) pharmaceuticals in April 2014 but was not detected in May 2015. Conversely the psychiatric drug oxazepam was not quantified in April 2014 but was measured in May 2015 (167 ng L⁻¹).

- WWTP B effluent

In April 2014, 14 pharmaceuticals among the 31 compounds selected were quantified and 5 were detected but not quantified (Tableau 5-3). In the second campaign of May 2015, 12 pharmaceuticals were quantified and 3 detected but not quantified among the 31 pharmaceuticals selected. For both campaigns, the three compounds at the highest concentrations were the analgesic diclofenac (2476 and 1055 ng L⁻¹), the antibiotic sulfamethoxazole (1380 and 640 ng L⁻¹) and the anti-epileptic carbamazepine (811 and 1007 ng L⁻¹).

Tableau 5-3 Concentrations of pharmaceuticals in effluents of WWTP A and WWTP B

Class	Compound	Range	WWTP A effluent		WWTP B effluent	
			April	May	March	May
Antibiotic	Ciprofloxacin	72-96.3	-	-	> LOQ	-
	Ofloxacin		18.3	53	47.7	303
	Roxithromycin		> LOQ	-	> LOQ	-
	Sulfamethoxazole	115-578	655.7	615	1380.4	640
	Trimethoprim	100-229	61.6	46.4	241.2	< LQ
Anticonvulsant	Carbamazepine	157-832	442.5	566	811.4	1007
Anti-inflammatory	Diclofenac	50-680	965.7	467	2476.3	1055
	Ibuprofen	80.5-1960	-	-	526.7	126
	Ketoprofen	86-392	143	260.5	107.2	-
	Naproxen	26-1890	254.6	-	355.3	100.1
	Paracetamol	108-11309	-	-	-	-
Antiparasitic	Metronidazole		35.8	<LQ	31.5	<LQ
Diuretic	Furosemide		< LOQ	<LQ	< LOQ	<LQ
Fungicide	Econazole		-	-	-	-
Hormone	A estradiol	0.8-3	-	-	-	-
	B estradiol	2.8-3	< LOQ	-	< LOQ	-
	Androstenedione		-	5.6	-	9.1
	Estriol		-	-	-	-
	Estrone		10	2.4	44.2	2.6
	Gestodene		-	-	-	-
	Levonorgestrel		-	-	-	-
	Progesterone		-	-	-	-
	Testosterone		-	-	-	-
	Lipid regulator	Bezafibrate	25-816	15.6	57.6	27
	Fenofibrate		-	-	-	-
Psychotropic	Fluvoxamine		-	-	-	-
	Lorazepam		28.6	47.4	41.4	123.5
	Norethindrone		-	-	-	-
	Oxazepam		< LOQ	167.5	> LOQ	286.5
β -blocker	Atenolol	154-843	324.1	381	324.5	169.5
	Propranolol		1.5	<LQ	6.8	17.5

- Comparison between the two effluents

Among the selected pharmaceuticals, 20 of the 31 were detected and quantified at least once in both WWTP effluents. For both sampling campaigns and effluents, 7 compounds were always detected (atenolol, carbamazepine, diclofenac, estrone, lorazepam, ofloxacin, sulfamethoxazole). Maximum concentrations found in this study for diclofenac, sulfamethoxazole and carbamazepine were in accordance with previously published data on the occurrence of these compounds (Verlicchi et al. 2012; Patrolecco et al. 2014). Concentrations of diclofenac (2,476 ng L⁻¹) and sulfamethoxazole (1,380 ng L⁻¹) in both effluents were higher than the range of average concentrations found in other studies: from 50 to 680 ng L⁻¹ for diclofenac and from 115 to 578 ng L⁻¹ for sulfamethoxazole (Miège et al. 2009; De la Cruz et al. 2012; Loos et al. 2013). Although these compounds had low excretion rates by humans, we found them at high concentrations (Luo et al. 2014). Such levels suggest that these

pharmaceuticals were frequently consumed. In addition levels of naproxen, trimethoprim, carbamazepine, atenolol and estrone measured in this study were in accordance with those reported in other reports (Miège et al. 2009; Rosal et al. 2010; De la Cruz et al. 2012; Loos et al. 2013) dealing with the occurrence of pharmaceuticals in WWTP effluents from different countries. Even though ibuprofen was among the most frequently detected compounds according to the review of (Verlicchi et al. 2012), it was not quantified in the effluent of WWTP A. However, ibuprofen concentrations in WWTP B effluent were in agreement with average concentrations (from 80.5 to 1960 ng L⁻¹) reported in the literature (Miège et al. 2009; Loos et al. 2013). Ciprofloxacin, roxithromycine, α estradiol, β estradiol, estriol, bezafibrate were not measured in the effluents although they were found in samples of other surveys (Miège et al. 2009; Loos et al. 2013; Gabet-Giraud et al. 2014). Differences of concentrations between the two effluents may be due to local variations in pharmaceutical consumption, which likely determine the amounts of compounds in WWTP influent. Moreover, higher raw wastewater volume from industries and surface runoff during rainfall may have had a dilution effect on pharmaceutical concentrations in WWTP A (Kasprzyk-Hordern et al. 2009). Other factors like the type of waste water treatment, temperature, HRT and SRT may affect the removal efficiency of the plant and finally the concentration of pharmaceuticals and may explain seasonal variations (Vieno et al. 2005; Patrolecco et al. 2014). Indeed, the largest biological reactor and highest HRT and SRT of WWTP A may improve removal efficiency of pharmaceuticals compared to WWTP B (Tableau 5-3). Furthermore the chemical properties (log K_{ow}, pKa) of each compound determined their fate in the aqueous or particulate phase, so total concentrations of pharmaceuticals may be underestimated if taking into account only aqueous phase. Indeed, da Silva et al. (2013) showed that among 43 pharmaceuticals analyzed in WWTP effluent, 30 % were predominantly bound to suspended particulate matter.

5.3.2 Occurrence of selected pharmaceuticals in river water

- Occurrence of pharmaceuticals in the Doubs river

Among the pharmaceuticals selected six compounds (paracetamol, ketoprofen, estrone, ofloxacin, carbamazepine and trimethoprim) displayed lower concentrations downstream of WWTP A (from 0.3 to 120.7 ng L⁻¹) while eleven compounds (diclofenac, paracetamol, carbamazepine, sulfamethoxazole, atenolol, ketoprofen, estrone, trimethoprim, progesterone, lorazepam and ofloxacin) occurred at higher concentrations (from 2.0 to 300.5 ng L⁻¹, Figure 5-2). Estrone and progesterone were measured in higher concentrations downstream of the WWTP (29.2 and 11.3 ng L⁻¹) than in the effluent (10 ng L⁻¹ and not detected). Furthermore paracetamol was not quantified in the effluent while its concentration was higher downstream (273.6 ng L⁻¹) than upstream (120.7 ng L⁻¹) of

the WWTP A. In May 2015 concentrations ranged from 0.1 to 69.6 ng L⁻¹ (estrone and oxazepam respectively) in upstream site and from 0.2 to 22.6 ng L⁻¹ (carbamazepine and paracetamol respectively) downstream of WWTP A. Paracetamol and testosterone were quantified upstream and downstream of WWTP A but not in the effluent. Oxazepam, carbamazepine, atenolol, trimethoprim and estrone were measured in higher concentrations upstream than downstream of the WWTP A.

- Occurrence of pharmaceuticals in the Loue river

In March 2014 among the 31 pharmaceuticals selected, eight were quantified upstream of WWTP B (paracetamol, carbamazepine, atenolol, trimethoprim, ketoprofen, ofloxacin, estrone and progesterone), while twelve (diclofenac, paracetamol, sulfamethoxazole, carbamazepine, ketoprofen, ibuprofen, atenolol, trimethoprim, bezafibrate, lorazepam, estrone, ofloxacin) were found downstream of the discharge (Figure 5-2). Except for paracetamol and progesterone, concentrations of the compounds were higher downstream of WWTP B discharge than upstream. The highest concentrations were found for diclofenac (166 ng L⁻¹), paracetamol (158 ng L⁻¹) and sulfamethoxazole (73 ng L⁻¹). In May 2015 only four pharmaceuticals (paracetamol, econazole, testosterone and trimethoprim) were quantified upstream and five (paracetamol, androstenedione, testosterone, trimethoprim and propranolol) downstream of the discharge of WWTP B. Three pharmaceuticals (trimethoprim, paracetamol and testosterone) were quantified downstream of the WWTP B but not in the effluent. Concentrations of compounds were much lower than in March 2014: the highest being for paracetamol (20 ng L⁻¹).

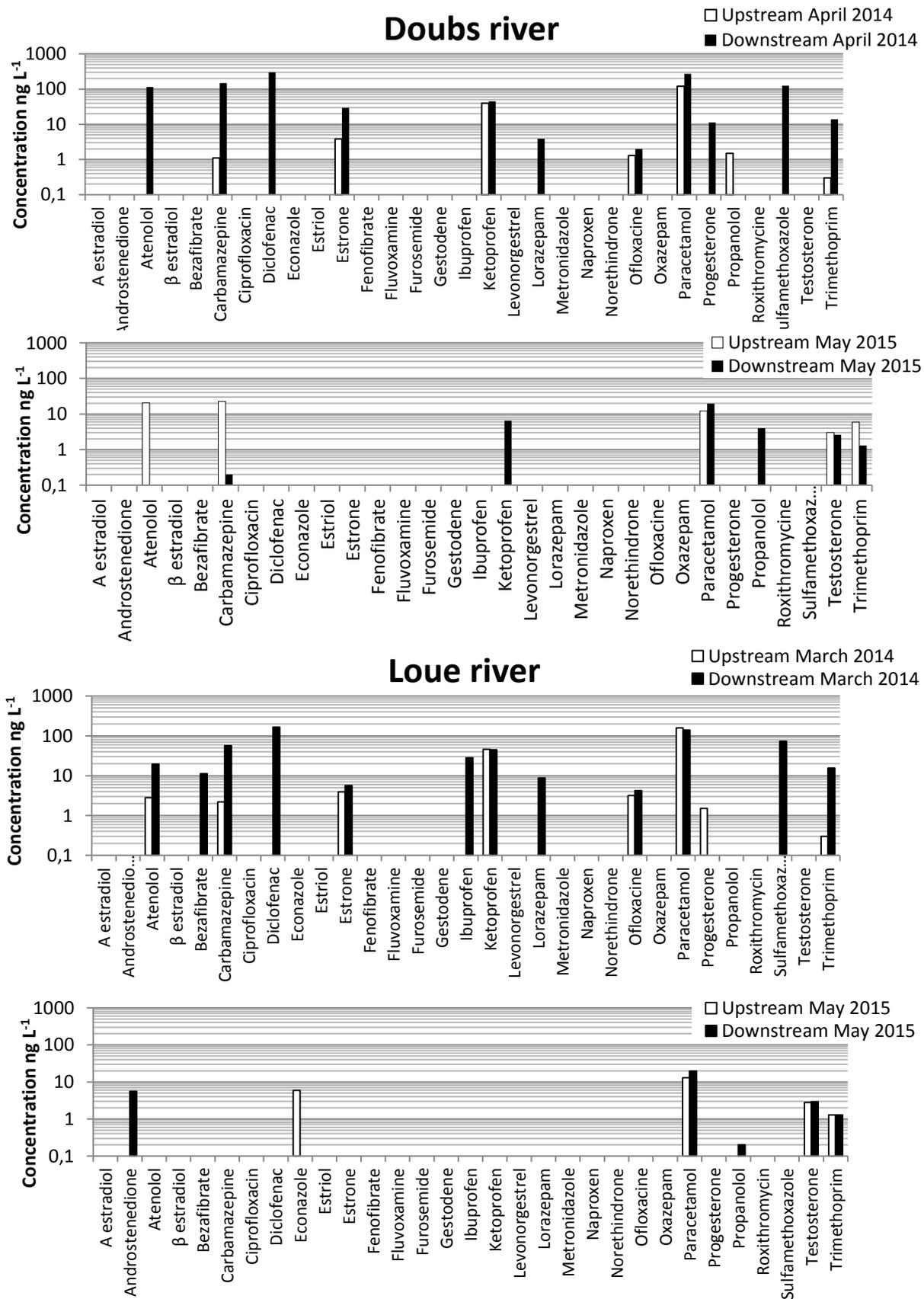


Figure 5-2 Concentration (Y axis log scale) for the selected pharmaceuticals in the water of the River Doubs and the River Loue for the two sampling campaigns

In both rivers, occurrence of carbamazepine, diclofenac, sulfamethoxazole and ketoprofen is consistent with previous reports dealing with the analysis of pharmaceutical residues in surface water (Gros et al. 2007; Vuillet and Cren-Olivé 2011). Estrone occurred upstream and downstream of the WWTP in the first campaign and ranged from 3.9 ng L⁻¹ to 29.2 ng L⁻¹. It is regularly detected in surface water at concentrations from 0.1 to few ng L⁻¹ because of its natural excretion by women and since it is a by-product of estradiol biodegradation (Daughton and Ternes 1999, Vuillet et al. 2009). Concentrations of estrone found in the Rivers Doubs and Loue were slightly higher than those reported in other rivers. In Germany, Zuehlke et al. (2005) found concentrations of estrone from 0.16 to 0.86 ng L⁻¹, Kuch and Ballschmiter (2001) found an average concentration of 0.7 ng L⁻¹ and in Italy, Laganà et al. (2004) reported 8 ng L⁻¹. In this study testosterone was also quantified in several samples at concentrations of 2.6 to 3 ng L⁻¹ but was not detected in the effluent of either WWTP. In China, Chang et al. (2011) reported very low concentrations of testosterone in WWTP effluent (0.2 to 1.2 ng L⁻¹). Furthermore, livestock excretion may represent another source of hormone release. Indeed, animal manure has been identified as a major source of natural steroids reaching the environment (Shore and Shemesh 2009). Bartelt-Hunt et al. (2011) reported the co-occurrence of pharmaceuticals and steroid hormones like estrone and testosterone in wastewater from cattle and swine facilities and in groundwater. Other compounds found in river water or WWTP effluents in this study are also used as veterinary drugs (Tableau 5-2). In France according to the allowed list of veterinary medicines (<https://www.anses.fr>): 8 compounds are used in both human and veterinary medicine: estriol, furosemide, ketoprofen, metronidazole, paracetamol, progesterone, sulfamethoxazole and trimethoprim. Trimethoprim and sulfamethoxazole, frequently observed in our samples, are usually employed in veterinary and human medicine due to their broad spectrum of activity and are among the most common pharmaceuticals used to prevent or treat bacterial infection (Pastor-Navarro et al. 2009). In addition, the degradation of some pharmaceuticals used in veterinary medicine produces metabolites which correspond to human medicine. For example, ciprofloxacin is a major metabolite of enrofloxacin (EMEA 1998). Therefore, it was not possible to quantify the contribution of pharmaceuticals from agricultural input in the Rivers Doubs and Loue. Nevertheless, due to the large numbers of pasture animals in the catchment, the veterinary origin of some pharmaceuticals (e.g. antimicrobials, antiparasitics,) cannot be excluded and will be investigated in further research. In Spain, Iglesias et al. (2013) suggested that the presence of antiparasitic drugs only employed in veterinary medicine attested that veterinary residue inputs occur in the environment even though farming activities like dairy and meat production result in less drug residue pollution than human activity.

In the present study estriol, α and β estradiol were not found in river water or effluent samples. Due to seasonal variation of flow rate, concentration of steroid oestrogen may vary and showed cyclical

pattern (Johnson 2010). So samples collected during these field surveys may reflect a low seasonal concentration period. Furthermore, this may be due to their hydrophobic properties enhancing adsorption onto suspended particulate matter and sediment (Nie et al. 2015). For example, estradiol has been quantified in river sediments from the River Ouse (UK) at concentrations from < 0.3 to 1.2 ng g^{-1} , and from 0.4 to 3.3 ng g^{-1} dry weight for estrone (Labadie et al. 2007). Numerous studies have identified WWTPs as the main source of pharmaceuticals in surface water, suspended matter and sediment (Silva et al. 2013; Patrolecco et al. 2014). Moreover, da Silva et al. (2013) highlighted that analysis limited to the water phase resulted in underestimation of the concentrations of pharmaceuticals and that suspended particulate matter (SPM) had to be considered. Indeed, Yang et al. (2015) found that carbamazepine and trimethoprim were the most frequently detected compounds in an essentially urban catchment. In Finland, Lahti and Oikari (2011) found that SPM downstream of WWTP were frequently contaminated with pharmaceuticals, however they also quantified ibuprofen and ofloxacin in SPM located in a rural area. The authors assumed that the pharmaceuticals came from independent households but did not consider agricultural sources. Nevertheless, the highest concentrations of most of the compounds tested occurred downstream of the WWTPs, confirming that WWTP effluents represent the main source of ecosystem contamination. The dilution factor (Tableau 5-1) in rivers (from 0.1 to 3%) and sorption onto suspended solids may explain why surface water concentrations of most of the pharmaceuticals investigated remain quite low after effluent discharge (Gómez et al. 2012). Therefore, surface water concentrations will partially depend on the stream flow rate and on the flow rate of the effluent. The occurrence of compounds in upstream sites may be explained by input from buildings not yet connected to the sewage network and/or by sewage overflow.

Furthermore the presence of pharmaceuticals in the River Loue spring may be linked to groundwater contamination (Figure 5-3). In March 2014 and May 2015 respectively 7 and 5 pharmaceuticals were quantified among 31 selected compounds. Two antibiotics (ofloxacin and trimethoprim) and one anti-inflammatory (paracetamol) were found in both campaigns. Carbamazepine, estrone, ketoprofen and sulfamethoxazole were quantified in the March 2014 survey but not in May 2015. During the first campaign the highest concentrations were found for paracetamol (132 ng L^{-1}) and ketoprofen (39 ng L^{-1}), while in May 2015 the highest concentration was for ofloxacin (20 ng L^{-1}). Propranolol and testosterone were quantified only in the second campaign (0.1 and 2.8 ng L^{-1}). These results are in accordance with a study in a karst system of the Swiss Jura which found that ketoprofen, diclofenac and sulfamethoxazole occurred frequently in the springs in the ng L^{-1} range (Morasch 2013). They also showed that the swallow hole draining an agricultural plain was the main entry path for micropollutants into the karst system and the connected springs and suggested domestic sewers as additional sources of contamination. Contamination of groundwater mainly results from landfill leachate, groundwater-

surface interaction and infiltration of contaminated water from agricultural land and/or sewer systems. Thin soil coverage with a low field capacity and highly permeable local infiltration pathways leads to groundwater recharging very rapidly after precipitation events. Transfer of compounds in the karst system led to decreased concentrations of pharmaceuticals due to different processes such as dilution, adsorption, degradation and travel time. Consequently, our results are fully consistent with the fact that karst springs are highly vulnerable and show strong variations in spring discharge and water quality (Heinz et al. 2008).

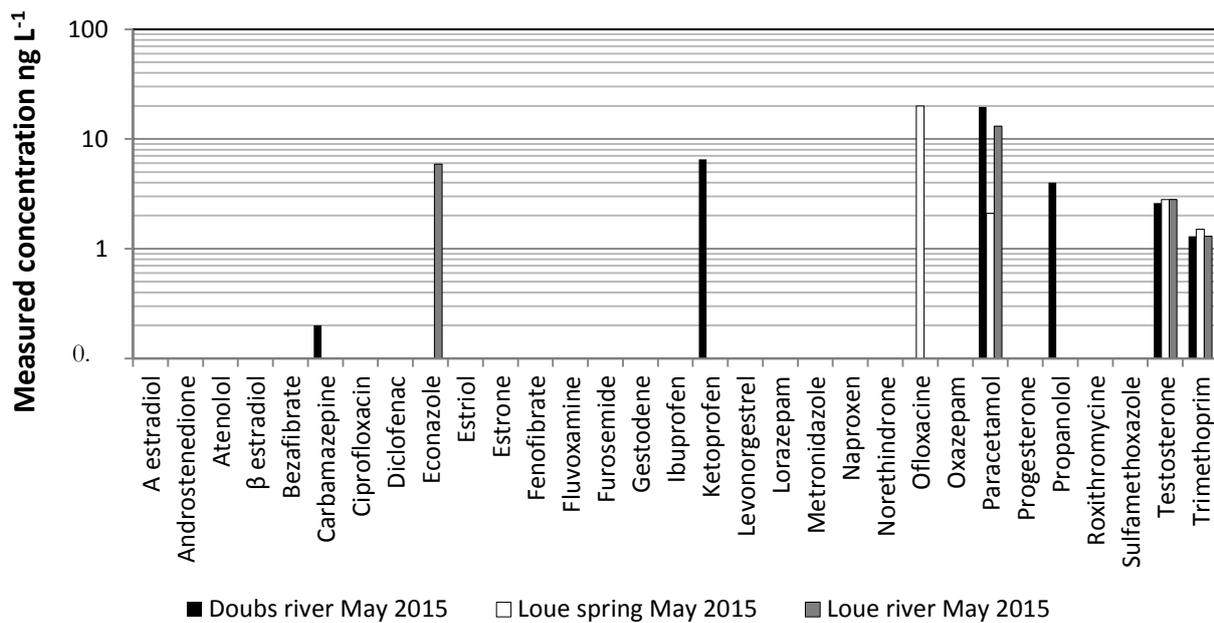


Figure 5-3 Concentration of pharmaceuticals downstream of WWTP A in the River Doubs near the karstic losses, in the karst spring of the Loue river and upstream of WWTP B in the River Loue

5.3.3 Toxicity

Many studies have demonstrated acute toxicities of pharmaceuticals on aquatic organisms from $\mu\text{g L}^{-1}$ to mg L^{-1} (Cleuvers 2003; Ferrari et al. 2003). For example, the EC_{50} for the crustacean *Daphnia magna* were reported to be $>13,800 \mu\text{g L}^{-1}$, $22,430 \mu\text{g L}^{-1}$, 25.20 mg L^{-1} and 31.75 mg L^{-1} for carbamazepine, diclofenac, sulfamethoxazole and ofloxacin respectively (Ferrari et al. 2003; Isidori et al. 2005). However, as concentrations in surface water are in the ng L^{-1} or $\mu\text{g L}^{-1}$ ranges, most pharmaceuticals did not cause lethal toxicity. Nevertheless chronic exposure to low concentrations of pollutants may lead to sublethal effects, including changes in behaviour for example. De Lange et al. (2006) demonstrated a change of behaviour in *Gammarus pulex* exposed to 10 ng L^{-1} ibuprofen which corresponded to concentrations 10^4 to 10^7 times lower than the previously reported LOECs and in the range of

environmentally occurring concentrations. Schwaiger et al. (2004) showed that long-term exposure to diclofenac in environmentally relevant concentrations led to an impairment of the general health of fishes. However, pharmaceuticals in mixtures may trigger chronic and synergetic effects and may be more toxic than the sum of the single compounds. Moreover, the toxic effect of multiple compounds at concentrations below the LOEC may produce significant effects in the following generations (Parrott and Bennie 2009). Melvin et al. (2014) demonstrated an increase of toxicity in amphibians exposed to a mixture of compounds (naproxen, carbamazepine, and sulfamethoxazole) commonly occurring in wastewater, compared to exposures to the single compounds. Chronic exposure to a mixture of antibiotic with sulfamethoxazole and trimethoprim at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ led to a significant decrease in the sex ratio of the first brood of *Daphnia magna* (Flaherty and Dodson 2005). This indicated that mixtures of antibiotics potentially found in aquatic ecosystems may affect the developmental and reproductive processes of non-target aquatic organisms and trigger responses in other aquatic populations.

The risk quotients (RQ) i.e. the ratio between the measured concentration of each compound and their corresponding PNEC were calculated for river water (Tableau 5-4, Tableau 5-5 and effluent samples Tableau 5-6). RQ in river water showed that ofloxacin and sulfamethoxazole were the most critical compounds and posed a medium and high environmental risk ($\text{RQ} > 0.1$ and $\text{RQ} > 1$) respectively. Up to now, European and French legislation has not provided limits for the concentrations of pharmaceuticals in WWTP effluent. However, comparison of concentrations of pharmaceuticals in surface water showed that several compounds (carbamazepine, diclofenac, ofloxacin and sulfamethoxazole) exceeded chronic quality standard proposed by the Swiss Ecotox Centre (www.centrecotox.ch). Furthermore, we evaluated the toxicity level of effluents by calculating RQ values for each compound separately. Tableau 5-6 shows that for both WWTPs, ofloxacin and sulfamethoxazole pose high environmental risk ($\text{RQ} > 1$). Moreover, diclofenac, ibuprofen and naproxen may cause medium risk in effluent of WWTP A with $\text{RQ} > 0.1$. These results indicate that both WWTP discharges constituted a significant risk for the aquatic environment in the Rivers Doubs and Loue. Even though most of the compounds tested are discharged at low concentrations, the high total mass discharged daily into rivers may contribute to adverse effects on aquatic biota due to chronic and mixture toxicities. Little is known about the possible long-term effects and low level exposure to pharmaceuticals (Santos et al. 2010). While knowledge regarding the environmental occurrence of veterinary pharmaceuticals is increasing, information in the literature on their fate and effects is limited (Bártíková et al. 2016). In addition, veterinary medicines are often introduced in the same area in combination with other pollutants like pesticides, which may increase adverse effects on non-target organisms. Therefore, aquatic organisms may be exposed to mixtures of human and veterinary

pharmaceuticals and pesticides that could have synergetic adverse effects. There is a definite need for studies addressing long-term effects of low doses of veterinary medicines and their degradation products in the environment, the behaviour of mixtures of veterinary drugs and the interactions of veterinary drugs with other pharmaceuticals or chemicals in the ecosystem.

Tableau 5-4 Concentrations of pharmaceuticals in the River Loue (values in bold exceed threshold values a, b, c). PNEC correspond to the predicted no-effect concentration, MAC-EQS correspond to environmental quality standard relative to the maximum allowable concentration and AA-EQS is relative to annual average concentration.

Loue river µg/L					March 2014			May 2015		
Class	Compound	PNEC ^a	MAC-EQS ^b	AA-EQS ^c	Spring	Upstream	Downstream	Spring	Upstream	Downstream
Antibiotic	Ciprofloxacin	938	0.363	0.089	-	-	-	-	-	-
	Ofloxacin	0.016			0.0007	0.0032	0.0042	0.02^a	-	-
	Roxithromycin	4			-	-	-	-	-	-
	Sulfamethoxazole	0.027	2.7	0.6	0.0015	-	0.0729^a	-	-	-
	Trimethoprim	2.6	1100	60	0.0001	0.0003	0.0155	0.0015	0.0013	0.0013
Anticonvulsant	Carbamazepine	13.8	2550	0.5	0.0019	0.0022	0.0568^c	-	-	-
Anti-inflammatory	Diclofenac	0.1		0.05	-	-	0.1665^c	-	-	-
	Ibuprofen	1.65	23	0.3	-	-	0.0283	-	-	-
	Ketoprofen	15.6			0.039	0.0462	0.0445	-	-	-
	Naproxen	2.62	370	1.7	-	-	-	-	-	-
	Paracetamol	1			0.1317	0.158	0.1389	0.0021	0.0131	0.0196
Antiparasitic	Metronidazole	2.5			-	-	-	-	-	-
Diuretic	Furosemide				-	-	-	-	-	-
Fungicide	Econazole				-	-	-	-	0.0059	-
Hormone	α estradiol			0.000037	-	-	-	-	-	-
	Androstenedione				-	-	-	-	-	0.0056
	β estradiol			0.4	-	-	-	-	-	-
	Estriol				-	-	-	-	-	-
	Estrone			3.6	0.0021	0.0039	0.0057	-	-	-
	Gestodene				-	-	-	-	-	-
	Levonorgestrel				-	-	-	-	-	-
	Norethindrone				-	-	-	-	-	-
	Progesterone				-	0.0015	-	-	-	-
	Testosterone				0.0001	-	-	0.0028	0.0028	0.0029
Lipid regulator	Bezafibrate		76	460	-	-	0.0112	-	-	-
	Fenofibrate	0.1			-	-	-	-	-	-
Psychotropic	Fluvoxamine				-	-	-	-	-	-
	Lorazepam				-	-	0.0088	-	-	-
	Oxazepam				-	-	-	-	-	98-
β-blocker	Atenolol	30	330	150	-	0.0028	0.0196	-	-	-
	Propranolol		12000	160	-	-	-	0.0001	-	0.0002

Tableau 5-5 Concentrations of pharmaceuticals ($\mu\text{g L}^{-1}$) in the River Doubs. PNEC correspond to the predicted no-effect concentration, MAC-EQS correspond to environmental quality standard relative to the maximum allowable concentration and AA-EQS is relative to annual average concentration.

River Doubs					April 2014		May 2015	
					Upstream	Downstream	Upstream	Downstream
Class	Compound	PNEC	MAC-EQS	AA-EQS				
Hormone	α estradiol			0.000037	-	-	-	-
Hormone	Androstenedione				-	-	-	-
β -blocker	Atenolol	30	330	150	-	0.1146	0.0204	-
Hormone	β estradiol			0.4	-	-	-	-
Lipid regulator	Bezafibrat		76	460	-	-	-	-
Anticonvulsant	Carbamazepine	13.8	2550	0.5	0.0011	0.1488	0.0224	0.0002
Antibiotic	Ciprofloxacin	938	0.363	0.089	-	-	-	-
Anti-inflammatory	Diclofenac	0.1		0.05	-	0.3005^c	-	-
Fungicide	Econazole				-	-	-	-
Hormone	Estriol				-	-	-	-
Hormone	Estrone			3.6	0.0038	0.0292	0.0001	-
Lipid regulator	Fenofibrate	0.1			-	-	-	-
Psychotropic	Fluvoxamine				-	-	-	-
Diuretic	Furosemide				-	-	-	-
Hormone	Gestodene				-	-	-	-
Anti-inflammatory	Ibuprofen	1.65	23	0.3	-	-	-	-
Anti-inflammatory	Ketoprofen	15.6			0.0394	0.0452	-	0.0065
Hormone	Levonorgestrel				-	-	-	-
Psychotropic	Lorazepam				-	0.0039	-	-
Antiparasitic	Metronidazole	2.5			-	-	-	-
Anti-inflammatory	Naproxen	2.62	370	1.7	-	-	-	-
Hormone	Norethindrone				-	-	-	-
Antibiotic	Ofloxacin	0.016			0.0013	0.002	-	-
Psychotropic	Oxazepam				-	-	-	-
Anti-inflammatory	Paracetamol	1			0.1207	0.2736	0.0122	0.0196
Hormone	Progesterone				-	0.0113	-	-
β -blocker	Propranolol		12000	160	0.0015	-	-	0.004
Antibiotic	Roxithromycin	4			-	-	-	-
Antibiotic	Sulfamethoxazole	0.027	2.7	0.6	-	0.1258^a	-	-
Hormone	Testosterone				-	-	0.003	0.0026
Antibiotic	Trimethoprim	2.6	1100	60	0.0616	0.0138	0.0059	0.0013

Tableau 5-6 Predicted no-effect concentration (PNEC $\mu\text{g L}^{-1}$) and corresponding risk quotients (RQs) for the selected compounds in both WWTP effluents

Class	Compound	PNEC	WWTP A		WWTP B	
			March 2014	May 2015	April 2014	May 2015
			RQ	RQ	RQ	RQ
Hormone	A estradiol		-	-	-	-
Hormone	Androstenedione		-	-	-	-
β -blocker	Atenolol	30	0.01	0.01	0.01	0.01
Hormone	B estradiol		-	-	-	-
Lipid regulator	Bezafibrat		-	-	-	-
Anticonvulsant	Carbamazepine	13.8	0.06	0.07	0.03	0.04
Antibiotic	Ciprofloxacin	938	-	-	-	-
Anti-inflammatory	Diclofenac	9.7	0.26	0.11	0.10	0.05
Fungicide	Econazole		-	-	-	-
Hormone	Estriol		-	-	-	-
Hormone	Estrone		-	-	-	-
	Fenofibrate	0.1	-	-	-	-
Psychotropic	Fluvoxamine		-	-	-	-
Diuretic	Furosemide		-	-	-	-
	Gestodene		-	-	-	-
	Ibuprofen	1.65	0.32	0.08	-	-
	Ketoprofen	15.6	0.01	-	0.01	0.02
	Levonorgestrel		-	-	-	-
	Lorazepam		-	-	-	-
	Metronidazole	2.5	0.01	-	0.01	-
	Naproxen	2.62	0.14	0.04	0.10	-
	Norethindrone		-	-	-	-
	Ofloxacin	0.016	2.98	18.94	1.14	3.31
	Oxazepam		-	-	-	-
	Paracetamol	1	-	-	-	-
	Progesterone		-	-	-	-
β -blocker	Propranolol		-	-	-	-
	Roxithromycin	4	-	-	-	-
	Sulfamethoxazole	0.027	51.13	23.70	24.29	22.78
	Testosterone		-	-	-	-
	Trimethoprim	2.6	0.09	-	0.02	0.02

5.4 Conclusion

The occurrence of 31 pharmaceuticals in two WWTPs located in a rural and karstic catchment has been established together for the first time with their concentrations in the receiving waters, the Rivers Doubs and Loue. In the WWTP effluents and surface water, diclofenac, sulfamethoxazole were detected in relatively high levels showing that WWTPs are not able to efficiently remove pharmaceuticals. Furthermore, this study showed that the levels of ofloxacin and sulfamethoxazole in surface water can pose a risk, highlighting their potential hazard for the health of the aquatic ecosystem. In addition, the occurrence of some pharmaceuticals upstream of the WWTP and in the karst spring of

the Loue river indicated other domestic and agricultural releases in the catchment and transport of the contaminants through the karst system. In order to improve water quality management and to reduce the impact on the aquatic ecosystem, authorities have to consider WWTPs as hotspots of contamination and take into account diffuse sources in the catchment due to the high risk of transfers in the karst system.

Acknowledgments

We thank A. Bolard and E. Chanez for sampling assistance. This study was financially supported by the Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse, La Région Franche-Comté and the Doubs département. The support of Peter Winterton with English editing is also greatly acknowledged.

5.5 Supplementary data

5.5.1 Analysis

5.5.1.1 Solid phase extraction (SPE)

Extraction 1, fraction 1 and fraction 2 with an Autotrace® work station (Thermo®)

Cartridges: Waters ® Oasis HLB 150 mg / 6 cc

Conditioning: 5 mL méthanol (MeOH), 5 mL water without endocrine disruptors at 10 mL/min

Loading: 450 mL water at 5 mL/min

Rinsing: 2 mL water at 5 mL/min

Dry: 20 min

Elution n° 1: 5 mL dichloromethane (fraction 1) at 2 mL/min

Change collection extraction tubes

Dry: 15 min

Elution n° 2: 5 mL MeOH, 5 mL ethyl acetate (fraction 2) at 2 mL/min

Dry evaporation under nitrogen flux

Reconstitution in 400 µL (95/5 water/methanol doped at 100 ppb with ¹³C-Phenacetine, internal standard)

Extraction 2 with an Autotrace® work station (Thermo®)

Cartridges: Waters ® Oasis HLB 150 mg / 6 cc

Conditioning: 5 mL MeOH, 5 mL water at 10 mL/min

Loading: 450 mL with 5 mL of citric acid (10 mM) at 5 mL/min

Rinsing: 2 mL water at 5 mL/min

Dry: 20 min

Elution: 2 x 5 mL MeOH at 2 mL/min

Dry evaporation under nitrogen flux

Reconstitution in 400 µL (95/5 water/methanol doped at 100 ppb with ¹³C-Phenacetine, internal standard)

5.5.2 Limit of quantification

Tableau 5-7 LQ and LD for each compound

Compound	Extraction and ionisation	Surface water		Effluent	
		LOD ng/L	LOQ ng/L	LOD ng/L	LOQ ng/L
A estradiol	Extraction 1 – fraction 1 – ESI negative	0.05	0.2	2.2	7.1
Androstenedione	Extraction 1 – fraction 1 – ESI positive	0.1	0.3	3.8	4.8
Atenolol	Extraction 1 – fraction 1 – ESI positive	0.5	1.5	7	23
B estradiol	Extraction 1 – fraction 1 – ESI negative	0.05	0.2	2.2	7.1
Bezafibrate	Extraction 2 – ESI positive	0.5	1.7	31	38.4
Carbamazepine	Extraction 1 – fraction 1 – ESI positive	0.02	0.05	0.03	0.1
Ciprofloxacin	Extraction 1 – fraction 2 – ESI positive	2.1	7	24.5	28.2
Diclofenac	Extraction 1 – fraction 2 – ESI positive	0.8	2.7	130	171
Econazole	Extraction 2 – ESI positive	0.2	0.5	2.82	9.3
Estriol	Extraction 1 – fraction 1 – ESI negative	71.1	234.6	233.3	700
Estrone	Extraction 1 – fraction 1 – ESI negative	0.03	0.1	0.4	1.2
fénofibrate	Extraction 2 – ESI positive	0.04	0.1	1.9	6.3
Fluvoxamine	Extraction 2 – ESI positive	0.8	2.6	3.2	10.5
Furosémide	Extraction 1 – fraction 2 – ESI negative	9.5	31.4	285	414
Gestodene	Extraction 1 – fraction 1 – ESI positive	0.5	1.5	2.4	8
Ibuprofène	Extraction 1 – fraction 2 – ESI negative	0.6	2.1	4.8	9.8
Ketoprofen	Extraction 2 – ESI positive	0.2	0.7	15	16
Levonorgestrel	Extraction 1 – fraction 1 – ESI positive	3.9	12.9	4	13.3
Lorazepam	Extraction 1 – fraction 1 – ESI positive	0.04	0.1	0.2	0.5
Metronidazole	Extraction 2 – ESI positive	3.7	12.2	272.7	900
Naproxène	Extraction 2 – ESI positive	1.5	5.1	12.7	19.2
Norethindrone	Extraction 1 – fraction 1 – ESI positive	0.5	1.7	3.8	12.4
Ofloxacin	Extraction 1 – fraction 2 – ESI positive	0.06	0.2	1.5	4.6
Oxazepam	Extraction 1 – fraction 1 – ESI positive	0.2	0.5	3.2	9.6
Paracétamol	Extraction 1 – fraction 1 – ESI positive	2.3	7.7	75.9	130.3
Progesterone	Extraction 1 – fraction 1 – ESI positive	0.5	1.6	3.8	8
Propranolol	Extraction 2 – ESI positive	0.04	0.1	1.1	3.3
Roxithromycine	Extraction 1 – fraction 1 – ESI positive	0.6	1.9	9.4	10.6
Sulfaméthoxazole	Extraction 1 – fraction 2 – ESI positive	0.04	0.1	0.4	1
Testosterone	Extraction 1 – fraction 1 – ESI positive	0.2	0.6	6	15
Triméthoprim	Extraction 1 – fraction 1 – ESI positive	0.03	0.1	6.8	8.2

5.5.3 Toxicity references : PNEC

Tableau 5-8 PNEC values for each compound with references

Class	Compound	PNEC L ⁻¹	µg	Reference
Antibiotic	Ciprofloxacin	938		Sanderson et al. 2003
	Ofloxacin	0.016		Ferrari et al. 2004
	Roxithromycin	4		Sanderson et al. 2003
	Sulfamethoxazole	0.027		Ferrari et al. 2004
	Trimethoprim	2.6		Sanderson et al. 2003
Anticonvulsant	Carbamazepine	13.8		Ferrari et al. 2004
Anti-inflammatory	Diclofenac	0.1		Ferrari et al. 2004
	Ibuprofen	5		Lindqvist et al. 2005
	Ketoprofen	306		Lindqvist et al. 2005
	Naproxen	128		Lindqvist et al. 2005
	Paracetamol	1400		Komori et al. 2013
Antiparasitary	Metronidazole	2.5		Kümmerer and Henninger 2003
Diuretic	Furosemide			
Fungicide	Econazole			
Hormone	α estradiol			
	Androstenedione			
	β estradiol			
	Estriol			
	Estrone			
	Gestodene			
	Levonorgestrel			
	Norethindrone			
	Progesterone			
	Testosterone			
	Lipid regulator	Bezafibrate	5.3	
Fenofibrate				
Psychotropic	Fluvoxamine			
	Lorazepam			
	Oxazepam			
β-blocker	Atenolol			
	Propranolol			

5.5.4 Mixing of effluent with river water

Complete mixing of the effluent with river water was evaluated by measuring electric conductivity in surface water upstream, near downstream and far downstream of the WWTP discharge for both surveys.

Tableau 5-9 Electric conductivity measured in both sites

	Upstream	Downstream
Doubs river		
Survey in 2014	395	405
Survey in 2015	389	397
	Upstream	Downstream
Loue river		
Survey in 2014	457	457
Survey in 2015	468	462

These results showed a good mixing of the effluent with river water.

6 Chapitre 3 : Intérêt des MES et des sédiments pour l'évaluation de la contamination par les HAP dans le Doubs et dans la Loue

L'objectif de ce chapitre est :

- de mesurer le degré de contamination en HAP dans les matrices solubles (rejets de STEP, eaux de surface) et particulaires (MES et sédiments) ;
- d'évaluer l'impact des STEP sur la contamination en HAP des différentes matrices ;
- d'évaluer l'impact des STEP sur les populations de gammarès considérés comme des bio indicateurs des écosystèmes d'eau douces.

Résumé de l'article publié dans le journal *Environmental Sciences and Pollution Research* :

Les concentrations de la somme des 16 HAP ($\sum_{16}\text{PAH}$) varient de 73,5 ng L⁻¹ à 728,0 ng L⁻¹ dans les eaux de surface et de 85,4 ng L⁻¹ to 313,1 ng L⁻¹ dans les effluents. Dans les MES et les sédiments, les concentrations en HAP varient de 749,6 à 2463 µg kg⁻¹ et de 690,7 µg kg⁻¹ à 3625,6 µg kg⁻¹ respectivement. Contrairement aux valeurs mesurées dans les eaux de surface, l'analyse des niveaux de contamination dans les MES et les sédiments montre des niveaux de contamination élevés dépassant des seuils de qualité. Ces résultats montrent donc la pertinence d'utiliser les MES et les sédiments pour l'évaluation de la qualité des écosystèmes aquatiques. Pour cette campagne d'échantillonnage, un impact de la STEP d'Ornans sur l'augmentation des concentrations en HAP dans les MES et les sédiments ainsi qu'une diminution de la densité des populations de gammarès a été mis en évidence. Par ailleurs, l'analyse des types de sources de pollution montre que les STEP sont considérées comme des sources ponctuelles de contamination en HAP qui reflète l'état de contamination généralisée du bassin versant.



RESEARCH ARTICLE

PAH occurrence in chalk river systems from the Jura region (France). Pertinence of suspended particulate matter and sediment as matrices for river quality monitoring

Axelle Chiffre¹ · François Degiorgi¹ · Nadia Morin-Crini¹ · Audrey Bolard¹ · Etienne Chanez¹ · Pierre-Marie Badot¹

Abstract

This study investigates the variations of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) levels in surface water, suspended particulate matter (SPM) and sediment upstream and downstream of the discharges of 2 wastewater treatment plant (WWTP) effluents. Relationships between the levels of PAHs in these different matrices were also investigated. The sum of sixteen US EPA PAHs ranged from 73.5 ng L⁻¹ to 728.0 ng L⁻¹ in surface water and from 85.4 ng L⁻¹ to 313.1 ng L⁻¹ in effluent. In SPM and sediment, \sum_{16} PAHs ranged from 749.6 to 2463 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and from 690.7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ to 3625.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectively. Investigations performed upstream and downstream of both studied WWTPs, showed that WWTP discharges may contribute to the overall PAH contaminations in the Loue and the Doubs rivers. Comparison between gammarid populations upstream and downstream of WWTP discharge showed that biota was impacted by the WWTP effluents. When based only on surface water samples, the assessment of freshwater quality did not provide evidence for a marked PAH contamination in either of the rivers studied. However, using SPM and sediment samples, we found PAHs content exceeding sediment quality guidelines. We conclude that sediment and SPM are relevant matrices to assess overall PAH contamination in aquatic ecosystems. Furthermore, we found a positive linear correlation between PAH contents of SPM and sediment showing that SPM represents an integrating matrix which is able to provide meaningful data about the overall contamination over a given time span.

Keywords: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Waste Water Treatment Plant discharge, Suspended Particulate Matter, Sediment, Toxicity, *Gammaridae*

6.1 Introduction

WWTPs generally receive complex mixtures containing a wide variety of organic pollutants from domestic, industrial and storm-water sources (Aguayo et al. 2004; Blanchard et al. 2004; Katsoyiannis et al. 2007). Most municipal treatment plants are designed and dimensioned to achieve removal of organic

matter (OM) and nutrients. So, except for WWTP with tertiary treatment, micropollutants cannot be completely removed from treated water. As a consequence rivers receive quantities of complex mixtures of chemicals such as pharmaceuticals, metals, PAHs) or pesticides. Beside droughts, precipitation events are able to affect water quality seriously through spills of untreated wastewater from overflows (Canobbio et al. 2009). PAHs are widespread contaminants in ecosystems, included in the priority list of pollutants of the US EPA (1993) and European Union (2000/60/CE) due to their toxic, mutagenic and carcinogenic potentials (IARC 1987). Municipal wastewaters represent a source of PAHs in surface water (Busetti et al. 2006; Pham and Proulx 1997; Shi et al. 2005; Gasperi 2006, Qi et al. 2013) which may come from household waste, discharge of petroleum products in industrial effluent and the discharge of urban storm water runoff (Yunker et al. 2002). Concentrations of total PAHs in raw municipal wastewaters ranged from ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$ and have been found to vary significantly depending on the amount of industrial effluent possibly co-treated with domestic wastewaters (Manoli and Samara 1999; Blanchard et al. 2004). After entering the aquatic environment, the behaviour and fate of PAHs depend on their physicochemical properties. Volatilization, dissolution, adsorption onto suspended solids and subsequent sedimentation, biotic and abiotic degradation, uptake by aquatic organisms and accumulation, are all major processes to which water PAHs were subjected (Zhou et al. 1999; Douben 2003). According to the way and time of exposure, and their physico-chemical properties, PAHs have different toxic effects. Several studies established acute toxicity values on freshwater organisms in aqueous phases from $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ for benzo(g,h,i)perylene (BghiPL) on *Daphnia magna* (Newsted and Giesy 1987) to 7.8 mg L^{-1} for naphthalene (NAP) on the fish *Pimephales promelas* (DeGraeve et al. 1982). However, because of their low water solubility, most PAHs showed greater affinity with SPM which will finally be deposited as sediment. Like in the aqueous phase, toxic values changed according to the molecule tested. Verrhiest et al. (2001) reported in the crustacean *Hyallela azteca* NOEC from 3 mg kg^{-1} to 300 mg kg^{-1} for phenanthrene (PHE) and benzo(k)fluoranthene (BkFLT) respectively. Therefore, sediment becomes a diffuse source of toxic contamination for many aquatic ecosystems, especially for benthic invertebrates that are highly exposed to contaminated sediment through their habitat and feeding habits (Archambault et al. 2010). So, this highlights the importance of investigating the sediment and suspended matter compartment for the assessment of the chemical quality status of rivers (Patrolecco et al. 2010).

Organisms living in close contact to contaminated sediment or SPM such as macrobenthos, may take up PAHs through body surface or by ingestion. Then, contaminants can be transferred to other levels of the aquatic food web. Furthermore, invertebrates are important taxa of aquatic food web, so a decline of population caused by contaminants may have a strong impact on the aquatic communities. Several studies have shown modifications of the macroinvertebrate (*Hydropsychidae*, *Gammaridae*)

community downstream of WWTP discharge points (Kosmala et al. 1999; Ladewig et al. 2006). Indeed, the amphipod species *Gammarus pulex* and *Gammarus fossarum* (Crustacea) are known as key species because of both high abundance and efficiency in shredding OM that represents an important energy source (Maltby et al. 2002). As predators on other invertebrates and prey items for many fish species, gammarids play a structural role in the composition of many freshwater ecosystems (McNeil et al. 1997). Furthermore, gammarids have proved to be sensitive to numerous contaminants (De Lange et al. 2006; Alonso et al. 2010; Adam et al. 2009), especially PAHs, pesticides and metals. So that species constitutes a good model organism to evaluate the impacts of WWTP discharge on aquatic ecosystems. Worldwide contamination and general degradation of chalk streams is an important environmental problem despite ongoing effort of governments to improve water quality. For example, since 2009, the Loue river, a famous trout and grayfish chalk stream in Eastern France, has been affected by repeated fish mortality (ONEMA 2012) and loss of macro-invertebrate diversity and density. In the same area, the Doubs river is highly contaminated by PAHs (AERMC 2013).

Most of the regulations about contaminant thresholds in freshwater focus on the aqueous phase, although this is not the most relevant compartment for lipophilic compounds. For local pollutant sources, SPM appeared to be more affected and more pertinent (Patrolecco et al. 2010; Hudjetz et al. 2014). Thus, that study focuses on PAH levels in PAHs in aqueous and solid fractions (effluent, freshwater, sediment, SPM) and on the impacts of the WWTP discharge on aquatic organisms. Two WWTPs in two streams (Loue and Doubs rivers) in Eastern France were investigated. For several decades, the demise of insect species known to be sensitive to contaminants and many fish mortality events reflected a decrease in the biological quality of these streams. The first objective of this study was to evaluate the impact of two differently sized WWTPs in chalk streams by measuring the distribution and the sources of PAHs in the main relevant compartments (i.e surface water, WWTP effluent, SPM, and sediment). The second objective was to assess the possible impact of both WWTP on the Gammaridae population.

6.2 Materials and methods

6.2.1 Study area

The Loue river and the Doubs river are located in the Jura mountains (Eastern France, Figure 6-1). The hydrological conditions in the catchment are the result of the alternating permeable and impermeable Jurassic strata and the presence of many karst structures. Moreover, the losses of the Doubs river at Arçon partly supply the source of the Loue river in Ouhans (Jacquemin 1984). At each stream, one sampling site was chosen upstream and two sampling sites downstream of the WWTP

effluent discharge (Figure 6-1). WWTP A treats raw wastewater from the town of Ornans with a capacity of 5,000 people equivalent (PE) WWTP B receives wastewater from Pontarlier and has a much higher capacity of 50,000 PE. Both WWTPs apply an activated sludge biological treatment and receive runoff and industrial wastewater is included in the input. Efficiencies of carbon, nitrogen and phosphorus removal were in accordance with French regulation. The Loue sampling sites were referred to as La (upstream), Lb (near downstream) and Lc (far downstream). The Doubs sampling sites were referred to as Da (upstream), Db (near downstream) and Dc (far downstream). The physical characteristics and morphological structure of the rivers were similar (Tableau 6-1 Location of the experimental sites).

Tableau 6-1 Location of the experimental sites

Parameters	Site A			Site B		
	La	Lb	Lc	Da	Db	Dc
Latitude	N47°06'07.5"	N47°06'08.2"	N47°06'35.9"	N46°55'55.2"	N46°56'09.4"	N46°56'24.4"
Longitude	E6°07'44.4"	E6°07'38.2"	E6°07'19.9"	E6°20'51.6"	E6°20'53.9"	E6°21'00.4"
Altitude (m)	326	329	329	807	805	802
Distance from the WWTP	101 (upstr.)	30 (downstr.)	1,000 (downstr.)	351 (upstr.)	120 (downstr.)	765 (downstr.)

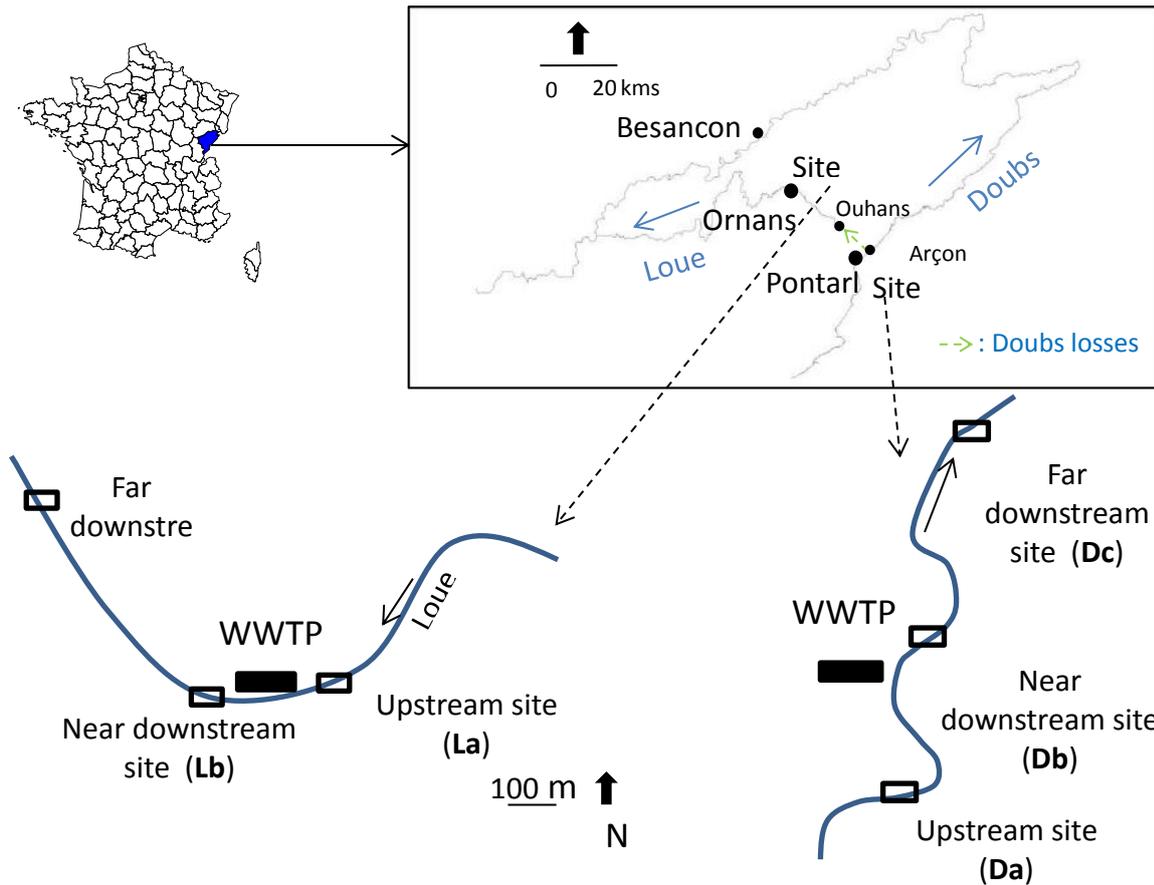


Figure 6-1 Location of sampling sites of the Loue (site A) and the Doubs (site B) river in the French Jura (France)

6.2.2 Sample collection

The investigation periods were from 5 December 2013 to 13 March 2014 for the Loue river and from 16 December 2013 to 17 April 2014 for the Doubs river (Figure 6-2). At the beginning of each investigation period, surface water and WWTP effluents were sampled for PAH analysis and for measurements of conductivity, pH, oxygen, Total Organic Carbon (TOC), and SPM content. At the same time, six suspended particulate matter traps were placed at each site. During the investigation period, chemical analyses were performed in surface water and effluent samples at different river flows. SPM of a large range of granulometry (from 0.04 to more than 2 mm) were trapped by passive sedimentation in a pre-cleaned cylinder (height: 450 mm; diameter: 50 mm) fixed in the riverbed (Bloesch and Burns 1980). At the end of the investigation period, sediment and mixing SPM from sediment traps were collected. Surface water and effluent samples were collected using 1 L pre-cleaned dark glass bottles for PAHs and 2 L plastic bottles for other chemical analysis. Oxygen and conductivity were determined *in situ*. After collection, all samples were immediately placed in an icebox, transported to the laboratory, and stored at 4°C before analysis. Surface sediments (0-20 cm) were

collected using a steel shovel sampler. SPM and sediments were put in glass containers, stored in a coolbox and transported to the laboratory. Sediments and SPM were kept at -20 °C before analysis.

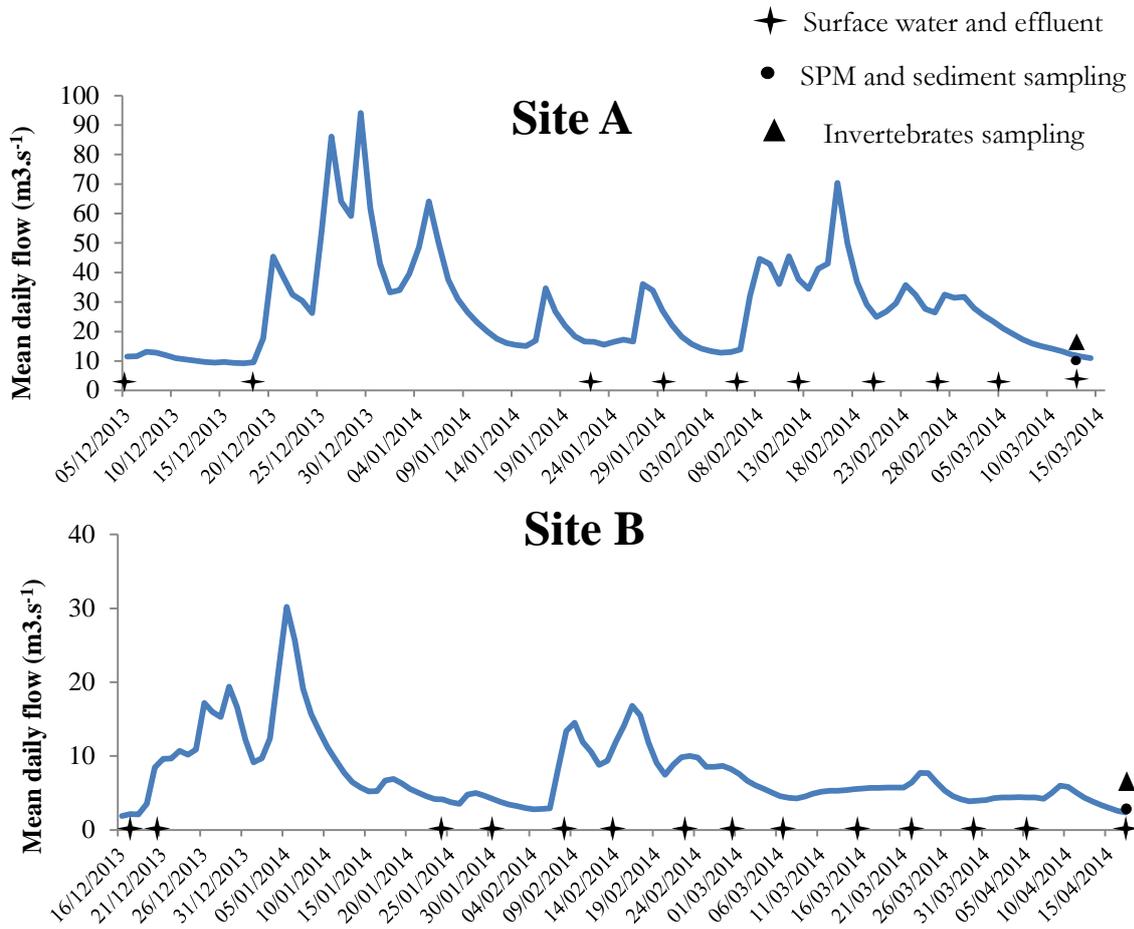


Figure 6-2 Loue river flow (site A) and Doubs river flow (site B) during the sampling period (from December 2013 to March 2014) of surface water, effluent, sediment, SPM and invertebrates

6.2.3 Gammaridae collection

Gammarids were collected with a Surber sampler (500 µm mesh width). For each sampling site, three replicates were sampled in the three preferential living substrates of gammarids: bryophytes (*Fontinalis* sp), gravel (particle size between 2 mm and 2 cm), and OM. Samples were kept in 90 % ethanol. Animals were separated from substrates by hand, identified, counted and finally kept in ethanol. Individuals were examined using a Wild M3B microscope (Leica) for species identification. The species were identified as *G. fossarum* and distinguished from *G. pulex* by the length of the inner ramus (Roux 1970). Population structure was determined for each sample. Individuals were classified into four developmental stages: juveniles (< 3 mm), young immature (3-6 mm), adults (6-9 mm) and

old adults (> 9 mm) (Roux 1970). Abundances were recorded in each sample, and calculation of densities at the site-level was done using the average densities in each substrate.

6.2.4 Analyses

In SPM and sediment samples, dry matter (DM), pH, Kjeldahl nitrogen, phosphorus and TOC were measured according to European and French standards NF EN 12880, NF EN 12176, NF EN 25663, NF EN ISO 11885 and NF X31-109 respectively. In surface water and effluent samples, TOC, conductivity, SPM and pH were measured according to NF EN 1484, NF EN 27888, NF EN 872 and NF EN ISO 10523 respectively.

Sixteen PAHs, naphthalene (NAP), acenaphthene (ACE), acenaphthylene (ACY), fluorene (FLU), phenanthrene (PHE), anthracene (ANT), fluoranthene (FLT), pyrene (PYR), benzo[a]anthracene (BaANT), chrysene (CHY), benzo[b]fluoranthene (BbFLT), benzo[k]fluoranthene (BkFLT), benzo[a]pyrene (BaPYR), dibenzo[a,h]anthracene (DahANT), indeno[1,2,3-cd]pyrene (IcdPYR), benzo[g,h,i]perylene (BghiPL) were purchased from Supelco Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and Interchim (Montluçon, France) for calibration. n-hexane Distol, and other of products for organic trace analysis, were obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France).

PAH extraction: PAH extraction was carried out according to Morin-Crini et al. (2015). PAHs were extracted from solid samples (sediment, SPM) with n-hexane by pressurized liquid extraction method (SpeedExtractor E-914 system from Büchi, Rungis, France). For liquid samples (freshwater, WWTP effluent), a liquid-liquid extraction in n-hexane was used under magnetic stirring for 30 min. In both cases, the extracts were concentrated using a Syncore Analyst (Büchi, Rungis, France) that prevents evaporation of solvent to dryness.

PAH analysis: Extracts were analyzed using a GC-MS/MS analyser (Agilent, Massy, France) which included a 7890A GC system, a 7000 GC triple quadrupole mass spectrometer and an 80 GC Combipal autosampler equipped with a (5 % phenyl)-methylpolysiloxane HP5MS column (30 m x 0.25 mm i.d, 0.25 μ m film thickness, Agilent 19091J-433).

Extraction and detection methods have been validated for all samples in regard to some parameters such as linearity, limits of detection or quantification (LOD or LOQ), precision (relative standard deviation) and trueness (recoveries) (Crini et al. 2014; Crini et al. 2015). Quality controls (QC) were made every 10 samples. The values are situated in the range 93-107 % and 92-102% of the expected value, for suspended matter or sediment samples and water samples respectively. When QC values were not situated in the range 80-120% of the expected value, the calibration was achieved again and the samples reanalyzed. For estimation of recoveries, samples were spiked at different concentration levels

of PAHs with a standard solution (ampoule of PAH mixture at 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, EPA 610, Restek, Lisses, France). Given that “blanks”, which were simultaneously performed, presented weak values for all PAHs (<LOD) no subtraction was made.

6.2.5 Diagnostic ratios

The sources of the PAHs found in the environment were usually anthropogenic sources. Overall, PAHs come from two major sources: fuel combustion (pyrolytic) or petroleum related material (petrogenic). Molecular ratios have been developed for interpreting PAH composition and determining the possible sources (Yunker et al. 1996; Qi et al. 2012). The abundance ratio of 2-3 ring hydrocarbons to 4-6 ring hydrocarbons $\text{ANT}/(\text{ANT}+\text{PHE})$, $\text{FLU}/(\text{FLU}+\text{PYR})$, $\text{InP}/(\text{InP}+\text{BghiPL})$ and $\text{BaANT}/\text{BaANT}+\text{CHY}$ are usually used. A ratio $\text{ANT}/(\text{ANT}+\text{PHE}) < 0.1$ indicated a petroleum source while a ratio > 0.1 is related to dominance of combustion. Moreover, a ratio of $\text{FLU}/(\text{FLU}+\text{PYR}) < 0.5$ indicates a petrogenic origin, while a the ratio > 0.5 is characteristic of a pyrolytic origin. A ratio $\text{IP}/(\text{IP}+\text{BghiPL}) > 0.5$ suggests wood and coal combustion. If this ratio is < 0.2 , it corresponds to a discharge of petroleum, while between 0.2 and 0.5 the ratio is characteristic of petro-chemical fuel combustion.

6.2.6 PAHs toxicity

The European Water Framework Directive (2000/60/CE) declares PAHs as priority substances and proposed Environmental Quality Standards (EQS) extrapolated from experimental databases of compound toxicity which range from 2.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ for NAP to 0.002 $\mu\text{g L}^{-1}$ for IcdPYR for aqueous phase (EU 2005; EU 2008).

However, these EQS concerned only seven PAHs, occurring especially in the water phase. Consequently we consider it is not fully appropriate to assess the overall toxicity of PAHs. For sediment samples, eight Predicted No Effect Concentration (PNEC) were derived from PNEC for surface water or corresponded to PNEC for soils. Yet, sediment quality guidelines (SQG) have been developed for freshwater ecosystems and usually used for sediment quality and ecological risk assessment. Based on field and laboratory data, guide values for PAHs have been provided by different authors (MacDonald et al. 2000; Burton 2002). In this study we used (i) the Threshold Effect Concentration (TEC) which is the concentration below which adverse effects were expected to occur only rarely for PAHs in sediments, (ii) the Probable Effect Concentration (PEC) which represents the chemical content above which harmful effects could be observed (MacDonald et al. 2000), and (iii) the PEL HA_{28} which represents the probable effect level for *Hyallela azteca* (US EPA 1996).

6.2.7 Statistics

Correlations were performed and tested using Spearman’s rank correlation between the PAH contents in SPM and sediment. Statistical analysis was performed on R 2.15.1 software.

6.3 Results and discussion

6.3.1 Conductivity, TOC, OM, and pH analyses

Conductivity of surface water ranged from 468 to 504 $\mu\text{S cm}^{-1}$ in the Loue river and from 398 to 426 $\mu\text{S cm}^{-1}$ in the Doubs river (Tableau 6-2). Such values correspond to those usually found in French Jura chalk streams (Nisbet and Verneaux 1970). WWTP effluents displayed a two-fold higher conductivity. In the Loue river, TOC ranged from 1.24 to 1.68 mg C L^{-1} and were lower than in the Doubs river where they varied from 2.21 to 2.58 mg C L^{-1} . SPM ranged from 3.40 to 6.83 mg L^{-1} for both sites. pH values were slightly alkaline and similar in both rivers. In the Loue river, a slight increase of TOC, conductivity and SPM were observed downstream of the WWTP discharge. In the WWTP A effluent, TOC and SPM were higher than those from WWTP B, although conductivity and pH were in the same range.

Tableau 6-2 TOC, Conductivity, SPM content and pH in surface water and effluent samples taken from the experimental sites (Loue river: La, Lb, Lc; Doubs river: Da, Db, Dc), mean (standard error).

Parameters	Site A				Site B			
	La	Effluent A	Lb	Lc	Da	Effluent B	Db	Dc
TOC (mg C L^{-1})	1.24 (0.04)	10.92 (0.85)	1.68 (0.16)	1.25 (0.04)	2.21 (0.07)	7.97 (0.61)	2.30 (0.09)	2.58 (0.27)
Conductivity ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	469 (8)	926 (65)	504 (22)	468 (8)	398 (4)	983 (69)	410 (4)	426 (13)
SPM (mg L^{-1})	4.65 (0.51)	9.26 (1.91)	6.83 (0.99)	4.20 (0.52)	3.77 (0.10)	6.02 (0.15)	3.40 (0.10)	4.73 (0.29)
pH	8.23 (0.02)	7.50 (0.06)	8.23 (0.02)	8.26 (0.02)	8.40 (0.02)	7.39 (0.03)	8.39 (0.02)	8.34 (0.03)

DM of SPM and sediment in the Loue river (Tableau 6-3) were in the same range (from 601 to 668 g kg^{-1}), whereas DM in the Doubs river sediment was higher (348 to 592 g kg^{-1}) than in SPM (296 to 310 g kg^{-1}). OM was the lowest in sediment in the Loue river (2.7 to 2.9 % DM) and the highest in SPM in the Doubs river (14.6 to 15.7% DM). The same trend was observed for TOC.

Tableau 6-3 TOC, Conductivity, OM, DM and pH in SPM and sediment samples taken from the experimental sites (Loue river: La, Lb, Lc; Doubs river: Da, Db, Dc)

Parameters	Site A			Site B		
	La	Lb	Lc	Da	Db	Dc
SPM						
TOC (C kg ⁻¹ DM)	29.6	21.1	20.9	69.1	103	103
Organic matter (% DM)	4.4	5.9	3.3	14.6	15.5	15.7
Dry matter (g kg ⁻¹)	643	601	668	301	310	296
pH	7.5	7.3	7.5	8.4	8	7.9
Sediment						
TOC (C kg ⁻¹ DM)	14.1	11.6	8.66	22.8	20.9	74.7
Organic matter (% DM)	2.9	3.3	2.7	3.9	4.5	11.8
Dry matter (g kg ⁻¹)	661	657	633	553	592	348
pH	7.3	7.7	8.1	7.8	7.6	7.5

6.3.2 PAHs in surface water

Concentrations of PAHs in surface water are shown in Figure 6-3. In December 2013, the sum of 16 PAH concentrations ($\sum_{16}\text{PAHs}$) found in the surface water from the Loue and Doubs river were in the same range and varied from 74.08 to 93.07 ng L⁻¹ found respectively at Lb and Lc. No difference was observed between upstream and downstream of the WWTP. For both rivers, $\sum_{16}\text{PAHs}$ measured during the second campaign (March-April 2014) were higher than those previously measured in December 2013. In the Loue river, $\sum_{16}\text{PAHs}$ in March 2014 ranged from 73.52 to 358.91 ng L⁻¹ respectively found at La and Lb. In the Doubs river, $\sum_{16}\text{PAHs}$ was also markedly higher than during the first campaign and ranged from 273.92 to 728.02 ng L⁻¹. For the second campaign, $\sum_{16}\text{PAHs}$ was higher in both downstream sites compared to upstream sites, indicating a marked increase of $\sum_{16}\text{PAHs}$ downstream of the WWTP discharge. 2-ring and 3-ring PAHs namely with a low molecular weight were the most abundant PAHs in surface water. For the winter sampling (December 2013), PHE, FLT and PYR showed the highest levels in the Loue river, whereas NAP displayed the highest concentration in the surface water from the Doubs river. During the second campaign (March – April 2014), low molecular weight PAH levels were much higher with PHE concentrations reaching 200 ng L⁻¹ in the Loue river, FLU and ACE also being abundant. In spring 2014, surface water from the Doubs river was especially rich in PHE, FLU, NAP and ACE and to a lesser extent in PYR, FLT and ANT. In both rivers, PHE and FLU were predominant for the second campaign. Interestingly, except for NAP in the

Doubs river, winter samples in both rivers displayed lower PAHs levels than spring samples. Furthermore PAH concentrations in downstream samples were always higher than upstream concentrations.

\sum_{16} PAHs were highest for the second campaign in spring, and in the WWTP B site (274 to 728 ng L⁻¹), but the major compounds were the same for both sites and campaigns. Our results showed that \sum_{16} PAHs were low compared to other rivers. Indeed in Asia, \sum_{16} PAHs ranged from 174 to 17050 ng L⁻¹ (Shi et al. 2005; Maskaoui et al. 2002), 193 to 1790 ng L⁻¹ (Qi et al. 2014). But direct comparison with data from the literature is not easy due to differences in the phase analyzed, the analytical methods used, and the compounds considered in each study. The higher PAH concentrations found in the Doubs and Loue rivers than in WWTP effluents can presumably be accounted for by other sources like untreated sewage discharge, atmospheric deposition and surface runoff. Moreover, WWTPs may also emit substituted PAHs (SPAHS), not measured in this study, such as oxygenated-PAHs (OPAHS), nitrated-PAHs (NPAHS), and methyl-PAHs (MPAHS). NPAHS and OPAHS may be formed from the oxidation of PAHs by chemical and/or microbiological processes (Bamford and Baker 2003). Qiao et al (2014b) measured OPAH concentration in water samples in the Haihe River System in China and found values ranged from 0.06 to 0.19 $\mu\text{g L}^{-1}$ and from 0.41 to 17.98 $\mu\text{g g}^{-1}$ in dissolved and particulate phase respectively.

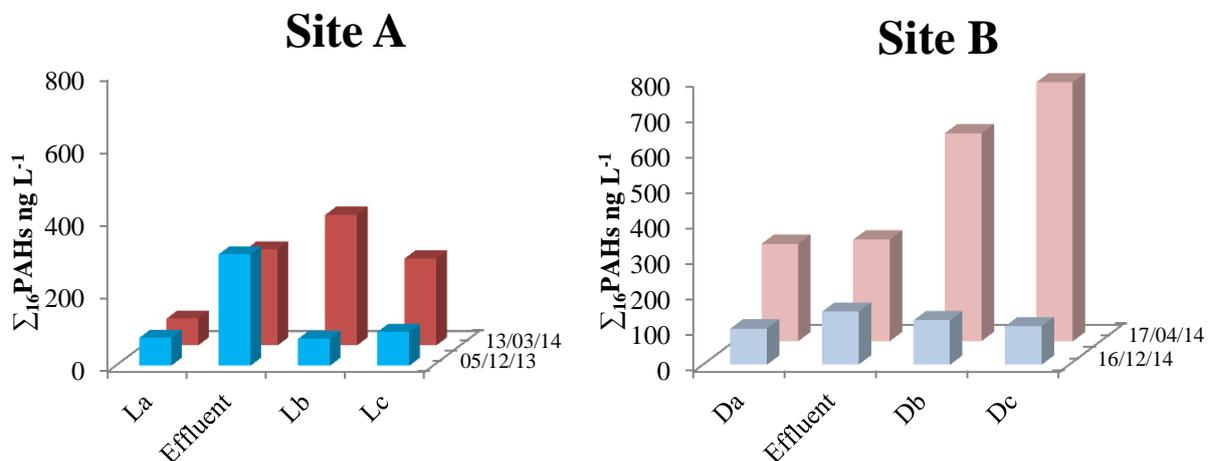


Figure 6-3 Sum of the 16 US EPA PAH concentrations (\sum_{16} PAHs, ng L⁻¹) in effluent and surface water from the Loue (site A; La, Lb and Lc) and the Doubs river (site B; Da, Db and Dc), sampled in winter 2013 and spring 2014

6.3.3 PAHs in WWTP effluent

\sum_{16} PAHs in the WWTP A effluent ranged from 94.72 ng L⁻¹ to 306.29 ng L⁻¹ during the investigation period with a mean value of 182.6 ± 72.3 ng L⁻¹ (Figure 6-3). \sum_{16} PAHs in the WWTP B effluent was close to WWTP A varying from 85.44 ng L⁻¹ to 313.10 ng L⁻¹ with a mean value of 176.64 ± 74.2 ng L⁻¹. So, \sum_{16} PAHs in WWTP A and B effluents were very similar whatever the period of sampling. In effluent samples, low molecular weight PAHs were especially abundant, with PHE displaying the highest concentration.

In effluent samples from WWTP A and WWTP B, \sum_{16} PAHs ranged from 85 to 313 ng L⁻¹ and were lower than concentrations usually described in the literature: \sum_{16} PAHs ranged from 182 to 241 ng L⁻¹ for a Chinese WWTP (Qiao et al. 2014), 245 to 404 ng L⁻¹ in WWTPs of Beijing (Qi et al. 2014), 418 ± 181 ng L⁻¹ in a WWTP in Canada (Pham and Proulx 1997) to 1120 ng L⁻¹ in an Italian WWTP respectively (Buseti et al. 2006).

6.3.4 PAHs in suspended particulate matter

In the Loue river, \sum_{16} PAH in SPM was higher at downstream stations. PAH contents ranged from 749.62 ng g⁻¹ upstream of the WWTP to 1344.78 ng g⁻¹ downstream. FLT, CHY, PYR, and to a lesser extent BaANT were found in higher concentrations than other PAHs (Tableau 6-4). In the Doubs river, \sum_{16} PAHs were in the same range for the three stations (Da, Db, Dc) and varied from 2353.69 ng g⁻¹ to 2463.04 ng g⁻¹. Downstream PAHs levels were equal or slightly higher than in upstream samples. Again, as in the Loue river, FLT, CHY, and PYR were the dominant PAHs. Whatever the location with respect to WWTP, PAHs in the Doubs river SPM were markedly higher than in the Loue river.

\sum_{16} PAHs measured in SPM samples in the Loue and the Doubs rivers (749 to 2463 ng g⁻¹) were in accordance with those reported in other studies. In the Dalio River watershed in China, Guo et al. (2007) measured \sum_{16} PAHs ranging from 317.5 to 23851.7 ng g⁻¹. Shi et al. (2005) found \sum_{16} PAHs ranged from 938 to 64 200 ng g⁻¹ in the Tianjing stream China. In the Seine River and Estuary in France, Fernandes et al. (1997) measured \sum_{16} PAHs from 1000 to 14000 ng g⁻¹. \sum_{16} PAHs in SPM were differently impacted by WWTP discharges. Indeed, we observed an increase of \sum_{16} PAHs downstream of the discharge from the smaller WWTP (site A along the Loue river). In contrast, the larger WWTP (site Db and Dc along the Doubs river) did not add PAHs compared to the upstream site Da.

6.3.5 PAHs in sediment

In the Loue river, the highest \sum_{16} PAH was measured in Lb (1869 ng g⁻¹), whereas PAH content in Lc (691 ng g⁻¹) was the lowest. As in SPM samples, FLT, CHY and PYR were the major compounds

found in sediment (Tableau 6-4). In the Doubs river, the lowest $\sum_{16}\text{PAH}$ in sediment (2003 ng g^{-1}) was measured in the first downstream site (Db). The highest PAH content (3626 ng g^{-1}) was observed in Dc. As SPM, 4-ring and 5-ring PAHs, especially FLT, PYR and CHY were the most abundant in sediment samples whatever the location also $\sum_{16}\text{PAHs}$ in sediments were higher downstream of the WWTP A. PAH contents measured in far downstream samples (Dc) were also higher than at the upstream station (Tableau 6-4).

Tableau 6-4 PAH concentrations (ng g^{-1}) in SPM and sediment samples taken upstream and downstream of the WWTPs A and B, and sediment Quality Guidelines for PAHs: TEC (Threshold Effect Concentration) and PEC (Probable Effect Concentration) were from MacDonald et al. (2000). EQS refer to Environmental Quality Standards from the European Water Framework Directive (2000/60/CE)

	NAP	ACY	ACE	FLU	PHE	ANT	FLT	PYR	BaANT	CHY	BbFLT	BkFLT	BaPYR	IcdPYR	dBahANT	BghiPL	\sum_{16} PAHs
SQG (ng g^{-1})																	
TEC	176			77.4	204	57.2	423	195	108	166	1290		150		33		1610
PEC	561			536	1170	845	2230	1520	1050	1290			1450				22800
EQS	2400					100	100					30	50	2		2	
SPM																	
La	< LQ	10.2	10.0	10.1	54.1	13.0	116.6	89.6	66.1	134.1	69.0	41.3	43.6	29.7	12.0	33.0	749.6
Lb	< LQ	11.9	8.8	12.3	92.0	33.4	262.1	161.7	142.7	259.4	111.0	64.4	68.2	40.1	17.3	42.3	1344.8
Lc	< LQ	11.0	9.0	11.6	94.8	23.0	263.2	175.1	105.2	193.3	102.8	61.3	67.8	48.8	20.5	53.6	1258.1
Da	< LQ	14.8	15.7	26.7	173.4	40.2	489.3	294.9	180.9	270.1	207.0	155.6	139.6	120.2	50.2	157.8	2353.7
Db	< LQ	16.2	31.5	37.7	184.2	39.7	478.2	283.8	198.4	305.2	216.6	170.5	141.5	92.0	33.7	109.8	2356.1
Dc	< LQ	17.7	14.8	21.4	159.3	38.8	497.5	294.3	234.2	355.5	250.4	177.0	155.2	95.9	10.9	123.1	2463.0
Sediment																	
La	< LQ	10.8	6.5	7.7	71.7	17.7	205.5	137.9	105.4	199.1	82.8	53.8	54.8	34.9	14.2	36.5	1056.4
Lb	< LQ	14.6	8.3	10.1	97.3	23.7	324.9	211.2	197.2	366.4	191.4	113.1	113.4	69.2	31.0	79.9	1868.8
Lc	< LQ	10.3	5.2	5.3	40.5	12.5	124.5	88.5	63.7	126.0	58.9	34.8	38.4	26.4	10.5	28.1	690.7
Da	< LQ	15.3	11.5	19.1	177.0	37.9	537.2	314.6	183.0	276.5	209.3	163.2	154.0	161.4	60.9	249.5	2587.7
Db	< LQ	15.7	10.3	14.4	122.9	39.8	408.6	240.9	159.2	232.6	173.3	129.8	124.7	112.2	43.5	157.4	2002.6
Dc	< LQ	23.3	21.5	32.0	255.5	77.0	600.0	458.7	278.2	398.9	318.0	230.2	224.8	182.0	69.9	247.3	3625.6
LQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	31.3	1.8	3.3	2.7	14.9	2.8	7.6	5.2	0.7	2.6	2.0	2.6	0.8	1.1	0.2	1.1	

\sum_{16} PAHs in sediment sampled in the Loue and Doubs rivers ranged from 691 ng g⁻¹ to 3626 ng g⁻¹. Kanzari et al. (2014) reported PAH contents of 4235 ng g⁻¹ downstream of the WWTP of Marseille which is the largest WWTP in Europe (1 500 000 PE). However, the lowest (572 ng g⁻¹) and mean contents measured (1966 ± 1104 ng g⁻¹) were in the same range as the concentrations reported in this study. \sum_{16} PAHs in sediments of both rivers were higher than those (81, 275 and 334 ng g⁻¹) reported respectively by Doong and Lin (2004), Guo et al. (2007) and Maskaoui et al. (2002). But, several studies reported very highly contaminated sites with \sum_{16} PAHs in sediment between 344 600 and 1 943 000 ng g⁻¹ in Spain and China respectively (Viguri et al. 2002; Shi et al. 2005). Regardless of the amounts released, the PAHs content found in sediments may be highly influenced by resuspension of sediments occurring during flood events.

The seasonal changes in \sum_{16} PAHs may be related to changes in the river flow and in PAH inputs from different sources including domestic and industrial wastewater discharge, runoff and stormwater. The highest PAH concentrations in water, SPM and sediment were found in site B reflecting emissions from the urban and industrial areas of Pontarlier town, whereas the Loue river watershed corresponds to a rural area. This is accordance with conclusions from Dong et al. (2009), who reported that industrial activity and traffic density (road dust) may impact PAH contamination.

Moreover, a significant positive correlation ($p < 2,2 \times 10^{-16}$, Spearman $r = 0,93$) was found between SPM and sediment \sum_{16} PAHs (Figure 6-4). This correlation shows that SPM may be used to monitor PAH contamination when river flow conditions (turbulence, re-suspension) and other phenomena (discharges, runoff events) impede or disturb sedimentation. This may be of great interest to investigate PAH contamination in the absence of sediment. Furthermore, SPM samples represent an integrating matrix which is able to provide meaningful data about the overall contamination over a time span, while surface water only provides instant data.

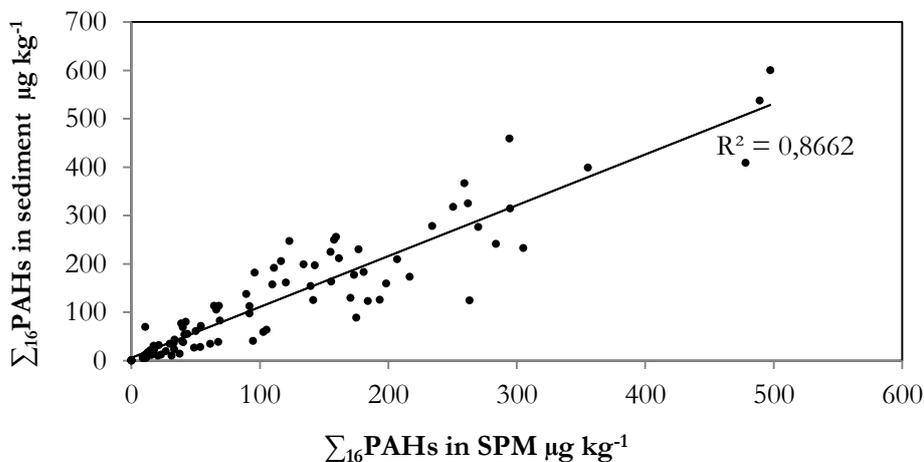


Figure 6-4 Correlation between PAHs contents (ng g⁻¹) in SPM and sediment samples for both sites

6.3.6 PAH toxicity

For Loue river water samples, no PAH levels exceeded EQS in water and effluent, whereas winter samples taken downstream of the WWTP B exceeded EQS slightly for IcdPYR and BghiPL. For both sites, all water and effluent samples were below acute and chronic toxicity values found in the literature. So, according to these guideline values, PAH concentrations measured in surface water and effluent samples for this first campaign were not considered toxic for aquatic taxa.

In the Loue river, the sediment downstream of the WWTP discharge (Lb) exceeded TEC values for PYR, BaANT and CHY. Moreover, SPM sampled downstream of the WWTP discharge (Lb and Lc) were above the TEC values for BaANT and CHY. However, $\sum_{16}\text{PAHs}$ was above TEC ($1610 \mu\text{g kg}^{-1}$) only in the sediment downstream of the WWTP (Lb). In the Doubs river, all the SPM and sediment samples were above the TEC values and also exceeded the PEL-HA₂₈ for FLT. SPM and sediment samples were also higher than the TEC for PYR, BaANT and CHY. Moreover, for sediment samples taken far downstream of the WWTP (Dc), PHE, ANT, and BaPYR concentrations were above TEC values. Finally, the concentration of dBahANT was above TEC values for all sediment samples and for SPM sampled upstream of the WWTP (Da).

6.3.7 Sources of PAHs

Several level ratios of interest were computed in SPM and sediment samples from the Loue and the Doubs rivers. The $\text{ANT}/(\text{ANT}+\text{PHE})$ ratio in SPM and sediment ranged from 0.19 to 0.27 for the Loue river and from 0.18 to 0.24 for the Doubs, suggesting a combustion source for the origin of the aquatic system contamination. The ratio of $\text{FLT}/(\text{FLT}+\text{PYR})$ in SPM and sediments for both sites were above 0.5 that is also consistent with a combustion source. Furthermore, all samples of SPM and sediments had a ratio of $\text{IP}/(\text{IP}+\text{BghiPL})$ between 0.39 and 0.49 that could correspond to fossil oil combustion (Yunker et al. 2002). Some diagnostic ratios have also been used to differentiate various types of emissions. Comparison of $\text{FLT}/\text{FLT}+\text{PYR}$ and $\text{IP}/\text{IP}+\text{BghiPL}$ ratios showed a cluster of all samples that resembles those described for coal tar and bituminous coal combustion (Figure 6-5).

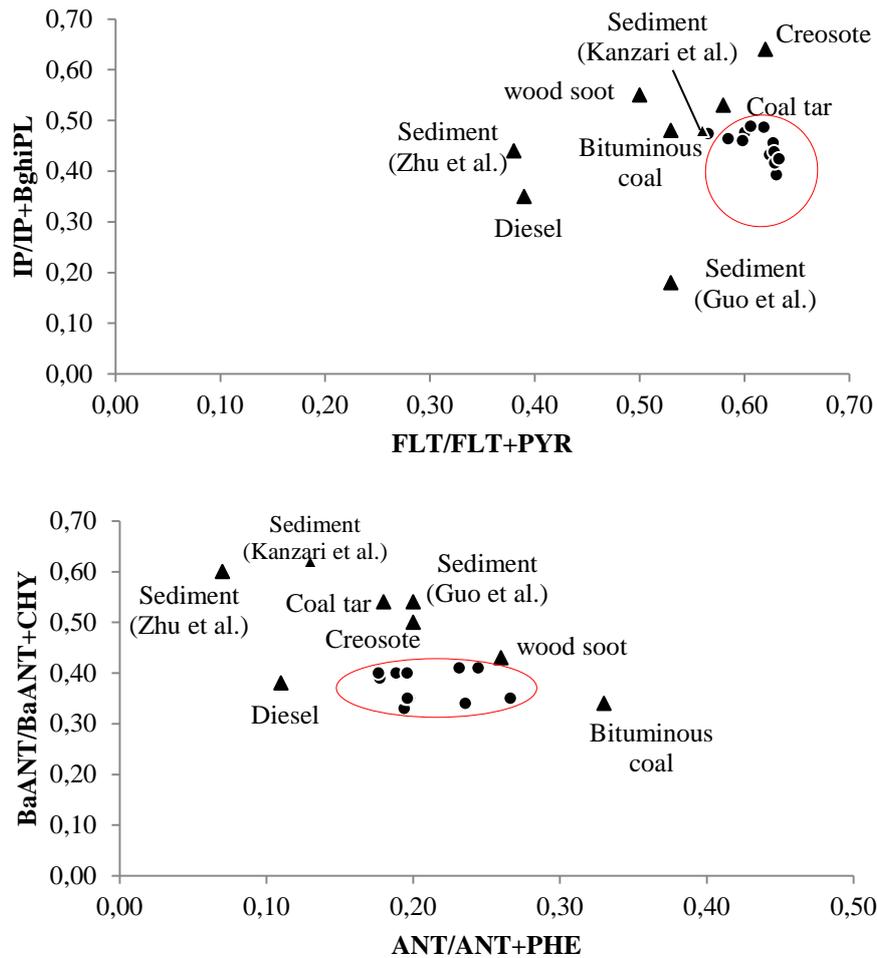


Figure 6-5 Comparison of FLT/FLT+PYR versus IP/IP+BghiPL ratios, and ANT/ANT+PHE versus BaANT/BaANT+CHY. Data from the present study (dots) and the literature (triangles; data from Kanzari et al. 2014; Zhou et al. 1999; Guo et al. 2007; Yunker et al. 1996)

These results are consistent with those from Kanzari et al. (2012) who reported that the sources of hydrocarbons in the sediments were markedly more pyrolytic rather than petrogenic.

Figure 6-5 also shows that our samples are located in single cluster. Furthermore, sites upstream and downstream of the WWTPs cannot be discriminated using such ratios. Consequently, we hypothesize that PAH concentrations in both studied rivers may reflect the overall contamination of the catchment basin and are not especially dependent of the effluent discharges from the WWTPs.

6.3.8 Gammarids population density

Population structures of *Gammaridae* upstream and downstream of both WWTPs sites were different (Figure 6-6). In the Loue river, densities were 987 ind.m⁻², 433 ind.m⁻² and 609 ind.m⁻² for La, Lb and Lc stations. Lowest densities for all developmental stages were found in the downstream stations (Lb and Lc) of the WWTP discharge. The smallest individuals (juveniles) were the most

abundant category for all stations, and composed 50 %, 64 % and 40 % of the population for La, Lb and Lc stations respectively. Then, immature were the second most abundant class, followed by adults and old adults. In the upstream station (La), 70 % of individuals occurred in bryophytes, then 18 % in OM and 12 % in gravel. In downstream stations total densities in OM increased (38 % for Lb and 54 % for Lc) compared to the upstream station (18 % for La). For the Doubs river, densities were 4211 ind.m⁻², 5524 ind.m⁻² and 5409 ind.m⁻² for Da, Db and Dc stations. The lowest density was found upstream (Da) of the WWTP discharge. Juveniles (< 3 mm) were the most abundant category for all stations and their abundance increased from the upstream to the downstream stations. Immature class (3 to 6 mm) was stable for all stations, while the abundance of the adult class decreased from upstream to downstream stations (31 %, 20 % and 15 % for Da, Db and Dc respectively). In upstream stations most individuals were in bryophytes (59 %), then in OM (36 %) and in gravel. While for downstream stations Db and Dc, individuals were mostly in OM, then in bryophytes and gravel.

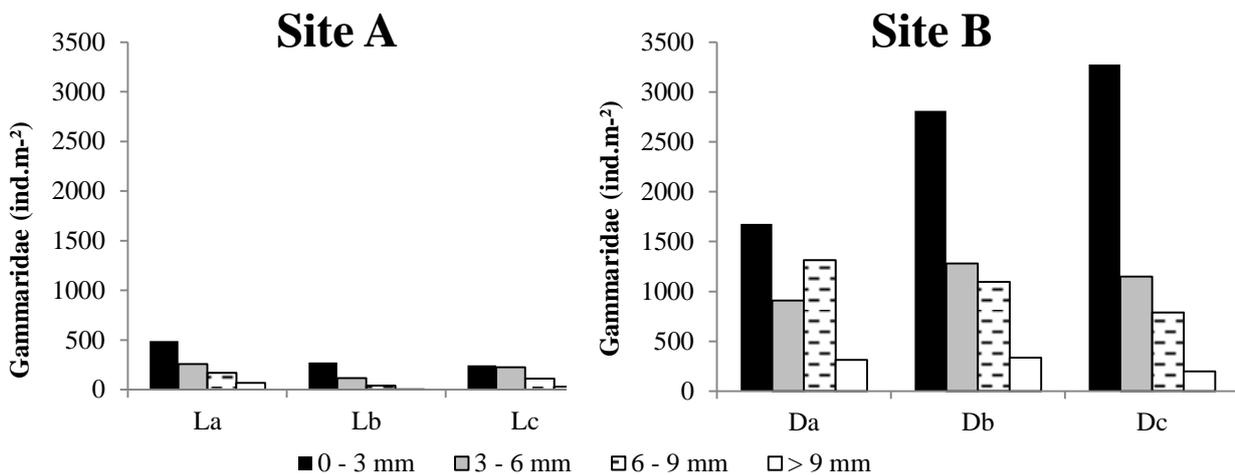


Figure 6-6 Density of Gammaridae (ind m⁻²) upstream and downstream of the WWTPs for each developmental stage: juveniles (< 3 mm) in black, immature (3-6 mm) in grey, adults (6-9 mm) in dotted lines and old adults (white)

We observed differences in the population structure of gammarids upstream and downstream of the WWTP discharge points for both sites. Downstream of WWTP A discharge, we observed a decrease of gammarid abundance in the Loue river, whereas there was an increase downstream of the WWTP B in the Doubs river. This increase was similar to those reported in the Korsch stream in Germany (Ladewig et al. 2006). These could be due to a greater nutrient and OM input from the WWTP that could lead to higher food supply. Moreover, even if several PAHs measured in our study in SPM and sediment were above TEC values, the high level of OM may decrease the bioavailability of the PAHs and other potential contaminants. However, the decrease of gammarid densities observed downstream

of the WWTP A is consistent with similar results from other European streams where only a few hundred individuals per square meter were recorded downstream of WWTP discharge (Schirling et al. 2005; Ladewig et al. 2006; Kosmala et al. 1999). In particular, Kosmala et al. (1999) found biological degradation downstream of a WWTP based on biological indices. In our study, the decrease of density is observed in juvenile stages, and could be related to a higher sensitivity of juveniles to contaminants as reported previously (McCahon and Pascoe 1999; Adam et al. 2010). Furthermore, the low densities of gammarids found in the Loue river may be related to a greater bioavailability of PAHs induced by low OM contents compared with the Doubs river. In such conditions, PAH contents in sediment and SPM above TEC values may result in juvenile mortality.

The sediment toxicity may also be enhanced by the presence of other chemicals in mixture like pesticides and metals. In fact, chemicals in mixtures may interact inducing unexpected toxicities in gammarids (Charles et al. 2014). Moreover, Xie et al. (2006) showed potential toxic interactions between metals and modified PAHs. The decrease in the abundance of adults may be a consequence of avoidance behaviour by adults which could better detect contaminated areas with their chemosensory sensilla (De Lange et al. 2006). For example, *G. pulex* may avoid PAH-spiked sediments and prefer clean sediment (De Lange et al. 2006). Therefore, energy spent resisting these direct and indirect effects of contaminants reduce the energy left for regular processes like growth and reproduction.

6.4 Conclusion

Investigations performed upstream and downstream of both studied WWTPs, showed that WWTP discharges may contribute to PAH contamination in the Loue and the Doubs rivers. However, PAHs found in both rivers reflected the overall contamination of the catchment basin and were not especially dependent on the effluent discharges from the WWTPs. Our results show that when based on surface water samples, the assessment of freshwater quality did not provide evidence for marked PAH contamination in either of the rivers studied. The quality assessment corresponds to what could be qualified as “good ecological status” with respect to the European Water Framework Directive (2000/60/CE). However, using SPM and sediment samples, we found PAH contents exceeding available sediment quality guidelines. At the same time, disturbances in gammarid population structure were observed although it was not possible to demonstrate cause and affect relationships, due to confounding factors. Furthermore, we evidenced a positive linear correlation between SPM and sediment PAH contents showing that SPM represents an integrating matrix able to provide meaningful data about the impact of WWTP discharge and the overall contamination over a given time span. We conclude that sediment and SPM are relevant matrices should be considered in regulation aspects to assess the overall PAH contamination in aquatic ecosystems.

7 Chapitre 4 : Variabilité temporelle des impacts de STEP sur la contamination des MES dans les rivières calcaires

Dans le chapitre 3, nous avons montré la pertinence d'analyser les phases particulières pour l'étude de la contamination en HAP du Doubs et de la Loue. Nous allons maintenant évaluer l'intérêt d'utiliser les MES pour estimer la qualité de l'eau vis à vis de différentes substances parmi les familles de molécules ayant des affinités pour la phase particulière, ainsi que la variabilité temporelle de l'impact des STEP sur la contamination des MES par ces différentes substances. Notre choix s'est porté sur les HAP et le phosphore en raison de leurs origines et de leurs caractéristiques différentes. En effet, les HAP sont des composés organiques constitués de deux ou plusieurs noyaux aromatiques condensés, ce qui les rendent très hydrophobes. Les HAP sont principalement produits à la suite de la combustion incomplète de la matière organique (origine pyrolytique). Alors, que le phosphore, indicateur majeur de la contamination domestique, est principalement issu de rejets métaboliques (urines, fèces) et de détergents. Dans les écosystèmes aquatiques, le phosphore se trouve sous différentes formes inorganiques et organiques, dissoute, colloïdale et/ou particulière, et présente une forte affinité pour les MES et les sédiments. Nous souhaitons déterminer dans quelle mesure l'utilisation des MES peut permettre d'évaluer la qualité de l'eau concernant des familles de molécules ayant des affinités pour la phase particulière.

Les objectifs de ce chapitre sont :

- d'analyser la variabilité temporelle des concentrations en HAP et en phosphore dans les MES et les sédiments
- d'étudier les impacts des STEP sur la contamination des MES par les HAP et le phosphore
- de montrer l'intérêt d'utiliser les MES pour la surveillance de la qualité de l'eau

L'étude de la variabilité de la contamination des MES sur le site d'étude de la Loue fait l'objet d'un article soumis pour publication. Le site du Doubs a été étudié dans une deuxième partie de chapitre.

7.1 Rivière Loue : Article 3

Résumé de l'article en révision dans Water, Air, & Soil Pollution

Au cours de l'année 2014, l'échantillonnage des MES et des sédiments a été réalisé au cours de cinq campagnes de prélèvements dans la Loue en amont et en aval de la STEP d'Ornans. Les concentrations en HAP dans les MES et les sédiments sont du même ordre de grandeur que des échantillons prélevés en aval de grandes agglomérations (du μg au mg kg^{-1}) bien que le bassin versant ne soit pas densément peuplé. Un impact significatif de la STEP d'Ornans sur la contamination des MES par les HAP a été

démonstré (Anova à mesures répétées, $p < 0,05$). Les sources de contamination des HAP dans le bassin sont multiples et s'orientent vers une contamination d'origine urbaine (lessivage des routes suite aux dépôts atmosphériques et solides, érosion des routes). Par ailleurs, bien qu'il y ait une variabilité temporelle des concentrations en HAP et un impact de la STEP sur les concentrations en HAP dans les MES, cette étude a montré de très grandes similitudes analytiques pour toutes les stations et les campagnes d'échantillonnage, indiquant des origines similaires pour ces contaminations. Ceci suggère que les STEP sont vraisemblablement des points de concentrations des flux de HAP circulant dans le bassin versant. Par ailleurs, l'analyse des résultats n'a pas permis de mettre en évidence d'impact de la STEP sur la contamination des MES en phosphore. Toutefois les concentrations en phosphore dans les MES varient selon les campagnes d'échantillonnage et sont significativement plus élevées pour les campagnes de mai, juin et décembre. La variabilité des concentrations en phosphore des MES échantillonnées en amont et aval des STEP est principalement influencée par la variabilité du régime hydrologique et la variabilité des sources diffuses du bassin telles que les lessivages des sols après épandages de lisiers et fumiers et/ou la remobilisation des algues suite à des développements excessifs (biodégradation et libération de nutriments). Cependant, des sources localisées et continues tel que le rejet de la STEP d'Ornans contribuent en outre à l'apport de phosphore dissous et particulaire. En conclusion, nous considérons que les MES constituent une matrice d'intérêt pour évaluer les contaminations. Elles fournissent des informations complémentaires à celles fondées sur les sédiments et du fait de leur disponibilité plus grande et de leur "instantanéité" elles permettent d'aborder l'étude des variabilités temporelles des contaminations chimiques à une échelle locale (comparaison amont / aval d'un point d'intérêt) et à celle du bassin versant tout entier.

How to assess temporal changes of point and diffuse contamination in a rural karstic watershed?

Relevance of suspended particulate matter (SPM) for efficient monitoring

Axelle Chiffre¹, François Degiorgi¹, Nadia Morin-Crini¹, Audrey Bolard¹, Etienne Chanez¹, Pierre-Marie Badot¹

¹ University of Bourgogne Franche-Comté, Chrono-environnement, UMR 6249 UFC/CNRS usc INRA, 16 route de Gray, 25030 Besançon cedex, France

Abstract

Waste water treatment plants (WWTP) have attracted attention in numerous studies in their impact on receiving surface waters because of the presence of varied contaminants in their effluents. This study investigated the relevance using SPM to monitor the temporal variability of the impact of a WWTP discharge in a chalk stream (Loue River) in France. We performed five sampling campaigns of SPM and sediment during a year at different seasons and analyzed polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and phosphorus in both matrix. PAH contents in SPM ranged from 675 to 3,709 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dry weight (dw) and in sediment from 668 to 7,712 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw. Levels of phosphorus ranged from 364 to 1380 mg kg^{-1} dw in SPM and from 315 to 523 mg kg^{-1} dw in sediment. The WWTP increased significantly PAH levels in SPM to the Loue river. However our results did not allow to evidence significant differences on particulate phosphorus concentration in SPM. Nevertheless, we evidenced significant seasonal variations of PAH and phosphorus concentrations in SPM. Besides sediment sampling, the collection of SPM allowed to monitor changes in contamination from the WWTP and highlighted impact of WWTP on PAH concentrations and changes of PAH and phosphorus concentrations over time. Contamination of SPM of the Loue River was driven by mixed inputs from point source like WWTP and from diffuse sources in the catchment like runoff from impervious and pervious surfaces. Combining monitoring of SPM and sediment proved to be an improved approach to assess contamination of local and diffuse sources in chalk streams.

Keywords: Wastewater treatment plant; SPM; Sediment; Polycyclic aromatic hydrocarbons; Phosphorus

7.2 Introduction

Sediment and SPM are material consisting of organic matter, particulate mineral matter and inorganic material. They have been proven an efficient tool to identify environmental contamination of aquatic ecosystem (Patrolecco et al. 2010; Kanzari et al. 2011; Oursel et al. 2013; Chiffre et al. 2015). However

sediment retention capacity was related to physico-chemical properties such as grain size and organic matter for example. Therefore variation of sediment composition induced a dramatic change in the spatial distribution in the concentration of pollutants (Viguri et al. 2002). Hence, using only sediment contamination may lead underestimation or overestimations and make difficult comparison of different sites. SPM are considered as the main vector of materials transported in rivers compared to the dissolved phase (Viers et al. 2009), and contribute predominantly to the transport of inorganic and organic contaminants like PAHs, nutriment, trace metal elements or pharmaceuticals (de Boer et al. 2003; Edwards and Withers 2008; Schwientek et al. 2013; Darwano et al. 2014; Meur et al. 2015).

The Loue river located in Eastern France is chalk stream renowned for its trout fishing and invertebrate diversity and density. Nowadays, while the Loue river is still regarded as in good ecological status (EEC, 2000), it has been affected by fish mortality and loss of macroinvertebrates for several years (ONEMA et al. 2012). Moreover, in spite of low anthropogenic pressures due to by low population density (35 inh km⁻²), the French Water Agency reported high PAH content in sediment in several rivers of the Franche-Comté region (MEDDE, 2013; Chiffre et al. 2015).

WWTP designed to treat pollution loads smaller than 2,000 people equivalent (PE) are quite frequent in the watershed (ONEMA et al. 2012) and in developed countries. WWTP receive mixtures of contaminants like nutrients, metals, PAH, pesticides and pharmaceuticals from urban and industrial emissions via household wastewater and sewer systems (Kolpin et al. 2002; Buseti et al. 2006; Köck-Schulmeyer et al. 2013, Ozaki et al. 2015). Moreover, most WWTP are not specifically designed to fully eliminate these compounds which remain in effluent and end up in the aquatic environment (Luo et al. 2014). Besides the hydrophobic nature of many compounds causes them to sorb onto suspended solids in effluent and then in surface water. In Europe the discharge of various toxic chemicals in wastewaters are mostly regulated by water quality-based control. However, monitoring filtered water is not fully relevant for hydrophobic substances which may not be found in the aqueous phase at significant concentration (Vignati et al. 2009). In addition, several studies demonstrated that a significant part of the contaminants in effluents was associated with SPM which contribute to transfer pollutants to freshwater ecosystem (Qi et al. 2010) and had to be considered for monitoring studies (Baker and Kasprzyk-Hordern 2011; Darwano et al. 2014; Subedi and Kannan 2014).

PAHs are widespread contaminants in the environment usually having anthropogenic origins (Lienig 1980), and have been evidenced in effluent of WWTP in many studies. Insoluble and therefore suspended matter-associated forms may represent major contributor of total PAHs in the river (Pham and Proulx 1997; Manoli and Samara 1999; Fatone et al. 2011; Qi et al. 2013). They usually occur in complex mixtures from different sources such as atmospheric deposition of vehicle exhaust, oil spills, urban runoff, and domestic and industrial wastewater discharges (Blanchard et al. 2001; Yunker et al.

2002; Brown and Peake 2006). Because of their toxicity, PAH are hazardous to aquatic organisms and may lead to a modification of the whole ecosystem (Bellas and Thor 200; Brinkmann et al. 2013). It is therefore important to monitor the contamination of SPM because they may act as a significant source of PAHs and may affect the biota (Wölz et al. 2010; Brinkmann et al. 2013).

Widespread dissolved and particulate phosphorus enrichment of surface waters causing a wide range of environmental problems, comes mainly from point source like wastewater discharges, and diffuse sources like runoff from impervious surfaces (roads) and from pervious surfaces such as forests and pastures (Ekka et al. 2006; Withers and Jarvie 2008). SPM and sediment modulate dissolved phosphorus concentration and reduce transport in water column through adsorption/desorption and co-precipitation/dissolution processes (Zhang et al. 2004b). Indeed, SPM and sediment represents significant sources of phosphorus in freshwater ecosystems and relevant compartment to monitor loads of phosphorus and identify point source.

While numerous data are available concerning impact of large-capacity WWTP on sediment PAH contamination (Pham and Proulx 1997; Blanchard et al. 2001; Kanzari et al. 2011), accurate data on the SPM-PAH contamination of smaller WWTP are lacking whereas such WWTP represent the main part of treatment plants in rural areas. Furthermore, Withers et al. (2009) found that in agricultural rural communities, runoff from impervious surfaces and influenced by wastewaters were more concentrated in phosphorus than surface runoff from cultivated land and pastures, and should controlled to avoid localized eutrophication impacts.

While WWTP discharge are considered as continuous and concentrated source of pollution, assessment of the fluctuations of the impact of WWTP outflow is not easy due to diurnal and seasonal changes in the nature and concentration of contaminants in the effluent and in the environment (Schwientek et al. 2015). Field investigations and better knowledge of the impact of small WWTP on pollutant contamination are needed to identify critical times in order to improve treatment management and to reduce adverse impact in freshwater ecosystems. This study was devoted to investigate the variations of chemical contamination issued from WWTP along the year and to assess the advantages to use SPM in addition to sediment as matrices for chemical analyses. For this purpose, we sampled SPM and sediment upstream and downstream of a WWTP discharge in the Loue river at different seasons. PAH and phosphorus contents were measured in SPM and sediment and were compared between both matrices and between sites.

7.3 Materials and methods

7.3.1 Area of study

The research area is situated in the Loue river in the Jura mountains (Eastern France) (Figure 7-1). The catchment is characterized by permeable and impermeable Jurassic strata and the presence of karstic structures. The mean flow rate of the Loue river is $21 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ with a rain-snow hydrological regime. The watershed is characterized by a low population density ($35 \text{ people km}^{-2}$) and is dominated by agricultural and forest areas. For this study we focused on the WWTP of Ornans located 24 kms from the source. The plant has a capacity of 5,000 PE and treats wastewater from domestic, industrial and runoff origin. The WWTP receives an average of 800 m^3 per day of wastewater, which is treated using a pretreatment step for solids removal and then an activated sludge biological treatment with ferric chloride to remove part of the phosphorus. The WWTP receives domestic, industrial and runoff wastewater. It respects the French legislation, notably that covering biological oxygen demand and chemical oxygen demand. The land used for agriculture is mainly composed of pastures and grassland (94 %). Livestock is dominated by dairy cows for cheese production. In addition, about 84 % of the agricultural land receives amendments in the form of manure (53 %), a mixture of manure and pig slurry (46 %) and sludge from WWTP (1 %).

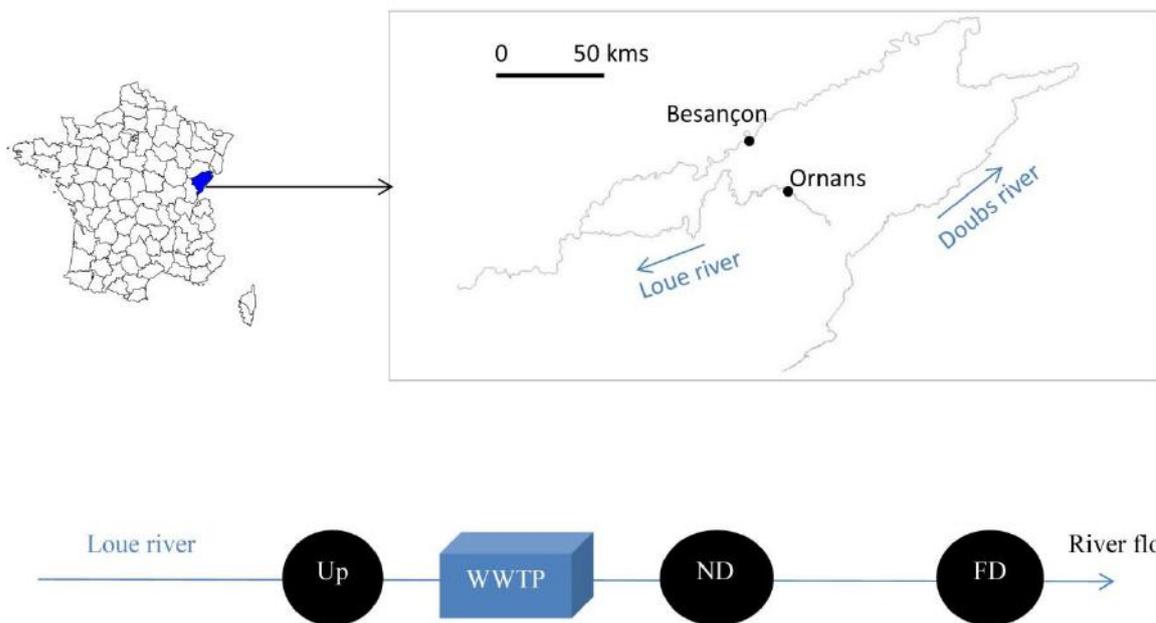


Figure 7-1 Map showing location of the Loue river indicating sampling sites upstream (Up), near downstream (Nd) and far downstream (Fd) of the WWTP.

7.3.2 Sampling

One site upstream and two sites downstream of the WWTP were defined to evaluate the impact of the discharge on PAH, TOC and TP contamination. Sampling sites were referred to as Up (upstream), Nd (near downstream) and Fd (far downstream) (Tableau 7-1). Five sampling campaigns of SPM were carried out from December 2013 to December 2014 at different seasons and different hydrological conditions. SPM were collected by passive sedimentation with three to six SPM traps (height, 450 mm; diameter, 50 mm) fixed in the riverbed (Bloesch and Burns 1980). At the beginning of the investigation (December 2013) empty SPM traps were placed at each site and were removed after flood events when SPM had settled in them. SPM were collected twice in spring 2014 (March and May), twice in summer 2014 (June and September) and once in winter 2014 (December). SPM accumulated in traps were collected and stored in glass jars in an isothermal container ($\pm 4^{\circ}\text{C}$). In March and May 2014 SPM replicates were pooled to have enough material for chemical analysis. In June, September and December replicates from each site (from 2 to 5 samples) were analyzed separately. This dataset was completed with composite surficial sediment sampling in March, June, September and December 2014 to compare loading PAHs onto SPM. Sediment samples were taken using a stainless steel shovel and stored in glass jars in an isothermal container during transport to the laboratory. SPM and sediment samples were freeze-dried, sieved with stainless steel sieves to 1,000 μm and homogenized before analysis.

Tableau 7-1 Number of samples of SPM and sediment for each site and sampling campaign

Sites	Upstream		Near downstream		Far downstream	
	SPM	Sediment	SPM	Sediment	SPM	Sediment
March 2014	n = 1	n = 1	n = 1	n = 1	n = 1	n = 1
May 2014	n = 1	/	n = 1	/	n = 1	/
June 2014	n=5	n=1	n=6	n = 1	n=5	n = 1
Sept. 2014	n=4	n=1	n=6	n=1	n=3	n=1
Dec. 2014	n=3	n=1	n=4	n=1	n=2	n=1

7.3.3 Sample preparation and analysis

Particle size of sediment and SPM were measured using a Laser Particle Size Analyzer (LS 230, Beckmann Coulter). The materials in each sample were separated into four size particle-classes: 0-2 (μm , clay); 2-20 (μm , fine silt); 20-200 (μm , coarse silt) and 200-2,000 (μm , sand). TOC and phosphorus content in water, SPM and sediment were analyzed by the Qualio laboratory (Besançon, France) which was

certified for chemical analyses by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development. In SPM and sediment samples, dry matter, total organic carbon (TOC) and total phosphorus were measured according to European and French standards NF EN 12880, NF X31-109 and NF ISO 11885 respectively.

For PAH analyses, sixteen PAHs: naphthalene (NAP), acenaphthene (ACE), acenaphthylene (ACY), fluorene (FLU), phenanthrene (PHE), anthracene (ANT), fluoranthene (FLT), pyrene (PYR), benzo[a]anthracene (BaANT), chrysene (CHY), benzo[b]fluoranthene (BbFLT), benzo[k]fluoranthene (BkFLT), benzo[a]pyrene (BaPYR), dibenzo[a,h]anthracene (DahANT), indeno[1,2,3-cd]pyrene (IcdPYR), benzo[g,h,i]perylene (BghiPL) were purchased from Supelco Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and Interchim (Montluçon, France) for calibration. n-hexane Distol, and other products for organic trace analysis, were obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France).

PAH extraction used the process described by Morin-Crini et al. (2014). PAHs were extracted from solid samples (sediment, SPM) with n-hexane by pressurized liquid extraction (SpeedExtractor E-914 system from Büchi, Rungis, France). For PAH analysis, extracts were analyzed using a GC-MS/MS analyser (Agilent, Massy, France) which included a 7890A GC system, a 7000 GC triple quadrupole mass spectrometer and an 80 GC Combipal autosampler equipped with a (5 % phenyl)-methylpolysiloxane HP5MS column (30 m x 0.25 mm i.d, 0.25 μm film thickness, Agilent 19091J-433). Extraction and detection methods were validated for all samples with regard to parameters such as linearity, limits of detection or quantification (LOD or LOQ), precision (relative standard deviation) and trueness (recoveries) (Morin-Crini et al. 2014; Morin-Crini et al. 2015). Quality controls (QC) were made every 10 samples. The values fell in the range 93-107 % and 92-102 % of the expected value, for suspended matter or sediment samples and water samples respectively. When QC values were not situated in the range 80-120 % of the expected value, the calibration was carried out again and the samples reanalyzed. For estimation of recoveries, samples were spiked at different concentrations of PAHs with a standard solution (ampoule of PAH mixture at 2000 $\mu\text{g ml}^{-1}$, EPA 610, Restek, Lisses, France). As the “blanks”, which were simultaneously performed, presented weak values for all PAHs (< LOD) no subtraction was made.

7.3.4 Data analysis

For statistical analysis R software was used to compare the $\sum_{16}\text{PAH}$ and phosphorus content of sediment and SPM in each site for the various campaigns. Normality of the data distribution was verified on data residues using the Kolmogorov Smirnov test and variance homogeneity was evaluated using the Bartlett test. When variance was homogenous and data normally distributed, repeated-measures anova analysis was performed ($p < 0.05$) to test the impact of the WWTP discharge in

receiving water and seasonal variations. For all significant anova results, a post-hoc pairwise was performed. If not, data was analyzed using the Friedman non-parametric test ($p < 0.05$). In addition, Spearman's correlation coefficient was calculated to assess the strength of the relationship between SPM and sediment PAH levels. Principal components analysis (PCA) was used to better understand temporal variability of SPM and sediment samples and to compare with different sources of PAH contamination of the environment. PCA was run by comparing the patterns of the 16 PAHs of 26 identified samples from the literature. Then the patterns of the 16 PAHs of SPM and sediment samples were added to the analysis and were considered as supplementary individuals. Individual PAH concentrations were normalized as a fraction of the total PAH.

7.4 Results

7.4.1 Physical-chemical proprieties

The size composition of sediment particles (Tableau 7-2) was dominated by coarse sand (200 to 2,000 μm diameter) for all campaigns, then by fine sand (50 to 200 μm diameter) and contained lesser quantities of clay and silt (< 2 to 50 μm diameter). SPM was mostly composed of fine sand and of moderate quantities of clay and silt in March, June and December and by coarse sand in May and September (Tableau 7-3).

Tableau 7-2 Particle size and total organic content in sediment upstream, near downstream and far downstream of the WWTP for each campaign

Sediment	March			May			June			Sep			Dec		
	Up	Nd	Fd	Up	Nd	Fd	Up	Nd	Fd	Up	Nd	Fd	Up	Nd	Fd
% Clay and silt (< 2-50 µm)	12.7	12.4	3.5	na	na	na	6.1	58.9	4.9	11.2	2.0	2.8	12	5.9	na
% Fine sand (50-200 µm)	20.1	23.6	8.3	na	na	na	10.6	40.7	8.1	34.8	3.6	2.8	35	23.8	na
% Sand (200-2.000 µm)	67.3	64.0	88	na	na	na	83.3	0.5	87.0	54	94.4	94.4	53	70.3	na
TOC (g C kg ⁻¹ DM)	14.1	11.6	8.7	na	na	na	25.4	29.5	14.5	30	9.5	7.8	36.9	16.9	22.7

Tableau 7-3 Particle size and total organic content in SPM upstream, near downstream and far downstream of the WWTP for each campaign, (mean ± SD)

SPM	Mar			May			June			Sep			Dec		
	Up	Nd	Fd	Up	Nd	Fd	Up	Nd	Fd	Up	Nd	Fd	Up	Nd	Fd
Samples	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1	n=5	n=2		n=5	n=6	N=4	n=1	n=1	n=1
% Clay and silt (< 2-50 µm)	43.22	20.4	30.9	13.9	10.2	28.7	44.2±14.7	32.7±12.3	46.1±6.7	6.8 ±3.2	8±3.7	6±0.1	51.5	30.8	33
% Fine sand (50-200 µm)	56.5	39	67.1	15.9	15.5	49.1	48.2±10.5	36.7±7.6	52.2±3.6	10.4±4.6	14.6±4.8	9.4±1.9	48.2	57.1	63.7
% Sand (200-2.000 µm)	0.26	40.7	2.0	70.2	74.3	22.2	7.6±7.5	19.5±5.2	1.7±2.9	82.8±7.6	77.5±8.3	84.6±2.7	0.3	12.1	3.3
Samples	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1	n=1	n=3	n=2	n=3	n=4	n=5	n=3	n=2	n=1	n=1
TOC (g C kg ⁻¹ DM)	29.6	21.1	20.9	34.2	51.6	34.8	47±3	47±3	41±0.1	20±4	33±9	18±7	61.9±4	68.3	56.3

TOC values were generally higher in SPM (from 17.7 to 68.3 g C kg⁻¹ dw) than in sediment (from 7.8 to 36.9 g C kg⁻¹ dw). In SPM, TOC values were highest in December (from 56.3 to 68.3 g C kg⁻¹ dw) and lowest in March and September (from 17.7 to 33.3 g C kg⁻¹ dw). The same trend was observed in sediment: from 16.9 to 36.9 g C kg⁻¹ dw in December and from 7.8 to 30.0 g C kg⁻¹ dw in September.

7.4.2 Phosphorus

Levels of phosphorus ranged from 315 to 523 mg kg⁻¹ dw in sediment and from 364 to 1380 mg kg⁻¹ dw in SPM (Figure 7-2). Phosphorus concentrations in sediment were similar upstream and downstream of the WWTP along the year however in SPM phosphorus concentrations varied three fold across seasons. Significantly highest concentrations were observed in May, June and December compared to March and September survey. However, no significant differences of phosphorus concentrations were observed in upstream and downstream sites. In surface water total mean concentrations of total dissolved phosphorus were 0.033, 0.077 and 0.036 in Up, Nd and Fd respectively. In effluent, concentrations of total dissolved phosphorus ranged from < 0.02 to 1.42 mg L⁻¹ (Tableau 7-4).

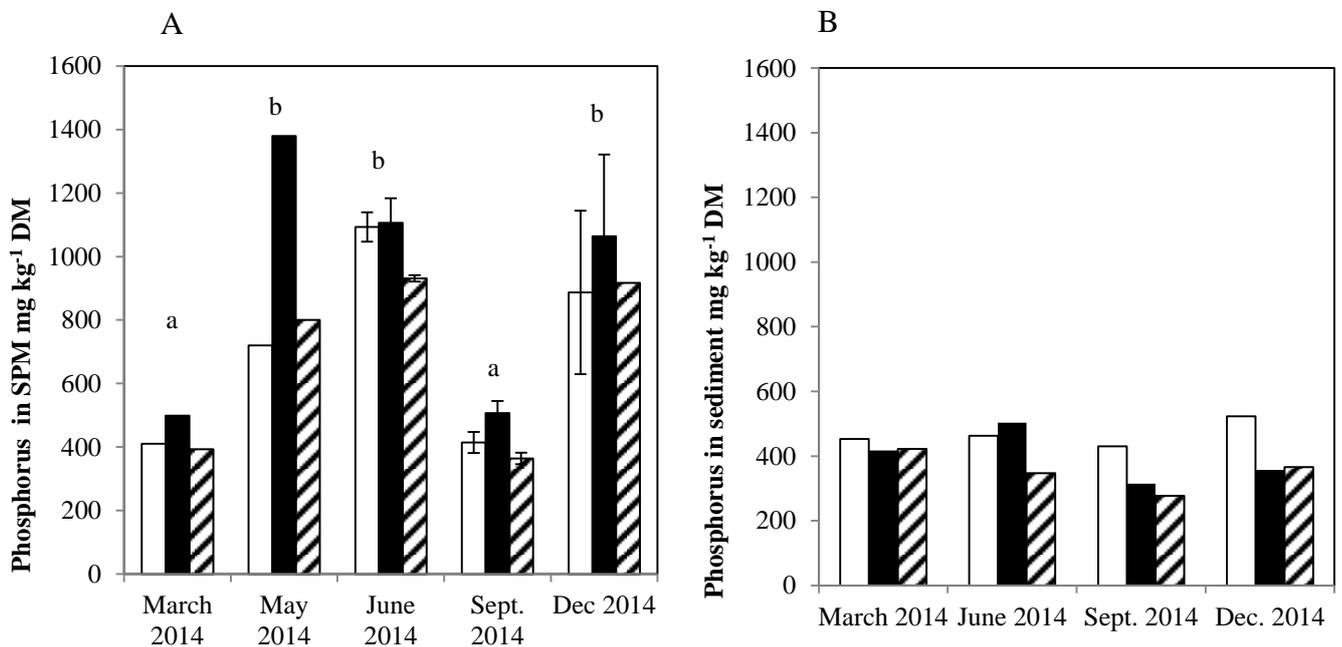


Figure 7-2 Phosphorus concentrations mg kg⁻¹dw in SPM (A) and sediment (B) in upstream (white), near downstream (black) and far downstream (dashed lines) from March to December 2014. SPM sampled in June, September and December concentrations are expressed in mean (\pm standard deviation). In SPM, no significant differences were found between sites for each campaign (Repeated

measured anova, $p > 0.05$). Significant differences occurred between sampling campaigns (Repeated measured anova, $p < 0.05$).

Tableau 7-4 Total phosphorus concentration (mg L⁻¹) in surface water samples Up, Nd and Fd of the WWTP. In surface water samples and effluent, total phosphorus was measured according to standard NF EN ISO 11885.

Date	Up	Nd	Fd	Effluent
19/12/2013	0.03	0.09	0.03	0.95
20/12/2013	0.03	0.04	0.04	1.21
22/01/2014	0.03	0.07	0.03	0.63
29/01/2014	0.04	0.06	0.04	0.4
06/02/2014	0.03	0.01	0.03	0.67
13/02/2014	0.04	0.05	0.04	0.58
20/02/2014	0.03	0.07	0.03	0.8
27/02/2014	0.04	0.05	0.04	0.69
05/03/2014	0.03	0.06	0.03	0.74
13/03/2014	0.02	0.05	0.02	0.92
04/04/2014	0.01	0.1	0.02	0.92
30/04/2014	0.01	0.01	0.01	0.72
13/05/2014	0.04	0.09	0.04	0.55
22/05/2014	0.02	0.19	0.03	1.42
28/05/2014	0.05	0.06	0.05	0.36
13/06/2014	0.01	0.11	0.02	<0.02
19/06/2014	0.02	0.03	0.02	0.72
03/07/2014	0.02	0.04	0.02	0.94
08/07/2014	0.15	0.19	0.13	0.97
22/07/2014	0.02	0.04	0.02	1.41
31/07/2014	0.02	0.08	0.07	0.33
04/09/2014	0.01	0.01	0.01	0.96
19/11/2014	0.039	0.037	0.036	0.79
10/12/2014	0.02	0.08	0.03	0.65
19/12/2014	0.06	0.08	0.07	0.48

7.4.3 PAHs

PAH contents in SPM samples in the Loue river are shown in Figure 7-3. In spring and summer campaigns \sum_{16} PAHs in SPM were highest Nd of the WWTP. PAH contents increased about 80 %, 28 %, 35 % and 70 % Nd relative to Up in March, May, June and September respectively. In March and May PAH contents in Nd sites were similar (1,323 and 1,394 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw respectively) and then increased in June and December (from 2,056 to 3,709 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw respectively). In September PAH contents decreased in Up and Fd sites compared to June: PAH content was 1,511 and 1,778 respectively in June and 1,054 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw and 1,141 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw in September. In winter PAH contents were significantly the

highest of the year and in the same range for all sites: 3,677, 3,709 and 3,637 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw in Up, Nd and Fd sites respectively. In sediment PAH contents were also the highest in December (from 4,399 to 7,712 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw) and the lowest in March and June (from 668 to 2,039 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw). PAH content in sediment increased Nd of the WWTP compared to the Up in March (80 %) and December (75 %) although it decreased in June (- 40 %) and in September (- 47 %).

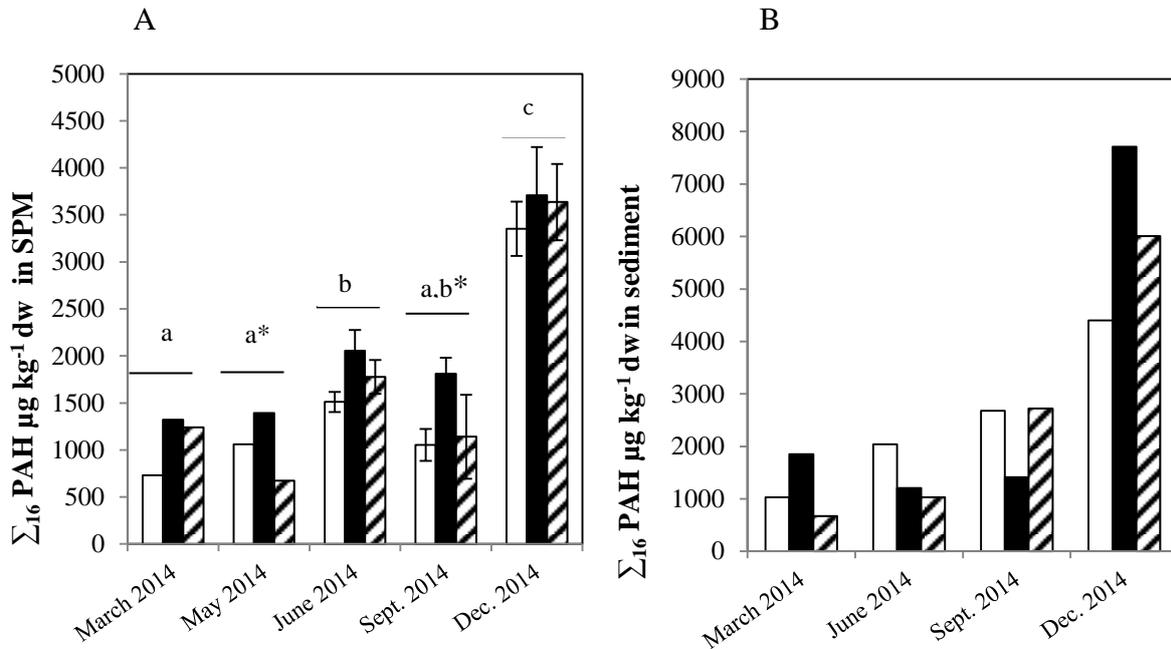


Figure 7-3 PAH concentrations in $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw in SPM (A) and sediment (B) in upstream (white), near downstream (black) and far downstream (dashed lines) from March to December 2014. For the SPM sampled in June, September and December concentrations are expressed in mean (\pm standard deviation). In SPM, significant differences were found between sites for each campaign (*) (Repeated measured anova, $p > 0.05$). Significant differences occurred between sampling campaigns (letters) (Repeated measured anova, $p < 0.05$).

A significant positive correlation ($p < 2.2 \times 10^{-16}$) was found between log of PAH contents in SPM and sediment for all sites and sampling campaigns (data not shown). This correlation showed that SPM contamination significantly corresponds to sediment contamination and may reflect the same origin. Otherwise for each campaign the correlation between PAH contents in SPM and sediment were calculated in Up, Nd and Fd sites (Tableau 7-5). For all seasons positive linear correlations (r^2 ranging from 0.89 to 0.98) were highlighted between SPM and sediment PAH contents for the three sites except in September and December in the Nd site, which showed a lower of correlation (r^2 of 0.57 and 0.47 respectively). In March similar correlations were observed between Up and Nd sites although the Fd site was influenced by an increase of PAH in SPM. In June slope coefficients were similar for Nd

and Fd sites and decreased compared to the Up site which shows an increase of PAH in SPM and a decrease of PAH in sediment (Figure 7-4).

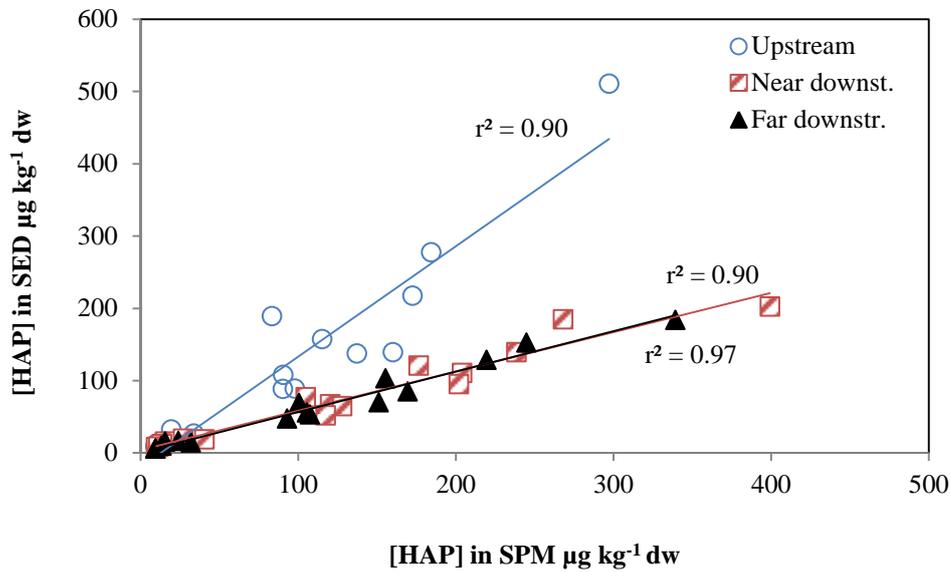


Figure 7-4 Relationship between the 16 PAH concentrations in sediment and SPM in $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw in upstream (circles), near downstream (square) and far downstream (triangle) in June 2014. Significant correlations were noted for each site (Spearman test, $p < 0.05$).

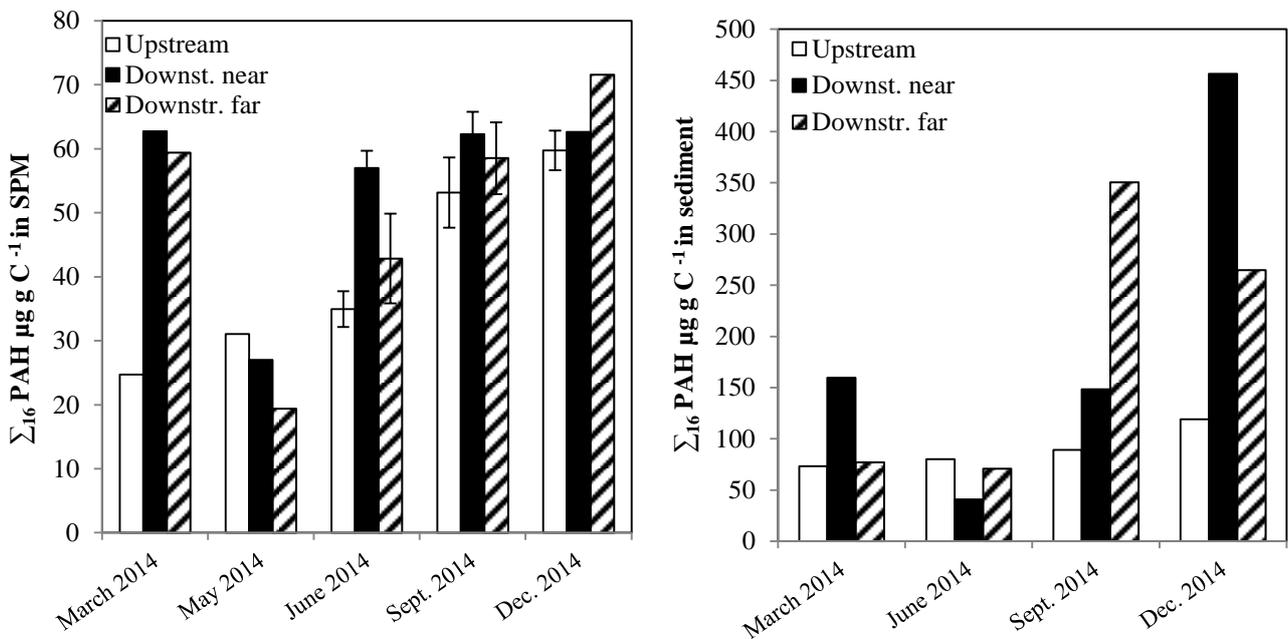


Figure 7-5 Σ_{16} PAHs normalized to TOC upstream, near downstream and far downstream of the WWTP for each campaign in SPM (left) and sediment (right).

Tableau 7-5 Relationship between the 16 PAH concentrations in sediment and SPM for each site and sampling campaign.

PAHs (Sed~SPM)	March			June			Sept.			Dec.		
	Up	Nd	Fd	Up	Nd	Fd	Up	Nd	Fd	Up	Nd	Fd
Slope	y=1.5x	y=1.4x	y=0.5x	y=1.4x	y=0.6x	y=0.6x	y=2.5x	y=1.8x	y=0.7x	y=2x	y=1.7x	y=0.6x
p-value	p<2.2 ^{e-16}	0.002	p<2.2 ^{e-16}	1.9 ^{e-6}	p=0,0006	p<2.2 ^{e-16}						
Rho (Spearman)	0.99	0.98	0.99	0.92	0.97	0.98	0.95	0.72	0.97	0.99	0.78	0.95

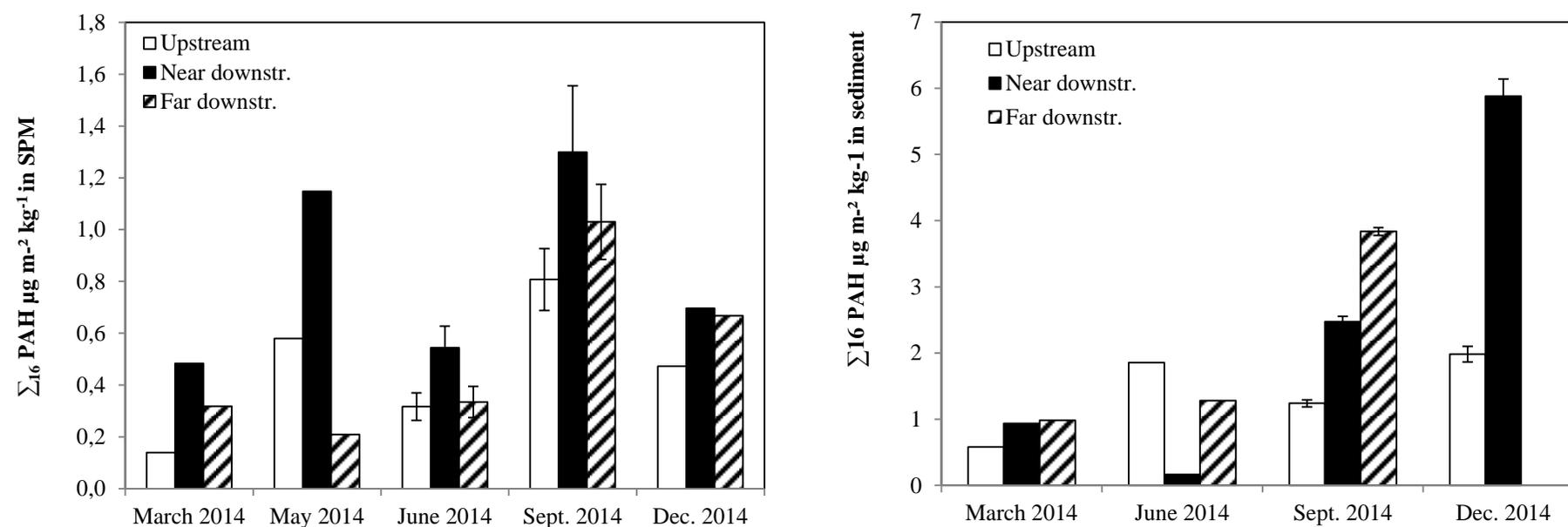


Figure 7-6 \sum_{16} PAHs normalized to the specific surface area upstream, near downstream and far downstream of the WWTP for each campaign in SPM (left) and sediment (right).

Sediment and SPM properties like grain size and organic content may differ with origin and season. So PAH content can be expressed relative to TOC contents and grain size composition in order to overcome the impact of these parameters. PAH content relative to TOC for all campaigns: concentrations at the Nd site were higher than Up in March, June and September although they were lowest in May and in the same range in December (Figure 7-5). For all sites, the lowest concentrations were in May (from 19.4 to 31.1 $\mu\text{g PAH g}^{-1}\text{ C}$) and the highest in December (from 56.5 to 68.3 $\mu\text{g PAH g}^{-1}\text{ C}$). In sediment the highest values were also found in December (from 119.2 to 456.3 $\mu\text{g PAH g}^{-1}\text{ C}$). Furthermore PAH content relative to organic carbon concentration in sediment were overall higher than in SPM and increased in the Nd site compared to Up in March, September and December. For both SPM and sediments the lowest values were found in May and June and the highest in September and December. The same comparison was applied for the grain size (Figure 7-6). The PAH contents relative to the specific surface area showed that in SPM from all seasons, the concentrations increased in the Nd site compared to Up. The same trend was observed for sediment except for the sampling campaign in June.

7.4.4 PAHs origins

PAHs are mainly formed via two mechanisms: combustion (pyrolytic) and crude oil discharge (petrogenic). Usually the emission source of PAHs may be identified with ratios of individual compounds such as $\text{ANT}/(\text{ANT}+\text{PHE})$, $\text{FLT}/(\text{FLT}+\text{PYR})$, $\text{IcdPYR}/(\text{IcdPYR}+\text{BghiPL})$, $\text{BaANT}/(\text{BaANT}+\text{CHY})$. These ratios are commonly used in the literature to identify sediment sources (Yunker et al. 2002). Tableau 7-6 indicates the molecular ratios of PAHs in SPM and sediment at the different sampling sites (Up, Nd and Fd) and times. For all seasons and sites $\text{ANT}/(\text{ANT}+\text{PHE})$ were higher than 0.1, $\text{FLT}/(\text{FLT}+\text{PYR})$ were higher than 0.5 and $\text{IcdPYR}/(\text{IcdPYR}+\text{BghiPL})$ were between 0.2 and 0.5 which showed a pyrolytic input of PAH in SPM and sediments. In order to analyze sources of emission, we used PCA with the 16 PAHs. PCA was used to better understand PAH sources and to compare to the samples from the Loue river (DeMott et al. 2010, Deng et al. 2013). The first two principal components PC1 and PC2 respectively explained about 49 % (PC1 explained 29 %; PC2 explained 20 %) of the variance of 16 PAH patterns (Figure 7-7). The projections of individuals with samples from this study as supplementary individuals showed that SPM and sediment samples were characterized by only positive scores on PC1 and mostly negative scores on PC2. Furthermore PAH patterns of SPM and sediment of the Loue river were similar to PAH patterns of coal tar, urban dust and brake lining samples, and similar to a sediment sampled near a WWTP.

Tableau 7-6 Molecular ratios for SPM and sediment samples

Sample	date	Site	ANT/178	FLT/FLT+PYR	BaANT/228	IP/IP+BghiPL
SPM	March	Up	0.19	0.57	0.47	0.33
		Nd	0.27	0.62	0.49	0.35
		Fd	0.19	0.60	0.48	0.35
	May	Up	0.22	0.60	0.52	0.40
		Nd	0.12	0.62	0.50	0.38
		Fd	0.12	0.58	0.48	0.42
	June	Up	0.19	0.61	0.62	0.40
		Nd	0.21	0.63	0.64	0.40
		Fd	0.18	0.61	0.62	0.39
	Sept	Up	0.16	0.62	0.56	0.38
		Nd	0.17	0.63	0.58	0.38
		Fd	0.63	0.59	0.55	0.44
	Dec	Up	0.35	0.60	0.56	0.48
		Nd	0.27	0.59	0.54	0.44
		Fd	0.31	0.60	0.54	0.46
Sediment	March	Up	0.20	0.60	0.46	0.35
		Nd	0.20	0.61	0.49	0.35
		Fd	0.24	0.58	0.46	0.34
	June	Up	0.14	0.59	0.61	0.42
		Nd	0.20	0.59	0.65	0.40
		Fd	0.24	0.63	0.60	0.40
	Sept	Up	0.34	0.61	0.56	0.42
		Nd	0.65	0.59	0.54	0.48
		Fd	0.64	0.56	0.58	0.52
	Dec	Up	0.27	0.57	0.53	0.43
		Nd	0.23	0.61	0.57	0.35
		Fd	0.17	0.59	0.56	0.36

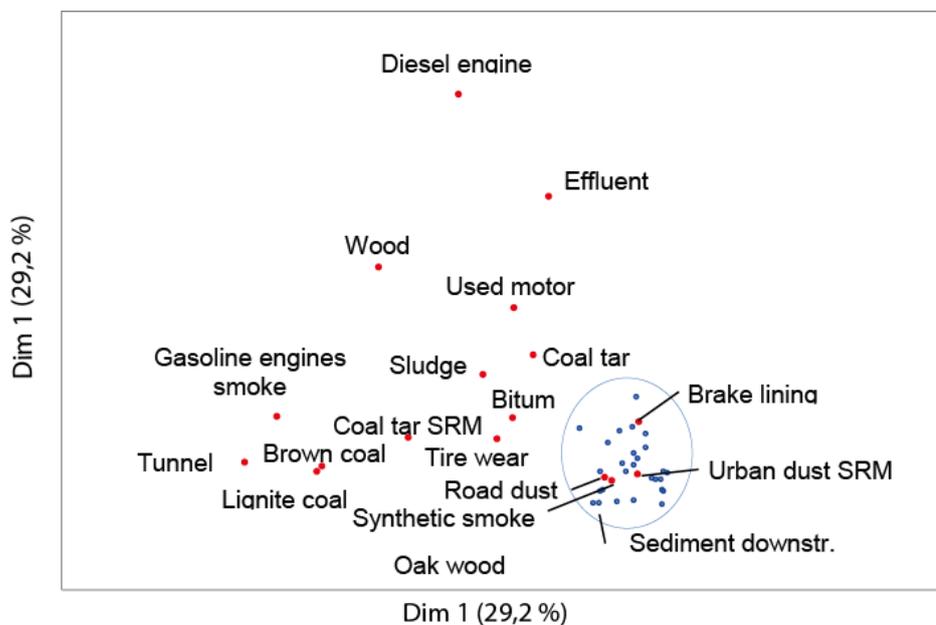


Figure 7-7 The loading plot of PCA of PAHs from samples in the literature data from SPM and sediment from the Loue river. (“Bitumen” ((Brandt and de Groot 2001)); “Brake linings” (Rogge et al.

1993); “Brown coal smoke” (Oros and Simoneit 2000); “Diesel engine smoke” (Khalili et al. 1995); “WWTP Effluent” (Buseti et al. 2006); “Gasoline engine smoke” (Khalili et al. 1995); “Lignite coal smoke” (Oros and Simoneit 2000); “Oak wood smoke” (Rogge et al. 1998); “Road dust particles” (Rogge et al. 1993); “Sediment downstr. WWTP” (Kanzari et al., 2011); Sludge (Jauzein et al. 1995); “Synthetic smoke” (Rogge et al. 1998); “Tunnel smoke” (Khalili et al. 1995); “Used motor oil” (Wang et al. 2009); “Wood combustion” (Khalili et al. 1995)).

7.5 Discussion

PAH levels in SPM and sediment sampled over a year in the Loue river ranged from 668 to 7,712 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw. The levels of PAHs reported in the literature are in the same range, but most samples in the literature data were from highly urbanized areas unlike the low population density of the catchment in the present study (35 people km^{-2}). Several studies have found that due to the abundance of sources, chemical loads in rivers increased with increasing population density (Kannan and Upreti 2008; Schwientek et al. 2013). However in this study, while the sites were located near a small town (5,000 inhabitants), \sum_{16} PAHs of several SPM and sediment samples were above samples from highly populated and industrialized watersheds: sediment samples were higher than those of one of the most contaminated rivers of Taiwan (8 to 356 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw, Doong and Lin 2004) and from a twenty million population Chinese agglomeration (91.3 to 1835 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw, Zhu et al. 2008). Moreover, they were in the middle range of sediment concentrations sampled downstream of the WWTP of Marseille (572 to 4235 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw, Kanzari et al. 2014) three hundred times larger than the WWTP followed in the present study, and sediment sampled in a high population density (919 people km^{-2}) Chinese catchment (31 to 4812 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw, Feng et al. 2007). However, they were ten times lower than in sediment sampled downstream of a WWTP four times larger in a German catchment of 600 people km^{-2} (12700 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw, Liu et al. 2013) and lower than some sediments from the Seine River and Estuary in France (14000 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dw, Fernandes et al. 1997).

The concentrations of PAHs in SPM and sediment varied during the year. The lowest concentrations were observed in March and May while the highest concentrations were measured in December. However an increase of PAH concentration in SPM downstream of the WWTP discharge was observed at each campaign except in December. The same trends were observed when PAH contents were expressed with respect to the organic carbon, confirming the increase of PAHs regardless of carbon content. The SPM sampled in summer (from June to September) were collected after low water flow and then during several heavy floods (reaching 90 $\text{m}^3 \text{s}^{-1}$) which may load the SPM with coarse particles and contaminants like PAHs bound to particles that are especially mobilized during high flow conditions when sediment is resuspended and urban runoff is intensified (Foster et al. 2000, Wölz et al. 2010). In December SPM, characterized by fine grain size and high organic carbon, were sampled after

several smaller floods (reaching $50.8 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) and melted snow which may have transported finer particles from surface deposition runoff. Qi et al. (2010) observed the same trend in China and measured significantly higher PAH concentrations in winter than in summer, which may be caused by the variation of the water flow between different seasons and by atmospheric deposition. Specific pools of particulate organic matter from atmospheric deposition, sediment resuspension, and terrestrial runoff can be important in the transport and fate of hydrophobic contaminants and may explain the temporal variation of PAH levels (Countway et al. 2003). However, concentration of PAH in SPM were mostly higher downstream of the WWTP than the Up site.

Comparison of the linear correlation of PAH concentration between SPM and sediment for each site revealed dissimilarities of contamination between Up and downstream sites of the WWTP. SPM and sediment sampled in the different sites had common sources, but they exhibited the impact of the WWTP differently: increased PAH content in SPM may be observed downstream of the discharge compared to Up, while it decreased in sediment. This stresses that SPM and sediment do not reflect the level of contamination. Our method of SPM sampling allowed the collection of homogenous particles over the entire width of the stream during a known period, very useful in streams dominated by the mineral fraction (gravel) without sedimentation areas. These SPM were representative of recent polluted particles transport in the river during the sampling period. In contrast sediment may reflect past contamination, being composed of heterogeneous particle sizes and can differ between sites which may modify their contamination level making comparison between sites difficult. These results evidenced the interest to combine SPM and sediment monitoring for the assessment of spot pollution sources like WWTP discharge as well as diffuse sources.

Defining PAH origins is not easy due to the diversity of the contamination sources. In urban areas, PAHs may result from a mixture between pyrogenic and petrogenic sources like incomplete combustion of fossil fuels or wood like, used oil and asphalt (Brown and Peake 2006). The comparison of molecular ratios of SPM and sediments showed a pyrolytic origin for all samples (Yunker et al. 2002) but did not allow highlighting differences between the Up site and the Nd site of the WWTP. Furthermore PCA analysis showed similar PAH patterns for all samples which were mostly similar to road and urban dust particles and to sediment near a WWTP. Both methods (molecular ratios and PCA) demonstrated that SPM and sediment were contaminated by the same mixed sources in Up and downstream sites of the WWTP. This input of PAHs may correspond to atmospheric deposition, vehicle exhaust deposits on impermeable surfaces such as roads, car parks and paved areas washed off by stormwater run-off (Brown and Peake 2006). Coal tar-based urban surfaces leached by runoff after a long dry period may also represent a source of contamination (Blanchard et al. 2001, O'Reilly et al. 2012). The sealcoat used for sealed parking lots may contain carbonaceous particles containing coal tar

and represent a source of PAH for stream-bed sediment and SPM (Yang et al. 2010). The large potential sources of PAH in aquatic environments made it difficult to precisely identify a specific source of PAHs. Furthermore some compounds responsive to chemical reaction (photooxidation, oxidation) and their differential rates of adsorption to the particulate phase may contribute to modifying the original distribution pattern of the emission source (Cerniglia 1992). Nevertheless the assessment of the SPM and sediment throughout the year near the town of Ornans reflected recurrent PAH contamination which seemed to be of urban origin.

In freshwater ecosystems phosphorus may occur as dissolved inorganic species, organic complexes or associated with particulate material. In this study, no significant differences of total dissolved phosphorus concentration in surface water were observed between Up, Nd and Fd. In addition, mean levels of total phosphorus were under range of concentration which is considered as pollution (Chambers et al. 2012). However, phosphorus interacts with SPM and sediments and undergo biological cycling (Edwards and Withers 2008). Phosphorus levels in sediment were quite low compared to SPM and under threshold effect of sediment quality guideline (MOE 2008). Indeed, phosphorus concentrations in sediment were under the concentration corresponding to the lowest effect level (600 mg kg^{-1}) and therefore were considered to have no effect on freshwater organisms. Highest concentration of phosphorus in SPM compared to sediment may be due to highest organic matter content and fine granulometry in SPM which may influence the adsorption of phosphorus (Smith et al. 2005). While constant concentrations of phosphorus were observed in sediment along the year, phosphorus concentrations in SPM varied according to seasons which indicated a temporal variation of inflow of particulate phosphorus in the catchment. Whereas concentrations in SPM were higher than in sediment, phosphorus concentration were below the range of suspended solids sampled in rivers of the Seine Basin (France) (Némery and Garnier 2007). Nevertheless, opposed to the rural agricultural catchment of the Loue river, the Seine Basin is a strongly human impacted river system subjected to a highly populated area and intensive agriculture. Similar concentrations of phosphorus upstream and downstream of the WWTP in sediment and SPM along the year did not evidence significant impact of the WWTP discharge on the contamination of particulate matter. It may be due to high rate and rapid dilution of dissolved and particulate phosphorus released from the WWTP in the river. However in baseflow conditions, WWTP discharge may increase concentration of dissolved phosphorus due to the reduced baseflow dilution (Jarvie et al. 2006). These results also showed that phosphorus in SPM and sediment mainly came from diffuse sources of contamination in the catchment which typically have a greater proportion in particulate forms. Phosphorus adsorbed to SPM mainly arrived during storm events in surface and sub-surface runoff and from a number of scattered entry points within the catchment. Nevertheless concentration of total phosphorus in storm runoff is

variable due to the complex origins, routing and composition of contributing source areas (Withers et al. 2009). Indeed, agricultural land runoffs are composed of fine-textured inorganic soil particles, organic matter and phosphorus in dissolved and particulate, and which relative composition of land runoff varied depending on land use and management (soil, crop and livestock). Jarvie et al. (2008) evidenced important diffuse agricultural source contribution to phosphorus loads in UK rivers from two major river basins. Particularly in small agricultural catchments, the export of phosphorus is frequently dominated by particulate phosphorus (Jarvie et al. 2008). Nonetheless, several studies highlighted the relevance of other source contribution that have characteristics intermediate between those of point and diffuse sources such as septic tank discharges mixed with road, pasture and farmyard runoff to particulate and dissolved phosphorus in rural agricultural rivers monitored (Edwards and Withers 2008; Jarvie et al. 2008). Relative contributions of agricultural activities as sources of pollutant depend of management factors such as length period for livestock, movement/application of livestock wastes, geographical location (e.g. proximity to stream or karstic infiltration) and climatic conditions (Edwards and Withers 2008). Particularly, dairy farms represent a continuous source of potential contaminated material (Edwards et al. 2008). Hence, as dairy farming is the major activity in the Loue River catchment, it may represent a source of contamination. Moreover, storm dependent runoff from pervious surface (e.g. forest, cultivated land and pasture) exhibited a more seasonal delivery pattern due to summer evapotranspiration by growing crops. However, Withers et al. (2009) showed that runoff from impervious surfaces (farmyard and roads), and/or influenced by septic tank discharges, was more concentrated than runoff from cultivated land and pasture.

7.6 Conclusion

This study explored the spatio-temporal trends of PAHs and phosphorus in sediment and SPM upstream and downstream of a WWTP in a rural agricultural catchment. The seasonal variation of PAH and phosphorus contents in SPM and sediment showed that the highest PAH concentration was found in winter. Our results demonstrated that SPM integrates variations of WWTP discharges and better points out the impact of the WWTP, whereas monitoring of sediments was less precise because of the changes in composition and deposition along the riverbed. The significant correlation of PAH compounds between SPM and sediment upstream and downstream of the WWTP indicates common sources of contamination of both compartments. Furthermore, molecular ratios and PCA suggested similar origins of contamination in all sites and throughout the year. However, analysis of PAH origins is not easy due to the lack of definitive and distinguishable source fingerprints. While WWTP is considered as a point source that reflects actual contamination of the catchment, runoff from agricultural surfaces, atmospheric deposition, road and urban dust washed from impermeable surfaces

and concentrated in sewers during rainfall represent a large part of SPM and sediment contamination. In addition, the temporal variations of PAH and phosphorus concentration highlighted the need to collect highly resolved and integrated information about contaminant loads in a catchment to track any overshooting in water quality criteria. Applicability of different sized WWTP and contaminants should be evaluated in future research.

Acknowledgments

This study was financially supported by the Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse, La Région Franche-Comté and the Doubs department. The support of Peter Winterton with English editing is also greatly acknowledged.

7.7 Rivière Doubs

Cette partie est consacrée à l'étude de la variabilité de la contamination des MES et des sédiments dans le Doubs au cours de campagnes d'échantillonnage effectuées en même temps dans la Loue.

7.7.1 Les HAP

Les concentrations moyennes en HAP dans le Doubs varient de 2160 à 7238 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dans les MES et de 1863 à 14007 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dans les sédiments au cours de l'année 2014 (Figure 7-8). Les concentrations en HAP dans les MES en amont et en aval proche de la STEP ne sont pas statistiquement différentes. Néanmoins en juin, septembre et décembre, les concentrations en HAP dans les MES sont plus élevées en aval proche par rapport à l'amont. Dans les sédiments, les concentrations en HAP à l'amont de la STEP sont systématiquement plus élevées par rapport aux stations avales. Dans les MES et les sédiments, les concentrations en HAP les plus élevées ont été mesurées en décembre 2014.

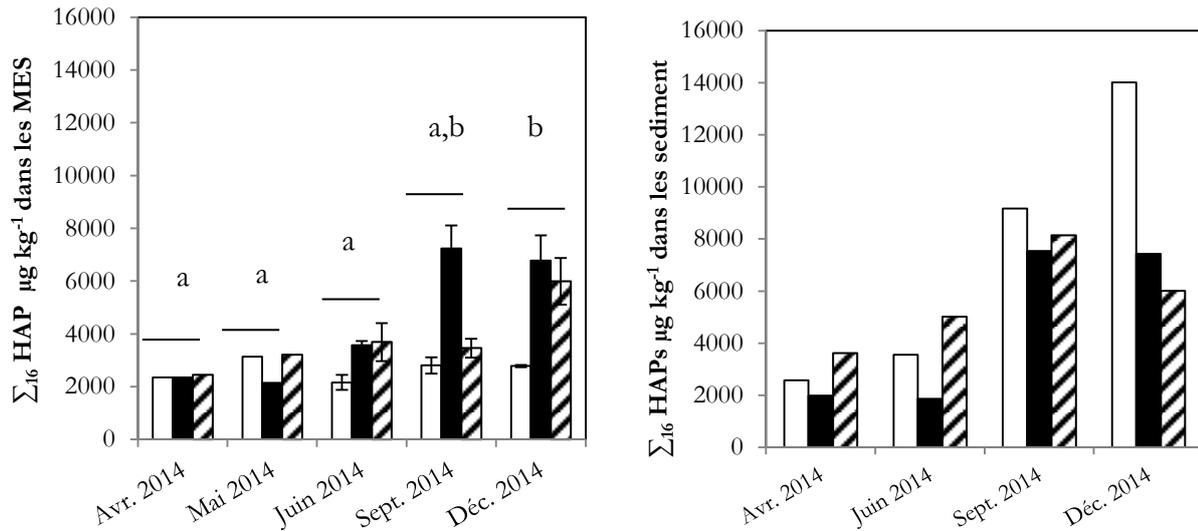


Figure 7-8 Concentrations en HAP dans les MES (gauche) et dans les sédiments (droite) du Doubs au cours des différentes campagnes d'échantillonnage en amont (blanc), en aval proche (noir) et en aval lointain (hachures). Les concentrations en HAP dans les MES en juin (n=5), septembre (n=5) et décembre (n=4) sont représentées par la moyenne pour chaque station et les écart-types. Les différences significatives (Anova à mesures répétées, $p < 0,05$) de concentrations moyennes en HAP selon les différentes campagnes d'échantillonnages sont représentées par des lettres.

Pour toutes les campagnes d'échantillonnage, les concentrations en HAP dans les MES et les sédiments dépassent systématiquement la valeur seuil TEC ($1610 \mu\text{g kg}^{-1}$). De plus, en septembre et décembre, les concentrations en HAP dans les MES prélevées en aval proche et dans tous les échantillons de sédiments dépassent la LEL (*lowest effect level* = $4000 \mu\text{g kg}^{-1}$) (MacDonald et al. 2000, MOE 2008). La STEP de Pontarlier n'a pas d'impact significatif sur les concentrations en HAP dans les MES dans le Doubs mais les résultats des campagnes de septembre et décembre indiquent une forte augmentation des concentrations en HAP en aval proche. La variabilité saisonnière synchrone des concentrations en HAP dans les MES et les sédiments suggère une source de contamination diffuse. Ainsi, bien que la STEP constitue un point de rejet des HAP dans le milieu (Chiffre et al. 2015), les principaux flux de HAP dans le Doubs ont vraisemblablement pour origine des sources diffuses (dépôts atmosphériques, lessivage des routes et chaussées) et ponctuels (déversoirs d'orage) en amont de la STEP.

Les concentrations en COT dans les MES sont variables en fonction des saisons et des stations (de 34,2 à $103 \text{ g C kg}^{-1} \text{ MS}$), mais sont plus élevées en aval proche de la STEP par rapport à l'amont. Dans les sédiments, les concentrations en COT ($20,9$ à $74,7 \text{ g C kg}^{-1} \text{ MS}$) et MO sont aussi variables selon les saisons et sont plus faibles que dans les MES. En rapportant les teneurs de HAP par rapport aux valeurs de COT, les concentrations de HAP dans les MES varient de 22,8 à $80,3 \mu\text{g g C}^{-1}$ au cours de l'année (Tableau 7-7). Dans les sédiments, les concentrations sont plus élevées que dans les MES et varient de 41,6 à $175,7 \mu\text{g g C}^{-1}$.

Tableau 7-7 Concentrations moyennes (erreur standard) en COT et taux de MO dans les MES et les sédiments du Doubs pour les différentes campagnes d'échantillonnage

	MES			Sédiments		
	Amont	Aval proche	Aval loint.	Amont	Aval proche	Aval loint.
COT g C kg⁻¹MS						
Avril 2014	69,1	103,0	103,0	22,8	20,9	74,7
Mai 2014	34,2	51,6	34,8	-	-	-
Juin 2014	57,1	86(13)	74(2)	55,7	44,8	59,6
Sept. 2014	53,3(2)	99,2(24)	65(7)	52,2	57,8	48,2
MO % (MS)						
Avril 2014	14,6	4,5	11,8	6,9	10,8	6,8
Mai 2014	6,9	10,8	6,8	-	-	-
Juin 2014	11,9(1)	19(2)	16(1)	9,2	3,9	1,7
Sept. 2014	9(1)	13(2)	11(5)	8,5	10,5	8,1

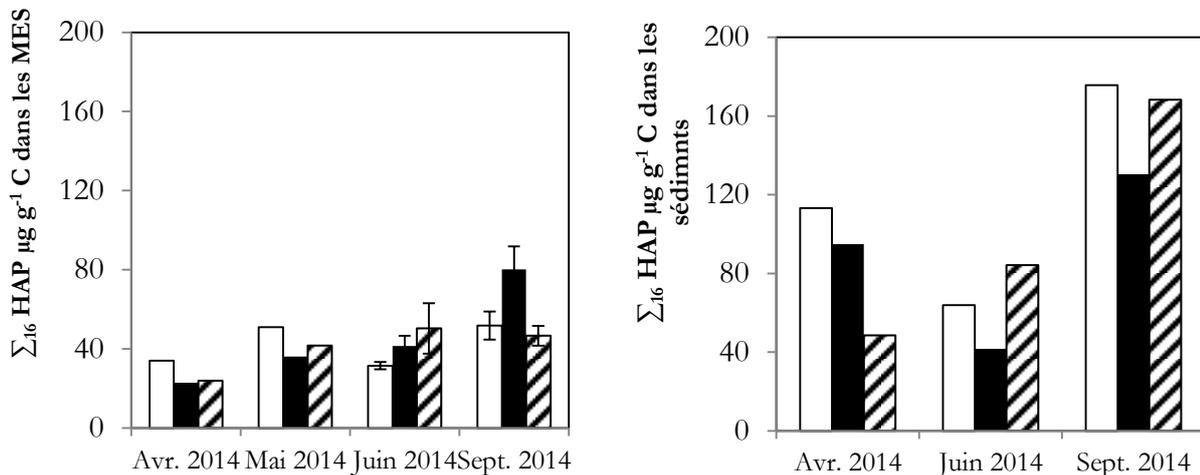


Figure 7-9 Concentrations en HAP rapporté au COT dans les MES (gauche) et dans les sédiments (droite) du Doubs au cours des différentes campagnes d'échantillonnage en amont (blanc), en aval proche (noir) et en aval lointain (hachures).

7.7.2 Le phosphore

Les concentrations moyennes en phosphore varient de 737 à 2850 mg kg⁻¹ de phosphore dans les MES et de 513 à 1190 mg kg⁻¹ dans les sédiments au cours des différentes campagnes d'échantillonnage (Figure 7-10). Dans les sédiments, les concentrations en phosphore ne dépassent pas les seuils de qualité des sédiments (SEL = 2000 mg kg⁻¹; MOE, 2008). Les concentrations moyennes en phosphore dans les MES en aval proche sont significativement plus élevées en aval proche par rapport à l'amont ($p < 0,05$). Ces résultats montrent un impact significatif de la STEP de Pontarlier sur les concentrations en phosphore dans les MES échantillonnées au cours des campagnes de prélèvements.

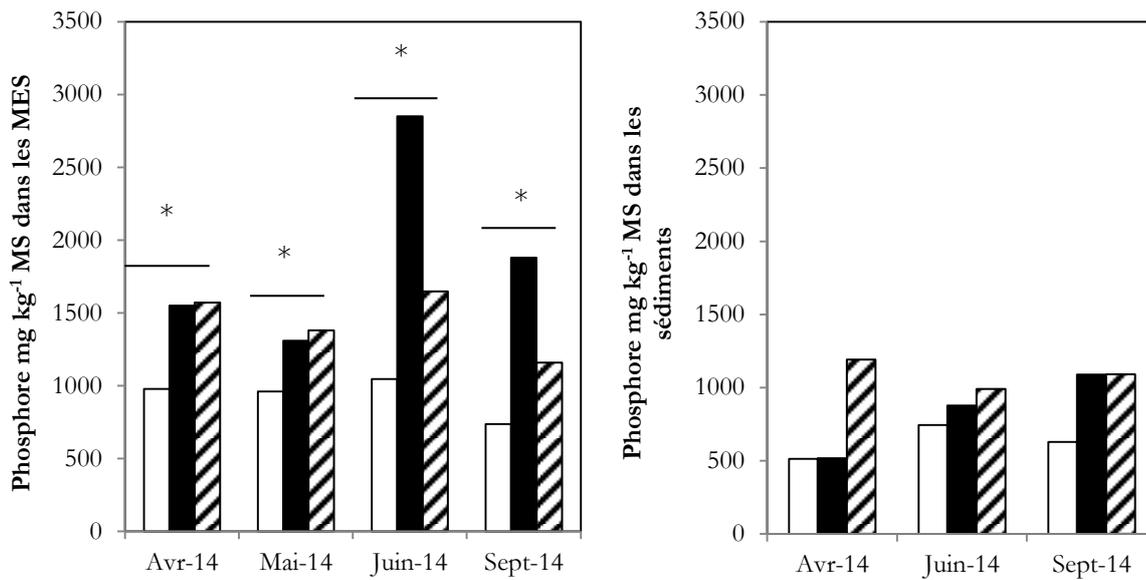


Figure 7-10 Concentrations en phosphore dans les MES (gauche) et dans les sédiments (droite) du Doubs au cours des différentes campagnes d'échantillonnage en amont (blanc), en aval proche (noir) et en aval lointain (hachures). Dans les MES, les concentrations en phosphore sont significativement plus élevées en aval proche (*) (anova à mesures répétées $p < 0,05$).

7.8 Conclusions

Dans la Loue, nous avons mis en évidence un impact de la STEP sur les concentrations en HAP dans les MES ainsi qu'une variabilité saisonnière des teneurs en HAP, dont les plus élevées ont été mesurées en hiver (de 675 à 3709 $\mu\text{g kg}^{-1}$). Dans le Doubs, l'augmentation des concentrations en HAP en aval proche de la STEP est très variable selon les campagnes de prélèvements et nous n'avons pas mis en évidence un impact significatif de la STEP. A l'inverse, la STEP de Pontarlier a un impact significatif sur les concentrations en phosphore dans les MES en aval proche du rejet.

La comparaison inter-sites montre les concentrations moyennes en phosphore et en HAP dans les MES du Doubs sont significativement plus élevées (Wilcoxon-Mann & Whitney, $p < 0,05$) que dans la Loue (Figure 7-11). De plus, pour la majorité des campagnes d'échantillonnage la variabilité saisonnière des niveaux de HAP et de phosphore dans les MES est synchronisée entre le Doubs et la Loue. Les concentrations en HAP les plus élevées sont observées en hiver, et en été pour le phosphore.

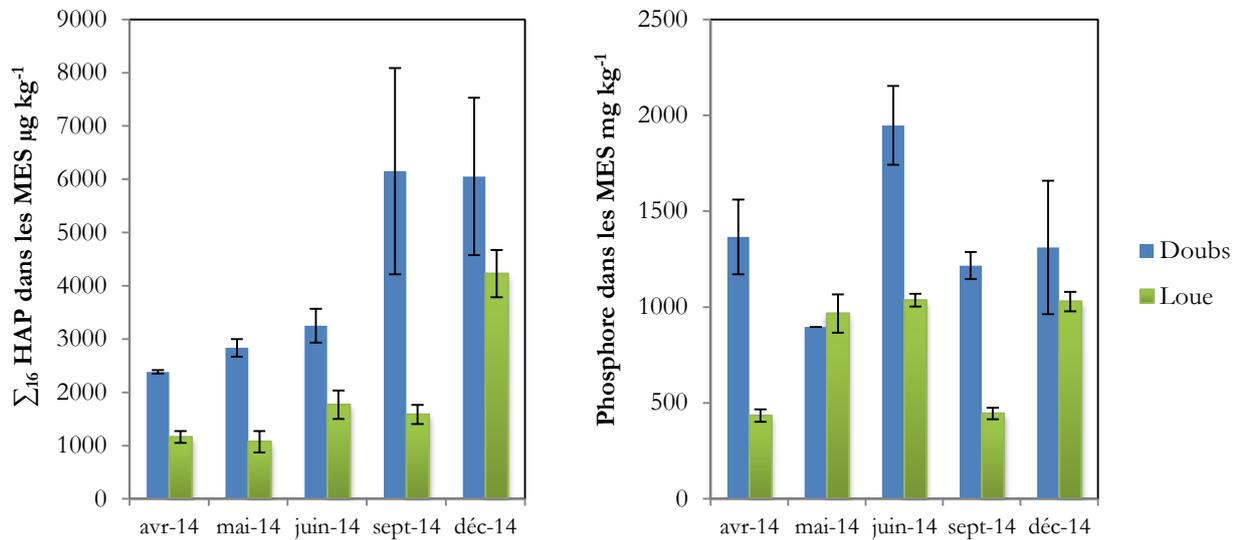


Figure 7-11 Concentrations moyenne en HAP et en phosphore dans les MES pour les différentes campagnes d'échantillonnage dans le Doubs (bleu) et dans la Loue (vert). Pour chaque campagne, les concentrations correspondent à la moyenne des trois stations de prélèvements (amont, aval proche et lointain), et les barres d'erreur aux écart-types. En avril, mai, juin, septembre et décembre, le nombre de répliques est respectivement $n=3$, $n=3$, $n=15$ et $n=10$.

Ces résultats mettent vraisemblablement en évidence des facteurs de variabilité communs entre le Doubs et la Loue à l'échelle du bassin versant, et appuient nos conclusions des études précédentes (Chapitre 3 et Chapitre 4. I). Effectivement, par le biais d'une ACP réalisée à partir des distributions relatives des molécules de HAP, nous avons mis en évidence de fortes similarités entre les échantillons de MES et de sédiments quels que soient leurs périodes et stations d'échantillonnage. En comparant avec les données de la littérature, il s'est avéré que les signatures moléculaires de nos échantillons étaient proches de celles de particules urbaines (Rogge et al. 1993). Ces résultats sont en accord avec diverses études montrant que la majorité des HAP retrouvés dans les STEP proviennent des eaux de ruissellements urbains tels que les lessivages de dépôts atmosphérique, de bitumes, de particules résultant de l'abrasion des pneus ainsi que des émissions automobiles (Gasperi 2006; Brown and Peake 2006; Yang et al. 2010). Les sources à l'origine d'émissions atmosphériques de HAP sont locales (industrie, chauffage urbain) et diffuses tel que le trafic routier dont l'intensité est corrélée aux teneurs en HAP dans les MES des eaux de ruissellement (Xanthopoulos and Hahn 1992; Foan et al. 2014). Par

ailleurs, l'augmentation des concentrations en HAP dans les MES et les sédiments en période hivernale peut s'expliquer par des baisses de température qui induisent une augmentation de l'adsorption des HAP sur la phase particulaire (Odabasi et al. 1999; Wu et al. 2005) tout en diminuant leur dispersion atmosphérique (Vrana et al. 2014). Ainsi, les conditions météorologiques hivernales associées à l'augmentation de la combustion de biomasse liée au chauffage, créent des situations propices aux dépôts de HAP particulaire. Toutefois les HAP étant des composés ubiquistes, ils sont soumis à de multiples processus abiotiques et biotiques en lien avec leurs propriétés physico-chimiques (volatilisation, adsorption, bioaccumulation, photooxydation,...). De ce fait, les ratios de HAP retrouvés dans le milieu récepteur sont vraisemblablement différents des ratios de HAP des sources d'émissions. Ainsi, l'identification des sources à partir de ces composés caractéristiques est plutôt limitée.

Outre les apports atmosphériques, la dégradation et l'érosion du réseau routier constitue une autre source potentielle de HAP dans les milieux aquatiques. En effet, les conditions hivernales dans le bassin versant particulièrement marquées par de longues périodes de gel et d'enneigement peuvent conduire à une dégradation notoire de la chaussée par des phénomènes de gonflement au gel d'enrobés bitumineux (Mauduit et al. 2013). Selon leur localisation, les chaussées sont généralement composées de divers empilements de couches de différents matériaux (sable silico-calcaire, sable ciment, grave-bitume, béton bitumineux, ...) nécessitant l'apport de liants bitumineux. Le bitume contiendrait en moyenne de 20 à 30 mg kg⁻¹ de HAP, soit moins de 5 mg kg⁻¹ dans l'enrobé bitumineux (Glet 2000; Onfield 2001). Les goudrons ont aussi été utilisés pendant plusieurs décennies en mélange avec du bitume dans les revêtements routiers. Les goudrons, au contraire du bitume, contiennent des quantités importantes de HAP (20 à 50%). Bien moins utilisés aujourd'hui pour la construction des routes, les goudrons sont toutefois toujours employés dans la formulation d'enrobés spéciaux (parkings, piste d'aéroports, ...) pour ses qualités de résistance aux solvants pétroliers. Bien qu'il n'existe aucune traçabilité sur la nature et les proportions des matériaux en place dans le réseau routier français, il est possible de retrouver du goudron dans chaque route ou chemin sous forme d'émulsion entre deux couches intermédiaires, pris dans la masse de l'enrobé ou en enduit de revêtement (Brazillet et al. 2001). Les chaussées peuvent donc être considérées comme des sources potentielles de HAP suite aux altérations mécaniques (fissurations, concassage) qui vont faciliter le lessivage des HAP contenus dans les différentes couches. En effet, des essais de percolation effectués sur des enrobés bitumineux concassés ont mis en évidence un relargage significatif des HAP dans les premiers percolats (Pépin 1998). Cependant, du fait de la variabilité des nombreuses chaussées existantes et de la variabilité de leurs teneurs en HAP, il est difficile d'estimer la contribution de ce type de source dans le cas de la contamination des MES et des sédiments dans le Doubs et dans la Loue. Effectivement, les

concentrations en HAP mesurées dans des échantillons de déchets routiers sont très variables et peuvent aller de 0,12 mg kg⁻¹ dans du béton bitumeux issu d'un parking de grande surface à 8124 mg kg⁻¹ dans un liant de chemin forestier (Brazillet et al. 2001).

Ces éléments de discussion permettent également d'expliquer en partie les concentrations en HAP plus élevées retrouvées dans le Doubs par rapport à la Loue. En effet, l'aire d'urbanisation et la proportion de surfaces imperméabilisées sont plus importantes à Pontarlier, et la proximité avec la Suisse engendre un trafic routier important augmentant chaque année 2,8 % depuis 2008 pouvant dépasser les 20 000 véhicules par jour (DREAL 2015). Toutefois, bien que la ville d'Ornans soit dix fois plus petite en terme de nombre d'habitants que Pontarlier, les concentrations en HAP dans les MES et les sédiments dépassent pour certaines campagnes les seuils de qualité (MacDonald et al. 2000).

Concernant le phosphore, de nombreux facteurs peuvent contribuer à sa variabilité temporelle des concentrations dans les MES. Les concentrations en phosphore dissous et particulaires dépendent principalement des phénomènes d'adsorption et de désorption dans les fractions organiques et inorganiques. Par ailleurs la variabilité des concentrations en phosphore dans les MES est aussi liée aux variations de régimes hydrologique et à la variabilité des sources diffuses du bassin telles que les lessivages des sols après épandage de lisiers et fumiers et/ ou la remobilisation des algues suite à des développements excessifs (biodégradation et une libération de nutriments) (Jarvie et al. 2008). Toutefois, des sources localisées et continues, notamment les rejets de STEP contribuent à l'apport de phosphore dissous et particulaire.

Ainsi en complément de la phase dissoute et des sédiments, les MES sont une matrice adaptée et pertinente pour évaluer les contaminations et étudier les variabilités spatio-temporelles à l'échelle locale ou à celle du bassin versant.

8 Chapitre 5 : Toxicité du benzo(a)pyrène et de la cyperméthrine seuls et en mélange sur l'amphipode *Gammarus pulex*

Les chapitres 3 et 4 ont montré l'existence d'une contamination chronique par les HAP des MES et des sédiments du Doubs et de la Loue. En outre, des analyses complémentaires ont révélé la présence ponctuelle de pesticides et plus particulièrement des pyréthrinoides telle que la cyperméthrine ($< 20 - 40,3 \mu\text{g kg}^{-1}$) dans les MES et les sédiments du Doubs et de la Loue. Ces substances sont fréquemment utilisées pour le traitement du bois, et comme anti-parasitaire en traitement vétérinaire, ainsi que dans de nombreuses autres applications. Cependant, l'exposition chronique et ponctuelle des organismes aquatiques aux HAP et aux pyrethrinoides peut induire des effets dommageables à différentes échelles et des dysfonctionnements des écosystèmes aquatiques. Du fait du caractère hydrophobe de ces molécules, les organismes benthiques et épibenthiques sont particulièrement exposés à ces contaminants qui peuvent être présents seuls ou en mélange dans les MES et les sédiments. Plusieurs travaux ont été réalisés sur l'étude de la toxicité des HAP et des pyréthrinoides dans les sédiments naturels ou artificiels sur divers organismes aquatiques via des bioessais en laboratoire (bactéries, algues, macroinvertébrés, poissons ; Maund et al. 2002 ; De Lange et al. 2006b ; Cachot et al. 2006 ; Adam et al. 2009 ; Engraff et al. 2011). Quelques auteurs ont aussi étudié la toxicité de plusieurs contaminants en mélange, dont les HAP et les pyréthrinoides dans des sédiments naturels (Badot et al. 2011; Mehler et al. 2011; Li et al. 2013). Toutefois, peu d'études en laboratoire ont été réalisées sur l'analyse des effets de HAP et des pyréthrinoides en mélange dans les sédiments artificiels. De plus, l'évaluation de la toxicité des pyrethrinoides est fréquemment réalisée sur l'amphipode *Hyalella azteca* d'après le protocole normalisé proposé par l'US EPA 2000). Toutefois, cet amphipode n'étant pas naturellement présent dans les cours d'eau européen, il est plus pertinent d'évaluer la toxicité de substances avec des espèces locales, comme par exemple *Gammarus pulex*, amphipode largement répandu dans les écosystèmes aquatiques européen. La toxicité de mélanges de polluants métalliques sur ces amphipodes a déjà été étudiée (Charles et al. 2014), mais il n'existe pas de données concernant les possibles effets conjoints liés à une exposition au HAP et aux pyréthrinoides. C'est pourquoi l'objectif de ce chapitre est d'évaluer la toxicité de sédiments artificiels contaminés par des HAP et pyréthrinoides seuls et en mélange sur l'amphipode *Gammarus pulex*. Dans cette étude (article en préparation), nous avons utilisé plus particulièrement le BaP en tant qu'indicateur des composés appartenant à la famille des HAP et la cyperméthrine du fait de leur présence dans les MES et les sédiments du Doubs et de la Loue et de leur toxicité sur les organismes aquatiques (Solomon et al. 2001).

Single and combined toxicity in *Gammarus pulex* (*Crustacea, Amphipoda*) exposed to PAH and pyrethroids spiked sediment

Axelle Chiffre¹, François Degiorgi¹, Etienne Chanez¹, Pierre-Marie Badot¹

1. University of Bourgogne Franche-Comté, Chrono-environnement, UMR 6249 UFC/CNRS usc INRA, 16 route de Gray, 25030 Besançon cedex, France

Abstract

Freshwater sediments are frequently contaminated with organic contaminants like polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and pesticides which may cause damages to aquatic biota. However the single or joint toxicities of PAH and pyrethroids polluted sediment are not documented. The objective of the present study was to evaluate the sensitivity of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* exposed to artificial sediment contaminated with a PAH (BaP) and pyrethrinoid (cypermethrin) delivered independently or in combination. For each experiment *G. pulex* were exposed during 10 days to single concentrations of BaP, cypermethrin and to mixture of both compounds. The LC₅₀ values were 11 mg kg⁻¹ for BaP and 17 µg kg⁻¹ for cypermethrin. Furthermore, we found that sublethal concentration of cypermethrin (5 µg kg⁻¹) in combination with increasing concentrations of BaP only slightly increased toxicity to *G. pulex* (LC₅₀ = 8 mg kg⁻¹). Our findings indicated that mixture of BaP and cypermethrin caused additive toxicity to *G. pulex* without synergetic effects.

Keywords : *Gammarus pulex*; BaP; Cypermethrin; sediment; mixture toxicity

8.1 Introduction

PAH and pesticides are widely present in the environment in mixture and are among contaminants of potential concern (Ingersoll et al. 2001; Mehler et al. 2011; Moschet et al. 2014). Numerous studies showed overall contamination of freshwaters by organic pollutants from urban and agricultural areas (Weston and Lydy 2010; Palmquist et al. 2011; Bartlett et al. 2012; Liu et al. 2013). PAH and pesticides usually enter in surface water by different routes like runoff, spray drift, waste water treatment plant (WWTP) and storm water overflows (Brown and Peake 2006; Weston and Lydy 2010; Palmquist et al. 2011). Due to their hydrophobic properties, PAH and pyrethroids have a high capacity to sorb on particles leading to their accumulation in suspended particulate matter and sediments at high levels in aquatic ecosystems (Palmquist et al. 2011; Schwientek et al. 2013). Sediments are therefore recognized to be a major source of pollution causing damages to organisms living there.

Worldwide PAH contamination of sediment ranged from several $\mu\text{g kg}^{-1}$ up to 50 mg kg^{-1} dw in contaminated area (Cachot et al. 2007; Zhu et al. 2008; Liu et al. 2013; Chiffre et al. 2015). Marked pyrethroid contaminations were reported in many freshwater sediment: concentrations of cypermethrin ranged from 0.8 to $40,3 \mu\text{g kg}^{-1}$ dw in rivers located in Jura Mountains in France (Adam 2008, Adam et al 2009), and from 0.63 to $30.6 \mu\text{g kg}^{-1}$ dw in a urban creek in California (Maund et al. 2002; Weston et al. 2004).

Numerous studies have evidenced toxicity of PAHs and pyrethroids on aquatic organisms. Exposure to BaP-spiked sediment induce genotoxic effect and adverse effects in embryos development (Barbee et al. 2008; Bihanic et al. 2014). Pyrethroids are among the most toxic insecticides for aquatic organism, with acute EC_{50} values for the amphipods *Gammarus pulex* and *Hyallela azteca* are at the ng per liter and $\mu\text{g kg}^{-1}$ range in the aqueous phase and in sediment respectively (Maund et al. 2002; Amweg et al. 2005; Adam et al. 2009; Weston and Lydy 2010). Co-exposure of freshwater organisms to pyrethroid and PAHs is not yet sufficiently investigated whereas occurrence of such co-exposition is likely frequent in many freshwater ecosystems. Therefore, toxicity assessment of PAH and cypermethrin in mixture is meaningful to quantify the impact of these contaminants on freshwater organisms, providing useful data for regulatory authorities in charge of setting or adjusting reglementary limits. Sediment toxicity tests, in which benthic organisms are exposed to bulk sediment (sediment-contact tests) are appropriate tools for assessing the potential hazard of contaminated sediments, as they consider more realistic exposure conditions than aqueous toxicity tests (Ingersoll et al. 2001). In addition, the use of artificial sediment in toxicity test improve comparisons between toxicity tests (Burton et al. 2000).

Knowledge about the assessment of the acute toxicity of sediment-associated BaP and cypermethrin single and in mixture is lacking. Furthermore, while crustaceans and particularly Gammarids are among the most sensitive species to pyrethroid insecticides (Cold and Forbes 2004), there are few data on sediment lethal concentration values of BaP and cypermethrin on the common European freshwater amphipod *G. pulex*. Hence the present study addresses these gaps. The objective of the present study was to assess the acute toxicity on *G. pulex* of artificial sediment-associated PAHs and pyrethroids as single substances and combined. *G. pulex* was selected for testing because of its ecological relevance in European freshwater, its high level of sensitivity to a wide range of pollutants and its common used as test organisms in ecotoxicological studies (Geffard et al. 2007; Adam et al. 2009; Vellinger et al. 2013). The amphipod *G. pulex* is one of the widespread, invertebrates in European streams and it is a major component of the biomass of many streams (Kunz et al. 2010). As detritus feeder, *G. pulex* play a key role in nutrient cycling in freshwater systems and are among the most sensitive aquatic invertebrates.

8.2 Materials and methods

8.2.1 Organisms sampling and maintenance

Gammaridae free from parasites were collected from an unpolluted stream (Ruisseau de la Fontaine des Ermites, France, N47°24'43" E006°03'32"). Individuals were acclimated in freshwater Evian® to laboratory conditions at least 10 days prior to testing and were fed with *Alnus glutinosa* leaves. Temperature was maintained at 16°C during their stay in the laboratory. For all the toxicity tests, we only used large individuals (> 6 mm). The present study was conducted in accordance with national and institutional guidelines for the protection of animal welfare.

8.2.2 Sediment spiking

Sediment were spiked with BaP and cypermethrin purchased from Sigma-Aldrich (France). The reconstituted sediment was composed of 75 % of sand, 22 % kaolin clay, 3 % sphagnum blond peat and 0.06 % of CaCo₃ to adjust pH to 6.5. Sand (0.2-0.5 mm) were sieved from sand (micromilled at 650 tr. min⁻¹ during 30 s) washed and dried 48 h. Sphagnum peat was sieved at 0.5 mm and dried during 48 hours. In each beaker, 100 g of artificial sediment were added and then spiked with the tested compounds.

For experiment 1, artificial sediments were spiked with BaP at 5, 20, 40 and 100 mg kg⁻¹ dw. Stock solution was prepared by diluting 100 mg of BaP (Sigma Aldrich) in 100 mL of acetone (Sigma Aldrich). Then in each beaker, 10 mL of stock solution diluted in acetone according to the final concentration were mixed in 100 g of sediment.

For experiment 2, artificial sediments were spiked with cypermethrin (Cyp) at 1, 5, 10 and 50 µg kg⁻¹ dw. Stock solution was prepared by diluting 50 mg of Cyp in 100 mL of acetone. Then, spiking was prepared in the same manner than experiment 1.

For experiment 3, artificial sediments were spiked with a mixture of BaP (5, 10, 20 and 40 mg kg⁻¹) and Cyp (fixed concentrations at 5 µg kg⁻¹ which correspond to EC₂₀).

Solvent was evaporated in a proofer during 72 h. One week before the start of the sediment toxicity test, 400 mL of Evian water was added in beakers with sediment contaminated. The sediment in the exposure beakers were held for 7 days under static conditions to allow sediment samples to better equilibrate before the start of the exposure. A solvent control sediment (acetone without PAH or cypermethrin) was prepared in the same manner.

8.2.3 Gammaridae exposition

Experiment 1, 2 and 3 were conducted separately. For each experiment, sediment treatment consisted of 6 replicates. After two weeks of acclimation, ten randomly selected male adults *G. pulex* were exposed in 600 mL glass beakers continuously oxygenated containing 100 g test sediment and 400 mL Evian® water. Treatment replicates were arranged and maintained in a completely randomized design. Glass beaker were covered in order to avoid evaporation and kept under controlled conditions with a 16:8 h light:dark photoperiod in the climatic room (16°C). Because BaP and pesticides require the use of solvent to be dissolved, we tested solvent control as a condition of the test. In addition negative controls with only Evian® water were also made to assess the validity of the test. Survival rate was investigated by counting the number of living Gammaridae at the end of the experiment.

8.2.4 Contaminants analysis of sediment

At the end of the manipulation all replicates sediment were lyophilized and stored at room temperature in the dark. Water samples were stored at -20°C until analysis. Tested solutions were analyzed to measure BaP concentrations remaining in the aqueous and particulate media after ten days of exposure.

8.2.5 PAH analysis

TOC content in sediment were analyzed according to European and French standards NF X31-109 by the Qualio laboratory (Besançon, France) which was certified for chemical analyses by the French Ministry of Ecology and Sustainable Development. For PAH analyses, benzo[a]pyrene (BaP) were purchased from Supelco Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France) and Interchim (Montluçon, France) for calibration. n-hexane Distol, and other products for organic trace analysis, were obtained from Fisher Scientific (Illkirch, France).

PAH extraction used the process described by Morin-Crini et al. (2014). PAHs were extracted from sediment with n-hexane by pressurized liquid extraction (SpeedExtractor E-914 system from Büchi, Rungis, France). For PAH analysis, extracts were analyzed using a GC-MS/MS analyser (Agilent, Massy, France) which included a 7890A GC system, a 7000 GC triple quadrupole mass spectrometer and an 80 GC Combipal autosampler equipped with a (5 % phenyl)-methylpolysiloxane HP5MS column (30 m x 0.25 mm i.d, 0.25 µm film thickness, Agilent 19091J-433). Extraction and detection methods were validated for all samples with regard to parameters such as linearity, limits of detection or quantification (LOD or LOQ), precision (relative standard deviation) and trueness (recoveries) (Morin-Crini et al. 2014; Morin-Crini et al. 2015). Quality controls (QC) were made every 10 samples. The

values fell in the range 93-107 % and 92-102 % of the expected value, for suspended matter or sediment samples and water samples respectively. When QC values were not situated in the range 80-120 % of the expected value, the calibration was carried out again and the samples reanalyzed. For estimation of recoveries, samples were spiked at different concentrations of PAHs with a standard solution (ampoule of PAH mixture at 2000 µg ml⁻¹, EPA 610, Restek, Lisses, France). As the “blanks”, which were simultaneously performed, presented weak values for all PAHs (< LOD) no subtraction was made.

8.2.6 Statistical analysis and models

Standard toxicity concentration-dependent Hill's model were tested to determine lethal concentrations induced 50 % of mortality (LC₅₀) of the single-contaminant and mixture experiments. They were calculated by the Regtox macro running with Microsoft Excel software.

In addition for the mixture, we calculated concentration addition (CA) and independent (IA) toxicity models. The CA model takes into account the relative toxicities of components and occurs according to (Faust et al. 2003) :

$$ECx_{xmix} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{p_i}{EC_{xi}} \right)^{-1}$$

where ECx_{xmix} is the effect concentration ($x\%$) of the mixture where the individual concentrations c_i are added up to c_{mix} , and p_i is the constant proportion of the chemical i in the mixture, i.e. $p_i = c_i/c_{mix}$.

The IA model takes into account the relative relationships between response probabilities in test organisms. The dose relationships can be calculated by multiplying the probabilities of nonresponse (Bliss 1939)

$$E(c_{mix}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)]$$

Statistical analyses were conducted using the software R 3.

8.3 Results and discussion

8.3.1 Chemical concentration after 10 days of exposure

Remaining concentrations of BaP at the end of experiment 1 and 3 were reported in Tableau 8-1. For experiment 1, mean concentrations of BaP in sediment ranged from 1.3, 8.1, 16.1 and 66.7 mg kg⁻¹ and from 0.25, 0.83, 6.27, 14.05 µg L⁻¹ in water, for initial concentrations in sediments of 5, 20, 40 and

100 mg kg⁻¹ respectively. In experiment 3, mean concentrations of BaP in sediment ranged from 2.1, 4.9, 12.9, and 44.6 mg kg⁻¹ in sediment and from 0.21, 0.58, 3.24 and 2.34 µg L⁻¹ in the water phase for initial concentrations in sediments of 5, 10, 20 and 100 mg kg⁻¹ respectively. Lower concentrations of BaP at the end of the experiments may be explained by moderate spiking efficiency, biodegradation and/or uptake by *G. pulex*.

Tableau 8-1 Nominal and average measured concentration of BaP in sediment after 10 days of exposure (d₁₀), mean (SD), (n=3)

Sediment			
Experiment 1		Experiment 3	
BaP nominal concentration (mg kg⁻¹)	BaP measured concentrations d₁₀ (mg kg⁻¹)	BaP nominal concentration (mg kg⁻¹)	BaP measured concentrations d₁₀ (mg kg⁻¹)
5	1.26 (0.13)	5	2.05 (0.056)
20	8.11 (1.82)	10	4.94 (1.02)
40	16.10 (1.98)	20	12.90 (0.91)
100	66.67 (1.16)	40	44.64 (0.638)

Tableau 8-2 Nominal and average measured concentration of BaP in water after 10 days of exposure (d₁₀), mean (SD), (n=3)

Water			
Experiment 1		Experiment 3	
BaP nominal concentration	BaP measured concentrations d₁₀ (µg L⁻¹)	Nominal concentration	BaP measured concentrations d₁₀ (µg L⁻¹)
0	0.25 (0.05)	0	0.21 (0.080)
0	0.83 (0.11)	0	0.58 (0.10)
0	6.27 (1.55)	0	3.24 (0.96)
0	14.05 (5.67)	0	2.34 (0.71)

8.3.2 Single and mixture toxicity of BaP and cypermethrin

Relevance of experimental results was checked using negative controls. Survival rate observed in controls and controls solvents were above 80% for all experiment. The observed mortality rate in *G. pulex* exposed to BaP and cypermethrin single or in mixture was concentration-dependent and increase along the gradient of compound concentration (Figure 8-1). The resulting LC₅₀ value for *G. pulex* exposed to sediment-amended BaP was 11.5 mg kg⁻¹ after ten days of exposure (Tableau 8-2). In experiment 2, cypermethrin lethality on *G. pulex* was displayed at low concentration: after ten days of exposure LC₅₀ occurred at 17 µg kg⁻¹. Finally, The LC₅₀ determined for BaP combined with 5 µg kg⁻¹ cypermethrin was 8 mg kg⁻¹.

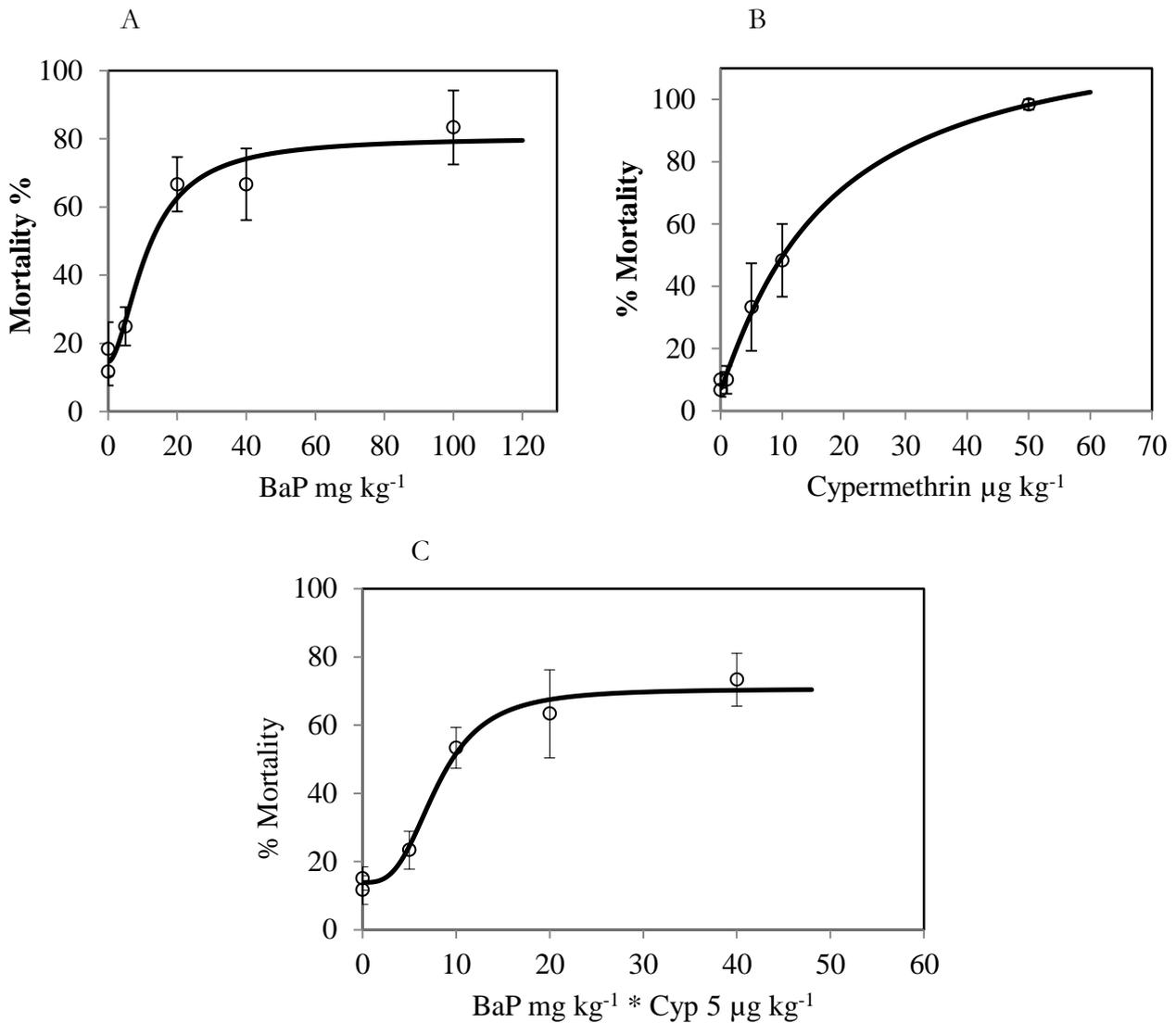


Figure 8-1 Concentration-response curve obtained by Hill's model after ten days of exposure to *G. pulex* to BaP (A), cypermethrin (B) and a mixture of BaP and cypermethrin (C). Percentages correspond to *G. pulex* mortality (%). BaP and mixture concentrations are expressed in mg kg⁻¹ and cypermethrin in µg kg⁻¹. Plots represent mean and standard error of six replicats.

Several authors studied ecotoxicological effects of cypermethrine in the water phase and in the sediment on aquatic organisms. Few studies evaluate pyrethroids particularly cypermethrin toxicity to gammarids in sediment. Nevertheless, Adam et al. (2009) showed that cypermethrin was highly toxic to the amphipod *G. pulex* with 96-h LC₅₀ of 0.09 µg L⁻¹. Acute toxicity results reported in this study (Figure 8-2) with gammarids were slightly higher than Maund et al. (2002) which found a 10-d LC₅₀ of 3.6 µg kg⁻¹ of cypermethrin to the amphipod *H. Azteca*. However reported to OC (Tableau 8-3), we showed a higher toxicity of cypermethrin to gammarids than Weston et al. (2004) which evidenced mean cypermethrin 10-d LC₅₀ values of 1.3 µg g⁻¹ OC. Nevertheless concentrations are in the same range. However, a recent study showed that field-collected populations in urban and agricultural

settings can be more than two orders of magnitude less sensitive to the pyrethroids than laboratory reared organisms (Clark et al. 2015). Cypermethrin may have also sublethal effects like growth reduction partially explained by requirement of additional energy for detoxification, metabolism and restoration of behavioral and physiological homeostasis (Palmquist et al. 2011). Moreover, Cold and Forbes (2004) showed that short pulse of the pyrethroid esfenvalerate caused decrease of fecundity and mating behavior of *G. pulex* which finally lead to decrease of offsprings.

Information about BaP toxicity in water phase and sediment on gammarids is sparse. Nevertheless, in the water phase Lawrence and Poulter (1998) found a LC_{50} of $371 \mu\text{g L}^{-1}$ to *G. duebeni* after 24h of exposure. An other study showed a 96-h LC_{50} of $58 \mu\text{g L}^{-1}$ to the copepod *Eurtemora affinis* nauplii (Forget-Leray et al. 2005). In this study, BaP concentration in the water phase after 10 days of exposure ranged from 0.25 to $14.05 \mu\text{g L}^{-1}$ and from 0.21 to $2.34 \mu\text{g L}^{-1}$ for respectively experiment 1 and 3. So we may consider that toxicity to *G. pulex* was linked to sediment- contact and to suspended contaminated particles (Verrhiest et al. 2001). Survival of the copepod *Amphiascus tenuiremis* was not affected to BaP exposition up to a concentration of $2100 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Wirth et al. 1998). In sediment, chronic toxicity of BaP to midges evidenced LC_{50} of 92 ± 19.6 and $56.9 \pm 1.76 \mu\text{g g}^{-1}$ OC after 20- and 43 days of exposure (Du et al. 2014). LC_{50} found in this study were more than ten times higher than Du et al. (2014). Highest toxicity to midges could be explained by longer exposure time exposure and/or a higher sensitivity of midges to BaP. In comparison with other PAH, Verrhiest et al. (2001) found LC_{50} of 10, 5 and 15 mg kg^{-1} dw of fluoranthene respectively for *Daphnia magna*, *Hyalalla azteca* and *Chironomus riparius*. Furthermore BaP may cause sublethal effects at lowest concentrations in water phase and sediment. Indeed, Lawrence and Poulter (1998) showed that swimming efficiency of *Gammarus duebeni* is impaired by BaP at nominal concentrations of $12 \mu\text{g L}^{-1}$. Lesueur et al. (2013) evidenced BaP caused a significant decrease in *E. affinis* larval growth compared with the solvent from $142 \mu\text{g kg}^{-1}$. Likewise, (Bang et al. 2009) reported growth retardation in larvae of the copepod *T. japonicus* exposed to $1 \mu\text{g L}^{-1}$ BaP.

Tableau 8-3 LC_{50} values for BaP and cypermethrin considering median TOC content ($17.4 \text{ g TOC kg}^{-1}$ dw) measured in 5 replicates in both experiments.

Sediment	Experiment 1	Experiment 2
Compound	BaP	Cypermethrin
$LC_{50} \text{ mg kg}^{-1}$	11.50	0.017
$LC_{50} \mu\text{g g}^{-1} \text{ OC}$	660	0.9

We evidenced significant differences between BaP and the mixture concentration response curve (Wilcoxon, Mann-Whitney test, $p < 0.05$) and between the CA model and BaP and mixture response curve (Wilcoxon, Mann-Whitney test, $p < 0.05$) (Figure 8-2). These results showed that the addition of cypermethrin to sediment contaminated with BaP slightly increased the toxicity to *G. pulex*. However, we observed weaker mortality rate of the mixture than predicted by the CA model. These differences may due to lowest BaP and cypermethrine concentrations measured in the sediment than nominal concentrations.

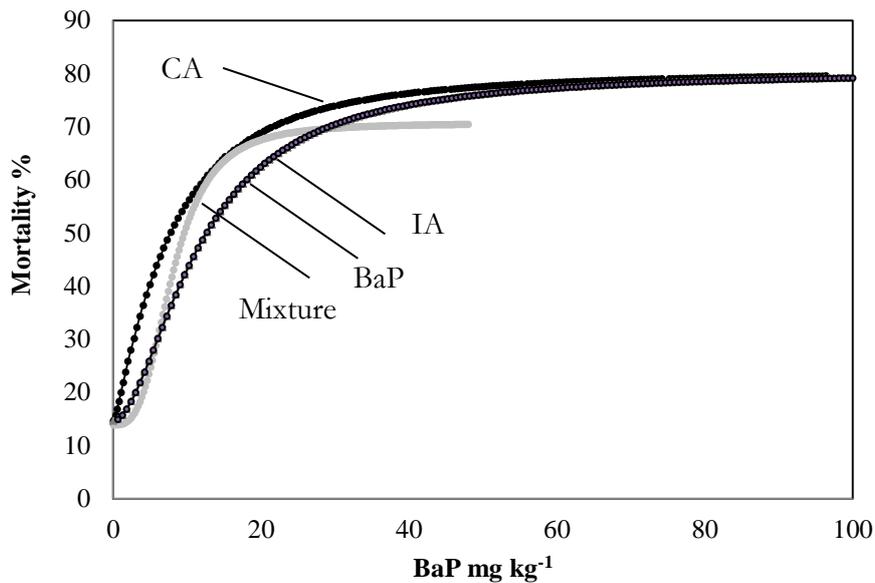


Figure 8-2 Concentration-reponse curve obtained for *G. pulex* exposed to BaP and mixture of BaP and cypermethrin after ten days of exposure, expressed in terms of BaP (mg kg⁻¹). Percentages correspond to *G. pulex* mortality (%). Predicted concentration-response curves calculated by CA, IA models.

8.4 Conclusion

Acute toxicity threshold were established by exposing *G. pulex* to sediment-associated BaP and cypermethrin and highlighted additive effect of BaP and cypermethrin in mixture. This study showed that acute toxicity of cypermethrin occurred at low concentrations (17 $\mu\text{g kg}^{-1}$) which may be under analytical detection limits of laboratory. This means that acute and chronic toxicities to *G. pulex* or other species may occur in field site without being detected. Despite a high exposure level to BaP, this study proposed new acute toxicity data to the amphipod *G. pulex* exposed to sediment-associated with BaP and cypermethrin. Furthermore these results showed cypermethrin high toxicity to the amphipod *G. pulex* at environmental concentrations and highlighted a risk of adverse effects to amphipod in aquatic ecosystems.

Discussion générale et conclusion

Les objectifs de ce travail de thèse étaient d'identifier, quantifier et comparer les flux de contaminants issus des STEP dans le Doubs et dans la Loue dans les phases dissoutes et particulaires, de caractériser les facteurs de variabilité des concentrations des différentes substances ainsi que d'évaluer leur impact sur les organismes aquatiques.

L'étude des paramètres globaux (matière carbonée, nutriments et MES) réalisée par une série d'échantillonnage ponctuel des eaux de surface et des rejets a mis en évidence un impact des STEP sur l'augmentation des concentrations en ammonium dans le Doubs et dans la Loue, mais n'a pas mis en évidence d'augmentation significative des concentrations des autres paramètres en aval des rejets de STEP. En effet, les variations des paramètres sont principalement influencées par les variabilités saisonnières des régimes hydriques du Doubs et de la Loue, notamment en période de crues pendant lesquelles les concentrations de COT et de MES sont les plus élevées. Pour les substances étudiées, les flux issus du rejet de la STEP d'Ornans ne représentent qu'une faible proportion des flux observés dans la Loue. Dans le Doubs, la dilution est plus faible que dans la Loue en raison du plus faible rapport entre les débits de la STEP et de la rivière. En ce qui concerne l'ammonium, les flux issus de la STEP peuvent par exemple représenter jusqu'à 80% des flux mesurés dans le Doubs.

Cette étude a permis de proposer un ordre de grandeur pour les flux de substances circulant dans le Doubs et dans la Loue. Elle montre notamment que les flux d'azote, phosphore et de COT dans la Loue sont deux à cinq fois plus élevés que dans le Doubs. Les flux d'azote et de phosphore estimés dans la Loue à Ornans ($3,4 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$ et $0,09 \text{ kg P ha}^{-1} \text{ an}^{-1}$) sont cohérents avec les résultats de Chanez et al. (2014) portant sur l'étude des flux d'azote et de phosphore sur la Loue plus en aval à Chenecey Buillon.

Les résultats de la présente étude montrent la grande variabilité temporelle des différents paramètres étudiés. Ces variables sont notamment influencées par la variabilité du régime hydrologique. Nos résultats mettent également en évidence les limites d'un échantillonnage de type ponctuel pour l'évaluation des impacts des rejets de STEP. Effectivement, ce type d'échantillonnage peut sous-estimer les flux de polluants en négligeant les pics de concentration transitoires pouvant survenir entre deux prélèvements et leur impact sur les organismes. Nos résultats indiquent qu'il conviendrait de mieux prendre en compte la variabilité temporelle de la composition des rejets dans les suivis mis en place pour la surveillance de leur qualité.

Afin d'évaluer dans quelle mesure cette variabilité peut avoir des conséquences sur le milieu récepteur, nous avons choisi de mettre en place un système de prise de données à pas de temps très court de l'ordre d'une prise de donnée par heure en amont et en aval des STEP. Le suivi quasi continu de nombreux paramètres n'étant pas matériellement possible, notre choix s'est porté sur la turbidité et

la conductivité, paramètres connus pour permettre l'évaluation de la variabilité de la qualité de l'eau à différentes échelles de temps (Jarvie et al. 2001; Vandenberg et al. 2005). Si la STEP de Pontarlier a un effet marqué sur l'augmentation de la conductivité en période hivernale, les effets de la STEP d'Ornans sont plus variables et elle n'a pas toujours un impact sur la conductivité. Ces résultats sont vraisemblablement liés à une dilution très élevée du rejet de la STEP d'Ornans dans la Loue.

Nos résultats pourront utilement être mis à profit par les gestionnaires et les scientifiques pour l'évaluation de la qualité chimique et biologique de l'eau, en particulier dans la Loue, où une variation importante de la conductivité (de 260 à 470 $\mu\text{S cm}^{-1}$) a été observée sur une période de 30 ans (Mudry et al. 2015).

Un des objectifs de cette thèse était d'évaluer la contamination des phases particulaires tels que les MES et les sédiments dans le Doubs et dans la Loue. Plusieurs auteurs soulignent l'importance de prendre en compte les phases particulaires pour l'évaluation de la qualité de l'eau, notamment pour la quantification des polluants hydrophobes généralement adsorbés aux MES (Coquery et al. 2005; Vignati et al. 2009). En effet, les processus d'adsorption des substances chimiques sur les MES jouent des rôles clés dans le transport, les transferts et les effets des polluants sur les organismes (Crini et Badot 2010). Les corrélations positives entre les concentrations en MES et la turbidité ont permis de montrer que les variations des concentrations en MES sont liées aux variations de débits dans le Doubs et dans la Loue. Dans le but d'évaluer la variabilité temporelle des MES et de contaminants associés, nous avons mis en place un dispositif d'échantillonnage passif permettant de collecter et d'intégrer les variabilités de flux de MES au cours de différentes périodes. Ce dispositif nous a plus particulièrement permis d'évaluer l'impact des STEP sur la contamination des MES par les HAP et le phosphore. Ainsi, nous avons mis en évidence une variabilité spatio-temporelle à l'échelle stationnelle et à celle du bassin versant. Nous avons montré des impacts ponctuels des STEP de Pontarlier et d'Ornans qui se traduisent par une augmentation des concentrations en phosphore et en HAP dans les MES en aval des rejets. En outre, la mise en évidence d'une variabilité saisonnière synchrone des concentrations en phosphore et HAP dans les MES du Doubs et de la Loue suggère l'influence de facteurs de variabilité communs à l'échelle du bassin versant. La variabilité saisonnière des concentrations en HAP est vraisemblablement en lien avec la variabilité des sources d'émissions atmosphériques (combustion biomasse, trafic routier) et diffuses (goudron et bitume) influencée par les conditions météorologiques, notamment les basses températures hivernales qui accentuent l'adsorption particulaire des HAP et leur dépôt, ainsi que les phénomènes de dégradation et d'érosion des routes. Les HAP sont ensuite transportés par le biais des eaux de ruissellements jusqu'aux STEP ou sont directement rejetés dans le milieu via les écoulements diffus et les déversoirs d'orage. Dans une telle hypothèse, les STEP peuvent

être considérées comme des points de concentrations des HAP dans le Doubs et dans la Loue, quand bien même les sources d'émissions sont multiples et diffuses. La variabilité temporelle des concentrations en phosphore dans les MES trouve vraisemblablement son origine dans des apports diffus d'origine agricole liés aux épandages, des apports d'origine domestique par l'intermédiaire de rejets directs d'eaux résiduaires non traitées caractérisées par de fortes concentrations en phosphore et dans la remobilisation des proliférations algales.

Dans le cadre d'une évaluation de la qualité de l'eau et d'une estimation des flux de polluants, ces résultats montrent l'importance de considérer les variabilités temporelles des concentrations en HAP et la nécessité d'une évaluation temporelle de la contamination. Nous avons donc proposé à titre exploratoire, une estimation des flux de HAP en associant des prises de données en continu (turbidité) avec différentes concentrations de HAP quantifiées dans le Doubs et dans la Loue au cours des campagnes d'échantillonnage. Afin de prendre en compte la variabilité temporelle des concentrations en HAP dans les MES, nous avons utilisé les concentrations médianes, et les concentrations correspondant aux 10^{ème} et 90^{ème} percentiles (Tableau 8-4).

Tableau 8-4 Concentrations en HAP ($\mu\text{g kg}^{-1}$) dans les MES en amont et en aval des STEP de Doubs et d'Ornans dans le Doubs et dans la Loue.

	Médiane	10 ^{ème} percentile	90 ^{ème} percentile
Doubs			
Amont (n = 15)	2963	1896	10698
Aval (n = 16)	4052	2679	9996
Loue			
Amont (n = 15)	1511	787	3672
Aval (n = 14)	3672	778	3799

Nous avons ensuite estimé les concentrations en MES à partir des données de turbidité enregistrées toutes les heures par les sondes et des équations décrivant les corrélations entre la turbidité et les concentrations en MES (Figure 4-15). Les flux de MES ont été calculés pour les stations amont et aval avec la méthode DWC (Équation 3-2). Ensuite les flux de HAP ont été obtenu en multipliant les flux de MES pondérés par les concentrations en HAP (Tableau 8-5).

Tableau 8-5 Estimation des flux moyens annuels de HAP (kg an⁻¹) en amont et en aval des STEP de Doubs et d'Ormans dans le Doubs et dans la Loue, pour les valeurs médiane, 10^{ème} percentile et 90^{ème} percentile des concentrations en HAP dans les MES.

	Doubs			Loue		
	Médiane	10 ^{ème} percentile	90 ^{ème} percentile	Médiane	10 ^{ème} percentile	90 ^{ème} percentile
Amont	5,0	3,2	17,9	14,1	7,4	34,3
Aval	10,1	6,1	25,0	19,5	8,6	42,1

En considérant les concentrations médianes de HAP dans les MES, les flux moyens annuels de HAP sont environ deux fois plus faibles, dans le Doubs (5,0 à 10,1 kg an⁻¹) que dans la Loue (14,1 à 19,5 kg an⁻¹), et sont plus élevés en aval des STEP. A titre comparatif, les flux moyens de HAP estimés arrivant dans la baie de San Francisco sont d'environ 3600 kg an⁻¹ (Greenfield and Davis 2005), 328 à 2400 kg an⁻¹ dans le Danube pour un débit moyen de 6500 m³ s⁻¹ (Foan et al. 2014) et 606 kg an⁻¹ dans la rivière Saguenay au Québec pour un débit moyen de 1750 m³ s⁻¹ (Pelletier et al. 2009). Dans le cas de l'estuaire de Seine, les rejets des stations d'épuration ont été évalués à 52 kg an⁻¹ pour un débit moyen de 500 m³ s⁻¹ (Lachambre and Fisson 2007). Toutefois, les débits moyens du Danube, de la Saguenay et de la Seine étant respectivement 300, 80 et 24 fois plus élevés que celui de La Loue, les flux de HAP moyens ne sont que 16 à 120, 30 et 2,5 fois plus élevés dans ces cours d'eau. Cependant, ces résultats préliminaires nécessitent l'acquisition de données complémentaires afin de prendre en compte une plus grande variété de conditions hydrologiques et climatiques, mais ont néanmoins permis d'estimer l'ordre de grandeur des flux de HAP moyens dans le Doubs et dans la Loue.

Les résultats obtenus avec deux contaminants aux propriétés physico-chimiques et origines différentes, ont démontré l'intérêt d'utiliser les MES pour l'évaluation de la qualité de l'eau en complément de l'étude des phases aqueuses et sédimentaires. En effet, de nombreux tronçons de cours d'eau sont dépourvus de zones de sédimentation et l'échantillonnage de MES s'avère être une alternative facile à mettre en place et peu coûteuse pour évaluer les contaminations. De plus, l'échantillonnage des MES permet d'intégrer les variations des concentrations en contaminants sur une période connue de l'ordre de la semaine, ce qui fournit des informations utilisables notamment pendant les crues où d'importants flux de MES sont transportés. Enfin, les capacités d'adsorption des sédiments sont dépendantes de leur composition physico-chimique et notamment de leurs teneurs en matière organique et en argiles. De ce fait, la comparaison de la contamination d'échantillons de sédiments ayant des caractéristiques différentes peut parfois être difficile. L'échantillonnage de MES permet de diminuer ces facteurs de variabilité car il permet la collecte simultanée de MES similaires dans les différentes stations d'étude. Les MES constituent donc une matrice qui apportent des informations

complémentaires par rapport aux prélèvements ponctuels qui reflètent un état instantané de la qualité de l'eau ou aux sédiments qui sont le témoin d'une contamination passée mais dont le plus souvent on ne peut pas connaître le temps d'intégration.

Nous avons aussi montré l'existence d'une contamination ponctuelle des MES et des sédiments du Doubs et de la Loue par les pyréthrinoides. Ainsi, l'existence d'une contamination chronique par les HAP associée à des contaminations ponctuelles de pyréthrinoides reconnus comme étant particulièrement toxique pour les amphipodes nous ont amené à évaluer les effets de ces micropolluants en mélange. Dans le but d'améliorer les connaissances sur les impacts de ces micropolluants en mélange sur les organismes aquatiques, et du fait des propriétés hydrophobes de ces deux familles de contaminant, nous avons choisi d'évaluer la toxicité conjointe des HAP et des pyréthrinoides sur *G. pulex* sur une matrice sédimentaire. Nous avons sélectionné le BaP en tant qu'indicateur représentatif de la famille des HAP et la cyperméthrine, molécule de la famille des pyréthrinoides régulièrement présente dans les MES et les sédiments et très toxique envers les crustacés d'eau douce. Nous avons caractérisé les effets toxiques sur *G. pulex* de sédiments contaminés séparément par du BaP ($CL_{50} = 11 \text{ mg kg}^{-1}$) et de la cyperméthrine ($CL_{50} = 17 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$), et nous avons montré l'additivité des effets de mélanges de BaP à des concentrations variables et de cyperméthrine à concentration constante. Les valeurs de toxicité aiguë de la cyperméthrine confirment la toxicité de cette molécule quand elle est présente dans les sédiments sur les amphipodes et notamment sur *G. pulex*, espèce autochtone de cours d'eau européen. Ces résultats montrent la nécessité de disposer de techniques analytiques présentant une limite de quantification inférieure aux seuils de toxicité pour une évaluation pertinente de la qualité de l'eau, notamment lors des évaluations réglementaires. Les techniques analytiques de routine qui sont disponibles sur le marché peuvent être inadaptées. A titre d'exemple, la limite de quantification la plus basse proposée par un laboratoire prestataire pour le dosage de la cyperméthrine dans les MES et les sédiments était de $20 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ c'est-à-dire supérieure à la CL_{50} trouvée dans notre travail.

Enfin, dans la cadre des objectifs de cette thèse et des recommandations du SDAGE portant sur l'évaluation des impacts des substances présentes dans les produits de synthèse couramment utilisés, nous avons dressé un premier bilan de la contamination en résidus médicamenteux. Cette étude a montré la présence de substances médicamenteuses dans les eaux du Doubs et de la Loue : les molécules retrouvées en plus fortes concentrations sont un anti-inflammatoire (diclofénac) et un antibiotique (sulfaméthoxazole). Les STEP ont été identifiées comme les principales sources de contamination, toutefois ces contaminations peuvent provenir d'autres sources de contaminations tels

que des rejets domestiques non raccordés aux réseaux, ainsi que de rejets liés aux activités de pâturage et d'épandage sur le bassin versant. En outre la quantification de substances médicamenteuses à la source de la Loue témoigne d'une contamination des eaux souterraines et de flux de contaminants dans le karst. Cette étude préliminaire sur la contamination du bassin versant du Haut-Doubs et de la Haute Loue par les résidus médicamenteux permettra d'orienter les travaux ultérieurs afin de diminuer l'impact des STEP, d'évaluer la contamination d'autres cours d'eau du bassin versant et dans le karst. De plus, il apparaît nécessaire dans le contexte régional de rechercher des molécules spécifiques d'une utilisation vétérinaire afin de dissocier les flux d'origine humaine de ceux liés aux activités agricoles.

L'ensemble du travail présenté dans cette thèse a permis de mettre en évidence les impacts des STEP sur la contamination par différentes substances des eaux du Doubs et de la Loue à travers l'étude des compartiments dissous et particulaires. Les niveaux de contamination des eaux et des matrices particulières mesurés *in situ* et les seuils de toxicité mesurés pour des mélanges de contaminants présents de façon récurrente ou ponctuelle dans la Loue et le Doubs indique que les risques pour les organismes aquatiques ne peuvent être négligés, les valeurs mesurées dans la Loue et le Doubs dépassant les valeurs repères de toxicité.

Les résultats obtenus au cours de ces travaux contribuent également à une meilleure connaissance des sources et mode de dispersion des différents contaminants identifiés. Ce travail souligne l'influence de nombreux facteurs de variabilité anthropiques et naturels de la contamination du Doubs et de la Loue à l'échelle du bassin versant. Les travaux d'autres auteurs soulignent la difficulté de maîtriser les pollutions diffuses à l'échelle des bassins versant du fait de nombreuses interactions entre des facteurs anthropiques (occupations des sols, pratiques agricoles, industries) et des paramètres liés au milieu naturel (climat, type de sols, géologie) (Barber et al. 2006; Fairbairn et al. 2016). Par ailleurs la variabilité temporelle de ces interactions accentue la difficulté d'identifier les causes et les effets des contaminations dans le bassin versant (Fairbairn et al. 2016). C'est ce que nous avons observé dans le Doubs et dans la Loue dans le cadre d'une étude sur les dynamiques de populations de gammares (*Gammarus fossarum* et *Gammarus pulex*) en tant que bioindicateur pour évaluer la variabilité des impacts des STEP.

Depuis plusieurs années en Europe, différents auteurs ont démontré l'intérêt et l'utilisation d'amphipodes tels que les gammares (*G. fossarum* et *G. pulex*) comme bioindicateurs pour étudier les impacts *in situ* de contaminants et d'unités de traitement des eaux usées (Schirling et al. 2005; Ladewig et al. 2006; Coulaud et al. 2011; Besse et al. 2012; Peschke et al. 2014). Adam (2008) a notamment mis en évidence de forts impacts des produits de traitement du bois tels que les pyrèthrinoïdes sur les populations de *G. fossarum* et *G. pulex* en Franche Comté. Il a en outre montré que *G. pulex* constituait

un organisme modèle pertinent pour réaliser des évaluations écotoxicologiques dans les cours d'eau Adam et al. (2010). Lors de quatre campagnes d'échantillonnage, nous avons collecté des gammares en amont et en aval de chaque STEP dans le Doubs et dans la Loue selon Chiffre et al. (2015). Pour les deux campagnes de 2014, nous avons aussi prélevé des gammares en amont « lointain » à Oye et Pallet (OyP) situé en amont de Pontarlier, et à Montegesoye (Mtg) localisé en amont de la ville d'Ornans. Les résultats obtenus montrent une variabilité des structures de populations de gammares selon les cours d'eau et selon les campagnes d'échantillonnage (Figure 8-3). Dans le Doubs, les densités de gammares sont généralement plus élevées que dans la Loue (sauf Mtg). En excluant les stations « amont lointain », les densités varient de 658 à 9460 ind m⁻² dans le Doubs et de 107 à 2836 ind m⁻² dans la Loue. Pour les deux cours d'eau, les densités les plus faibles ont été observées en février 2013. Pour les autres campagnes d'échantillonnage, les densités sont variables selon les stations de prélèvements. Dans le Doubs, pour les trois premières campagnes de prélèvements les densités de gammares en amont de la STEP sont les plus faibles par rapport aux densités de gammares en aval de la STEP. Toutefois en septembre 2014, la tendance s'inverse et les densités de gammares en aval proche sont significativement plus faibles qu'en amont (Kruskal wallis, $p < 0,05$). Dans la Loue, les densités de gammares en aval proche diminuent par rapport à l'amont pour trois campagnes de prélèvements (février 2014, mars et septembre 2014). Toutefois, les densités de gammares observées à Mtg en amont de la ville d'Ornans, sont deux à cinq fois supérieures à celles des autres stations. Ceci est vraisemblablement le signe d'altérations fortes de la qualité de l'eau en lien avec l'agglomération d'Ornans. Il est à noter qu'à l'aval de la STEP, la situation n'est pas plus détériorée qu'à l'amont et qu'après quelques centaines de mètres (aval lointain), les populations sont plus denses, notamment en septembre 2014.

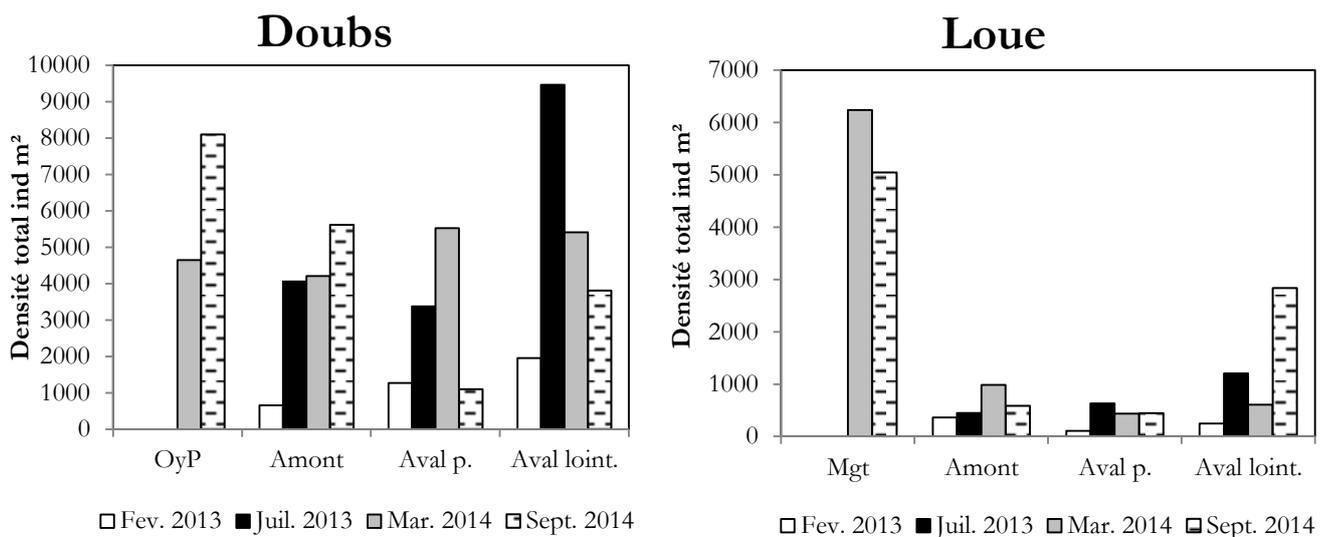


Figure 8-3 Densité totale de gammares (ind m⁻²) en amont, aval proche et aval lointain des STEP de Doubs et d'Ornans dans respectivement le Doubs et la Loue pour chacune des campagnes de

prélèvements en février 2013, juillet 2013, mars 2014 et septembre 2014, et à Oye et Pallet et Montgesoye pour les campagnes de 2014.

Les populations de gammares varient en fonction de facteurs naturels tels que la température, l'abondance de nourriture, la diversité des substrats, le régime hydrologique et le parasitisme (Crane 1994; Schleiter et al. 1999; Adam 2008). Les dynamiques de population varient en fonction des périodes de reproduction variables qui ont lieu en hiver et en été. L'abondance de juvéniles augmente généralement de mars à juin, puis en début d'automne (Welton 1979). Ainsi, les faibles densités en février 2013 sont probablement dues à l'augmentation du taux de mortalité en lien avec une limitation de l'abondance de nourriture disponible en période hivernale (Gee, 1992). Par ailleurs, la dynamique des populations de gammares est aussi fonction des pressions anthropiques ponctuelles et diffuses à l'origine de contaminations inorganiques et organiques des phases aqueuses et particulières (Ladewig et al. 2006 ; Adam 2008 ; Peschke et al. 2014). Ladewig et al. (2006) ont montré des effets variables des impacts de STEP qui peuvent induire des augmentations ou des diminutions de la taille des gammares. L'augmentation de la taille des gammares en aval des STEP peut être liée à l'augmentation des concentrations en matière carbonée qui contribuent à l'apport d'énergie nécessaire à la croissance des individus. Au contraire, la diminution des abondances de gammares en aval des rejets de STEP peut être la conséquence d'une diminution du taux de reproduction suite à une baisse du taux d'accouplement, des déformations des appareils de reproduction et des perturbations hormonales. En effet, plusieurs études ont montré les effets de rejets de STEP sur le développement et la régulation des systèmes de reproduction (Gross et al. 2001 ; Schirling et al. 2005). En aval d'une STEP située dans la rivière Schussen en Allemagne, Peschke et al. (2014) a mis en évidence une modification du sexe ratio, une baisse de la fécondité des femelles et une augmentation des concentrations des protéines de choc thermique (hsp70). Des comportements d'évitement des zones contaminées tels que décrits par De Lange et al. (2006b) peuvent aussi expliquer la faible abondance des gammares en aval des STEP. Globalement, malgré une variabilité spatio-temporelle des densités de gammares reflétant probablement l'association de plusieurs facteurs naturels et anthropique (impact de la STEP), les faibles densités observées en amont des STEP témoignent de la présence d'autres sources de perturbations (rejets non raccordés au réseau d'assainissement, déversoirs d'orages, ...) qui ne permettent pas de discriminer les effets de la STEP par rapport à l'amont. Toutefois, l'augmentation des densités en aval lointain témoigne de conditions plus favorables pour les gammares, et montre vraisemblablement des impacts de l'agglomération de Pontarlier et de la STEP. Effectivement, les déversoirs d'orage situés en amont de la STEP sont à l'origine de rejets dans le Doubs d'un mélange d'eaux pluviales et domestiques non traitées et pouvant impacter les populations de gammares (Kosmala et al. 1999; Gray 2004). De même dans la Loue, les densités de population de gammares en amont de la STEP sont très inférieures aux densités observées en amont d'Ornans à Montgesoye. Du fait de l'occurrence de perturbations en

amont des STEP en lien avec les rejets urbains, il n'est pas aisé de discriminer les impacts de la STEP. De plus, bien que l'étude de la dynamique de population de gammares soit pertinente pour évaluer les impacts d'une source ponctuelle de contamination (Adam 2008), elle ne permet pas dans notre cas d'identifier un impact récurrent de la STEP. Toutefois, l'étude d'autres paramètres à l'échelle de l'individu tels que l'induction de la vitellogénine, l'augmentation du taux de protéine hsp70 ou des phénomènes de bioaccumulation pourrait apporter des informations complémentaires à l'étude des populations de gammares (Ashauer et al. 2010; Xuereb et al. 2011; Besse et al. 2012; Peschke et al. 2014; Bertin et al. 2016).

Ces travaux de thèse ont permis d'acquérir de nouvelles connaissances sur les sources et le transport de différents contaminants dans le bassin versant du Haut Doubs et de la Haute Loue qui suscitent par ailleurs de nouvelles interrogations et pistes de réflexions. En effet, la mise en évidence de nombreux facteurs de variabilité naturelle et anthropique démontre l'importance d'une étude à long terme des impacts pouvant affecter la qualité de l'eau. C'est pourquoi il est nécessaire d'acquérir des données sur plusieurs années permettant de prendre en compte diverses conditions hydroclimatiques et leurs impacts sur la qualité de l'eau. De plus, l'échantillonnage de MES en complément des échantillonnages ponctuels d'eau de surface et de sédiments à l'échelle du bassin versant permettra d'améliorer les connaissances sur la variabilité spatio-temporelle des flux de diverses substances. La nature karstique du bassin versant souligne par ailleurs l'importance de développer des connaissances sur les relations entre la variabilité des flux de contaminants et les transferts pédologiques et hydrogéologiques.

Bibliographie

- Adam O (2008) Impact des produits de traitement du bois sur les amphipodes *Gammarus pulex* (L.) et *Gammarus fossarum* (K.): approches chimiques, hydro-écologiques et écotoxicologique. Franche-Comté
- Adam O, Degiorgi F, Crini G, Badot PM (2009) Mixture toxicity assessment of wood preservative pesticides in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1402–1407.
- Adam O, Degiorgi F, Crini G, Badot PM (2010) High sensitivity of *Gammarus* sp. juveniles to deltamethrin: Outcomes for risk assessment. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1402–1407.
- AFFSAPS (2011) Ventes de médicaments aux officines et aux hopitaux de France : chiffres cle 2010.
- AFSSA (2006) Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine.
- Al Aukidy M, Verlicchi P, Jelic A, et al (2012) Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. *Sci Total Environ* 438:15–25. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.08.061
- Amweg EL, Weston DP, Ureda NM (2005) Use and toxicity of pyrethroid pesticides in the Central Valley, California, USA. *Environ Toxicol Chem* 24:966–972. doi: 10.1897/04-146R1.1
- Andersen CB, Lewis GP, Sargent KA (2004) Influence of wastewater-treatment effluent on concentrations and fluxes of solutes in the Bush River, South Carolina, during extreme drought conditions. *Environ Geosci* 11:28–41.
- Anderson B, Hunt J, Phillips B, et al (2007) Patterns and trends in sediment toxicity in the San Francisco Estuary. *Environ Res* 105:145–155. doi: 10.1016/j.envres.2006.07.005
- Andreo B, Goldscheider N, Vadillo I, et al (2006) Karst groundwater protection: First application of a Pan-European Approach to vulnerability, hazard and risk mapping in the Sierra de Líbar (Southern Spain). *Sci Total Environ* 357:54–73. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.05.019
- ANSM (2014) Analyse des ventes de médicaments en France en 2013.
- Aquaref, ONEMA, INERIS (2009) Les substances émergentes dans l'environnement - Note de synthèse sur l'état de l'art concernant les produits pharmaceutiques, les cosmétiques et les produits d'hygiène corporelle.
- Ashauer R, Caravatti I, Hintermeister A, Escher BI (2010) Bioaccumulation kinetics of organic xenobiotic pollutants in the freshwater invertebrate *Gammarus pulex* modeled with prediction intervals. *Environ Toxicol Chem* 29:1625–1636. doi: 10.1002/etc.175
- Badot P., Adam O, Degiorgi F, Crini G (2011) Combined exposure to mixtures of chemical. An impossible challenge ? In: Pesticides, M. Stoytcheva. Rijeka (Croatia), pp 67–90
- Badot P-M, Degiorgi F, Lucot E, et al (2014) Etat de santé des rivières karstiques en relation avec les pressions anthropiques sur leurs bassins versants. *Chrono Environnement*, Université de Bourgogne Franche Comté

- Baker DR, Kasprzyk-Hordern B (2011) Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1218:1620–1631. doi: 10.1016/j.chroma.2011.01.060
- Bang HW, Lee W, Kwak I-S (2009) Detecting points as developmental delay based on the life-history development and urosome deformity of the harpacticoid copepod, *Tigriopus japonicus sensu lato*, following exposure to benzo(a)pyrene. *Chemosphere* 76:1435–1439. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.06.002
- Banjac Z, Ginebreda A, Kuzmanovic M, et al (2015) Emission factor estimation of ca. 160 emerging organic microcontaminants by inverse modeling in a Mediterranean river basin (Llobregat, NE Spain). *Sci Total Environ* 520:241–252. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.03.055
- Barbee GC, Barich J, Duncan B, et al (2008) In situ biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Ecotoxicol Environ Saf* 71:454–464. doi: 10.1016/j.ecoenv.2008.01.001
- Barber LB, Murphy SF, Verplanck PL, et al (2006) Chemical Loading into Surface Water along a Hydrological, Biogeochemical, and Land Use Gradient: A Holistic Watershed Approach. *Environ Sci Technol* 40:475–486. doi: 10.1021/es051270q
- Bartelt-Hunt S, Snow DD, Damon-Powell T, Miesbach D (2011) Occurrence of steroid hormones and antibiotics in shallow groundwater impacted by livestock waste control facilities. *J Contam Hydrol* 123:94–103. doi: 10.1016/j.jconhyd.2010.12.010
- Bártíková H, Podlipná R, Skálová L (2016) Veterinary drugs in the environment and their toxicity to plants. *Chemosphere* 144:2290–2301. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.137
- Bartlett AJ, Rochfort Q, Brown LR, Marsalek J (2012) Causes of toxicity to *Hyaella azteca* in a stormwater management facility receiving highway runoff and snowmelt. Part I: Polycyclic aromatic hydrocarbons and metals. *Sci Total Environ* 414:227–237. doi: 10.1016/j.scitotenv.2011.11.041
- Bellas J, Thor P (2007) Effects of selected PAHs on reproduction and survival of the calanoid copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicology* 16:465–474. doi: 10.1007/s10646-007-0152-2
- Bertin D, Labadie P, Ferrari BJD, et al (2016) Potential exposure routes and accumulation kinetics for poly- and perfluorinated alkyl compounds for a freshwater amphipod: *Gammarus* spp. (Crustacea). *Chemosphere* 155:380–387. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.04.006
- Besse J-P, Coquery M, Lopes C, et al (2012) Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Res.* doi: 10.1016/j.watres.2012.10.024
- Besse J-P, Garric J (2008) Human pharmaceuticals in surface waters: Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicol Lett* 176:104–123. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.10.012
- Bichet V, Campy M (2008) Montagnes du Jura – Géologie et paysages, NEO.

- Bihanic FL, Perrichon P, Landi L, et al (2014) Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay. *Environ Sci Pollut Res* 21:13689–13702. doi: 10.1007/s11356-014-2607-3
- Bilotta GS, Brazier RE (2008) Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water Res* 42:2849–2861. doi: 10.1016/j.watres.2008.03.018
- Blanchard M, Teil M-J, Ollivon D, et al (2001) Origin and distribution of polyaromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in urban effluents to wastewater treatment plants of the paris area (FRANCE). *Water Res* 35:3679–3687. doi: 10.1016/S0043-1354(01)00078-1
- Blant (2001) *Le Jura. Les paysages, la vie sauvage, les territoires.*, Delachaux et Niestlé. Paris
- Bliss CI (1939) The Toxicity of Poisons Applied Jointly. *Ann Appl Biol* 26:585–615. doi: 10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x
- Bloesch DJ, Burns DNM (1980) A critical review of sedimentation trap technique. *Schweiz Z Für Hydrol* 42:15–55. doi: 10.1007/BF02502505
- Bloor MC, Banks CJ (2006) An evaluation of mixed species in-situ and ex-situ feeding assays: The altered response of *Asellus aquaticus* and *Gammarus pulex*. *Environ Int* 32:22–27. doi: 10.1016/j.envint.2005.04.004
- Bowes MJ, Leach DV, House WA (2005) Seasonal nutrient dynamics in a chalk stream: the River Frome, Dorset, UK. *Sci Total Environ* 336:225–241. doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.05.026
- Boxall ABA, Fogg LA, Blackwell PA, et al (2004) Veterinary medicines in the environment. *Rev Environ Contam Toxicol* 180:1–91.
- Boxall ABA, Kolpin DW, Halling-Sørensen B, Tolls J (2003) Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environ Sci Technol* 37:286A–294A.
- Brandt HCA, de Groot PC (2001) Aqueous leaching of polycyclic aromatic hydrocarbons from bitumen and asphalt. *Water Res* 35:4200–4207. doi: 10.1016/S0043-1354(01)00216-0
- Brazillet C, Domas J, Pepin G (2001) *Caractérisation des déchets - Le goudron dans les déchets du réseau routier.* INERIS
- BRGM (2009) *Substances pharmaceutiques à usage vétérinaire dans les effluents agricoles : synthèse bibliographique.*
- BRGM (2014) *Rôle et contribution des eaux souterraines d'origine karstique dans les crues de la Loue à Chenecey-Buillon.*
- Brinkmann M, Hudjetz S, Kammann U, et al (2013) How flood events affect rainbow trout: Evidence of a biomarker cascade in rainbow trout after exposure to PAH contaminated sediment suspensions. *Aquat Toxicol* 128–129:13–24. doi: 10.1016/j.aquatox.2012.11.010
- Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, et al (2005) Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ Toxicol Chem* 24:464–469. doi: 10.1897/04-081R.1

- Brown JN, Peake BM (2006) Sources of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban stormwater runoff. *Sci Total Environ* 359:145–155. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.05.016
- Bunzel K, Kattwinkel M, Liess M (2013) Effects of organic pollutants from wastewater treatment plants on aquatic invertebrate communities. *Water Res* 47:597–606. doi: 10.1016/j.watres.2012.10.031
- Burton GA, Pitt R, Clark S (2000) The Role of Traditional and Novel Toxicity Test Methods in Assessing Stormwater and Sediment Contamination. *Crit Rev Environ Sci Technol* 30:413–447. doi: 10.1080/10643380091184228
- Busetti F, Heitz A, Cuomo M, et al (2006) Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *J Chromatogr A* 1102:104–115. doi: 10.1016/j.chroma.2005.10.013
- Cachot J, Geffard O, Augagneur S, et al (2006) Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquat Toxicol* 79:257–267. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.06.014
- Cachot J, Law M, Pottier D, et al (2007) Characterization of Toxic Effects of Sediment-Associated Organic Pollutants Using the λ Transgenic Medaka. *Environ Sci Technol* 41:7830–7836. doi: 10.1021/es071082v
- Canobbio S, Mezzanotte V, Sanfilippo U, Benvenuto F (2009) Effect of Multiple Stressors on Water Quality and Macroinvertebrate Assemblages in an Effluent-Dominated Stream. *Water Air Soil Pollut* 198:359–371. doi: 10.1007/s11270-008-9851-4
- Cerniglia CE (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3:351–368. doi: 10.1007/BF00129093
- Chambers P., Allard M, Walker S., et al (1997) The impacts of municipal wastewater effluents on Canadian waters: a review. *Water Qual Res J Can* 32:659–71.
- Chambers PA, McGoldrick DJ, Brua RB, et al (2012) Development of environmental thresholds for nitrogen and phosphorus in streams. *J Environ Qual* 41:7–20. doi: 10.2134/jeq2010.0273
- Chanez E, Degiorgi F, Lucot E, Badot P-M (2014) Les flux d'azote et de phosphore dans le bassin versant de la haute et moyenne Loue.
- Chang H, Wan Y, Wu S, et al (2011) Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: Comparison to estrogens. *Water Res* 45:732–740. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.046
- Charles J, Crini G, Degiorgi F, et al (2013) Unexpected toxic interactions in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) exposed to binary copper and nickel mixtures. *Environ Sci Pollut Res* 21:1099–1111. doi: 10.1007/s11356-013-1978-1
- Chebbo G, Gromaire MC, Ahyerre M, Garnaud S (2001) Production and transport of urban wet weather pollution in combined sewer systems: the Marais experimental urban catchment in Paris. *Urban Water* 3:3–15.

- Chiffre A, Degiorgi F, Morin-Crini N, et al (2015) PAH occurrence in chalk river systems from the Jura region (France). Pertinence of suspended particulate matter and sediment as matrices for river quality monitoring. *Environ Sci Pollut Res* 22:17486–17498. doi: 10.1007/s11356-015-4897-5
- Choi K, Kim Y, Park J, et al (2008) Seasonal variations of several pharmaceutical residues in surface water and sewage treatment plants of Han River, Korea. *Sci Total Environ* 405:120–128. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.06.038
- Clark SL, Ogle RS, Gantner A, et al (2015) Comparative sensitivity of field and laboratory populations of *Hyalella azteca* to the pyrethroid insecticides bifenthrin and cypermethrin. *Environ Toxicol Chem* 34:2250–2262. doi: 10.1002/etc.2907
- Cleuvers M (2003) Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol Lett* 142:185–194. doi: 10.1016/S0378-4274(03)00068-7
- CLIFFORD NJ, RICHARDS KS, BROWN RA, LANE SN (1995) Laboratory and field assessment of an infrared turbidity probe and its response to particle size and variation in suspended sediment concentration. *Hydrol Sci J* 40:771–791. doi: 10.1080/02626669509491464
- Cold A, Forbes VE (2004) Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquat Toxicol* 67:287–299. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.01.015
- Conley JM, Symes SJ, Schorr MS, Richards SM (2008) Spatial and temporal analysis of pharmaceutical concentrations in the upper Tennessee River basin. *Chemosphere* 73:1178–1187. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.07.062
- Coquery M, Morin A, Bécue A, Lepot B (2005) Priority substances of the European Water Framework Directive: analytical challenges in monitoring water quality. *TrAC Trends Anal Chem* 24:117–127. doi: 10.1016/j.trac.2004.11.004
- Coquery M, Pomies M, Martin-Ruel S, et al (2011) Mesurer les micropolluants dans les eaux usées brutes et traitées.
- Coulaud R, Geffard O, Xuereb B, et al (2011) In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Res* 45:6417–6429. doi: 10.1016/j.watres.2011.09.035
- Countway RE, Dickhut RM, Canuel EA (2003) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) distributions and associations with organic matter in surface waters of the York River, VA Estuary. *Org Geochem* 34:209–224. doi: 10.1016/S0146-6380(02)00162-6
- Crane M (1994) Population characteristics of *Gammarus pulex* (L.) from five English streams. *Hydrobiologia* 281:91–100. doi: 10.1007/BF00006438
- Crini G, Badot PM (2010) Sorption processes and pollution. Besançon
- da Silva AK, Amador J, Cherchi C, et al (2013) Emerging Pollutants – Part I: Occurrence, Fate and Transport. *Water Environ Res* 85:1978–2021. doi: 10.2175/106143013X13698672323065
- Darwano H, Duy SV, Sauvé S (2014) A New Protocol for the Analysis of Pharmaceuticals, Pesticides, and Hormones in Sediments and Suspended Particulate Matter From Rivers and Municipal Wastewaters. *Arch Environ Contam Toxicol* 66:582–593. doi: 10.1007/s00244-014-0007-9

- Daughton CG, Ternes TA (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect* 107:907–938.
- de Boer J, Wester PG, van der Horst A, Leonards PEG (2003) Polybrominated diphenyl ethers in influents, suspended particulate matter, sediments, sewage treatment plant and effluents and biota from the Netherlands. *Environ Pollut* 122:63–74. doi: 10.1016/S0269-7491(02)00280-4
- De la Cruz N, Giménez J, Esplugas S, et al (2012) Degradation of 32 emergent contaminants by UV and neutral photo-fenton in domestic wastewater effluent previously treated by activated sludge. *Water Res* 46:1947–1957. doi: 10.1016/j.watres.2012.01.014
- De Lange HJ, Noordoven W, Murk AJ, et al (2006a) Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquat Toxicol* 78:209–216. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.03.002
- De Lange HJ, Sperber V, Peeters ETHM (2006b) Avoidance of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments by the freshwater invertebrates *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Environ Toxicol Chem* 25:452–457. doi: 10.1897/05-413.1
- 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. doi: 10.1016/j.ijheh.2011.08.002
- Dégémont (2004) *Mémento technique de l'eau*, Lavoisier.
- DeMott RP, Gauthier TD, Wiersema JM, Crenson G (2010) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Austin Sediments After a Ban on Pavement Sealers. *Environ Forensics* 11:372–382. doi: 10.1080/15275922.2010.526520
- Deng W, Li XG, Li SY, et al (2013) Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediment of mud areas in the East China Sea using diagnostic ratios and factor analysis. *Mar Pollut Bull* 70:266–273. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.02.032
- Descamps A, Poupény A (2013) Caractérisation de l'état de santé de la Loue dans le secteur d'Ornans et recherche des causes d'altération.
- Doong R, Lin Y (2004) Characterization and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon contaminations in surface sediment and water from Gao-ping River, Taiwan. *Water Res* 38:1733–1744. doi: 10.1016/j.watres.2003.12.042
- Douben PET (2003) *PAHs: An Ecotoxicological Perspective*. John Wiley & Sons
- DREAL (2015) RN 57 Amélioration de la circulation au sud de Pontarlier.
- Du J, Li Y, Huang ZC, You J (2014) Chronic Toxicity Thresholds for Sediment-Associated Benzo[a]pyrene in the Midge (*Chironomus dilutus*). *Arch Environ Contam Toxicol* 66:370–378. doi: 10.1007/s00244-014-0005-y
- Edwards AC, Kay D, McDonald AT, et al (2008) Farmyards, an overlooked source for highly contaminated runoff. *J Environ Manage* 87:551–559. doi: 10.1016/j.jenvman.2006.06.027
- Edwards AC, Withers PJA (2008) Transport and delivery of suspended solids, nitrogen and phosphorus from various sources to freshwaters in the UK. *J Hydrol* 350:144–153. doi: 10.1016/j.jhydrol.2007.10.053

- Einsiedl F, Radke M, Maloszewski P (2010) Occurrence and transport of pharmaceuticals in a karst groundwater system affected by domestic wastewater treatment plants. *J Contam Hydrol* 117:26–36. doi: 10.1016/j.jconhyd.2010.05.008
- Ekka SA, Haggard BE, Matlock MD, Chaubey I (2006) Dissolved phosphorus concentrations and sediment interactions in effluent-dominated Ozark streams. *Ecol Eng* 26:375–391. doi: 10.1016/j.ecoleng.2006.01.002
- EMA (1998) Committee for veterinary medicinal products ENROFLOXACIN. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
- Engraff M, Solere C, Smith KEC, et al (2011) Aquatic toxicity of PAHs and PAH mixtures at saturation to benthic amphipods: Linking toxic effects to chemical activity. *Aquat Toxicol* 102:142–149. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.01.009
- EPTB Schéma d'aménagement et gestion des eaux Haut Doubs/Haute Loue.
- Fairbairn DJ, Karpuzcu ME, Arnold WA, et al (2016) Sources and transport of contaminants of emerging concern: A two-year study of occurrence and spatiotemporal variation in a mixed land use watershed. *Sci Total Environ* 551–552:605–613. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.02.056
- Fatone F, Di Fabio S, Bolzonella D, Cecchi F (2011) Fate of aromatic hydrocarbons in Italian municipal wastewater systems: An overview of wastewater treatment using conventional activated-sludge processes (CASP) and membrane bioreactors (MBRs). *Water Res* 45:93–104. doi: 10.1016/j.watres.2010.08.011
- Faust M, Altenburger R, Backhaus T, et al (2003) Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat Toxicol* 63:43–63. doi: 10.1016/S0166-445X(02)00133-9
- Felten V, Baudoin JM, Guérol F (2006) Physiological recovery from episodic acid stress does not mean population recovery of *Gammarus fossarum*. *Chemosphere* 65:988–998. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.059
- Feng C, Xia X, Shen Z, Zhou Z (2007) Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in Wuhan section of the Yangtze River, China. *Environ Monit Assess* 133:447–458. doi: 10.1007/s10661-006-9599-5
- Fent K, Weston AA, Caminada D (2006) Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat Toxicol* 76:122–159. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.09.009
- Fernandes MB, Sicre M-A, Boireau A, Tronczynski J (1997) Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Mar Pollut Bull* 34:857–867. doi: 10.1016/S0025-326X(97)00063-5
- Ferrari B, Mons R, Vollat B, et al (2004) Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? *Environ Toxicol Chem* 23:1344–1354. doi: 10.1897/03-246
- Ferrari B, Paxéus N, Giudice RL, et al (2003) Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac. *Ecotoxicol Environ Saf* 55:359–370. doi: 10.1016/S0147-6513(02)00082-9

- Flaherty CM, Dodson SI (2005) Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere* 61:200–207. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.02.016
- Foan L, Leblond S, Thöni L, et al (2014) Spatial distribution of PAH concentrations and stable isotope signatures ($\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$) in mosses from three European areas – Characterization by multivariate analysis. *Environ Pollut* 184:113–122. doi: 10.1016/j.envpol.2013.08.006
- 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. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.06.008
- Foster GD, Roberts Jr EC, Gruessner B, Velinsky DJ (2000) Hydrogeochemistry and transport of organic contaminants in an urban watershed of Chesapeake Bay (USA). *Appl Geochem* 15:901–915. doi: 10.1016/S0883-2927(99)00107-9
- Gabet-Giraud V, Miège C, Jacquet R, Coquery M (2014) Impact of wastewater treatment plants on receiving surface waters and a tentative risk evaluation: the case of estrogens and beta blockers. *Environ Sci Pollut Res Int* 21:1708–1722. doi: 10.1007/s11356-013-2037-7
- Gasperi J (2006) Introduction et transfert des hydrocarbures à différentes échelles spatiales dans le réseau d'assainissement parisien.
- Geffard A, Quéau H, Dedourge O, et al (2007) Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 145:632–640. doi: 10.1016/j.cbpc.2007.02.012
- Glet W (2000) Mise en évidence, par sublimation, de la présence d'HAP dans les matériaux de construction routière. Barcelone,
- Gómez MJ, Herrera S, Solé D, et al (2012) Spatio-temporal evaluation of organic contaminants and their transformation products along a river basin affected by urban, agricultural and industrial pollution. *Sci Total Environ* 420:134–145. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.01.029
- Gómez MJ, Martínez Bueno MJ, Lacorte S, et al (2007) Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast. *Chemosphere* 66:993–1002. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.07.051
- Goodson KL, Pitt R, Subramaniam S, Clark S (2012) The Effect of Increased Flows on the Treatability of Emerging Contaminants at a Wastewater Treatment Plant during Rain Events. *Proc Water Environ Fed* 2012:7224–7237. doi: 10.2175/193864712811704152
- Grabicova K, Grabic R, Blaha M, et al (2015) Presence of pharmaceuticals in benthic fauna living in a small stream affected by effluent from a municipal sewage treatment plant. *Water Res* 72:145–153. doi: 10.1016/j.watres.2014.09.018
- Gray L (2004) Changes in water quality and macroinvertebrate communities resulting from urban stormflows in the Provo River, Utah, U.S.A. *Hydrobiologia* 518:33–46. doi: 10.1023/B:HYDR.0000025055.15164.40
- Greenfield BK, Davis JA (2005) A PAH fate model for San Francisco Bay. *Chemosphere* 60:515–530. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.01.004

- Gromaire M. (1998) La pollution des eaux pluviales urbaines en réseau d'assainissement unitaire. Caractéristiques et origines. Ecole Nationale des Ponts et Chaussées
- Gros M, Petrović M, Barceló D (2007) Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (Northeast Spain). *Environ Toxicol Chem* 26:1553–1562. doi: 10.1897/06-495R.1
- Gross MY (2001) Effects of sewage effluent and nonylphenol on the fresh water amphipod *Gammarus Pulex* (L.). Ph.D., Royal Holloway, University of London
- Gross MY, Maycock DS, Thorndyke MC, et al (2001) Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. *Environ Toxicol Chem* 20:1792–1797. doi: 10.1002/etc.5620200824
- Guo W, He M, Yang Z, et al (2007) Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, suspended particulate matter and sediment from Daliao River watershed, China. *Chemosphere* 68:93–104. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.12.072
- Harries JE, Sheahan DA, Matthiessen P, et al (1996) A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ Toxicol Chem* 15:1993–2002. doi: 10.1002/etc.5620151118
- Heberer T (2002) Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett* 131:5–17. doi: 10.1016/S0378-4274(02)00041-3
- Heinz B, Birk S, Liedl R, et al (2008) Water quality deterioration at a karst spring (Gallusquelle, Germany) due to combined sewer overflow: evidence of bacterial and micro-pollutant contamination. *Environ Geol* 57:797–808. doi: 10.1007/s00254-008-1359-0
- Hemming JM, Allen HJ, Thuesen KA, et al (2004) Temporal and spatial variability in the estrogenicity of a municipal wastewater effluent. *Ecotoxicol Environ Saf* 57:303–310. doi: 10.1016/S0147-6513(03)00025-3
- Hill A. (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *Journal of Physiology. J Physiol* 40:4–7.
- Hoeger B, Köllner B, Dietrich DR, Hitzfeld B (2005) Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquat Toxicol* 75:53–64. doi: 10.1016/j.aquatox.2005.07.006
- Iglesias A, Nebot C, Vázquez BI, et al (2013) Detection of veterinary drug residues in surface waters collected nearby farming areas in Galicia, North of Spain. *Environ Sci Pollut Res* 21:2367–2377. doi: 10.1007/s11356-013-2142-7
- Ingersoll CG, MacDonald DD, Wang N, et al (2001) Predictions of Sediment Toxicity Using Consensus-Based Freshwater Sediment Quality Guidelines. *Arch Environ Contam Toxicol* 41:8–21. doi: 10.1007/s002440010216
- Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, et al (2005) Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. *Sci Total Environ* 346:87–98. doi: 10.1016/j.scitotenv.2004.11.017
- Jacquemin P (1984) Réponses hydrodynamiques des hauts bassins du Doubs et de la Loue. Université de Franche-comté

- J. Lawrence A, Poulter C (1998) Development of a sub-lethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus duebeni*. *Water Res* 32:569–578. doi: 10.1016/S0043-1354(97)00306-0
- Jarvie H elen P, Neal C olin, Smart R ichard, et al (2001) Use of continuous water quality records for hydrograph separation and to assess short-term variability and extremes in acidity and dissolved carbon dioxide for the River Dee, Scotland. *Sci Total Environ* 265:85–97. doi: 10.1016/S0048-9697(00)00651-3
- Jarvie HP, Neal C, Withers PJA (2006) Sewage-effluent phosphorus: A greater risk to river eutrophication than agricultural phosphorus? *Sci Total Environ* 360:246–253. doi: 10.1016/j.scitotenv.2005.08.038
- Jarvie HP, Withers PJA, Hodgkinson R, et al (2008) Influence of rural land use on streamwater nutrients and their ecological significance. *J Hydrol* 350:166–186. doi: 10.1016/j.jhydrol.2007.10.042
- Jauzein I, Feix I, Wiart J (1995) Micro-polluants organiques dans les boues résiduares des stations d'épuratio...
- Jiries A, Hussain H, Lintelmann J (2000) Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Wastewater, Sediments, Sludge and Plants in Karak Province, Jordan. *Water Air Soil Pollut* 121:217–228. doi: 10.1023/A:1005257207607
- Jjemba PK (2006) Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 63:113–130. doi: 10.1016/j.ecoenv.2004.11.011
- Johnson AC (2010) Natural Variations in Flow Are Critical in Determining Concentrations of Point Source Contaminants in Rivers: An Estrogen Example. *Environ Sci Technol* 44:7865–7870. doi: 10.1021/es101799j
- Joss A, Zabczynski S, Göbel A, et al (2006) Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: Proposing a classification scheme. *Water Res* 40:1686–1696. doi: 10.1016/j.watres.2006.02.014
- Kannan A, Upreti RK (2008) Influence of distillery effluent on germination and growth of mung bean (*Vigna radiata*) seeds. *J Hazard Mater* 153:609–615. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.09.004
- Kanzari F, Syakti AD, Asia L, et al (2014) Distributions and sources of persistent organic pollutants (aliphatic hydrocarbons, PAHs, PCBs and pesticides) in surface sediments of an industrialized urban river (Huveaune), France. *Sci Total Environ* 478:141–151. doi: 10.1016/j.scitotenv.2014.01.065
- Kanzari F, Syakti AD, Asia L, et al (2011) Aliphatic hydrocarbons, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, organochlorine, and organophosphorous pesticides in surface sediments from the Arc river and the Berre lagoon, France. *Environ Sci Pollut Res* 19:559–576. doi: 10.1007/s11356-011-0582-5
- Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ (2009) The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res* 43:363–380. doi: 10.1016/j.watres.2008.10.047

- Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ (2008) The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res* 42:3498–3518. doi: 10.1016/j.watres.2008.04.026
- Kemper N (2008) Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecol Indic* 8:1–13. doi: 10.1016/j.ecolind.2007.06.002
- Khalili NR, Scheff PA, Holsen TM (1995) PAH source fingerprints for coke ovens, diesel and, gasoline engines, highway tunnels, and wood combustion emissions. *Atmos Environ* 29:533–542. doi: 10.1016/1352-2310(94)00275-P
- Köck-Schulmeyer M, Villagrasa M, López de Alda M, et al (2013) Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. *Sci Total Environ* 458–460:466–476. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.010
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, et al (2002) Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36:1202–1211. doi: 10.1021/es011055j
- Komori K, Suzuki Y, Minamiyama M, Harada A (2013) Occurrence of selected pharmaceuticals in river water in Japan and assessment of their environmental risk. *Environ Monit Assess* 185:4529–4536. doi: 10.1007/s10661-012-2886-4
- Kools SAE, Moltmann JF, Knacker T (2008) Estimating the use of veterinary medicines in the European union. *Regul Toxicol Pharmacol* 50:59–65. doi: 10.1016/j.yrtph.2007.06.003
- Kosmala A, Charvet S, Roger M-C, Faessel B (1999) Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using instream invertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Water Res* 33:266–278. doi: 10.1016/S0043-1354(98)00176-6
- Kuch HM, Ballschmiter K (2001) Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ Sci Technol* 35:3201–3206.
- Kümmerer K (2009) The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges. *J Environ Manage* 90:2354–2366. doi: 10.1016/j.jenvman.2009.01.023
- Kümmerer K, Henninger A (2003) Promoting resistance by the emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 9:1203–1214.
- Kunz PY, Kienle C, Gerhardt A (2010) *Gammarus* spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests. In: Whitacre DM (ed) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 205. Springer New York, pp 1–76
- Labadie P, Cundy AB, Stone K, et al (2007) Evidence for the Migration of Steroidal Estrogens through River Bed Sediments. *Environ Sci Technol* 41:4299–4304. doi: 10.1021/es063062j
- Lachambre M, Fisson C (2007) La contamination chimique : quel risque en estuaire de Seine ?

- Ladewig V, Jungmann D, Köhler HR, et al (2006) Population structure and dynamics of *Gammarus fossarum* (Amphipoda) upstream and downstream from effluents of sewage treatment plants. *Arch Environ Contam Toxicol* 50:370–383.
- Laganà A, Bacaloni A, De Leva I, et al (2004) Analytical methodologies for determining the occurrence of endocrine disrupting chemicals in sewage treatment plants and natural waters. *Anal Chim Acta* 501:79–88. doi: 10.1016/j.aca.2003.09.020
- Lahti M, Oikari A (2011) Pharmaceuticals in settleable particulate material in urban and non-urban waters. *Chemosphere* 85:826–831. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.06.084
- Le Nang D (2013) Relations entre la variabilité de la pollution urbaine et le contexte socio-culturel du bassin de collecte. Université de Lorraine
- Lesueur T, Boulangé-Lecomte C, Xuereb B, et al (2013) Development of a larval bioassay using the calanoid copepod, *Eurytemora affinis* to assess the toxicity of sediment-bound pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf* 94:60–66. doi: 10.1016/j.ecoenv.2013.04.025
- Li H, Sun B, Lydy MJ, You J (2013) Sediment-Associated Pesticides in an Urban Stream in Guangzhou, China: Implication of a Shift in Pesticide Use Patterns. *Environ Toxicol Chem* 32:1040–1047. doi: 10.1002/etc.2147
- Lienig D (1980) J. M. Neff: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. 30 fig., 89 tab., 262 pp. - London: Applied Science Publishers LTD 1979. \$ 50.00. *Int Rev Gesamten Hydrobiol Hydrogr* 65:898–898. doi: 10.1002/iroh.19800650624
- Lindqvist N, Tuhkanen T, Kronberg L (2005) Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water Res* 39:2219–2228. doi: 10.1016/j.watres.2005.04.003
- Liu Y, Beckingham B, Ruegner H, et al (2013) Comparison of Sedimentary PAHs in the Rivers of Ammer (Germany) and Liangtan (China): Differences between Early- and Newly-Industrialized Countries. *Environ Sci Technol* 47:701–709. doi: 10.1021/es3031566
- Loos R, Carvalho R, António DC, et al (2013) EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents. *Water Res* 47:6475–6487. doi: 10.1016/j.watres.2013.08.024
- Luo Y, Guo W, Ngo HH, et al (2014) A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci Total Environ* 473–474:619–641. doi: 10.1016/j.scitotenv.2013.12.065
- MacDonald DD, Ingersoll CG, Berger TA (2000) Development and Evaluation of Consensus-Based Sediment Quality Guidelines for Freshwater Ecosystems. *Arch Environ Contam Toxicol* 39:20–31. doi: 10.1007/s002440010075
- Macneil C, Dick JTA, Elwood RW (1997) The Trophic Ecology of Freshwater *Gammarus* Spp. (crustacea:amphipoda): Problems and Perspectives Concerning the Functional Feeding Group Concept. *Biol Rev* 72:349–364. doi: 10.1111/j.1469-185X.1997.tb00017.x
- Madoux-Humery A-S, Dorner S, Sauvé S, et al (2013) Temporal variability of combined sewer overflow contaminants: Evaluation of wastewater micropollutants as tracers of fecal contamination. *Water Res* 47:4370–4382. doi: 10.1016/j.watres.2013.04.030

- Mahler BJ, Van Metre PC, Bashara TJ, et al (2005) Parking Lot Sealcoat: An Unrecognized Source of Urban Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ Sci Technol* 39:5560–5566. doi: 10.1021/es0501565
- Maitland PS (1966) Notes on the biology of *Gammarus pulex* in the River Endrick. *Hydrobiologia* 28:142–152. doi: 10.1007/BF00144945
- Maltby L (1995) Sensitivity of the crustaceans *Gammarus pulex* (L.) and *Asellus aquaticus* (L.) to short-term exposure to hypoxia and unionized ammonia: Observations and possible mechanisms. *Water Res* 29:781–787. doi: 10.1016/0043-1354(94)00231-U
- Maltby L, Clayton SA, Wood RM, McLoughlin N (2002) Evaluation of the *Gammarus pulex* in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance. *Environ Toxicol Chem* 21:361–368. doi: 10.1002/etc.5620210219
- Manoli E, Samara C (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. *TrAC Trends Anal Chem* 18:417–428. doi: 10.1016/S0165-9936(99)00111-9
- Mauduit V, Mauduit C, Vulcano Greullet N, Coulon nathalie (2013) egradation subite des enrobés bitumineux par période de gel/degel: Analyse de cas de terrain et recherche exploratoire en laboratoire. *Bull Lab Ponts Chaussées* 47–63.
- Maund SJ, Hamer MJ, Lane MCG, et al (2002) Partitioning, bioavailability, and toxicity of the pyrethroid insecticide cypermethrin in sediments. *Environ Toxicol Chem* 21:9–15. doi: 10.1002/etc.5620210102
- McKelvie ID, Peat DMW, Worsfold PJ (1995) Analytical perspective. Techniques for the quantification and speciation of phosphorus in natural waters. *Anal Proc Anal Commun* 32:437–445. doi: 10.1039/AI9953200437
- Mehler WT, Li H, Lydy MJ, You J (2011) Identifying the Causes of Sediment-Associated Toxicity in Urban Waterways of the Pearl River Delta, China. *Environ Sci Technol* 45:1812–1819. doi: 10.1021/es103552d
- Melvin SD, Cameron MC, Lanctôt CM (2014) Individual and mixture toxicity of pharmaceuticals naproxen, carbamazepine, and sulfamethoxazole to Australian striped marsh frog tadpoles (*Limnodynastes peronii*). *J Toxicol Environ Health A* 77:337–345. doi: 10.1080/15287394.2013.865107
- Meur ML, Montargès-Pelletier E, Bauer A, et al (2015) Characterization of suspended particulate matter in the Moselle River (Lorraine, France): evolution along the course of the river and in different hydrologic regimes. *J Soils Sediments* 1–18. doi: 10.1007/s11368-015-1335-8
- Miège C, Choubert JM, Ribeiro L, et al (2009) Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. *Environ Pollut* 157:1721–1726. doi: 10.1016/j.envpol.2008.11.045
- Ministry of Environment and Energy (MOE) (2008) Guidelines for identifying, assessing, and managing contaminated sediment in Ontario: an integrated approach. Toronto, Ontario
- Moon H-B, Yoon S-P, Jung R-H, Choi M (2008) Wastewater treatment plants (WWTPs) as a source of sediment contamination by toxic organic pollutants and fecal sterols in a semi-enclosed bay in Korea. *Chemosphere* 73:880–889. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.07.038

- Morasch B (2013) Occurrence and dynamics of micropollutants in a karst aquifer. *Environ Pollut* 173:133–137. doi: 10.1016/j.envpol.2012.10.014
- Morin-Crini N, Druart C, Amiot C, et al (2014) Towards a Convenient Procedure to Characterize Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Sediments Receiving Industrial Effluents. *Pollut Eff Control* 3–1.
- Morin-Crini N, Druart C, Amiot C, et al (2015) Discharge waters: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) levels by a GC-MS/MS method. *Environ Eng Manag J* 14:1195–1202.
- Moschet C, Vermeirssen ELM, Seiz R, et al (2014) Picogram per liter detections of pyrethroids and organophosphates in surface waters using passive sampling. *Water Res* 66:411–422. doi: 10.1016/j.watres.2014.08.032
- Mudry J-M, Degiorgi F, Lucot E, Badot P-M (2015) Middle Term Evolution of Water Chemistry in a Karst River: Example from the Loue River (Jura Mountains, Eastern France). 147–151. doi: 10.1007/978-3-642-17435-3_17
- Musolff A, Leschik S, Möder M, et al (2009) Temporal and spatial patterns of micropollutants in urban receiving waters. *Environ Pollut* 157:3069–3077. doi: 10.1016/j.envpol.2009.05.037
- Némery J, Garnier J (2007) Origin and fate of phosphorus in the Seine watershed (France): Agricultural and hydrographic P budgets. *J Geophys Res Biogeosciences* 112:G03012. doi: 10.1029/2006JG000331
- Nie M, Yan C, Dong W, et al (2015) Occurrence, distribution and risk assessment of estrogens in surface water, suspended particulate matter, and sediments of the Yangtze Estuary. *Chemosphere* 127:109–116. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.01.021
- Nisbet M, Verneaux J (1970) Composantes chimiques des eaux courantes. Discussion et proposition de classes en tant que bases d'interprétation des analyses chimiques. *Ann Limnol - Int J Limnol* 6:161–190. doi: 10.1051/limn/1970015
- Odabasi M, Vardar N, Sofuoglu A, et al (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Chicago air. *Sci Total Environ* 227:57–67. doi: 10.1016/S0048-9697(99)00004-2
- Olsen RL, Chappell RW, Loftis JC (2012) Water quality sample collection, data treatment and results presentation for principal components analysis – literature review and Illinois River watershed case study. *Water Res* 46:3110–3122. doi: 10.1016/j.watres.2012.03.028
- ONEMA, Villeneuve A, Humbert JF, et al (2012) Rapport d'expertise sur les mortalités de poissons et les efflorescences de cyanobactéries de la Loue. ONEMA
- Onfield J-N (2001) Eurasphalt/Eurobitume : Santé, sécurité et environnement.
- O'Reilly K, Pietari J, Boehm P (2012) Forensic Assessment of Refined Tar-Based Sealers as a Source of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Urban Sediments. *Environ Forensics* 13:185–196. doi: 10.1080/15275922.2012.676598
- Oros DR, Simoneit BRT (2000) Identification and emission rates of molecular tracers in coal smoke particulate matter. *Fuel* 79:515–536. doi: 10.1016/S0016-2361(99)00153-2

- Osorio V, Larrañaga A, Aceña J, et al (2016) Concentration and risk of pharmaceuticals in freshwater systems are related to the population density and the livestock units in Iberian Rivers. *Sci Total Environ* 540:267–277. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.06.143
- Oursel B, Garnier C, Durrieu G, et al (2013) Dynamics and fates of trace metals chronically input in a Mediterranean coastal zone impacted by a large urban area. *Mar Pollut Bull* 69:137–149. doi: 10.1016/j.marpolbul.2013.01.023
- Ozaki N, Takamura Y, Kojima K, Kindaichi T (2015) Loading and removal of PAHs in a wastewater treatment plant in a separated sewer system. *Water Res* 80:337–345. doi: 10.1016/j.watres.2015.05.002
- Pal A, Gin KY-H, Lin AY-C, Reinhard M (2010) Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci Total Environ* 408:6062–6069. doi: 10.1016/j.scitotenv.2010.09.026
- Palmquist K, Fairbrother A, Salatas J, Guiney PD (2011) Environmental fate of pyrethroids in urban and suburban stream sediments and the appropriateness of *Hyalella azteca* model in determining ecological risk. *Integr Environ Assess Manag* 7:325–335. doi: 10.1002/ieam.162
- Parrott JL, Bennie DT (2009) Life-Cycle Exposure of Fathead Minnows to a Mixture of Six Common Pharmaceuticals and Triclosan. *J Toxicol Environ Health A* 72:633–641. doi: 10.1080/15287390902769428
- Pastor-Navarro N, Maquieira A, Puchades R (2009) Review on immunoanalytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products. *Anal Bioanal Chem* 395:907–920. doi: 10.1007/s00216-009-2901-y
- Patrolecco L, Ademollo N, Capri S, et al (2010) Occurrence of priority hazardous PAHs in water, suspended particulate matter, sediment and common eels (*Anguilla anguilla*) in the urban stretch of the River Tiber (Italy). *Chemosphere* 81:1386–1392. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.09.027
- Patrolecco L, Capri S, Ademollo N (2014) Occurrence of selected pharmaceuticals in the principal sewage treatment plants in Rome (Italy) and in the receiving surface waters. *Environ Sci Pollut Res* 1–13. doi: 10.1007/s11356-014-3765-z
- Pelletier É, Desbiens I, Sargian P, et al (2009) Présence des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les compartiments biotiques et abiotiques de la rivière et du fjord du Saguenay. *Rev Sci Eau J Water Sci* 22:235–251. doi: 10.7202/037483ar
- Pépin G (1998) Caractérisation des déchets - Essais de percolation sur deux déchets bitumineux. INERIS, Verneuil-en-Halatte
- Peschke K, Geburzi J, Köhler H-R, et al (2014) Invertebrates as indicators for chemical stress in sewage-influenced stream systems: Toxic and endocrine effects in gammarids and reactions at the community level in two tributaries of Lake Constance, Schussen and Argen. *Ecotoxicol Environ Saf* 106:115–125. doi: 10.1016/j.ecoenv.2014.04.011
- Pezet F (2014) Bilans et transferts de phosphore dans le bassin versant du lac du Bourget: caractérisation, interprétation et modélisation des flux. Université de Grenoble

- Pham T-T, Proulx S (1997) PCBs and PAHs in the Montreal Urban Community (Quebec, Canada) wastewater treatment plant and in the effluent plume in the St Lawrence River. *Water Res* 31:1887–1896. doi: 10.1016/S0043-1354(97)00025-0
- Qi W, Liu H, Pernet-Coudrier B, Qu J (2013) Polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater, WWTPs effluents and in the recipient waters of Beijing, China. *Environ Sci Pollut Res* 20:4254–4260. doi: 10.1007/s11356-012-1435-6
- Qi W, Liu H, Qu J, et al (2010) Polycyclic aromatic hydrocarbons in effluents from wastewater treatment plants and receiving streams in Tianjin, China. *Environ Monit Assess* 177:467–480. doi: 10.1007/s10661-010-1648-4
- Qiao M, Qi W, Liu H, Qu J (2014) Occurrence, behavior and removal of typical substituted and parent polycyclic aromatic hydrocarbons in a biological wastewater treatment plant. *Water Res* 52:11–19. doi: 10.1016/j.watres.2013.12.032
- Ratola N, Cincinelli A, Alves A, Katsoyiannis A (2012) Occurrence of organic microcontaminants in the wastewater treatment process. A mini review. *J Hazard Mater* 239–240:1–18. doi: 10.1016/j.jhazmat.2012.05.040
- Raymond S Incertitudes des flux transportés par les rivières (matière en suspension, nutriments, sels dissous) : vers un système expert d'optimisation des méthodes de calcul. François-Rabelais de Tours
- Ren H, Kikuchi J, Endo H, Hayashi T (2009) Fluctuation in the Flow of Poly Aromatic Hydrocarbons (PAHs) into the Aquatic Environment through the City Sewage Treatment Process. *J Environ Chem* 19:325–341. doi: 10.5985/jec.19.325
- Richardson ML, Bowron JM (1985) The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J Pharm Pharmacol* 37:1–12.
- Rodier J, Legube B, Merlet N, Brunet R L'analyse de l'eau, Dunod.
- Rogge WF, Hildemann LM, Mazurek MA, et al (1993) Sources of fine organic aerosol. 3. Road dust, tire debris, and organometallic brake lining dust: roads as sources and sinks. *Environ Sci Technol* 27:1892–1904. doi: 10.1021/es00046a019
- Rogge WF, Hildemann LM, Mazurek MA, Cass GR (1998) Sources of Fine Organic Aerosol. 9. Pine, Oak, and Synthetic Log Combustion in Residential Fireplaces. *Environ Sci Technol* 32:13–22. doi: 10.1021/es960930b
- Rosal R, Rodríguez A, Perdigón-Melón JA, et al (2010) Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res* 44:578–588. doi: 10.1016/j.watres.2009.07.004
- Rossi L, Chèvre N, Fankhauser R, et al (2013) Sediment contamination assessment in urban areas based on total suspended solids. *Water Res* 47:339–350. doi: 10.1016/j.watres.2012.10.011
- Roux A. (1970) Les gammes du groupe pulex. Essai de systématique biologique -1. Etude morphologique et morphodynamique. Université de Lyon

- Sanderson H, Johnson DJ, Wilson CJ, et al (2003) Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. *Toxicol Lett* 144:383–395.
- Santos LHMLM, Araújo AN, Fachini A, et al (2010) Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J Hazard Mater* 175:45–95. doi: 10.1016/j.jhazmat.2009.10.100
- Schirling M, Jungmann D, Ladewig V, et al (2005) Endocrine effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): Influence of wastewater effluents, temporal variability, and spatial aspects on natural populations. *Arch Environ Contam Toxicol* 49:53–61.
- Schleiter IM, Borchardt D, Wagner R, et al (1999) Modelling water quality, bioindication and population dynamics in lotic ecosystems using neural networks. *Ecol Model* 120:271–286. doi: 10.1016/S0304-3800(99)00108-8
- Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, et al (2004) Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat Toxicol* 68:141–150. doi: 10.1016/j.aquatox.2004.03.014
- Schwientek M, Guillet G, Rügner H, et al (2015) A high-precision sampling scheme to assess persistence and transport characteristics of micropollutants in rivers. *Sci Total Environ*. doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.07.135
- Schwientek M, Rügner H, Beckingham B, et al (2013) Integrated monitoring of particle associated transport of PAHs in contrasting catchments. *Environ Pollut* 172:155–162. doi: 10.1016/j.envpol.2012.09.004
- Shore LS, Shemesh M (2009) Naturally produced steroid hormones and their release into the environment. *Pure Appl Chem* 75:1859–1871. doi: 10.1351/pac200375111859
- Silva C, Oliveira C, Gravato C, Almeida JR (2013) Behaviour and biomarkers as tools to assess the acute toxicity of benzo(a)pyrene in the common prawn *Palaemon serratus*. *Mar Environ Res* 90:39–46. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.05.010
- Smith RV, Jordan C, Annett JA (2005) A phosphorus budget for Northern Ireland: inputs to inland and coastal waters. *J Hydrol* 304:193–202. doi: 10.1016/j.jhydrol.2004.10.004
- Solomon KR, Giddings JM, Maund SJ (2001) Probabilistic risk assessment of cotton pyrethroids: I. Distributional analyses of laboratory aquatic toxicity data. *Environ Toxicol Chem* 20:652–659. doi: 10.1002/etc.5620200326
- Subedi B, Kannan K (2014) Fate of Artificial Sweeteners in Wastewater Treatment Plants in New York State, U.S.A. *Environ Sci Technol* 48:13668–13674. doi: 10.1021/es504769c
- Ternes TA, Joss A, Siegrist H (2004) Peer Reviewed: Scrutinizing Pharmaceuticals and Personal Care Products in Wastewater Treatment. *Environ Sci Technol* 38:392A–399A. doi: 10.1021/es040639t
- Togola A, Budzinski H (2008) Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *J Chromatogr A* 1177:150–158. doi: 10.1016/j.chroma.2007.10.105

- Tourenne D, Costilhes F Sous bassin de Plaisir Fontaine. Enquête des pratiques agricoles. Chambre d'agriculture du Doubs, 2011
- US EPA (1993) Provisional Guidance for Quantitative Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. EPA/600/R-93/089.
- US EPA (2000) Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Environmental Protection Agency, Washington
- Vandenberg JA, Ryan MC, Nuell DD, Chu A (2005) Field Evaluation of Mixing Length and Attenuation of Nutrients and Fecal Coliform in a Wastewater Effluent Plume. *Environ Monit Assess* 107:45–57. doi: 10.1007/s10661-005-2020-y
- Vellinger C, Gismondi E, Felten V, et al (2013) Single and combined effects of cadmium and arsenate in *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda): Understanding the links between physiological and behavioural responses. *Aquat Toxicol* 140–141:106–116. doi: 10.1016/j.aquatox.2013.05.010
- Verlicchi P, Al Aukidy M, Zambello E (2012) Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Sci Total Environ* 429:123–155. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.04.028
- Verneaux J (1973) Cours d'eau de Franche-Comte (massif du Jura). Essai de biotypologie. Besançon
- Verrhiest G, Clément B, Blake G (2001) Single and Combined Effects of Sediment-Associated PAHs on Three Species of Freshwater Macroinvertebrates. *Ecotoxicology* 10:363–372. doi: 10.1023/A:1012223014534
- Vieno NM, Tuhkanen T, Kronberg L (2005) Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. *Environ Sci Technol* 39:8220–8226. doi: 10.1021/es051124k
- Viers J, Dupré B, Gaillardet J (2009) Chemical composition of suspended sediments in World Rivers: New insights from a new database. *Sci Total Environ* 407:853–868. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.09.053
- Vignati DAL, Valsecchi S, Polesello S, et al (2009) Pollutant partitioning for monitoring surface waters. *TrAC Trends Anal Chem* 28:159–169. doi: 10.1016/j.trac.2008.10.013
- Viguri J, Verde J, Irabien A (2002) Environmental assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments of the Santander Bay, Northern Spain. *Chemosphere* 48:157–165. doi: 10.1016/S0045-6535(02)00105-4
- Vrana B, Klučárová V, Benická E, et al (2014) Passive sampling: An effective method for monitoring seasonal and spatial variability of dissolved hydrophobic organic contaminants and metals in the Danube river. *Environ Pollut* 184:101–112. doi: 10.1016/j.envpol.2013.08.018
- Vulliet E, Cren-Olivé C (2011) Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. *Environ Pollut* 159:2929–2934. doi: 10.1016/j.envpol.2011.04.033

- Vulliet E, Cren-Olivé C, Grenier-Loustalot M-F (2009) Occurrence of pharmaceuticals and hormones in drinking water treated from surface waters. *Environ Chem Lett* 9:103–114. doi: 10.1007/s10311-009-0253-7
- Wang Z, Chen J, Huang L, et al (2009) Integrated fuzzy concentration addition-independent action (IFCA-IA) model outperforms two-stage prediction (TSP) for predicting mixture toxicity. *Chemosphere* 74:735–740. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.08.023
- Welton JS (1979) Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. *Freshw Biol* 9:263–275. doi: 10.1111/j.1365-2427.1979.tb01508.x
- Welton JS, Clarke RT (1980) Laboratory Studies on the Reproduction and Growth of the Amphipod, *Gammarus pulex* (L.). *J Anim Ecol* 49:581. doi: 10.2307/4265
- Weston DP, Lydy MJ (2010) Urban and Agricultural Sources of Pyrethroid Insecticides to the Sacramento-San Joaquin Delta of California. *Environ Sci Technol* 44:1833–1840. doi: 10.1021/es9035573
- Weston DP, You J, Lydy MJ (2004) Distribution and Toxicity of Sediment-Associated Pesticides in Agriculture-Dominated Water Bodies of California's Central Valley. *Environ Sci Technol* 38:2752–2759. doi: 10.1021/es0352193
- Wirth EF, Fulton MH, Chandler GT, et al (1998) Toxicity of Sediment Associated PAHs to the Estuarine Crustaceans, *Palaemonetes pugio* and *Amphiscus tenuiremis*. *Bull Environ Contam Toxicol* 61:637–644. doi: 10.1007/s001289900808
- Withers PJA, Jarvie HP (2008) Delivery and cycling of phosphorus in rivers: A review. *Sci Total Environ* 400:379–395. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.08.002
- Withers PJA, Jarvie HP, Hodgkinson RA, et al (2009) Characterization of Phosphorus Sources in Rural Watersheds. *J Environ Qual* 38:1998–2011. doi: 10.2134/jeq2008.0096
- Wölz J, Fleig M, Schulze T, et al (2010) Impact of contaminants bound to suspended particulate matter in the context of flood events. *J Soils Sediments* 10:1174–1185. doi: 10.1007/s11368-010-0262-y
- Wu S-P, Zhang Z-H, Lan T, Zuo Q (2005) Distribution of particle-phase hydrocarbons, PAHs and OCPs in Tianjin, China.
- Xanthopoulos C, Hahn H. (1992) Sources of pollution of stormwater runoff from urban areas.
- Xuereb B, Bezin L, Chaumot A, et al (2011) Vitellogenin-like gene expression in freshwater amphipod *Gammarus fossarum* (Koch, 1835): functional characterization in females and potential for use as an endocrine disruption biomarker in males. *Ecotoxicology* 20:1286–1299. doi: 10.1007/s10646-011-0685-2
- Yang Y, Metre PCV, Mahler BJ, et al (2010) Influence of Coal-Tar Sealcoat and Other Carbonaceous Materials on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Loading in an Urban Watershed. *Environ Sci Technol* 44:1217–1223. doi: 10.1021/es902657h
- Yang Y-Y, Toor GS, Williams CF (2015) Pharmaceuticals and organochlorine pesticides in sediments of an urban river in Florida, USA. *J Soils Sediments* 15:993–1004. doi: 10.1007/s11368-015-1077-7

- Yunker MB, Macdonald RW, Vingarzan R, et al (2002) PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org Geochem* 33:489–515. doi: 10.1016/S0146-6380(02)00002-5
- Zaimes GN, Schultz RC, Isenhardt TM, et al (2005) Stream bank erosion under different riparian land-use practices in northeast Iowa.
- Zhang J, Cai L, Yuan D, Chen M (2004a) Distribution and sources of polynuclear aromatic hydrocarbons in Mangrove surficial sediments of Deep Bay, China. *Mar Pollut Bull* 49:479–486. doi: 10.1016/j.marpolbul.2004.02.030
- Zhang J-Z, Fischer CJ, Ortner PB (2004b) Potential availability of sedimentary phosphorus to sediment resuspension in Florida Bay. *Glob Biogeochem Cycles* 18:GB4008. doi: 10.1029/2004GB002255
- Zhou W, Beck BF, Green TS (2003) Evaluation of a peat filtration system for treating highway runoff in a karst setting. *Environ Geol* 44:187–202. doi: 10.1007/s00254-002-0745-2
- Zhu L, Chen Y, Zhou R (2008) Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediment and soil in drinking water resource of Zhejiang Province, China. *J Hazard Mater* 150:308–316. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.04.102
- Zuehlke S, Duennbier U, Heberer T (2005) Determination of estrogenic steroids in surface water and wastewater by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *J Sep Sci* 28:52–58. doi: 10.1002/jssc.200301727

Liste des publications

Parue dans Environmental Science Pollution Research:

Chiffre, A., Degiorgi, F., Morin-Crini, N., Bolard, A., Chanez, E., & Badot, P. M. (2015). PAH occurrence in chalk river systems from the Jura region (France). Pertinence of suspended particulate matter and sediment as matrices for river quality monitoring. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(22), 17486-17498.

Chiffre, A., Clérandeau, C., Dwoinikoff, C., Le Bihanic, F., Budzinski, H., Geret, F., & Cachot, J. (2016). Psychotropic drugs in mixture alter swimming behaviour of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) larvae above environmental concentrations. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(6), 4964-4977.

En révision dans Environmental Science Pollution Research:

Chiffre et al., (2016) Occurrence of pharmaceuticals in WWTP effluents and their impact in a karstic rural catchment of eastern France

En révision dans Air, soil and water pollution :

Chiffre et al., (2016) How to assess temporal changes of point and diffuse contamination in a rural karstic watershed ? Relevance of SPM for efficient monitoring

Soumis pour publication

Mazzitelli Jean-Yves, Budzinski Hélène, Cachot Jérôme, Geffard Olivier, Marty Pierre, Chiffre Axelle, François Adeline, Bonnafe Elsa, Geret Florence. (2016) Evaluation of psychiatric hospital wastewater toxicity: What is its impact on aquatic organisms?

Communication scientifique

ISPAC 2015 à Bordeaux :

- Communication orale : “Gammarids as indicators for PAH toxicity : in situ and laboratory bioassays to evaluate the impact of sediment contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons”

SETAC 2015 à Barcelone :

- Communication orale : « Impact of WWTP discharge on PAH contamination of suspended particulate matter in chalk stream of the French Jura”

ContaSed 2015 à Ascona:

- Poster: “Comparison of the impacts of two WWTP discharge on PAH contamination in SPM and sediment in chalk stream”

Forum des jeunes chercheurs à Besançon, mai 2014 (2^{ème} prix de la session écosystèmes et contaminants) :

- Communication orale « Impacts des rejets de stations d’épuration dans les rivières calcaires : exemple des HAP »

Colloque de la société d’écotoxicologie fondamentale et appliquée (SEFA) à Besançon, juillet 2014 :

- Communication orale courte « Etude de la contribution des stations d’épuration à l’apport de polluants organiques dans les rivières calcaires»

Forum des jeunes chercheurs à Besançon, mai 2013

- Poster « Impacts des rejets de stations d’épuration dans les rivières calcaires : exemple des HAP »