

N° d'ordre
Année 2013

Thèse

Evaluation de l'impact des rejets urbains de temps de pluie sur le compartiment algal des écosystèmes aquatiques

Mise au point d'outils pour la surveillance des milieux récepteurs

Présentée devant

L'institut national des sciences appliquées de Lyon

Pour obtenir

Le grade de docteur

Formation doctorale

École doctorale : Chimie de Lyon (Chimie, Procédés et Environnement)

Spécialité : Sciences de l'Environnement Industriel et Urbain

Par

Yannis FERRO

(Ingénieur des Travaux Publics de l'Etat)

Soutenue le 23 septembre 2013 devant la Commission d'examen

Jury

Directeurs de Thèse

Yves Perrodin (LEHNA, ENTPE)

Directeur de recherche, HDR

Claude Durrieu (LEHNA, ENTPE)

ITPE - Chercheur

Rapporteurs

Sara A. Bilmes (INQUIMAE, Univ. Buenos Aires)

Professeur

Valeria Mezzanotte (DISAT, Univ. Milano)

Professeur

Examineurs

Sylvie Barraud (LGCIE, INSA Lyon)

Professeur

Nicole Jaffrézic-Renault (ISA, Univ. Lyon 1)

Directeur de recherche, HDR

Marie Christine Gromaire (LEESU, ENPC)

Chargée de recherche, HDR

Canh Tran-Minh

Professeur honoraire

Cette thèse a été réalisée au sein de l'équipe « Impact des Polluants sur les Ecosystèmes » du Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés sur le site de l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat (Vaulx en Velin)

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	CHIMIE DE LYON http://www.edchimie-lyon.fr Insa : R. GOURDON	M. Jean Marc LANCELIN Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE http://edeea.ec-lyon.fr Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN eea@ec-lyon.fr	M. Gérard SCORLETTI Ecole Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 65 55 Fax : 04 78 43 37 17 Gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION http://e2m2.universite-lyon.fr Insa : H. CHARLES	Mme Gudrun BORNETTE CNRS UMR 5023 LEHNA Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Forel 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 06.07.53.89.13 e2m2@univ-lyon1.fr
EDISS	INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES- SANTÉ http://www.ediss-lyon.fr Sec : Samia VUILLERMOZ Insa : M. LAGARDE	M. Didier REVEL Hôpital Louis Pradel Bâtiment Central 28 Avenue Doyen Lépine 69677 BRON Tél : 04.72.68.49.09 Fax :04 72 68 49 16 Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr
INFOMATHS	INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES http://infomaths.univ-lyon1.fr Sec :Renée EL MELHEM	Mme Sylvie CALABRETTO Université Claude Bernard Lyon 1 INFOMATHS Bâtiment Braconnier 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44.82.94 Fax 04 72 43 16 87 infomaths@univ-lyon1.fr
Matériaux	MATERIAUX DE LYON http://ed34.universite-lyon.fr Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry Ed.materiaux@insa-lyon.fr	M. Jean-Yves BUFFIERE INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Saint Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 Jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr
MEGA	MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE http://mega.ec-lyon.fr Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry mega@insa-lyon.fr	M. Philippe BOISSE INSA de Lyon Laboratoire LAMCOS Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72 .43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 Philippe.boisse@insa-lyon.fr
ScSo*	ScSo* http://recherche.univ-lyon2.fr/scso/ Sec : Viviane POLSINELLI Brigitte DUBOIS Insa : J.Y. TOUSSAINT	M. OBADIA Lionel Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.77.23.86 Fax : 04.37.28.04.48 Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

A ma famille,

Remerciements

Mes plus sincères remerciements vont tout d'abord à toute l'équipe du LEHNA :

- Yves Perrodin directeur de thèse et directeur de l'équipe IPE du LEHNA pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour mon master et cette thèse de doctorat ;
- Claude Durrieu directrice de thèse pour son encadrement sans faille, ses précieux conseils et son soutien au laboratoire comme à la ville ;
- Jean Philippe Bedell maître de stage lors de mon master qui m'a transmis sa passion pour la recherche et m'a donné l'envie de faire cette thèse ;
- Les chercheurs (Jean Philippe, Laurent, Raphael, Thierry, Cécile, Laurence, Gwenaël, Brice, Alain, Sylvie, Claude et Yves), l'équipe technique (Marc, Xavier, Lydie, Thérèse et Myriam) et Alicia Naveros, sans oublier les doctorants du LEHNA (Lebinh, Dieuseul, Morgane, Aude, Raphael, Frédéric, Erije, Adriana, Monique) pour leurs précieux conseils scientifiques, leur disponibilité et leur bonne humeur à toutes et à tous au long de ces 3 années. Surtout ne changez rien ! ;

Je souhaite également remercier :

- Nicole Jaffrézic-Renault (Univ Lyon 1), Sylvie Barraud (INSA) et Céline Chouteau (CETE Nord Picardie) pour le suivi scientifique de cette thèse ;
- La direction de la recherche de l'ENTPE (Luc Delattre, Francette Pignard et Sonia Cenille) pour leur soutien aux doctorants de l'école ;
- Le Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, l'ONEMA et la FR41 BioEnvironnement et Santé pour le soutien financier de ce travail ;
- Le Grand Lyon pour le soutien technique sur les sites d'étude ;
- L'OTHU et en particulier Sylvie Barraud sa directrice, pour le soutien financier, scientifique et technique ;

Mais également tous ceux et toutes celles qui ont contribué à la réussite de ce travail :

- Serge-Etienne Parent pour son aide dans le traitement statistique des données ;
- Konrad Chmielewski pour le développement de l'interface de contrôle de la prise programmable via port Ethernet ;
- Franck Frémion ;
- Slah Hidouri ;
- Cécile Dujardin ;
- Damien Dambre ;
- Warren Lassey pour leur apport à cette thèse au cours de leur stage ;

Sans oublier les doctorants gourmands (Antoine, Félix et Robin) toujours là quand il faut, dans les bons comme les mauvais moments, ainsi que toute l'ALD²ENTPE pour les futals du vendredi, les mots fléchés et les discussions scientifiques de haute volée ;

D'un point de vue plus personnel, je souhaite remercier toute ma famille avec une pensée toute particulière pour ma maman ainsi que ma Kroukrou qui a presque réussi à me supporter ces 3 années !

D'une façon générale cette thèse est dédiée à l'ensemble des professionnels du secteur de l'eau et de l'assainissement ainsi que de la métrologie avec qui mes rapports furent aussi divers qu'enrichissants.

Evaluation de l'impact des rejets urbains de temps de pluie sur le compartiment algal et mise au point d'outils pour la surveillance des milieux récepteurs

La gestion des eaux pluviales constitue un défi important à relever dans les villes du monde entier : aujourd'hui on ne compte plus les problèmes d'inondation et de pollution, problèmes chroniques qui tendent à s'amplifier à mesure que l'urbanisation grandit. Une gestion durable de ces eaux est au cœur des enjeux du XXI^e siècle et afin de répondre à ces problèmes le Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable a engagé une opération de recherche.

Parmi les problèmes posés par les eaux pluviales notre étude se focalise sur les rejets urbains de temps de pluie (RUTP). Ces rejets constituent un apport important et imprévisible de nombreux polluants pour les masses d'eaux réceptrices. La pollution des RUTP est étudiée depuis de nombreuses années et, alors que les connaissances en la matière s'affinent, il n'existe à l'heure actuelle aucune étude de grande ampleur permettant d'identifier l'impact des RUTP sur les écosystèmes récepteurs.

Notre travail a consisté à étudier l'impact environnemental de différents échantillons de RUTP collectés sur 3 sites d'assainissement pluvial de l'agglomération lyonnaise. Nous avons utilisé pour cela des bioindicateurs pertinents, les microalgues d'eau douce, organismes unicellulaires à la base des chaînes trophiques et très sensibles aux polluants présents dans les RUTP. Nous avons réalisé des bioessais écotoxicologiques connus de la littérature et contribué au développement de nouveaux indicateurs de toxicité. De plus nous avons cherché à adapter ces bioessais pour permettre leur utilisation sur le terrain. En parallèle nous avons travaillé à l'amélioration d'un biocapteur enzymatique à cellules algales. Nous avons évalué ses performances sur les échantillons de RUTP et nous avons ensuite construit une station de mesure automatisée afin de réaliser des mesures directement sur les sites d'assainissement (*on line monitoring*).

Ce travail contribue à mettre en évidence l'impact des RUTP sur le milieu récepteur tout en confirmant le caractère hétérogène des rejets.

Mots-Clés: RUTP ; bioessais ; biocapteurs ; microalgues ; activités enzymatiques ; fluorescence chlorophyllienne ; sol-gel ; écotoxicologie

Assessment of the impacts of urban wet weather effluents on algae compartment and development of systems for receiving water bodies assessment

The stormwater management constitutes an important challenge for cities around the world: today there are countless problems of flooding and pollution, chronic problems that tend to amplify as urbanization grows. Sustainable management of these waters is at the heart of defies of the twenty-first century and to address these problems the Ministry of Ecology and Sustainable Development has launched a research operation.

Among problems posed by stormwater, our study focuses on urban wet weather discharges (UWWD). These releases are an important and unpredictable contribution of many pollutants to the receiving water bodies. UWWD's pollution has been studied for many years and, while knowledge in the field matures, there is at present no large-scale study to identify the impact of UWWD on the receiving ecosystems.

Our work consist in studying the impact of different UWWD samples collected at 3 storm sanitation sites of Lyon on the environment. We have relevant bioindicators, freshwater microalgae, unicellular organisms at the base of the trophic chain and very sensitive to pollutants present in the UWWD. We have undertaken ecotoxicological bioassays known from the literature and contributed to the development of new indicators of toxicity. Furthermore, we seek to adapt these bioassays to allow their use in the field. In parallel, we have worked to improve an enzyme biosensor algal cell. We evaluated its performances on samples of UWWD and then we built an automated measuring station to make measurements directly on the remediation site (online monitoring).

Key words: urban wet weather discharges; stormwater; runoff; rain water; bioassays; biosensors; microalgae; enzymatic activities; chlorophyll fluorescence; sol-gel; ecotoxicology

Table des matières

Remerciements.....	5
Table des matières	8
Liste des publications	11
Liste des abréviations	12
Liste des tableaux	14
Liste des figures	17
Introduction générale	21
Partie A : Etude bibliographique.....	23
1 La gestion des eaux pluviales en ville	24
1.1 Historique.....	24
1.2 Outils juridiques et réglementaires en vigueur.....	26
1.3 Les solutions techniques modernes.....	33
2 Caractéristiques physicochimiques des RUTP	40
2.1 Origine des contaminants	40
2.2 Transfert des polluants	43
2.3 Composition physicochimique des RUTP	44
2.4 Composition bactériologique des RUTP.....	54
3 Impact écologique des RUTP sur les écosystèmes aquatiques	56
3.1 La notion d'impact	56
3.2 La notion de masse d'eau	56
3.3 Impact sur les masses d'eau	57
4 Outils d'évaluation de l'impact écologique.....	64
4.1 Caractérisation des effets	64
4.2 Les bioessais écotoxicologiques au laboratoire	66
4.3 Les biocapteurs pour des essais de terrain	74
Résumé du chapitre 4.....	87
Bilan de l'étude bibliographique	88
Partie B : Démarche expérimentale	89
5 Description des sites et du matériel d'étude.....	90
5.1 Critères de choix	90
5.2 Le déversoir d'orage d'Ecully	91
5.3 Les bassins d'infiltration et de rétention des eaux	92
5.4 Protocole d'échantillonnage	96
5.5 Protocole d'analyse.....	96
5.6 Bilan des prélèvements et analyses	97
6 Bioessais	99
6.1 Matériel biologique.....	99
6.2 Réactifs utilisés.....	99
6.3 Bioessais sur algues libres	100
7 Biocapteurs.....	104
7.1 Mesures conductimétriques	104
7.2 Dosage de l'oxygène	107
7.3 Suivie de la fluorescence.....	111
8 Poste de mesures sur site	114

9	Analyse statistique	116
9.1	Logiciel	116
9.2	Données sources	116
9.3	Méthodes exploratoires.....	118
Partie C : Résultats.....		121
10	Analyse physicochimique des échantillons	123
10.1	Description des événements étudiés	123
10.2	Substances nutritives	124
10.3	Éléments traces métalliques	126
10.4	Micropolluants organiques	128
	Conclusion	132
11	Evaluation de l'écotoxicité des effluents prélevés.....	133
11.1	Activités enzymatiques sur algues libres.....	133
11.2	Efficacité photosynthétique	139
11.3	Croissance cellulaire.....	141
11.4	Traitement statistique des données.....	146
11.5	Bilan des essais réalisés au laboratoire	157
	Conclusion	159
12	Développement des biocapteurs.....	160
12.1	Activités enzymatiques en biocapteurs.....	160
12.2	Capteur à oxygène.....	164
12.3	Capteur à fluorescence	173
	Conclusion	181
13	Une station autonome pour les mesures de terrain	182
13.1	Solutions techniques	182
13.2	Fonctionnement global	186
13.3	Premiers essais sur site	187
13.4	Synthèse	188
	Conclusion	188
Partie D : Discussion générale		189
14	Discussion de la méthode	190
14.1	Caractérisation des échantillons	190
14.2	Evaluation de la toxicité grâce aux bioessais	191
14.3	Développement de biocapteurs.....	192
14.4	Une station de mesures pour le terrain	193
15	Discussion des résultats.....	194
15.1	Résultats d'analyse.....	194
15.2	Résultats des bioessais.....	194
15.3	Développement des biocapteurs	199
15.4	Les mesures réalisées sur le terrain.....	200
Recommandations		201
	Pour une meilleure gestion des RUTP	201
	Pour une meilleure surveillance environnementale	202
Partie E : Conclusion générale et perspectives		203
Conclusion générale		204
	Typologie des rejets urbains.....	204
	Impacts écologiques des rejets urbains pour le milieu récepteur.....	204
	Les outils de terrain	205
Perspectives.....		206

Dans le domaine des bioessais	206
Dans le domaine des biocapteurs.....	206
Dans le domaine de l'hydrologie urbaine.....	206
Bibliographie.....	208
Annexes	229
Annexe I : Quelques biocapteurs pour les milieux aquatiques (Eltzov and Marks, 2011).....	230
Annexe II : Normes de qualité environnementales	232
Annexe III : Milieu AFNOR LC.....	233
Annexe IV : Milieu TAP	234
Annexe V : Composition physicochimique des rejets.....	235
Annexe VI : Article	239

Liste des publications

Articles

- Ferro, Y., Perullini, M., Jobbagy, M., Bilmes, S. A., and Durrieu, C. (2012). Development of a Biosensor for Environmental Monitoring Based on Microalgae Immobilized in Silica Hydrogels. *Sensors (Basel, Switzerland)*, **12**(12), 16879-16891
- Ferro, Y. et Durrieu, C. (2013) Un biocapteur pour la surveillance de rejets urbains, *publications MRCT* (à paraître, juillet 2013)
- Numéro spécial I2M sur l'Instrumentation en Electrochimie (en cours, mai 2014)

Communications orales internationales

- Gaspard, H., Chouteau, C., Ferro, Y. et Durrieu, C., Caractérisation de déversoirs d'orage basée sur le métabolisme algal, *8^e conférence internationale Novatech, 23 – 27 juin 2013, Lyon, France*
- Ferro, Y., Perullini, M., Bilmes, S.A., Jobbagy, M. and Durrieu, C., Biosensor for herbicides detection based on sol-gel entrapped microalgae, *13^e colloque du GFB & 8th Sino-French Workshop: "Surface Electrochemistry of Molecules of Biological Interest & Biosensor Applications", 24-28 septembre 2012, Lacanau-Océan, France*
- Durrieu, C. et Ferro, Y., Les biocapteurs à cellules algales pour le monitoring des écosystèmes aquatiques, *Phototrophes aquatiques et biotechnologie: Bioprocédés, Bioénergie, Biocapteurs et Biomolécules actives, El Mouradi Palace, 31 mars-2 avril 2012, Sousse, Tunisie*
- Durrieu, C., Guedri, H. and Ferro, Y., Nano algal biosensors for the environmental monitoring of pollutants in water ecosystems, *ChinaNANO 2011, International Conference on Nanoscience & Technology, 7-9 septembre 2011, Pékin, Chine*

Communications orales nationales

- Ferro, Y. et Durrieu, C., Le développement des méthodes de suivi in situ, *4^e forum national sur la gestion durable des eaux pluviales, 20 et 21 mars 2013, Gayant Expo, Douai*
- Ferro, Y. et Durrieu, C., Conception d'un biocapteur à cellules algales pour évaluer la toxicité de rejets urbains de temps de pluie, *6^{ème} Colloque Interdisciplinaire en Instrumentation (C2I), 29 et 30 janvier 2013, Villeurbanne*
- Ferro, Y. et Durrieu, C., Impacts de rejets urbains par temps de pluie sur le métabolisme d'algues unicellulaires, *Polluants émergents: quels défis pour une meilleure gestion de l'eau?, École des Mines de Nantes, 1er et 2 février 2012, Nantes*

Posters

- Ferro, Y., Hubert, G., Chouteau, C. and Durrieu, C., Contribution of biosensors based on unicellular organisms to evaluate the ecological impact of stormwater, *8^e conférence internationale Novatech, 23 – 27 juin 2013, Lyon, France*
- Ferro, Y., Lassey, W. et Durrieu, C., Automatisation d'un biocapteur à cellules algales pour la surveillance in situ et en continu de rejets urbains par temps de pluie, *MADICA 2012, 7 - 9 novembre 2012, Sousse, Tunisie*
- Ferro, Y. and Durrieu, C., Development of an algal biosensor for toxicity assessment of urban wet weather effluents, *SIDISA 2012 Sustainable Technology for Environmental Protection, 26 - 29 juin 2012, Milan, Italie* [ISBN 978-88-903557-1-4]

Liste des abréviations

A : anthracène
Acen : acénaphène
AChCl : chlorure d'acétylcholine
AChE : activité acétylcholinestérase
ADN : acide désoxyribonucléique
AE : activité estérase
AP : alkylphénols
APA : activité phosphatase alcaline
APE : éthoxylate d'alkylphénols
ARN : acide ribonucléique
Atr : atrazine
B(a)A : benzo(a)anthracène
B(a)P : benzo(a)pyrène
B(b)F : benzo(b)fluoranthène
B(g,h,i)P : benzo(g,h,i)pérylène
BI : bassin d'infiltration
B(k)F : benzo(k)fluoranthène
BR : bassin de rétention
BSA: *bovine serum albumin*
C : chrysène
COMMPS: *combined monitoring-based and modeling-based priority setting*
COV : composés organiques volatils
CV : *Chlorella vulgaris*
CR : *Chlamydomonas reinhardtii*
D : Diuron
DBO : demande biochimique en oxygène
DCE : directive cadre sur l'eau
DCO : demande chimique en oxygène
DO : déversoir d'orage
EP : eaux pluviales
ETM : éléments traces métalliques
F : fluoranthène
FDA : fluorescéine diacétate
Fluo : fluorène
HAP : hydrocarbure(s) aromatique(s) polycyclique(s)
 γ - HCCH : gamma hexachlorocyclohexane
I : isoproturon
I(1,2,3)P : indéno(1,2,3)pyrène
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
MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle
MUF : methylumbelliférol

MUP : methylumbelliferyl phosphate
N : naphthalène
NP : nonylphénol
NSQD: *National Stormwater Quality Database*
OP : octylphénol
OPE : éthoxylates d'octylphénol
P : pyrène
PCP : parachlorophénol
PEHD : polyéthylène haute densité
Phen : phénanthrène
PLU : plan local d'urbanisme
PNEC: *predicted no effect concentration*
pNPP : paranitrophénylphosphate
PPR : plan de prévention des risques
PS : *Pseudokirchneriella subcapitata*
Pt-OP : para-ter octylphénol
RST : réseau scientifique et technique
RUTP : rejets urbains de temps de pluie
SAM: *self assembled monolayer*
SECTEN : SECTeurs Economiques et éNergie
Sim : simazine
SCOT : schéma de cohérence territoriale
UE : Union Européenne

Liste des tableaux

Tableau 1 : liste des substances prises en compte dans la caractérisation de l'état des masses d'eaux. Source : Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse	29
Tableau 2: évolution et origines des émissions de métaux lourds dans l'air en France métropolitaine durant la période 1990-2010, données (CITEPA, 2012) au format SECTEN	40
Tableau 3: sources possibles de pollutions dans les eaux de ruissellement de chaussées, d'après (Aryal et al., 2010)	41
Tableau 4: contribution relative des eaux de ruissellement, des eaux usées et des dépôts en réseau à la pollution des rejets unitaires. d'après (Chebbo, 1992) * il s'agit de la contribution des dépôts pluvieux précédents. En réalité, la masse de dépôts augmente pendant chaque événement pluvieux, ce qui contribue à diminuer la part directe des eaux de ruissellement	42
Tableau 5 : comparaison selon différents auteurs du pourcentage de pollution totale que représentent les dépôts du réseau par rapport aux RUTP	42
Tableau 6: ordre de grandeur en nutriments dans les eaux pluviales, d'après (Pitt et al., 2004), données issues du National Stormwater Quality Database (NSQD). nr = molécule non recherchée.....	46
Tableau 7: ordre de grandeur de quelques métaux dans les eaux pluviales, nr = élément non recherché.....	47
Tableau 8: ordre de grandeur de quelques pesticides retrouvés dans les eaux pluviales en milieu urbain, valeurs minimales et maximales.....	50
Tableau 9: ordre de grandeur de la contamination en HAP des eaux pluviales selon le site de prélèvement	52
Tableau 10: ordre de grandeur en nonylphénol (NP) et en octylphénol (OP) dans les eaux pluviales, nr = composé non recherché.....	54
Tableau 11: ordres de grandeur de la pollution bactériologique des rejets urbains de temps de pluie (en nombre de cellules pour 100 ml), d'après (Bertrand-Krajewski, 2006)	55
Tableau 12: comparatif des approches substances et matrices (Perrodin et al., 2010), d'après (ADEME, 2007).	65
Tableau 13 : quelques espèces fréquemment utilisées comme bioindicateurs (milieu aquatique)	67
Tableau 14: quelques bioessais normalisés en milieu aquatique, A = aiguë, C = chronique	70
Tableau 15 : relation entre reconnaissance biologique et mode de transduction, d'après (Jaffrezic-Renault et al., 1994)	80
Tableau 16 : techniques d'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur, d'après (Jaffrezic-Renault et al., 1994)	84
Tableau 17: caractéristiques du site d'Ecully, d'après (Dembélé, 2010)	91
Tableau 18: caractéristiques du site de Chassieu, d'après (Dembélé, 2010)	93
Tableau 19: activités et pollutions sur le BV de Chassieu, source : association mi-plaine entreprises.....	94
Tableau 20 : caractéristiques du site de Bron, relevés personnels.....	95
Tableau 21: récapitulatif des sites étudiés, d'après (Becouze-Lareure, 2010)	96
Tableau 22 : liste des substances organiques recherchées. En gras les substances prioritaires de la DCE (annexe X) et en souligné les substances de la liste I et II de la directive 2006/11	97
Tableau 23: bilan des prélèvements et analyses réalisés. d = analyse de la fraction dissoute uniquement ; d+p = analyse de la fraction dissoute et particulaire	98
Tableau 24 : nombre d'échantillons collectés et analysés	98
Tableau 25 : liste des réactifs utilisés, fournis par Sigma-Aldrich à l'exception du silicate de sodium fourni par Riedel-de-Haen.....	99
Tableau 26 : composition du milieu réactionnel pour la mesure de l'activité estérase chez <i>C. Vulgaris</i>	101
Tableau 27 : composition du milieu réactionnel pour la mesure de l'activité phosphatase alcaline chez <i>C. vulgaris</i>	101
Tableau 28 : composition des puits pour la mesure de l'effet du DCMU sur les microalgues immobilisées. En souligné, les puits contenant du DCMU à la place du milieu Oligo LC.....	112
Tableau 29 : composition des puits pour la quantification des limites de détection de l'atrazine en fonction de la technique d'immobilisation.....	112
Tableau 30 : durée (D), hauteur (H), intensité moyenne (I) de la pluie et nombre de jours de temps sec (J temps sec) ayant précédé le prélèvement d'un échantillon.....	123
Tableau 31 : nombre total d'échantillon collectés et analysés	124

Tableau 32 : concentration en nitrates, phosphates, sulfates et potassium dans les prélèvements de temps sec (fraction dissoute, min - max) * : les valeurs présentées sont celles en azote total Kjeldhal (NTK) et en phosphore total. nr = non recherché. Elles sont comparées aux valeurs de la littérature et aux limites de bonne qualité..	124
Tableau 33 : concentration en nitrates, phosphates, sulfates et potassium dans les prélèvements de temps de pluie (fraction dissoute, min - max) < : inférieur aux limites de détection, nr = non recherché	125
Tableau 34 : concentrations en plomb, cadmium, chrome, nickel, cuivre et zinc dans les prélèvements de temps sec (fraction dissoute, min - max) < : inférieur aux limites de détection.....	127
Tableau 35 : concentrations en plomb, cadmium, chrome, nickel, cuivre et zinc dans les prélèvements de temps de pluie (fraction dissoute, min - max), < : inférieur aux limites de détection	127
Tableau 36 : concentrations en micropolluants organiques dans les prélèvements de temps sec (fraction dissoute, min - max), < : inférieur aux limites de détection, nr = non recherchée.....	128
Tableau 37 : concentrations en micropolluants organiques dans les prélèvements de temps sec (fraction particulaire, min - max), < : inférieur aux limites de détection	129
Tableau 38 : concentrations en micropolluants organiques dans les prélèvements de temps de pluie (fraction dissoute, min – max sauf * où les valeurs pour les HAP sont données sur le total : dissous + particulaire) < : inférieur aux limites de détection.....	130
Tableau 39 : concentrations en micropolluants organiques dans les prélèvements de temps de pluie (fraction particulaire, min - max), < : inférieur aux limites de détection	132
Tableau 40 : % d'activité résiduelle de l'activité estérase (AE) sur algues libres de type <i>C. vulgaris</i> après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux prélèvements de temps sec.....	135
Tableau 41 : % d'activité résiduelle de l'activité estérase (AE) sur algues libres de type <i>C. vulgaris</i> après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux prélèvements de temps de pluie	135
Tableau 42 : % d'activité résiduelle de l'activité phosphatase alcaline (APA) sur algues libres de type <i>C. vulgaris</i> après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux prélèvements de temps sec.....	136
Tableau 43 : % d'activité résiduelle de l'activité phosphatase alcaline (APA) sur algues libres de type <i>C. vulgaris</i> après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux prélèvements de temps de pluie.....	137
Tableau 44 : % d'activité photosynthétique résiduelle de cellules de type <i>C. vulgaris</i> sur les échantillons de temps sec filtrés (F) et non filtrés (NF) après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition.....	139
Tableau 45 : % d'activité photosynthétique résiduelle de cellules de type <i>C. vulgaris</i> sur les échantillons de temps de pluie filtrés (F) et non filtrés (NF) après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition	140
Tableau 46 : % d'inhibition de la croissance de cellules de type <i>P.subcapitata</i> (PS) et <i>C. vulgaris</i> (CV) 72 h après inoculation des échantillons de temps sec et selon le milieu de culture utilisé.....	141
Tableau 47 : % d'inhibition de la croissance de cellules de type <i>P.subcapitata</i> (PS) et <i>C. vulgaris</i> (CV) 72 h après inoculation des échantillons de temps de pluie et selon le milieu de culture utilisé	142
Tableau 48 : codes donnés aux échantillons pour l'étude statistique	147
Tableau 49 : codes donnés aux résultats des bioessais et aux mesures physicochimiques pour l'analyse statistique.....	147
Tableau 50 : valeurs du coefficient de Pearson sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo de Chassieu	149
Tableau 51 : valeurs du coefficient de Kendall sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo de Chassieu	150
Tableau 52 : valeurs du coefficient de Pearson sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo d'Ecully... ..	151
Tableau 53 : valeurs du coefficient de Kendall sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo d'Ecully....	151
Tableau 54 : valeurs du coefficient de Pearson sur la matrice physicochimie/écotoxicologie de Bron.....	152
Tableau 55 : valeurs du coefficient de Kendall sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo de Bron....	153
Tableau 56 : valeurs du coefficient de Pearson sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo	154
Tableau 57 : valeurs du coefficient de Pearson sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo rejets de temps de pluie.....	155
Tableau 58 : valeurs du coefficient de Kendall sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo rejets de temps de pluie.....	156
Tableau 59 : résultats des essais menés au laboratoire sur les RUTP.....	157
Tableau 60 : résultats des essais menés au laboratoire sur les RUTS	158
Tableau 61 : % d'activité résiduelle de l'activité acétylcholinestérase de <i>C. vulgaris</i> immobilisées en biocapteur après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux rejets de temps sec	161
Tableau 62 : % d'activité résiduelle de l'activité acétylcholinestérase de <i>C. vulgaris</i> immobilisées en biocapteur après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux rejets de temps de pluie.....	161

Tableau 63 : % d'activité résiduelle de l'activité phosphatase alcaline de C. vulgaris immobilisées en biocapteur après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux rejets de temps sec 162

Tableau 64 : % d'activité résiduelle de l'activité phosphatase alcaline de C. vulgaris immobilisées en biocapteur après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux rejets de temps de pluie..... 162

Tableau 65 : % d'augmentation de la fluorescence chlorophyllienne après exposition à l'atrazine (0 à 10 µM) de microalgues immobilisées dans l'alginate et le sol-gel après 40 mn, 5 h et 24 h d'exposition 177

Liste des figures

Figure 1: bassins de stockage des eaux pluviales en construction à Lille – Fives, image Lille Métropole	36
Figure 2 : bassin de stockage (en permanence en eau) des eaux pluviales à Saint Priest (Porte des Alpes), image Grand Lyon	36
Figure 3: bassin de stockage (sec) des eaux pluviales à Saint Priest (Minerve), photographie personnelle	37
Figure 4: coupe d'une noue (Grand-Lyon, 2008)	37
Figure 5: coupe d'une chaussée à structure réservoir (Grand-Lyon, 2008)	38
Figure 6: coupe d'un toit végétalisé (Grand-Lyon, 2008)	38
Figure 7: aptitude au transport du sédiment de caniveau (Artieres, 1987)	44
Figure 8: Coupe de <i>C. vulgaris</i> au MET et schéma d'interprétation, (Roland et al., 2008).....	68
Figure 9: <i>P. subcapitata</i> en microscopie photonique. Source : ecotox.ca	69
Figure 10 : Coupe de <i>C. reinhardtii</i> en MET et schéma d'interprétation (Roland et al., 2008).....	69
Figure 11 : distribution des enzymes et des métabolites dans le modèle reconstruite de <i>C. reinhardtii</i> . (Boyle and Morgan, 2009)	70
Figure 12 : mode d'action du DCMU. A gauche fonctionnement normal, à droite fixation du DCMU sur le site Q _b ce qui entraîne l'émission de photons de plus basses énergies. D'après http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ (UPMC - UFR des Sciences de la Vie (UFR 927))	72
Figure 13 : représentation et fonctionnement schématique d'un biocapteur, adaptée de (Asch, 2010).....	75
Figure 14: localisations des sites étudiés dans le cadre de cette étude, source : google maps.....	90
Figure 15 : station de mesure et schéma de principe, en place sur les sites OTHU, source : OTHU.....	91
Figure 16 : ruisseau des planches et déversoirs d'orage à Ecully, photographie personnelle	92
Figure 17 : bassin de rétention (BR) (à gauche) et d'infiltration (BI) (à droite) des eaux de Chassieu, source : google maps.....	93
Figure 18 : bassin de rétention des eaux de Chassieu, par temps sec (à gauche) et par temps de pluie (à droite), photographies personnelles	93
Figure 19: bassin versant (en rouge) du bassin de rétention (en noir) jouxtant l'aéroport de Lyon – Bron, source : google maps.....	95
Figure 20: site par temps sec, photographie personnelle	95
Figure 21 : principe de mesure des activités enzymatiques en bioessais	100
Figure 22 : schéma des électrodes interdigitées (Chouteau, 2004) (A) et zoom sur les interdigitations (B)	104
Figure 23 : dégradation du paranitrophénylphosphate par la phosphatase alcaline	104
Figure 24 : dégradation du chlorure d'acétylcholine par l'acétylcholinestérase.....	104
Figure 25 : représentation schématique de l'immobilisation des cellules algales sur l'électrode de platine modifiée par les couches SAMs. La figure n'est pas à l'échelle. Source : (Guedri and Durrieu, 2008)	105
Figure 26 : montage expérimental pour les mesures d'activités enzymatiques à l'aide du biocapteur conductimétrique, (Dambre, 2011).....	106
Figure 27 : une mesure témoin (A) et après exposition à un toxique (B)	107
Figure 28 : fonctionnement d'une électrode de Clark	108
Figure 29 : fonctionnement d'une optode, d'après (Tengberg et al., 2006).....	108
Figure 30 : préparation d'un gel d'agarose	109
Figure 31 : billes et gels d'alginate.....	110
Figure 32 : billes d'alginate dans une matrice sol-gel	111
Figure 33 : concentrations en ions nutritifs relevées dans les échantillons du BR de Bron le 19 octobre 2011, le 02 janvier 2012 et le 22 mai 2012.....	126
Figure 34 : concentration en HAP dissous dans 4 échantillons prélevés par temps de pluie sur le bassin de rétention de Bron	131
Figure 35 : Représentation graphique de l'activité catalase de d'algues libres de type <i>C. reinhardtii</i> avant (témoin) et après 1h, 2h et 3h d'exposition aux RUTP prélevés à Chassieu le 24/02/2011	138
Figure 36 : % d'inhibition moyen de la croissance de cellules de type <i>P.subcapitata</i> (PS) et <i>C. vulgaris</i> (CV) 72 h après inoculation des échantillons de temps de pluie et selon le milieu de culture utilisé.....	143
Figure 37 : % d'inhibition de la croissance de cellules de type <i>P.subcapitata</i> 72 h après inoculation des échantillons de temps de pluie de Chassieu en proportions variables	144

Figure 38 : % d'inhibition de la croissance de cellules de type <i>P.subcapitata</i> 72 h après inoculation des échantillons de temps de pluie d'Ecully en proportions variables.....	144
Figure 39 : % d'inhibition de la croissance de cellules de type <i>P.subcapitata</i> 72 h après inoculation des échantillons de temps de pluie de Bron en proportions variables.....	145
Figure 40 : analyse canonique de la redondance sur les échantillons prélevés à Chassieu à partir des données physicochimiques et des bioessais menés sur algues libres.....	149
Figure 41 : analyse canonique de la redondance sur les échantillons prélevés à Ecully à partir des données physicochimiques et des bioessais menés sur algues libres.....	150
Figure 42 : analyse canonique de la redondance sur les échantillons prélevés à Bron à partir des données physicochimiques et des bioessais menés sur algues libres.....	152
Figure 43 : analyse canonique de la redondance sur l'ensemble des échantillons prélevés à partir des données physicochimiques et des bioessais menés sur algues libres.....	153
Figure 44 : analyse canonique de la redondance sur l'ensemble des échantillons prélevés par temps de pluie à partir des données physicochimiques et des bioessais menés sur algues libres.....	155
Figure 45 : solution d'agarose contenant les microalgues et déposée dans les moules.....	164
Figure 46 : gel d'agarose déposé sur l'électrode de Clark (A) et immobilisé sur une optode à l'aide d'une membrane de dialyse (B).....	165
Figure 47 : $[O_2] = f(t)$ après 2 injections successives de 0,5 % d' H_2O_2 sur gel d'agarose.....	165
Figure 48 : bille d'alginate immobilisée sur un fil d'acier (A) et à l'aide d'une membrane de dialyse (B).....	166
Figure 49 : billes d'alginate fixées à l'optode (A) et zoom sur une bille après réaction avec le H_2O_2 (B).....	167
Figure 50 : $[O_2] = f(t)$ après 3 injections successives de 0,5 % d' H_2O_2 sur bille d'alginate immobilisée au contact d'une électrode de Clark.....	167
Figure 51 : membranes de matériau sol-gel contenant la souche d'algues CR.....	168
Figure 52 : $[O_2] = f(t)$ après 3 injections successives de 0,5% d' H_2O_2 sur sol-gel.....	168
Figure 53 : double membrane alginate/sol-gel renfermant des cellules de <i>C. vulgaris</i> , vue de profil (A) et vue de haut (B).....	169
Figure 54 : cinétique de formation du dioxygène et vitesse initiale de réaction, volume de sol-gel = 200 μ l.....	170
Figure 55 : cinétique de formation du dioxygène et vitesse initiale de réaction, volume de sol-gel = 300 μ l.....	170
Figure 56 : % d'inhibition de la croissance après les deux étapes d'immobilisation du matériel cellulaire (couche de silice de 1,9 mm) comparé aux algues libres (non immobilisées).....	173
Figure 57 : fluorescence de la chlorophylle (en unité arbitraire) 1h après le dépôt dans la microplaque : dans le milieu de culture à l'état libre (control, en bleu), dans le milieu de culture additionné de 2% de Na(I)-alginate (alginate de sodium, en rouge), encapsulé dans le Ca(II)-alginate (alginate de calcium, en vert), et après la procédure d'immobilisation en deux étapes (alginate de calcium / SiO_2 , en violet).....	174
Figure 58 : % d'augmentation de la fluorescence chlorophyllienne après 40mn d'exposition au DCMU (4 mg/L) en fonction de la technique d'immobilisation et de la souche d'algue utilisée : dans le milieu de culture à l'état libre (control, en bleu), dans le milieu de culture additionné de 2% de Na(I)-alginate (alginate de sodium, en rouge), encapsulé dans le Ca(II)-alginate (alginate de calcium, en vert), et après la procédure d'immobilisation en deux étapes (alginate de calcium / SiO_2 , en violet).....	175
Figure 59 : % d'augmentation de la fluorescence chlorophyllienne après 40mn d'exposition à l'atrazine en fonction de la technique d'immobilisation et de la souche d'algue utilisée : dans le milieu de culture à l'état libre (control, en bleu), dans le milieu de culture additionné de 2% de Na(I)-alginate (sodium alginate, en rouge), encapsulé dans le Ca(II)-alginate (calcium alginate, en vert), et après la procédure d'immobilisation en deux étapes (calcium alginate/ SiO_2 , en violet).....	176
Figure 60 : % d'augmentation de la fluorescence chlorophyllienne après 24 h d'exposition au rejet de temps sec de Chassieu prélevé le 03/03/2011 en fonction de la technique d'immobilisation et de la souche d'algue utilisée.....	178
Figure 61 : % d'augmentation de la fluorescence chlorophyllienne après 24h d'exposition au rejet de temps sec d'Ecully prélevé le 03/03/2011 en fonction de la technique d'immobilisation et de la souche d'algue utilisée.....	178
Figure 62 : % d'activité résiduelle après 24h d'exposition au rejet de temps sec de Chassieu prélevé le 03/03/2011 en fonction de la technique d'immobilisation et de la souche d'algue utilisée.....	179
Figure 63 : % d'activité résiduelle après 24h d'exposition au rejet de temps sec d'Ecully prélevé le 03/03/2011 en fonction de la technique d'immobilisation et de la souche d'algue utilisée.....	180
Figure 64 : plan initial de la station autonome de mesure de toxicité in situ (Dambre, 2011).....	182
Figure 65 : zoom sur le groupe capteur.....	183
Figure 66 : montage des éléments hydraulique (la pompe péristaltique n'est pas visible).....	184
Figure 67 : groupe substrat.....	184

<i>Figure 68 : prise programmable via port Ethernet.....</i>	<i>185</i>
<i>Figure 69 : interface utilisateur pour le pilotage du vérin via la prise programmable.....</i>	<i>185</i>
<i>Figure 70 : le groupe acquisition (sur la droite) composé du Lock-in, d'un générateur de tension et d'un ordinateur (au second plan). On retrouve sur la gauche de cette photographie la pompe péristaltique du groupe hydraulique</i>	<i>186</i>
<i>Figure 71 : premiers essais in situ</i>	<i>187</i>
<i>Figure 72 : mesure témoin (A) et après 5 mn de contact avec les eaux de temps sec de Chassieu (B).....</i>	<i>187</i>

Je suis né dans un environnement – je ne sais pas d'où je suis venu ni où je vais ni qui je suis. C'est ma situation comme la vôtre, à chacun d'entre vous. Le fait que chaque homme a toujours été dans cette même situation et s'y trouvera toujours ne m'apprend rien. Tout ce que nous pouvons observer nous-mêmes à propos de la brûlante question relative à notre origine et à notre destination, c'est l'environnement présent. C'est pourquoi nous sommes avides de trouver à son sujet tout ce que nous pouvons. Voilà en quoi consiste la science, le savoir, la connaissance, voilà quelle est la véritable source de tout effort spirituel de l'homme. Nous essayons de découvrir tout ce que nous pouvons au sujet du contexte spatial et temporel dans lequel notre naissance nous a situés. Et dans cet effort, nous trouvons la joie, nous le trouvons extrêmement intéressant. (Ne serait-ce pas là le but pour lequel nous sommes ici ?)

Erwin Schrödinger, Physique quantique et représentation du monde

Introduction générale

Les milieux aquatiques subissent de nombreuses pressions liées aux activités humaines et plus particulièrement en milieu urbain à cause de la forte densité de population. La dégradation des habitats, de la faune et de la flore aquatique a amené les autorités françaises et européennes à légiférer et à prendre des décisions ambitieuses afin d'inverser ce processus. La directive cadre européenne sur l'eau prévoit ainsi de « prévenir toute dégradation supplémentaire, de préserver et d'améliorer l'état des écosystèmes aquatiques ainsi que, en ce qui concerne leur besoin en eau, des écosystèmes terrestres et des zones humides qui en dépendent directement. »

Parmi l'ensemble des pressions s'exerçant sur les milieux aquatiques, il en est une peu étudiée, mais qui joue un rôle déterminant dans leur dégradation. Il s'agit des rejets urbains de temps de pluie (RUTP). Ces derniers sont définis comme étant l'ensemble des rejets urbains dus aux exutoires pluviaux, aux déversoirs d'orage et à la station d'épuration pendant les périodes pluvieuses. Les volumes rejetés, leurs compositions, leurs variabilités sont des éléments étudiés depuis de nombreuses années en France et de par le monde. En revanche, leur impact sur les milieux récepteurs (cours d'eau et nappes) est peu étudié dans les milieux académiques et commence tout juste à être pris en compte par les pouvoirs publics.

Dans le contexte actuel de l'application de politiques de développement durable et de protection de la ressource en eau, il est essentiel de comprendre les effets à court et long terme des effluents urbains sur les écosystèmes récepteurs. C'est pourquoi nous posons donc aujourd'hui la question suivante : quel est l'impact des RUTP sur le compartiment algal et de quelles manières pouvons-nous évaluer précocement d'éventuels effets délétères pour le milieu aquatique?

Ce travail est réalisé dans le cadre d'un programme de recherche du MEDDE, et est soutenue par l'ONEMA ainsi que l'Observatoire de Terrain en Hydrologie Urbaine (OTHU), une fédération de recherche qui étudie le fonctionnement des ouvrages de l'assainissement pluvial depuis 1999. Cet observatoire est un laboratoire de recherche hors murs, constitué par un ensemble d'appareils de mesure installés sur le système d'assainissement de l'agglomération lyonnaise et sur les milieux aquatiques recevant ses effluents. Une de ses ambitions consiste à mieux comprendre le cycle de l'eau en ville et les flux de polluants associés afin de développer des stratégies nouvelles et plus durables de gestions des eaux pluviales en zone urbaine.

A travers ces ouvrages, notre travail développe deux points : il s'attache en premier lieu à évaluer la dangerosité des effluents urbains à l'aide de différents bioindicateurs de toxicité. Pour cela, nous nous sommes basés sur le suivi des modifications du métabolisme de microalgues dulçaquicoles, excellents organismes bioindicateurs. En second lieu, ce travail a eu pour vocation le développement de nouveaux biomarqueurs d'écotoxicité et l'adaptation de bioessais existants afin de mettre au point des outils de suivi de terrain : des biocapteurs qui permettent de réaliser des mesures en temps réel quant à la qualité des effluents étudiés et leurs effets sur le milieu récepteur.

La première partie du document est consacrée à l'étude de la littérature sur les RUTP. Elle présente un bilan sur leur composition, leurs impacts sur les différentes catégories de masses d'eau ainsi que sur les outils d'évaluation des impacts de polluants sur les organismes et des dispositifs d'évaluation adaptés aux études de terrain.

La seconde partie présente notre démarche expérimentale ainsi que les différentes méthodes et le matériel utilisé lors de cette étude pour répondre à notre problématique.

La troisième partie est consacrée aux résultats obtenus. Dans un premier temps, nous présentons les résultats d'analyse des échantillons prélevés. Dans un second temps, nous traitons des bioessais menés en laboratoire et nous confrontons ces résultats aux analyses physicochimiques. Enfin, nous montrons comment nous avons pu adapter les bioessais pour les rendre utilisables sur site ainsi que la construction d'une station de mesure autonome.

Pour conclure ce manuscrit nous ferons le bilan de ce travail de thèse, de ses apports et de ses faiblesses dans le traitement de notre problématique et nous aborderons pour finir les nouvelles perspectives de recherche qu'il ouvre.

Partie A : Etude bibliographique

1 La gestion des eaux pluviales en ville

1.1 Historique

Les problèmes posés par l'évacuation des eaux usées sont aussi vieux que les villes. On retrouve des traces d'ouvrages d'assainissement dès la Rome antique. Sous le règne de Tarquin l'Ancien (-616 ; -575 av J.C) fut construit le *Cloaca Maxima*, dont la fonction première était de drainer les eaux marécageuses se situant entre l'Isquilin, le Viminal et le Quirinal, trois des sept collines de Rome. Ce canal à ciel ouvert évacuait l'eau du sol jusqu'au Tibre. Mais rapidement, il se transforma en grand égout et fut progressivement recouvert par travaux successifs jusqu'au II^e siècle ap J.C (Chocat, 1997).

On voit déjà à ce moment de l'histoire que le réseau d'assainissement a des fonctions multiples qui peuvent varier au cours du temps. On remarque aussi que le milieu naturel est un exutoire spontané des déchets produits par la société. Le principe est simple : évacuer le plus loin possible du lieu de vie ses eaux usées afin d'éviter tout risque sanitaire lié à l'eau stagnante (colibacilloses, choléra, fièvre typhoïde, dengue, ...) (CNRS, 2000).

Actuellement, en France, même s'il subsiste quelques systèmes d'évacuation des eaux usées et pluviales des temps anciens, les structures que l'on trouve dans nos villes sont plus récentes. Une petite part est héritée du Moyen-Age et la plus grande part nous vient du XIX^e siècle.

Au Moyen-Age, les systèmes d'évacuation d'eaux usées mis au point par les romains ne sont pas oubliés mais non exploités faute de moyens pour les entretenir (Chocat, 1997). Ainsi, la plupart des maisons situées en ville n'ont pas de fosse d'aisance et la technique utilisée est celle du « tout-à-la-rue ». Les petits ruisseaux servent d'égout à ciel ouvert aussi bien pour les eaux usées que pour les eaux pluviales. La situation ne fait qu'empirer au cours des siècles, cette dégradation étant à mettre en parallèle avec l'augmentation de la densité des villes et des activités humaines (Boudriot, 1988).

La situation ne s'améliorera qu'à partir du début du XIX^e siècle avec l'apparition des premiers égouts, destinés dans un premier temps à assainir les rues et non prévus pour évacuer les rejets domestiques. Dans la seconde moitié du XIX^e, le concept de réseau apparaît comme une représentation susceptible d'être appliquée dans un premier temps à l'hydrographie d'un bassin. Cette période a été marquée par l'émergence d'un mouvement hygiéniste qui préconisait de collecter les eaux urbaines et de les transporter dans des canalisations enterrées pour les rejeter au milieu naturel en dehors de la ville, afin d'éviter le développement de maladies. Les premiers textes modernes concernant le droit de l'eau, dont certaines dispositions sont aujourd'hui encore applicables, sont les codes napoléoniens. L'objectif principal de ces codes étant, suite à la Révolution Française de 1789, de déterminer le régime de propriété de l'eau. Il en est ainsi du Code du domaine public fluvial et du Code civil, qui fixent les régimes de propriété et donc d'usage des cours d'eau, des sources, des plans d'eau, etc. Mais à l'époque aucune préoccupation liée à « l'environnement aquatique » n'apparaît dans ces textes.

En France, la construction des réseaux modernes d'assainissement est avalisée en 1894 par le vote de la loi sur le tout-à-l'égout à Paris. Ce système se généralisera rapidement à l'ensemble de la France dès le début du XX^e siècle, accompagné des premières stations d'épuration. Les premiers réseaux sont de type unitaire : les collecteurs évacuent les eaux usées « de temps sec » et occasionnellement le ruissellement pluvial. C'est un système qui donna

satisfaction jusqu'à la fin de la Seconde Guerre mondiale (et qui constitue à l'heure actuelle le réseau d'assainissement historique de nos centres villes).

A la fin du XIX^e siècle est votée la première grande loi sur l'eau (8 avril 1898), afin d'organiser les différents usages de l'eau qui se sont largement développés suite notamment à la révolution industrielle. Pour la première fois, l'Etat intervient pour réglementer des usages par un système d'autorisation de type « police des eaux ». Néanmoins, les impératifs qui ont donné lieu à cette réglementation et les objectifs qu'elle poursuit ne sont pas d'ordre « écologique ». Il s'agit plutôt de veiller à ce que le développement industriel reste compatible avec des impératifs de salubrité et donc de sécurité publique.

La première apparition réellement significative de préoccupations environnementales dans le droit de l'eau français remonte à la loi du 16 décembre 1964. Cette loi crée les organismes de bassin (agences et comités de bassin). Pour la première fois dans l'histoire administrative française, une entité naturelle, le bassin, correspond à une circonscription administrative et fera donc l'objet d'une gestion spécifique. Par ailleurs, le fil directeur de cette loi consiste à « lutter contre la pollution pour satisfaire ou concilier les exigences de :

- l'alimentation en eau potable et la santé publique ;
- l'agriculture, l'industrie, les transports, et toute autre activité humaine d'intérêt général ;
- la vie biologique du milieu récepteur [...] »

L'ordre dans lequel apparaissent ces préoccupations est très significatif de l'approche de la gestion de l'eau de l'époque. On notera en particulier le progrès considérable que constitue l'objectif de lutte contre la pollution dans un souci notamment de maintien de la vie biologique même si « l'approche usage » reste prédominante. Une hiérarchie existe donc encore entre usages et milieux, et on peut considérer que la loi de 1964 a eu pour objectif principal la satisfaction des usages – cette satisfaction ne devant toutefois pas nuire aux milieux aquatiques.

Entre 1964 et 1991, plusieurs lois importantes sont intervenues dans le domaine de la protection de l'environnement. Parmi elles, on notera en particulier la Loi du 10 juillet 1976 qui affirme pour la première fois que la protection de la nature est d'intérêt général. La Loi « pêche » du 29 avril 1984 constitue également une avancée significative puisqu'elle prévoit que la préservation des milieux aquatiques et du patrimoine piscicole est d'intérêt général.

A partir de 1991 de nouveaux textes de lois, toujours en vigueur, permettent à la France et à l'Union Européenne de mener une politique plus ambitieuse et respectueuse de l'environnement en termes de gestion des eaux. Ces textes sont décrits ci-après ainsi que les outils mis à la disposition des gestionnaires publics afin de remplir ces objectifs.

1.2 Outils juridiques et réglementaires en vigueur

1.2.1 Les grands textes d'orientation

1.2.1.1 La loi sur l'eau (3 janvier 1992)

La loi sur l'eau de 1992 découle des directives européennes 91/271/CEE « eaux urbaines résiduaires » et 91/676/CEE « nitrates ». Elle modifie profondément les principes de gestion de l'eau en franchissant une étape supplémentaire pour la prise en compte des milieux aquatiques. Elle définit la notion de « gestion équilibrée » (article 2) de la ressource en eau, en visant à assurer :

- « la préservation des écosystèmes aquatiques, des sites et des zones humides [...] ;
- la protection contre toute pollution et la restauration de la qualité des eaux superficielles et souterraines et des eaux de mer dans la limite des eaux territoriales ;
- le développement et la protection de la ressource en eau ;
- la valorisation de l'eau comme ressource économique et la répartition de cette ressource, de manière à satisfaire ou à concilier, lors des différents usages, activités ou travaux, les exigences :
 - de la santé, de la salubrité publique, de la sécurité civile et de l'alimentation en eau potable de la population ;
 - de la conservation et du libre écoulement des eaux et de la protection contre les inondations ;
 - de l'agriculture, des pêches et cultures marines, de la pêche en eau douce, de l'industrie, de la production d'énergie, des transports, du tourisme, des loisirs et des sports nautiques ainsi que de tout autre activité humaine légalement exercée. »

Autrement dit, les principes de gestion de l'eau définis par la loi sur l'eau consistent à affirmer que la préservation des milieux aquatiques est un préalable nécessaire à la satisfaction des usages. La mise en avant des milieux aquatiques tient au fait qu'en les maintenant « en bonne santé » on pourra mieux satisfaire les différents usages. Milieux et usages ne doivent donc pas être opposés, au contraire, et en particulier lorsque l'on se situe dans une logique de moyen ou long terme.

La loi sur l'eau de 1992 définit les modalités de création de schémas directeurs d'aménagement et de gestion des eaux (SDAGE) : ils fixent pour chaque bassin ou groupement de bassins les orientations fondamentales d'une gestion équilibrée de la ressource en eau. Ils prennent en compte les principaux programmes arrêtés par les collectivités et définissent les objectifs de quantité et de qualité des eaux ainsi que les aménagements à réaliser pour les atteindre. Ils délimitent le périmètre des sous-bassins correspondant à une unité hydrographique. Les programmes et décisions administratives dans le domaine de l'eau doivent être compatibles ou rendus compatibles avec leurs dispositions. Les autres décisions administratives doivent prendre en compte les dispositions de ces schémas directeurs.

De plus, dans un groupement de sous-bassins ou un sous-bassin correspondant à une unité hydrographique ou à un système aquifère, un schéma d'aménagement et de gestion des eaux (SAGE) fixe les objectifs généraux d'utilisation, de mise en valeur et de protection quantitative et qualitative des ressources en eau superficielle et souterraine et des écosystèmes aquatiques ainsi que de préservation des zones humides.

1.2.1.2 *La directive cadre sur l'eau (20 octobre 2000)*

La directive cadre sur l'eau (DCE) 2000/60/CEE est entrée en vigueur le 20 octobre 2000. Elle établit un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau. Elle fixe plusieurs objectifs :

- atteindre un bon état écologique des eaux en 2015 ;
- réduire progressivement les rejets ou les émissions pour les substances prioritaires ;
- supprimer les rejets des substances prioritaires dangereuses d'ici 2021.

En mettant en place les outils suivants :

- une gestion des eaux par bassin versant ;
- la fixation d'objectifs par « masse d'eaux » ;
- une planification et une programmation avec une méthode de travail spécifique et des échéances ;
- une analyse économique des modalités de tarification de l'eau et une intégration des coûts environnementaux ;
- une consultation du public dans le but de renforcer la transparence de la politique de l'eau.

La DCE induit aujourd'hui pour l'ensemble de la gestion de l'eau et des activités qui la dégradent la mise en place de plans d'action, au travers des SDAGE articulés autour de la notion de bon état des milieux aquatiques. Ces plans définissent à l'échelle de chaque grand bassin hydrographique les actions prioritaires à accomplir, entre autres pour les prélèvements et rejets des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE). Dans ce cadre, des exigences locales visant à atteindre ou conserver le bon état des milieux peuvent conduire à renforcer les prescriptions nationales encadrant l'activité d'une ICPE, et notamment à réviser, dans l'arrêté préfectoral autorisant son activité, les valeurs limites d'émissions pour des paramètres servant à qualifier l'état du milieu (micropolluants ou macro-polluants tels que le phosphore ou l'azote par exemple en cas de risque d'eutrophisation des milieux).

Les notions de bon équilibre chimique et écologique sont intimement liées à la physicochimie des masses d'eaux. Aussi, la DCE ainsi que d'autres directives européennes connexes prévoient la surveillance de nombreuses substances présentes dans les milieux aquatiques dégradés.

En lien avec la DCE, la directive 2006/11/CE du 15 février 2006 concernant la pollution causée par certaines substances dangereuses déversées dans le milieu aquatique de la Communauté, définit deux listes de substances et imposent aux Etats membres de prendre des mesures appropriées pour éliminer la pollution des eaux par les substances relevant de la liste I et pour réduire la pollution des eaux par les substances relevant de la liste II. Cette démarche comprend des objectifs de qualité des milieux et des normes d'émissions.

On peut établir à l'heure actuelle une liste de 41 substances prises en compte comme critère du bon état chimique des eaux et 9 polluants spécifiques caractéristiques du bon état écologique, définies par la circulaire du 7 mai 2007 :

- 13 substances (ou familles de substances) dangereuses prioritaires de l'annexe X de la DCE. Elles sont toxiques, persistantes et bioaccumulables ; les objectifs étant d'en arrêter ou de supprimer progressivement les rejets et pertes d'ici 2021 ou 2028. La circulaire du 7 mai 2007 précise un objectif de diminution de 50% des rejets d'ici 2015 (2004 étant année de référence). Il s'agit de : diphényléthers pentabromés (PBDE), cadmium et ses composés, chloroalcane, hexachlorobenzène, hexachlorobutadiène, , hexachlorocyclohexane, mercure et ses composés, nonylphénols, pentachlorobenzène, somme de 5 HAP (B(a)P, B(b)F, B(k)F B(g,h,i)P, I(1,2,3-cd)P), composés du tributylétain (TBT), anthracène, endosulfan ;

- 20 substances (ou familles de substances) prioritaires de l'annexe X de la DCE. Ces substances présentent un risque significatif pour ou via l'environnement aquatique, les objectifs visant toujours à réduire progressivement les rejets, les émissions et les pertes d'ici 2021. La circulaire du 7 mai 2007 précise un objectif de diminution de 30% des rejets d'ici 2015 (2004 étant année de référence). Ce sont des pesticides (alachlore, atrazine, chlorfenvinphos, chlorpyrifos, diuron, isoproturon, simazine, trifluraline), des composés organiques volatils (benzène, 1,2-dichloroéthane, dichlorométhane, trichlorométhane), des HAP (fluoranthène, naphthalène), des métaux (plomb et ses composés, nickel et ses composés), l'octylphénols, le pentachlorophénol, le trichlorobenzènes et le DEHP;

- 8 substances (ou famille de substances) de la liste I de la directive 2006/11 non incluses dans l'annexe X. La circulaire du 7 mai 2007 précise un objectif de diminution de 50% des rejets d'ici 2015 (2004 étant année de référence). Ces sont des pesticides (aldrine, dieldrine, endrine, isodrine, DDT total, pp DDT) et des solvants (tétrachloroéthylène, trichloroéthylène) ;

- 9 polluants spécifiques caractéristiques du bon état écologique des eaux, issus de la liste II de la directive 2006/11 non inclus dans l'annexe X. La circulaire du 7 mai 2007 précise un objectif de diminution de 10% des rejets d'ici 2015 (2004 étant année de référence) pour les molécules soulignées: arsenic, chrome, cuiivre, zinc, chlotorlon, oxadiazon, linuron, 2,4 D, 2,4 MCPA.

Tableau 1 : liste des substances prises en compte dans la caractérisation de l'état des masses d'eaux.
Source : Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse

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					
Liste des 41 substances caractéristiques du bon état chimique des eaux : - l'ensemble des 13 substances (ou familles de substances) dangereuses prioritaires de l'annexe X de la DCE - l'ensemble des 20 substances (ou familles de substances) prioritaires de l'annexe X de la DCE - et les substances 8 substances (ou familles de substances) de la liste I de la directive 2006/11 (ex76/464/CE) non incluses dans l'annexe X				Liste des 9 polluants spécifiques caractéristiques du bon état écologique des eaux	
Les Substances Dangereuses Prioritaires de la DCE (SDP)	Les Substances Prioritaires de la DCE (SP)	Substances "Liste I" de la directive 2006/11 (ex 76/464/CEE) non incluses dans la DCE	en <u>souligné</u> substances issues de la "Liste II" de la directive 2006/11 (ex 76/464/CEE), retenues au titre du programme d'action national, <u>non incluses dans la DCE</u>		
Objectifs de réduction nationaux (circulaire du 7 mai 2007**)	50 % du flux des rejets à l'échéance 2015 (année de référence 2004)	30 % du flux des rejets à l'échéance 2015 (année de référence 2004)	50 % du flux des rejets à l'échéance 2015 (année de référence 2004)	pour celles soulignées, 10 % du flux des rejets à l'échéance 2015 (année de référence 2004)	
Objectifs DCE sur les rejets	Suppression des rejets à l'échéance nov 2021 ou déc 2028	Réduction des rejets (pas de délai fixé)	Pas d'objectifs DCE sur les rejets	Pas d'objectifs DCE sur les rejets	
substances ou familles de substances concernées	Composés du Tributylétain (TBT) (Tributylétain-cation)	DEHP (Di (2-éthylhexyl)phthalate)	Perchloréthylène (Tétrachloroéthylène)	<u>Arsenic</u>	
	PBDE*** (Pentabromodiphényléther)	Chlorure de méthylène (Dichlorométhane ou DCM)	Trichloroéthylène	<u>Chrome</u>	
	Nonylphénols (4-(para)-nonylphénol)	Octylphénols (Para-tert-octylphénol)	Aldrine	<u>Cuivre</u>	
	Chloroalcane C10-C13	Diuron	Tétrachlorure de carbone	<u>Zinc</u>	
	Somme de 5 HAP = Benzo (g,h,i) Pérylène Indeno (1,2,3-cd) Pyrène Benzo (b) Fluoranthène Benzo (a) Pyrène Benzo (k) Fluoranthène	Nickel et ses composés	DDT (Dichlorodiphényltrichloroéthane)	Chlortoluron	
	Anthracène HAP ***	Plomb et ses composés	Dieldrine	<u>Oxadiazon</u>	
	Pentachlorobenzène	Fluoranthène	Isodrine	<u>Linuron</u>	
	Mercurure et ses composés	Chloroforme (Trichlorométhane)	Endrine	<u>2,4 D</u>	
	Cadmium et ses composés	Atrazine		<u>2,4 MCPA</u>	
	Hexachlorobenzène	Trichlorobenzène (TCB)			
	Hexachlorocyclohexane (Lindane)	Chlorpyrifos			
	Hexachlorobutadiène	Naphtalène			
	Endosulfan (total) ***	Alachlore			
		Isoproturon Chlorfenvinphos Pentachlorophénol Benzène Simazine 1,2 Dichloroéthane Trifluraline (+ Diphényléther bromés****)			
	nombre de substances et familles de substances	13	20	8	9
			41		9
	code couleur national	rouge	jaune	orange	blanc (substances soulignées)

La DCE prévoit également dans son article 2 l'établissement de normes de qualité environnementale (NQE) c'est-à-dire des valeurs limites de concentrations en polluants dans les milieux aquatiques. Ces normes visent à améliorer et à protéger la qualité environnementale.

« Les Etats membres veillent à ce que la composition de leurs eaux de surface soit conforme aux normes de qualité environnementale pour les substances prioritaires, exprimées en moyenne annuelle et en concentration maximale admissible. »

Une proposition de directive du Parlement européen et du conseil établissant des normes de qualité environnementale (NQE) dans le domaine de l'eau a été votée au Parlement le 18 juin 2008/05/CE (EC 2008). Avec ces normes, l'Union européenne cherche à assurer un niveau élevé de protection de l'environnement et de la santé humaine.

Les NQE sont établies pour :

- les concentrations totales des composés organiques, c'est-à-dire sur l'échantillon brut ;
- les concentrations en phase dissoute des métaux, après filtration à 0.45 µm (EC 2008).

Elles sont fixées pour trois types d'eau : les eaux de surfaces intérieures, les eaux de transition et les eaux marines intérieures et territoriales. Un récapitulatif de l'ensemble des valeurs NQE est disponible en annexe.

1.2.1.3 La loi sur l'eau et les milieux aquatiques (30/12/2006)

La Loi sur l'Eau et les Milieux Aquatiques (LEMA) du 30 décembre 2006 a rénové le cadre global défini par les lois sur l'eau du 16 décembre 1964 et du 3 janvier 1992 qui avaient bâti les fondements de la politique française de l'eau : instances de bassin, redevances, agences de l'eau. Les nouvelles orientations qu'apporte la LEMA ont pour but principal l'atteinte des objectifs fixés par la DCE.

La LEMA comporte 102 articles et réforme plusieurs codes (environnement, collectivités territoriales, santé publique ...). Au travers de ces articles, les principales dispositions de la LEMA consistent :

- à rénover l'organisation institutionnelle via une réforme des redevances des agences de l'eau, une légitimation des comités de bassin à approuver les programmes d'intervention des agences et les taux de redevance et à la création de l'Office national de l'eau et des milieux aquatiques (ONEMA). Cet organisme est chargé de mener et de soutenir, au niveau national, des actions destinées à favoriser une gestion globale, durable et équilibrée de la ressource en eau, des écosystèmes aquatiques, de la pêche et du patrimoine piscicole ;
- à proposer des outils nouveaux pour lutter contre les pollutions diffuses ;
- à permettre la reconquête de la qualité écologique des cours d'eau en les entretenant par des méthodes douces, d'assurer leur continuité écologique, par l'obligation d'un débit minimum imposé au droit des ouvrages hydrauliques et enfin, grâce à des outils juridiques à protéger les frayères ;
- à renforcer la gestion locale et concertée des ressources en eau ;
- à simplifier et renforcer la police de l'eau ;
- à donner des outils nouveaux aux maires pour gérer les services publics de l'eau et de l'assainissement dans la transparence ;
- à réformer l'organisation de la pêche en eau douce ;
- à prendre en compte l'adaptation au changement climatique dans la gestion des ressources en eau.

Ce texte présente en particulier de nouveaux articles sur la gestion des eaux pluviales. Des crédits d'impôts sont instaurés pour l'installation d'ouvrages de récupération des eaux de pluie et une taxe pour les eaux pluviales peut être mise en place par les collectivités qui le souhaitent (cf. partie 1.2.2.5).

1.2.1.4 L'arrêté du 22 juin 2007

Cet arrêté est relatif à la collecte, au transport et au traitement des eaux usées des agglomérations d'assainissement¹ ainsi qu'à la surveillance de leur fonctionnement et de leur efficacité. Il est rattaché au code des collectivités territoriales et définit dans ce cadre « l'étendue des prestations afférentes aux services communaux d'assainissement ». Mais il est également rattaché au code de l'environnement et fixe dans ce cadre « les prescriptions techniques qui permettent de garantir l'efficacité de la collecte et du traitement des eaux usées urbaines ».

Il interdit le raccordement des eaux pluviales au réseau d'eaux usées (sauf justification expresse de la commune et à la condition que le dimensionnement du système de collecte et de la station d'épuration de l'agglomération d'assainissement le permette).

Il définit également les obligations en matière d'autosurveillance du réseau : ce principe doit être mis en œuvre dans le cas des stations d'épuration et des déversoirs d'orage. C'est un principe inspiré de la législation relative aux ICPE. L'autosurveillance a pour finalité une meilleure maîtrise des rejets des effluents et des déchets, y compris dans des circonstances exceptionnelles (accidents, événements météorologiques particulier, ainsi qu'à l'occasion de travaux). 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.

De plus, de nouvelles exigences apparaissent dans le domaine de la surveillance des incidences des rejets sur le milieu récepteur : « Lorsqu'en raison des caractéristiques des effluents collectés et de celles des eaux réceptrices des rejets, ces derniers risquent d'accroître notablement la concentration dans les eaux réceptrices en polluants et d'en compromettre le respect des objectifs de qualité, ou de porter atteinte à la qualité d'eaux de baignade ou d'eaux destinées à la production d'eau potable ou d'eaux conchylicoles, un suivi approprié du milieu récepteur des rejets est réalisé régulièrement par le maître d'ouvrage. Une mesure par an au moins est réalisée. En cas de rejet dans un cours d'eau, deux points de mesures doivent être aménagés, l'un en amont du rejet de la station d'épuration, l'autre en aval, à une distance telle de celui-ci que la mesure soit la plus représentative possible. »

1.2.2 Les outils de planification de l'urbanisme

La réglementation européenne, une fois retranscrite en droit français, est ensuite appliquée à l'échelon local par l'intermédiaire de divers plans et programmes. Ces plans et programmes étant conçus par et pour le territoire concerné, ils permettent aux acteurs locaux de mettre en pratique les politiques nationales « au cas par cas ».

1.2.2.1 *Le schéma de cohérence territoriale*

Le schéma de cohérence territoriale (SCOT) peut spécifier des objectifs dans le domaine des risques. Outil privilégié de la planification intercommunale, il se situe à la bonne échelle pour définir des principes d'équilibre entre les diverses occupations du sol, par rapport à des contraintes identifiées d'écoulement ou de protection des lieux habités.

¹ L'article 2 de la directive ERU définit l'agglomération comme une « zone dans laquelle la population et/ou les activités économiques sont suffisamment concentrées pour qu'il soit possible de collecter les eaux urbaines résiduaires pour les acheminer vers un système de traitement des eaux usées ou un point de rejet final ».

1.2.2.2 Le plan local d'urbanisme

Le plan local d'urbanisme (PLU) doit être compatible avec le SCOT et doit, en matière de prévention des risques, transcrire les documents s'imposant aux communes (plan de prévention des risques, projet d'intérêt général). Il peut édicter des mesures particulières liées à la maîtrise des ruissellements et des risques d'inondation, notamment lorsqu'il reprend des dispositions issues d'études de zonage d'assainissement établies conformément au code général des collectivités territoriales (art. L.2224-10). Au niveau de la Communauté urbaine de Lyon (Grand Lyon), le PLU reprend les mêmes objectifs que le règlement d'assainissement.

1.2.2.3 Les règlements d'assainissement

Le règlement de service définit le cadre des relations existantes entre le service d'assainissement et les usagers. Il rappelle le contexte légal et réglementaire et fixe les obligations de la collectivité et des usagers ainsi que les modalités d'exercice du service. Ce règlement fixe ainsi les modalités de gestion des eaux pluviales sur son territoire de compétences.

Sur le territoire du Grand Lyon s'applique un règlement dont le but est bien de « définir les conditions et modalités du déversement des eaux usées et pluviales dans les réseaux d'assainissement communautaires. ». Le texte référent consacre un chapitre entier (n°5) aux eaux pluviales. Il comporte deux articles (22 et 23) stipulant ainsi que « la collectivité n'a pas d'obligation de collecte des eaux pluviales issues des propriétés privées. Le principe de gestion des eaux pluviales est le rejet au milieu naturel. » Et plus loin on peut encore lire : « Ce rejet au milieu naturel peut s'effectuer par infiltration dans le sol ou par écoulement dans des eaux superficielles. Dans tous les cas, vous devrez rechercher des solutions limitant les quantités d'eaux de ruissellement ainsi que leur pollution. »

La communauté urbaine en charge de l'assainissement essaie donc de limiter au maximum les rejets d'eaux pluviales dans le réseau pour privilégier une gestion « à la parcelle ».

1.2.2.4 Le zonage d'assainissement pluvial

Le zonage d'assainissement pluvial est élaboré par une commune ou un groupement de communes, sur leur territoire. Il a pour but de prévenir les effets de l'urbanisation et du ruissellement des eaux pluviales sur les systèmes d'assainissement et sur les milieux récepteurs. Il délimite :

- les zones où des mesures doivent être prises pour limiter l'imperméabilisation des sols et pour assurer la maîtrise du débit et de l'écoulement des eaux pluviales et de ruissellement ;
- les zones où il est nécessaire de prévoir des installations pour assurer la collecte, le stockage éventuel et si besoin, le traitement des eaux pluviales et de ruissellement, lorsque la pollution qu'elles apportent au milieu aquatique risque de nuire gravement à l'efficacité des dispositifs d'assainissement.

Le zonage pluvial est une phase essentielle dans l'élaboration d'une stratégie de gestion des eaux pluviales. Il permet d'intervenir tant au niveau de la zone urbaine déjà desservie par un réseau collectif que sur l'urbanisation future, et même les zones agricoles. De plus, il favorise l'intercommunalité.

1.2.2.5 Le code général des collectivités territoriale : la taxe pluviale

Compte tenu de l'impact des eaux pluviales sur l'environnement, il a été décidé d'inscrire dans la LEMA (cf. ci-avant) l'instauration d'une taxe pluviale. Il aura toutefois fallu attendre plus de cinq ans pour qu'elle devienne effective, avec la publication du décret du 6 juillet 2011.

Ce décret ouvre la voie à la création d'un service public de gestion des eaux pluviales et permet d'instaurer, pour son financement, une taxe qui sera prélevée auprès des propriétaires publics ou privés d'un terrain ou d'une voirie, dans une zone urbaine ou à urbaniser. La taxe est assise sur la superficie cadastrale des terrains. Lorsque ces terrains ne sont pas répertoriés au cadastre, la superficie prise en compte est évaluée par la commune ou le groupement qui institue la taxe. Lorsque le terrain assujéti à la taxe comporte une partie non imperméabilisée, la superficie de cette partie, déclarée par le propriétaire dans les conditions prévues à l'article L. 2333-98-1, est déduite de l'assiette de la taxe.

Le produit de la taxe est exclusivement affecté à la création, à l'exploitation, au renouvellement, à l'extension des installations de gestion des eaux pluviales urbaines, à l'entretien de ces ouvrages ainsi qu'au contrôle des dispositifs évitant ou limitant le déversement de ces eaux dans les ouvrages publics. Un état annexe au compte administratif retrace les recettes procurées par cette taxe et leur emploi.

1.2.2.6 Le Plan de Prévention des Risques Naturels pour les inondations

Il établit la cartographie précise des secteurs susceptibles d'être inondés ou qui ont déjà été inondés. Son volet réglementaire édicte des mesures pour :

- limiter ou interdire la construction de nouveaux bâtiments ;
- limiter les conséquences de nouvelles imperméabilisations et obliger les propriétaires à stocker les eaux de pluie sur leurs parcelles pour des pluies très exceptionnelles (période de retour de 100 ans au lieu des 20 ou 30 ans demandés habituellement).

1.3 Les solutions techniques modernes

Parallèlement à l'évolution de la réglementation, des solutions techniques ont vu le jour afin de limiter les impacts des eaux pluviales en milieu urbain.

1.3.1 Les techniques traditionnelles

Développé il y a plus d'un siècle dans les centres urbains, le réseau d'assainissement ne peut accepter toutes les eaux de pluie. Lorsque les flux sont trop importants, à l'occasion d'orages violents, les égouts se mettent en charge et finissent par déborder sur la chaussée, inondant routes et habitations. Les stations d'épuration n'apportent aucune solution à ces problèmes car elles ont été conçues à l'origine pour traiter les eaux résiduaires et non pour évacuer les eaux de pluies. Elles ne sont d'ailleurs pas prévues pour recevoir de grosses quantités d'eau et traitent plus difficilement les métaux lourds et autres contaminants présents (cf. chapitre 2). Aussi, pour éviter de noyer la station d'épuration, l'ancien exutoire permettant le rejet direct au milieu naturel fut conservé, les deux ouvrages étant mis en relation par des dispositifs variés destinés à réguler autant que possible le débit transitant dans le nouveau

collecteur. La notion de déversoir d'orage (DO) fut alors introduite dans les réseaux d'assainissement. Ce sont les ouvrages les plus simples et les plus anciens de gestion des eaux pluviales. Conçus à l'origine comme de simples régulateurs de débit, ils déclenchaient le déversement dès que le débit incident dépassait 3 à 5 fois le débit moyen de temps sec. Cette règle était fondée sur l'idée que seule les eaux usées étaient polluées ce qui n'est pas le cas (cf. chapitre 2). En 2004, on dénombrait 33 400 déversoirs d'orage pour 98 000 km de réseau unitaire (Institut français de l'environnement, 2008). Ils tendent actuellement à prendre en compte le risque pour l'environnement pour devenir des ouvrages de dépollution (déversoirs latéraux à seuil double, déversoirs à seuil haut et à chambre tranquillisante, ...) mais ce type d'ouvrage est encore rare. Aussi, par temps de pluie, ce sont toujours de grandes quantités d'un mélange d'eaux usées et d'eaux pluviales qui se déversent dans le milieu naturel, cours d'eau ou milieu marin dans les communes littorales.

1.3.2 Les techniques alternatives

Les problèmes chroniques d'inondation et de pollution engendrés par les eaux pluviales en réseau unitaire ont persisté malgré la présence de déversoirs d'orage. Ceci a conduit à l'idée d'une séparation complète, sur les bassins versants, des eaux pluviales et des eaux usées qui devront être désormais transportées par deux canalisations différentes. En 2004, on dénombrait 295 000 km de réseau séparatif (dont 200 000 km pour les eaux usées) sur 20 580 communes, (Institut français de l'environnement, 2008). Deux arguments sont avancés : il faut traiter les eaux usées par une station d'épuration avant rejet dans le milieu naturel, et il n'est pas possible de traiter les eaux pluviales dont les volumes peuvent être colossaux et dont on sous-estime la charge polluante.

La théorie de ce système, nommé système séparatif, est simple : des canalisations d'eaux usées sont construites sous les rues afin de desservir les habitations avec un diamètre bien inférieur aux canalisations unitaires historiques. En revanche, on s'efforce d'évacuer les eaux pluviales le plus possible par récolte des ruissellements superficiels en ne construisant des collecteurs que sur de petites distances, juste avant le milieu naturel.

Les techniques alternatives permettent de contourner les inconvénients liés à la gestion traditionnelle des eaux pluviales. Elles consistent à collecter les eaux de pluie, les stocker, puis les restituer de façon différée et régulée.

Cette stratégie de maîtrise des débits fait appel à deux types de solutions souvent complémentaires :

- une première possibilité est de répartir judicieusement, sur le réseau de collecte, des ouvrages de stockage ;
- une autre possibilité, qui peut s'avérer plus économique, se situe encore plus en amont, en intégrant cette préoccupation au cœur des aménagements urbains. Un certain nombre de collectivités la pratiquent déjà et ont imposé aux lotisseurs publics et privés le stockage des eaux de pluie.

Les techniques alternatives peuvent être mises en œuvre à des échelles très variables : parcelle, commune, groupement de communes, bassin versant. Elles font partie du panel de solutions techniques pouvant être proposées par la plupart des outils vus précédemment (zonage

pluvial, PPR, syndicats de bassins versants, ...) pour réduire les problèmes rencontrés lors de la gestion traditionnelle et historique des EP.

Ces techniques ont pour point commun d'assurer trois fonctions principales : la collecte, le stockage temporaire *in situ* (gestion à la parcelle) et la restitution différée et régulée des eaux de pluie.

- Collecte des eaux de pluies : Les eaux pluviales sont recueillies soit directement par infiltration au travers de revêtements de sol suffisamment perméables, soit après ruissellement, par des avaloirs raccordés au réservoir de stockage.
- Stockage temporaire : différentes formes de stockage sont possibles à l'aval de la zone de ruissellement :
 - en volume vide (réservoirs de stockage) : l'eau collectée est stockée dans des bassins de rétention, dont la configuration dépendra des caractéristiques du site ;
 - en volume partiellement vide (structures réservoirs) : l'eau est stockée dans des matériaux poreux ayant des propriétés hydrauliques et mécaniques suffisantes.
- Restitution différée et régulée des eaux de pluie : l'écoulement des volumes stockés se fait soit à débit régulé, dans le réseau aval, au moyen d'un ouvrage de régulation, soit directement dans la nappe par infiltration dans le sous-sol. On recherchera autant que possible à restituer les eaux de pluie au milieu naturel au plus près des lieux de production et le plus ponctuellement possible, afin d'en favoriser la dispersion et non pas la concentration.

Les principaux ouvrages utilisés pour les techniques alternatives sont :

- Les réservoirs de stockage : bassins en eau à ciel ouvert, bassins sec à ciel ouvert, bassins couverts en béton, noues ;
- Les structures réservoirs : chaussées et parkings à structure réservoir, tranchées drainantes, toitures terrasses, puits d'infiltration.

C'est la combinaison de tous ces aménagements intégrés qui permet l'efficacité du dispositif global des techniques alternatives. Celles-ci sont séduisantes du point de vue financier avec un gain constaté sur les dépenses d'aménagement.

Le principe de fonctionnement de ces différents ouvrages est détaillé ci-après.

1.3.2.1 Les bassins

L'eau est collectée par un ouvrage d'arrivée, stockée dans le bassin, puis évacuée à débit régulé soit par un ouvrage vers un exutoire de surface (bassin de retenue), soit par infiltration dans le sol (bassin d'infiltration). Le bassin peut être à ciel ouvert ou enterré (en béton). Il peut s'agir dans ce dernier cas de bassins de stockage souterrains de grandes dimensions, qui s'avèrent souvent très onéreux. Cette stratégie n'est donc pas nécessairement la plus économique à long terme, mais il arrive qu'elle soit privilégiée compte tenu des disponibilités foncières de l'aménageur. On peut citer comme exemple les ouvrages réalisés par la Communauté urbaine de Lille dans le quartier de Lille-Fives. Entre 2005 et 2011 ont été réalisés successivement un premier bassin de 20 000 m³ (Gutenberg) et un second ouvrage composé de deux bassins circulaires pour une capacité de 40 000 m³, l'ensemble de ces infrastructures étant complètement enterré et aménagé.



Figure 1: bassins de stockage des eaux pluviales en construction à Lille – Fives, image Lille Métropole

Parmi les bassins de retenue, on distingue les bassins en eau, qui conservent une lame d'eau en permanence (Figure 2), et les bassins secs, qui sont vides la majeure partie du temps et dont la durée d'utilisation est très courte, de l'ordre de quelques heures seulement. Les bassins peuvent être situés en domaine public, où on leur attribue un autre usage valorisant les espaces utilisés (terrain de sport, aire de jeu, place...) (Figure 3).



Figure 2 : bassin de stockage (en permanence en eau) des eaux pluviales à Saint Priest (Porte des Alpes), image Grand Lyon



Figure 3: bassin de stockage (sec) des eaux pluviales à Saint Priest (Minerve), photographie personnelle

1.3.2.2 Les noues

Une noue est un fossé large et peu profond, présentant des rives en pente douce. Sa fonction essentielle est de stocker un volume important de pluie (décennal par exemple), mais elle peut servir aussi à écouler un épisode plus rare (centennal). Le stockage et l'écoulement de l'eau se font à l'air libre. La collecte est réalisée, soit par canalisations, soit directement après ruissellement sur les surfaces adjacentes (récupération des eaux de toiture et de chaussée, par exemple).

L'eau est évacuée vers un exutoire (réseau, puits et/ou bassin de rétention) ou par infiltration. Les noues, compte tenu de leur intérêt paysager et de leur emprise au sol, se rencontrent souvent à l'intérieur des lotissements où elles délimitent deux terrains mitoyens et servent d'espaces de jeux et de loisirs pour les enfants. Elles peuvent aussi servir de support à des chemins piétonniers.

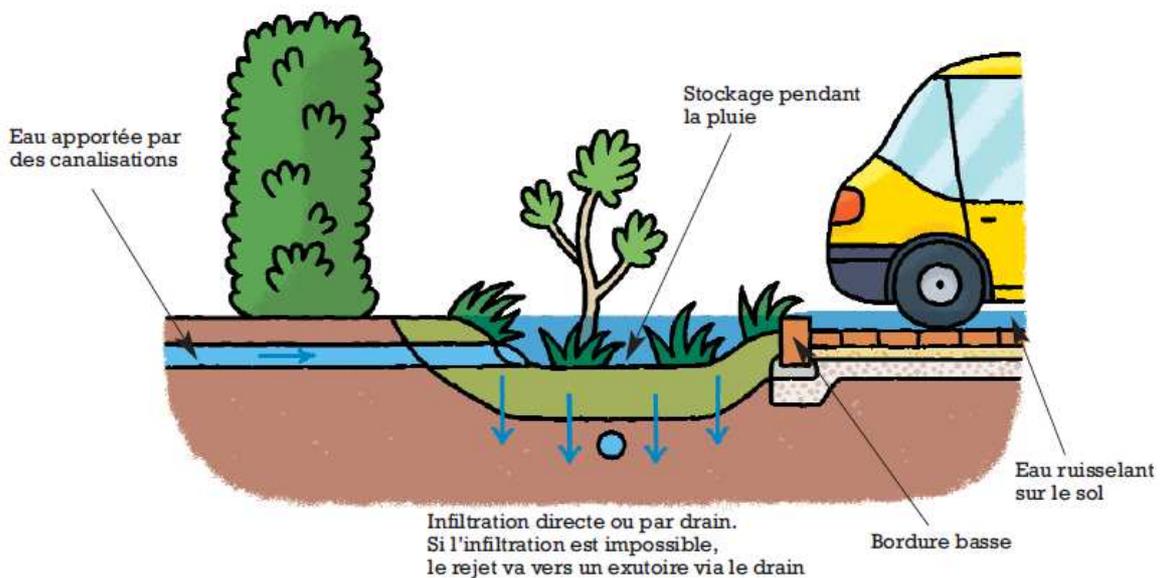


Figure 4: coupe d'une noue (Grand-Lyon, 2008)

1.3.2.3 Les chaussées à structure réservoir

Une chaussée à structure réservoir, outre son rôle de circulation ou de parking, répond à la fonction purement hydraulique de réservoir. Cette fonction de rétention d'eau, commune à toutes les solutions compensatoires, se fait à l'intérieur du corps de la chaussée, dans les vides des matériaux. Elle nécessite la collecte et l'évacuation de l'eau, chacune pouvant se faire de deux manières.

- La collecte peut se faire :
 - soit localement par un système d'avaloirs et de drains qui conduisent l'eau dans le corps de chaussée ;
 - soit par infiltration répartie à travers un revêtement drainant en surface (enrobé drainant ou pavé poreux). Il convient donc de distinguer la structure réservoir et l'enrobé drainant. Des structures réservoirs sans enrobé drainant peuvent être mises en œuvre.
- L'évacuation peut se faire :
 - vers un exutoire prédéfini (réseau d'eau pluviale) ;
 - par infiltration dans le sol support.

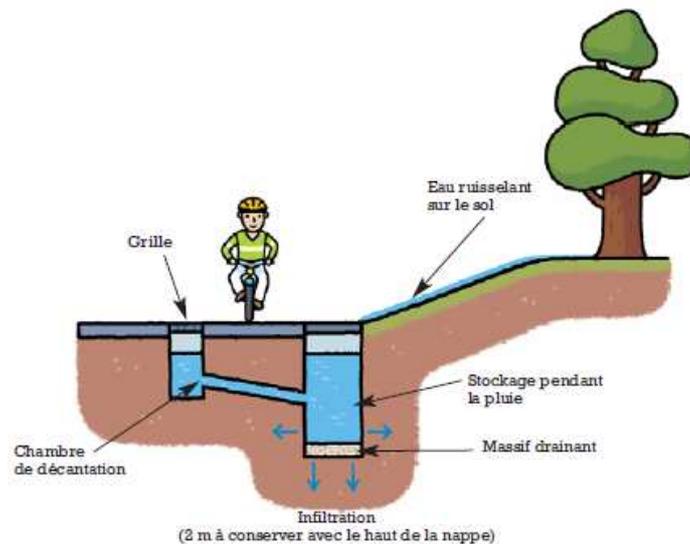


Figure 5: coupe d'une chaussée à structure réservoir (Grand-Lyon, 2008)

1.3.2.4 Les toitures stockantes

L'eau de pluie est stockée provisoirement sur le toit, sur quelques centimètres, par l'intermédiaire d'un parapet en pourtour de toiture. Une partie est absorbée ou s'évapore (notamment dans le cas de toitures végétalisées). L'autre est évacuée par un dispositif de vidange assurant la régulation des débits.

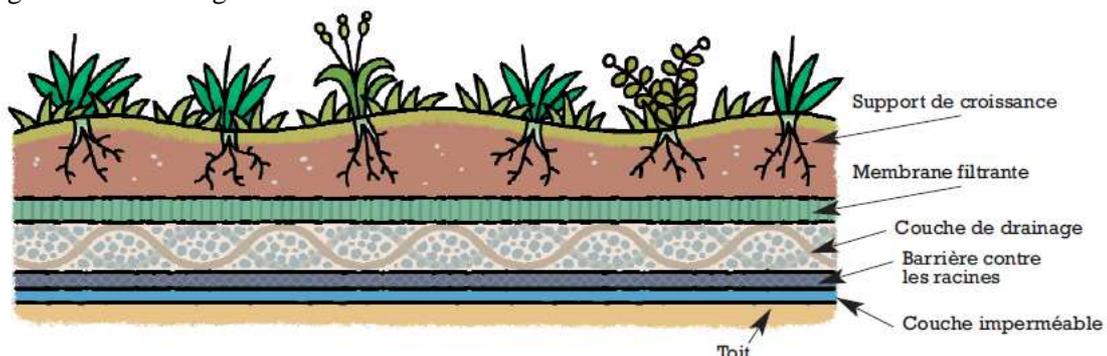


Figure 6: coupe d'un toit végétalisé (Grand-Lyon, 2008)

Résumé du chapitre 1

Depuis l'Antiquité, les eaux pluviales entraînent en zone urbaine inondations et pollutions. Pour résoudre ces deux problèmes majeurs, politiques et ingénieurs ont travaillé en parallèle pour cadrer les usages et le parcours de l'eau en ville.

Toutefois, avec l'urbanisation croissante et l'imperméabilisation des surfaces, ces textes réglementaires et ces ouvrages techniques - dont la portée était limitée - ont rapidement été insuffisant pour lutter contre ces problèmes. C'est pourquoi aujourd'hui à l'échelle européenne, de nouvelles directives ambitieuses ont vu le jour, associées à des modes de gestion plus respectueux du cycle de l'eau. Leur finalité étant à moyen terme de recouvrer un bon état écologique et chimique des masses d'eaux.

Deux défis s'offrent à nous :

- Quantifier les pollutions et leurs impacts générés par les ouvrages traditionnels qui représentent encore des sources importantes de nuisances sur les écosystèmes récepteurs ;
- Evaluer les impacts potentiels des rejets issus des ouvrages faisant appels aux techniques alternatives. En effet ces dernières bien que séduisantes n'offrent pas le même recul en terme de connaissance que les techniques traditionnelles.

2 Caractéristiques physicochimiques des RUTP

Il s'agit ici de faire un bilan des principaux contaminants potentiellement présents dans les RUTP ainsi que de leurs origines et modes de transferts.

2.1 Origine des contaminants

2.1.1 L'atmosphère

L'eau de pluie ne tombe pas à l'état pur, en effet la pollution atmosphérique est indispensable à la formation des gouttes de pluie. Sans la présence d'aérosols les gouttelettes d'eau n'atteindraient pas une masse critique pour vaincre l'agitation moléculaire et tomber au sol. De manière naturelle l'eau de pluie est donc impure. Avant l'ère industrielle les causes d'alimentation de l'air en aérosols étaient principalement le volcanisme, les incendies et le vent (Chocat, 1997).

Néanmoins, depuis la révolution industrielle du XIX^e qui s'est accompagné de la combustion massive de matières organiques fossiles, de nombreux polluants sont venus se concentrer dans l'atmosphère. De nos jours les grands émetteurs de polluants sont le transport routier, la transformation d'énergie, le résidentiel/tertiaire/artisanat et l'agriculture. Les polluants les plus présents dans l'atmosphère sont les oxydes d'azote (NO_x), les oxydes de soufre (SO_x), les composés organiques volatiles (COV), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), le monoxyde d'azote (CO), les particules de taille inférieure à 10 µm (PM₁₀), l'ozone (O₃), le plomb (Pb), le benzène, le toluène (AASQA-Rhône-Alpes, 2010). De façon globale, on considère en milieu urbain que les polluants de l'air contribuent à hauteur de 15% à 25% de la pollution présente dans les eaux de ruissellement. Cette proportion peut même être plus forte pour certains polluants comme les éléments traces métalliques (Chocat, 1997).

Tableau 2: évolution et origines des émissions de métaux lourds dans l'air en France métropolitaine durant la période 1990-2010, données (CITEPA, 2012) au format SECTEN

	Tonnage					Répartition en % (en 2010)			
	1990	1995	2000	2005	2010	Energie	Industrie	Résidentiel/ tertiaire	Transport
Arsenic (As)	16	15,8	13,8	9,9	5,9	21	53	26	0
Cadmium (Cd)	20,6	18	14,1	6,2	2,9	14	65	8	13
Chrome (Cr)	390	187	101	41	25	13	53	31	3
Cuivre (Cu)	236	237	232	227	224	1	5	2	92
Mercure (Hg)	24	19,6	11	6,2	4,2	23	72	5	0
Nickel (Ni)	293	235	193	140	64	69	22	5	1
Plomb (Pb)	4258	1434	239	125	83	5	68	18	9
Sélénium (Se)	14,6	14,7	15	14,1	11,6	4	86	10	0
Zinc (Zn)	1999	1184	766	311	239	6	42	20	32

2.1.2 Les surfaces bâties

L'étude présente portant uniquement sur les RUTP, nous n'identifierons uniquement ici que les sources de pollution urbaine. (Chocat, 1997) met en évidence 6 sources principales de pollution générées par les activités urbaines :

Le transport routier : Les véhicules motorisés constituent l'une des sources directes principales pour un grand nombre de polluants. C'est le cas en particulier pour les hydrocarbures, le plomb, le caoutchouc, les oxydes d'azote et de soufre et différents métaux provenant de l'usure des pneus (Zn, Cd, Cu), des garnitures de freins (Cu, Zn, Pb), de la carrosserie et autres pièces métalliques (Pb, Cd), des pots catalytiques (Pt, Pd). (Davis et al., 2001) ont estimé que les garnitures de frein produisent en moyenne par kilomètre 75 µg de cuivre, 3 µg de plomb, 89 µg de zinc et 0,5 µg de cadmium. Les véhicules constituent également une source indirecte de pollution via l'usure des infrastructures routières : ciments et goudrons des chaussées, constituants du marquage au sol (en part. Pb). On peut également signaler les apports de polluants lors de l'entretien hivernal via des fondants chimiques et des sels de déneigement (NaCl, MgCl₂, CaCl₂) (Durand, 2003).

Tableau 3: sources possibles de pollutions dans les eaux de ruissellement de chaussées, d'après (Aryal et al., 2010)

	Freins	Pneus	Carrosserie	Carburant et lubrifiant	Chaussée	Sels de déneigement	Détritus
Cd		X					
Cr		X	X				
Cu	X	X	X				
Fe		X	X				X
Pb			X				
Ni		X	X				
Zn	X	X	X				
Matière organique					X		X
Matière minérale					X	X	X
HAP		X		X	X		

L'industrie : La part de l'industrie dans la pollution des sols urbains est variable. Elle dépend des types d'installations et de leur situation par rapport à la ville. L'origine industrielle est généralement citée pour les métaux (Pb, Zn, Cd), pour certains résidus pétroliers ainsi que pour de nombreux micropolluants organiques (solvants en particulier). Les modes de dissémination des polluants industriels sont également multiples. Les rejets dans l'atmosphère représentent probablement le vecteur principal, c'est également celui pour lequel la réduction a été la plus forte ces dernières années. Plus diffus et plus pernicieux sont les rejets dus à des stockages extérieurs mal protégés, susceptibles de rinçage pendant les précipitations.

Les animaux : les déjections des animaux, qu'ils soient domestiques ou non, constituent une source de matière organique et de contamination bactérienne ou virale.

Les déchets solides : Les déchets solides produits par la ville peuvent contaminer les eaux de ruissellement de différentes manières. La plus évidente est constituée par le rejet direct ou quasiment direct d'ordures ou de produits divers dans les bouches d'égout ou sur les surfaces

urbaines (caniveaux, trottoirs, etc.) Les sources sont multiples : rejets volontaires, poubelles non étanches, nettoyage de places de marché, etc. Les produits ainsi rejetés sont multiples : matières organiques, plastiques, métaux divers, papiers, etc.

Les chantiers et l'érosion des sols : l'érosion des sols en période de temps sec, soit par l'action du vent, soit par l'action mécanique des roues des véhicules, constitue une source importante de MES. Cette pollution est généralement minérale et inerte ; elle peut cependant, dans certains cas contenir des agents actifs (comme du goudron par exemple). Les masses accumulées peuvent être fortement augmentées par la présence de chantiers.

La végétation : La végétation est une source importante de matières carbonées, plus ou moins facilement biodégradable. Elle est également à l'origine indirecte d'apport d'azote et de phosphate (engrais), ainsi que de produits organochlorés (pesticides, herbicides). Les apports de ce type ne sont bien évidemment pas uniquement d'origine urbaine. Cependant la ville et le comportement des usagers sont susceptibles de les augmenter fortement :

- d'une part parce que les doses de produits phytosanitaires utilisées en ville sont extrêmement importantes rapportées à la biomasse végétale ;
- d'autre part parce que l'imperméabilisation des sols provoque l'entraînement direct des débris végétaux lors des pluies alors que dans les zones rurales ou naturelles ces derniers se décomposent le plus souvent à la surface du sol.

2.1.3 Le réseau d'assainissement

Les dépôts dans le système réseau ont été largement étudiés depuis les années 1990. En effet ils jouent un rôle important en tant que source de pollution. Dans le Tableau 4 et le Tableau 5 ci-dessous, on se rend compte que cette pollution peut représenter plus de 20 % de la pollution totale contenue dans les rejets urbains par temps de pluie.

Tableau 4: contribution relative des eaux de ruissellement, des eaux usées et des dépôts en réseau à la pollution des rejets unitaires. d'après (Chebbo, 1992) * il s'agit de la contribution des dépôts pluvieux précédents. En réalité, la masse de dépôts augmente pendant chaque événement pluvieux, ce qui contribue à diminuer la part directe des eaux de ruissellement

	Eau de ruissellement	Eaux usées	Dépôts (*) en réseau
MES	50 %	30 %	20 %
DCO	45 %	35 %	20 %
DBO ₅	25 %	55 %	20 %
Hydrocarbures	50 %	40 %	10 %
Plomb	65 %	10 %	25 %

Tableau 5 : comparaison selon différents auteurs du pourcentage de pollution totale que représentent les dépôts du réseau par rapport aux RUTP

	(Chebbo, 1992)	(Bachoc, 1992)	(Krejci et al., 1994)	(Gromaire, 1998)
Contribution des dépôts en réseau	20 %	30-44 %	59 %	30-80 %

Les premières causes de sédimentation dans les réseaux sont connues pour être des discontinuités, toutes deux hydrauliques et structurelles (Chebbo et al., 1995). Les dépôts dans les canalisations se produisent en général durant les périodes de temps sec et au moment de la décélération du flot quand les eaux pluviales finissent de s'écouler. La propension d'un sédiment à se déposer varie selon la position considérée dans le réseau (c'est-à-dire selon le flot entrant et le type de solide qui s'y trouve) et des caractéristiques physiques du conduit (diamètre, longueur, forme, ...). Le dépôt se fait en fonction du champ d'écoulement, la nature des particules et la concentration en suspension et /ou près du lit (Ashley et al., 1992, 2000). L'importance des effets des flux (qui changent rapidement) pour le transport et le dépôt dans les égouts de grande taille a été observée dans de nombreuses études.

Chocat (1997) fait remarquer que le problème est différent selon que le système d'assainissement est unitaire ou séparatif. Dans le premier cas, les eaux de ruissellement vont se mélanger aux eaux usées et le mélange eaux pluviales-eaux usées va se déverser dans le milieu naturel par les déversoirs d'orage si le débit devient suffisamment fort. Dans le second cas, seules les eaux de ruissellement rejoindront le milieu récepteur. En pratique, du fait du manque de rigueur généralement rencontré dans la séparation des eaux, les réseaux strictement séparatifs sont l'exception (Chocat, 1997).

Dans le cas des réseaux unitaires, deux sources de pollution supplémentaires viennent s'ajouter à celle des eaux de ruissellement :

- les eaux usées s'écoulant pendant la durée de l'événement pluvieux ;
- les dépôts qui se sont constitués dans le réseau pendant la période de temps sec antécédente et qui peuvent être remis en mouvement lors de la pluie.

On peut lire dans un rapport du sénat (Miquel, 2001) que « les polluants métalliques circulent dans les canalisations et se déposent en partie, tout au long du parcours, exactement comme les sédiments au fond d'une rivière. Mais en cas de fortes précipitations, un débordement se produit, une partie des sédiments est remis en suspension et se dépose ailleurs – y compris hors des canalisations – susceptible alors de polluer l'environnement. »

Nous venons de voir que les surfaces urbaines renferment un grand nombre de polluants provenant des activités anthropiques. Voyons maintenant comment ces composés se retrouvent dans les eaux de ruissellement.

2.2 Transfert des polluants

Dès que la quantité d'eau précipitée à la surface du sol dépasse quelques dixièmes de millimètres, le ruissellement commence. Au ruissellement sont associés des phénomènes d'érosion et d'entraînement de particules ainsi mobilisées.

La capacité de la pluie à éroder les sols non revêtus et à mobiliser les polluants accumulés sur les surfaces imperméables semble dépendre de sa granulométrie (taille et énergie cinétique des gouttes) et de son intensité instantanée sur des pas de temps très courts, l'essentiel des particules étant arraché sous l'impact direct des gouttes de pluie.

Seules les particules de faible dimension sont susceptibles d'être entraînées par le ruissellement. Artières (1987) définit le schéma d'aptitude au transport suivant :

- $\emptyset > 2$ mm: particules très peu sollicitées par le ruissellement ;
- $200 \mu\text{m} < \emptyset < 2$ mm: particules difficilement transportées par le ruissellement ;
- $\emptyset < 200 \mu\text{m}$: particules facilement transportées par le ruissellement.

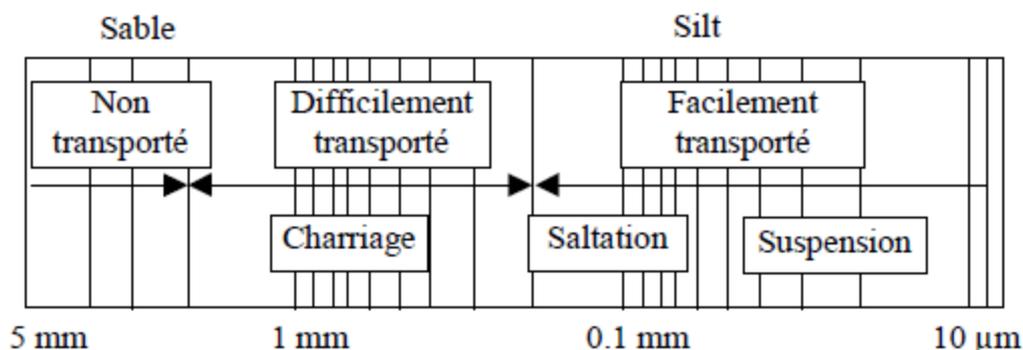


Figure 7: aptitude au transport du sédiment de caniveau (Artieres, 1987)

La capacité de la pluie à entraîner les polluants jusqu'au système souterrain d'assainissement dépend principalement des débits qu'elle est capable de générer, en particulier dans les caniveaux qui contiennent l'essentiel de la pollution déposée pendant la période de temps sec.

Pour résumer, les deux paramètres pluviométriques principaux permettant d'expliquer les flux de polluants (ou du moins ceux qui sont le plus souvent cités) sont la hauteur totale d'eau précipitée pendant la pluie et l'intensité maximale sur une durée courte (la plupart des auteurs retiennent des valeurs de l'ordre de 5 à 6 minutes, qui correspondent à des données habituellement disponibles).

2.3 Composition physicochimique des RUTP

Les grandes familles de polluants le plus souvent présentes dans les rejets urbains de temps de pluie sont ici considérées.

2.3.1 Les nutriments

On regroupe généralement sous le terme de nutriments l'ensemble des rejets en nitrates et en phosphates mais certains auteurs y incluent également les rejets en potassium.

2.3.1.1 Sources et usages

Les rejets de nutriments dans les milieux aquatiques résultent :

- de ruissellements des terrains agricoles amendés ;
- de certains rejets industriels ;
- des rejets d'eaux usées non raccordés au réseau d'assainissement (mauvais branchement) ;
- de l'insuffisance d'épuration des eaux domestiques usées.

Les phosphates ont la propriété de neutraliser l'action du calcaire. Ils sont donc rajoutés aux détergents pour adoucir l'eau et obtenir ainsi un meilleur lavage. Cependant, leur utilisation fait l'objet depuis de nombreuses années d'une polémique entre producteurs de lessives et protecteurs de l'environnement. Pour les usages domestiques de lavage de linge, les

phosphates représentaient encore 20 000 tonnes en 2003 dans les détergents textiles domestiques. Les phosphates ont été remplacés par des zéolithes dont l'effet sur l'environnement est négligeable, mais les phosphates continuent à entrer dans la composition des détergents textiles à usage industriel et dans la composition des détergents pour lave-vaisselle à hauteur de 20 000 tonnes par an au total (source : <http://www.developpement-durable.gouv.fr>).

En France, la présence de nitrates dans les eaux continentales provient à 66 % de l'agriculture, suite à l'épandage de doses massives d'engrais azotés et de lisier (effluents d'élevage), les zones les plus atteintes étant les plaines alluviales qui récoltent les eaux des grands bassins versants et sont des lieux privilégiés d'agriculture intensive. Le reste est issu des rejets des collectivités locales (22 %) et de l'industrie (12 %). L'essentiel de cette pollution est dû à la différence entre les apports en nitrates sous forme d'engrais et ce qui est réellement consommé par les plantes. En France, selon un bilan du ministère de l'Agriculture, cet excédent est passé de 320 000 tonnes en 1995 à 400 000 tonnes en 1997, les régions les plus touchées étant la Bretagne, la Champagne-Ardenne, le Centre et le Poitou-Charentes et l'Île-de-France.

2.3.1.2 Distribution environnementale

En France, les phosphates rejetés dans l'environnement proviennent, à parts sensiblement égales, de sources agricoles (engrais) et industrielles, de déjections humaines et de détergents ou lessives phosphatées. En Europe de l'Ouest, la pollution ponctuelle par les phosphates est estimée à 3,5 grammes par habitant et par jour : 1,2 gramme provient des excréments humains, et le reste surtout des détergents. En matière de pollution diffuse, on estime que 0,5 à 2,5 % du phosphore des engrais utilisés est entraîné par l'eau, lors du lessivage des sols cultivés par les eaux de pluie et de drainage.

Parmi les composés azotés, le nitrate est le plus préoccupant. Les nitrates sont facilement adsorbés sur les sols en raison de leur nature anionique. L'accumulation de nitrates dans les sols contribue à son transfert vers les eaux souterraines. De nombreuses études ont rapporté que les eaux pluviales urbaines sont l'un des principaux contributeurs de contamination en éléments nutritifs des eaux souterraines (Lee et al., 2003; Wakida and Lerner, 2005).

En une trentaine d'années, le taux de nitrates dans les rivières bretonnes a ainsi doublé. Jusqu'aux années 1970, il était de 15 à 20 mg/l en moyenne. En 2001, un tiers des rivières bretonnes avaient un taux de nitrate supérieur à 50 mg/l.

Or, la réglementation européenne impose :

- depuis 1975, pour les eaux superficielles destinées à la consommation humaine, un taux maximum pour les nitrates (50 mg/l pour l'eau destinée à la consommation humaine) et pour un certain nombre d'autres substances² ;
- depuis 1991, aux agriculteurs de mettre en œuvre des actions pour limiter l'apport de nitrates d'origine agricole³ afin que les normes fixées pour les eaux superficielles soient respectées.

² Directive n° 75/440/CEE du 16/06/75 concernant la qualité requise des eaux superficielles destinées à la production d'eau alimentaire dans les Etats membres, abrogée depuis le 22 décembre 2007 par l'article 22 de la Directive n° 2000/60/CE du 23 octobre 2000 (JOCE n° L 327 du 22 décembre 2000)

³ Directive « nitrate » : directive 91/676/CEE du Conseil du 12 décembre 1991 concernant la protection des eaux contre la pollution par les nitrates à partir de sources agricoles

Dans le milieu récepteur en région lyonnaise, moins agricole que la Bretagne, la pollution par les nitrates est généralisée à tous les couloirs fluvio-glaciaires, avec des valeurs qui dépassent localement les valeurs guides de 50 mg/l (Conseil général du Rhône - Service agriculture et environnement, 2009).

Tableau 6: ordre de grandeur en nutriments dans les eaux pluviales, d'après (Pitt et al., 2004), données issues du National Stormwater Quality Database (NSQD). nr = molécule non recherchée

Echantillon	Unité	NH ₃	NO ₂ +NO ₃	N _{tot} (Kjeldahl)	P _{tot}
Résidentiel, USA	mg/l	700	0,32	0,6	0,17
Commercial, USA	mg/l	nr	0,5	0,6	0,11
Industriel, USA	mg/l	nr	0,5	0,73	0,11
Autoroutier, USA	mg/l	1,07	0,28	2	0,25

2.3.1.3 Impacts potentiels sur les milieux aquatiques

Les nutriments sont des éléments nutritifs nécessaires au développement et au maintien des organismes dans le milieu aquatique. Toutefois, la modification de leur stock dans les milieux aquatiques par des rejets d'origines diverses (cf. ci-dessus) engendre des dysfonctionnements d'ordre écologique.

Pour certains auteurs, le phosphore peut jouer le rôle de facteur limitant de la production végétale, tandis que l'azote sous sa forme ammoniacale est plutôt un élément toxique à doses élevées. Il apparaît que, si le choix entre les deux formes d'azote se présente, l'azote ammoniacal est souvent choisi préférentiellement aux nitrates par les macrophytes, l'assimilation de cette forme de l'azote demandant moins d'énergie à la plante (Carbiener et al., 1995).

L'effet écologique des eaux pluviales en milieu urbain sur les communautés benthiques a été rapporté par (Pratt et al., 1981). Ils ont corrélé un haut degré de correspondance entre les sources connues de ruissellement urbain et ont conclu que les perturbations causées sur la communauté benthique étaient dus au ruissellement urbain.

Les phosphates sont les principaux responsables, en France et dans le monde, des phénomènes d'eutrophisation et de dystrophisation. En effet, non toxiques en eux-mêmes pour la vie animale et végétale, ils portent atteinte à l'environnement dès lors qu'ils sont en fortes concentrations : ils deviennent alors de véritables engrais pour les milieux aquatiques qu'ils contribuent à enrichir exagérément en matière organique.

L'azote se dissout aisément dans les systèmes aquatiques et se convertit alors en formes aqueuses : ion nitrate (NO₃⁻), ammonium (NH₄⁺) ou ammoniac (NH₃) et selon le pH, ion nitrite (NO₂⁻). Ce sont ces éléments qui ont le plus grand impact sur les milieux aquatiques car ils sont directement disponibles et assimilables par les organismes simples (Angerville, 2009). Ces apports supplémentaires en nutriments pouvant entraîner des poussées d'eutrophisation qui se caractérisent par des efflorescences de phytoplancton (bloom algal) toxiques ou non qui accaparent l'oxygène. Cette situation d'anoxie peut entraîner une dégradation de la qualité des milieux aquatiques, une chute de la biodiversité et à terme la mort de tous les organismes aquatiques aérobies.

Dans les nappes, les nitrates modifient les conditions chimiques d'oxydo-réduction du milieu et donc la teneur en certains autres éléments en solution. Il se pourrait aussi que l'écologie de ces milieux souterrains soit affectée (bactéries, micro-invertébrés souterrains vivant dans les nappes) mais ceci a été peu étudié jusqu'ici (Miquel, 2003).

2.3.2 Eléments traces métalliques

2.3.2.1 Sources et usages

La locution « métaux lourds » est un terme scientifiquement ambigu. Généralement, on regroupe sous ce terme l'ensemble des métaux de masse volumique supérieur à 6g/cm^3 . Néanmoins, la littérature emploie fréquemment ce terme pour désigner de manière générale un oligoélément toxique qui a une origine anthropique. Certains métaux toxiques ne sont pas particulièrement « lourds » (par exemple le zinc), tandis que certains éléments toxiques ne sont pas des métaux (c'est le cas de l'arsenic qui est un métalloïde). Ce terme générique désigne donc indistinctement des métaux et métalloïdes réputés toxiques. Pour ces différentes raisons, l'appellation « éléments traces métalliques » -ETM- ou par extension « éléments traces » est préférable à celle de métaux lourds (Rollin and Quiot, 2006).

Les ETM les plus préoccupants (à cause de leur toxicité et des volumes émis) sont les suivants : As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se, Zn (Rollin and Quiot, 2006). Nous ne détaillons pas les sources spécifiques de ces composés. Le lecteur en quête d'informations complémentaires pourra se référer aux travaux de thèse de (Bressy, 2010) ou de (Durand, 2003).

2.3.2.2 Distribution environnementale

De par leurs émissions intensives dans l'environnement urbain, les ETM sont les substances les plus répandues dans les RUTP et dans les dépôts présents dans le réseau. Ces polluants sont bien connus et la littérature est riche en études concernant leur présence et leur impact potentiel (Davis et al., 2001; Aryal et al., 2010; Bressy, 2010).

Le tableau ci-après compile les concentrations moyennes en métaux retrouvés dans des eaux de ruissellement routières dans la littérature selon le lieu de prélèvement (colonne de gauche).

Tableau 7: ordre de grandeur de quelques métaux dans les eaux pluviales, nr = élément non recherché

Echantillon	Unité	Cd	Cu	Zn	Pb	Références
Urbain, Paris	µg/l	nr	nr	320 - 620	200-400	(Ranchet et al., 1993)
Urbain, Allemagne	µg/l	13	184	954	525	(Xanthopoulos and Hahn, 1993)
Parking, Bordeaux	µg/l	nr	nr	nr	7-170	(Balades et al., 1994)
Urbain (site-a), Paris	µg/l	nr	nr	1300	457	(Constant, 1995)
Urbain (site-b), Paris	µg/l	nr	nr	900	535	
Voirie commerciale et passante, USA	µg/l	nr	43 -320	460 - 15200	31 -97	(Sansalone and Buchberger, 1997)
Urbain, Paris	µg/l	0,3-1,8	27-191	246-3839	71-523	(Gromaire et al., 1999)
Urbain et autoroutier, Australie	µg/l	nr	30-340	15-1850	80-620	(Drapper et al., 2000)
Autoroutier, Nantes	µg/l	nr	11 - 146	100 - 1500	14-190	(Legret, 2001)
Urbain, Paris	µg/l	0,2-1	37-103	327-1661	98-268	(Gromaire et al., 2001)
Autoroutier, Suisse	µg/l	4,5	150	500	300	(Boller, 2004)
Autoroutier, Base NSQD, USA	µg/l	1	34	200	25	(Pitt et al., 2004)
Urbain, Italie	µg/l	nr	0,1-53,3	27,7-123,4	6,1-23,3	(Gnecco et al., 2004)
Urbain, Nantes	µg/l	nr	16 -23	66 - 350	2,3 - 18	(Lamprea-Maldonado, 2009)

2.3.2.3 Impacts potentiels sur les milieux aquatiques

Les ETM sont présents de façon naturelle dans l'environnement, certains atomes étant indispensables pour le métabolisme des organismes. Ces composés deviennent polluants

lorsqu'ils entraînent un effet délétère pour les écosystèmes, c'est-à-dire lorsque leur concentration dans le milieu passe au-dessus d'un certain seuil. Les activités anthropiques engendrent un apport massif de micropolluants dans le milieu (cf. ci-dessus).

Les milieux aquatiques sont très sensibles aux éléments traces par la coexistence de deux phénomènes : la bioaccumulation⁴ et la biomagnification⁵.

Entre 1994 et 1996 un suivi de la contamination métallique des poissons a été établi par l'Agence de l'Eau Artois Picardie : les concentrations maximales ont été relevées pour le zinc sur le canal de Roubaix (38,8 mg/kg) et pour le cuivre sur la Sensée (1,64 mg/kg).

2.3.3 Pesticides

2.3.3.1 Sources et usages

Le mot pesticide est un terme récent emprunté à la langue anglaise. C'est un terme générique qui englobe les produits phytopharmaceutiques et les produits biocides.

Les produits phytopharmaceutiques (ou phytosanitaires) sont les produits utilisés en milieu végétal (agricole et non agricole) pour la prévention, le contrôle ou l'élimination d'organismes vivants jugés indésirables. Il en existe trois catégories :

- les herbicides, pour lutter contre les mauvaises herbes ;
- les fongicides, pour lutter contre les champignons et moisissures ;
- les insecticides, pour lutter contre les insectes.

Les produits biocides sont les produits destinés à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles dans les secteurs non agricoles concernant par exemple la conservation du bois, la désinfection d'objets et surfaces en milieu hospitalier et certains usages domestiques.

Il convient de distinguer substances actives (molécules qui produisent l'effet recherché) des préparations commerciales que sont les produits phytopharmaceutiques et les biocides (exemple du Roundup®). L'agriculture française utilise environ 500 substances actives qui entrent dans la composition de plus de 1000 produits commercialisés.

Dans le cadre des suivis sanitaires ou environnementaux, le mot générique «pesticide» est utilisé pour les résidus qui sont retrouvés, indépendamment de leurs usages initiaux.

En 2008, sur les 78 600 tonnes de pesticides vendus, 10 % ont été utilisés pour des usages non agricoles (entretien des infrastructures routières et ferroviaires, des espaces verts, des trottoirs, jardinage, traitement des locaux,...). Ce sont ces usages qui entraînent une contamination des eaux pluviales urbaines et qui s'ajoutent aux pesticides d'origine agricole dans les zones périurbaines.

⁴ La bioaccumulation est définie comme le bilan de l'accumulation, la distribution et l'élimination de la substance dans un organisme exposé (air, eau, sol et nourriture). Le facteur de bioconcentration (BCF) équivaut au rapport de la concentration de la substance chimique mesurée dans l'organisme et sa concentration dans l'eau à l'état d'équilibre. Lorsque les constantes de cinétique d'accumulation et de dépuración sont disponibles, le BCF peut également être calculé à partir du rapport de ces deux constantes (Tissier et al., 2005).

⁵ La biomagnification est l'accumulation et le transfert de produits chimiques par la chaîne alimentaire (eau → plancton → poisson herbivore → poisson carnivore → homme...) via l'ingestion de nourriture contaminée, résultant en une augmentation de la concentration interne de la substance d'autant plus forte que l'organisme est à un niveau élevé de la chaîne trophique (Tissier et al., 2005).

On peut classer les substances actives les plus utilisées en 6 grandes catégories (en gras les substances présentes dans l'annexe X de la DCE, d'après : <http://www.era-orleans.org/AFIP/FR/Index.html>, Université d'Orléans - UPR3021 CNRS ICARE) :

Les triazines : Cette famille couvre un grand champ d'utilisation. La plupart sont utilisés comme herbicides sélectifs. Ils peuvent être utilisés seuls ou combinés avec d'autres composés afin d'augmenter leur efficacité. Ce sont des inhibiteurs de la photosynthèse. Ils agissent spécifiquement sur le photosystème II (site A). Les triazines comptent parmi les plus anciens herbicides, les recherches sur ces composés ayant commencé dans les années 50. On retrouve dans cette catégorie des molécules comme l'**atrazine**, la cynazine, le prometon, la prometryn et la **simazine**).

Les organochlorés : Cette famille comprend un grand nombre de composés chimiques contenant du chlore et sont associés généralement à d'autres éléments. Ils font partie des insecticides les plus puissants et les plus efficaces. On trouve dans cette famille l'Aldrine, Endrine, Dieldrine, Isodrine, DDT, **alpha Endosulfan**, **Endosulfan** ou en encore le **pentachlorophenol**. Ils sont très persistants dans les sols, et se concentrent également dans les tissus biologiques. Beaucoup de composés de cette famille sont interdits en raison de leur neurotoxicité.

Les organophosphorés : Ces composés constituent une famille d'insecticides agissant sur l'enzyme acétylcholinestérase. Ils opèrent en bloquant irréversiblement l'acétylcholinestérase, essentielle aux transferts nerveux chez les insectes, les humains, ainsi que chez la plupart des animaux. Les composés organophosphorés sont rapidement dégradés par le rayonnement solaire, dans l'air, et dans les sols, bien que de petites quantités puissent subsister et se retrouver dans la nourriture et l'eau. Le fait qu'ils se dégradent facilement fait de cette famille une alternative intéressante aux pesticides organochlorés persistants. Cependant, bien que les organophosphorés se dégradent plus rapidement, ils sont plus toxiques (en part. à cause de leur produit de dégradation), ce qui représente un risque pour les utilisateurs de ces composés. Les composés organophosphorés les plus courants sont le parathion, le malathion, le methylparathion, le **chlorofenviphos**, le **chlorpyrifos**, le diazinon et le dichlorvos.

Les acétamides/amides : Les acétamides constituent une classe d'herbicides fréquemment utilisée en usage agricole (environ 700 t/an), principalement pour le désherbage du maïs. Les principaux composés appartenant à cette famille sont : l'acétochlore, l'**alachlore**, le dimethenamide, le flufenacet et le metolachlore. Ces substances sont très peu adsorbées par les matières en suspension et le sédiment. L'alachlore par exemple se retrouvera donc principalement en solution. Bien que les données de dégradation soient peu nombreuses et contrastées (Tissier et al., 2005), il semble que l'alachlore soit peu biodégradable (demi-vie de dégradation estimée à 23 jours en eau de rivière).

Les urées substituées : Ils inhibent la photosynthèse en agissant spécifiquement sur le photosystème II (site A). Ces herbicides sont utilisés pour un usage agricole mais également urbain/domestique en tant que défanant-débroussaillant pour le traitement des allées de parc, jardin et trottoir. On trouve dans cette catégorie des molécules comme le **Diuron**, l'**Isoproturon**, le linuron, le metobromuron, le monolinuron, le siduron et le tebuthiuron.

Les dinitroanilines : Ce sont des inhibiteurs de la formation des microtubules. Ils sont utilisés en tant qu'herbicide pour les dicotylédones et graminées lors de la culture de colza, soja, tournesol, choux, arbres et arbustes d'ornement et des plantes à parfum, aromatiques et médicinales (INERIS, 2007). On peut citer la **Trifluraline**, le pendimethaline et l'ethalfluraline.

2.3.3.2 Distribution Environnementale

Les rejets sont générés par trois principaux types d'acteurs : les agriculteurs, les particuliers et les services techniques (espaces verts publics, voiries et voies ferrées). Les rejets sont donc multiples et répartis sur l'ensemble du territoire national. Selon (Miquel, 2003) il est vraisemblable que les utilisateurs urbains (particuliers et services techniques) surdosent les épandages de pesticides. La plus forte présence de surfaces imperméables en milieu urbain, ainsi que l'importance du drainage direct sans infiltration dans le sol accroît le risque de ruissellement des pesticides.

Après applications, les pesticides arrivent sur les sols où ils sont soumis à un ensemble de mécanismes conditionnant leur devenir et leur dispersion vers les autres compartiments de l'environnement. Ces processus peuvent être biologiques ou abiotiques et concernent leur transformation (métabolisme par les microorganismes, photolyse, catalyse...), leur rétention (absorption par les végétaux ou la microflore du sol, et d'un certains nombres de processus physico-chimiques conduisant à la création de liaisons, plus ou moins réversibles, entre le pesticides et les constituants du sol) et leur transport (par les végétaux ou par la flore, par lixiviation, lessivage ou ruissellement ce qui pourra conduire à la contamination des eaux de drainage, des eaux de surfaces ou des nappes phréatiques), informations tirées de l'observatoire des résidus de pesticides (<http://www.observatoire-pesticides.gouv.fr/>).

Le service statistique du ministère de l'Ecologie et du Développement durable (anciennement Institut Français de l'Environnement) réalise depuis 1998 une synthèse annuelle des données concernant la contamination des eaux par les pesticides, grâce aux actions de contrôle et de surveillance réalisées par les services de l'Etat, les organismes publics et les collectivités locales.

En 2010, des pesticides ont été détectés au moins une fois dans 91 % des 2340 points de mesure de la qualité des cours d'eau. Plus de 20 pesticides différents sont décelés sur 13 % des points de mesure, principalement situés en métropole : dans le bassin parisien, en amont du Rhône et dans le nord de la France. Dans les eaux souterraines, des pesticides ont été décelés en 2010 sur 63 % des points de mesure en France métropolitaine (1878 points). Les points avec plus de 5 pesticides se situent principalement en Martinique, au nord-est du bassin parisien, dans le couloir rhodanien, et secondairement, au sud de Poitou-Charentes. Les teneurs mesurées sont parfois très faibles et ont dans ces cas peu d'incidence sur la qualité des eaux. Cependant, ces mesures démontrent de manière claire une dispersion très importante des pesticides et une présence généralisée dans les milieux aquatiques.

Tableau 8: ordre de grandeur de quelques pesticides retrouvés dans les eaux pluviales en milieu urbain, valeurs minimales et maximales

Echantillon	Unité	Glyphosate	AMPA	Diuron	Métaldéhyde	Isoproturon	Référence
Zone urbaine dense, Paris	µg/l	< - 1,92	< - 1,47	0,03 – 1,75	< - 0,58	< - 0,14	(Zgheib, 2009)
	µg/l	0,11-0,58	0,14-0,2	0,04-0,08	0,29-0,38	0,05	(Bressy, 2010)

2.3.3.3 *Impacts potentiels sur les milieux aquatiques*

C'est le manque de sélectivité des pesticides vis-à-vis de leur cible qui provoque la plupart des effets nocifs pour l'environnement. Les animaux absorbent les pesticides via la nourriture ou l'eau d'alimentation, via l'air respiré ou au travers de leur peau ou de leur cuticule. Ayant franchi diverses barrières, le toxique peut rester stocker sans produire d'effet ou atteindre des sites spécifiques du métabolisme (Van der Werf, 1996).

Des études ont été menées pour quantifier l'impact de différents pesticides sur les espèces aquatiques. Ceux-ci peuvent provoquer des dégâts importants dans la faune aquatique, les mortalités de poissons étant les plus spectaculaires. (Pimentel et al., 1993) estiment qu'entre 1977 et 1987, aux États-Unis, 6 à 14 millions de poissons sont morts, chaque année, à cause des pesticides.

Les bioessais de toxicité aquatique menées sur les algues (Stachowski-haberkorn et al., 2008), les crustacés (daphnies) (Villarroel et al., 2003) et les poissons (Palma et al., 2008), mettent en évidence une toxicité importante des molécules testées, même à des concentrations proches des valeurs seuils fixées par les normes de qualité environnementale. De nombreux organismes nationaux et internationaux procèdent à l'évaluation de la toxicité des pesticides ou synthétisent l'information disponible (études expérimentales et épidémiologiques) sous forme de monographies. On dispose ainsi de données sur la toxicité aquatique pour la plupart des matières actives. On peut citer ainsi les bases de données suivantes:

- AGRITOX (gérée par l'ANSES)
- IRIS (gérée par l'USEPA)
- e-phy (gérée par le ministère de l'Agriculture)

2.3.4 Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

C'est un vaste groupe de chaînes polycarbonnées, allant des hydrocarbures aliphatiques simples aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ces derniers sont majoritaires dans les RUTP. Ce sont des composés organiques constitués presque uniquement d'atomes de carbone et d'hydrogène et comportant au minimum deux noyaux benzéniques fusionnés. Il existe plus de 100 HAP différents et ceux-ci se rencontrent comme mélanges complexes de plusieurs identités et non comme composés isolés. Le plus simple des HAP est le naphthalène (deux cycles) et le plus complexe est le coronène (sept cycles).

2.3.4.1 *Sources et usages*

Les HAP sont formés durant la pyrolyse ou la combustion incomplète de charbon, de produits pétroliers (essence, diesel, kérosène, asphalte, brai de goudron...), de gaz, de bois, d'ordures ménagères ou d'autres substances organiques comme le tabac, la viande cuite au barbecue... Ils peuvent donc provenir de sources naturelles et d'activités anthropiques. Les HAP se trouve principalement dans le goudron, la créosote et d'autres produits similaires utilisés comme biocides pour protéger et préserver des matériaux (bois notamment). Ils sont également présents dans des huiles de dilution utilisées pour la production de pneumatiques. Des composés HAP sont également inclus dans l'asphalte et dans de nombreux autres dérivés de combustibles fossiles. En ville, la première source d'émission d'HAP est logiquement la circulation automobile avec sa combustion de matière organique fossile. Les HAP se retrouvent dans les eaux de ruissellement par lessivage des surfaces anthropisées (cf. partie.2.2).

2.3.4.2 Distribution Environnementale

La solubilité des HAP dans l'eau est de très faible à modérée pour les HAP dits « lourds ». Les HAP sont fortement adsorbés sur les sédiments avec des Koc⁶ de l'ordre de $6 \cdot 10^6$. De nombreuses recherches ont étudié le comportement des HAP dans les eaux pluviales (par exemple (Hwang and Foster, 2006)). Elles ont montré que le pourcentage de HAP totaux liés aux particules variait de 70 à 95 %. De plus, les HAP s'adsorbent préférentiellement sur des particules de petite taille, de l'ordre de 100 μm .

Thorton *et al.* (2001) ont mesuré des concentrations en HAP, liées à la circulation automobile, dans des eaux de ruissellement urbaines, de l'ordre de 2 à 3 mg/l. Ils ont également cherché à estimer les teneurs en HAP dans les eaux d'assainissement urbaines. Ils donnent pour la France des teneurs de l'ordre de 0,05 à 0,44 $\mu\text{g/l}$ pour les eaux en entrée de station et de 0,02 à 0,09 $\mu\text{g/l}$ pour les eaux en sortie. D'autres auteurs ont étudié les concentrations en HAP dans plusieurs stations d'épuration des eaux de la région parisienne entre 1998 et 1999. La présence de HAP semble être majoritairement due aux ruissellements d'eaux urbaines (elles-mêmes chargées en HAP suite aux dépôts polluants des véhicules sur la chaussée) plutôt qu'aux dépôts atmosphériques (Blanchard *et al.*, 2001). Le Tableau 9 rassemble quelques résultats d'études sur les HAP dans les eaux de ruissellement.

Tableau 9: ordre de grandeur de la contamination en HAP des eaux pluviales selon le site de prélèvement

Echantillon	Unité	HAP	Références
Urbain, Allemagne	$\mu\text{g/l}$	2-15	(Xanthopoulos and Hahn, 1993)
Résidentiel, Suisse	$\mu\text{g/l}$	0,59 - 5	(Rossi, 1998)
Urbain dense, Columbia, USA	$\mu\text{g/l}$	0,4 - 16	(Ngabe <i>et al.</i> , 2000)
Urbain, Pologne	$\mu\text{g/l}$	1,5 - 2,7	(Gryniewicz, 2003)
Rue, USA	$\mu\text{g/l}$	0,03 - 7,8	(Stein <i>et al.</i> , 2006)
Périurbain et urbain, USA	$\mu\text{g/l}$	1,5 - 12,5	(Hwang and Foster, 2006) (Σ 35 HAP)
Urbain, Le Havre	$\mu\text{g/l}$	0,2 - 16	(Motelay-Massei <i>et al.</i> , 2006)
Urbain, Nantes	$\mu\text{g/l}$	0,16 – 20	(Lamprea-Maldonado, 2009)
Urbain, Paris	$\mu\text{g/l}$	0,88 - 6,5	(Zgheib, 2009)
Urbain, Paris	$\mu\text{g/l}$	3,3 - 40	(Bressy, 2010)

2.3.4.3 Impacts potentiels sur les milieux aquatiques

Ces composés présentent un large spectre de réponses toxicologiques, incluant immunotoxicité, reprotoxicité, perturbation des systèmes endocriniens, génotoxicité et cancérogénicité chez la faune aquatique et chez l'Homme (Daouk, 2011).

En raison de leur caractère lipophile, les HAP s'accumulent dans les organismes vivants, préférentiellement dans les tissus lipidiques. La plupart des organismes ont la capacité de métaboliser les HAP par action de l'enzyme cytochrome P450 (Varanasi, 1991; Luch *et al.*, 2002). Les HAP deviennent toxiques principalement lorsque les métabolites hydrophiles se fixent sur les structures cellulaires (protéines, ADN). La modification de l'ADN induit alors des effets cancérigènes et mutagènes (Baird *et al.*, 2002). D'autre part, les HAP sont photodégradables, ce qui peut aussi induire une phototoxicité (Gourlay, 2004).

⁶ C'est le coefficient de partage entre le carbone organique du sol et l'eau (L.kg^{-1}). C'est le rapport entre la quantité absorbée d'un composé par unité de poids de carbone organique du sol et la concentration de ce même composé en solution aqueuse à l'équilibre. Plus le coefficient Koc est grand, plus la substance est « liée » aux particules et moins il a tendance à se trouver dissout dans l'eau, source Ineris (http://www.ineris.fr/siris-pesticides/bdd_siris_pesticides)

2.3.5 Alkylphénols

Les alkylphénols (AP) sont des substances chimiques non-halogénées fabriquées presque exclusivement pour produire des éthoxylates d'alkylphénol (APE), une famille de surfactants non-anioniques. Les APE les plus largement utilisés sont les éthoxylates de nonylphénol (NPE) et, dans une moindre mesure, les éthoxylates d'octylphénol (OPE). Dans l'environnement, les APE se dégradent en AP, lesquels sont persistants, bioaccumulables et toxiques pour la vie aquatique.

2.3.5.1 Sources et usages

Les NPE sont utilisés comme surfactants, émulsifiants, dispersants et/ou agents mouillants dans une grande variété d'applications commerciales et industrielles. Des 77 000 tonnes utilisées en Europe de l'ouest, la plus grande part (presque 30 %) était incorporée dans des produits de nettoyage industriels ou à destination des collectivités (détergents) ; d'autres usages étaient également significatifs : émulsifiants (11 %), finition des textiles (10 %), finition du cuir (7 %), ingrédients de pesticides et autres produits agricoles (6 %), peintures à l'eau (5 %) (OSPAR Commission, 2001). De plus, la littérature indique qu'une proportion substantielle (16 % soit plus de 12 000 tonnes) était utilisée dans plusieurs autres « niches commerciales » (ingrédients de cosmétiques, de shampoings, et autres produits de soin corporel) ou ne faisait l'objet d'aucune affectation connue. Dans cette dernière catégorie, se classeraient les usages comme ingrédients de colles et de mastics, mais les informations sont très limitées. La documentation mentionne également l'usage de dérivés de NP comme antioxydants de certains plastiques (Guenther et al., 2002).

La littérature indique également pour les OPE une gamme similaire d'usages que pour les NPE, bien que très peu d'informations fiables soient disponibles pour ce groupe (OSPAR Commission, 2001). Pour les deux groupes, on trouve peu de documentation permettant d'évaluer dans quelle mesure ces usages ont pu évoluer au cours des dernières années.

2.3.5.2 Distribution Environnementale

Les APE et les AP (particulièrement le nonylphénol et ses dérivés) sont distribués largement dans les eaux douces et marines et, en particulier, dans les sédiments où ces composés persistants s'accumulent. Du fait de leurs rejets dans les eaux usées, les APE et les AP sont des composants communs des boues d'épuration des eaux, y compris celles épandues dans les champs. Les niveaux de contamination de la faune ont fait l'objet de peu de recherches, même si la littérature cite des niveaux significatifs détectés dans des poissons et des oiseaux aquatiques en aval des sites de production d'APE ou d'installations les utilisant. Le NP comme l'OP sont connus pour s'accumuler dans les tissus des poissons et d'autres organismes vivants, et suivre un processus de biomagnification dans la chaîne alimentaire. (OSPAR Commission, 2001).

Des travaux récents ont montré l'omniprésence du NP dans toute une variété d'aliments en Allemagne (Guenther et al., 2002), mais les conséquences de cette exposition pour l'homme restent encore à évaluer. La portée et les conséquences de l'exposition directe provoquée par leur usage dans les produits de consommation n'ont pas non plus été beaucoup étudiées, bien qu'un rapport récent fasse état de la présence de résidus de NP et d'OP dans des poussières domestiques (Butte and Heinzow, 2002).

Tableau 10: ordre de grandeur en nonylphénol (NP) et en octylphénol (OP) dans les eaux pluviales, nr = composé non recherché

Echantillon	Unité	NP	OP	Références
Urbain dense Paris	µg/l	1,5 - 1,9	0,11 - 0,21	(Bressy, 2010)
Urbain, résidentiel, Suède	µg/	0,1 - 1,2	nr	(Björklund et al., 2009)
Urbain dense Paris	µg/	1,6 - 9,2	0,11 - 0,26	(Zgheib, 2009)
Urbain et industriel, Chine	µg/	0,86 - 7,38	nr	(Kueh and Lam, 2008)
Aéroport, USA	µg/	0,98 - 7,7	nr	(Corsi et al., 2006)
Industriel, Angleterre	µg/	1,7 - 4,9	nr	(Rule et al., 2006)

2.3.5.3 Impacts potentiels sur les milieux aquatiques

Les principaux dangers associés aux APE proviennent de leur dégradation partielle en éthoxylates à chaînes plus courtes et le retour à la forme AP elle-même, c'est-à-dire le NP et l'OP qui sont tous deux toxiques pour les organismes aquatiques. L'évaluation des risques effectuée par l'UE pour le nonylphénol a associé aux usages courants des NPE des risques significatifs pour l'environnement aquatique, les sols et pour les organismes supérieurs par empoisonnement secondaire (c'est à dire résultant de l'accumulation du NP dans la chaîne alimentaire), (OSPAR Commission, 2001). En considération de l'exposition humaine provoquée par l'usage des NPE dans les produits de consommation, le Comité Scientifique de l'Union Européenne sur la Toxicité, l'Ecotoxicité et l'Environnement a conclu que « le manque sérieux de données mesurées pour le NP en relation avec la production et l'utilisation de ce composé et de ces dérivés rend l'évaluation des expositions professionnelles et domestiques incertaines » (CSTEE, 2001).

Le danger associé aux AP (NP et OP) le plus largement reconnu réside indubitablement dans leur activité oestrogénique, c'est à dire leur capacité à imiter les hormones œstrogènes naturelles. Cette activité peut altérer le développement sexuel de plusieurs organismes vivants, et provoquer notamment la féminisation des poissons (Jobling et al., 1995, 1996), un facteur suspecté d'avoir contribué de façon importante aux modifications massives du développement sexuel des poissons dans les rivières britanniques (Jobling et al., 2002). D'autres travaux ont décrit les effets directs du NP sur la structure et les fonctions de l'ADN dans la larve de bernacle, un mécanisme qui pourrait être responsable des effets de perturbations hormonales observés dans l'ensemble des organismes vivants (Atienzar and Depledge, 2002).

2.4 Composition bactériologique des RUTP

Les rejets urbains de temps de pluie véhiculent une pollution bactériologique importante, qui exige un traitement approprié dans toutes les zones de baignade, de loisirs nautiques et de conchyliculture. Les rejets des déversoirs d'orage sont responsables d'une pollution bactériologique importante car ils proviennent de réseaux unitaires (Aalderink et al., 1990), et leur impact sur le milieu récepteur peut durer plusieurs jours (Burm, 1967). Dans les réseaux pluviaux séparatifs, les sources de contamination sont les déjections des animaux à sang chaud, et notamment les animaux de compagnie (Geldreich et al., 1968; Geldreich and Kenner, 1969; Olivieri et al., 1989; Hart and Waller, 1993). Les autres sources de contamination sont les mauvais branchements d'eaux usées, la reprise des dépôts des avaloirs, les solides des chaussées et les débris végétaux. En réseaux unitaires, ces sources externes s'ajoutent bien évidemment à la pollution bactériologique des eaux usées (Bertrand-Krajewski, 2006).

Un bilan réalisé sur la période 2003-2007 de la contamination des eaux en bactéries à l'échelle de la région parisienne a mis en évidence un enrichissement global selon un gradient amont-aval autour de l'agglomération. Cet enrichissement plus marqué en période de pluie peut être rapproché d'une contamination par des RUTP (Gonçalves et al., 2009). Aussi l'existence d'un risque sanitaire doit être prise en considération par les gestionnaires des espaces urbains. Des microorganismes tels que *E. Coli*, *P. Aeruginosa*, des entérocoques intestinaux ou encore des salmonelles, ont été identifiés dans différents bassins de rétention d'eaux pluviales urbaines (Cournoyer and Perrodin, 2009).

Tableau 11: ordres de grandeur de la pollution bactériologique des rejets urbains de temps de pluie (en nombre de cellules pour 100 ml), d'après (Bertrand-Krajewski, 2006)

Type de réseau	Coliformes totaux	Coliformes fécaux	Streptocoques fécaux
Réseaux séparatifs	10^4 à 10^7	10^3 à 10^6	10^2 à 10^5
Réseaux unitaires	10^5 à 10^8	10^4 à 10^6	10^3 à 10^6

Résumé du chapitre2

Les eaux pluviales se chargent de polluants dès leur formation dans l'atmosphère puis, au fur et à mesure de leur parcours, sur les surfaces urbaines et dans le réseau d'assainissement. Lorsqu'elles regagnent le milieu naturel, elles contiennent l'ensemble des molécules utilisées et émises par la ville moderne et le bassin versant drainé. Les rejets urbains de temps de pluie représentent une menace pour les écosystèmes aquatiques, qu'ils soient d'eau douce ou marins, de surface ou souterrains. Les volumes sont tels et la pollution souvent importante qu'ils entraînent des dégradations à la fois physiques et physicochimiques ; c'est pour cela que les RUTP sont étudiés de près par les équipes de recherche.

Les nombreux travaux menés sur cette thématique ont donc montré la grande variabilité de ces rejets, en termes de qualité et de quantité. Cette variabilité est de plus spatiale et temporelle, mettant en lumière les difficultés pour anticiper ce type de pollution et le besoin d'outils de suivi de la contamination.

3 Impact écologique des RUTP sur les écosystèmes aquatiques

Les dégradations et les conséquences qui suivent le déversement de RUTP se manifestent conjointement à l'évènement pluvial et de manière marquée (on parle alors d'effet de choc) mais d'autres effets, beaucoup plus pernicioseux, se manifestent sur des durées beaucoup plus importantes (on parle alors d'effets différés). Ce sont ces dégradations et les impacts engendrés par les RUTP sur les grandes catégories de masses d'eaux inventoriées dans la DCE que nous allons nous attacher à présenter dans ce chapitre.

3.1 La notion d'impact

Les études réalisées ces vingt dernières années convergent vers la constatation commune selon laquelle la caractérisation des RUTP n'est pas suffisante pour prévoir de façon fiable leurs impacts sur la fonctionnalité des écosystèmes (Seager and Maltby, 1989; Desbordes and Hémain, 1990; Borchardt and Sperling, 1997; Parent-Raoult and Boisson, 2007). Elle ne prend en compte ni les effets synergiques des rejets sur les organismes aquatiques, ni les phénomènes de rémanence des polluants ou de bioaccumulation dans les réseaux trophiques, et apporte peu d'informations sur la compréhension écologique des mécanismes en jeu (Walsh, 2000). La simple caractérisation des rejets est de plus en plus adaptée à l'étude de la pollution pluviale, compte tenu du caractère intermittent des rejets pouvant engendrer des effets cumulatifs à moyen et long terme. Ainsi la nécessité d'étudier l'impact sur le compartiment biologique a été clairement établie (Ellis et Hvitved-Jacobsen, 1996) avec la prise en compte particulière de l'intégration des processus écologiques dans l'évaluation du risque (Admiraal et al., 2000; Ellis, 2000). Peu de travaux ont toutefois été réalisés dans ce sens (Parent-Raoult and Boisson, 2007). Les études recensées concernent les milieux d'eaux courantes, lacustres et marines, les aquifères ainsi que des milieux artificiels comme les lagunes côtières et les bassins de rétention / infiltration. Elles proposent trois approches méthodologiques différentes : études de laboratoire, de terrain ou une combinaison des deux. Les études en laboratoire consistent à observer, dans certaines conditions (bioessais, tests d'écotoxicité, expérimentations en canaux artificiels), la réponse d'un ou plusieurs organismes exposés à un rejet urbain de temps de pluie synthétique ou prélevé sur le terrain (*whole effluent toxicity testing*). Les études de terrain examinent généralement la réponse des communautés en place et permettent d'intégrer la complexité des systèmes naturels. Actuellement la mise en place de systèmes de surveillance (biocapteurs) sur des sites spécifiques pourrait permettre de suivre l'évolution de certains phénomènes biologiques; ceci pourrait constituer un outil d'aide à la compréhension de certains phénomènes (Durrieu et al., 2006).

Nous proposons ici de présenter les travaux réalisés à ce jour sur l'impact écologique des RUTP en fonction des typologies de masses d'eau.

3.2 La notion de masse d'eau

La DCE définit le concept de « masse d'eau » comme « unité hydrographique (eau de surface) ou hydrogéologique (eau souterraine) cohérente, présentant des caractéristiques assez homogènes et pour laquelle, on peut définir un même objectif ». La masse d'eau constitue ainsi

l'unité spatiale d'évaluation de l'état écologique et chimique d'un écosystème. L'atteinte, ou non, des objectifs de la directive sera appréciée à cette échelle de la masse d'eau. Les programmes de gestion seront élaborés à l'échelle de groupes de masses d'eau, dans la logique de l'approche intégrée par bassin versant. Ainsi, une masse d'eau présente un caractère homogène sur le plan de la géologie, de la morphologie, du régime hydrologique, de la topographie et de la salinité.

3.3 Impact sur les masses d'eau

3.3.1 Impact sur les cours d'eau

Du fait qu'ils reçoivent les déversoirs d'orage, ce sont les cours d'eau qui ont donné lieu au plus grand nombre d'études concernant l'impact des RUTP. Les atteintes engendrées restent malgré tout particulièrement difficiles à évaluer du fait que ces écosystèmes subissent déjà hors perturbation de grandes variabilités temporelles et spatiales. En effet, après une forte crue ou un étiage sévère, la composante physico-chimique connaît d'importantes dilutions ou concentrations et la population animale et végétale, pourra, pour un temps relativement long, ne comporter qu'une fraction de sa densité normale. De manière générale, l'impact des rejets sur les cours d'eau se fait par comparaison entre l'amont et l'aval du ou des points de rejet; de façon plus globale, c'est quelquefois la dégradation amont-aval par rapport à la zone urbanisée qui sera considérée.

3.3.1.1 Effet sur la composante physico-chimique

Les RUTP exercent sur les composantes physiques et chimiques des cours d'eau des modifications à la fois immédiates et différées (Parent-Raoult and Boisson, 2007).

Les effets immédiats des RUTP sont nombreux (Burton et al., 2000). Ils provoquent un changement souvent brutal du régime hydraulique entraînant des effets érosifs sur les berges ainsi que la remise en suspension des sédiments. De plus, les RUTP contribuent à de nombreux apports tels que :

- des matières en suspension qui augmentent la turbidité du milieu (Gupta and Saul, 1996; Seidl et al., 1998) ;
- d'eaux fortement ou totalement désoxygénées, entraînant une chute immédiate du taux d'oxygène dissous (Hvitved-Jacobsen, 1982; Even et al., 2004) ;
- de matières organiques biodégradables, qu'elles soient sous forme dissoute, adsorbée ou particulaire, entraînant également une consommation rapide de l'oxygène dissous (Harremoës, 1982; Seidl et al., 1998; Gray, 2004) ;
- d'ions ammonium, éventuellement transformés en ammoniac, forme chimique toxique selon le pH (Mullis et al., 1997) ;
- de micropolluants organiques et minéraux (Pitt et al., 1995; Hall et al., 1998; Lee, 2000; Davis et al., 2001; Borden et al., 2002; Gray, 2004; Suárez and Puertas, 2005) ;
- de bactéries pathogènes (Qureshi, 1979; Seidl et al., 1998; Irvine et al., 2005).

Ces apports à effets immédiats peuvent avoir des conséquences catastrophiques directes sur l'écosystème, entraînant en particulier des mortalités importantes au sein des biocénoses; on parle alors d'effets de choc.

Les effets différés sont liés à l'accumulation de polluants dans les sédiments, on peut citer l'exemple de la contamination des sédiments du Rhône et de ses affluents par les PCB (Babut and Miege, 2007; Babut and Dorioz, 2009).

3.3.1.2 Effets sur la biocénose

Les études réalisées portent à la fois sur des organismes de la colonne d'eau et du sédiment. Celles conduites directement sur le terrain font appel pour la plupart aux macro-invertébrés de la zone benthique et hyporéïque. En ce qui concerne le choix du secteur à prospecter, (Angerville, 2009) émet l'hypothèse de l'existence d'une zone préférentielle régit par des conditions adéquates (pente longitudinale douce, débit relativement faible, vitesse d'écoulement laminaire..) qui favorisent la décantation des particules contenues dans les RUTP. Dès lors, les organismes interstitiels seraient exposés à une part importante de la pollution particulaire apportée par les RUTP. Le choix de ces zones d'étude est donc une étape essentielle dans les études de terrain. Il est toutefois acquis que les invertébrés benthiques constituent d'excellents bio-indicateurs car, inféodés aux sédiments, ils sont relativement bien exposés aux effets cumulatifs (Rochfort et al., 2000; Komínková et al., 2005). Les effets peuvent se traduire par une diminution de l'abondance et de la diversité des communautés d'invertébrés benthiques. Un gradient longitudinal s'observe généralement à l'aval des rejets (Pratt et al., 1981; Gray, 2004), avec des changements au niveau des taxons dominants et du développement d'espèces polluto-résistantes (Seager and Abrahams, 1990). Ces modifications s'amplifient avec les quantités d'eau déversées en temps de pluie. Les impacts observés peuvent alors être durables du fait de la rémanence des polluants dans le milieu (Pratt et al., 1981). Néanmoins, des périodes de temps secs suffisamment longues peuvent permettre la restauration des communautés (Grapentine et al., 2004).

Les diatomées sessiles constituent également de bons indicateurs de la pollution organique générée par les eaux pluviales (Willemsen et al., 1990; Newall and Walsh, 2005). En effet, contrairement à certains macro-invertébrés benthiques, elles n'ont pas la faculté de migrer (mécanismes de dérive, d'enfouissement, etc.) vers des habitats présentant des conditions plus favorables et moins soumis à l'influence des rejets. Les indices diatomées et macroinvertébrés ont été utilisés dans le cadre de l'évaluation de l'impact d'un déversoir d'orage sur la Drouette (cours d'eau périurbain de l'ouest parisien). Les résultats montrent une meilleure sensibilité des invertébrés avec une baisse sensible de la diversité en aval du déversoir (Rollin et al., 2010). Des prélèvements d'organismes au sein du cours d'eau ont permis de mettre en évidence des atteintes morphologiques amont/aval chez le chironome (déformation du *mentum*) (Arambourou, 2011).

Par ailleurs, (Gast et al., 1990) ont observé sur 63 sites néerlandais, des effets immédiats sur le phytoplancton se traduisant par une diminution de la biomasse et de la diversité, mais parfois suivis à moyen et long termes par un bloom algal. De même, des augmentations des biomasses algales et bactériennes ont été observées au sein de communautés périphytiques ; l'effet se manifeste rapidement après la fin du rejet du déversoir (4 à 8 heures) et perdure au moins 6 jours (Parent-Raoult, 2004). Les RUTP ont également un impact direct sur le métabolisme d'algues phytoplanctoniques, étudié par le biais d'activités enzymatiques estérases et phosphatase alcaline (Durrieu et al., 2010; Ferro and Durrieu, 2012).

Il est plus délicat d'établir des relations dose /réponse avec les poissons car, en raison de leur mobilité, le temps de contact réel avec les substances toxiques est difficile à évaluer (Burton et al., 2000; La Point and Waller, 2000). Quelques études mettent en évidence la sensibilité des poissons à une chute de concentration en oxygène dissous. Celle-ci peut provoquer une augmentation de l'activité respiratoire des poissons (Seager and Abrahams, 1990), voire même, lorsque la chute est brutale, des chocs anoxiques sévères engendrant des mortalités (Kreutzberger et al., 1980; Harremoës, 1982; Hvitved-Jacobsen, 1982; Schaarup-Jensen and Hvitved-Jacobsen, 1990). Les poissons constituent toutefois des modèles intéressants pour l'étude des phénomènes de bioaccumulation. Des études montrent en effet des problèmes de reproduction *in situ* pouvant être la conséquence directe d'atteintes du génome (Penders et al., 2012). Aucune étude de génotoxicité n'a cependant été rapportée sur l'impact direct des eaux pluviales sur les populations piscicoles.

L'impact physique des rejets (augmentation brutale du débit, érosion des berges et du fond, etc.) et leur répétition, conséquence directe de leur caractère intermittent, contribuent à modifier continuellement l'habitat physique, voire à le détruire totalement (Wagner and Geiger, 1996). Cette instabilité est alors susceptible de modifier la composition et l'abondance des communautés aquatiques en favorisant le maintien ou le développement des espèces capables de supporter de tels changements (Pedersen and Perkins, 1986). Ces résultats confirment de nouveau que l'habitat et le débit constituent deux facteurs écologiques d'importance fondamentale pour les communautés aquatiques soumises aux RUTP (Borchardt and Sperling, 1997; Taylor et al., 2004; Komínková et al., 2005; Parent-Raoult and Boisson, 2007). Le degré d'impact sur les biocénoses est généralement lié aux caractéristiques du milieu récepteur : plus le cours d'eau et de petite taille et/ou le débit est faible, plus l'impact est prononcé (Willemssen et al., 1990). Les différentes études réalisées montrent que les résultats ne permettent pas toujours de mettre en évidence des effets significatifs. Cette difficulté est à rapprocher de la forte variabilité temporelle (Morrisey et al., 2003) et spatiale à l'échelle des habitats échantillonnés (Rochfort et al., 2000; Grapentine et al., 2004). Les caractéristiques du bassin versant jouent également un rôle important (Bay et al., 2003; Schiff and Bay, 2003).

Les études en laboratoire étudient la réaction d'organismes inféodés aux cours d'eau après des durées variables d'expositions à différentes concentrations d'eaux pluviales récoltées au niveau de déversoirs. Au cours de son travail de thèse Angerville (2009) a ainsi réalisé une série de bioessais monospécifiques pour tenter de caractériser la toxicité de RUTP déversés sur la Chaudane (cours d'eau de l'ouest lyonnais) vis-à-vis de différents organismes tests. Cette étude distingue deux phases dans le rejet : une phase « eau » et une phase « particules ». Une batterie de bioessais a été réalisée sur chacune de ces phases. La fraction eau s'est révélée toxique pour le crustacé *Ceriodaphnia dubia* alors que la fraction particulaire s'est révélée très toxique pour la bactérie *Vibrio fischeri*. Des résultats complètement différents ont été obtenus avec d'autres types de bioessais réalisés dans cette même étude (Angerville, 2009).

Il apparaît donc important de réaliser un grand nombre de campagnes de manière à pouvoir réaliser une exploitation mathématique des résultats. Ceci peut permettre de dégager une tendance. On peut citer à titre d'exemple une étude statistique menée par Mullis *et al.* (1996) permettant d'établir une relation dose réponse entre les modifications physico-chimiques du milieu en aval d'un déversoir d'orage et la mortalité de deux espèces d'invertébrés *Gammarus pulex* et *Asellus aquaticus* (Mulliss et al., 1996).

(Parent-Raoult, 2004) a réalisé des expérimentations en canaux artificiels pour évaluer l'impact de RUTP collectés en région lyonnaise, sur les communautés périphytiques. Les effets ont été évalués, en conditions expérimentales ainsi rigoureusement contrôlées, sur les descripteurs structurels (biomasse totale et algale, teneur en phéopigments, abondance bactérienne), physiologiques (intégrité membranaire) et fonctionnels (activités enzymatiques extracellulaires : leucine aminopeptidase et β -glucosidase). Six campagnes de prélèvements ont été réalisées. Les résultats obtenus montrent que la masse organique est globalement peu affectée par la présence des rejets, alors que la biomasse algale semble parfois stimulée, probablement par des teneurs non négligeables en sels dissous. Les données des phéopigments, quand elles sont exploitables, révèlent peu de réponse suite aux rejets, la communauté algale étant peu altérée par les rejets. Les abondances bactériennes, augmentent quasiment systématiquement en présence des rejets. Les deux activités enzymatiques répondent quant à elles très différemment selon les rejets utilisés, voire même selon les campagnes utilisant les mêmes rejets. Notons seulement que de manière générale, elles dénotent une augmentation de la capacité hydrolytique des biofilms en présence des rejets. Les essais réalisés en canaux artificiels mettent d'autre part en évidence l'importance des facteurs abiotiques (température, vitesse du courant) sur les réponses biologiques observées sur des invertébrés benthiques tels que *Gammarus pulex* (Borchardt and Statzner, 1990) ou des biofilms périphytiques soumis à des rejets simulés de déversoirs d'orage (Parent-Raoult, 2004).

3.3.2 Impact sur les plans d'eau de type « lacs »

Dans un lac les pollutions ne s'écoulent pas; ces écosystèmes accumulent par conséquent tous les rejets qu'ils reçoivent, ce qui les rend particulièrement sensibles. L'impact de l'urbanisation sur les lacs a été essentiellement étudié pour le compartiment physico-chimique. Aucune étude *in situ* n'a été recensée sur la biocénose. En effet, dans un lac, il est impossible de faire une comparaison amont aval ce qui rend très difficile l'interprétation des phénomènes pouvant être imputés à la pollution pluviale.

3.3.2.1 Effets sur la composante physico-chimique

Il s'agit essentiellement d'effets liés au dépôt et à l'accumulation de matières en suspension susceptibles de provoquer des phénomènes d'envasement et de colmatage. Des quantités importantes de matière organique, de nutriments (Hatch and Burton, 1999), de polluants persistants de toutes natures (métaux lourds, hydrocarbures, pesticides...) sont ainsi stockés dans les sédiments et accumulés dans les chaînes alimentaires (Mulliss et al., 1994; Huntley et al., 1997; Ianuzzi et al., 1997). La dégradation de la qualité des grands lacs alpins (Annecy, Léman, Bourget) dans les années 70 illustre bien l'impact de l'urbanisation. En effet les alpes, ont connu un développement urbain mal contenu dans la dernière partie du 20^{ème} siècle. D'importants programmes de restauration, basés sur l'amélioration des techniques d'assainissement ont été conduits pour améliorer la qualité de la colonne d'eau des grands lacs (Monod, 1978; Syndicat intercommunal du lac d'Annecy, 1991). Les polluants restent toutefois présents dans les sédiments. L'analyse de métaux lourds de PCB et d'HAP sur des carottages de sédiments réalisés dans le lac du Bourget permet de suivre l'évolution de l'urbanisation de son bassin versant pendant le siècle dernier (Jung et al., 2008).

3.3.2.2 Effets sur la biocénose

On ne peut citer que quelques études réalisées en laboratoire qui évaluent la sensibilité d'espèces lacustres. Des tests de survie à 48 heures, 7 jours et 10 jours ont été menés sur *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, et *Pimephales promelas* en présence d'eau pluviale et de sédiments contaminés. Ils mettent en évidence une forte mortalité sur la daphnie (Hatch and Burton, 1999). D'autres auteurs ont mis en évidence le rôle important des composés organiques non polaires, c'est à dire peu hydrosolubles, sur la mortalité de la daphnie (*C. Dubia* : test de survie à 48h et 96h) (Gersberg et al., 2004).

Il semblerait qu'en milieu lacustre, l'impact soit plus sévère que sur les cours d'eau du fait du temps de séjour plus long des polluants (Gast et al., 1990) ; Il peut porter sur la globalité de l'écosystème en induisant, dans certains cas, des phénomènes tels que son eutrophisation accélérée (Parent-Raoult and Boisson, 2007).

3.3.3 Impact sur les eaux littorales

Le problème est à peu près identique à celui des lacs : pas de comparaison amont-aval. Il est possible de mettre en évidence des perturbations, notamment dans les zones de transition où une diminution de la biodiversité a pu être observée (Armstrong et al., 1980). La dynamique des rejets s'apparente à celle des cours d'eau qui les véhiculent.

Une étude réalisée sur 78 stations de la côte sud de la Californie met en évidence une importante prolifération bactérienne dans les eaux côtières (Dwight et al., 2012) avec des impacts sanitaires rapportés.

Comme pour les lacs, des travaux en laboratoire ont été réalisés sur des espèces marines. On peut citer par exemple les travaux de (Schiff et al., 2002) qui montrent que les eaux pluviales urbaines n'affectent pas la survie de *Mysidopsis bahia* (crustacé marin), la concentration en effluent entraînant la mort de 50 % (CE₅₀) des populations testées étant supérieure à 100 % (concentration de l'effluent). Par contre, concernant *Stongylocentrotus purpuratus* (oursin), les eaux pluviales ont un effet sur la fertilisation des œufs, avec une réduction de 50 % (CE₅₀) pour des concentrations en effluents parfois inférieures à 3 % (Bay et al., 2003). Par ailleurs, les espèces réagissent à des toxiques spécifiques, soit les métaux traces (principalement le zinc) pour l'oursin, et les pesticides organophosphorés pour la daphnie (Schiff et al., 2002). Enfin, des travaux conduits sur les algues marines (*Phaeodactylum tricornutum* et *Dunaliella tertiolecta*) de la baie de Banyuls (Languedoc-Roussillon) ont mis en évidence une forte perturbation de la croissance et d'activités enzymatiques, telles que les phosphatases et estérases (Durrieu et al., 2011). L'impact de l'urbanisation sur les zones côtières semble manifeste et peut s'étaler sur des dizaines de km² en aval des estuaires; en effet les rejets drainant des bassins versants urbanisés sont beaucoup plus toxiques pour la vie marine que ceux provenant de zones peu développées (Bay et al., 2003). Toutefois, il reste difficile de faire la part entre l'impact lié à la ville et celui provoqué par des pollutions diffuses d'origine diverses (agriculture, industrie...)

3.3.4 Impact sur les eaux souterraines

Des études récentes et très originales mettent en évidence l'impact potentiel des eaux de pluie sur les eaux souterraines par le biais des bassins d'infiltration. Ainsi (Foulquier et al., 2009, 2011) ont mis en évidence des mécanismes de transfert s'accompagnant d'une augmentation de la concentration de Carbone Organique Dissous (COD) dans l'aquifère et d'une diminution de l'Oxygène Dissous (OD). Il semblerait que ces phénomènes ne soient pas l'unique résultante de phénomènes abiotiques mais qu'ils soient associés à une augmentation de la biomasse microbienne et de sa respiration. Des modifications sembleraient également se produire au niveau du compartiment des macroinvertébrés. On pourrait donc conclure de ces travaux que l'infiltration des eaux pluviales dans les aquifères modifie de manière significative les interactions trophiques.

3.3.5 Impact sur les eaux artificielles

Nous examinerons ici le cas des bassins de rétention / infiltration d'eaux pluviales. Nous avons vu précédemment que l'infiltration d'eaux pluviales dans l'aquifère semble en affecter la biocénose. Quelques études ont été réalisées sur les mécanismes d'interactions qui se produisent à la surface de ces bassins. Ainsi (Datry, 2003) a mis en évidence la très faible biodiversité en macroinvertébrés à la surface d'un bassin d'infiltration de l'est lyonnais. Seules deux espèces ont été identifiées: l'oligochète *T. tubifex* et le cyclopoïde *E. serrulatus*. Ceci peut être rapproché de la faible oxygénation du milieu et la concentration importante de diverses familles de polluants (hydrocarbures, pesticides, métaux...). Cette étude a également montré l'adaptabilité des espèces présentes, elles sont en effet capables de mettre en place des mécanismes de détoxification, comme l'augmentation du taux d'excrétion d'ammonium et accumulation de produits du métabolisme aérobie pour faire face à la pénurie en oxygène. Il en ressort que seuls quelques organismes sont capables de s'adapter sur ces milieux impropres au développement d'une biocénose équilibrée. Le risque écotoxicologique a été évalué par (Becouze-Lareure, 2010) en entrée et sortie du bassin de décantation d'eaux situé juste en amont du bassin d'infiltration précédemment cité. Le comportement d'organismes tests : ostracodes (*Heterocypris incongruens*) et rotifères (*Brachionus calyciflorus*) a été étudié pour 3 campagnes d'études. Une variabilité événementielle a été mise en évidence avec une diminution de la mortalité observée pour les 2 premières campagnes alors que la 3ème campagne montre l'inverse. Une variabilité spatiale a également été observée avec une inhibition de la croissance plus marquée en sortie. On peut donc constater une fois encore la variabilité des phénomènes observés. Toutefois les RUTP semblent avoir un fort impact sur la qualité de l'eau infiltrée.

D'autre part, (Badin et al., 2011) ont également montré que l'activité de la microflore de ces bassins semble être dépendante de leur statut hydrique. En effet les cycles d'inondation-assèchement s'accompagne d'une modification de la stabilité structurale de la couche sédimentaire qui provoque une modification de l'agrégation qui pourrait s'accompagner d'un transfert de matières organiques et de polluants vers l'aquifère.

Résumé du chapitre 3

Sur les 5 types de masses d'eaux considérées par l'Union Européenne, les RUTP sont susceptibles d'affecter leur qualité, physicochimique comme écologique. Les effets les plus présents dans la littérature sont la modification de la morphologie du cours d'eau, des débits et de la turbidité. On note aussi des variations de la composition chimique et des paramètres physiques (conductivité, température, dioxygène dissous, etc.) Ce sont ces perturbations qui peuvent avoir un effet délétère sur les espèces vivants dans la masse d'eau considérée.

Les perturbations peuvent provoquer sur les organismes des effets à court terme (effets de choc), souvent marqués, allant jusqu'à la mort de certains individus. Ces perturbations peuvent entraîner également des effets à plus long terme (effets différés), beaucoup plus pernicious et difficiles à évaluer. Ce sont des effets liés à l'accumulation de nutriments (eutrophisation) ou de micropolluants (métaux, pesticides, ...) pouvant aboutir à la disparition d'espèces polluo-sensibles.

On notera le faible nombre d'études ainsi que leur champ d'action limité ayant été réalisé sur l'impact des RUTP sur les écosystèmes récepteurs.

4 Outils d'évaluation de l'impact écologique

Les bioessais écotoxicologiques et les biocapteurs sont ici décrits dans le contexte de surveillance des milieux aquatiques.

4.1 Caractérisation des effets

4.1.1 Généralités

La caractérisation des effets écotoxicologiques d'un échantillon consiste à mettre en évidence sa capacité à agir sur les organismes du milieu récepteur considéré. On cherche en général à observer un effet délétère sur une fonction de cet organisme (croissance, métabolisme, reproduction, ...). La principale finalité de cette caractérisation est de parvenir à évaluer la concentration prédite sans effet (PNEC *predicted no effect concentration*) pour l'échantillon concerné.

La seule connaissance des paramètres physico-chimiques du milieu récepteur ne suffit pas à définir l'impact de ce dernier sur les écosystèmes. Pendant longtemps l'écotoxicologie a été assimilée à une démarche de stricte chimie analytique alors que cette dernière, même si elle est indispensable à la discipline, ne constitue en aucun cas la finalité elle-même.

Il est également reconnu que les actions combinées liées à la présence de mélanges de polluants (ex : effets de synergie et/ou d'antagonisme) ne peuvent être prévues à partir de la seule connaissance de ces polluants. L'utilisation d'essais sur organismes biologiques peut contribuer à répondre à ces besoins (ADEME, 2005) (cf. 4.2).

On peut procéder à cette caractérisation au moyen de deux approches complémentaires: soit on considère l'échantillon comme un tout indivisible, donc une « matrice », soit on l'approche en fonction de ses différentes composantes.

4.1.2 L'approche substance

Les approches « substances » impliquent deux étapes complémentaires. On fait tout d'abord appel à l'analyse physico-chimique de la matrice polluante concernée en vue de déterminer les polluants qu'elle contient. Ces polluants sont les agents potentiellement dangereux à partir desquels on réalisera la caractérisation des effets de la matrice étudiée. Un nombre important de ces composés peut être mis en évidence dans une matrice polluante, cependant il est admis de procéder au choix de certains composés qui joueront alors le rôle de « traceurs de risque ». Le choix des traceurs découle d'un consensus permettant de retenir un ensemble de polluants pertinents et/ou spécifiques au scénario étudié. Ces traceurs de risque peuvent, par conséquent, être de natures diverses : inorganiques, organiques, biologiques,...

On procède ensuite à la mise en œuvre d'essais écotoxicologiques sur des gammes de concentrations des traceurs de risques sélectionnés. Cette approche est conseillée lorsqu'on connaît bien la matrice étudiée et que quelques toxiques dominent.

4.1.3 L'approche matrice

Tout comme l'approche substances, l'approche « matrice » réclame la mise en œuvre d'essais écotoxicologiques en vue d'apprécier les effets d'une matrice sur des organismes. Mais dans le cadre de cette approche on expose les organismes considérés à la matrice tout entière. On utilise cette approche lorsqu'aucun toxique ne domine dans la matrice et/ou que la nature des substances présentes est incertaine.

Pour mettre en évidence des effets, il est possible d'utiliser différents niveaux d'organisation biologique et différentes échelles d'expérimentation. On peut sélectionner un certain nombre de bioessais mono-spécifiques qui constitueront une « batterie de bioessais mono-spécifiques », tout comme on peut recourir à des « bioessais pluri-spécifiques ». La notion de batterie de « bioessais mono-spécifiques » fait référence à différents bioessais (normalisés ou non) réalisés séparément sur la même matrice (ou le même polluant). Les « bioessais pluri-spécifiques » font intervenir plusieurs espèces d'organismes mais simultanément au contact de la matrice, avec des niveaux d'organisation écologiques supérieurs.

L'analyse physico-chimique de la matrice polluante étudiée ne joue donc plus le rôle prépondérant qui lui est attribué dans les approches « substances » pour l'estimation des valeurs de PNEC. Néanmoins, la caractérisation physico-chimique de la matrice apporte des informations complémentaires sur les concentrations en éléments potentiellement toxiques présents dans cette matrice.

Tableau 12: comparatif des approches substances et matrices (Perrodin et al., 2010), d'après (ADEME, 2007)

Approche «substances»	Approche «matrice»
Caractéristiques	
Caractérisation des polluants Analyse des substances prises individuellement. (ex. : Plomb, cadmium, zinc, ...) Les valeurs utilisées sont issues des bases de données écotoxicologiques généralement obtenues à partir des essais écotoxicologiques sur des gammes de concentrations de la substance considérée.	Caractérisation des matrices Analyse des matrices (ex. : Déchet, effluent, sol, sédiment, percolat, eau de surface ...) Les essais écotoxicologiques sont réalisés sur des échantillons environnementaux prélevés in situ ou générés à partir d'un dispositif expérimental. Ces essais sont réalisés sur la matrice non diluée ou sur une gamme de dilutions de cette dernière.
Avantages	
Simplicité, faible coût. Permet de fixer facilement des objectifs de réhabilitation en termes de concentrations dans les milieux.	Prise en compte des interactions possibles entre les substances présentes dans le compartiment étudié Meilleure prise en compte de la biodisponibilité des polluants.
Limitations	
Interactions (additivité, antagonisme ou synergie) entre les substances non prises en compte. Biodisponibilité des substances peu ou mal appréciée.	Complexité plus grande Coût plus important
Applicabilité des approches	
Les substances contenues dans les sédiments sont majoritairement connues. Dominance de quelques substances toxiques Informations sur les « effets » disponibles pour les substances étudiées Modèles de calcul des transferts et des expositions de substances robustes et éprouvés. Approche possible avec un budget limité	Nature des substances présentes incertaine (identification incertaine des sources) Pas de dominance de toxiques, Les informations sur les « effets » ne sont pas disponibles pour les substances étudiées Modélisation de l'évaluation de l'exposition nécessitant un apport expérimental (ex. : test de percolation sur un déchet) Recherche d'un réalisme plus poussé

4.2 Les bioessais écotoxicologiques au laboratoire

Pour de déterminer l'impact d'une matrice ou d'une molécule sur un organisme ou sur un groupe d'organismes, il a été mis au point des bioessais écotoxicologiques, appelés aussi tests d'écotoxicologie, définis par. (Ramade, 2007) :

« [Les bioessais] ont pour objet d'évaluer le degré de sensibilité (ou de résistance) à tel ou tel polluant toxique chez les diverses espèces animales ou végétales. En pratique on cherche à déterminer les différentes formes de toxicité (par contact, par inhalation, ou par ingestion), et à faire une évaluation quantitative de leurs principaux effets létaux ou sublétaux. »

Il rajoute : « Leur objet [les bioessais] est de déterminer la toxicité des substances chimiques potentiellement nocives, pour les populations humaines ainsi que leurs activités biocides et/ou les particularités toxicologiques pour les principaux règnes d'êtres vivants. Enfin il est important-autant que faire se peut-de déterminer leur écotoxicité présomptive pour les biocénoses naturelles à l'aide d'expérimentations sur les divers types écologiques d'êtres vivants (producteurs, consommateurs, décomposeurs). » Il est donc essentiel de recourir à l'expérimentation sur divers types écologiques.

Toutefois il ne suffit pas de sélectionner des êtres vivants, il faut également sélectionner des indicateurs biologiques de pollutions, appelés également bioindicateurs. Le choix de bioindicateurs pertinents est une préoccupation constante de l'écotoxicologue. Les caractéristiques d'un bon bioindicateur sont les suivantes (Ramade, 2007) :

- Tous les individus d'une espèce bioindicatrice devraient présenter une corrélation identique et simple entre leur teneur en la substance polluante et la concentration moyenne de cette dernière dans le biotope ou dans l'alimentation quelles que soient la localisation et les conditions environnementales ;
- L'espèce devrait être sédentaire afin d'être sûr que les concentrations trouvées soient bien en rapport avec sa contamination dans le site géographique où elle a été prélevée ;
- L'espèce devrait être abondante dans l'ensemble de l'aire étudiée et si possible avoir une distribution biogéographique étendue afin de favoriser les comparaisons entre zones distinctes ;
- Les espèces à forte longévité sont préférables parce qu'elles permettent un échantillonnage sur plusieurs classes d'âge si nécessaire. En outre, les espèces à forte longévité subissent une exposition à un contaminant pendant de longues périodes ce qui par suite permet de disposer de preuves expérimentales sur les effets à long terme ;
- L'espèce devrait être facile à échantillonner et assez résistante pour être amenée en laboratoire afin de réaliser par exemple des études de décontamination.

Idéalement les tests de toxicité se déroulent *in situ*, afin de tenir compte des conditions de terrains localisées. Toutefois, de nombreux obstacles logistiques et la nécessité de suivre des protocoles de test rigoureux limitent la faisabilité de tels essais *in situ*. C'est pourquoi les tests de toxicité sont généralement pratiqués au laboratoire, à la fois sur des échantillons d'eau et des sédiments afin de contrôler de nombreux paramètres environnementaux qui peuvent influencer sur les résultats de toxicité (température, qualité de l'eau, etc.) (Marsalek et al., 1999)

Il existe une multitude de bioessais, permettant de tester la toxicité aiguë et chronique des rejets urbains par temps de pluie, en voici une liste non exhaustive fréquemment utilisée.

4.2.1 Des organismes modèles pour le travail en laboratoire

4.2.1.1 Généralités

L'idée est de sélectionner des organismes représentatifs des grands types écologiques que l'on peut retrouver dans un écosystème aquatique. L'utilisation de bioindicateurs écologiques de toxicité repose sur le principe de sélection des organismes aquatiques résistants aux pollutions au détriment des organismes sensibles. En effet, à l'échelle d'un peuplement, les individus ou les espèces les plus faibles vont disparaître sous la pression du polluant (mort ou fuite), laissant la possibilité aux espèces résistantes de se développer davantage. Ce phénomène entraîne l'établissement de peuplements dont la structure reflète la qualité de l'eau, notamment au travers de l'analyse des présences/absences. L'inventaire des organismes aquatiques indicateurs de pollution présents dans un milieu permet d'évaluer le niveau de contamination de ce milieu. Il s'agit dans ce cas d'outils permettant de mesurer l'effet des substances toxiques. Ils ne peuvent donc pas être utilisés à titre préventif, mais plutôt comme outils de diagnostic. (Agence de l'eau Artois Picardie, 2002)

Tableau 13 : quelques espèces fréquemment utilisées comme bioindicateurs (milieu aquatique)

Famille	Espèce				
Poissons	<i>Brachydanio rerio</i>		<i>Oncorhynchus mykiss</i>		
Arthropodes	<i>Daphnia magna</i>	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	<i>Palaemonetes varians</i>	<i>Hyalella azteca</i>	<i>Gammarus pulex</i>
Oligochètes	<i>Eisenia fetida</i>		<i>Tubifex tubifex</i>		
Mollusques	<i>Elliptio complanata</i>		<i>Lymnaea stagnalis</i>		
Végétaux sup.	<i>Lemna minor</i>		<i>Lolium perenne</i>		
Rotifères	<i>Brachionus calyciflorus</i>				
Mycètes	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>				
Microalgues	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlamydomonas renaardti</i>	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Phaeodactylum tricorutum</i>
Bactéries	<i>Vibrio fischeri</i>	<i>Escherichia Coli</i>		<i>Pseudomonas putida</i>	

4.2.1.2 Les microalgues

Les micro-organismes sont connus pour être à la base des écosystèmes aquatiques mais également en raison de leur grande importance écologique (Gilbin, 2001). Les algues unicellulaires appartiennent à ce groupe d'organismes. Les algues sont des producteurs primaires, premier maillon du réseau trophique. Dans les écosystèmes aquatiques, la caractéristique principale de ce premier maillon, aux côtés des macrophytes, est de permettre l'entrée du carbone inorganique dans le compartiment biotique par le biais de la photosynthèse. De par leur faible taille, leur forme et leur richesse en carbone, ces micro-organismes constituent généralement une partie importante de la nourriture consommée par le zooplancton (cladocères) (Cauzzi, 2007). De plus ces organismes naturellement présents dans les milieux aquatiques sont facilement cultivables en laboratoire et sensibles aux polluants listés dans le chapitre 2.3. Pour toutes ces raisons les microalgues sont d'excellents bioindicateurs, c'est pour cela que notre choix s'est orienté vers ce compartiment de l'écosystème aquatique.

Chlorella vulgaris : Les chlorelles sont des algues vertes unicellulaires, appartenant à l'ensemble des chlorophytes, classe des chlorophycées, ordre des chlorococcales et famille des oosystacées. Elles sont de formes sphériques ou ellipsoïdales, de couleur verte foncée et de taille généralement comprises entre 2µm et 10µm (Figure 8). *C. vulgaris* réalise son activité photosynthétique via ses chloroplastes qui représentent la moitié du volume cellulaire. Ces plastes renferment des pigments photosynthétiques, la chlorophylle *a* et la chlorophylle *b*. Cette algue se reproduit de manière asexuée (végétative), la cellule mère se divisant en quatre spores qui s'échappent et germent pour donner un clone de la cellule mère.

La chlorelle est une espèce non flagellée d'eau douce, souvent cultivé en laboratoire pour des études fines de photosynthèse. A l'appareil cinétique près, ici absent, elle présente de grandes similitudes avec *Chlamydomonas reinhardtii* (cf. ci-après) (De Revers, 2002).

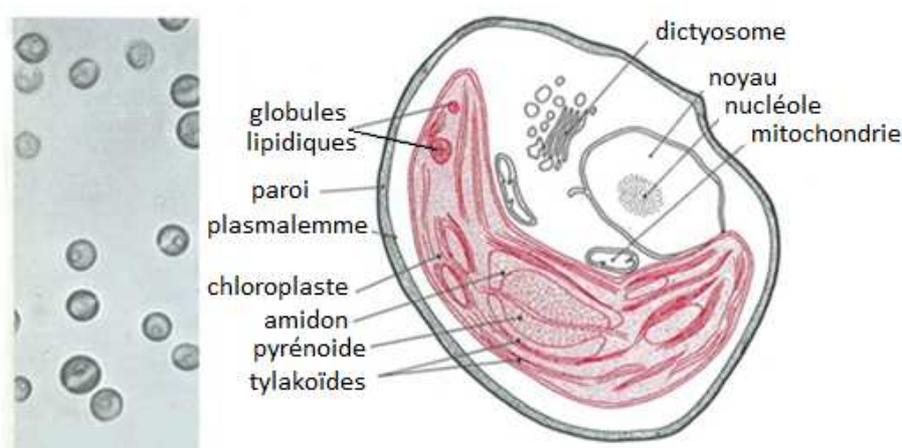


Figure 8: Coupe de *C. vulgaris* au MET et schéma d'interprétation, (Roland et al., 2008)

Pseudokirchneriella subcapitata : L'algue *P. subcapitata*, anciennement dénommée *Selenastrum capricornutum* puis *Raphidocelis subcapitata* est une algue eucaryote dulçaquicole de la famille des Chlorophyceae (ordre des Chlorococcales). Il n'y a pas de division végétative dans cette famille ; la reproduction se fait par zoo-sporulation (2 autospores, le plus souvent). Cette algue verte est présente dans une grande diversité de milieux aquatiques mais affectionne généralement les eaux calmes ; elle est susceptible de se développer dans la colonne d'eau, le sédiment ou sur des supports divers à condition que la lumière soit en quantité suffisante. Elle est également connue pour être sensible à la pollution des écosystèmes (Nygaard et al., 1986; Samoura, 2004; Cauzzi, 2007) Cet organisme unicellulaire, de petite taille (longueur moyenne de 5 - 6 µm), a une forme de croissant, n'a pas de flagelle et ne forme pas de colonies (Figure 9). Les cellules sont isolées ou groupées en paquets irréguliers et son cytoplasme renferme principalement de la chlorophylle *a*, de la chlorophylle *b* et des pigments caroténoïdes. La richesse et la disponibilité des nutriments présents dans le milieu, la lumière et le carbone sont des facteurs prépondérants dans son développement.

L'espèce *P. subcapitata* a été utilisée dans un premier temps pour étudier l'impact des nutriments sur la productivité primaire en relation avec l'eutrophisation des milieux aquatiques. Son utilisation s'est ensuite généralisée aux tests écotoxicologiques principalement en raison de sa facilité de culture et de sa croissance rapide.

Les producteurs primaires constituent une cible privilégiée dans le cadre de la contamination par le cuivre (Gilbin, 2001). De plus, les algues sont réputées sensibles aux pollutions d'origine métallique, notamment *P. subcapitata* en ce qui concerne les substances pures (Santiago et al., 2002).



Figure 9: *P. subcapitata* en microscopie photonique. Source : ecotox.ca

Chlamydomonas reinhardtii : C'est une algue verte unicellulaire d'environ 10μm de long appartenant au plancton d'eau douce. La cellule est mobile grâce à un appareil locomoteur comportant deux flagelles ou fouets, situés à l'avant du corps. L'essentiel du volume cellulaire est occupé par un chloroplaste incurvé en forme de cloche (Figure 10). Une vacuole pulsatile située près de la base des flagelles se contracte et se vide périodiquement.

A la fois autotrophe par son chloroplaste et mobile par ses flagelles *C. Reinhardtii* réunit des caractéristiques végétales (photosynthèse) et animales (locomotion).

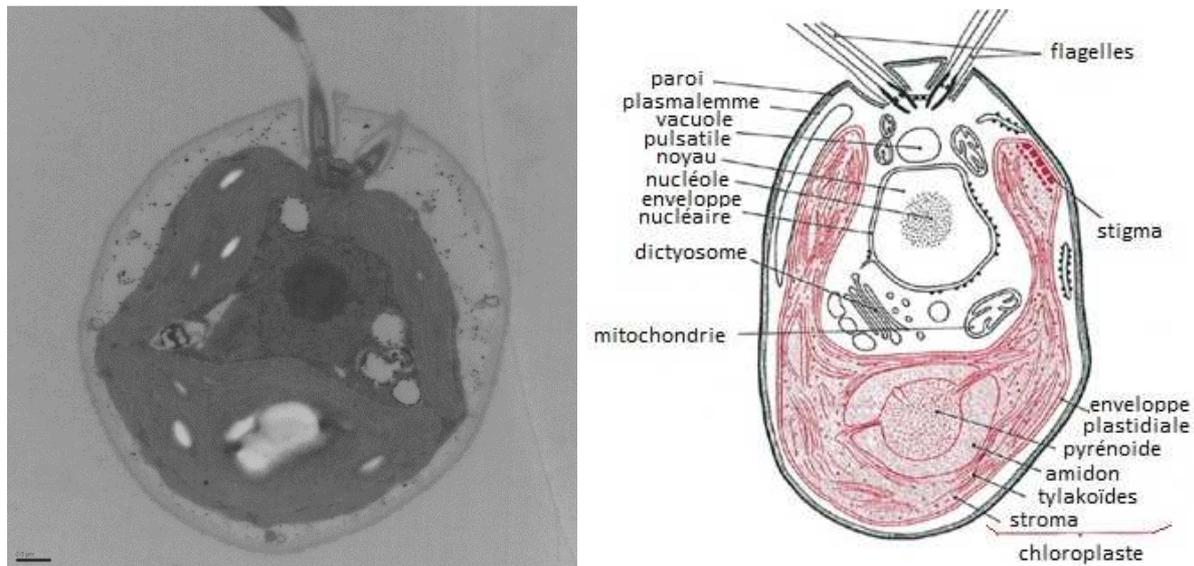


Figure 10 : Coupe de *C. reinhardtii* en MET et schéma d'interprétation (Roland et al., 2008)

Depuis plus de 50 ans, *C. reinhardtii* sert de modèle expérimental pour la recherche sur les processus fondamentaux de la biologie cellulaire. La Figure 11 présente ainsi la répartition des enzymes et des métabolites dans la cellule. La moitié des enzymes et des métabolites est localisé dans les chloroplastes, suivie du cytosol et des mitochondries. Il existe également un grand nombre de réactions de transport indiquant l'importance du métabolisme d'échange entre les différents compartiments.

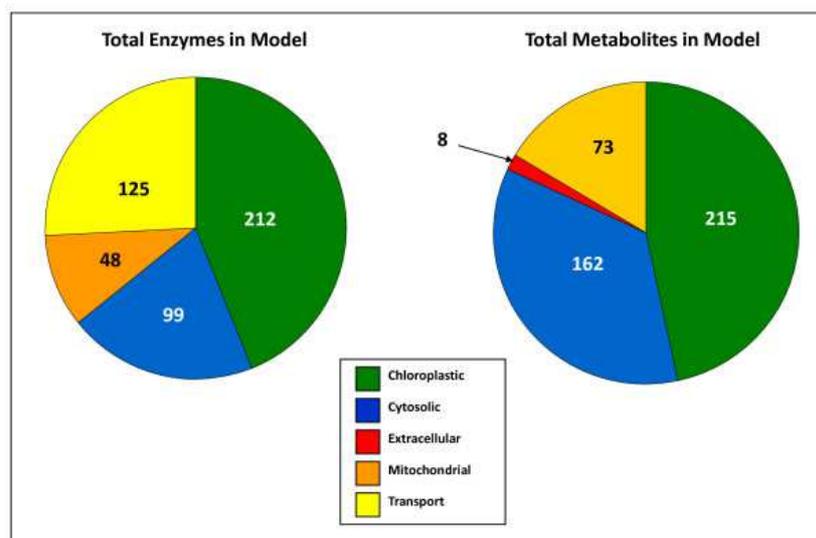


Figure 11 : distribution des enzymes et des métabolites dans le modèle reconstruite de *C. reinhardtii*. (Boyle and Morgan, 2009)

4.2.2 Les essais normalisés en milieu aquatique

Ce sont des bioessais définis par l'ISO (International Standard Organisation) et/ou par l'AFNOR (Association Française de NORmalisation). Pour être considérés comme valides, ces tests doivent remplir un cahier des charges très rigoureux et fixent des contraintes d'application très précises.

Le principal avantage des tests normalisés est de pouvoir comparer entre eux les résultats obtenus sur des lieux ou à des moments différents grâce à un protocole rigoureux et faisant consensus au sein de la communauté internationale.

Toutefois ces tests présentent certains inconvénients ; tout d'abord citons leur nombre limité. Ensuite, par essence, ces tests manquent de souplesse ; en fonction de la molécule ou de l'effluent testé on peut être amené à faire varier un protocole ce qui entraîne la non validité de l'essai au sens de la norme. C'est pourquoi nous présentons ci-après des tests non normalisés.

Tableau 14: quelques bioessais normalisés en milieu aquatique, A = aigüe, C = chronique

Famille	Espèce	Toxicité	Critère	Norme
Arthropodes	<i>Daphnia magna Straus</i>	A	Mobilité	ISO 6341
		C		NF T90 -378
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	C	ISO 20665 (NF T90-329)	
	<i>Palaemonetes varians</i>	A	Survie	NF T90 -349
Rotifères	<i>Brachionus</i>	C	Reproduction	ISO 20666 (NF T90-334)
Poissons	<i>Danio rerio</i>	A	Ecllosion	ISO 15088 (NF T90-365)
	<i>Salmo gairdneri</i>	A	Survie	NF T90-305
Végétaux sup.	<i>Lemna minor</i>	C	Croissance	ISO 20079 (NF T90-308)
Algues	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	C	Croissance	ISO 8692 (NF T90-304)
Bactéries	<i>Vibrio fischeri</i>	A	Luminescence	ISO 11348 (NF 90-320)
	<i>Pseudomonas putida</i>	A	Reproduction	ISO 10712 (NF T90-342)

4.2.3 Les essais non normalisés en milieu aquatique

De nombreux bioessais sont encore au stade de la recherche et sont pour la plupart adaptés à un domaine d'étude bien particulier, aussi ils ne font pas l'objet d'une norme. La littérature est riche de bioessais menés avec plus ou moins de succès sur un grand nombre de types trophiques à l'aide de divers biomarqueurs. Parmi les grandes catégories de biomarqueurs de toxicité en milieu aquatique dulçaquicole on retrouve les activités enzymatiques et la fluorescence chlorophyllienne.

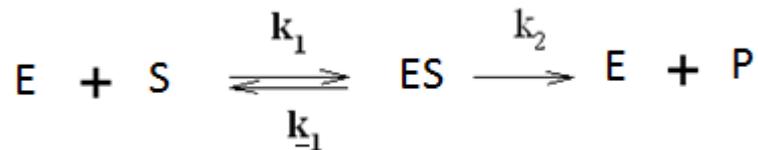
4.2.3.1 Suivi de l'activité enzymatique

Les enzymes sont les catalyseurs du monde vivant ; sans ces protéines les réactions chimiques indispensables à la vie ne pourraient avoir lieu de manière aussi efficace et rapide.

Comme n'importe quel catalyseur une enzyme a le pouvoir d'accélérer une réaction sans être consommée au cours de celle-ci. Les réactions métaboliques seraient la plupart du temps très faibles voire non mesurables en l'absence d'enzyme, à moins de se placer dans des conditions non compatibles avec la vie (physiologiques). C'est typiquement le cas des réactions d'hydrolyse ; par exemple l'hydrolyse de l'amidon se fait en catalyse acide ($\text{pH} < 2$) à $t = 100^\circ\text{C}$ en 1h mais est réalisée en quelques minutes grâce à l'amylase à $t = 37^\circ\text{C}$.

Aussi les enzymes apparaissent comme des catalyseurs très efficaces ; un taux d'accélération de 10^7 peut apparaître comme banal, mais ceci n'est vrai que dans les conditions optimales d'activité de l'enzyme (Pelmont, 1995).

Ces réactions enzymatiques peuvent se résumer ainsi :



Avec E l'enzyme étudiée, S le substrat, ES le complexe enzyme-substrat et P le produit de la réaction catalysée par E. k_1 et k_2 étant les constantes de vitesses respectives des réactions de formation du complexe ES et du produit P. k_{-1} étant la réaction de dissociation du complexe en ES. On remarque que E n'est pas consommé au cours de la réaction.

k_2 est l'étape limitante d'un processus complexe : elle représente le pouvoir catalytique intrinsèque d'une protéine, quelle que soit sa concentration dans le mélange du test, c'est-à-dire le nombre de molécules de substrat qu'une molécule d'enzyme peut transformer par unité de temps.

Pour utiliser une réaction enzymatique comme bioindicateur on peut se placer dans plusieurs cas de figure :

- Le polluant étudié est un substrat naturel de l'enzyme sélectionné ; dans ce cas de figure l'étude des cinétiques enzymatiques nous fournit une information sur la concentration de substrat présent et donc du polluant. Ainsi l'étude de la catalase, enzyme catalysant la dégradation du peroxyde d'hydrogène, nous fournit des informations sur le degré de stress d'une cellule (Bonet et al., 2012).

L'activité des enzymes peut être perturbée par des inhibiteurs : en sa présence la réaction catalysée est ralentie et de plus il n'est pas transformé par l'enzyme. Aussi nous voyons deux applications directes :

- Il est possible de détecter certains composés inhibiteurs en étudiant l'activité des enzymes perturbées. Les éléments traces métalliques perturbent par exemple le fonctionnement de la phosphatase alcaline (Badreddine, 1996; Durrieu et al., 2003) tandis que les HAP sont connus pour agir sur les oxydases (Payne et al., 1987) ;
- Nous avons vu que les enzymes sont des protéines indispensables au fonctionnement cellulaire. Aussi lorsque leur fonctionnement est perturbé c'est toute la cellule qui est affectée. En effet, les réactions enzymatiques se font généralement en cascade. Le produit de la réaction 1 peut être substrat de la réaction 2 et ainsi de suite. C'est pourquoi l'étude des réactions enzymatiques est un excellent biomarqueur de toxicité.

Citons les travaux de (Châtel et al., 2010) utilisant des MAP kinases (*mitogen activated protein*) ou les travaux de (Shailaja and D'Silva, 2003) utilisant différentes classes d'enzymes comme biomarqueurs de pollution environnementale.

4.2.3.2 Fluorescence chlorophyllienne

Chez les chlorophytes au cours de la photosynthèse la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique se fait par l'absorption de photons au niveau des photosystèmes situés dans la membrane des tylacoïdes (au sein des chloroplastes). L'énergie est restituée par la voie de la photosynthèse : des électrons provenant du système d'oxydation de l'eau sont transférés de proche en proche grâce à une série de transporteurs jusqu'à un accepteur final par l'intermédiaire des centres réactionnels des deux photosystèmes.

La photosynthèse est notamment inhibée par des herbicides. Ce phénomène peut être illustré par l'action du DCMU (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-diméthylurea). Cette molécule se lie au site Q_B de la protéine D1 du complexe photosystème II dans la membrane des tylacoïdes, bloquant ainsi le transport des électrons de Q_A à Q_B (Figure 12). Ce processus empêche la fixation du CO_2 et la production d'ATP ainsi que les autres composés de haute énergie nécessaires à la croissance de la cellule.

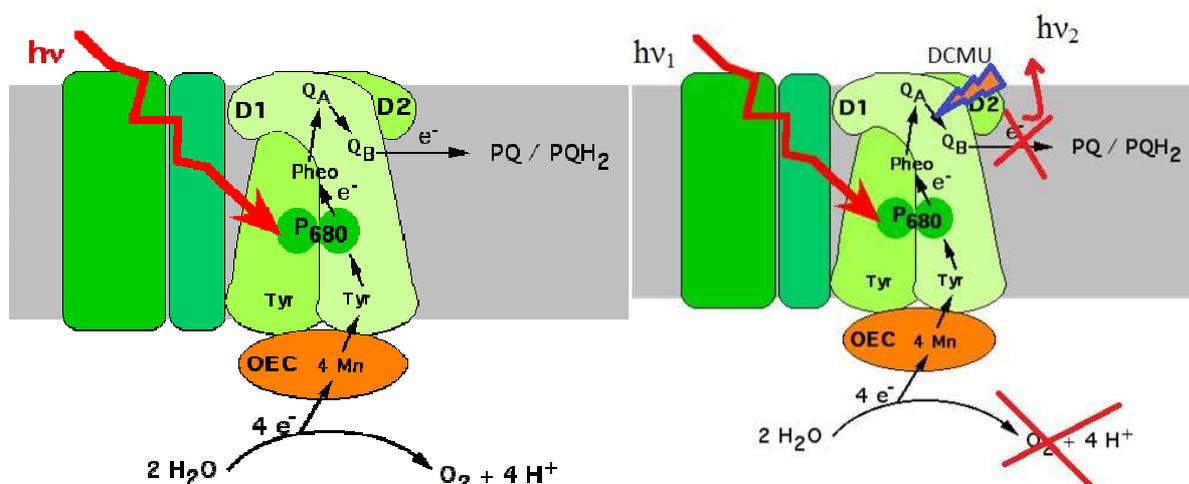


Figure 12 : mode d'action du DCMU. A gauche fonctionnement normal, à droite fixation du DCMU sur le site Q_B ce qui entraîne l'émission de photons de plus basses énergies. D'après <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/> (UPMC - UFR des Sciences de la Vie (UFR 927))

Certains toxiques peuvent bloquer ce transfert électronique. La photosynthèse est alors inhibée et l'énergie de désexcitation est dissipée par émission d'une lumière fluorescente qui peut être mesurée par fluorimétrie (la chlorophylle *a* et *b* sont excités aux longueurs d'onde comprises autour de 460 nm et émettent un signal autour de 680 nm). La photosynthèse et la fluorescence sont donc liées par une relation inversement proportionnelle.

Ainsi de nombreux auteurs exploitent ces propriétés pour détecter certains composés ou pour étudier la toxicité de certains effluents.

La fluorescence chlorophyllienne a été utilisée afin d'évaluer la toxicité de certains métaux lourds (cadmium) et de pesticides (atrazine et DCMU) chez *C. vulgaris*. Ces résultats ont abouti au développement d'un biocapteur pour la détection de ces composés (Nguyen-Ngoc et al., 2009). De même d'autres auteurs ont utilisé les microalgues pour étudier les effets de certains toxiques (atrazine, metribuzin, terbuthylazine, Diuron, KCN, glyphosate, carbofuran, malathion et methylparahion) sur la fluorescence de la chlorophylle *a*. Ils ont pu évaluer les effets de ces toxiques en moins de 20mn à de faibles concentrations (Choi et al., 2012).

Ces possibilités de mesure sur cellules entières, (activités enzymatiques, fluorescence chlorophyllienne) peuvent être exploitées de manière judicieuse afin de développer des biocapteurs.

4.3 Les biocapteurs pour des essais de terrain

Les biocapteurs appliqués à l'environnement sont étudiés actuellement pour le contrôle des eaux et des effluents hydriques ; leur développement s'est imposé afin de suppléer les essais écotoxicologiques et physico-chimiques conventionnels, inadaptés à la détection *in situ* et en continu des polluants (Osbold et al., 1995).

Un biocapteur est un système analytique formé de deux parties : un récepteur biologique capable de reconnaître une substance cible présente dans un milieu complexe et un transducteur qui traduit les modifications biochimiques (engendrées par la reconnaissance spécifique) en un signal électrique ou optique permettant de mesurer la concentration de la substance cible. Un biocapteur idéal doit rassembler les deux propriétés suivantes (Eltzov and Marks, 2011) :

- **sensibilité** (réponse aux faibles concentrations d'analytes) ;
- **spécificité** (capacité à discriminer des espèces en fonction des éléments de reconnaissance immobilisés).

Selon l'IUPAC (union internationale de la chimie pure et appliquée), le biocapteur doit être petit, compact, doit fonctionner sans addition de réactif, être réutilisable et la partie biologique doit être intimement liée au transducteur. Cette définition correspond au travail de pionnier de Clark et Lyons qui ont mis au point le premier biocapteur à glucose (Clark and Lyons, 1962). Actuellement, le terme biocapteur est associé à des systèmes bio-analytiques très performants qui ne répondent plus à la définition très stricte de l'IUPAC.

Dans un biocapteur l'élément biologique ou biorécepteur est généralement immobilisé sur ou au contact du transducteur. Le biorécepteur apporte une spécificité et une sensibilité très élevée par rapport aux capteurs chimiques. Ces qualités laissent à penser que les biocapteurs devraient remplacer dans le futur, les méthodes analytiques existantes. Toutefois l'utilisation d'un récepteur biologique impose des conditions d'utilisation douce, notamment pour le pH, la température, la force ionique, etc.

Les biocapteurs peuvent être classés selon le type de biorécepteur utilisé qu'il soit catalytique/métabolique ou qu'il agisse par affinité. Ils peuvent l'être aussi selon la nature de l'élément biologique fixé au transducteur. On peut distinguer les capteurs enzymatiques, les capteurs microbiens, les immunocapteurs à ADN, les capteurs à membrane à empreinte moléculaire (MIP).

Ils peuvent être aussi classés selon le signal engendré par la reconnaissance moléculaire (c'est-à-dire en fonction du transducteur). Les différents modes de transduction utilisés sont principalement électrochimiques (ampérométriques, potentiométriques, conductimétriques ou impédimétriques), massiques (quartz piézo-électrique) et optiques (SPR). Les transducteurs thermiques qui connaissent un développement important sont peu ou pas utilisés au niveau des biocapteurs (Asch, 2010).

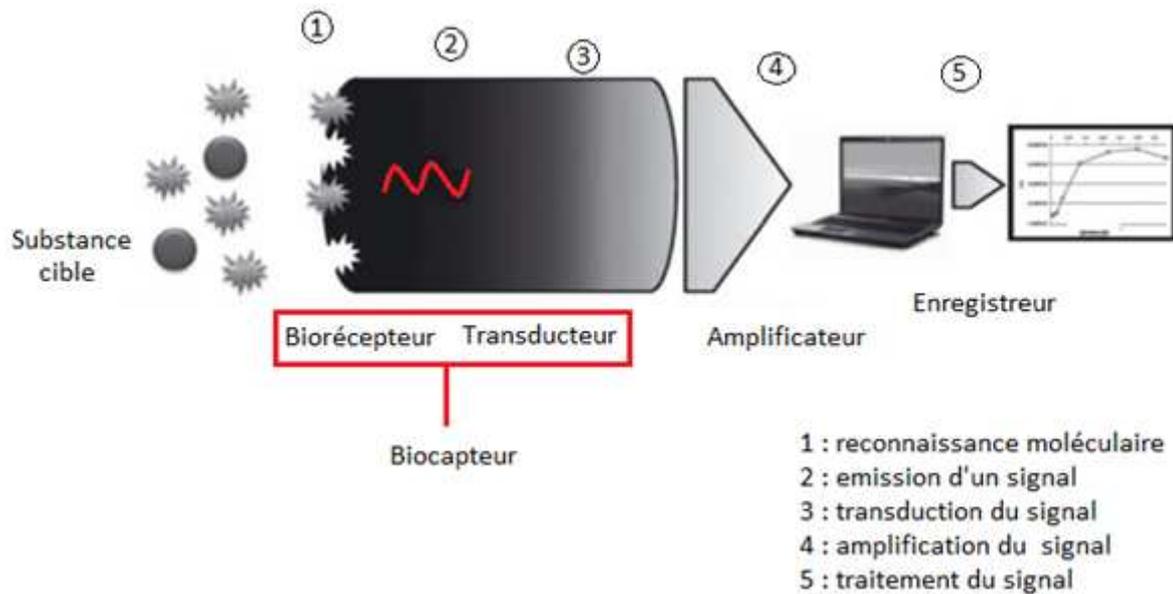


Figure 13 : représentation et fonctionnement schématique d'un biocapteur, adaptée de (Asch, 2010)

4.3.1 Les biorécepteurs

Les biorécepteurs peuvent être de nature très diverses, en relation avec la grande variabilité du monde vivant.

4.3.1.1 Les protéines

Enzymes : une enzyme catalyse une réaction avec une grande sélectivité en ce qui concerne le choix du substrat et la formation du produit. Aussi ce sont des précieuses alliées pour la détection d'une molécule d'intérêt dans une matrice complexe et actuellement les biocapteurs à enzymes purifiées sont les plus répandus. Quelques réalisations : un capteur à glucose utilisant de la glucose oxydase immobilisée (Cosnier et al., 1999) ou un capteur à caféine dont le fonctionnement est basé sur l'inhibition de la phosphatase alcaline (Akyilmaz and Turemis, 2010).

Immuno-récepteurs : tout comme les enzymes les immunoglobulines ont une grande sélectivité pour leur ligand (formation d'un complexe anticorps-antigène). Ce type de capteur est conçu en général pour doser les anticorps dans le sérum ; c'est le principe du test ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Quelques réalisations : (Ohno et al., 2013) ont par exemple développé un capteur permettant de doser l'immunoglobuline A (IgA) chez l'Homme. De la même manière un capteur pour doser l'immunoglobuline C (IgC) a pu être mis au point (Wang et al., 2013).

Récepteurs membranaires : ce sont des protéines non catalytiques et non immunitaires destinées à transmettre une information chimique extérieure à la cellule à l'intérieur de celle-ci. On a ainsi des récepteurs hormonaux ou à neurotransmetteurs par exemple. La réception de cette molécule entraînant généralement une cascade d'évènements (ouverture d'un canal ionique, excréation, ...) Il existe par exemple des capteurs à œstradiol utilisant un récepteur à base d'œstrogène α (Xia et al., 2010).

4.3.1.2 Les acides nucléiques

Les biocapteurs à acide nucléique (ADN et ARN) sont basés sur les propriétés de reconnaissance et d'autoassemblage de séquences complémentaires. On utilise des aptamères, oligonucléotides de longueur le plus souvent comprise entre 15 et 60 bases et qui possèdent une forte affinité et spécificité envers un ligand (petites molécules organiques, peptides, acides nucléiques, protéines, cellules entières) en adoptant une conformation particulière. Les biocapteurs à aptamères sont utilisés par exemple pour la détection de micotoxines ou de bactéries dans la nourriture (Paniel et al., 2010; McGrath et al., 2012) et plus généralement toute sorte de microorganismes pathogènes (Wang et al., 2012).

4.3.1.3 Les cellules entières

Les microorganismes peuvent constituer une source précieuse de biocatalyseur pour la conception de biocapteurs à cellules entières et se sont révélés être adaptés à l'immobilisation dans une configuration de biocapteur. Les microorganismes ont un certain nombre d'avantages en tant que matériaux biologiques de détection pour la conception d'un biocapteur : ils sont présents de façon ubiquiste et sont capables de métaboliser un large éventail de composés chimiques. Ils ont une grande capacité à s'adapter à des conditions défavorables et à développer la capacité de dégrader de nouvelles molécules avec le temps. Des biocapteurs ont été développés intégrant une large gamme de types de bactéries, de levures et d'algues. Par rapport à des biocapteurs utilisant des enzymes purifiées, les biocapteurs à cellules entières sont plus résistants à la perte d'activité car leurs enzymes et cofacteurs sont hébergés dans un environnement optimisé par la nature. Par conséquent, ces biocapteurs sont plus aptes à satisfaire toutes les exigences en matière de surveillance de l'environnement: ils peuvent identifier la présence *in situ* d'un composé toxique dès qu'il est libéré dans les eaux usées ou de l'environnement aquatique. D'autres biocapteurs à cellules entières ont été construits à partir des cellules génétiquement modifiées. Ces techniques peuvent améliorer la sensibilité et la sélectivité du biocapteur mais ne sont plus en mesure de refléter les conditions de fonctionnement des écosystèmes.

Bactéries : Les bactéries sont utilisées dans de nombreuses applications, à l'état naturel ou génétiquement modifié. A l'état naturel on les utilise notamment pour réaliser des capteurs à DBO (Liu and Mattiasson, 2002) On les utilise de manière génétiquement modifiées afin de leur faire exprimer un gène d'intérêt en cas de contact avec le polluant/la molécule recherchée. Le gène d'intérêt exprimant une protéine détectable grâce à un transducteur adapté. Par exemple via une fibre optique il est possible de détecter la fluorescence émise par la GFP (*green fluorescence protein*) synthétisée par des bactéries génétiquement modifiées.

Mycètes : Les levures sont également fréquemment utilisées dans la construction de biocapteurs ampérométriques (Akyilmaz and Dinçkaya, 2005; Akyilmaz et al., 2006). Mais il existe également des mesures optiques grâce à des levures bioluminescentes (Weitz et al., 2002).

Microalgues : Les microalgues (phytoplancton) ont été utilisées pour la surveillance des milieux aquatiques marins et dulçaquicoles avec différents types de transducteurs (Védrine et al., 2003; Chouteau et al., 2005) pour leur capacité à intégrer un large éventail de polluants. (Védrine et al., 2003) ont étudié la fluorescence de la chlorophylle de *C.vulgaris* tandis que (Chouteau et al., 2005) ont étudié deux enzymes présentes au niveau de sa paroi.

4.3.2 Les Transducteurs

En relation avec le grand nombre de biorécepteurs possibles et de réponses engendrées il existe de multiples transducteurs afin de convertir la reconnaissance moléculaire en un signal électrique interprétable.

4.3.2.1 Les transducteurs optiques

Lors de la reconnaissance avec la molécule cible le transducteur peut émettre une lumière ou voir ses propriétés optiques modifiées.

Fluorescence : On utilise fréquemment cette technique de transduction afin de détecter les variations de lumière émises par un biorécepteur après excitation de celui-ci. En effet lorsqu'une molécule reçoit un quantum de lumière cette dernière peut restituer cette énergie sous forme thermique, mécanique ou bien lumineuse. Dans ce dernier cas c'est un photon de plus basse énergie (de plus grande longueur d'onde) qui est émis. Rappelons que la chlorophylle *a* est une molécule qui fluoresce à 680 nm lorsqu'on l'excite à 460 nm. A l'aide d'un fluorimètre il est donc possible d'étudier le rayonnement émis par un corps après l'avoir excité à des longueurs d'ondes préalablement sélectionnées.

Les mécanismes utilisés pour détecter les molécules d'intérêts comprennent (Rogers and Poziomek, 1996):

- des liaisons réversibles de l'analyte au biorécepteur de surface, entraînant un changement observé du biorécepteur ;
- des réactions chimiques irréversibles entre l'analyte et le biorécepteur conduisant à la formation de chromophores ou fluorophores. Si le biorécepteur est une enzyme, il est alors aisé de suivre son activité si le produit de la réaction catalysée est fluorescent. L'activité estérase et l'activité phosphatase alcaline ont ainsi été étudiées sur des microalgues à l'aide de substrats non fluorescents mais donnant un produit fluorescent après catalyse avec les enzymes présentes à la surface des organismes étudiées (Regel et al., 2002; Guedri and Durrieu, 2009) ;
- la liaison de l'analyte à un biorécepteur qui entraîne des changements dans la fluorescence ou la luminescence observée. Citons les travaux de (Abel et al., 1996) qui ont développé un biocapteur pour suivre l'hybridation de brins d'ADN par fluorimétrie ;
- l'examen spectroscopique direct de la substance à analyser accumulée à la surface du transducteur. La fluorescence est par exemple fréquemment utilisée pour surveiller la santé des microalgues exposées à divers contaminants (Nguyen-Ngoc and Tran-Minh, 2007; Nguyen-Ngoc et al., 2009).

Absorbance : De la même manière que pour la fluorescence, des interactions entre la molécule d'intérêt et le biorécepteur sont susceptibles de modifier l'absorbance du système étudié. Aussi grâce à un spectrophotomètre il est possible de suivre ces variations. Par exemple (Lan et al., 2012) ont étudié l'activité de l'enzyme « Methyl Parathion Hydrolase » grâce à la mesure du produit formé par absorbance. Ils ont ainsi construit un biocapteur à pesticides organophosphorés.

4.3.2.2 Les transducteurs électrochimiques

Ampérométrie : Dans un capteur ampérométrique, on procède à une électrolyse d'une espèce électroactive entre une électrode indicatrice et une électrode de référence, en fixant une surtension E_A correspondant au palier limite de diffusion pour cette espèce. On détermine la hauteur du palier de diffusion, qui est proportionnelle à la concentration de l'espèce réduite ou oxydée à l'électrode indicatrice. Un étalonnage préalable en un point est effectué, dans les mêmes conditions. Les valeurs de courant mesurées sont extrêmement variables : elles dépendent notamment de la quantité d'espèces électroactives, de la surface de l'électrode indicatrice, etc. Elles sont généralement comprises entre quelques picoampères et quelques dizaines de milliampères. Cette technique a pu être utilisée pour créer un biocapteur à caféine en mesurant l'inhibition d'une enzyme (Akyilmaz and Turemis, 2010) ou encore utilisée pour la détection des aflatoxines dans la nourriture (Paniel et al., 2010).

Potentiométrie : Le potentiel du capteur (qui n'est parcouru par aucun courant) est mesuré par rapport à un potentiel de référence. Ce dernier est obtenu par une électrode de référence. Cette condition de courant nul est d'autant mieux respectée que la résistance aux bornes de laquelle sont branchées les électrodes est plus grande. En pratique, les voltmètres aux entrées desquels sont reliées les électrodes ont des impédances d'entrée très grandes ($> 10^{12} \Omega$).

Les différents types de transducteurs sont soit des transistors à effet de champ qui sont la base de toute la gamme de capteurs intégrés de type ChemFET (ISFET, GasFET, ENFET). Un capteur de type ISFET a été utilisé pour déterminer les pesticides organophosphorés (Hendji et al., 1993).

Conductimétrie : La mesure de la conductance d'une solution électrolytique s'effectue en immergeant dans la solution une cellule de mesure comportant deux électrodes dont la surface S et la distance sont déterminées par étalonnage dans une solution de conductivité connue. En première approximation, pour des solutions de concentration faible, la conductivité est proportionnelle à la concentration de l'électrolyte. Ces capteurs conductimétriques détectent toutes les espèces ioniques présentes dans la solution, leur utilisation demande de bien connaître la composition ionique des solutions puisqu'ils n'ont aucune sélectivité intrinsèque. La mesure de conductance ne peut être effectuée en courant continu, car il se produirait alors une polarisation des électrodes et une électrolyse entraînant une variation de résistance. Il est donc indispensable de réaliser la mesure en courant alternatif de fréquence suffisamment élevée pour éliminer ces effets perturbateurs. Pour les solutions faiblement conductrices, dont la conductivité est inférieure à quelques microsiemens, on emploie de préférence des fréquences de mesure faibles : 50 Hz par exemple. Pour les solutions fortement conductrices, dont la conductivité est supérieure à quelques millisiemens, des fréquences plus élevées sont employées : 10 kHz. Pour les solutions de conductivité moyenne, on utilise des fréquences comprises entre 10^2 et 10^3 Hz. Les biocapteurs conductimétriques ont pu être utilisés pour détecter le trichloréthylène, (Hnaïen et al., 2011) ou encore les polluants présents dans les milieux aquatiques via l'étude du métabolisme d'algues unicellulaires (Chouteau, 2004).

Impédimétrie : la transduction impédimétrique mesure les processus de transfert de charges qui se déroulent à l'interface électrode-électrolyte. Quand des cellules sont immobilisées à la surface d'une électrode et se déploient, il est attendu une augmentation significative de l'impédance du système, au moins aux basses fréquences (< 10 kHz), en raison

des propriétés isolantes des parois ou membranes cellulaires. En présence de composés cytotoxiques, les changements morphologiques ou les altérations fonctionnelles voire la mort cellulaire peuvent être observées par le suivi de l'impédance. Grâce à cette technique les effets du mercure, du cadmium, du benzalkonium, de l'arsenic, et du trinitrobenzène sur ont été étudiés sur des fibroblastes (Xiao and Luong, 2005).

4.3.2.3 Les transducteurs mécaniques

Balance à quartz : La microbalance à quartz est constituée d'une lame de quartz taillée sous l'angle cristallographique approprié ; sur les deux faces de cette lame sont déposées des électrodes circulaires en or entre lesquelles est appliquée une tension alternative. La fréquence de résonance du quartz va être modifiée par le dépôt d'une espèce chimique sur une des électrodes, le décalage relatif de la résonance en fréquence dépend de la masse de ce dépôt suivant la loi de Sauerbrey. La grande application de cette microbalance à quartz (QCM *Quartz Crystal Microbalance*) est la détermination des épaisseurs de dépôt dans les techniques de dépôt sous vide. L'application microcapteur chimique est liée au dépôt d'un matériau, sur une ou les deux électrodes, ayant des propriétés de reconnaissance spécifique et dans lequel l'espèce chimique vient s'adsorber. Cette technique a ainsi été utilisée pour détecter une bactérie pathogène, *Francisella tularensis*, en utilisant comme biorécepteur un anticorps spécifique de cette bactérie (Kleo et al., 2012).

Microstructure mobile : La technologie des capteurs à ondes acoustiques de surface (SAW *Surface Acoustic Wave*) repose sur le principe de l'effet piézoélectrique inverse. Chaque équipement de mesure comprend une unité d'interrogation, ainsi que le capteur associé à son antenne, la distance d'interrogation entre le capteur et l'unité d'interrogation pouvant aller jusqu'à plusieurs mètres en espace libre. L'onde électromagnétique envoyée par l'unité d'interrogation est reçue, puis traduite en onde acoustique au moyen d'un transducteur à la surface d'un matériau piézoélectrique, constitutif du capteur SAW (typiquement le quartz). Les fluctuations de températures liées à l'environnement proche de la surface de ce dernier engendrent une modification des propriétés physiques de l'onde acoustique se propageant en surface du dispositif. En retour, l'onde modifiée est transformée en onde électromagnétique pour être renvoyée vers l'unité d'interrogation.

L'absorption sélective d'un gaz dans un matériau spécifique déposé sur la surface du cristal modifie la masse et la conductivité superficielle de cette couche et, par là-même, les caractéristiques de propagation des ondes acoustiques superficielles.

Dans les systèmes de détection, on utilise des structures de type différentiel permettant d'éliminer certains effets interférents dont la température. La sélectivité de détection dépend de la nature des matériaux spécifiques, on utilise les mêmes dépôts que pour les microbalances à quartz. Pour pallier le manque de sélectivité absolue de ce type de capteur, on réalise des réseaux comprenant un grand nombre de ces capteurs, chacun d'eux étant recouvert d'un dépôt de matériau différent. Après une détermination des caractéristiques de réponse de chaque capteur dans des gaz purs, on peut réaliser l'analyse complète de mélanges de gaz.

Cette technique a été utilisée afin de détecter la fixation de cellules cancéreuses aux immunoglobulines fixées à la surface d'une puce en silicium (Bröker et al., 2012). De manière générale cette technique est souvent utilisée pour mesurer les variations de masses (Lee et al., 2012).

4.3.2.4 Les transducteurs thermiques

La transduction thermique porte sur la mesure de la chaleur dégagée ou absorbée au cours d'une réaction biochimique. L'évolution de la chaleur totale ou absorption est proportionnelle à l'enthalpie molaire et le nombre total de molécules de produit créé dans la réaction biochimique (Ramanathan and Danielsson, 2001). C'est une technique peu utilisée car technologiquement contraignante mais qui peut être complémentaire d'une autre, comme l'ampérométrie (Yakovleva et al., 2012).

Nous venons de voir les grandes catégories de biorécepteurs utilisés pour la fabrication des biocapteurs ainsi que les modes de transduction associés. Le Tableau 15 synthétise de manière simplifiée l'ensemble de ces données.

Tableau 15 : relation entre reconnaissance biologique et mode de transduction, d'après (Jaffrezic-Renault et al., 1994)

Biorécepteur	Effet de la reconnaissance	Mode de transduction possible
Système enzymatique	Modification de la concentration du produit	Ampérométrie
	Modification du potentiel redox	Potentiométrie
	Modification de la conductivité	Conductimétrie
	Chaleur de réaction	Thermique
Immunoespèces	Modification de la taille ou de la conformation	Optique
	Modification de la masse	Piézoélectrique
	Modification des propriétés électriques	Impédimétrie
Cellules entières	Modification de la fluorescence	Optique
	Modification de la conductivité	Conductimétrie

4.3.3 Techniques d'immobilisation

Le biorécepteur doit être intimement lié à son transducteur et la stratégie d'immobilisation choisie est fondamentale pour assurer un fonctionnement optimal du capteur.

Ainsi la technique choisie doit respecter un certain nombre de critères :

- Le maintien de l'activité biologique après l'immobilisation ;
- La proximité de l'élément biologique et du transducteur ;
- La stabilité et la durabilité de l'élément biologique ;
- La conservation de la sensibilité spécifique du biorécepteur pour l'analyte étudié ;
- Pour certains usages la possibilité de réutiliser le matériel biologique.

Il existe de nombreuses stratégies que nous décrivons ici.

4.3.3.1 *Couplage covalent*

C'est une technique très répandue pour immobiliser protéines et acides nucléiques. Elle est basée sur la formation d'une liaison covalente entre le biorécepteur et le transducteur grâce au choix d'un groupe fonctionnel (amine, carboxyle, sulfhydryle, hydroxyle, imidazole, phénolique, thiol, thréonine et groupes indoles). C'est une technique simple qui assure une liaison, directe ou indirecte, solide au transducteur. Dans tous les cas, la surface du transducteur doit être préalablement fonctionnalisée ou bien c'est la biomolécule qui doit être modifiée.

Couplage direct : C'est une technique bien adaptée aux biomolécules de petite taille. Elle est basée sur la fonctionnalisation de la surface d'une électrode avec une monocouche auto-assemblée ou encore avec un film polymère conducteur. Pour que la fixation soit réalisable, il faut que la biomolécule contienne un des groupements fonctionnels listés ci avant (Guedri, 2010).

Couplage indirect : Ce dernier intervient quand le couplage direct est peu convenable ou impossible. Contrairement à ce dernier, les biomolécules sont immobilisées sur la surface du transducteur à l'aide d'un intermédiaire chimique ou biologique. C'est par exemple le cas des thiols comme l'acide 3-mercaptopropionique (Zhao et al., 1999), ou du système biotine-avidine (Ouerghi et al., 2002).

Le principal désavantage du couplage covalent est qu'il nécessite certaines réactions chimiques pouvant être toxiques pour les organismes étudiés. De plus le processus d'adsorption physique provoque l'apparition de faibles liaisons électrostatiques pouvant conduire à la désorption du biorécepteur (Lagarde and Jaffrezic-Renault, 2011).

4.3.3.2 *Inclusion dans un gel*

Les techniques d'inclusion permettent d'encapsuler des cellules entières tout en maintenant leur activité biologique.

Agarose : L'agarose est un polysaccharide présent dans certaines algues (algues rouges) et qui a un haut pouvoir gélifiant. De plus c'est un matériau biocompatible, translucide et qui est donc fréquemment utilisé pour l'immobilisation des biorécepteurs. L'agarose peut être utilisé en association avec d'autres composés pour immobiliser leur biorécepteur, comme l'acide nitrilotriacétique (NTA) (Lan et al., 2012) ou le sol-gel (Ferro et al., 2012).

Alginate : L'alginate de sodium est un polysaccharide présent dans certaines algues (algues brunes) et, comme l'agarose, en plus d'être biocompatible il a un excellent pouvoir gélifiant. Il existe de nombreux travaux détaillant l'encapsulation de cellules entières dans des billes ou des gels d'agarose. Des cellules d'un mycète ont par exemple pu être encapsulées en vue de mesurer la biosorption du cadmium (Arica et al., 2001) ou encore. des bactéries immobilisées ont servi de biorécepteur à un capteur à DBO (Villalobos et al., 2010).

Chitosan : Tout comme l'agarose et l'alginate c'est un polysaccharide. On le produit à partir de la chitine, elle-même extraite de carapaces de crustacés. Le chitosan a l'exceptionnelle particularité d'être chargé positivement (en milieu acide), ce qui lui permet de réagir avec tous les composés biologiques chargés négativement (parois des bactéries par exemple) et donc de les fixer solidement par liaison ionique. Cette technique a pu être utilisée pour immobiliser une enzyme, la glucose oxydase dans le cadre de la mise au point d'un capteur à glucose (Miao et al., 2001).

Sol-gel : C'est une technique très attractive qui consiste à enfermer les molécules ou organismes d'intérêt dans un matériau vitreux inorganique synthétisé à température ambiante. Le matériau formé est doté de grandes propriétés optiques (transparences) et mécaniques (rigidité) apprécié dans des biocapteurs à transduction optique (Gupta and Chaudhury, 2007).

Polyacrylamide: Les gels de polyacrylamide sont obtenus par polymérisation du monomère acrylamide en présence d'un autre monomère bifonctionnel et donc réticulant, le N,N'-méthylène bisacrylamide (ou un équivalent). La porosité des gels obtenus dépend de la concentration totale en monomères et de la proportion d'agents monomères réticulants (le bisacrylamide). Un capteur ampérométrique à acetaminophène (paracétamol) a pu être mis au point grâce à l'immobilisation d'une enzyme, la peroxydase du raifort, dans un gel de polyacrylamide (González-Sánchez et al., 2011).

Le principal désavantage de l'inclusion des biorécepteurs dans un gel est la création possible d'une barrière de diffusion ou un blocage des pores par des polymères de taille importante (Abu-Rabeah et al., 2009). Ainsi dans certains cas on constate une altération de la sensibilité du biocapteur (Lei et al., 2006).

4.3.3.3 Confinement

Le confinement consiste à isoler les biorécepteurs à proximité du transducteur au sein d'un compartiment fermé par une membrane sélective. Il existe deux stratégies :

La filtration sur membranes : une solution contenant les biorécepteurs est filtrée à travers une membrane de Téflon (Arakawa et al., 2011), de polycarbonate (Lei et al., 2004), d'acétate de cellulose (Lanyon et al., 2006), de nitrate de cellulose (Gilbert et al., 2011), de silicone (Lawrence et al., 2013), de quartz (Védrine et al., 2003) ou encore de nylon (Narang et al., 2011). Les éléments biologiques d'intérêt sont alors piégés dans les mailles du filtre. Cette membrane étant ensuite fixée sur le transducteur.

Les membranes de dialyse : la seconde stratégie consiste à retenir les biorécepteurs près du transducteur à l'aide de membranes de dialyse, la porosité de cette dernière étant choisie en fonction de la taille du biorécepteur et des molécules étudiées (Simelevicius et al., 2012).

4.3.3.4 Réticulation

La réticulation est le processus par lequel des protéines sont liées entre elles à l'aide d'un agent de réticulation (glutaraldéhyde, acide bis-diazobenzidinde-2,2'-disulfure...). Ainsi, le glutaraldéhyde possède deux groupements aldéhyde à ses extrémités, qui réagissent avec les groupements amines primaires des protéines. On obtient ainsi un gel réticulé très stable, néanmoins des problèmes de superposition de biomolécules apparaissent et il peut en découler un effet sur la sensibilité du biocapteur. La réticulation est parfois utilisée en complément d'autres méthodes pour améliorer la stabilité mécanique de la structure, on parle alors de co-réticulation.

4.3.3.5 Co-réticulation

On associe parfois d'autres molécules (protéines supports) lors de la réticulation afin d'augmenter les performances de l'immobilisation. On associe ainsi fréquemment l'albumine de sérum bovin (abrégiée BSA pour *bovine serum albumin*) (Chouteau et al., 2004) ou la gélatine (Akyilmaz and Dinçkaya, 2005) au glutaraldéhyde comme agent réticulant. Cette méthode simple et rapide offre une bonne perméabilité aux électrons pour les mesures électrochimiques.

Mais les méthodes de réticulation et co-réticulation ont certains désavantages, en particulier celui de créer des ponts entre les groupes fonctionnels situés à la surface de la membrane des microorganismes et le glutaraldéhyde. Ainsi la survie des cellules peut être compromise. C'est pourquoi le temps de contact entre le biorécepteur et l'agent réticulant doit être choisi avec la plus grande rigueur.

4.3.3.6 Langmuir-Blodgett

Un film de Langmuir-Blodgett contient une ou plusieurs couches monomoléculaires d'une substance organique, déposées à la surface d'un liquide sur un solide en immergeant le substrat solide (une lamelle de quartz par ex.) dans le liquide. Une monocouche est adsorbée de façon homogène lors de chaque étape d'immersion. En procédant à plusieurs passages, il est possible d'empiler ainsi jusqu'à plusieurs dizaines de monocouches (la limite possible dépendant du type de molécule). Ainsi des films d'épaisseur très précise peuvent être formés. Cette épaisseur est exacte car l'épaisseur de chaque monocouche est connue et peut donc être ajoutée afin de trouver l'épaisseur totale du film. Les monocouches sont assemblées verticalement et sont généralement composées de molécules amphiphiles avec une tête hydrophile et une queue hydrophobe (acides gras tels que l'acide béhénique ou la stearylamine).

Si l'on dispose d'une biomolécule adéquate pour cette technique de dépôt et susceptible de fixer les molécules à détecter, la conception du capteur est aisée. Cependant il est concevable que ce ne soit généralement pas le cas. Aussi il a été envisagé une procédure plus générale qui consiste à inclure dans la cuve, au moment de la réalisation du film, un faible pourcentage du biorécepteur. Il est ainsi possible de le fixer sur le quartz via le film de Langmuir-Blodgett qui joue alors le rôle d'un filet aux mailles suffisamment lâches pour autoriser la détection, sans pour autant permettre au biorécepteur de quitter la surface du quartz.

Un film de Langmuir-Blodgett contenant une enzyme (la butyrylcholinestérase) a ainsi été utilisé pour détecter les pesticides organochlorés (Wan et al., 2000).

4.3.3.7 Adsorption physique

Billes magnétique : Les billes magnétiques servent à fixer le biorécepteur qui fixera à son tour les espèces cibles. Leur utilisation permet d'augmenter la surface active et de ce fait augmenter la sensibilité. L'application d'un champ magnétique permet d'attirer les billes magnétiques et leur revêtement biologique contre le transducteur. Leurs applications sont extrêmement variées et peuvent être utilisées avec un grand nombre de mode de transduction et des biorécepteurs (immunoglobulines et acides nucléiques principalement) (Jaffrezic-Renault et al., 2007).

Nanomatériaux : Récemment les nanomatériaux ont joué un rôle grandissant pour le développement des biocapteurs. Typiquement les nanoparticules d'or, les nanobilles magnétiques et les nanotubes de carbone ou de titane servent à immobiliser un grand nombre de biorécepteur pour les biocapteurs électrochimiques. Ainsi les nanotubes de carbone ont été beaucoup exploités pour immobiliser des bactéries, comme l'ont réalisé par exemple (Huang et al., 2004; Timur et al., 2007). Des travaux menés sur des nanoparticules d'or ont montré qu'ils pouvaient servir de support pour immobiliser des récepteurs à œstrogène (Xia et al., 2010). Pour ce qui est des nanoparticules magnétiques de nouvelles applications biomédicales sont en train d'émerger dans le domaine des biocapteurs (marquages de médicaments, IRM, etc) (Osaka et al., 2006).

Le Tableau 16 récapitule les techniques d'immobilisation fréquemment utilisées ainsi que leurs principaux avantages et inconvénients.

Tableau 16 : techniques d'immobilisation du biorécepteur sur le transducteur, d'après (Jaffrezic-Renault et al., 1994)

Technique d'immobilisation	Avantages	Inconvénients
Couplage covalent	Grande stabilité et grande variété de réactions possibles	Nécessite une surface de transducteur ou de membrane fonctionnalisable
Inclusion dans un gel	Biocompatible donc applicables aux organismes entiers	Biorécepteur non directement en contact avec le transducteur
Confinement	Le biorécepteur reste libre dans un compartiment fermé par une membrane sélective et conserve une activité maximale	Technique complexe
Réticulation	Peut être utilisé pour augmenter la stabilité des édifices obtenus avec des techniques d'adsorption physique ou d'inclusion dans un gel	Difficulté pour contrôler le degré de réticulation
Co-réticulation	L'utilisation d'une protéine inerte permet de minimiser l'inactivation du biorécepteur par l'agent réticulant	Difficulté pour contrôler le degré de co-réticulation
Langmuir-Blogett	Technique douce et obtention d'édifices supramoléculaires bien contrôlés	Stabilité de l'édifice médiocre en solution. Réservé aux transducteurs plans
Adsorption physique	Grande simplicité	Désorption de la molécule lors de variations de pH ou de la force ionique

4.3.4 Applications à la surveillance de l'environnement

Nous venons de voir les grandes catégories de biocapteurs existants, dont le fonctionnement est basé sur un vaste choix de biorécepteurs associés à des transducteurs adaptés.

Les applications des biocapteurs sont très diverses : agroalimentaire, santé, industrie... Dans le cadre de ce travail nous nous intéresserons uniquement aux dispositifs impliqués dans la surveillance de l'environnement.

De nombreux travaux de recherche portent sur la détection de polluants présents dans les matrices urbaines. Nous allons donc présenter les biocapteurs développés pour la détection des toxiques présents dans les RUTP ainsi que l'évaluation de l'impact de ces composés sur des espèces aquatiques. Aussi nous ne nous traiterons que des capteurs à cellules entières. Ce type de capteur est principalement développé en laboratoire et un petit nombre seulement d'études ont été menées sur des effluents réels, et un nombre encore plus faible a pu être testé dans des conditions réelles. Dans un second paragraphe nous traiterons spécifiquement des travaux ayant abouti à des mesures de terrain.

4.3.4.1 Détection et évaluation de l'impact de toxiques au laboratoire

Ce paragraphe traite des biocapteurs à cellules entières développés pour la surveillance de l'environnement, à savoir pour la détection de toxiques (substances prioritaires de la DCE) ou l'évaluation des effets de matrices environnementales sur des organismes aquatiques.

Détection / effets des ions nutritifs : Un biocapteur conductimétrique a été développé pour la détection des phosphates. Son fonctionnement repose sur l'étude de la phosphatase alcaline de cellules algales (*C. vulgaris*) immobilisées par réticulation. Grâce à ce type de capteur les auteurs de ces travaux ont obtenu une limite de détection de 0,4 μM (Guedri and Durrieu, 2009).

Détection / effets des ETM : Le même biocapteur conductimétrique a également servi pour la détection du cadmium. La mesure de la phosphatase alcaline a permis d'obtenir une limite de détection de ce métal de 1 ppb (Guedri and Durrieu, 2008).

Un biocapteur bactérien basé sur une transduction ampérométrique a été développé pour la détection des ions Cu^{2+} permettant d'obtenir une limite de détection de l'ordre du μM (Lehmann et al., 2000).

Détection / effets d'herbicides : De nombreux auteurs ce sont intéressés à la problématique des herbicides dans les milieux aquatiques et ont opté pour des transductions optiques basées sur la fluorescence de la chlorophylle chez les algues unicellulaires (Védrine et al., 2003; Nguyen-Ngoc and Tran-Minh, 2007; Peña-Vázquez et al., 2009).

Toutefois selon la nature des pesticides à détecter la mesure de la fluorescence chlorophyllienne peut s'avérer inefficace. Ainsi d'autres auteurs ont privilégié une transduction électrochimique. C'est le cas par exemple de Chouteau *et al.* (2005) qui ont travaillé sur des herbicides organophosphorés, et qui ont montré par conductimétrie que ces molécules inhibaient l'acétylcholine estérase des microalgues *C. vulgaris* immobilisées par réticulation sur des microélectrodes en or (Chouteau et al., 2005).

Des travaux ont également eu lieu en milieu salin et des biocapteurs basés sur l'étude de l'activité estérase d'algues marines ont permis de quantifier l'effet de différents herbicides (Guedri, 2010).

De récents travaux ont permis d'abaisser les limites de détection des pesticides à des valeurs très basses en étudiant par conductimétrie l'acétylcholine estérase de cyanobactéries, de l'ordre de 10^{-12} M pour le DCMU (Tekaya et al., 2013).

4.3.4.2 Monitoring in situ

Les biocapteurs ont peu été utilisés sur le terrain, les sites d'étude étant peu favorables à ce type de mesures exigeantes en matériel.

Toutefois quelques réalisations importantes méritent d'être mentionnées.

Mesure de la DBO : La demande biochimique en oxygène (DBO) est la quantité d'oxygène qu'il faut fournir à un échantillon d'eau pour minéraliser par voie biochimique les matières organiques biodégradables contenues dans l'eau (Chocat, 1997). On la calcule en général au bout de 5 jours dans le noir (on parle alors de DBO_5). Ce paramètre est le plus utilisé en station d'épuration et concernant les RUTP, il peut être utile, en particulier pour évaluer les risques d'effets de choc, de distinguer la DBO décantable attachée aux MES, la DBO colloïdale et la DBO dissoute.

La détermination rapide de la DBO (30 mn) peut être obtenue par des méthodes basées sur les biocapteurs (Marty et al., 1997). La plupart des capteurs à DBO sont des capteurs de type biofilm microbiens à cellules entières, qui reposent sur la mesure du taux de respiration bactérienne, situé à proximité d'un transducteur approprié. Une caractéristique commune de ces capteurs est qu'ils sont constitués d'un film microbien pris en sandwich entre une membrane de cellulose poreuse et une membrane perméable aux gaz comme élément de reconnaissance biologique. Ce film microbien est une population microbienne immobilisée qui peut oxyder le substrat organique à quantifier. Il est également possible d'utiliser d'autres organismes unicellulaires hétérotrophes tels que les mycètes. La réaction est en général une variation de la concentration en oxygène dissous ou d'autres phénomènes tels que l'émission de lumière. Un capteur physique est utilisé pour surveiller ce processus (électrode de Clark). Le résultat est un changement du signal électrique ou optique. Le signal est amplifié et corrélé à la teneur en matériau biodégradable mesurée.

Ce type de capteur a été utilisé pour mesurer en continue la DBO dans divers échantillons provenant de rejets industriels (usine de latex, hôpitaux, compagnie de transport, société de lavage de voitures, ...) grâce à l'utilisation de microorganismes présents dans des boues activées et immobilisés dans un gel d'alginate (Kumlanghan et al., 2008).

Les capteurs à DBO ont également été utilisés sur des rejets domestiques. Des travaux menés à l'université des sciences et technologies de Hong Kong, ont montré qu'il était possible de travailler sur des rejets domestiques riches en NaCl à cause de l'utilisation d'eau de mer dans les sanitaires. Ainsi grâce à l'utilisation de levures résistantes au sel les auteurs ont mis en évidence que ce type de biocapteur permettait la surveillance de la DBO des zones côtières (Lehmann et al., 1999).

Détection des ETM: Un biocapteur bactérien pour la détection et la quantification des métaux dans l'environnement a été développé et mis en application sur le terrain par Charrier *et al.* (2011). Les auteurs de cette étude ont mis au point des cartes bactériennes avec quatre souches d'*E. Coli* génétiquement modifiées capables d'exprimer un gène codant pour une protéine luminescente lors d'un contact avec une molécule d'intérêt, en l'occurrence ici un métal.

Malgré de bons résultats sur des échantillons de métaux pris à part, les auteurs ont pointé d'importantes difficultés d'interprétation des données lorsque les métaux se retrouvent ensemble. De nombreuses réactions croisées et d'effets synergiques ont pu être mis en avant. (Charrier et al., 2011a, 2011b).

Détection de pathogènes : Il peut être fort utile de détecter certains pathogènes dans les milieux aquatiques afin d'éviter des problèmes sanitaires que ce soit au niveau des eaux de consommation ou des eaux de baignades. Certains auteurs ont décrit les applications des biocapteurs à aptamères pour la détection des pathogènes : virus, bactéries, parasites (Wang et al., 2012). Nous pouvons citer une technique innovante pour la détection des salmonelles, basée sur des biorécepteurs nucléotidiques (apatamères) immobilisés sur des billes magnétiques (Joshi et al., 2009).

Nous pouvons faire à nouveau le constat du faible nombre d'études réalisées sur des effluents réels et/ou sur le terrain.

Résumé du chapitre 4

Deux approches sont possibles pour étudier la toxicité d'un effluent : une approche fondée sur l'étude des substances contenues dans les effluents et une seconde fondée sur l'effluent lui-même. Une fois l'approche choisie, nous avons présenté les tests écotoxicologiques (ou bioessais) utilisés en routine ou émergents permettant d'évaluer la toxicité d'une matrice sur un organisme. Enfin nous avons mis en avant le fonctionnement et l'intérêt que pouvaient représenter les biocapteurs pour la surveillance de l'environnement.

Que faut-il retenir ? Il n'existe pas une méthode, une technique permettant d'évaluer les dommages engendrés par un polluant, une activité, sur l'écosystème, ou même sur un seul type trophique. Les bioessais ont pour vocation de nous éclairer sur les effets et les mécanismes d'action des toxiques sur les êtres vivants. Nous avons vu qu'ils se déroulaient en laboratoire et, malgré l'information indispensable qu'ils apportent, étaient incomplets car éloignés du terrain. Aussi la grande diversité de biocapteurs qui émerge depuis de nombreuses années tend à apporter un début de solution à ce problème bien qu'à leur actuelle il reste encore de nombreux verrous techniques à lever avant d'obtenir un véritable outil de surveillance de l'environnement.

Bilan de l'étude bibliographique

L'étude de la littérature nous a permis de présenter la situation actuelle en matière de gestion des eaux pluviales en France. Après avoir étudié le contexte réglementaire et les outils techniques présents en milieu urbain, nous nous sommes intéressés à leur composition. Les rejets urbains de temps pluie comportent un grand nombre de polluants organiques et minéraux en rapport direct avec l'occupation des sols du bassin versant et les activités humaines du territoire. Ces rejets sont susceptibles d'impacter la qualité physicochimique du milieu récepteur mais également sa qualité écologique. Ces impacts, difficiles à prévoir, peuvent être évalués à l'aide d'outils de laboratoire, les bioessais écotoxicologiques. Ces tests fournissent des informations quant aux effets des polluants ou des matrices sur un type d'organisme voire un type trophique. Mais malgré des atouts indéniables ils souffrent d'un défaut important dans notre contexte ; celui de fournir des informations différées de l'évènement pluvieux. Aussi nous nous sommes intéressés aux biocapteurs car ce sont des outils capables tout comme les bioessais de nous renseigner sur la dangerosité d'un échantillon mais de manière plus fine et plus rapide que ces derniers. Toutefois, ces outils sont encore au stade du développement et très peu de tests « grandeur nature » ont été réalisés à ce jour. C'est pourquoi aujourd'hui malgré les progrès importants de la recherche réalisés ces dernières années, nous manquons sérieusement d'outils de surveillance de l'environnement.

Partie B : Démarche expérimentale

5 Description des sites et du matériel d'étude

5.1 Critères de choix

Dans le cadre de la fédération de recherche OTHU (présentée en introduction) trois ouvrages ont été sélectionnés, en fonction de leur fonctionnement (traditionnel ou technique alternative), des caractéristiques de leur bassin versant, de leur facilité d'accès et des connaissances préexistantes.

Nous avons ainsi retenu (Figure 14) :

- un déversoir d'orage, représentatif du fonctionnement d'un réseau unitaire et basé à l'aval d'un bassin versant de type résidentiel (situé sur la commune d'Ecully) ;
- deux bassins de rétention et d'infiltration des eaux, représentatifs des techniques alternatives et situés à l'aval d'un bassin versant de type industriel (sur la commune de Chassieu) et routier (sur la commune de Bron).

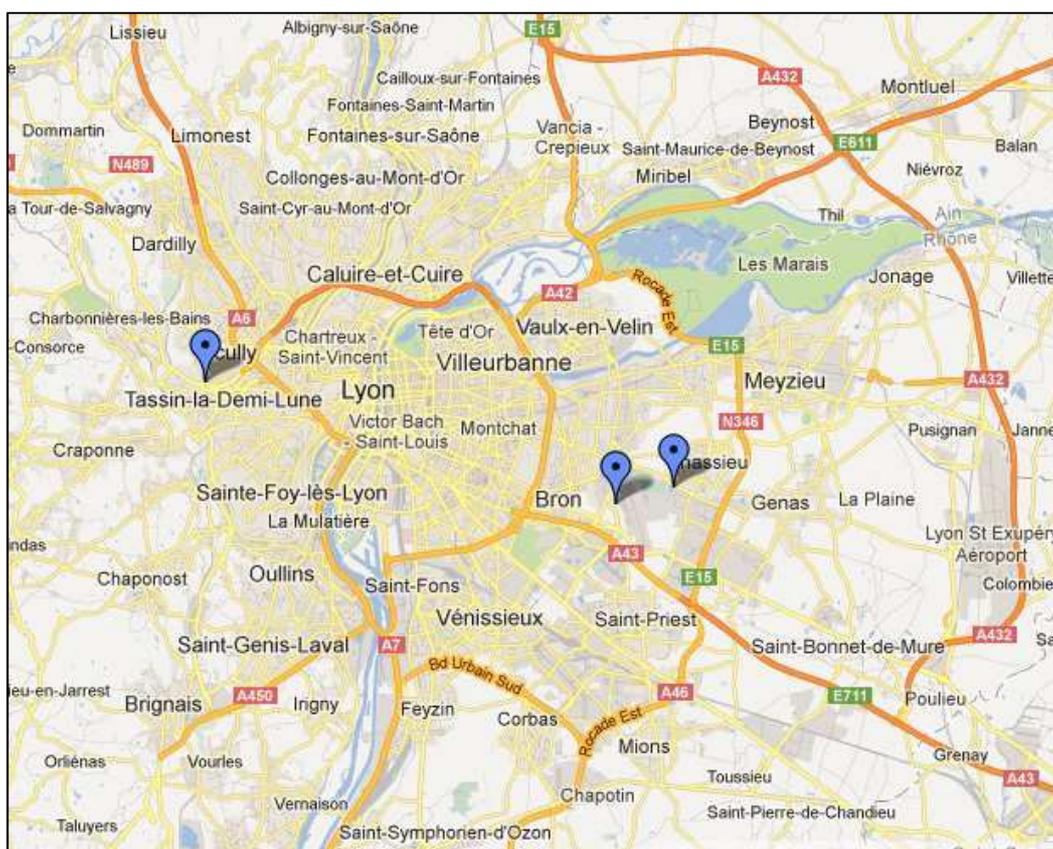


Figure 14: localisations des sites étudiés dans le cadre de cette étude, [source : google maps](#)

Les ouvrages d'Ecully et de Chassieu sont instrumentés par l'OTHU et ces infrastructures servent de support à nos recherches. Des stations de mesures sont installées et renferment divers instruments: des capteurs mesurent en continu, avec un pas de temps de 2 minutes, des paramètres quantitatifs (hauteur et vitesse) et qualitatifs (température, pH, conductivité et turbidité) sur les effluents. Une pompe péristaltique à débit constant de 1 l/s et une vitesse moyenne de succion de 1 m/s, alimente en continu un canal de transfert dans lequel sont placés les capteurs qualitatifs. Les capteurs quantitatifs sont eux installés directement dans les collecteurs (Figure 15).

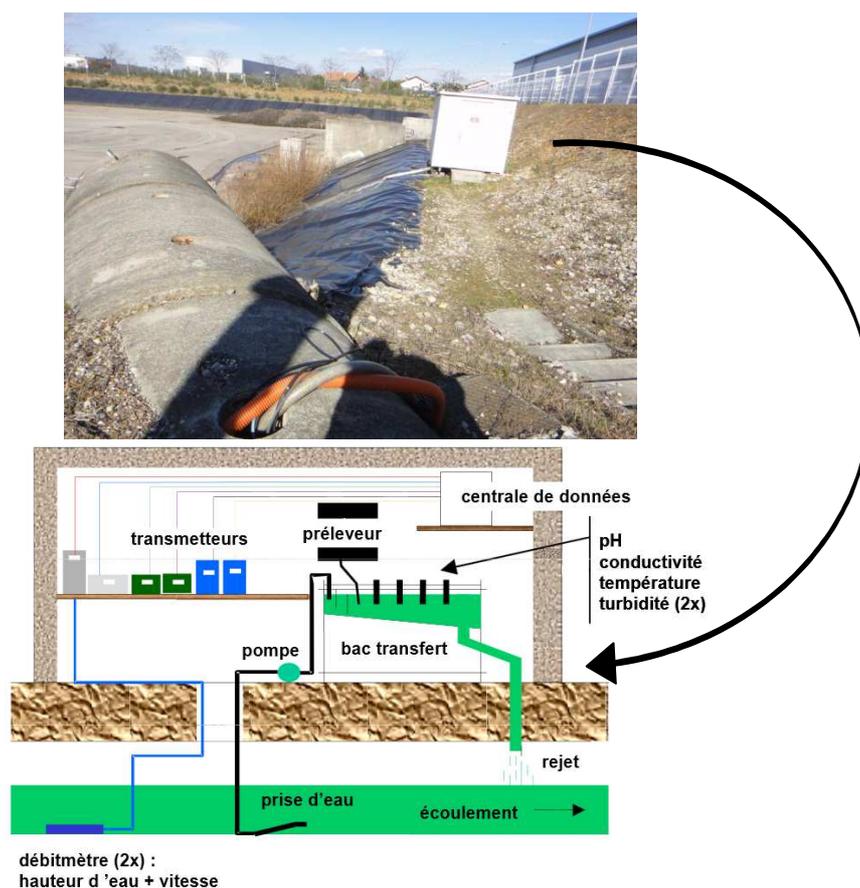


Figure 15 : station de mesure et schéma de principe, en place sur les sites OTHU, [source](#) : OTHU

5.2 Le déversoir d'orage d'Ecully

Ecully est une commune située dans la banlieue ouest de Lyon (7000 EH environ). Le bassin versant est une zone d'habitat résidentiel moyennement dense, imperméabilisé à 45 %. Ce bassin est drainé par un réseau d'assainissement majoritairement unitaire, avec quelques tronçons séparatifs (dans sa partie haute), cinq petits déversoirs d'orage et le déversoir du Valvert à l'aval, au niveau de l'exutoire. L'ensemble des effluents des déversoirs se jette dans les ruisseaux des Planches et le Trouillat lors des événements pluvieux sans passage par un système de traitement. Le déversoir du Valvert est le point principal de mesure (mesurage du débit et des flux de polluants). Le point de prélèvement de la pompe se situe dans la canalisation située à 3 m en amont du déversoir d'orage. Le Tableau 17 récapitule les caractéristiques principales du bassin versant d'Ecully.

Tableau 17: caractéristiques du site d'Ecully, d'après (Dembélé, 2010)

Commune	Ecully				
Coordonnées	N 45°45'58" - E 4°46'09"				
Type d'ouvrage	Déversoir d'orage				
Type de BV	Résidentiel				
Réseau	Unitaire				
Caractéristiques	Surface	Taux d'imperméabilisation	Pente	coefficient de ruissèlement	Temps de séjour
	245 ha	42%	2%	0,15	15 mn
Milieu récepteur	Ruisseau des planches				



Figure 16 : ruisseau des planches et déversoirs d'orage à Ecully, photographie personnelle

5.3 Les bassins d'infiltration et de rétention des eaux

Nous avons sélectionné deux ouvrages situés dans l'est lyonnais, composés de deux bassins en série. Le premier est un bassin de rétention qui a pour but de décanter les eaux collectées avant de les infiltrer dans le second bassin.

5.3.1 Chassieu

Le site de Chassieu est constitué d'un bassin versant, d'une surface de 185 ha, à dominante industrielle drainée par un réseau séparatif (Figure 17). Le réseau pluvial a pour exutoire un bassin de décantation suivi d'un bassin d'infiltration (Figure 18) situé au-dessus d'une nappe dont le toit est à 13 mètres de profondeur. Les volumes respectifs des deux bassins sont de 32 000 m³ (11 000 m² de surface) et 61 000 m³ (8 000 m² de surface). L'ensemble est situé dans la plaine de l'Est Lyonnais dont le substratum est composé de dépôts fluvio-glaciaires.

Le bassin de rétention reçoit en permanence, en plus des eaux pluviales, des eaux de temps sec issues de process industriels de la zone (eaux de refroidissement par exemple). Le point de prélèvement de la pompe se situe dans la canalisation à environ 10 m en amont de l'exutoire du réseau.



Figure 17 : bassin de rétention (BR) (à gauche) et d'infiltration (BI) (à droite) des eaux de Chassieu, source : google maps



Figure 18 : bassin de rétention des eaux de Chassieu, par temps sec (à gauche) et par temps de pluie (à droite), photographies personnelles

Le Tableau 18 récapitule les principales caractéristiques du bassin versant de Chassieu tandis que le Tableau 19 présente quelques activités et sources de pollution sur ce même bassin versant.

Tableau 18: caractéristiques du site de Chassieu, d'après (Dembélé, 2010)

Commune	Chassieu				
Coordonnées	N 45°44'176- E 4°57'490''''				
Type d'ouvrage	BR/BI				
Type de BV	Industriel et commercial				
Réseau	Séparatif et eaux de process (erreurs de branchement ?)				
Caractéristiques	Surface	Taux d'imperméabilisation	Pente	coefficient de ruissèlement	Temps de séjour
	185 ha	75 %	0,4 %	0,4	32 mn
Milieu récepteur	Nappe de l'est lyonnais				

Tableau 19: activités et pollutions sur le BV de Chassieu, source : association mi-plaine entreprises

Activité	Pollution dominante
Fabrication de machines-outils	métaux
Fabrication, vente et matériel de soudage	
Métallurgie	
Mécanique de précision - usinage	
Miroiterie, vitrerie	
Fonderie, alliages légers et cuivreux	
Fabrication outillage en carbure de tungstène et diamant	
Polissage, traitement des métaux	
Distributeur de zinc	
Mécanique générale	métaux, hydrocarbures
Imprimerie	métaux, solvants
SAV et commerce de moteurs diesel	métaux, hydrocarbures
Transport international	hydrocarbures, métaux
Transformation de matières plastiques	hydrocarbures, alkylphénols
Distribution de pétrole et dérivés	hydrocarbures
Distributeur et fabricant de résines	hydrocarbures, solvants
Mécanique, tôlerie, peinture, dépannage	solvants, métaux, hydrocarbures
Matières premières pour cosmétiques	solvants
Commerce de revêtement de surface	
Peinture industrielle	solvants, métaux
Fabrication bois et mobilier aluminium	pesticides, métaux
Distribution de produits chimique pour industries	tt types
Recyclage et récupération	
Fabrication négoce de produits pour laboratoires	

5.3.2 Bron

Le site de Bron est composé d'un bassin de décantation des eaux situé en amont d'un bassin d'infiltration, tous deux en aval d'un parking pour poids lourds d'une capacité de 350 places (Figure 19 et Figure 20). Le Tableau 20 récapitule les caractéristiques principales du bassin versant de Bron.



Figure 19: bassin versant (en rouge) du bassin de rétention (en noir) jouxtant l'aéroport de Lyon – Bron, source : google maps

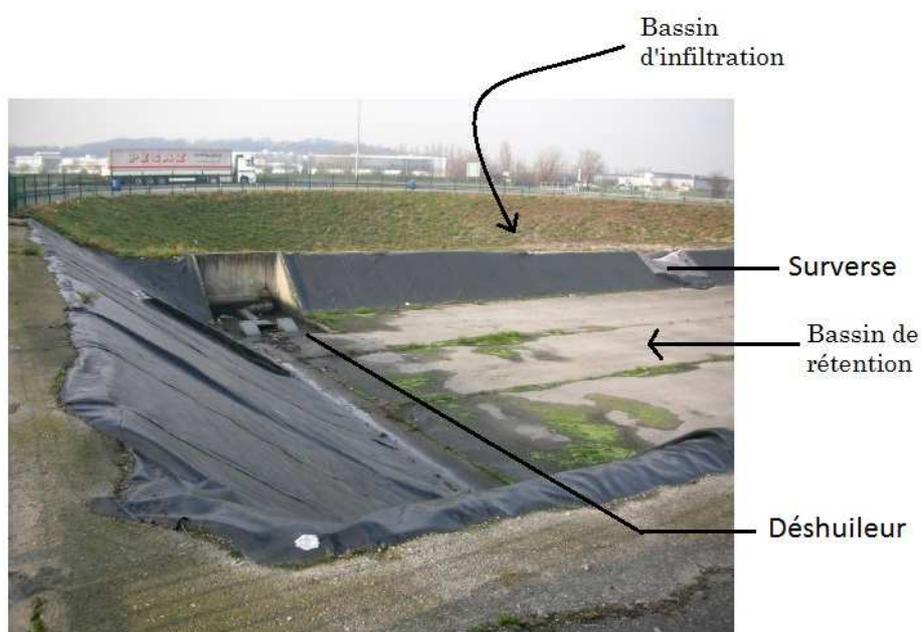


Figure 20: site par temps sec, photographie personnelle

Il faut noter un imprévu arrivé au cours de ce travail : ce parking a été fermé à partir du 16 novembre 2011 et n'a pas été réoccupé depuis. Cet impondérable a eu des conséquences quant à la variation de qualité des eaux rejetées dans le bassin comme nous le verrons par la suite.

Tableau 20 : caractéristiques du site de Bron, relevés personnels

Commune	Bron				
Coordonnées	N 45°43'53.82'' - E 4°56'6.48''				
Type d'ouvrage	BR/BI				
Type de BV	Routier (parking P.L)				
Réseau	Séparatif stricte				
Caractéristiques	Surface	Taux d'imperméabilisation	Pente	coefficient de ruissèlement	Temps de séjour
	4 ha	100 %	?	?	?
Milieu récepteur	Nappe de l'est lyonnais				

Nous concluons ce paragraphe par un récapitulatif des caractéristiques des sites étudiés (Tableau 21).

Tableau 21: récapitulatif des sites étudiés, d'après (Becouze-Lareure, 2010)

Site		Chassieu	Ecully	Bron
Surface totale (ha)		185	245	4
Occupation du bassin versant (% de la surface totale)		Industriel	Résidentiel	Stationnement poids lourds
	Imperméabilisation	75	42	100
	Espaces verts	20	60	0
	Zones agricoles	4	5	0
	Espaces naturels	4	1	0

5.4 Protocole d'échantillonnage

Les prises d'échantillons ont été faites manuellement à l'aide de flacons de 2L en plastique (PEHD) et après 3 rinçages du contenant avec l'effluent à recueillir.

Ces prélèvements ont été réalisés au cours d'une période de temps sec ou d'une période de temps de pluie. Les échantillons prélevés ne se veulent pas représentatifs de l'évènement pluvieux au cours duquel ils ont été récoltés, ce sont des « instantanés » et représentent donc l'état du rejet uniquement au moment du prélèvement.

Il aurait été possible d'utiliser les préleveurs automatiques existants pour reconstituer un échantillon moyen d'une pluie, mais au vu de leur manque de fiabilité et de la logistique nécessaire à leur bon fonctionnement nous avons voulu privilégier la souplesse et la réactivité afin de récupérer un plus grand nombre d'échantillons.

5.5 Protocole d'analyse

Bien que nous ayons fait le choix d'une approche écotoxicologique « matrice » il nous a semblé fondamental de connaître la nature et la quantité des polluants présents dans nos échantillons. Ainsi nous avons recherché systématiquement certains ions et métaux et quand cela était possible (coûts, volumes) la pollution organique (cf. ci-après).

Ions : sur chaque échantillon nous avons analysé (en interne) la quantité de nitrates (NO_3^-), de phosphates (PO_4^{2-}), de sulfate (SO_4^{2-}) et de potassium (K^+) dans la fraction dissoute (analyses réalisées par chromatographie ionique, Thermo Scientific Dionex DX-100).

Métaux : cinq métaux lourds (plomb, cadmium, nickel, cuivre et chrome) ont été dosés (en interne) sur la fraction dissoute par spectroscopie d'absorption atomique (Hitachi Z-8200).

Organiques : en parallèle, pour certains échantillons, des analyses non réalisables en interne ont été commandées au Service Central d'Analyse du CNRS⁷ afin de doser certains composés organiques figurant dans la liste des substances prioritaires de la DCE (en gras) et de

⁷ Institut des Sciences Analytiques - UMR 5280 Département Service Central d'Analyse (SCA) 5 rue de la Doua- 69100 VILLEURBANNE - France

la directive 2006/11 (souligné). Ces dosages ont été réalisés par chromatographie en phase gazeuse associée à la spectrométrie de masse à temps de vol (GC-ToF, AGILENT 6890N) et en chromatographie liquide à haute performance associée à la spectrométrie de masse (AGILENT 100/1200 et ABSciex/3200 QTRAP). Lorsque la quantité de MES était suffisante l'analyse de la fraction particulaire a pu être réalisée en complément de la fraction dissoute.

Tableau 22 : liste des substances organiques recherchées. En gras les substances prioritaires de la DCE (annexe X) et en souligné les substances de la liste I et II de la directive 2006/11

Pesticides	HAP	Alkylphénols
Alachlore	Anthracène	Nonylphénols (4-nonylphénol)
<u>Aldrine</u>	Acénaphène	Octylphénols (para-ter-octylphénol)
Atrazine	Benzo (a) Anthracène	Pentachlorophénol
Chlorpyrifos	Benzo (a) Pyrène	
Chlorfenvinphos	Benzo (b) Fluoranthène	
<u>op DDT</u>	Benzo (k) Fluoranthène	
<u>pp DDT</u>	Benzo (g, h, i) Pérylène	
pp DDE	Chrysène	
pp DDD	Dibenz (a,h) Anthracène	
<u>Dieldrine</u>	Fluoranthène	
Diuron	Fluorène	
Endosulfan	Indéno (1, 2, 3) Pyrène	
<u>Endrine</u>	Naphtalène	
Hexachlorobenzène	Phenanthrène	
Hexachlorobutadiène	Pyrène	
Hexachlorocyclohexane		
<u>Isodrine</u>		
Isoproturon		
Simazine		
Trichlorobenzène (TCB)		
Trifluraline		

5.6 Bilan des prélèvements et analyses

Les analyses des ions et des métaux ont été faites sur la fraction dissoute uniquement. Pour les organiques la fraction particulaire a été analysée lorsque cela était techniquement possible.

Tableau 23: bilan des prélèvements et analyses réalisés. d = analyse de la fraction dissoute uniquement ; d+p = analyse de la fraction dissoute et particulaire

Bassin versant	Date	Temps	Analyses réalisées		
			Ions nutritifs	ETM	Micropolluants organiques
Chassieu (13 prélèvements 6 temps de pluie 7 temps sec)	18/01/2011	sec	d	d	
	03/02/2011	sec	d	d	
	24/02/2011	pluie	d	d	
	03/03/2011	sec	d	d	d + p
	20/05/2011	sec	d	d	d + p
	13/07/2011	pluie	d	d	
	19/10/2011	pluie	d	d	
	02/01/2012	pluie	d	d	d + p
	05/01/2012	pluie	d	d	d + p
	20/02/2012	sec	d	d	d
	16/03/2012	sec	d	d	d
	25/04/2012	sec	d	d	
	21/05/2012	pluie	d	d	d + p
Ecully (5 prélèvements 3 temps de pluie 2 temps sec)	03/02/2011	sec	d	d	
	24/02/2011	pluie	d	d	
	03/03/2011	sec	d	d	d + p
	19/10/2011	pluie	d	d	d + p
	21/05/2012	pluie	d	d	d + p
Bron (5 prélèvements 5 temps de pluie)	31/05/2011	pluie	d	d	d + p
	13/07/2011	pluie	d	d	
	19/10/2011	pluie	d	d	d + p
	02/01/2012	pluie	d	d	d
	21/05/2012	pluie	d	d	d

Tableau 24 : nombre d'échantillons collectés et analysés

Chassieu						
	Ions nutritifs		ETM		Micropolluants organiques	
	Temps sec	Temps de pluie	Temps sec	Temps de pluie	Temps sec	Temps de pluie
Dissous	7	6	7	6	4	3
Particulaire	0	0	0	0	2	3
Ecully						
Dissous	2	3	2	3	1	2
Particulaire	0	0	0	0	1	2
Bron						
Dissous	/	5	/	5	/	4
Particulaire	/	0	/	0	/	2

6 Bioessais

6.1 Matériel biologique

Nous avons sélectionné trois souches de microalgues déjà présentées dans la partie A : *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlamydomonas reinhardtii*. Elles proviennent de l'algothèque du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN).

Les souches de microalgues sont entretenues par repiquage hebdomadaire dans le milieu LC oligo (AFNOR, 1980) pour *C. vulgaris* et *P. subcapitata* et dans le milieu Tris Acétique Phosphate (TAP) pour *C. reinhardtii* (Gorman and Levine, 1965) préalablement stérilisé par autoclavage (20 minutes, 130 °C, 1,3 bars). Les souches sont maintenues dans un cycle nyctéméral de 16 heures d'éclairement à 5000 lux et 8 heures d'obscurité.

6.2 Réactifs utilisés

Tableau 25 : liste des réactifs utilisés, fournis par Sigma-Aldrich à l'exception du silicate de sodium fourni par Riedel-de-Haen

Milieus de culture	AFNOR Oligo LC (Annexe) TAP (Annexe)
Substrats et réactifs pour la mesure de la phosphatase alcaline	Paranitrophénylphosphate (pNPP) Méthylumbelliférylphosphate (MUP) Méthylumbelliférone (MUF)
Substrats et réactifs pour la mesure de l'estérase	Fluorescéine Diacétate (FDA) Chlorure d'acétylcholine (AChCl) Fluoresceine
Substrats et réactifs pour la mesure de la catalase	Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)
Tampons	Tris-HCL Citrate Phosphate de potassium
Toxiques	Effluents Diuron (DMCU) Atrazine
Immobilisation du biorécepteur	Acide 3-Mercaptopropionique (MPA) Alginate de sodium Chlorure de calcium (CaCl ₂) Agarose Silicate de sodium (NaOH 10% SiO ₂ 27%) Nanoparticules de silice (Ludox)
Nettoyage des électrodes	Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂) Acide sulfurique (H ₂ SO ₄) Ethanol (CH ₃ CH ₂ OH)

6.3 Bioessais sur algues libres

Nous présentons ici les bioessais réalisés sur les algues libres, à savoir les mesures d'activités enzymatiques, de l'efficacité photosynthétique (fluorescence chlorophyllienne) et de la croissance cellulaire.

6.3.1 Activités enzymatiques

6.3.1.1 Principe

Nous suivons l'activité de trois enzymes chez l'algue *Chlorella vulgaris* (nous avons vu dans la partie A que ce sont des biomarqueurs de toxicité pertinents).

Pour la mesure de l'activité estérase et phosphatase alcaline les essais se déroulent dans des microplaques Costar 48 puits à fond opaque. Le principe repose sur la détection du produit fluorescent (P) suite à la réaction entre l'enzyme (E) et le substrat (A) grâce à un fluorimètre. L'appareil utilisé (Fluostar de BMG) permet une lecture quasi instantanée des puits. Cet appareil est commandé par le logiciel BIOLISE permettant d'étudier les cinétiques enzymatiques.

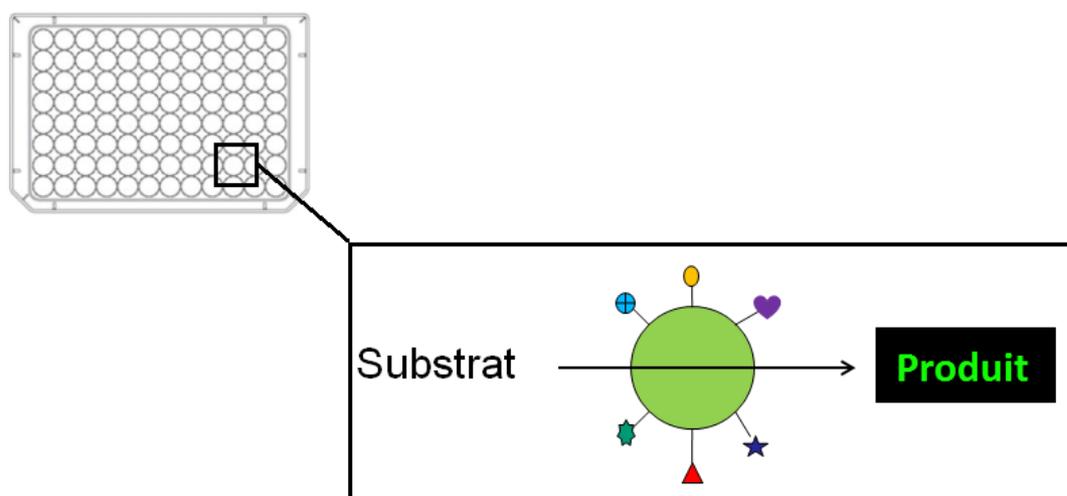


Figure 21 : principe de mesure des activités enzymatiques en bioessais

L'appareil fournit une mesure de fluorescence en unités arbitraires de fluorescence (U.A.F). Afin de connaître la relation entre la concentration en produit fluorescent et la mesure en U.A.F nous avons réalisé des gammes de dilution du produit concerné et des mesures de fluorescence. Ainsi 1 U.A.F de fluorescéine = 10^{-5} μ M et 1 U.AF de MUF = $3 \cdot 10^{-5}$ μ M.

6.3.1.2 Activité estérase

Les souches d'algues doivent être utilisées environ 3 jours après le repiquage lorsqu'elles sont en phase exponentielle de croissance. La concentration en algues doit être de l'ordre de 10^6 cellules par ml. On place 500 μ l de solution algale dans les puits de la microplaque que l'on met en contact soit avec un milieu témoin (eau ultrapure) soit avec l'échantillon à tester (effluent). On laisse incuber le mélange dans une enceinte thermostatée à 21 °C et avec une alternance jour/nuit de 16h/8h à 5000 lux durant un temps t variant de 2 h à 48 h. Une fois la durée d'incubation terminée, on centrifuge la microplaque à 3000 tr/mn afin d'enlever le milieu et conserver les microalgues.

Ensuite on incorpore aux algues de 50 µl à 500 µl de substrat, en l'occurrence de la fluorescéine diacétate (FDA) à 20 µM et on complète avec de l'eau ultrapure de manière à ce que le volume des puits soit constant. On crée un gradient de substrat de manière à pouvoir ensuite tracer vitesse initiale de réaction en fonction de la quantité de substrat introduite initialement. La concentration en produit formé (fluorescéine) dans le milieu réactionnel est suivie à l'aide du fluorimètre avec les paramètres d'excitation et d'émission 480/538 nm. Les essais répliqués trois fois.

Tableau 26 : composition du milieu réactionnel pour la mesure de l'activité estérase chez *C. Vulgaris*

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8
Algues	500	500	500	500	500	500	500	500
FDA (20 µM)	0	50	100	150	200	300	400	500
Eau	500	450	400	350	300	200	100	0
Total	500	500	500	500	500	500	500	500

6.3.1.3 Activité phosphatase alcaline

(Durrieu and Tran-Minh, 2002) ont montré que pour avoir une activité phosphatase alcaline maximale, les algues doivent épuiser leur stock interne de phosphate. Pour cela, les cultures algales en phase exponentielle sont centrifugées (3000 tours/mn pendant 10 mn) puis remises en suspension dans un milieu AFNOR LC sans phosphate (AFNOR-P) pendant 3 semaines au bout desquelles elles atteignent leur activité maximales. Elles sont ensuite conservées à 4 °C où elles conservent une activité constante pendant quatre semaines (Badreddine, 1996).

On procède ensuite comme pour la mesure de l'activité estérase ; les algues sont mises en contact avec l'échantillon test ou avec la solution témoin durant un temps t. Après centrifugation on incorpore le substrat (Méthylumbelliférylphosphate MUP), du tampon Tris-HCL (1M, pH 8,5) et on complète avec de l'eau ultrapure pour travailler à volume constant. On suit la quantité de produit formée au cours du temps à l'aide du fluorimètre avec les paramètres d'excitation et d'émission 355/460 nm. Les essais sont menés en tri réplicas.

Tableau 27 : composition du milieu réactionnel pour la mesure de l'activité phosphatase alcaline chez *C. vulgaris*

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8
Algues	500	500	500	500	500	500	500	500
Tris-HCl (1 M, pH 8,5)	50	50	50	50	50	50	50	50
MUP (20 µM)	0	50	100	150	200	250	350	450
Eau	450	400	350	300	250	200	100	0
Total	500	500	500	500	500	500	500	500

6.3.1.4 Activité catalase

La catalase est une enzyme qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en dioxygène :



Le peroxyde d'hydrogène est une molécule qui absorbe à 240 nm. Nous pouvons alors suivre la disparition du peroxyde d'hydrogène par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 240 nm. Cependant les protéines et acides aminés absorbant aussi à 240 nm, il est nécessaire d'éliminer le bruit de fond lié à ces paramètres.

Nous avons évalué l'impact des eaux pluviales du bassin de rétention de Chassieu (18/01/2011) sur l'activité de la catalase. Pour cela, nous prélevons 110 ml d'algues en phase exponentielle de croissance. Nous ajoutons 110 ml d'eaux pluviales et nous respectons des temps de contact de 1, 2 et 3 heures. Les algues sont ensuite centrifugées à 2000 tr/mn pendant 10 minutes à 24 °C et le culot est remis en suspension dans 110 ml de tampon phosphate de potassium pH 7, 0,05 M. La solution est répartie dans 11 tubes de 10 ml. Nous y ajoutons du peroxyde d'hydrogène à 6,44 mM et de l'acide chlorhydrique à 0,12 mM à t=0 s puis toutes les 30 secondes jusqu'à 5 minutes après mise en contact du substrat et des algues. Les solutions sont ensuite centrifugées à 2000 tr/mn pendant 10 minutes à 24°C. Les surnageants sont filtrés à 0,7 µm et l'absorbance des filtrats est mesurée à 240 nm.

6.3.2 Fluorescence chlorophyllienne

Comme pour les bioessais précédents on commence par exposer les microalgues à l'effluent à tester et en parallèle à une solution d'eau ultrapure (témoin). Les effluents à tester ont été utilisés tel quel ou après une filtration à 0,45 µm afin d'éliminer la plus grande partie des matières en suspension. Ainsi nous pouvons discriminer la part de la pollution sous forme dissoute de celle sous forme particulaire.

On procède à la mesure de la fluorescence chlorophyllienne grâce à un fluorimètre (Varian Cary Eclipse) avant la mise en contact et après un temps d'incubation variant de 2 à 48 h. Les paramètres d'excitation et d'émission utilisés correspondent à l'émission globale des chlorophylles de *C. Vulgaris* (résultats non publiés) : $\lambda_{ex} = 460$ nm et $\lambda_{em} = 680$ nm. Ce sont les variations d'intensité se traduisant par une modification de la hauteur du pic d'émission qui sont dans ce cas analysées. Elles sont comparées à l'augmentation de fluorescence induite par le DCMU qui provoque un blocage complet de la photosynthèse et par conséquent une fluorescence maximum. Les résultats sont traduits en matière de pourcentage d'activité photosynthétique résiduelle selon la formule suivante :

$$A_{res} (\%) = \frac{\Delta F_{essai}}{\Delta F_{témoin}} * 100$$

Avec $\Delta F = F_u - F_o$, F_u étant la fluorescence avant empoisonnement et F_o la fluorescence après empoisonnement au DCMU 4 mg/l. (Rebillard, 1989).

6.3.3 Croissance cellulaire

Les essais d'inhibition de la croissance cellulaire ont été réalisés selon à la norme en vigueur (NF EN ISO 8692). Nous utilisons des plaques de culture cellulaire dans lesquels nous introduisons 0,5 ml de milieu de culture, $5 \cdot 10^4$ cellules de la souche *P. subcapitata* et 4,5 ml du rejet à tester ou d'eau ultrapure pour l'échantillon témoin. Les essais sont menés en tri répliques. Les plaques sont placées sous lumière continue (5000 lux) à 21 °C durant $72h \pm 2$ h.

La concentration cellulaire des échantillons est mesurée à l'aide d'un hématimètre de Mallassez et on calcule le taux de croissance spécifique μ de l'échantillon tel que :

$$\mu = \frac{\ln xL - \ln x0}{tL - t0}$$

Avec xL la concentration cellulaire mesurée à l'instant L , $x0$ la concentration cellulaire nominale initiale, tL l'heure à la fin de l'essai et $t0$ l'heure du début de l'essai.

On calcule ensuite le pourcentage d'inhibition I de l'essai tel que :

$$I (\%) = \frac{\mu c - \mu i}{\mu c} * 100$$

Avec μc le taux de croissance du témoin et μi le taux de croissance de l'essai i .

Toutefois les mesures d'activités enzymatiques et de fluorescence chlorophyllienne sont faites sur les algues *C. vulgaris* cultivées avec le milieu de culture Lefebvre et Czarda (Oligo LC). C'est pourquoi, pour tous les essais réalisés sur effluent non dilué, nous avons réalisé en parallèle la même mesure mais en utilisant la souche *C. vulgaris* et le milieu Oligo LC.

De plus en parallèle des essais sur les effluents bruts, nous avons pour certains échantillons, réalisé des essais de mesure de la CE_{50} , dans le but de trouver la concentration en effluent qui inhibe 50 % de la croissance cellulaire. Pour cela nous avons procédé comme précédemment, en utilisant l'effluent brut, puis dilué à 1/10, 3/10, 1/2, 7/10 et 9/10 avec de l'eau ultrapure et nous avons préféré le milieu de culture Lefebvre et Czarda (Oligo LC) à celui préconisé dans la norme en vigueur.

7 Biocapteurs

7.1 Mesures conductimétriques

Le transducteur conductimétrique est composé de deux paires identiques d'électrodes interdigitées en or commercialisées par l'Institut of Semiconductors Physics, Kiev, Ukraine. Les deux paires d'électrodes interdigitées en or de 150 nm d'épaisseur sont déposées sur un substrat en céramique. Une couche intermédiaire de Ti de 50 nm d'épaisseur a été utilisée pour améliorer l'adhésion de l'or sur le substrat. La largeur des doigts constituant les électrodes interdigitées, ainsi que la distance entre elles est de 10 μm alors que leur longueur est d'environ 1 mm, ce qui permet d'avoir une zone sensible sur chacune des deux électrodes d'environ 1 mm². Pour définir la partie sensible du capteur, la partie centrale a été couverte de résine en époxyde (Figure 22).

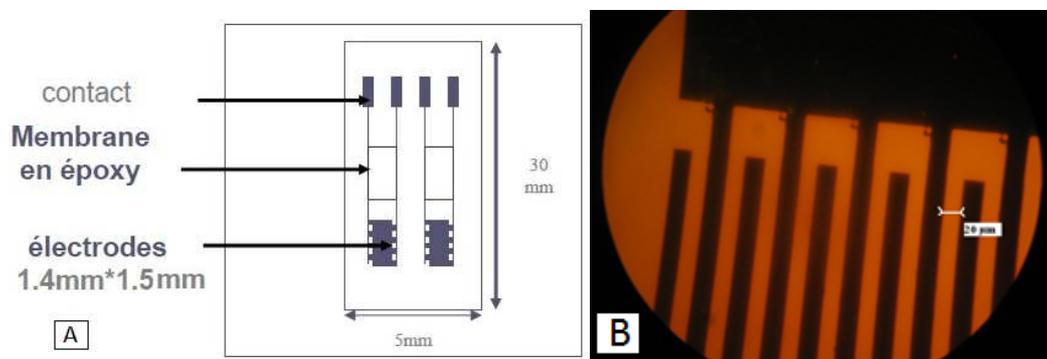


Figure 22 : schéma des électrodes interdigitées (Chouteau, 2004) (A) et zoom sur les interdigitations (B)

Les mesures sont basées sur la détection des variations de conductivité au niveau des zones sensibles liées à des mouvements d'ions entre l'anode et la cathode. Ici, c'est la phosphatase alcaline (APA) ou l'acétylcholinestérase (AChE) de *C. vulgaris* qui induisent des réactions catalytiques produisant des espèces ioniques aboutissant aux changements de conductivité mesurables. Les substrats utilisés sont respectivement le paranitrophénylphosphate (pNPP) pour les mesures de l'APA (Figure 23) et le chlorure d'acétylcholine (AChCl) pour la mesure de l'AChE (Figure 24).

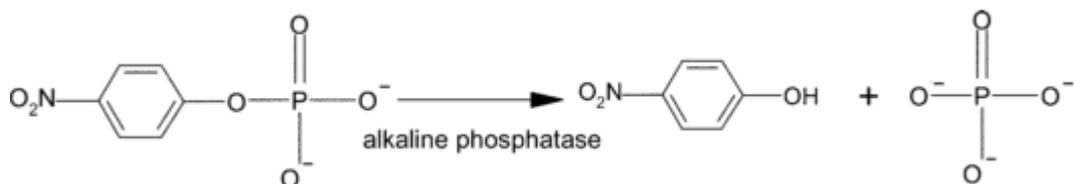


Figure 23 : dégradation du paranitrophénylphosphate par la phosphatase alcaline

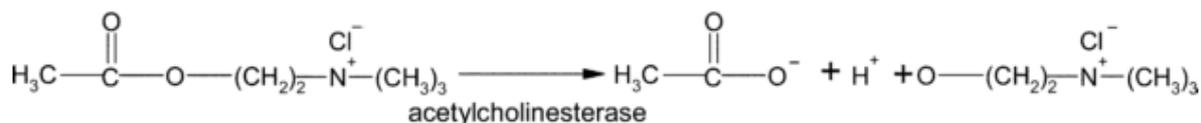


Figure 24 : dégradation du chlorure d'acétylcholine par l'acétylcholinestérase

7.1.1 Techniques d'immobilisation

7.1.1.1 Réticulation via BSA/glutaraldéhyde

L'utilisation de la technique d'immobilisation d'un biorécepteur avec la BSA a été introduite par (Dzyadevych et al., 1994) dans le cadre du développement de biocapteurs enzymatiques. Elle a ensuite été adaptée par (Chouteau et al., 2005) pour immobiliser des microalgues et utilisée par (Guedri, 2010). La membrane active est composée de 100µl de suspension algale à différentes concentrations et 10 mg de BSA. Pour les mesures de l'APA de *C.vulgaris*, la membrane active contient des algues préconditionnées dans un milieu AFNOR-P et pour les autres mesures (AE de toutes les souches et l'APA des algues marines) des algues fraîchement repiquées.

La membrane de référence est composée soit de BSA et d'algues non préconditionnées (mesure de l'APA de *C.vulgaris*) ou de membrane « blanche » ne contenant pas d'algues. 1 µl des mélanges ainsi réalisés sont déposés sur chacune des parties sensibles des microélectrodes interdigitées puis placés dans une atmosphère saturée en glutaraldéhyde pendant 20 minutes afin de permettre la réticulation des membranes. Enfin, les électrodes sont laissées à l'air libre pendant 10 minutes, le temps de sécher.

7.1.1.2 Les couches SAM

Les monocouches auto-assemblées (En anglais : *Self Assembled Monolayers*, SAMs) ont été utilisées pour la première fois pour immobiliser des cellules algales par (Guedri and Durrieu, 2008). Les électrodes interdigitées sont tout d'abord nettoyées aux ultrasons pendant 10 minutes, puis subissent une réduction chimique par immersion dans une solution de Piranha (H_2O_2/H_2SO_4 , 1:3 v/v) pendant 15 minutes. Les électrodes sont ensuite rincées à l'éthanol absolu et séchées sous un flux d'air. Les électrodes ainsi prétraitées sont immergées dans une solution d'acide 3-mercaptopropionique (MPA) à 2 mM pendant 12 heures à la température ambiante. Après la formation des couches SAMs, les électrodes modifiées sont rincées plusieurs fois à l'eau ultra-pure pour éliminer le MPA adsorbé physiquement sur la surface de l'électrode. 1 µl de culture algale est ensuite déposé sur les électrodes. On utilise pour cela une culture d'algues préconditionnée si l'on souhaite étudier l'APA ou en phase exponentielle de croissance si l'on souhaite étudier l'AE. La deuxième électrode reste libre et constitue ainsi l'électrode de référence. Le dépôt sera maintenu 12h sur les électrodes qui seront ensuite lavées avec de l'eau ultrapure afin d'enlever l'excès de cellules non immobilisées.

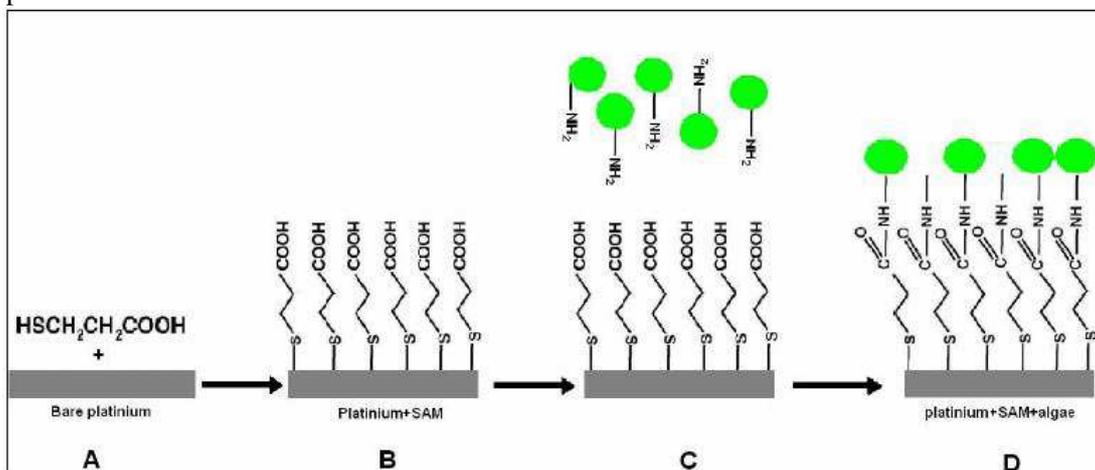


Figure 25 : représentation schématique de l'immobilisation des cellules algales sur l'électrode de platine modifiée par les couches SAMs. La figure n'est pas à l'échelle. Source : (Guedri and Durrieu, 2008)

7.1.2 Mesure des activités enzymatiques

7.1.2.1 Principe

Les mesures conductimétriques (Figure 26) sont basées sur une mesure différentielle entre l'électrode de travail (sur laquelle sont déposées les algues préconditionnées ou en phase exponentielle de croissance) et l'électrode de référence (vierge de tout dépôt). Grâce à un générateur, un signal d'excitation sinusoïdal de fréquence 100 kHz et d'amplitude 0,1 V est appliqué aux deux électrodes excitatrices. Les signaux de sortie mesurés au niveau des électrodes réceptrices dépendent de l'impédance du système. Dans le domaine des hautes fréquences utilisées ici, l'impédance réelle est alors égale à la résistance de la solution ce qui permet d'accéder à la conductance. Les signaux mesurés sont traités par la technique du *lock-in*, c'est à dire filtrés à l'aide d'une bande passante faible centrée sur la fréquence d'excitation puis transmis à la détection synchrone qui fournit la différence de conductivité entre l'électrode de travail et l'électrode de référence.

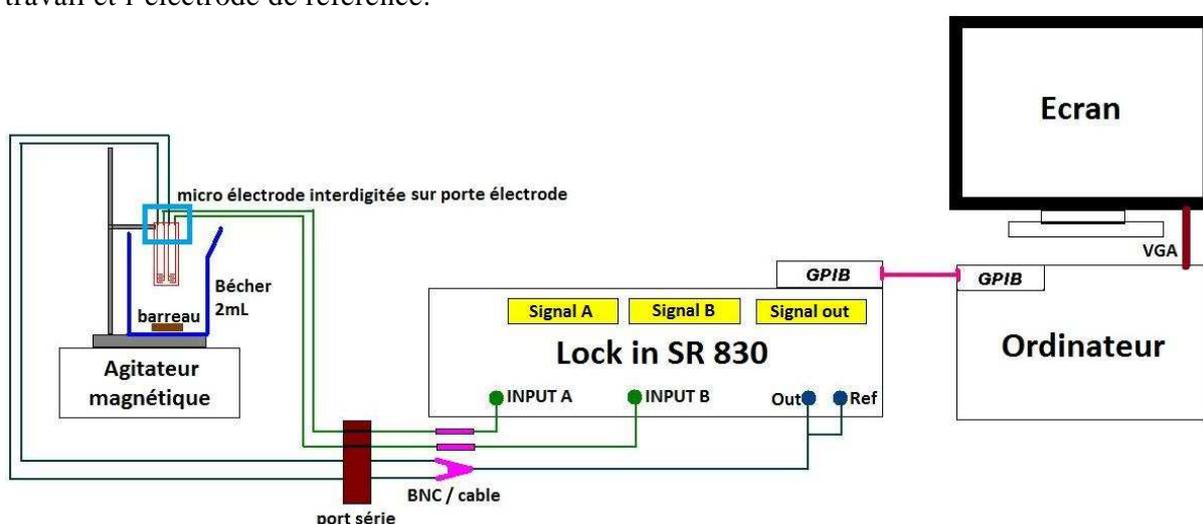


Figure 26 : montage expérimental pour les mesures d'activités enzymatiques à l'aide du biocapteur conductimétrique, (Dambre, 2011)

Les algues sont dans un premier temps immobilisées : sur les microélectrodes en or pour les mesures conductimétriques.

Ce n'est qu'une fois immobilisées qu'elles sont exposées à un polluant et respectivement à une solution témoin placée dans les mêmes conditions expérimentales. Ceci nous permet de mesurer l'effet de l'immobilisation sur la sensibilité aux polluants.

7.1.2.2 Prise de mesure – traitement des données

Les mesures ont été effectuées à température ambiante dans une cellule en verre de 2 ml. Le biocapteur est immergé dans l'eau ultrapure ou le tampon adéquat, en présence d'une agitation.

La séquence programmée avec le logiciel LabView 8.5 (National Instrument) est initiée. Le logiciel détecte un signal **dSi** (différence de potentiel entre l'électrode de travail et l'électrode de référence) qui met une dizaine de secondes à se stabiliser. Une fois le signal stabilisé, l'expérimentateur injecte une quantité q de substrat au temps t dans le milieu.

Une fois le substrat injecté on observe un pic (Figure 27), correspondant à la libération d'ions à proximité des contacts de la microélectrode **dSf**.

Une fois l'expérience réalisée le logiciel enregistre un fichier texte comportant deux colonnes, retournant à chaque pas de temps (colonne 1) les valeurs numériques de la différence de potentiel au cours du temps (colonne 2). Une macro Excel nous permet de récupérer la moyenne de la ddp au repos (dS_i) et après l'injection du substrat (dS_f) pour finalement nous donner $dS = dS_f - dS_i$, paramètre de référence de l'expérience.

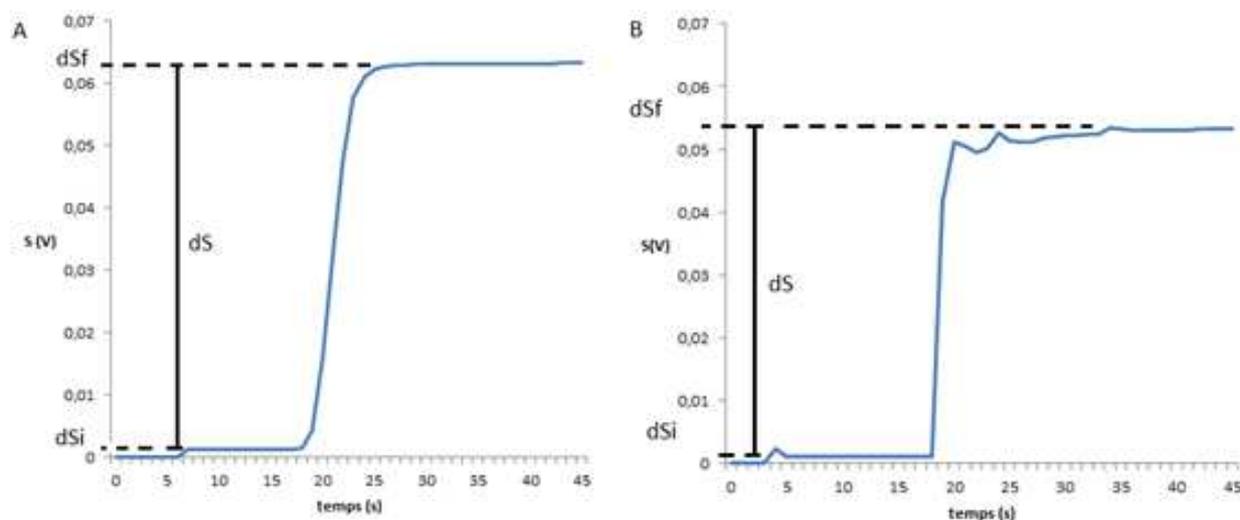


Figure 27 : une mesure témoin (A) et après exposition à un toxique (B)

Le paramètre dS que nous venons de mettre en évidence est proportionnel à la capacité de catalyse de la réaction et donc indirectement relié à l'état physiologique de la souche d'algue fixée sur la microélectrode. On peut définir ainsi une inhibition de l'activité enzymatique I , tel que :

$$I(\%) = \frac{dS_{\text{témoin}} - dS_{\text{essai}}}{dS_{\text{témoin}}} * 100$$

7.2 Dosage de l'oxygène

Une seconde stratégie pour le suivi de l'activité catalase consiste à suivre la formation du dioxygène dans le milieu réactionnel. Nous avons utilisé dans le cadre de cette étude deux types de sonde à oxygène : une électrode de Clark et une optode.

7.2.1 Mesure électrochimique

L'électrode de Clark (Figure 28) est composée d'une anode en argent et d'une cathode en platine entre lesquelles on maintient une différence de potentiel de 0,7 V. Sous l'influence de cette tension l'oxygène dissous dans la solution est transformé en ion hydroxyde captant ainsi 4 électrons. Au contact de l'anode les chlorures présents dans l'électrolyte se combinent à l'argent de l'électrode pour former du chlorure d'argent libérant alors 4 électrons. Il résulte de ces transferts d'électrons un courant très faible proportionnel à la concentration en oxygène.

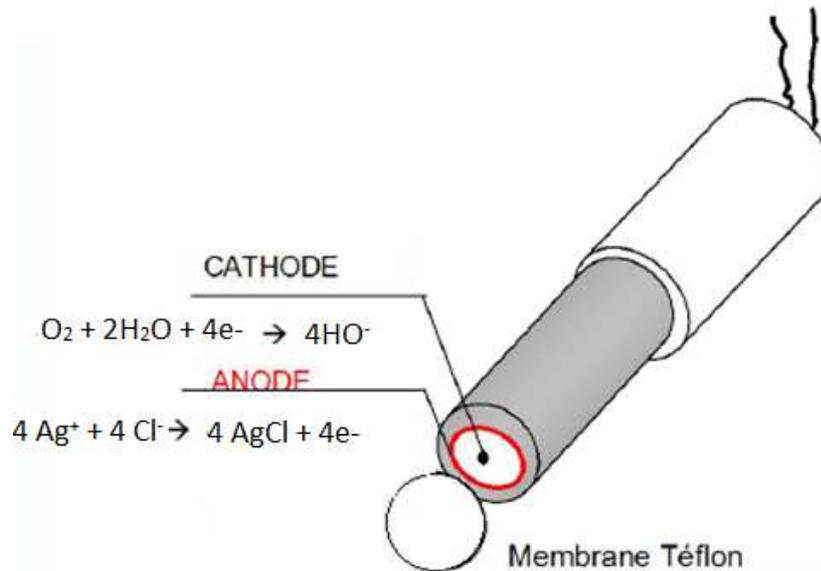


Figure 28 : fonctionnement d'une électrode de Clark

La mesure de l'activité catalase se déroule à l'aide d'une sonde à oxygène Inolab oxi 30 et du logiciel Multilab Pilot.de chez WTW

7.2.2 Mesure optique

Une optode repose sur un fonctionnement original (Figure 29) que nous présentons ici (Modèle HQ 40d, Hach).

Dans une optode l'oxygène dissous dans la solution migre vers le capteur. Il s'associe à un composé fluorescent présent dans la couche sensible et provoque par fluorescence une émission rouge quand il est stimulé par une diode laser bleue. Le composé fluorescent n'est pas consommé dans le process. De même l'oxygène n'est ni consommé ni chimiquement altéré. Le changement de couleur est détecté derrière le capteur au côté opposé à l'eau. La partie optique est isolée du process.

Couche de silicone noire

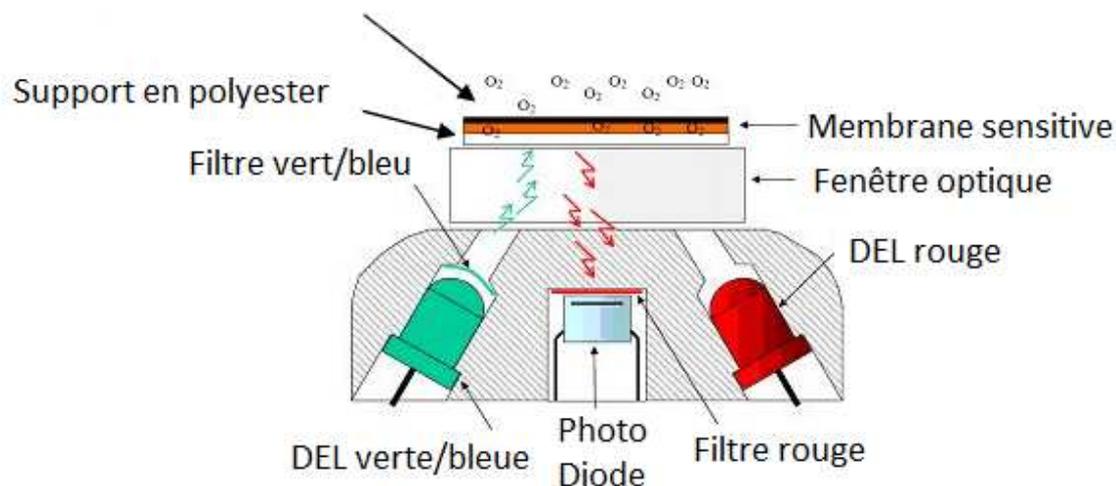


Figure 29 : fonctionnement d'une optode, d'après (Tengberg et al., 2006)

7.2.3 Techniques d'immobilisation

Un des principaux problèmes du travail sur site est le choix d'une technique appropriée d'immobilisation des cellules d'intérêt. Nous avons essayé différentes méthodes pour immobiliser les microalgues, le support ou la matrice devant remplir les critères suivants :

- Biocompatibilité ;
- Résistance mécanique
- Transparence ;
- Porosité suffisante pour permettre les échanges de matières (gaz, nutriments).

Ainsi après une étude bibliographique, notre choix s'est arrêté sur 3 techniques : la synthèse d'un gel d'agarose, la synthèse de billes ou d'un gel d'alginate et enfin la synthèse d'un hydrogel silicaté.

7.2.3.1 Agarose

L'agarose est un polysaccharide présent dans certaines algues (algues rouges) et qui a un haut pouvoir gélifiant.

Dans un bécher de 15 ml on introduit 9 ml de milieu de culture algal et 200 mg d'agarose, que l'on met à chauffer et agiter (Figure 30). Lorsque la température atteint les 45-50 °C l'agarose se dissout totalement dans le milieu. A ce moment on coupe le chauffage et on laisse refroidir en continuant à agiter. En attendant que ce mélange refroidisse on met à centrifuger 50 ml d'algues. On dilue le culot dans 1 ml de milieu de culture et on rajoute cette solution dans le bécher contenant l'agarose refroidi ($T < 30$ °C). On brasse le mélange. Avant que la solution ne commence à se figer on pipette 1mL de cette solution algale que l'on dépose dans un moule.

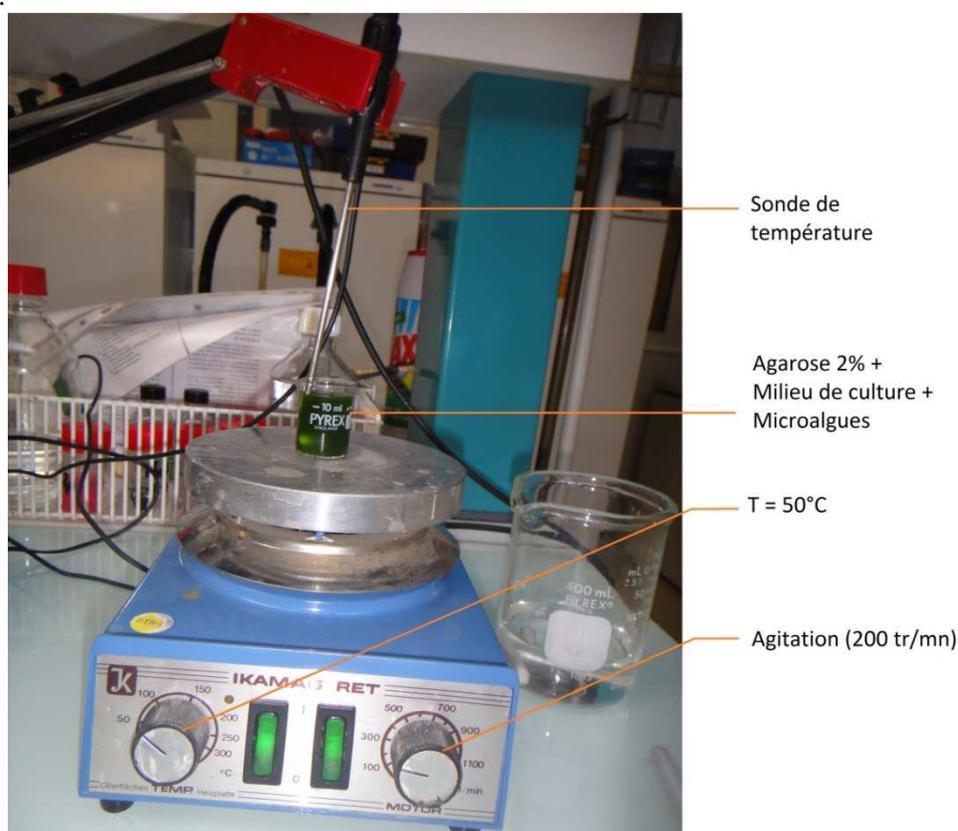


Figure 30 : préparation d'un gel d'agarose

7.2.3.2 Alginate

L'alginate de sodium est un polysaccharide présent dans certaines algues (algues brunes) et comme l'agarose il a un excellent pouvoir gélifiant.

Une solution d'alginate de sodium à 2 % est mise à agiter jusqu'à dissolution complète du composé. Puis on ajoute un volume de solution algale, un volume de tampon (Tris-HCl à 0,01 M, pH 7,5) à deux volumes d'alginate à 2 %. On agite vigoureusement pour assurer un brassage optimal. On obtient ainsi une solution de microalgues dans l'alginate à 1 % au pH souhaité.

D'autre part on prépare une solution de chlorure de calcium (CaCl_2) à 0,1M.

- **Billes d'alginate** : il est aisé de former des billes d'un diamètre de quelques millimètres à l'aide d'une pompe péristaltique et d'une seringue. La solution de microalgues dans l'alginate est pompée dans un tube silicone à l'aide de la pompe puis injectée dans une seringue de 10 ml. Cette seringue est placée à une vingtaine de centimètre d'un bécher contenant la solution de CaCl_2 . En régime permanent on assiste à une chute au goutte à goutte de la solution algale dans le bain de CaCl_2 , chaque goutte se gélifiant instantanément. On patiente 1 h pour un durcissement complet. Les billes sont récupérées puis rincées à l'eau ultrapure. Elles peuvent ensuite être stockées dans du milieu de culture à 4°C.
- **Gel d'alginate** : de la même manière il est possible de former un gel d'alginate en déposant la solution algale au fond d'un puits d'une microplaque. On dépose ensuite délicatement le même volume de CaCl_2 , et après 1 h on pipette l'excédent de liquide.



Figure 31 : billes et gels d'alginate

7.2.3.3 Sol-gel

La technique de synthèse du sol-gel consiste à réaliser la fabrication d'un matériau vitreux inorganique à température ambiante. Son principe repose sur la polymérisation de monomères silicatés. Plusieurs voies de synthèse sont possibles, nous avons choisi la voie aqueuse simple et peu coûteuse à mettre en place.

Nous sommes donc partis d'une solution de silicate de sodium, SIL, (Riedel-de Haën; NaOH 10 %, SiO_2 27 %) et d'une suspension de silice colloïdale, COL, (LUDOX HS-40, 40 % in water) avec une concentration totale en silice ajustée à 3,8% en quantité de matière dans le mélange initial des précurseurs. L'hydrogel synthétisé à un pH constant ($\text{pH} = 6,5 \pm 0,5$ ajusté avec le HCl), et avec une relation molaire en précurseurs de SIL:COL égale à 1:3.

Nous mélangeons les solutions SIL et COL tout en contrôlant le pH à l'aide d'un papier indicateur. Si besoin nous rajoutons quelques gouttes de HCl. Lorsque le pH passe en deçà de 8 la solution commence à se gélifier et se solidifie en quelques minutes. Nous obtenons alors un gel d'une grande qualité optique.

Les algues ne sont pas incorporées directement au sol-gel, le procédé de synthèse étant corrosif et pourraient être fatale pour les organismes. Aussi l'immobilisation se déroule en deux étapes :

- Synthèse d'une bille ou d'un gel d'alginate renfermant les microalgues ;
- Synthèse du sol-gel qui encapsule la bille ou qui recouvre le gel ;
- Dissolution de la matrice d'alginate à l'aide d'acide citrique.



Figure 32 : billes d'alginate dans une matrice sol-gel

7.2.4 Prise de mesure

Après immobilisation on place les microalgues face au toxique à évaluer (effluent ou pesticide) ou une solution témoin (eau ultrapure). On place le bécher de travail contenant 80 ml de tampon phosphate (pH 7 0,05M) sur un agitateur magnétique avec son barreau et on installe la sonde à oxygène avec les microalgues immobilisées. Une fois le signal stabilisé on injecte 400 µl de peroxyde d'hydrogène à 30 %. On mesure au cours du temps l'évolution de la concentration en oxygène dans le milieu.

7.3 Suivre de la fluorescence

7.3.1 Démarche

Dans le cadre de la mise au point de nouveaux outils de terrain et dans un but de simplicité nous avons commencé par travailler à l'aide de microplaques Costar 48 et 96 puits et du fluorimètre Fluostar de BMG.

Les mesures de fluorescence impliquent que le matériau d'encapsulation dispose de grandes qualités optiques en plus de celles décrites précédemment. C'est pourquoi nous avons travaillé uniquement avec des gels à base d'alginate, seuls ou avec un hydrogel silicaté.

7.3.2 Mesure des performances du capteur

Dans un premier temps il a fallu nous assurer de la biocompatibilité du matériau, premier critère fondamental de choix d'un matériau d'encapsulation. Le protocole est similaire à celui suivi dans la norme ISO 8692 sauf que dans le cas présent le toxique considéré est le processus d'encapsulation. Nous avons travaillé avec une microplaque de 48 puits et immobilisé les 3 souches de microalgues dans l'alginate puis recouvert cette membrane avec un hydrogel silicaté. L'épaisseur du sol-gel choisie étant de 1,9 mm et la concentration initiale de microalgues de 10^4 cellules/ml.

Dans un second temps il a fallu nous assurer de la qualité optique du matériau et du fait qu'il n'influe pas sur les mesures optiques que nous souhaitons réaliser. Aussi nous avons comparé les valeurs de fluorescence de la chlorophylle selon que les algues étaient libres, dans de l'alginate de sodium à 2% (Na(I)-alginate), dans l'alginate gélifié à l'aide du chlorure de calcium (Ca(II)-alginate) et enfin dans l'alginate gélifié et recouvert d'un hydrogel silicaté (Ca(II)-alginate/SiO₂). Ces mesures ont été réalisées à l'aide de microplaques de 96 puits.

Dans un troisième temps, nous avons testé la capacité des microalgues encapsulées à détecter un herbicide, le DCMU. Pour cela nous avons exposé les microalgues libres et encapsulées à du DCMU à 4 mg/l et mesuré les valeurs de fluorescence. Chaque mesure est répliquée six fois et avec chaque souche de microalgue, toujours en microplaque de 96 puits (Tableau 28).

Tableau 28 : composition des puits pour la mesure de l'effet du DCMU sur les microalgues immobilisées.
En souligné, les puits contenant du DCMU à la place du milieu Oligo LC

	CV	PS	CR	<u>CV</u>	<u>PS</u>	<u>CR</u>
Libres	50 µl algues + 50 µl TRIS + 170 µl H ₂ O + 30 µl DCMU ou milieu Oligo LC					
Na (I)-alginate	50 µl algues + 50 µl TRIS + 100 µl alginate 2% + 70 µl H ₂ O + 30 µl DCMU ou milieu Oligo LC					
Ca (II)-alginate	50 µl algues + 50 µl TRIS + 100 µl alginate 2% + 100 µl de CaCl ₂ (retirée après gélification) + 70 µl H ₂ O + 30 µl DCMU ou milieu Oligo LC					
Ca (II) alginate/SiO ₂	50 µl algues + 50 µl TRIS + 100 µl alginate 2% + 100 µl de CaCl ₂ (retirée après gélification) + 70 µl de Sol-gel +30 µl DCMU ou milieu Oligo LC					

Enfin pour terminer nous avons souhaité connaître la meilleure souche algale et les limites de détection d'un herbicide (l'atrazine) pour ce biocapteur. Chaque mesure est répliquée quatre fois et avec chaque souche de microalgue.

Tableau 29 : composition des puits pour la quantification des limites de détection de l'atrazine en fonction de la technique d'immobilisation

	Témoin	0,001 µM	0,01 µM	0,1 µM	1 µM	10 µM
Libres	50 µl algues + 50 µl TRIS + 170 µl H ₂ O + 30 µl polluants ou milieu Oligo LC (témoin)					
Na (I)-alginate	50 µl algues + 50 µl TRIS + 100 µl alginate 2% + 70 µl H ₂ O + 30 µl polluants ou milieu Oligo LC (témoin)					
Ca (II)-alginate	50 µl algues + 50 µl TRIS + 100 µl alginate 2% + 100 µl de CaCl ₂ (retirée après gélification) + 70 µl H ₂ O + 30 µl polluants ou milieu Oligo LC (témoin)					
Ca (II) alginate/SiO ₂	50 µl algues + 50 µl TRIS + 100 µl alginate 2% + 100 µl de CaCl ₂ (retirée après gélification) + 70 µl de Sol-gel +30 µl polluants ou milieu Oligo LC (témoin)					

7.3.3 Essais sur effluents réels

Après avoir validé les performances de ce biocapteur à l'aide de solutions synthétiques nous avons souhaité le tester sur des effluents urbains. Dans un premier temps nous avons suivi le même protocole que celui ayant servi à l'évaluation des herbicides, en remplaçant la substance active par l'effluent choisi. Avant les mesures de fluorescence nous remplaçons l'effluent par de l'eau ultrapure pour ne pas perturber la mesure de fluorescence.

Dans un second temps nous avons procédé comme sur algues libres pour la mesure de l'efficacité photosynthétique, à savoir que nous avons souhaité déterminer l'activité photosynthétique résiduelle après l'exposition au rejet A (%) (cf. 6.3.2).

Pour réaliser ces effets nous avons sélectionné deux effluents de temps sec prélevés le 03/03/2011 sur le déversoir d'orage d'Ecully et dans le bassin de rétention de Chassieu. Ces deux effluents ont montré un effet important sur la fluorescence chlorophyllienne d'algues libres c'est pourquoi ces rejets sont intéressants pour tester notre biocapteur.

8 Poste de mesures sur site

Afin de réaliser des mesures de toxicité sur site à l'aide du biocapteur conductimétrique nous avons entrepris la construction d'une station de travail pouvant fonctionner en semi autonomie de manière automatisée.

Concrètement plusieurs verrous techniques empêchaient jusqu'alors la réalisation de mesures sur site :

- Matériel volumineux et non transportable : alors que le biocapteur est de taille réduite, l'ensemble du dispositif de traitement du signal est lourd et encombrant.
- Présence indispensable de l'expérimentateur : une prise de mesure nécessite plusieurs étapes réalisées manuellement. En premier lieu l'installation du biocapteur sur son support, le paramétrage du *lock-in*, l'ajout des réactifs, du tampon, le changement du milieu réactionnel et le nettoyage des instruments.
- Conservation des réactifs : les solutions stocks (concentrées) se conservent plusieurs mois à -18 °C. Une fois diluées pour l'emploi elles peuvent se conserver 24 h à température ambiante.

Ainsi nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- Miniaturisation des équipements de laboratoire : travail avec les équipementiers électroniques afin de trouver le meilleur rapport encombrement/performances.
- Fonctionnement autonome : pour pouvoir réaliser des mesures en l'absence d'expérimentateur nous avons dû automatiser le système de prise de mesures. Pour cela deux stagiaires spécialisés en mécatroniques nous ont aidé en premier à définir notre plan d'action et dans un second temps à la réalisation du projet.

Liste du matériel utilisé :

Groupe capteur

- 2 supports de montage de laboratoire
- 2 noix de serrage
- 2 portes électrodes sur mesures en plexiglas
- 2 bécher Pyrex 150mL profil bas sur mesure avec olive de purge à la base
- 2 microélectrodes interdigitées en or

Groupe hydraulique

- une pompe péristaltique débit variable pour tuyaux 1-10mm (Gilson minipuls 2) ;
- 4 électrovannes 24 V filetage de sortie 26x34 (Gardenna) ;
- un programmeur d'arrosage automatique 24 V pour 4 électrovannes (Gardenna 4040) ;
- 2 réseaux pour programmeur d'arrosage automatique ;
- une prise relais 24 V d'automatisation de pompe ;
- 6 embouts plastiques 12x17 6 mm ;
- 6 réducteurs en laiton 26x34 – 15x21 ;
- 6 réducteurs en laiton 15x21 – 12x17 ;
- Tuyaux en silicone de diamètre 6 et 8 mm ;
- Tés en plastique de 6 mm.

Groupe substrat

- 2 seringues en plastique de 1 ml ;
- support enfichable en bois MDF avec équerres ;
- vérin linéaire – vitesse 1mm/s – course max 100 mm ;
- longeron poussoir à visser ;
- contrôleur d'alimentation TCP/IP (Gude Expert Power Control).

Groupe acquisition

- un ordinateur portable équipé du logiciel LabView (National Instrument) et des pilotes du lock in ;
- *Lock-in* Ametek signal recovery 7230 ;
- générateur de tension FG250 ;
- prises BNC / câbles électriques 1,5mm² ;
- câble informatique avec interface GPIB.
-

Le chapitre 13 (partie C) présente l'ensemble des étapes qui nous ont amené du laboratoire aux essais de terrains.

9 Analyse statistique

9.1 Logiciel

Afin de réaliser notre analyse statistique nous faisons appel au logiciel R.

R est en fait un langage et un environnement pour le calcul statistique et la réalisation de graphiques. R offre une grande variété de statistiques (modélisation linéaire et non linéaire, tests statistiques classiques, analyse de séries temporelles, classification, clustering, ...) et des techniques graphiques. Le langage S est souvent le véhicule de choix pour la recherche en méthodologie statistique et R offre une voie Open Source à la participation à cette activité.

R est un environnement dans lequel les techniques statistiques sont mises en œuvre. R peut être étendu (facilement) via des packages. Il existe environ huit packages fournis avec la distribution R et beaucoup d'autres sont disponibles sur la famille de sites Internet « CRAN » couvrant un très large éventail de statistiques modernes.

9.2 Données sources

9.2.1 Tableaux de données (Data set)

Les données utilisées sont toutes quantitatives et peuvent être divisées en trois catégories.

- En premier lieu nous disposons des résultats d'analyses physicochimiques : nutriments, métaux, alkylphénols, pesticides et HAP ;
- En second lieu les résultats des bioessais : inhibition de la croissance, de l'efficacité photosynthétique, de l'APA et de l'AE à après différents temps de contact ;
- Enfin des paramètres météorologiques du jour du prélèvement des échantillons : hauteur de pluie, durée de l'événement pluvieux, intensité moyenne et nombre de jours de temps sec précédant l'évènement pluvieux.

Les données physicochimiques sont exprimées dans des unités différentes : mg/l pour les ions, µg/l pour les métaux et ng/l pour les organiques. Les résultats des bioessais sont exprimés en pourcentage (sans dimension) et les paramètres météorologiques sont de dimensions variées.

On dispose donc de trois matrices X, Y et Z :

- X étant la matrice des valeurs écotoxicologiques,
- Y la matrice des paramètres physicochimiques ;
- Z la matrice des données météorologiques.

Ces trois matrices ayant le même nombre de lignes pour un site considéré (prélèvements) et différent par leur nombre de colonnes (variables décrivant ce prélèvement : physicochimie, toxicité, météo). Au vu du grand nombre de variables pouvant décrire un échantillon il a paru pertinent dans un certain nombre de cas de regrouper les polluants par grandes familles.

9.2.2 Gestion des valeurs manquantes

La plupart des tests statistiques requièrent des matrices de données complètes, c'est-à-dire sans valeurs manquantes. Dans de nombreux cas nous ne disposons pas des toutes les valeurs d'analyse ou de bioessais possibles pour un échantillon donné. Aussi lorsqu'une analyse vient à manquer nous remplaçons la valeur manquante par la limite de détection de ce composé. Pour les bioessais nous procédons différemment. Nous utilisons une technique dite « d'imputation ».

Nous utilisons une méthode basée sur la distance entre l'élément manquant et les autres valeurs obtenues : l'imputation des k voisins les plus proches (*k-Nearest Neighbor Imputation*). Cette méthode d'imputation utilise la mesure de la distance euclidienne. Les données compositionnelles sont représentées uniquement dans un espace simplexe (un simplexe est l'enveloppe convexe d'un ensemble de $(n+1)$ points utilisé pour former un repère affine dans un espace affine de dimension n), aussi nous devons utiliser une mesure différente de la distance, comme la distance d'Aitchison, défini pour deux compositions $x=(x_1, \dots, x_D)$ et $y=(y_1, \dots, y_D)$ tel que :

$$d_a(x, y) = \sqrt{\frac{1}{D} \sum_{i=1}^{D-1} \sum_{j=i+1}^D \left(\ln \frac{x_i}{x_j} - \ln \frac{y_i}{y_j} \right)^2}.$$

Ainsi la distance d'Aitchison prend soin du fait que les données compositionnelles incluent leurs informations seulement dans les ratios entre les parties. Une fois les k voisins les plus près d'une observation manquante identifiée, leur information est utilisée pour estimer celles manquantes. Pour des raisons de robustesse, l'estimation basée en utilisant les médianes est préférée à celle utilisant les moyennes. Si les données compositionnelles ne se résument pas à une constante, il est important d'utiliser un ajustement par rapport à la somme des parties impliquées dans l'imputation.

9.2.3 Transformation des données

On part de notre catalogue de données quantitatives à n objets et p variables. Il est important de travailler avec des données homogènes, c'est pourquoi on réalise un centrage et une réduction de la matrice de départ.

La « standardisation » fournit des variables sans dimension et élimine l'influence induite de magnitude différences entre les échelles ou les unités. Une procédure courante consiste à appliquer la combinaison centrage-réduction. Pour chaque variable cela consiste à : (1) calculer la différence entre la valeur initiale et la moyenne de la variable (le centrage) et (2) diviser cette différence par l'écart type de la variable (réduction).

9.3 Méthodes exploratoires

9.3.1 Mesure des corrélations

9.3.1.1 *Corrélation linéaire de Bravais-Pearson*

Cherchant une liaison dans une distribution à deux variables, il est possible d'établir une régression linéaire simple, « résumant » graphiquement un nuage de points par une droite, dite de régression. La « qualité » de cette régression est mesurée par le coefficient de corrélation. C'est la covariance entre la variable explicative x et la variable à expliquer y , rapportée au produit de leurs écarts-types. Le coefficient de corrélation linéaire simple, dit de Bravais-Pearson (ou de Pearson), est une normalisation de la covariance par le produit des écarts-type des variables.

$$r = \frac{\sigma_{xy}}{\sigma_x \sigma_y}$$

Comme une covariance est forcément inférieure ou égale au produit des écarts-type, le coefficient est compris entre -1 et 1. Un signe négatif indique que y varie en sens inverse de x et on parle alors de corrélation négative. Si le coefficient est proche de 0, les deux variables sont linéairement indépendantes tandis qu'une liaison linéaire est d'autant plus marquée que le coefficient s'approche de 1 ou de -1.

On remarque qu'il reste égal à lui-même, que la régression soit effectuée de y en x ou de x en y . C'est un nombre sans dimension, indépendant des unités de mesure des observations puisqu'on a « standardisé » la covariance.

Ce coefficient est noté r . Comme il mesure l'intensité qui lie deux variables seulement, le coefficient de corrélation ne peut résumer la qualité d'une régression multiple. Toutefois, il conserve dans ce cadre son utilité : calculé pour chaque paire de variables explicatives, il alimente la matrice des corrélations. Par conséquent, il permet de repérer les variables superflues.

9.3.1.2 *Coefficient de rang de Kendall*

Munissons-nous d'une distribution à deux variables. Généralement, la mesure d'une plus ou moins bonne corrélation entre elles est effectuée avec le coefficient de corrélation de Pearson, au besoin en utilisant un changement de variable si la liaison n'est pas linéaire. Parfois cet outil devient inopérant : variables ordinales, discrètes, ne suivant pas une loi normale, etc. On se tourne alors vers une corrélation des rangs. L'objet de l'étude n'est plus les valeurs que prennent les observations mais leur classement par rapport à l'ordre observé sur l'autre variable.

Un coefficient souvent utilisé est alors celui de Spearman (ρ). Mais ce dernier n'est pas toujours très pertinent, en particulier lorsqu'il existe beaucoup d'ex-æquo. Il reste une solution : le coefficient de rang de Kendall (*Kendall rank correlation coefficient*).

Le τ de Kendall n'est pas à proprement parler une variante du coefficient de Pearson. On n'applique pas la formule sur des données recodées. Il repose sur un principe très différent, il s'interprète également de manière différente. Le τ de Kendall est défini pour mesurer l'association entre variables ordinales, typiquement des classements (ou rangs) affectés par des juges. Son champ d'application couvre donc parfaitement celui du ρ de Spearman. Le τ de

Kendall s'interprète comme le degré de correspondance entre 2 classements (ou 2 notations). Si toutes les paires sont concordantes *i.e.* le classement selon X concorde systématiquement avec le classement selon Y, $\tau = 1$; si toutes les paires sont discordantes, $\tau = -1$; enfin, si les deux classements sont totalement indépendants, $\tau = 0$.

Surtout, et c'est sa principale différenciation avec le ρ de Spearman, le τ de Kendall se lit comme une probabilité. Il est le fruit de la différence entre 2 probabilités : celle d'avoir des paires concordantes et celle d'avoir des paires discordantes. Ainsi, lorsque $\tau = 0$, une paire d'observations a autant de chances d'être concordante que d'être discordante

Le principe est le suivant : une première série est triée et les rangs des valeurs de la deuxième série sont mis en regard de la première. Dès lors, on ne s'intéresse plus qu'à la seconde. Pour chaque observation, on relève le nombre de valeurs suivantes lui sont supérieures (on attribue +1) et inférieures (-1). D'où une nouvelle série de chiffres qui sont des soldes entre des nombres positifs et négatifs.

Le solde total S est égal à $n(n-1)/2$ si l'ordre est parfaitement respecté puisque c'est la somme des n premiers entiers naturels. Si l'ordre est parfaitement inversé, $S = -n(n-1)/2$. En cas d'indépendance totale, $S = 0$.

La valeur de S est alors observée au travers du « tau de Kendall ». Celui-ci est le solde observé par rapport au solde maximum :

$$\tau = \frac{S}{\frac{n(n-1)}{2}} = \frac{2S}{n(n-1)}$$

C'est donc un indicateur assez « rustique ». Il est compris entre -1 et +1 et s'interprète comme un coefficient de Pearson. : plus il s'approche de 1, plus on est certain qu'il existe une corrélation positive (variations dans le même sens), plus il est proche de -1 et plus on peut supposer l'existence d'une corrélation négative. Enfin, si le τ de Kendall est proche de zéro, la probabilité qu'il n'existe aucune liaison monotone entre les deux est forte. Par « liaison monotone », il faut entendre une liaison linéaire, logarithmique, exponentielle... Graphiquement, on ne sait pas quelle forme peut avoir la courbe de régression mais ce n'est pas l'objet de l'étude.

9.3.2 L'Analyse en Composantes Principales (ACP)

L'ACP construit de nouvelles variables, artificielles et fournit des représentations graphiques permettant de visualiser les relations entre variables ainsi que l'existence éventuelle de groupes d'individus et de groupes de variables. L'interprétation des résultats est une phase délicate qui doit se faire en respectant une certaine démarche.

Le but de l'ACP étant d'obtenir une représentation des individus dans un espace de dimension plus faible que p , la question se pose d'apprécier la perte d'information subie et de savoir combien de facteurs il faut retenir. Le critère habituellement utilisé est celui du pourcentage d'inertie totale expliquée.

On représente les n objets dans un espace à p dimensions. On projette cet espace selon 2 axes orthogonaux : la direction de la plus grande variance du groupe et sa perpendiculaire.

Le graphe des valeurs propres exprime la manière dont la variabilité des données se répartit dans l'espace. C'est une mesure de l'importance des axes. En général on conserve les axes nécessaires pour représenter 75 % de l'information totale.

La représentation du nuage projeté sur un couple d'axes principaux est appelée carte factorielle. C'est une manière de voir l'information multidimensionnelle. La carte factorielle des axes 1 et 2 est dite premier plan factoriel et représente la part maximale de la variabilité.

La représentation liant variables et composantes principales est appelée cercle des corrélations. Les angles entre les descripteurs reflètent leur degré de corrélation. Les distances entre les objets sont des approximations de leur distance euclidienne dans un espace multidimensionnelle (Saporta, 2006).

9.3.3 Analyse canonique de redondance (ACR)

Source : (Bouxin, 2008)

Les techniques d'ordination sous contraintes cherchent à détecter automatiquement les motifs de variations des espèces qui peuvent être expliqués par des variables observées de l'environnement. Il s'agit donc d'analyses traitant simultanément deux tableaux de données bien différentes, espèces et variables environnementales. Les diagrammes qui en résultent expriment non seulement les motifs de variation dans la composition spécifique mais aussi les liens entre espèces et variables de l'environnement (Jongman et al., 1987).

L'analyse canonique de redondance (notée ACR ou RDA pour *redunancy analysis*) est la forme « sous contraintes » de l'analyse en composantes principales (Jongman et al., 1987).

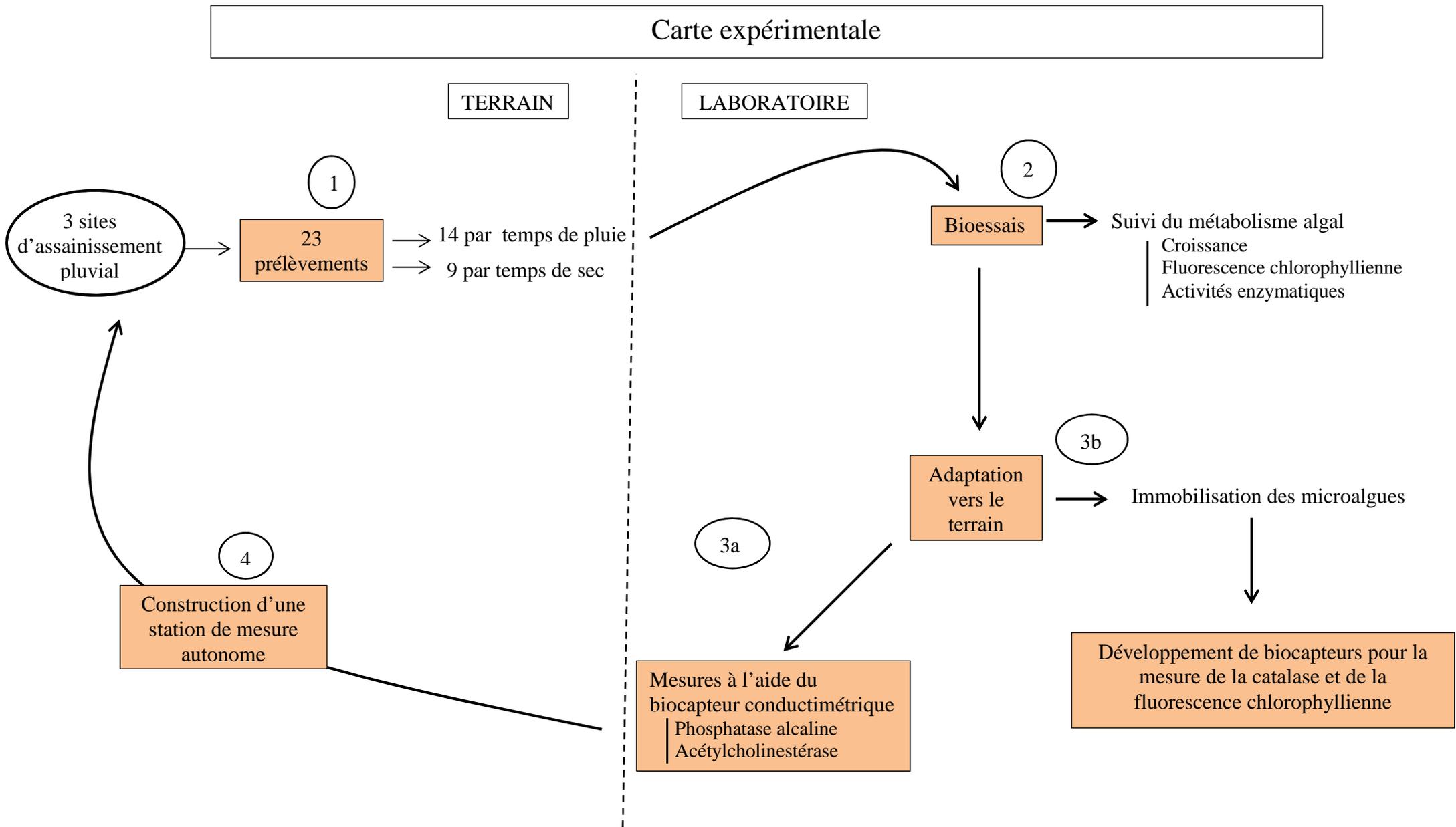
Source : (Makarenkov and Legendre, 1999)

Parmi les méthodes d'ordination proposées dans la littérature statistique, l'ACR (analyse canonique de redondance) est devenue l'une des plus employées par les écologistes. En ACR, deux tableaux des données sont considérés. Le premier tableau (Y) contient les variables-réponse (les données écotoxicologiques) alors que le second (X) contient les variables explicatives (les variables environnementales). L'ACR est une extension directe de l'analyse en composantes principales (ACP) de Y effectuée sous les contraintes imposées par X. L'ACR trouve les axes d'ordination des nuages de points qui sont le plus fortement linéairement liés à l'ensemble des variables explicatives. À cause de ces contraintes imposées par les variables explicatives, l'ACR est souvent appelée ordination sous contrainte.

Les axes d'ordination indiquent les directions de plus grande variabilité de la matrice des variables-réponse ajustées \hat{Y} . Cette matrice s'obtient par régression linéaire multiple de la matrice des variables-réponse Y sur la matrice des variables explicatives X. Par conséquent, les vecteurs d'ordination sont contraints d'être des combinaisons linéaires des variables de la matrice X. Il n'y a pas, en fait, de raison particulière pour laquelle les changements en quantité des espèces seraient reliés linéairement, dans la nature, à ceux des variables environnementales.

Partie C : Résultats

Carte expérimentale



1 : choix des sites d'études et réalisation de prélèvements par temps sec et par temps de pluie → chapitre 10

2 : réalisation de bioessais en vue d'une évaluation écotoxicologiques des rejets → chapitre 11

3a : évaluation des performances d'un biocapteur conductimétrique pour l'évaluation écotoxicologique des rejets urbains → chapitre 12

3b : développement de biocapteurs adaptés des bioessais en vue de la réalisation de mesures sur le terrain → chapitre 12

4 : construction d'une station de mesure autonome de l'écotoxicité basée sur le biocapteur bi-enzymatique et premières mesures de terrain → chapitre 13

10 Analyse physicochimique des échantillons

Nous avons réalisé 23 prélèvements sur 3 sites différents (Chassieu, Ecully et Bron) entre février 2011 et mai 2012. 14 de ces prélèvements ont été réalisés manuellement au cours d'épisodes pluvieux et 9 de la même manière par temps sec.

Sur le site de Chassieu nous avons prélevé également par temps sec car il s'écoule en permanence des effluents dans le bassin de rétention des eaux. Ces eaux proviennent des industries du bassin versant et sont dues à de mauvais branchements ou à des rejets sauvages. Sur le site d'Ecully le prélèvement par temps de pluie est constitué d'un mélange d'eaux usées et d'eaux pluviales du réseau unitaire et celui de temps sec d'eaux strictement usées. Enfin à Bron nous n'avons pu prélever que par temps de pluie car le bassin de rétention est alimenté uniquement par les eaux pluviales ruisselant sur le bassin versant (parking poids lourds).

10.1 Description des événements étudiés

Les caractéristiques des 14 épisodes pluvieux considérés sont résumées dans le Tableau 30. Ces pluies sont variables en durée (de 3 h à 24 h) comme en volumes (de 2 mm à 25 mm). Les dates d'échantillonnage résultent de contraintes techniques : disponibilité d'un véhicule, disponibilité du technicien, jour ouvrable, etc.

Tableau 30 : durée (D), hauteur (H), intensité moyenne (I) de la pluie et nombre de jours de temps sec (J temps sec) ayant précédé le prélèvement d'un échantillon

Date	Site	D (h)	H (mm)	I (mm/h)	J temps sec (jours)
24/02/2011	Chassieu Ecully	23,67	6,68	0,28	1
31/05/2011	Bron	11,68	16,69	1,43	15
13/07/2011	Chassieu Bron	3,22	19,75	6,14	0
19/10/2011	Chassieu Ecully Bron	6,13	9,59	1,56	10
02/01/2012	Chassieu Bron	5,45	2,15	0,39	0
05/01/2012	Chassieu	16,40	7,97	0,49	0
22/05/2012	Chassieu Ecully Bron	24,95	25,71	1,03	0

Une fois les échantillons collectés nous avons réalisé ou fait réaliser diverses analyses afin d'évaluer leur composition physicochimique. Les analyses de micropolluants organiques étant dispendieuses nous n'avons pu en réaliser au total (temps de pluie et temps sec confondus) que 7 sur les effluents de Chassieu (dont 5 sur le particulaire), 3 sur ceux d'Ecully (dont 3 sur le particulaire) et 4 sur ceux de Bron (dont 2 sur le particulaire), voir Tableau 31. Les données sur le particulaire ne sont disponibles que pour un faible nombre d'échantillons à cause de l'insuffisance de matière nécessaire à l'analyse. Un récapitulatif de l'ensemble des analyses réalisées est disponible en annexe.

Tableau 31 : nombre total d'échantillon collectés et analysés

Chassieu						
	Ions		Métaux		Organiques	
	Temps sec	Temps de pluie	Temps sec	Temps de pluie	Temps sec	Temps de pluie
Dissous	7	6	7	6	4	3
Particulaire	0	0	0	0	2	3
Ecully						
Dissous	2	3	2	3	1	2
Particulaire	0	0	0	0	1	2
Bron						
Dissous	/	5	/	5	/	4
Particulaire	/	0	/	0	/	2

10.2 Substances nutritives

Ce paragraphe présente les valeurs en nitrates, phosphates et potassium retrouvées dans les échantillons de temps sec et de temps de pluie (fraction dissoute uniquement). Ces composés ont un rôle important dans le fonctionnement des écosystèmes, ces derniers pouvant être perturbés en cas d'apports trop importants. Les résultats obtenus sont comparés à ceux obtenus par (Zgheib, 2009) sur des eaux de temps sec (réseaux unitaires et séparatifs) et sur des eaux pluviales de l'agglomération parisienne (en réseau séparatif uniquement). Nous indiquons également les limites de bonne qualité établies dans le système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau (MEDD et Agences de l'eau, 2003).

10.2.1 Temps sec

Sur le réseau unitaire d'Ecully on retrouve des concentrations importantes de matières azotées et phosphatées, traitées en aval par la station d'épuration des eaux de Pierre bénite. Ces nutriments sont les principales molécules drainées par les eaux noires et grises du réseau unitaire de temps sec. Le réseau séparatif de Chassieu draine également par temps sec d'importantes quantités de nutriments, comparables aux valeurs du réseau de l'agglomération parisienne. Celles-ci ne sont pas prises en charge par une station d'épuration et se déversent dans le bassin de rétention avant d'être infiltrées. Ces molécules proviennent de rejets sauvages ponctuels (nettoyage de machines ou de véhicules) ou de mauvais branchements sur le réseau (eaux de process industriels).

Tableau 32 : concentration en nitrates, phosphates, sulfates et potassium dans les prélèvements de temps sec (fraction dissoute, min - max) * : les valeurs présentées sont celles en azote total Kjeldhal (NTK) et en phosphore total. nr = non recherché. Elles sont comparées aux valeurs de la littérature et aux limites de bonne qualité

Site	Unité	Cette étude		(Zgheib, 2009) *		Limites de bonne qualité (SEQ V2)
		Chassieu	Ecully	Séparatif	Unitaire	
NO ₃ ⁻	mg/l	16,1 - 79,7	40,9 - 134	46 - 101	37 - 48	50
PO ₄ ²⁻	mg/l	0,2 - 14,3	10,7 - 18,7	6,1 - 12,4	4,5 - 6	0,5
K ⁺	mg/l	4 - 17,3	17,8 - 18,6	nr	nr	/

Les eaux rejetées dans le bassin de rétention de Chassieu ne respectent pas de manière générale les limites de bonne qualité fixées par le MEDDE, ce qui peut poser des problèmes lors de l'infiltration, notamment en ce qui concerne la qualité de l'eau de nappe.

Les eaux résiduaires du réseau unitaire d'Ecully riches en nutriments vont être traitées en station de manière à respecter les normes en vigueur lorsqu'elles regagneront le milieu naturel. On notera une charge polluante plus importante que sur le réseau parisien (maxima trois fois supérieurs), ce dernier subissant probablement une dilution importante à cause des mauvais branchements et des infiltrations d'eau dans le réseau.

10.2.2 Temps de pluie

Le Tableau 33 montre une diminution globale de la charge polluante sur Ecully et Chassieu bien qu'en réseau unitaire ces valeurs peuvent rester encore élevées (plus de 100 mg/l de nitrates). Les eaux pluviales tendent à diluer les nutriments mais dans des proportions assez faibles au vu des volumes mis en jeu. Ainsi les eaux de ruissellement sont également chargées en nutriments, bien que dans des proportions plus faibles que les eaux de temps sec. Ceci est dû au lessivage des surfaces urbaines parfois riches en ions nutritifs : espaces verts amendés, déjections animales, ... Sur Chassieu et sur Ecully les valeurs en ions nutritifs sont bien supérieures aux concentrations retrouvées par d'autres auteurs (Göbel et al., 2007; Zgheib, 2009) qui ont travaillé sur réseau séparatif en milieu urbain, et non en zone industrielle. En revanche sur le site de Bron on reste bien dans ces gammes de valeurs.

Tableau 33 : concentration en nitrates, phosphates, sulfates et potassium dans les prélèvements de temps de pluie (fraction dissoute, min - max) < : inférieur aux limites de détection, nr = non recherché

Site	Unité	Cette étude			(Zgheib, 2009)	(Göbel et al., 2007)	Limite de bonne qualité (SEQ V2)
		Chassieu	Ecully	Bron			
NO ₃ ⁻	mg/l	1 - 33,9	5,3 - 108,5	< - 18,5	< - 16	< - 16	50
PO ₄ ²⁻	mg/l	< - 14,3	1,6 - 6,5	< - 1,96	0,3 - 3,52	< - 0,5	0,5
K ⁺	mg/l	< - 8,2	5 - 11,3	0,3 - 6,5	nr	< - 3,8	/

Notons qu'après la fermeture du parking pour poids lourds en amont du bassin de rétention de Bron (fermeture le 17/11/11) la concentration en ions décroît rapidement : 6 mois après les concentrations sont inférieures au mg/l. La Figure 33 présente les concentrations en ions nutritifs retrouvées dans trois échantillons, avant fermeture (19/10/11), 2 mois et 6 mois après la fermeture (02/01/12 et 22/05/12). Nous avons là une preuve de la pollution engendrée par le stationnement et la circulation des poids lourds même en ce qui concerne les substances nutritives, certainement engendré par le nettoyage des véhicules.

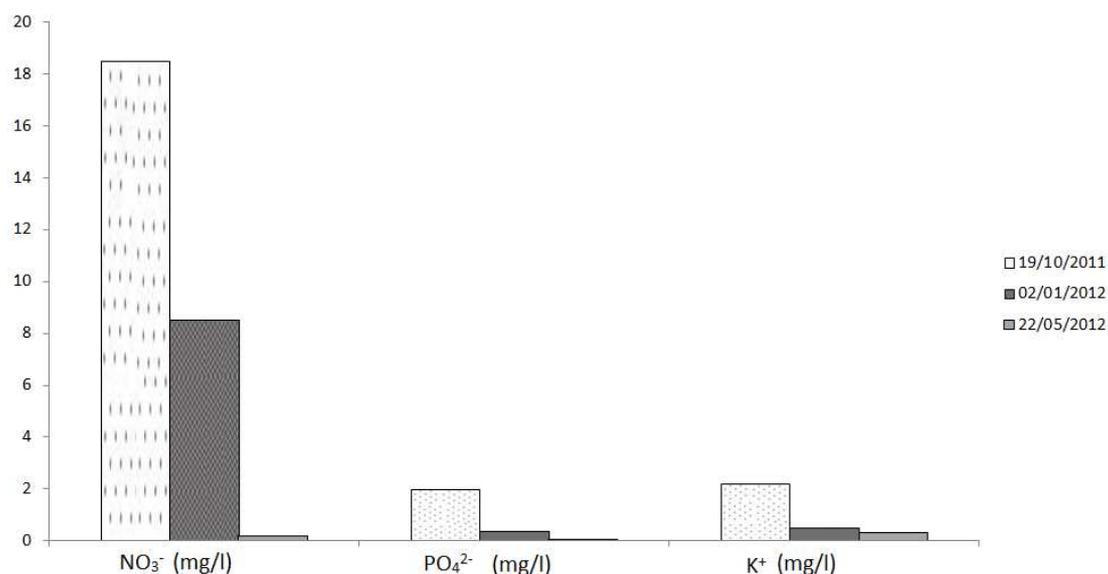


Figure 33 : concentrations en ions nutritifs relevées dans les échantillons du BR de Bron le 19 octobre 2011, le 02 janvier 2012 et le 22 mai 2012

10.3 Eléments traces métalliques

Nous nous intéressons ici aux métaux suivants : plomb, cadmium, chrome, nickel, cuivre et zinc dans la fraction dissoute. Nous les avons sélectionnés car ils sont typiques des activités de la ville : industries, trafic routier, chauffage urbain, toxiques pour les milieux aquatiques et pris en compte par les directives européennes. Les résultats d'analyses obtenus dans nos prélèvements sont comparés aux données obtenues par Zgheib (2009) et Bécouze-Lareure (2010) au cours de leur travail de thèse. Nous indiquons également comme éléments de repères les normes de qualité environnementales (NQE), fixées par l'UE (Le parlement européen et le conseil de l'union européenne, 2008) et les normes de qualité environnementales provisoires (NQEp), établies par le MEDDE (Ministère de l'écologie et du développement durable, 2007).

10.3.1 Temps sec

Le Tableau 34 montre que les rejets du bassin versant de Chassieu sont fortement chargés en éléments traces métalliques, dans des proportions bien plus importantes aux valeurs obtenues par (Zgheib 2009) et aux normes de qualité environnementale. Ceci est à mettre en lien avec les nombreuses industries et ateliers du bassin versant, ces activités étant génératrices de rejets importants et non maîtrisés, notamment en zinc (c'est-à-dire hors du réseau d'assainissement des eaux usées).

Par temps sec le bassin versant d'Ecully draine uniquement nickel et cuivre, 2 métaux systématiquement détectés, dans les mêmes ordres de grandeurs que l'étude de Zgheib. Le cuivre est un oligoélément indispensable au métabolisme humain. Le corps humain normal contient 70 à 100 mg de cuivre et l'alimentation apporte en moyenne 2 à 5 mg de cuivre par jour dont 40 % à 60 % sont absorbés (Misrahi and Hadchouel, 1997). Aussi du cuivre est en permanence émis dans le réseau d'assainissement unitaire via les eaux usées. C'est également le cas pour le nickel, en moyenne les besoins journaliers d'un individu sont d'environ 75 µg et les apports sont évalués à environ 0,1 mg/jour (Leblanc, 2004).

Tableau 34 : concentrations en plomb, cadmium, chrome, nickel, cuivre et zinc dans les prélèvements de temps sec (fraction dissoute, min - max) < : inférieur aux limites de détection

Site	Unité	Cette étude		(Zgheib, 2009)		NQE et NQE(p)
		Chassieu	Ecully	Séparatif	Unitaire	
Pb	µg/l	0,49 - 0,64	<	<	3,43 - 7,41	7,2
Cd	µg/l	< - 3,16	<	<	0,22 - 0,27	0,08
Cr	µg/l	0,56 - 6,9	<	<	22 - 27	3,4
Ni	µg/l	1,77 - 20,13	1,6 - 3,27	<	1,73 - 2,78	20
Cu	µg/l	3,22 - 29,45	22,02 - 26,78	80 - 160	40 - 50	1,4
Zn	µg/l	100 - 800	<	80 - 230	60 - 110	7,8

10.3.2 Temps de pluie

Le Tableau 35 montre que le bassin versant d'Ecully draine d'autres métaux, typiques des surfaces routières : plomb et chrome alors que le nickel n'est plus détecté. Les valeurs détectées sont faibles, inférieures aux données de Bécouze (2010) et de Zgheib (2009) bien que l'on retrouve encore dans 100% des échantillons étudiés du cuivre dans des quantités supérieures aux normes de qualité environnementales provisoires.

Sur Chassieu nous remarquons que globalement les ETM sont dans des concentrations moins importantes que par temps sec mais supérieures aux valeurs NQE/NQE(p) pour le cadmium, le cuivre et le zinc.

Sur le site de Bron les échantillons collectés sont peu chargés en ETM contrairement à ce que l'on pouvait attendre au vu de l'occupation des sols du bassin versant. Ces faibles concentrations sont très certainement dues au caractère statique d'un parking, sollicitant bien moins la mécanique qu'une chaussée et donc l'usure des parties émettrices de métaux (garnitures de frein en particuliers).

Tableau 35 : concentrations en plomb, cadmium, chrome, nickel, cuivre et zinc dans les prélèvements de temps de pluie (fraction dissoute, min - max), < : inférieur aux limites de détection

Site	Unité	Cette étude			(Becouze-Lareure, 2010)		(Zgheib 2009)	NQE et NQE(p)
		Chassieu	Ecully	Bron	Chassieu	Ecully		
Pb	µg/l	< - 2,19	< - 1,76	<	2 - 37	2 - 39	< - 129	7,2
Cd	µg/l	< - 0,23	<	< - 2,1	0,1 - 2,3	0,04 - 0,4	< - 0,53	0,08
Cr	µg/l	1,2 - 1,41	< - 1,22	< - 0,18	2 - 21	0,5 - 17	< - 45	3,4
Ni	µg/l	2,89 - 4,7	<	<	4 - 21	0,5 - 4	< - 5,8	20
Cu	µg/l	5,79 - 12,88	8,41 - 18,92	1,87 - 15,42	17 - 74	20 - 58	30 - 220	1,4
Zn	µg/l	130 - 270	<	<	171 - 678	0,6 - 1,6	130 - 520	7,8

Nous n'avons pas pu réaliser d'analyses des métaux sur le particulaire, toutefois les travaux de (Becouze-Lareure, 2010) sur les sites d'Ecully et de Chassieu ont montré qu'à Chassieu le Cu, Cd, Pb et Cr ont tendance à être fortement liés aux MES (> 70 %) alors que le Ni et le Zn ont plutôt une affinité médiane (\pm 50 %). Sur Ecully on retrouve les mêmes tendances à l'exception que le Zn est plus fortement lié aux MES (>70 %).

10.4 Micropolluants organiques

Les pesticides, alkylphénols et hydrocarbures aromatiques polycycliques ont été analysés sur la fraction dissoute et particulaire. Nous comparons nos résultats aux données de la thèse de Zgheib (2009) et aux valeurs NQE.

10.4.1 Temps sec

Sur le bassin versant d'Ecully nous n'avons qu'une seule analyse sur les micropolluants organiques, fraction dissoute et particulaire (03 mars 2011). Le tableau 36 montre une faible pollution organique sur la fraction dissoute récoltée à Ecully : 3 pesticides et 2 HAP détectés, dans des concentrations inférieures aux valeurs NQE ainsi qu'à celles trouvées par Zgheib en réseau unitaire.

En revanche sur le site de Chassieu on détecte de nombreux pesticides, des alkylphénols et 7 HAP dans des teneurs parfois supérieures aux valeurs NQE et aux travaux de Zgheib.

Tableau 36 : concentrations en micropolluants organiques dans les prélèvements de temps sec (fraction dissoute, min - max), < : inférieur aux limites de détection, nr = non recherchée

Substances	Unité	Cette étude		(Zgheib, 2009)		NQE
		Chassieu	Ecully	Séparatif	Unitaire	
Atrazine	ng/l	< - 19,9	2,9	<	< - 60	600
Diuron	ng/l	4,8 - 833	25	60 - 300	50 - 150	200
Isoproturon	ng/l	< - 82,9	<	<	90	300
Pentachlorophénol	ng/l	< - 12,1	<	nr	nr	400
Simazine	ng/l	< - 44,2	2,8	<	<	1000
4-nonylphénol	ng/l	21,3 - 1114	<	<	<	300
Para-ter-octylphénol	ng/l	< - 38	<	120 - 170	< - 200	100
Anthracène	ng/l	< - 70,9	<	< - 35	< - 22	100
Fluoranthène	ng/l	2,0 - 54,3	<	40 - 170	20 - 132	100
Naphtalène	ng/l	17 - 78,9	35	54 - 494	54 - 63	2400
Acénaphène	ng/l	< - 101,5	<	< - 35	< - 22	700
Fluorène	ng/l	< - 204,4	<	12 - 27	11 - 22	300
Phénanthrène	ng/l	< - 440,6	9,5	19 - 74	24 - 110	110
Pyrène	ng/l	3,6 - 30,8	<	39 - 173	22 - 128	24

Le Tableau 37 montre que la fraction particulaire de l'échantillon collecté à Ecully est, elle aussi très peu chargée en micropolluants organiques.

En revanche sur le site de Chassieu les MES des rejets de temps sec peuvent être fortement contaminés, notamment en HAP et en alkylphénols avec des valeurs bien au-dessus des données de la littérature. Comme précédemment l'étude du bassin versant et des activités présentes nous donne des clés de compréhension.

Tableau 37 : concentrations en micropolluants organiques dans les prélèvements de temps sec (fraction particulaire, min - max), < : inférieur aux limites de détection

Site	Unité	Cette étude		(Zgheib, 2009)	
		Chassieu	Ecully	Unitaire	Séparatif
Diuron	ng/g	< - 109,1	<	<	<
Isoproturon	ng/g	< - 6,1	<	<	<
Simazine	ng/g	< - 3,6	<	<	<
Pentachlorophénol	ng/g	< - 22,6	<	<	<
4-nonylphénol	ng/g	396,7 - 867	<	<	<
Para-ter-octylphénol	ng/g	< - 209,9	<	< - 250	100 - 160
Fluoranthène	ng/g	109,3 - 2394,9	58,6	140 - 540	110 - 470
Naphtalène	ng/g	42,3 - 225,1	48,6	30 - 60	10-50
Benzo (a) pyrène	ng/g	< - 32	<	30 - 190	30 - 220
Benzo (b) fluoranthène	ng/g	< - 94	<	60 - 310	60 - 310
Benzo (k) fluoranthène	ng/g	< - 24,4	<	20 - 110	20 - 120
Acénaphène	ng/g	< - 195,1	<	< - 20	< - 40
Fluorène	ng/g	< - 97,4	<	20 - 40	10-50
Phénanthrène	ng/g	< - 6993,2	141,9	60 - 390	50 - 150
Pyrène	ng/g	< - 1460,9	<	170 - 530	160 - 480
Benzo (a) anthracène	ng/g	< - 163	<	40 - 220	30 - 260
Chrysène	ng/g	< - 97,7	<	60 - 240	50 - 270

10.4.2 Temps de pluie

Le Tableau 38 montre que sur le bassin de Chassieu la pollution organique est bien plus faible que par temps sec, le ruissellement des surfaces imperméabilisées n'apportant pas de contamination supplémentaire par rapports aux effluents de temps sec. Les résultats d'analyse donnent des valeurs inférieures aux valeurs NQE et aux valeurs de Zgheib mais dans les mêmes ordres de grandeurs que les travaux de Bressy et de Bécouze.

Tableau 38 : concentrations en micropolluants organiques dans les prélèvements de temps de pluie
 (fraction dissoute, min – max sauf * où les valeurs pour les HAP sont données sur le total : dissous + particulaire)
 < : inférieur aux limites de détection

Substances	Unité	Cette étude			(Zgheib, 2009)	(Bressy, 2010)	(Bécouze, 2010) *		NQE
		Chassieu	Ecully	Bron			Chassieu	Ecully	
Atrazine	ng/l	1,7 - 2,5	< -2	<	<	<	< - 0,3	0,5 - 3	600
Diuron	ng/l	20 - 43	12,2 - 238	<	30 - 1750	40 - 80	3 - 43	14 - 258	200
γ Hexachlorocyclohexane	ng/l	< - 7,2	<	<	/	<	<	<	<
Isoproturon	ng/l	1,7-2,7	<	1,9	50	< - 140	2 - 135	< - 6	300
Simazine	ng/l	<	2,8 - 2,9	<	< - 150	<	< - 5	0,1 - 5	<
4-nonylphénol	ng/l	26 - 555	201	10-23	300 - 9200	1400	<	<	300
Para-ter-octylphénol	ng/l	11-33	8,6	<	< - 260	<	< - 232	< - 186	100
Fluoranthène	ng/l	4 - 5,9	<	10,2 - 56	10 - 110	15 - 40	234-366	37 - 292	100
Naphtalène	ng/l	108 - 182	117	16 - 111	5 - 490	<	<	<	2400
Benzo (a) pyrène	ng/l	<	<	< - 11	11 - 310	3 - 8	<	<	50
Benzo (b) fluoranthène	ng/l	<	<	14 - 37	26 - 660	22	104-203	< - 64	Σ = 30
Benzo (k) fluoranthène	ng/l	<	<	< - 18	16 - 230	<	101-177	< - 46	
Acénaphène	ng/l	9,4 -19	10	4,7 - 7	2 - 104	<	<	<	700
Fluorène	ng/l	14 - 18	15	< - 9,8	23 - 945	<	<	<	300
Phénanthrène	ng/l	16 - 53	<	8,3 - 116	45 - 730	12	<	<	110
Pyrène	ng/l	5,7 - 8	3,1	11,4 - 48	19 - 3254	21	<	<	24
Benzo (a) anthracène	ng/l	<	<	8,6 - 23	12 - 300	11	<	<	5
Chrysène	ng/l	<	<	8,7 - 25	17 - 660	13	<	<	6

Le bassin versant de Bron ne draine quasiment que des HAP comme micropolluants organiques. Contrairement aux ions les concentrations drainées tendent à augmenter après la fermeture du parking poids lourds (Figure 34). Ce phénomène peut s'expliquer par la grande rémanence des composés polyaromatiques. Mais les concentrations retrouvées restent en dessous des valeurs NQE excepté pour le phénanthrène, le pyrène, le benzo(a)anthracène et le chrysène.

Les micropolluants organiques se répartissent différemment selon la famille à laquelle ils appartiennent : les HAP sont fortement liés aux particules tandis que les pesticides se retrouvent en majorité dans la phase dissoute. Enfin les alkylphénols se répartissent de manière homogène entre la phase dissoute et la phase particulaire (Zgheib, 2009).

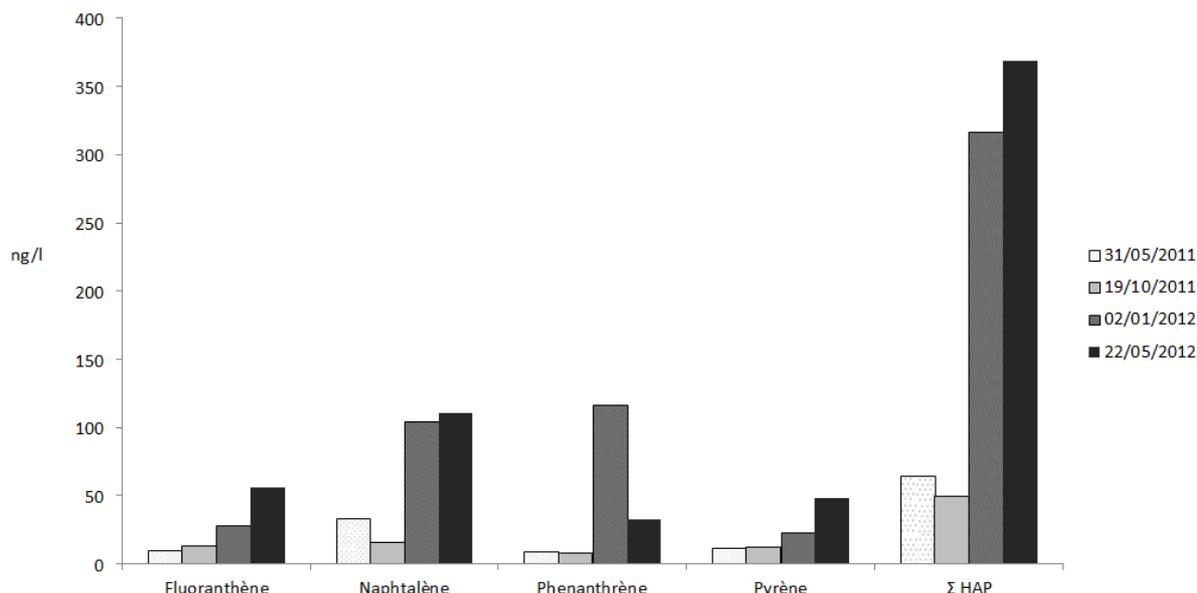


Figure 34 : concentration en HAP dissous dans 4 échantillons prélevés par temps de pluie sur le bassin de rétention de Bron

Le Tableau 39 montre que sur Chassieu les micropolluants organiques sous forme particulaire sont en faible concentration, dans des proportions équivalentes aux rejets de temps sec et celles trouvées dans l'étude de Zgheib.

Sur Ecully en revanche on constate bien l'effet du ruissellement des eaux pluviales qui viennent se charger en contaminants particulaires et enrichir les rejets urbains de temps de pluie en HAP et alkylphénols, dans des valeurs supérieures à l'étude de Zgheib.

Sur le bassin de Bron on se rend compte que la grande partie de la pollution aux HAP est portée par la fraction particulaire avec des concentrations qui dépassent la dizaine de $\mu\text{g/g}$ (mg/kg). Comme précédemment l'étude du bassin versant nous donne des clés de compréhension mais également des travaux antérieurs menés sur Chassieu qui ont montré la présence de ces contaminants dans l'atmosphère et dans les eaux météoritiques. Cette observation est à rapprocher à la présence d'infrastructures de transport jouxtant le bassin versant (Dembélé, 2010).

Tableau 39 : concentrations en micropolluants organiques dans les prélèvements de temps de pluie (fraction particulaire, min - max), < : inférieur aux limites de détection

Site	Unité	Cette étude			(Zgheib, 2009)
		Chassieu	Ecully	Bron	
Fluoranthène	ng/g	853 - 1153	134,8 - 207	12290 - 12002	110 - 2400
Naphtalène	ng/g	210	< - 86,4	584 - 780	130 - 370
Benzo (a) pyrène	ng/g	<	<	4080 - 5660	320 - 1300
Benzo (b) fluoranthène	ng/g	1196 - 1448	331	14005 - 16565	460 - 2100
Benzo (k) fluoranthène	ng/g	< - 604	<	4861 - 7110	170 - 780
Indéno (1, 2, 3) pyrène	ng/g	<	<	4484 - 6252	190 - 1500
Phénanthrène	ng/g	502	235,7 - 287	3250 - 4282	220 - 2920
Pyrène	ng/g	1120 - 1321	28,6 - 223	10033 - 11321	430 - 5820
Benzo (a) anthracène	ng/g	802 - 872	< - 149	4188 - 6574	80 - 830
Chrysène	ng/g	625 - 828	51,9 - 149	7095 - 8846	190 - 1800
Benzo (g,h,i) perylène	ng/g	<	<	4183 - 4563	/
4-nonylphénol	ng/g	15542 - 26672	< - 4663	1476 - 2864	<
Para-ter-octylphénol	ng/g	< - 885	< - 296	457 - 1049	< - 380

Conclusion

Les résultats des analyses chimiques nous permettent de mettre en lumière la variabilité de la contamination de nos échantillons. Cette contamination dépend bien évidemment de l'occupation des sols du bassin versant et du type d'ouvrages étudié. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui a toujours mis en évidence la grande variabilité inter-sites et inter-événements de la qualité des rejets urbains par temps de pluie. Ils nous confortent dans le choix d'une approche matrice pour la poursuite de notre étude concernant la réalisation de bioessais et biocapteurs dans l'objectif d'évaluer l'impact écologique.

11 Evaluation de l'écotoxicité des effluents prélevés

Rappelons que l'objectif de ce travail est d'évaluer l'impact des rejets urbains de temps de pluie sur les écosystèmes récepteurs. Au vu des caractéristiques physicochimiques de ces rejets, variables et complexes, nous avons choisi d'évaluer leur toxicité par le biais d'une approche matrice. Celle-ci consiste à étudier la toxicité globale du rejet plutôt que la toxicité des substances qu'il contient considérées individuellement.

L'écosystème aquatique étant riche et complexe nous avons choisi de travailler sur le compartiment des producteurs primaires, le phytoplancton. D'un point de vue écologique les algues unicellulaires sont présentes dans tous les milieux aquatiques et constituent la base des chaînes trophiques. Notre travail expérimental repose sur des bioessais menés sur cellules entières et non génétiquement modifiées. Ceci donne une grande représentativité écologique à notre étude. D'un point de vue écotoxicologique ces organismes sont bien connus pour réagir précocement à une grande variété de polluants. Enfin d'un point de vue pratique les microalgues sont faciles à obtenir, à cultiver en laboratoire et ne posent pas de problèmes éthiques.

Les modifications de divers paramètres physiologiques, représentatifs des grandes fonctions métaboliques des algues sont ici évaluées. Nous avons ainsi suivi la croissance cellulaire, paramètre général rendant compte d'une atteinte globale de l'organisme. D'autres paramètres bien plus spécifiques ont également été suivis : les activités enzymatiques et la fluorescence de la chlorophylle. Les activités enzymatiques sont modifiées par certaines catégories de polluants et leur perturbation peut constituer un marqueur de leur présence. La fluorescence de la chlorophylle est un marqueur de perturbation du photosystème II lors de la photosynthèse. C'est donc un paramètre important à suivre ; en effet il est lié au stress cellulaire dû aux polluants modifiant l'activité photosynthétique.

11.1 Activités enzymatiques sur algues libres

Trois activités enzymatiques, l'estérase et la phosphatase alcaline chez l'algue *C. vulgaris* et la catalase chez *C. reinhardtii* ont été étudiées.

Estérase et phosphatase alcaline sont deux enzymes ayant fait l'objet de nombreuses études et sont connues pour leur capacité à être perturbées par certaines catégories de polluants (Buxton and Murdoch, 1981; Regel et al., 2002; Durrieu et al., 2003, 2011; McCarthy et al., 2010). En revanche la catalase n'a fait l'objet que de peu d'études sur les microalgues. C'est une enzyme caractéristique du stress oxydant. Ainsi notre travail a consisté à évaluer la pertinence d'utiliser la catalase comme bioindicateur pertinent pour notre étude.

Les activités enzymatiques ont été mesurées après différents temps d'exposition aux polluants : 2 h, 24 h et 48 h. Aux temps courts nous cherchons à mettre en évidence une toxicité aigüe, une réponse précoce de l'algue au polluant. Ceci nous permet également d'évaluer la capacité de cette activité à être utilisée en biocapteur comme indicateur de toxicité rapide. Le fait d'exposer les algues plus longtemps (24 h et 48 h) nous permet d'évaluer l'évolution de leur comportement au cours du temps, comme par exemple la mise en évidence de mécanismes de défense.

11.1.1 Traitement des données brutes

Comment comparer les résultats d'activité entre eux ? Nous avons besoin d'un paramètre commun à toutes les mesures afin de comparer l'essai au témoin et les résultats d'essais entre eux.

Les enzymes que nous étudions sont dites « Michaeliennes », du nom du biochimiste Leonor Michaelis qui avec Maud Menten ont proposé une équation de vitesse qui utilise l'hypothèse d'état stationnaire.

Elles obéissent donc à une loi de vitesse du type : $v = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]}$

Avec v la vitesse initiale de la réaction, V_m la vitesse limite ou vitesse maximum de la réaction, K_m constante de Michaelis et $[S]$ la concentration en substrat. v et V_m ont la dimension d'une concentration par unité de temps ($n.L^{-3}.T^{-1}$). K_m a la dimension d'une concentration ($n.L^{-3}$) et permet d'avoir une idée sur la constante de dissociation du complexe enzyme-substrat. En pratique K_m est inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

Afin de comparer les activités enzymatiques nous utilisons le paramètre K_m/V_m , appelé temps spécifique. Ce rapport correspond au temps qui serait nécessaire à l'enzyme pour consommer tout le substrat si elle fonctionnait en permanence dans les conditions de premier ordre à vitesse constante (Cornish-Bowden et al., 2005).

L'activité enzymatique résiduelle A_{res} est définie comme étant :

$$A_{res}(\%) = \frac{\frac{K_m}{V_m} \text{ essai}}{\frac{K_m}{V_m} \text{ témoin}} * 100$$

Si le rapport K_m/V_m de l'essai est inférieur à celui du témoin, A_{res} est inférieur à 100% ce qui traduit une inhibition de l'activité enzymatique. Mais il arrive également que A_{res} soit supérieur à 100 %; on parle alors d'activation ou de stimulation de l'activité enzymatique étudiée.

11.1.2 Activité estérase

L'estérase est une enzyme perturbée par les polluants organiques et notamment les pesticides organochlorés (Chouteau, 2005). Certaines études ont pointé l'effet des éléments traces métalliques (Hadjoudja et al., 2009) mais d'autres non (Guedri, 2010). Nos rejets sont parfois riches en polluants organiques et il est intéressant de voir comment se comporte cette enzyme en présence des rejets comportant un cocktail de molécules

11.1.2.1 Temps sec

Le Tableau 40 montre que dès 2 h de contact avec les échantillons de Chassieu l'activité estérase des microalgues est perturbée ; on constate de fortes activations (jusqu'à 20 x l'activité témoin) et des fortes inhibitions (activité résiduelle inférieure à 20 %)

Après 48h de contact tous les échantillons testés (excepté celui du 20/05/11) stimulent l'activité estérase. Ce phénomène est très certainement lié à la présence d'ions nutritifs en quantité importante dans les échantillons identifiés par l'analyse chimique, de 18,7 à 79,7 mg/l de nitrates. Paradoxalement l'échantillon du 20/05/11 pourtant chargé en nutriments (67 mg/l de nitrates) inhibe très fortement l'activité estérase. Cet effet est probablement dû aux métaux (Cd, Ni) connus pour jouer un rôle inhibiteur.

Tableau 40 : % d'activité résiduelle de l'activité estérase (AE) sur algues libres de type *C. vulgaris* après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux prélèvements de temps sec

Site	Date	Bioessais		
		AE 2 h	AE 24 h	AE 48 h
Chassieu	18/01/2011	1245,66	509	205,6
	03/02/2011	/	209,28	130,44
	03/03/2011	1034,75	1964,58	676,56
	20/05/2011	111,71	122,62	10,47
	20/02/2012	19,93	5,6	1928,53
	16/03/2012	20,67	45,35	2527,27
	25/04/2012	119,09	64,88	136,81
Ecully	03/02/2011	175,44	143,63	161,71
	03/03/2011	/	/	/

11.1.2.2 Temps de pluie

Le tableau 41 montre que les échantillons prélevés à Chassieu modifient l'activité estérase de *C. vulgaris* dans des proportions bien moins importantes que par temps sec, avec des activités résiduelles comprises entre 3 % et 160 %.

Avec les rejets prélevés à Ecully l'inhibition de l'AE augmente proportionnellement au temps d'exposition aux rejets collectés, même si l'échantillon collecté le 24/02/11 stimule fortement cette activité quel que soit le temps de contact. Comme pour les rejets de temps sec, ce phénomène est très certainement dû aux fortes concentrations en nutriments (plus de 100 mg/l de nitrates).

Les RUTP du bassin de Bron inhibent l'activité estérase dans tous les cas après 24 h et 48 h d'exposition, ce qui tend à montrer l'action des micropolluants organiques sur cette activité.

Tableau 41 : % d'activité résiduelle de l'activité estérase (AE) sur algues libres de type *C. vulgaris* après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux prélèvements de temps de pluie

Site	Date	Bioessais		
		AE 2 h	AE 24 h	AE 48 h
Chassieu	24/02/2011	87,67	83	/
	13/07/2011	90,25	131,64	/
	19/10/2011	114,59	35,6	82
	02/01/2011	159,6	16,36	27,32
	05/01/2012	63,27	107,82	3,33
	21/05/2012	89,1	58,18	100,64
Ecully	24/02/2011	1000,41	698,37	613,04
	19/10/2011	105,16	24,65	17,76
	22/05/2012	68,38	17,6	2,65
Bron	31/05/2011	17,67	33,22	7,6
	13/07/2011	126,1	96,78	78,46
	19/10/2011	90,66	74,06	73,76
	02/01/2012	73,65	64,55	90,25
	22/05/2012	80,32	5,12	1,35

L'activité estérase est affectée dès 2h de contact aussi bien avec les rejets de temps sec que de temps de pluie. Plus le temps de contact augmente et plus cette perturbation semble marquée. En comparant ces résultats avec les analyses physicochimiques, nous supposons une corrélation entre la présence de nutriments et les activations de l'AE. Toutefois la présence d'autres composés tendent à contrebalancer ces activations (ETM et micropolluants organiques).

Nous voyons que l'interprétation des résultats des bioessais reste délicate malgré la connaissance de la physicochimie et l'aide de travaux antérieurs.

11.1.3 Activité phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline est une enzyme sensible aux éléments traces métalliques (Badreddine, 1996). Son activité est notamment perturbée par le zinc, le cadmium le mercure et le plomb (Durrieu et al., 2003). L'APA mesurée sur algues libres semble en revanche peu sensible aux pesticides (Guedri, 2010).

11.1.3.1 Temps sec

On retrouve comme avec l'AE une grande variabilité dans les effets des échantillons sur l'APA mais dans des gammes moins étendues, allant de 331 % d'activité résiduelle (Chassieu 25/04/12, 24 h de contact) à 32 % au minimum (Ecully 03/03/11, 24 h de contact).

Sur Ecully le seul échantillon que nous ayons pu tester inhibe de manière importante l'APA (32 % d'activité résiduelle après 24h de contact).

Tableau 42 : % d'activité résiduelle de l'activité phosphatase alcaline (APA) sur algues libres de type *C. vulgaris* après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux prélèvements de temps sec

Site	Date	Bioessais		
		APA 2 h	APA 24 h	APA 48 h
Chassieu	18/01/2011	244,32	55,02	214,64
	03/02/2011	/	109,1	171,4
	03/03/2011	118,53	95,93	62,32
	20/05/2011	69,83	98,61	171,61
	20/02/2012	/	/	/
	16/03/2012	79,87	78,27	119,37
	25/04/2012	181,65	331,37	245,46
Ecully	03/02/2011	/	/	/
	03/03/2011	96,45	31,92	42,46

11.1.3.2 Temps de pluie

Le Tableau 43 montre qu'après 2h de contact avec des échantillons de temps de pluie de Chassieu, l'APA est peu modifiée mais après 24 h et 48 h d'inhibition nous constatons des baisses de l'activité résiduelle avec des valeurs comprises entre 26 et 81 %.

Les trois échantillons prélevés à Ecully entraînent une variabilité importante des réponses : inhibition, sans effet et stimulation de l'APA.

Sur le bassin de Bron il y a inhibition de l'APA après 24 h de contact avec les 4 premiers échantillons prélevés, le dernier en date du 22/05/12 stimulant cette activité. En revanche après 48 h d'exposition les 5 échantillons prélevés inhibent l'APA.

Tableau 43 : % d'activité résiduelle de l'activité phosphatase alcaline (APA) sur algues libres de type *C. vulgaris* après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux prélèvements de temps de pluie

Site	Date	Bioessais		
		APA 2 h	APA 24 h	APA 48 h
Chassieu	24/02/2011	97,39	36,46	36,89
	13/07/2011	98,46	25,88	45,88
	19/10/2011	/	/	/
	02/01/2011	103,26	81,25	58,81
	05/01/2012	119,82	72,64	51,08
	21/05/2012	/	/	/
Ecully	24/02/2011	55,09	42,15	23,65
	19/10/2011	85,95	104,93	53,09
	22/05/2012	128,89	466,4	176,61
Bron	31/05/2011	84,64	47,6	31,31
	13/07/2011	105,97	35,17	50,97
	19/10/2011	98,71	92,3	98,62
	02/01/2012	90,36	73,32	25,77
	22/05/2012	93,29	206,87	89,33

Par temps sec comme par temps de pluie nous avons constaté des phénomènes de stimulation de l'APA. Des études antérieures ont montré des résultats similaires notamment les travaux de (Chouteau, 2004) et de (Guedri, 2010) sur *C. vulgaris*. Deux hypothèses ont pu être formulées : il peut s'agir de la stimulation des défenses cellulaires qui peut se traduire par l'activation de certaines enzymes dont les phosphatases. Ce phénomène a été observé pour de faibles concentrations en éléments polluants uniquement. La deuxième a été énoncée par Linden *et al.* (1977) : les métaux lourds et en particulier le cadmium peuvent jouer un rôle d'ions activateurs. Ainsi les très faibles concentrations retrouvées dans nos échantillons peuvent en partie expliquer les activations constatées.

Ici encore nous voyons bien la complexité des mécanismes qui sont en jeu et la difficulté d'interprétation des résultats qui en résulte.

11.1.4 Activité catalase

Des travaux préalables ont permis de développer des techniques de mesures optiques de la catalase (Dujardin, 2011) et ont mis en évidence son utilisation potentielle comme biomarqueur de toxicité.

Ainsi nous avons mesuré l'activité catalase sur des cellules de *C. reinhardtii* avant (témoin) et après 1 h, 2 h et 3 h d'exposition à un rejet de temps de pluie (Figure 35). Les essais ont été réalisés sur des temps courts afin de déterminer le temps de réponse de l'enzyme face à aux toxiques présents dans les RUTP.

Une heure après la mise en contact l'activité catalase des microalgues est presque nulle, l'activité résiduelle étant inférieure à 10 % avec une variabilité très faible. Le temps de réponse extrêmement court fait de cette enzyme un biomarqueur de toxicité pertinent et potentiellement utilisable en biocapteur pour des mesures de terrain.

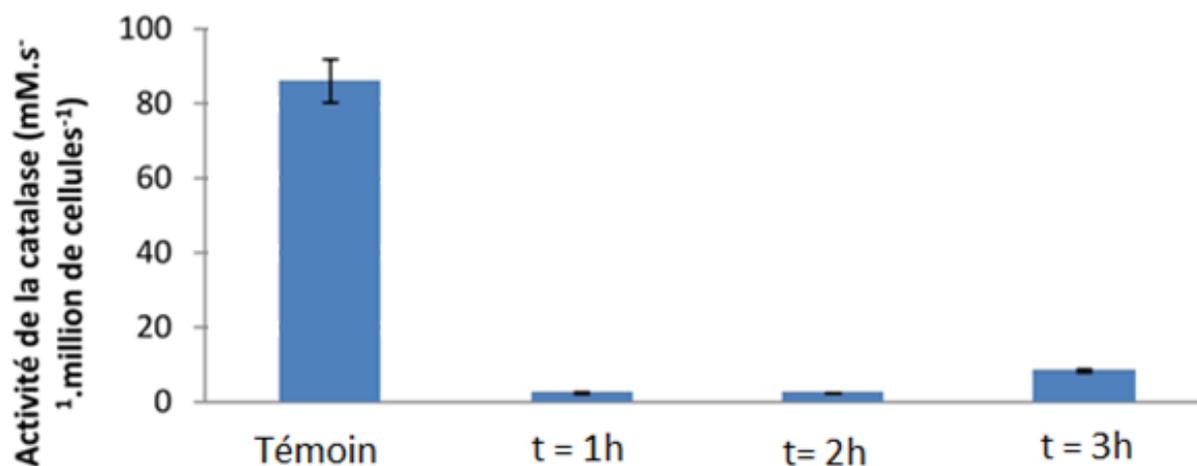


Figure 35 : Représentation graphique de l'activité catalase de d'algues libres de type *C. reinhardtii* avant (témoin) et après 1h, 2h et 3h d'exposition aux RUTP prélevés à Chassieu le 24/02/2011

Contrairement à l'APA mesurée sur des moules de méditerranée (cf. ci-dessus) le cuivre et les eaux contaminées aux éléments traces métalliques n'ont pas d'effet sur l'activité catalase (Regoli and Principatob, 1995). Mais les travaux de Bonet *et al.* (2012) ont montré l'effet du zinc (400 µg/l) sur l'activité catalase d'un biofilm d'eau douce durant un mois. Ils ont mis en évidence une corrélation positive entre l'accumulation de zinc et l'activité catalase. Selon ces auteurs le temps de de réponse rapide de l'activité après l'exposition (+ 43 % d'activité 24 h après la mise en contact) en fait un bon indicateur précoce de toxicité.

Trop peu d'essais ont été réalisés sur la catalase de *C. reinhardtii* mais ces premiers résultats semblent indiquer que cet indicateur est intéressant pour l'évaluation de la toxicité des rejets urbains.

11.1.5 Synthèse des résultats des mesures d'activité enzymatiques sur algues libres

Les résultats de mesure des activités estérase et phosphatase alcaline sont très variables, à mettre en lien avec la variabilité de la composition des rejets (cf. Chapitre 10). Toutefois malgré la grande variabilité apparente nous avons pu mettre en lumière certaines tendances qui se révèlent grâce au nombre d'essais menés. Par temps de pluie nous avons ainsi mis en évidence l'existence d'une forte relation entre l'activité de l'enzyme et le temps d'exposition au polluant, relation inexistante par temps sec. Cette relation est d'ordre logarithmique, l'activité résiduelle de l'enzyme étudiée décroissant proportionnellement au temps de contact avec l'effluent.

Bien que ces premiers résultats soient importants, les seules données des activités enzymatiques ne suffisent pas à caractériser l'impact des rejets urbains sur le compartiment algal. Pour cela nous avons mesuré en parallèle l'effet des rejets sur d'autres paramètres métaboliques plus généraux : photosynthèse et croissance cellulaire. Le croisement des données de l'ensemble des bioessais permettant une vision globale de l'atteinte de l'organisme. C'est l'objet de la suite de l'étude.

11.2 Efficacité photosynthétique

Les variations de la fluorescence chlorophyllienne peuvent être évaluées par le biais l'augmentation de fluorescence induite par le DCMU qui provoque un blocage complet de la photosynthèse et par conséquent une fluorescence maximum. Les résultats sont traduits en matière de pourcentage d'activité photosynthétique résiduelle selon la formule suivante :

$$F_{res} (\%) = \frac{\Delta F_{essai}}{\Delta F_{témoin}} * 100$$

Avec $\Delta F = F_u - F_o$, F_u étant la fluorescence avant empoisonnement et F_o la fluorescence après empoisonnement au DCMU 4mg/l (Rebillard, 1989).

Comme avec les activités enzymatiques selon le rejet considéré l'efficacité photosynthétique peut être inhibée ou stimulée et on constate une grande variabilité dans les résultats (Tableau 44). Toutefois après 48h de contact avec les rejets de temps sec nous n'avons relevé que des inhibitions, preuve de la toxicité avérée des rejets de temps sec, concordant avec les essais d'inhibition de la croissance cellulaire (résultats non encore présentés, cf. ci-après).

Tableau 44 : % d'activité photosynthétique résiduelle de cellules de type *C. vulgaris* sur les échantillons de temps sec filtrés (F) et non filtrés (NF) après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition

Site	Date	2 h		24 h		48 h	
		NF	F	NF	F	NF	F
Chassieu	18/01/2011	126,31	129,27	111,64	85,8	65,47	47,06
	03/02/2011	98,72	126,55	73,18	81,41	87,92	72,43
	03/03/2011	34,77	94,12	6,96	163,43	/	/
	20/05/2011	165,12	154,89	137,09	151,92	91,48	49,79
	20/02/2012	155,45	165,17	143,12	139,78	22,5	79,58
	16/03/2012	148,32	135,85	129,45	145,55	73,61	94,06
Ecully	03/03/2011	123,45	139,21	44,23	116,18	/	/

Sur les échantillons de temps de pluie (Tableau 45) les résultats sont bien plus variables que par temps sec. Sur le bassin de Chassieu après 2 h de contact 4 rejets sur 6 stimulent l'efficacité photosynthétique et c'est le cas pour 5 rejets sur 6 après 24 h d'exposition.

Les rejets du DO d'Ecully entraînent également des réponses d'une grande variabilité, selon que le rejet soit filtré ou non et selon le temps de contact.

Après 2 h d'exposition l'ensemble des rejets de Bron (non filtrés) entraînent une diminution de l'activité résiduelle, compris entre 69 % et 97 % Nous avons donc une atteinte précoce du photosystème II par les contaminants chimiques présents dans les effluents.

Tableau 45 : % d'activité photosynthétique résiduelle de cellules de type *C. vulgaris* sur les échantillons de temps de pluie filtrés (F) et non filtrés (NF) après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition

Site	Date	2 h		24 h		48 h	
		NF	F	NF	F	NF	F
Chassieu	24/02/2011	95,62	96,33	185,45	182,51	/	/
	13/07/2011	121,88	124,33	10,69	103,53	33,12	58,5
	19/10/2011	129,99	104,32	167,06	210,97	136,85	53,14
	02/01/2011	106,8	111,93	194,97	86,4	117,03	107,32
	05/01/2012	114,13	105,17	167,04	153,35	127,68	114,05
	21/05/2012	99,73	82,45	116,57	121,06	73,52	93,02
Ecully	24/02/2011	125,67	152,3	90,18	76,09	/	/
	19/10/2011	82,03	106,38	153,51	194,49	125,55	122,13
	22/05/2012	93,87	88,56	123,62	148,99	86,31	111,54
Bron	31/05/2011	69,32	115,73	163,58	143,43	/	/
	13/07/2011	88,51	126,58	21,51	102,16	46,23	67,61
	19/10/2011	94,14	85,27	123,43	144,76	26,81	76,29
	02/01/2012	84,61	104,81	163,08	122,84	152,97	39,1
	22/05/2012	97,4	91,41	111,56	109,24	85,47	84,83

Contrairement aux autres bioessais, nous avons réalisé des mesures de l'efficacité photosynthétique sur des effluents bruts mais également après filtration. Ce prétraitement a eu pour conséquence 3 types de phénomènes :

- L'échantillon filtré voit son activité augmentée par rapport à l'échantillon brut : l'effet toxique de l'échantillon est donc porté totalement ou partiellement par la fraction particulaire $> 0,45 \mu\text{m}$;
- L'échantillon qui stimulait l'efficacité photosynthétique (ou qui n'avait pas d'effet) devient après filtration source d'inhibition. La fraction $> 0,45 \mu\text{m}$ est certainement source de nutriments, ce qui masquait les effets toxiques contenus dans la fraction dissoute ;
- L'échantillon neutre devient source de stimulation de l'efficacité photosynthétique après la filtration. La fraction particulaire porte donc tout ou partie de l'effet toxique et la fraction dissoute est riche en éléments nutritifs.

Ainsi les essais de mesure de l'efficacité photosynthétique mettent en lumière la l'importance que peut avoir dans certains cas la composante particulaire sur les effets observés. On note une nouvelle fois la variabilité des effluents et de leurs effets sur le compartiment algal.

11.3 Croissance cellulaire

Les essais d'inhibition de la croissance cellulaire ont été réalisés à l'aide de deux milieux de culture différents sur les algues *P. subcapitata* et *C. vulgaris*.

Pour l'interprétation des données nous utiliserons les valeurs obtenues avec les algues *C. vulgaris* en milieu de culture Lefebvre – Czarda (Oligo LC) de manière à pouvoir comparer les résultats obtenus avec les mesures de l'activité enzymatique et de fluorescence chlorophyllienne qui ont été réalisés dans ce milieu. Nous reviendrons sur les différences de résultats obtenues avec les algues *P. subcapitata* en milieu de culture ISO (conformément à la norme en vigueur) dans un paragraphe de discussion.

11.3.1 Résultats

Le Tableau 46 montre que les eaux de temps sec prélevées à Ecully inhibent la croissance cellulaire de 34 % et de 24 % pour les 2 échantillons testés. Les eaux de temps sec du BR de Chassieu prélevées à partir de mars 2011 inhibent également la croissance cellulaire, de 30 % à 100 %. Les deux rejets prélevés plus tôt, janvier et février 2011 n'ont que peu d'effets sur la croissance cellulaire. On observe une légère stimulation de la croissance pour ces échantillons (valeurs négatives).

Tableau 46 : % d'inhibition de la croissance de cellules de type *P.subcapitata* (PS) et *C. vulgaris* (CV) 72 h après inoculation des échantillons de temps sec et selon le milieu de culture utilisé

Site	Date	Temps sec	
		PS ISO	CV Oligo LC
Chassieu	18/01/2011	51,20	-10,69
	03/02/2011	100,00	-2,30
	03/03/2011	100,00	100,00
	20/05/2011	80,09	30,70
	20/02/2012	1,76	61,19
	16/03/2012	36,93	43,18
	25/04/2012	-20,52	100,00
Ecully	03/02/2011	100,00	34,48
	03/03/2011	100,00	24,22

Comme par temps sec, par temps de pluie la totalité des échantillons prélevés à Chassieu inhibe la croissance cellulaire à l'exception de l'effluent prélevé le 19/10/11. Sur les échantillons analysés par le CNRS on remarque une pollution particulière très importante en HAP et en alkylphénols.

Avec les rejets d'Ecully on constate une grande variabilité des résultats (semblables à l'APA 24 h) avec un rejet entraînant une complète inhibition de la croissance, un second ne provoquant pas effet et enfin un dernier stimulant la croissance cellulaire.

Avec les échantillons de Bron nous avons constaté 100 % d'inhibition de la croissance cellulaire, variant de 11 % à 100 %.

Tableau 47 : % d'inhibition de la croissance de cellules de type *P.subcapitata* (PS) et *C. vulgaris* (CV) 72 h après inoculation des échantillons de temps de pluie et selon le milieu de culture utilisé

Site	Date	Temps de pluie	
		PS ISO	CV Oligo LC
Chassieu	24/02/2011	42,80	54,61
	13/07/2011	10,38	100,00
	19/10/2011	-54,11	100,00
	02/01/2011	29,40	92,83
	05/01/2012	17,09	100,00
	21/05/2012	-22,95	36,61
Ecully	24/02/2011	80,56	7,30
	19/10/2011	-201,92	32,42
	22/05/2012	-35,36	84,24
Bron	31/05/2011	-42,13	44,83
	13/07/2011	-12,02	90,29
	19/10/2011	83,42	73,41
	02/01/2012	15,96	100,00
	22/05/2012	-3,70	7,83

Nous constatons de grandes différences selon que l'essai ait été mené conformément à la norme ou selon notre protocole. Il semble que la norme sous-estime la toxicité des rejets, l'inhibition moyenne ne dépassant pas 10 % sur les 3 bassins versants étudiés alors qu'avec notre protocole nous obtenons pour Chassieu, Ecully et Bron respectivement 80 %, 40 % et 60 % d'inhibition (Figure 36). La cause de ce phénomène est très certainement la concentration en nutriments (cf. annexe). Le milieu ISO préconisé dans la norme en vigueur est beaucoup moins concentré en nutriments que le milieu Oligo LC. Aussi une matrice environnementale fortement chargée en nutriments peut avoir tendance à stimuler la croissance par rapport à l'échantillon témoin réalisé en milieu ISO, et ce, malgré la présence de polluants dans cette matrice. Ce phénomène reste limité avec le milieu Oligo LC grâce à la quantité de nutriments présents, supérieurs aux besoins cellulaires. L'apport supplémentaire via une matrice environnementale ne tend donc pas à stimuler la croissance.

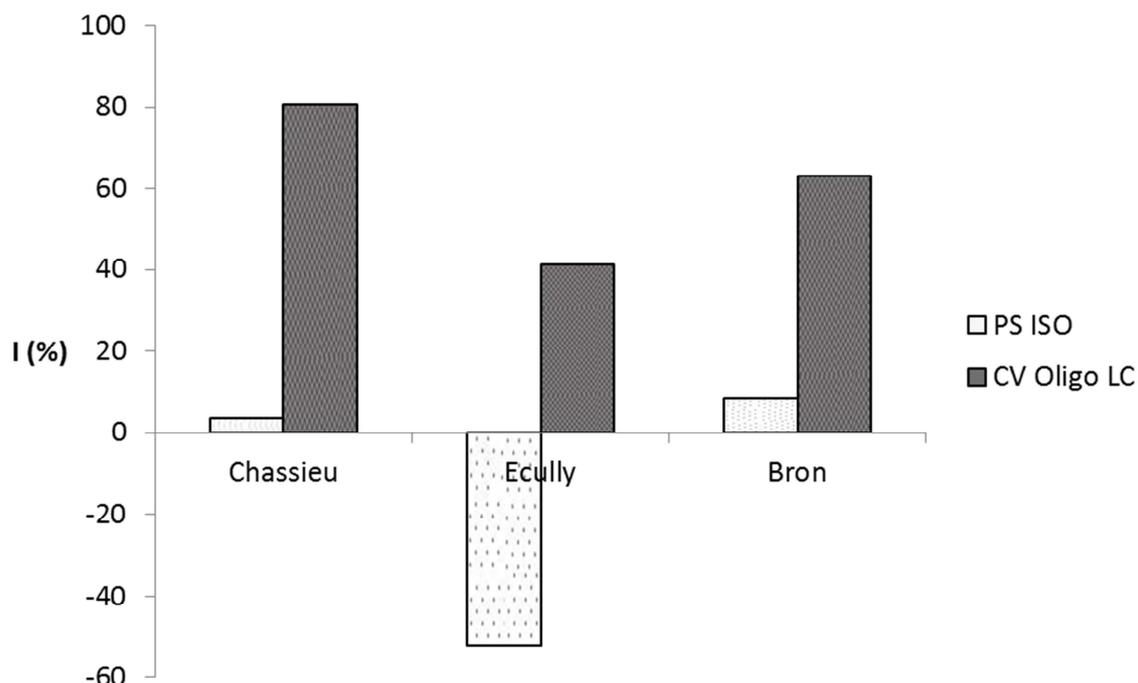


Figure 36 : % d'inhibition moyen de la croissance de cellules de type *P.subcapitata* (PS) et *C.vulgaris* (CV) 72 h après inoculation des échantillons de temps de pluie et selon le milieu de culture utilisé

11.3.2 Calcul des CE₅₀

Nous avons souhaité réaliser des calculs de CE₅₀ (proportion de l'effluent dans le milieu d'essai nécessaire pour inhiber la croissance cellulaire de 50 %). Au vu des résultats obtenus précédemment nous avons fait un compromis sur le protocole en travaillant avec la souche algale *P. subcapitata* mais avec le milieu de culture Oligo LC. Ces essais de détermination de CE₅₀ n'ont pas pu tous être réalisés à cause du manque d'effluents, utilisés par les bioessais et mesures en biocapteurs.

Avec les rejets de Chassieu (4 échantillons testés) nous avons en moyenne une relation dose – effet assez marquée (Figure 37). L'inhibition peut être considérée comme significative (>10 %) à partir d'une proportion en effluent de 70 % (dilué à 30 %). On atteint alors un palier, avec une inhibition maximale d'environ 20 %. Nous ne pouvons donc pas calculer de CE₅₀ sur les valeurs moyennes. En revanche c'est possible pour un rejet, celui du 22/05/2012 avec une CE₅₀ d'environ 0,9.

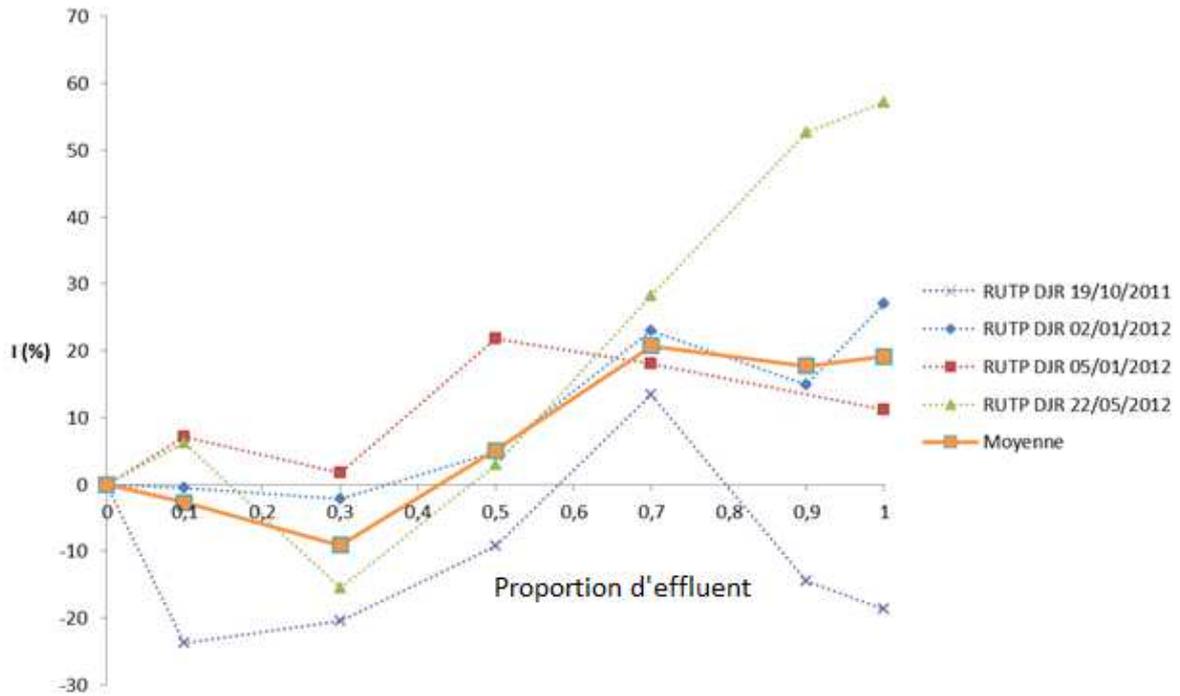


Figure 37 : % d'inhibition de la croissance de cellules de type *P.subcapitata* 72 h après inoculation des échantillons de temps de pluie de Chassieu en proportions variables

Avec les deux rejets testés provenant du D.O d'Ecully (Figure 38) nous obtenons en moyenne une stimulation de la croissance cellulaire, dès que le rejet est présent (proportion de 0,1). Dans le détail le rejet du 19/10/2011 est globalement sans impact pour la croissance cellulaire, le rejet du 22/05/2011 étant source de stimulation importante (entre 40 et 60 % selon la dilution). Là encore il n'est pas possible de calculer une CE_{50} .

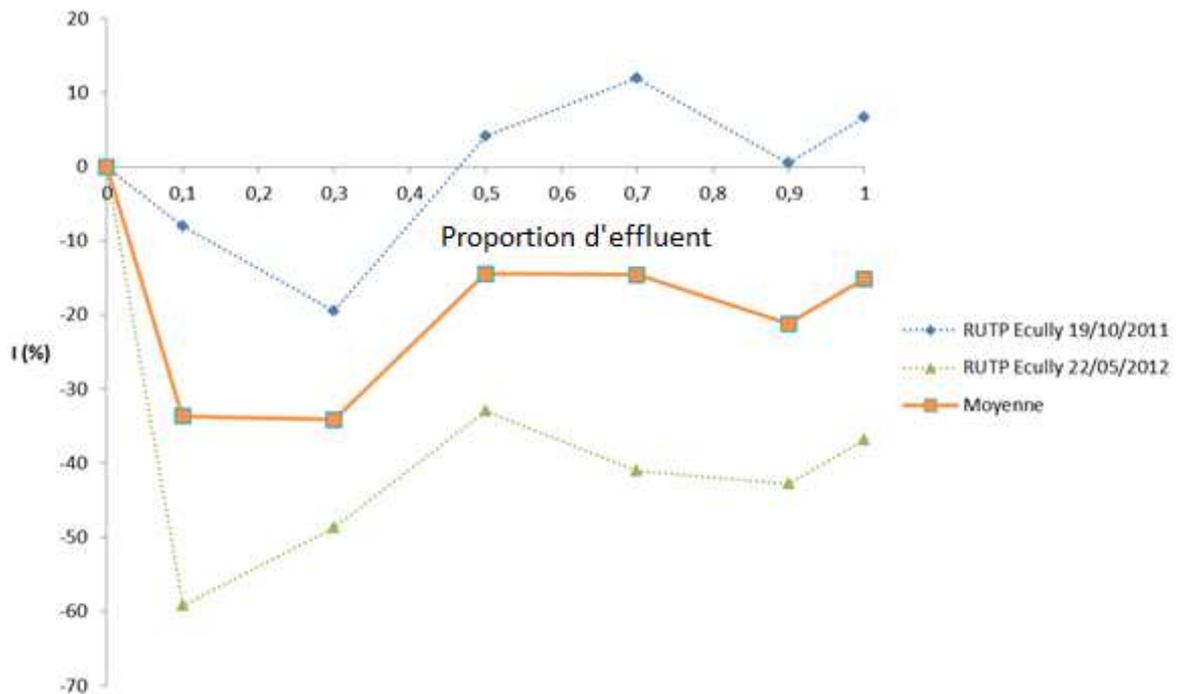


Figure 38 : % d'inhibition de la croissance de cellules de type *P.subcapitata* 72 h après inoculation des échantillons de temps de pluie d'Ecully en proportions variables

Les effluents du bassin de rétention de Bron se comportent de manière similaire à ceux de Chassieu (Figure 39). En moyenne nous constatons une inhibition significative de la croissance à partir d'une portion d'effluent de 0,5. On atteint alors un palier d'environ 40 % d'inhibition. En fait le rejet du 02/01/2012 impacte peu la croissance, (entre -20 % et +20 %), c'est celui prélevé le 19/10/2011 qui a le plus d'effets (80 % d'inhibition). Ce dernier échantillon permet d'obtenir une CE_{50} de 0.6 environ.

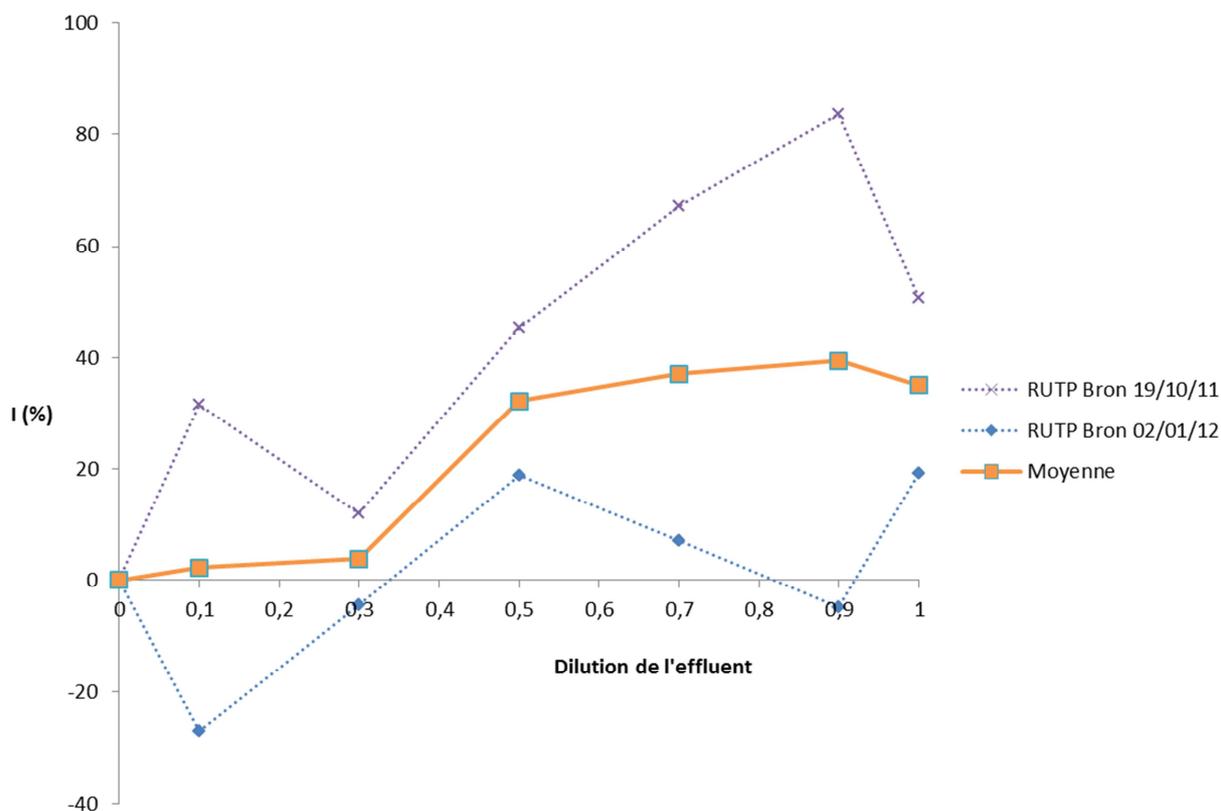


Figure 39 : % d'inhibition de la croissance de cellules de type *P.subcapitata* 72 h après inoculation des échantillons de temps de pluie de Bron en proportions variables

11.3.3 Synthèse des résultats sur la croissance cellulaire

L'ensemble des essais menés à l'aide du milieu Oligo LC montrent que les rejets sont très toxiques dans 52 % des cas (inhibition ≥ 50 %), moyennement toxiques dans 30 % des cas ($10 \leq$ inhibition < 50 %), sans effet dans 13% des cas ($-10 <$ inhibition $< +10$ %) et enfin nous avons constaté une stimulation dans 4 % des cas (inhibition < -10 %). Nous voyons que ce bioessai est très sensible car il y a inhibition avec plus de 80 % des échantillons récoltés ce qui n'était pas le cas avec les bioessais réalisés précédemment. En revanche, conformément aux résultats précédents, nous remarquons une variabilité importante entre échantillons récoltés sur un même site ou récoltés à la même date mais sur des sites différents.

Il existe des différences entre les rejets de temps sec et de temps de pluie : ces derniers semblent impacter de manière plus forte la croissance cellulaire avec 95% des échantillons entraînant une inhibition. La pollution particulière, notamment métallique pourrait expliquer en partie ce phénomène ; Angerville (2009) et Bonet (2012) ont tous deux montrés l'impact des éléments traces métalliques sur la croissance d'algues unicellulaires.

Effet du milieu de culture : dans de nombreux cas les résultats menés avec le milieu de culture ISO sont concordants avec ceux réalisés avec le milieu Oligo LC. Mais dans certains cas on assiste à des stimulations de croissance ou à un effet nul alors que le rejet est toxique en présence du milieu Oligo LC. Comme nous l'avons vu dans la partie B ce phénomène est dû à la composition du milieu ISO. Ce dernier est peu concentré en nutriments et les microalgues ont tendance à être carencées en certains ions. Aussi le rejet peut apporter un complément utile au développement de la plante, et comparativement au témoin on peut alors dans certains cas constater une croissance plus importante (tant que le rejet n'est pas trop chargé en toxiques).

Le milieu Oligo LC bien plus concentré en nutriments, permet alors d'éviter ce phénomène pour ne prendre en compte que l'effet toxique.

11.4 Traitement statistique des données

Malgré l'étude de la littérature concernant les effets des différents polluants sur les activités cellulaires il nous est extrêmement compliqué d'expliquer les inhibitions et stimulations constatées aux résultats d'analyse présentés dans le chapitre 1. Au vu des effets d'addition, de synergie et d'antagonisme existant entre tous les polluants présents cette démarche aurait peu de chance d'aboutir. Aussi, afin de mettre en avant les rejets ayant le plus d'effets, nous avons entrepris la réalisation d'une analyse statistique exploratoire.

11.4.1 Généralités

Cette analyse a donc été menée en vue de relier les résultats des bioessais avec les résultats des analyses physicochimiques. Afin de traiter les données de manière intelligible nous avons choisi différents codes pour nommer les évènements traités (Tableau 48) ainsi que les résultats des bioessais et les données physicochimiques (Tableau 49).

Tableau 48 : codes donnés aux échantillons pour l'étude statistique

Site	Date	Temps	Code
Chassieu	18/01/2011	Sec	1.TS.DJR
	03/02/2011	Sec	2.TS.DJR
	24/02/2011	Pluie	3.TP.DJR
	03/03/2011	Sec	4.TS.DJR
	20/05/2011	Sec	5.TS.DJR
	13/07/2011	Pluie	6.TP.DJR
	19/10/2011	Pluie	7.TP.DJR
	02/01/2012	Pluie	8.TP.DJR
	05/01/2012	Pluie	9.TP.DJR
	20/02/2012	Sec	10.TS.DJR
	16/03/2012	Sec	11.TS.DJR
	25/04/2012	Sec	12.TS.DJR
	22/05/2012	Pluie	13.TP.DJR
Ecully	03/02/2011	Sec	1.TS.Ec
	24/02/2011	Pluie	2.TP.Ec
	03/03/2011	Sec	3.TS.Ec
	19/10/2011	Pluie	4.TP.Ec
	22/05/2012	Pluie	5.TP.Ec
Bron	31/05/2011	Pluie	1.TP.Br
	13/07/2011	Pluie	2.TP.Br
	19/10/2011	Pluie	3.TP.Br
	02/01/2012	Pluie	4.TP.Br
	22/05/2012	Pluie	5.TP.Br

Tableau 49 : codes donnés aux résultats des bioessais et aux mesures physicochimiques pour l'analyse statistique

Bioessais	Temps d'expo	Code	Physicochimie	Forme	Code
Inhibition de l'AE	2h	AE.2h	ions nutritifs	dissous	d.nutriments
	24h	AE.24h			
	48h	AE.48h			
Inhibition de l'APA	2h	APA.2h	ETM	dissous	d.métaux
	24h	APA.24h			
	48h	APA.48h			
Croissance	72h	Croissance	pesticides	dissous	d.pesticides
Efficacité Photo-synthétique	2h	Fluo.2h	alkylphénols	dissous	d.alkylphenols
	24h	Fluo.24h			
	48h	Fluo.48h			
			HAP	dissous	d.HAP
				particulaire	p.HAP

Nous avons travaillé par bassin versant, puis avec tous les rejets confondus pour terminer sur les rejets de temps de pluie uniquement. Pour chaque catégorie étudiée nous avons tout d'abord réalisé une analyse en composantes principales (ACP) sur les données écotoxicologiques afin d'éliminer certains paramètres corrélés et redondants. Puis sur le jeu de données Ecotox/physicochimie nous avons réalisé une analyse canonique de la redondance (ACR) afin de représenter de manière graphique les liens entre les paramètres étudiés. Pour terminer nous avons fait l'analyse de deux coefficients de corrélations : le coefficient linéaire de Bravais-Pearson et le coefficient de rang de Kendall. Nous utilisons ici une matrice contenant les données écotoxicologiques, les données physicochimiques mais également les données météorologiques (durée, intensité, volume précipité et nombre de jours de temps sec ayant précédé l'événement). Le coefficient de Pearson correspond au rapport de la covariance des variables sur le produit des covariances de chaque variable. Il évalue de linéarité entre les variables deux à deux. Le coefficient de Kendall est un test non paramétrique permettant de quantifier le degré d'association de deux variables, association non nécessairement linéaire. Nous retiendrons comme significatives les valeurs supérieures à 0,5 (en valeur absolue), sauf pour Ecully où nous retenons les valeurs supérieures à 0,7 en raison du faible nombre d'échantillons.

11.4.2 Tendances par bassin versant

11.4.2.1 Chassieu

Une ACP préliminaire sur les données écotoxicologiques a montré une corrélation forte entre les inhibitions de l'AE 2 h et l'AE 24 h. C'est également le cas entre l'efficacité photosynthétique à 48 h et l'inhibition de l'APA 2 h (résultats non montrés).

L'ACR (Figure 40) nous montre que les rejets de temps de pluie sont globalement regroupés au même endroit de la carte des individus (centre) tandis que les rejets de temps sec sont bien plus éparpillés. Les rejets de temps de pluie ont donc certaines caractéristiques communes. On remarque de plus que l'inhibition de l'APA est bien corrélée avec les alkylphénols dissous. L'inhibition de l'efficacité photosynthétique 2h est corrélée positivement avec les alkylphénols particuliers et à 24 h avec les pesticides et les HAP (dissous et particuliers).

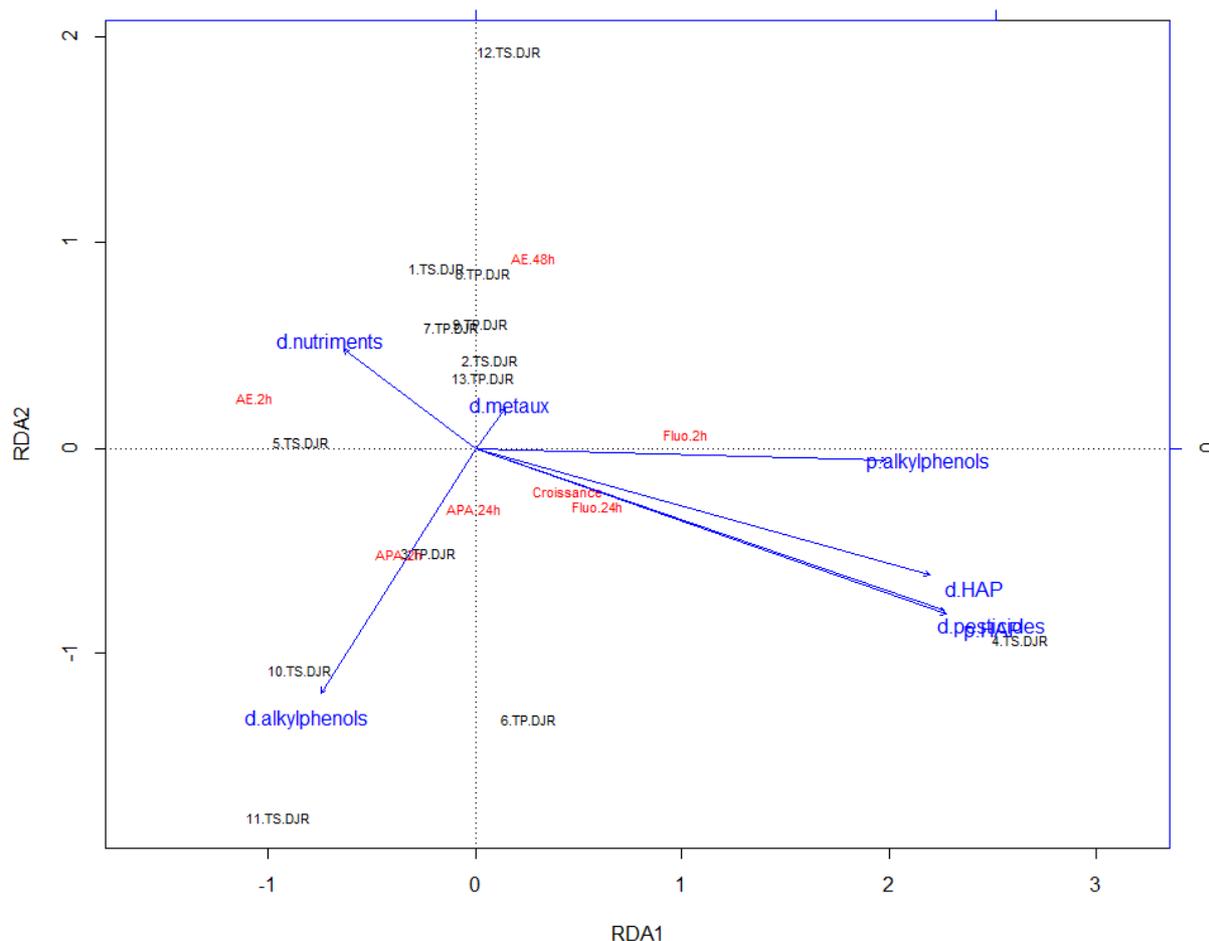


Figure 40 : analyse canonique de la redondance sur les échantillons prélevés à Chassieu à partir des données physicochimiques et des bioessais menés sur algues libres

Du côté des corrélations de Pearson positives on retrouve l'inhibition de l'efficacité photosynthétique et les pesticides, les HAP dissous/particulaires (Tableau 50). On constate également un lien positif entre la croissance cellulaire (stimulation) et la présence de nutriments et de métaux. La présence de métaux est fortement corrélée aux nombre de jours de temps sec ayant précédé l'échantillonnage (0,93). Il existe des corrélations négatives fortes entre l'AE 2 h et les pesticides et HAP. On notera également la corrélation négative existante entre la concentration en nutriments et les caractéristiques de la pluie. Plus l'événement dure longtemps et est important en volume et plus les nutriments sont dilués.

Tableau 50 : valeurs du coefficient de Pearson sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo de Chassieu

	Coefficient de Pearson – BR de Chassieu								
	Croissance	Fluo.2h	Fluo.24h	APA.48h	AE.2h	AE.48h	Durée	Pluvio	JTempsSec
d.nutriments	-0,72	-0,32	0,13	-0,69	0,10	0,03	-0,55	-0,62	0,55
d.métaux	-0,50	0,14	0,26	-0,40	-0,08	0,08	-0,36	-0,37	0,93
d.pesticides	0,28	0,72	0,56	0,25	-0,99	-0,09	-0,19	-0,20	0,02
d.HAP	0,36	0,75	0,43	0,39	-0,94	-0,09	-0,11	-0,17	-0,06
d.alkylphenols	-0,01	-0,18	-0,15	0,15	0,20	-0,64	0,04	-0,09	-0,17
p.HAP	0,38	0,75	0,26	0,52	-0,77	0,10	0,15	0,04	-0,07

Les valeurs du coefficient de rang Kendall (Tableau 51) montrent également la corrélation métaux - nombre de jours de temps sec. On retrouve aussi le lien très fort qui existe entre la concentration en nutriments et les caractéristiques de la pluie.

Tableau 51 : valeurs du coefficient de Kendall sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo de Chassieu

	Coefficient de Kendall - BR de Chassieu						
	Fluo.48h	APA.24h	APA.48h	Durée	Pluvio	Intensité	JTempsSec
d.nutriments	0,05	0,12	-0,49	-0,61	-0,67	-0,67	0,25
d.métaux	-0,05	0,17	-0,30	-0,28	-0,28	-0,28	0,67
d.pesticides	-0,26	-0,45	0,19	0,02	-0,02	-0,02	-0,16
p.HAP	-0,51	-0,34	0,25	0,24	0,13	0,13	0,00
p.alkylphenols	-0,48	-0,47	0,25	0,28	0,24	0,24	-0,14

11.4.2.2 Ecully

Une ACP réalisée sur les valeurs d'inhibition des différentes activités enzymatiques (résultats non montrés) a montré que l'AE 2 h était corrélée avec AE 24 et 48 h. Nous ne retenons que l'AE 24 h pour mener une ACR. Idem avec l'APA que nous retenons pour un temps d'exposition de 2 h.

L'ACR (Figure 41) montre une dispersion des paramètres écotoxicologiques sur le cercle des corrélations. Les pesticides sont proches de l'inhibition de la croissance cellulaire indiquant une corrélation positive.

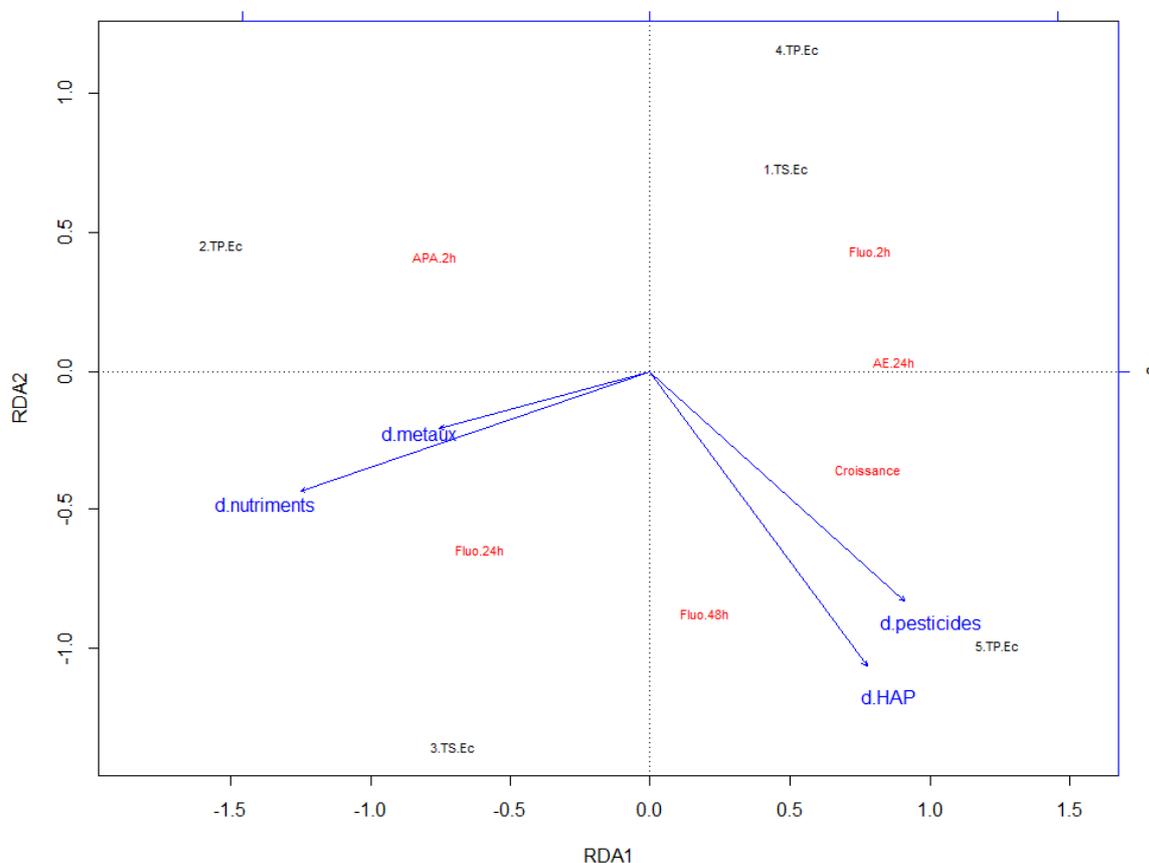


Figure 41 : analyse canonique de la redondance sur les échantillons prélevés à Ecully à partir des données physicochimiques et des bioessais menés sur algues libres

Le Tableau 52 montre que l'inhibition de l'efficacité photosynthétique à 48 h est très fortement corrélée positivement avec les micropolluants organiques tandis que l'inhibition de l'APA 2 h est corrélée négativement avec ces mêmes polluants. Ces deux activités sont positionnées de part et d'autre sur le cercle des corrélations.

Tableau 52 : valeurs du coefficient de Pearson sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo d'Ecully

	Coefficient de Pearson - DO d'Ecully							
	Croissance	Fluo.2h	Fluo.24h	Fluo.48h	APA.2h	AE.24h	Pluvio	Intensite
d.nutriments	-0,74	-0,92	0,90	-0,61	0,49	-0,79	-0,76	-0,83
d.metaux	-0,62	-0,66	0,69	-0,69	0,46	-0,41	-0,98	-0,88
d.pesticides	0,93	0,35	-0,17	0,99	-0,89	0,47	0,78	0,46
d.HAP	0,88	0,20	0,03	0,95	-0,91	0,40	0,66	0,32
d.alkylphenols	0,93	0,35	-0,23	1,00	-0,83	0,45	0,80	0,45
p.HAP	0,92	0,58	-0,35	0,92	-0,91	0,63	0,86	0,71
p.alkylphenols	0,93	0,35	-0,23	1,00	-0,83	0,45	0,80	0,45

D'après la matrice des coefficients de Kendall (Tableau 53) les nutriments inhibent l'efficacité photosynthétique et l'APA à 24 h mais stimulent l'AE à 24 h. Les ETM sont fortement corrélés à l'inhibition de l'APA 24 h. Nutriments et ETM sont corrélés négativement avec la pluviométrie : plus il pleut et plus ces éléments sont dissous. Les eaux de temps sec drainent donc la majorité de ces polluants. Les HAP dissous, les alkylphénols dissous et particuliers sont corrélés avec l'efficacité photosynthétique à 48 h. Les HAP particuliers sont corrélés avec l'inhibition de l'AE à 24 h.

Tableau 53 : valeurs du coefficient de Kendall sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo d'Ecully

	Coefficient de Kendall - DO d'Ecully						
	Fluo.24h	Fluo.48h	APA.2h	APA.24h	AE.24h	Pluvio	Intensité
d.nutriments	0,80	-0,63	0,40	1,00	-0,80	-0,74	-0,53
d.metaux	0,60	-0,63	0,20	0,80	-0,60	-0,95	-0,74
d.pesticides	-0,11	0,67	-0,95	-0,32	0,53	0,44	0,22
d.HAP	0,12	0,76	-0,84	-0,12	0,36	0,25	0,00
d.alkylphenols	-0,32	1,00	-0,63	-0,63	0,63	0,67	0,33
p.HAP	-0,32	0,67	-0,74	-0,53	0,74	0,67	0,44
p.alkylphenols	-0,32	1,00	-0,63	-0,63	0,63	0,67	0,33

11.4.2.3 Bron

L'ACP préliminaire menée sur les valeurs écotoxicologiques du BR de Bron ont montré que l'AE 24 h et l'AE 48 h étaient corrélées. C'est également le cas pour l'AE 2 h ; l'APA 2 h ; Fluo 24 h et Fluo 48 h. Ainsi nous avons supprimé l'AE 48 h, l'AE 2 h et Fluo 48 h de l'ACR.

L'ACR (Figure 42) montre une forte corrélation entre la présence de pesticides et l'inhibition de l'APA 48 h ainsi que l'efficacité photosynthétique à 2 h.

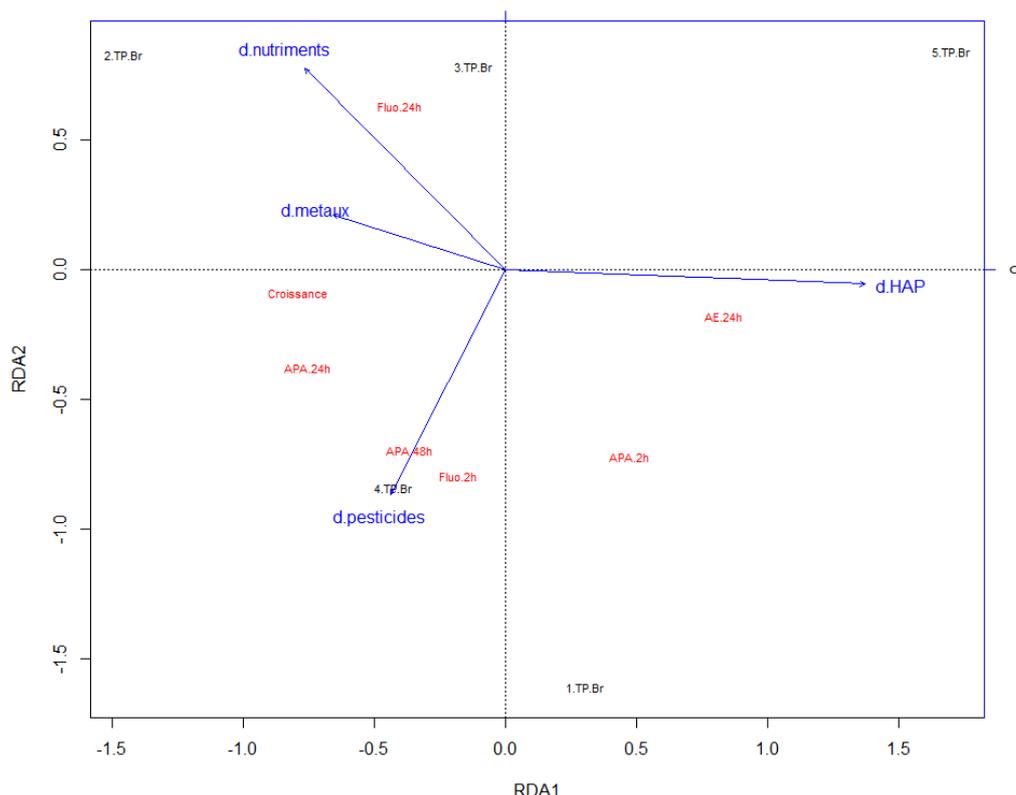


Figure 42 : analyse canonique de la redondance sur les échantillons prélevés à Bron à partir des données physicochimiques et des bioessais menés sur algues libres

Peu de corrélations positives sont mises en avant par l'étude des corrélations de Pearson (Tableau 54). La croissance est inhibée par les nutriments et les pesticides. De même l'inhibition de l'AE est corrélée avec les HAP et les alkylphénols sous forme dissoute. D'autre part le nombre de jours de temps sec ayant précédé le prélèvement est corrélé avec la pollution particulaire et les pesticides sous forme dissoute. La durée de l'évènement est également corrélée avec la pollution aux alkylphénols sous forme dissoute.

Tableau 54 : valeurs du coefficient de Pearson sur la matrice physicochimie/écotoxicologie de Bron

	Coefficient de Pearson - BR de Bron								
	Croissance	Fluo.2h	APA.24h	APA.48h	AE.24h	Durée	Pluvio	Intensite	JTempsSec
d.nutriments	0,52	-0,40	0,18	-0,44	-0,59	-0,59	-0,50	-0,05	0,13
d.métaux	0,35	-0,01	0,37	-0,35	-0,47	-0,38	-0,22	-0,03	0,61
d.pesticides	0,55	0,11	0,14	0,56	-0,15	-0,33	-0,85	-0,43	-0,40
d.HAP	-0,37	-0,33	-0,74	-0,03	0,64	0,47	-0,42	-0,63	-0,53
d.alkylphenols	-0,60	-0,50	-0,90	-0,27	0,72	0,59	-0,09	-0,43	-0,57
p.HAP	-0,07	0,33	0,25	-0,24	-0,02	0,12	-0,01	-0,26	0,93
p.alkylphenols	0,02	0,07	0,17	-0,43	-0,14	-0,02	-0,12	-0,23	0,79

Les valeurs du coefficient de Kendall (Tableau 55) confirment certaines corrélations : l'APA et les pesticides, l'AE et la pollution aux HAP et aux alkylphénols. Ici la durée de l'évènement est corrélée avec la pollution aux HAP dissous. Enfin de la même manière le nombre de jours de temps sec avant échantillonnage est corrélé avec la pollution particulaire et avec les métaux dissous.

Tableau 55 : valeurs du coefficient de Kendall sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo de Bron

	Coefficient de Kendall - BR de Bron								
	Croissance	Fluo.48h	APA.24h	APA.48h	AE.24h	Durée	Pluvio	Intensite	JTempsSec
d.métaux	0,00	0,80	0,20	-0,20	-0,40	-0,20	0,00	0,40	0,60
d.pesticides	0,63	-0,63	0,00	0,63	0,00	-0,32	-0,63	-0,63	-0,38
d.HAP	-0,40	-0,40	-0,60	0,20	0,80	0,60	-0,40	-0,80	-0,12
d.alkylphenols	-0,12	-0,60	-0,60	0,12	0,60	0,36	-0,36	-0,60	-0,57
p.HAP	-0,12	0,84	-0,12	-0,36	-0,12	0,12	-0,12	0,36	0,71
p.alkylphenols	-0,12	0,84	-0,12	-0,36	-0,12	0,12	-0,12	0,36	0,71

11.4.3 Tendence générale

11.4.3.1 Tous rejets confondus

Une ACP préliminaire a mis en lumière la forte corrélation de l'AE 2 h et 24 h. Il en est de même entre l'APA 48 h et l'efficacité photosynthétique 48 h.

L'ACR (Figure 43) montre que l'APA est inhibée conjointement à la présence des alkylphénols et des métaux dissous. La croissance est stimulée par les ETM

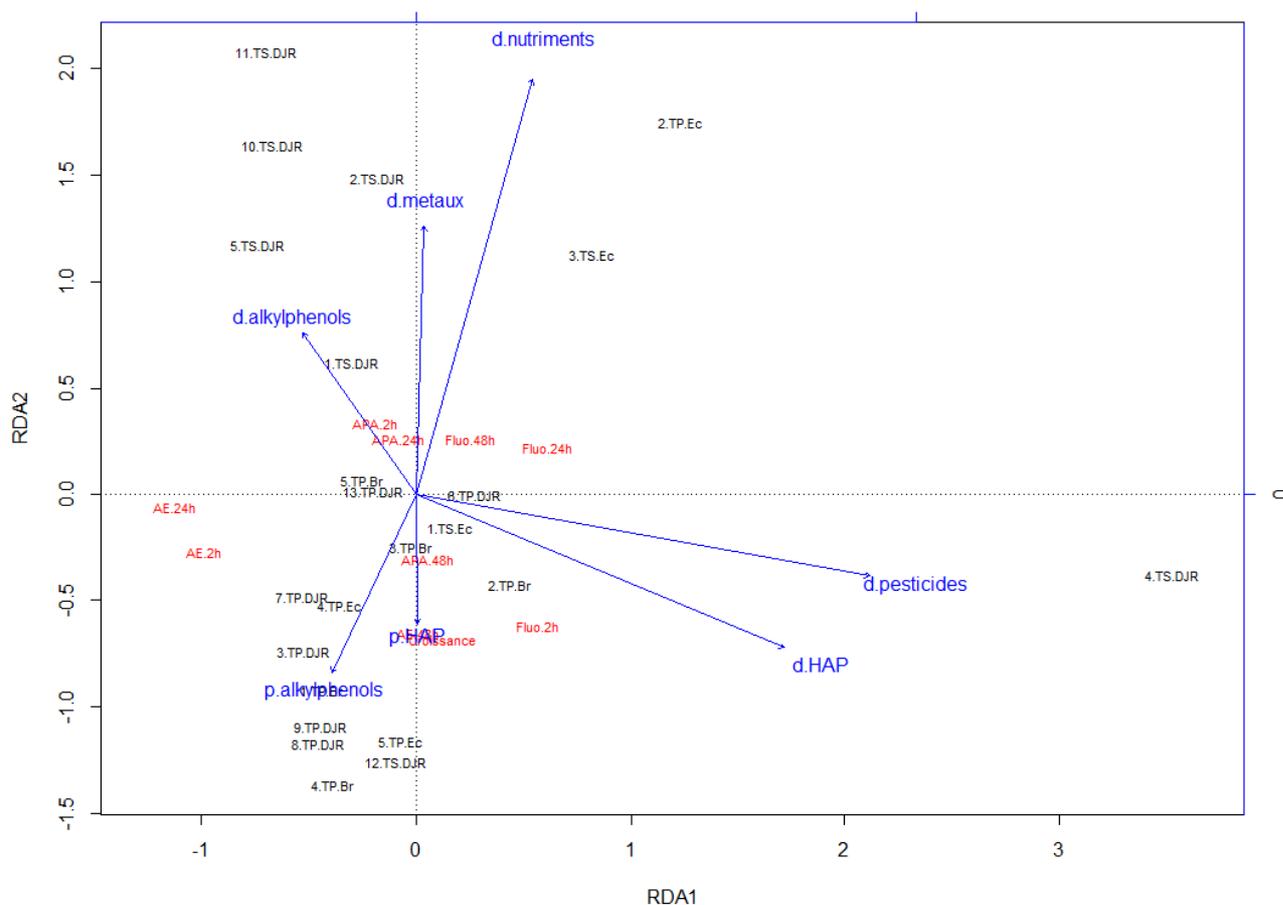


Figure 43 : analyse canonique de la redondance sur l'ensemble des échantillons prélevés à partir des données physicochimiques et des bioessais menés sur algues libres

Les valeurs du coefficient de corrélation linéaire de Bravais – Person (Tableau 56) nous montrent que l'inhibition de la croissance est corrélée négativement à la présence de nutriments. De plus pesticides et HAP dissous sont corrélés avec l'inhibition de l'efficacité photosynthétique à 2 h mais stimulent l'activité estérase à 24 h.

Comme précédemment la concentration en nutriments est corrélée négativement à la pluviométrie et la concentration en ETM est positivement corrélée aux nombre de jours de temps sec.

Tableau 56 : valeurs du coefficient de Pearson sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo

	Coefficient de Pearson - Tous les rejets					
	Croissance	Fluo.2h	AE.24h	AE.48h	Pluvio	JTempsSec
d.nutriments	-0,59	-0,41	-0,18	-0,10	-0,56	0,26
d.metaux	-0,29	-0,12	-0,13	-0,05	-0,39	0,50
d.pesticides	0,28	0,55	-0,89	-0,10	-0,14	-0,06
d.HAP	0,30	0,58	-0,75	-0,06	-0,10	-0,19
d.alkylphenols	0,06	-0,28	0,09	-0,63	-0,11	-0,19

La seule corrélation significative obtenue avec le calcul du τ de Kendall est entre la concentration en nutriments et la pluviométrie, ainsi qu'avec l'intensité de la pluie (corrélation négative), (résultats non présentés).

L'ensemble des bioessais réalisés ont permis de mettre en évidence plusieurs relations entre les données écotoxicologiques et physicochimiques. Ainsi il existe une forte relation entre la pollution aux HAP et alkylphénols et l'inhibition de l'activité estérase.

11.4.3.2 Rejets de temps de pluie uniquement

Une ACP préliminaire a mis en évidence la corrélation entre l'efficacité photosynthétique à 2 h et à 24 h, ainsi qu'entre les mesures de l'AE et de l'APA. Nous avons retenu ainsi Fluo.2h, Fluo.48h, l'APA 48 h et l'AE 24 h qui étaient les données les mieux projetées sur le cercle des corrélations.

L'ACR (Figure 44) nous montre que la croissance est très corrélée avec les alkylphénols particuliers. L'efficacité photosynthétique est corrélée avec les HAP particuliers. Les nutriments sont corrélés avec l'APA 48 h et les HAP dissous avec l'AE 24 h.

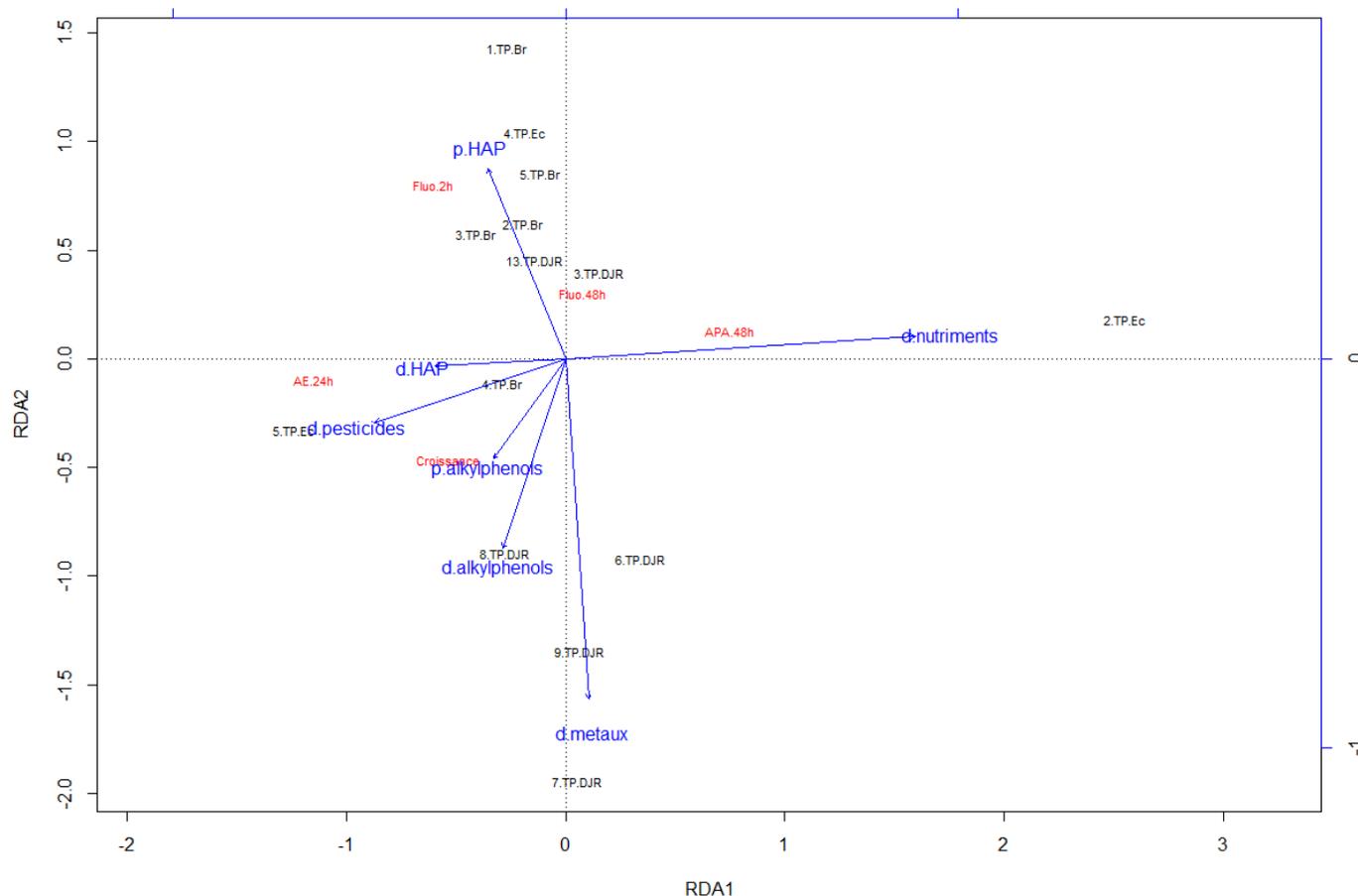


Figure 44 : analyse canonique de la redondance sur l'ensemble des échantillons prélevés par temps de pluie à partir des données physicochimiques et des bioessais menés sur algues libres

Le Tableau 57 nous montre que la présence de nutriments dans les eaux pluviales est corrélée positivement avec l'inhibition de l'APA 2 h et négativement avec l'inhibition de l'AE 2 h. La présence de métaux est corrélée négativement avec l'efficacité photosynthétique à 2 h. Les pesticides et les alkylphénols sont corrélés négativement avec l'inhibition de l'APA. Enfin la présence de HAP particuliers est corrélée positivement avec le nombre de jours de temps sec.

Tableau 57 : valeurs du coefficient de Pearson sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo rejets de temps de pluie

	Coefficient de Pearson - Rejets de temps de pluie				
	Fluo.2h	APA.2h	APA.24h	AE.2h	JTempsSec
d.nutriments	-0,40	0,72	0,20	-0,97	-0,06
d.metaux	-0,57	-0,14	0,21	0,06	0,39
d.pesticides	0,09	-0,59	-0,89	0,13	-0,24
d.alkylphenols	-0,18	-0,58	-0,23	0,16	0,02
p.HAP	0,41	0,10	0,14	0,18	0,67

Le calcul du coefficient de Kendall (Tableau 58) nous montre l'existence de corrélations négatives. La pollution organique est corrélée négativement avec l'inhibition de l'APA.

Tableau 58 : valeurs du coefficient de Kendall sur la matrice physicochimie/écotoxicologie/météo rejets de temps de pluie

	Coefficient de Kendall - Rejets de temps de pluie	
	APA.2h	APA.24h
d.pesticides	-0,41	-0,59
d.HAP	-0,17	-0,55
d.alkylphenols	-0,52	-0,54
p.alkylphenols	-0,46	-0,44

11.4.4 Apports du traitement statistique

Le traitement statistique permet « d'éclairer » nos résultats bruts, c'est-à-dire de mettre en évidence des relations entre les données disponibles qui ne sont pas visibles au premier coup d'œil.

Nous avons ainsi pu constater des grandes tendances, qui pour beaucoup d'entre elles sont, somme toute, logiques. Ainsi du point de vue de la composition des rejets, les nutriments sont dilués par les eaux pluviales, et donc leur concentration est inversement proportionnelle aux volumes précipités. Ce phénomène est très marqué sur le bassin versant d'Ecully à cause des fortes concentrations en nutriments dans les eaux usées (effluents de temps sec). On remarque également que les concentrations en micropolluants sous forme particulières et en métaux sont corrélées aux nombre de jours de temps ayant précédé l'événement pluvieux. Les dépôts s'accumulent et la pluie vient lessiver les particules métalliques et organiques.

D'un point de vue toxicité on ne retrouve pas systématiquement les liens métaux – inhibition de l'APA, micropolluants organiques – inhibition de l'AE et pesticides – inhibition de l'efficacité photosynthétique. Ce peut être le cas, comme avec les rejets d'Ecully, mais ce n'est pas la norme. Il existe donc un effet cocktail, certains composés contrebalançant ou amplifiant les effets de premiers. Mais malgré ce traitement statistique nous sommes incapables de mettre en avant certaines associations de polluants plus toxiques que d'autres pour tel ou tel paramètre physiologique.

Par le passé des auteurs ont réalisé ce type de traitement statistique sur des biofilms de réacteurs de station d'épuration exposés à des concentrations variables en chlorure de sodium (Cortés-Lorenzo et al., 2012). Ils ont étudié différentes activités enzymatiques : estérase, phosphatase acide, phosphatase alcaline, protéase et glucosidase. Ils ont confrontés ces activités à différents paramètres physicochimique (DCO, MES, DBO₅, pH, salinité et date du prélèvement des microorganismes) au cours d'une analyse canonique de la redondance. Ils ont ainsi mis en évidence que la salinité et la date du prélèvement étaient les deux paramètres les plus importants qui expliquaient les modifications des activités enzymatiques.

Enfin il est intéressant d'étudier les différences de résultats entre les rejets de temps de pluie et l'ensemble des rejets. Par temps de pluie les nutriments ont un poids plus important que sur l'ensemble des rejets alors que les concentrations sont plutôt faibles. Dans les deux cas la pollution particulaire ne joue pas un rôle important sur les activités étudiées contrairement à ce que l'on pouvait attendre. Ce constat est certainement dû au faible nombre d'analyses réalisées sur le particulaire par rapport au dissous et au fait que nous ne disposons pas de données sur les métaux à l'état particulaire.

11.5 Bilan des essais réalisés au laboratoire

11.5.1 Résultats globaux

Il est intéressant de regrouper tous les essais réalisés dans un seul tableau afin de pouvoir comparer les résultats entre eux. Afin de conserver une représentation claire nous n'avons conservé que les résultats des activités enzymatiques et de l'activité photosynthétique uniquement après une exposition aux rejets de 24 h. Nous choisissons cette durée comme base de comparaison entre les résultats des différentes activités étudiées car c'est un bon compromis entre toxicité aiguë et chronique. En effet 2 h de contact est un temps parfois court pour constater des effets et après 48 h d'exposition les tendances sont plus difficilement interprétables à cause de la mise en place de divers mécanismes de défenses cellulaires.

Un code couleur général a été adopté afin de rendre la présentation des résultats plus facile. La couleur rouge correspond à une forte inhibition de l'activité étudiée (supérieure à 50 %). L'orange représente une inhibition moyenne (entre 10 et 50 %). Le vert n'indique pas d'effet significatif. Enfin le violet représente une stimulation de l'activité étudiée (supérieur à 10 %) et le blanc correspond à l'absence de données.

Tableau 59 : résultats des essais menés au laboratoire sur les RUTP

Site	Date	Croissance		Fluo 24h		Bioessais	
		PS ISO	CV LC	NF	F	APA 24h	AE 24h
Chassieu	24/02/2011	Red	Red	Purple	Purple	Red	Orange
	13/07/2011	Orange	Red	Red	Green	Red	Green
	19/10/2011	Green	Red	Purple	Purple	White	Red
	02/01/2011	Red	Red	Purple	Orange	Purple	Red
	05/01/2012	Orange	Red	Purple	Purple	Orange	White
	21/05/2012	Purple	Orange	Purple	Purple	White	Orange
Ecully	24/02/2011	Red	Green	Green	Orange	Red	Purple
	19/10/2011	Purple	Orange	Purple	Purple	Green	Red
	22/05/2012	Purple	Red	Purple	Purple	Purple	Red
Bron	31/05/2011	Purple	Orange	Purple	Purple	Red	Red
	13/07/2011	Green	Red	Red	Green	Red	Green
	19/10/2011	Red	Red	Purple	Purple	Green	Orange
	02/01/2012	Orange	Red	Purple	Purple	Orange	Orange
	22/05/2012	Green	Green	Purple	Green	Purple	Red

Pour un évènement pluvieux donné on constate de grandes variations dans les réponses des biomarqueurs étudiés. Ainsi les polluants présents dans les effluents n'affectent pas de la même manière toutes les activités cellulaires. On note toutefois certaines tendances : la croissance des CV est inhibée dans 12 cas sur 14 et l'efficacité photosynthétique est stimulée dans 11 cas sur 14 pour les rejets non filtrés.

Tableau 60 : résultats des essais menés au laboratoire sur les RUTS

Site	Date	Croissance		IEP 24h		Bioessais	
		PS ISO	CV LC	NF	F	APA 24h	AE24h
Chassieu	18/01/2011						
	03/02/2011						
	03/03/2011						
	20/05/2011						
	20/02/2012						
	16/03/2012						
	25/04/2012						
Ecully	03/02/2011						
	03/03/2011						

Du côté des rejets de temps sec on constate là encore une forte inhibition de la croissance cellulaire. Mais autrement aucune tendance globale ne se dessine et il manque un certain nombre de résultats, limitant ainsi les potentialités d'interprétation.

11.5.2 Synthèse des résultats obtenus au laboratoire

Notre étude écotoxicologique, basée sur une approche matrice mono spécifique qui a été par la suite associée à l'évaluation des performances d'un biocapteur a abouti à plusieurs conclusions que nous discutons ici.

Pour un échantillon donné nous avons observé une grande variabilité de la réponse des biomarqueurs étudiés : certains sont stimulés, d'autres inhibés et ce, dans des proportions plus ou moins grandes. De même pour un biomarqueur donné, selon l'échantillon testé, son activité varie de manière importante. Il apparaît donc difficile de définir avec certitude et de manière univoque la toxicité d'un rejet. On pourrait imaginer la création d'une grille d'interprétation multicritères avec un système de pondération des activités étudiées. Mais on ne peut établir de hiérarchie pertinente entre les fonctions métaboliques. Aussi ce panel de biomarqueurs et de réponses doit être vu comme un atout et non comme une simple difficulté pour l'interprétation de la toxicité des rejets urbains. Tous les échantillons recueillis provoquent des effets sur le métabolisme cellulaire, ainsi ils sont tous « en capacité » d'impacter le milieu récepteur. Les différents effets nous fournissent des informations sur le mode / la voie d'impact. Une efficacité photosynthétique stimulée associée à une faible inhibition de la croissance cellulaire peut être annonciatrice d'un bloom algal. Une inhibition de la croissance cellulaire et des activités enzymatiques présage d'un impact fort sur les capacités de maintien du phytoplancton.

Conclusion

Nous avons réalisé toute une batterie de bioessais sur une espèce modèle, *Chlorella vulgaris*, dans le but d'évaluer l'impact des rejets urbains de temps de pluie sur le compartiment algal. Pouvons-nous maintenant répondre à cette question ?

Oui nous le pouvons : nous venons de voir que le métabolisme algal est perturbé par les rejets collectés, quel que soit le bassin versant étudié et l'époque de l'année. Les perturbations observées vont dans le sens d'une inhibition ou d'une stimulation mais dans les deux cas ces variations sont significatives de l'activité étudiée. D'autre part nous observons des réactions rapides ou différées dans le temps.

Pour résumer, l'impact des rejets urbains de temps de pluie est important sur le compartiment algal. Ces rejets modifient différents niveaux du métabolisme algal perturbant *in fine* son développement normal (croissance, maintien et reproduction).

Pour ce qui est des causes de l'impact, elles sont multiples et ne peuvent être définies de manière générale. Chaque site est unique et on ne peut transposer les résultats *sensu stricto* à d'autres ouvrages. En revanche des tendances générales se sont dessinées. On a ainsi pu établir des relations entre les données météorologiques et la physicochimie des eaux : dilution des nutriments en lien avec la quantité d'eaux précipitées et quantité de métaux et polluants particuliers reliées au nombre de jours de temps sec ayant précédé l'évènement pluvieux. Plus intéressant, il existe également des relations entre les polluants présents et les modifications du métabolisme algal. Ainsi nous avons confirmé l'effet des polluants organiques sur l'estérase (surtout les HAP) et l'effet des métaux sur l'APA. Mais dans de nombreux cas l'APA est également inhibée par les polluants organiques (pesticides, alkylphénols). Notons par ailleurs le fort effet des alkylphénols qui sont corrélés avec l'inhibition de l'efficacité photosynthétique et la croissance cellulaire.

12 Développement des biocapteurs

Après avoir mis en évidence l'impact potentiel des RUTP sur le compartiment algal des écosystèmes, nous souhaitons maintenant développer un outil de surveillance utilisable directement sur nos sites d'étude. Il s'agit d'un biocapteur algal. Ce travail a été initié par Chouteau et amélioré par Guedri au cours de leur travaux de thèse respectifs (Chouteau, 2004; Guedri, 2010). Ce type de biocapteur a par le passé fait ses preuves à de nombreuses reprises que ce soit pour la détection de composés présents dans les RUTP ou pour l'évaluation écotoxicologique des impacts de ces mêmes composés. En revanche ce type de biocapteur n'a jamais été utilisé sur des échantillons réels, uniquement sur des solutions synthétiques. Notre travail a ainsi consisté à évaluer le comportement de ce type d'outil sur nos échantillons. Nous avons ainsi étudié l'activité enzymatique des algues immobilisées sur un biocapteur ainsi que la réponse obtenue en présence de RUTP. Nous avons également développé de nouvelles techniques d'immobilisations dans l'objectif de mesurer la sensibilité de la réponse et de proposer de nouvelles applications à d'autres modes de transduction.

12.1 Activités enzymatiques en biocapteurs

Les résultats obtenus ont été comparés avec ceux menés sur algues libres. Pour cela nous avons réalisé des mesures de l'activité acétylcholinestérase (AChE) et de l'activité phosphatase alcaline (APA) sur des algues immobilisées à la surface d'électrodes interdigitées. Nous avons sélectionné la technique des monocouches autoassemblées présentées dans la partie B. Le fonctionnement du biocapteur conductimétrique est basé sur la mesure des mobilités de charges à proximité immédiate des zones sensibles. Nous mesurons la transformation d'un substrat non chargé en un produit ionisé grâce à l'action de l'enzyme étudiée. Pour cela travaillons spécifiquement avec l'acétylcholinestérase car en plus d'être un excellent bioindicateur elle catalyse la transformation du chlorure d'acétylcholine (non chargé) en produits chargés ce qui n'est pas le cas avec la fluorescéine. Pour les mêmes raisons nous utilisons le paranitrophénylphosphate (PNPP) pour suivre l'APA grâce au biocapteur conductimétrique.

12.1.1 Activité acétylcholinestérase

12.1.1.1 Temps sec

Le Tableau 61 montre que les rejets de de Chassieu ont peu d'effets sur l'AChE : après 2 h de contact sur 6 rejet testés, un échantillon stimule l'activité de +100 % tandis qu'un autre l'inhibe (78 % d'activité résiduelle). Les 4 autres ne modifient pas significativement cette activité. L'unique rejet testé provenant d'Ecully impacte fortement l'AChE, avec des activités résiduelles variant de 0 à 36 % selon le temps d'exposition.

Aucun lien ne semble se dégager entre le temps de contact et l'activité résiduelle.

Tableau 61 : % d'activité résiduelle de l'activité acétylcholinestérase de *C. vulgaris* immobilisées en biocapteur après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux rejets de temps sec

Site	Date	Biocapteur		
		AChE 2h	AChE 24h	AChE 48h
Chassieu	18/01/2011	103,82	101,81	102,5
	03/02/2011	199,36	210,37	206,04
	03/03/2011	/	/	/
	20/05/2011	113,34	32,2	104,57
	20/02/2012	98,36	98,61	97,96
	16/03/2012	100,91	98,07	79,75
	25/04/2012	77,77	96,06	413,12
Ecully	03/02/2011	0	36,43	0

12.1.1.2 Temps de pluie

Le Tableau 62 montre que les rejets prélevés à Chassieu ont plus d'effets sur l'AChE que les rejets de temps sec : après 24 h d'exposition la moitié des échantillons inhibent l'activité, avec des pourcentages d'activités résiduelles compris entre 57 % (19/10/11) et 8 % (24/02/11). Les autres échantillons ne produisant pas d'effets significatifs. Sur Ecully le rejet du 24/02/11 est également très impactant vis-à-vis de cette enzyme avec une activité résiduelle inférieure à 1 % après 24 h de contact. En revanche les deux autres prélèvements stimulent l'AChE de +26 % et +72 % après 24 h de contact. Les effluents prélevés à Bron commencent à produire un effet sur l'AChE après 24 h de contact. Sur les 3 rejets testés seul celui prélevé le 22/05/11 a un effet significatif avec une stimulation de +46 %. Mais après 48 h de contact l'activité résiduelle devient presque nulle (1,56 %) mettant ici en évidence un effet des polluants présents (majoritairement des HAP).

Tableau 62 : % d'activité résiduelle de l'activité acétylcholinestérase de *C. vulgaris* immobilisées en biocapteur après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux rejets de temps de pluie

Site	Date	Biocapteur		
		AChE 2h	AChE 24h	AChE 48h
Chassieu	24/02/2011	/	8,04	969,42
	13/07/2011	101,64	101,47	101,99
	19/10/2011	50,14	56,65	155,21
	02/01/2011	22,15	23,3	29,09
	05/01/2012	97,38	97,45	96,7
	21/05/2012	101,37	101,52	101,21
Ecully	24/02/2011	100	0,63	/
	19/10/2011	103,8	126,41	356,06
	22/05/2012	97,97	172,81	0,37
Bron	19/10/2011	100,55	98,11	102,43
	02/01/2012	93,82	90,24	102,37
	22/05/2012	109,62	146,13	1,56

12.1.2 Activité phosphatase alcaline

12.1.2.1 Temps sec

Les rejets du bassin de Chassieu sont globalement sans effet majeurs sur l'APA, à l'exception de celui prélevé le 03/03/2011 qui inhibe cette activité de manière importante (21 % d'activité résiduelle dès 2 h de contact). Le seul prélèvement d'Ecully ayant été testé provoque un effet très marqué avec des activités résiduelles inférieures à 10 % après contact.

Tableau 63 : % d'activité résiduelle de l'activité phosphatase alcaline de *C. vulgaris* immobilisées en biocapteur après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux rejets de temps sec

Site	Date	Biocapteur		
		APA 2h	APA 24h	APA 48h
Chassieu	03/03/2011	20,78	29,21	26,58
	20/05/2011	125,62	122,58	122,39
	20/02/2012	95,16	96,96	96,34
	16/03/2012	101,08	103,04	103,93
	25/04/2012	99,95	99,79	100,17
Ecully	03/03/2011	8,15	1,96	2,14

12.1.2.2 Temps de pluie

Le Tableau 64 montre que l'APA est globalement stimulée par les rejets de Chassieu prélevés en 2011 alors que ceux prélevés en 2012 sont sans effets significatifs (on notera une légère inhibition pour l'échantillon daté du 05/01/12). Avec les rejets récoltés à Ecully nous assistons comme à Chassieu à une forte stimulation de l'APA avec le rejet daté du 24/02/11. En revanche les deux autres prélèvements n'ont pas d'effet significatif. Enfin sur Bron nous avons une tendance similaire, une forte stimulation avec le premier rejet prélevé (13/07/11) et plus d'effets significatifs par la suite.

Tableau 64 : % d'activité résiduelle de l'activité phosphatase alcaline de *C. vulgaris* immobilisées en biocapteur après 2 h, 24 h et 48 h d'exposition aux rejets de temps de pluie

Site	Date	Biocapteur		
		APA 2h	APA 24h	APA 48h
Chassieu	24/02/2011	204,6	259,62	224,19
	13/07/2011	322,39	320,97	298,88
	19/10/2011	156,9	153,19	152,91
	02/01/2012	109,69	100,64	107,38
	05/01/2012	88,02	89,82	89,61
	21/05/2012	97,71	96,57	97,77
Ecully	24/02/2011	387,24	394,44	392,62
	19/10/2011	92,25	88,13	87,6
	22/05/2012	/	99,95	100,93
Bron	13/07/2011	497,55	426,05	468,43
	19/10/2011	92,92	86,65	87,6
	02/01/2012	104,54	93,91	102,02
	22/05/2012	100,93	98,08	98,76

Les résultats obtenus pour les mesures en biocapteur montrent que les rejets de Chassieu prélevés par temps sec ont tendance à stimuler l'ACHé alors que par temps de pluie il y a plutôt inhibition de cette activité. Avec les rejets d'Ecully c'est la tendance inverse que l'on constate. Avec les rejets de Bron il a en moyenne peu d'effet sur l'ACHé.

On notera la très faible variabilité de l'APA au cours du temps. Celle-ci réagit dès 2 h de contact et sa réponse reste stable après 24 h et 48 h de contact avec les polluants. En moyenne il y a stimulation pour les échantillons de temps de pluie, entre 150 % et 250 % d'activité résiduelle. Les échantillons de temps sec de Chassieu quant à eux sont sans effet sur l'APA et l'unique échantillon d'Ecully est fortement toxique (activité résiduelle inférieure à 10 %).

Nous disposons des résultats d'études précédentes menées sur les biocapteurs conductimétriques. Toutefois aucune étude n'a été réalisée sur des effluents réels, seulement sur des solutions synthétiques de polluants ; aussi ces travaux nous fournissent des pistes pour interpréter nos résultats mais pas de certitude. Chouteau et al. (2005) ont montré que des solutions d'éléments traces métalliques, seuls ou en mélanges binaires, inhibaient l'APA à partir de concentrations de 10 ppb en Cd ou en Zn. En revanche ils n'ont pas mis en évidence d'effets de synergie ou d'antagonisme. Dans leur étude les auteurs ont également mis en avant la sensibilité de l'ACHé à certains pesticides organochlorés (méthyl – paraxon) à partir de 100 ppb (inhibition constatée de -20 %). Mais leur étude a été menée sur des temps courts, entre 1 h et 4 h d'exposition et nous n'avons pas d'information quant aux effets à plus long terme.

Guedri *et al.* (2010) a mis en évidence des stimulations de l'APA pour de faibles concentrations en ETM, en particulier avec le zinc et le plomb (1 ppb). Il arrive fréquemment que nos échantillons contiennent des concentrations de cet ordre de grandeur, pouvant en partie expliquer les inhibitions constatées.

Il faut également noter que dans la grande majorité des cas il n'y a pas concordance entre résultats des mesures réalisées sur algues libres et celles réalisées en biocapteurs. Ceci est certainement dû à la différence de proportion entre le nombre de cellules exposées pour une même quantité de contaminant. Sur biocapteur les microalgues sont présentes sur une monocouche de 1,5 mm². En considérant qu'une algue de *C. vulgaris* occupe une surface d'environ 3,14*10⁻⁴ mm² la surface active du biocapteur rassemble moins de 5000 cellules. En revanche un puits d'une microplaque renferme plusieurs millions de cellules. La différence de densité cellulaire et donc d'exposition aux polluants peut expliquer en partie la non concordance des résultats réalisés sur algues libres et sur algues immobilisées. Il n'y a pas de bons ou de mauvais résultats, il est intéressant d'avoir réalisé les mesures en biocapteur au laboratoire avant les essais sur site afin d'être conscient de ce phénomène.

Les performances d'un biocapteur, sa sensibilité en particulier, sont intimement liées à la technique d'immobilisation utilisée. Guedri (2010) a par exemple montré l'intérêt d'utiliser la technique des SAMs par rapport à l'association BSA/glutaraldéhyde pour les mesures de l'ACHé et de l'APA. Après les mesures conductimétriques de ces 2 enzymes nous souhaitons également développer des biocapteurs pour la mesure de l'activité catalase et pour la mesure de la fluorescence chlorophyllienne. Dans cette perspective nous avons été amenés à nous questionner sur l'immobilisation du biorécepteur. Nous avons donc cherché la meilleure technique permettant de mesurer l'activité de cette enzyme sur un capteur à oxygène et dans un deuxième temps pour la détection de pesticides via des mesures de fluorescence.

12.2 Capteur à oxygène

Nous avons vu précédemment (11.1.4) que la catalase était une enzyme sensible aux rejets urbains et qu'elle pouvait potentiellement être utilisée comme biomarqueur de toxicité. Aussi nous avons cherché le meilleur moyen d'immobiliser des microalgues à la surface d'un capteur à oxygène afin d'étudier la réaction de dégradation du peroxyde d'hydrogène en dioxygène par la catalase. Une fois le mode de transduction sélectionné, conductimétrique (électrode de Clark) ou optique (optode) s'est posé la question du choix de la technique d'immobilisation. Nous avons vu dans la partie A qu'il existait un très grand nombre de possibilités d'immobilisations des microalgues avec comme principale contrainte, le respect des conditions de biocompatibilité. Nous avons donc mis en œuvre plusieurs techniques afin de sélectionner la plus performante. En premier lieu nous avons testé l'immobilisation dans un gel d'agarose, en second lieu dans des billes d'alginate et enfin à l'aide d'un matériau sol-gel.

12.2.1 Sur gel d'agarose

Au sein de notre laboratoire nous avons préparé une solution d'agarose contenant les cellules algales puis nous l'avons coulée dans des moules fabriqués spécialement pour ce travail (Figure 45). Le diamètre correspondant à la surface active du capteur à oxygène utilisé.



Figure 45 : solution d'agarose contenant les microalgues et déposée dans les moules

Une fois démoulés, ces gels sont déposés à la surface d'une électrode de Clark (Figure 46). Les optodes ont été testées mais ne sont pas adaptées à ce type d'immobilisation ; après fixation d'un gel les fluorophores ne réagissent plus. Afin de maintenir en place ce gel sur le capteur, ce dernier est recouvert d'une membrane de dialyse, elle-même attachée à l'aide d'un élastique.

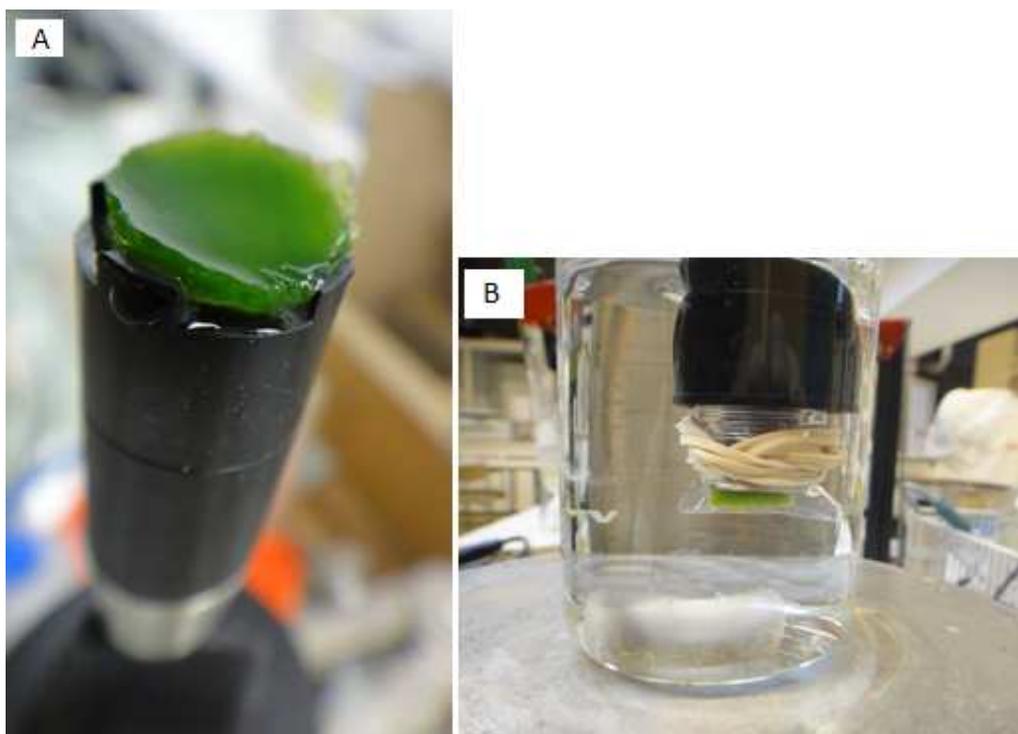


Figure 46 : gel d'agarose déposé sur l'électrode de Clark (A) et immobilisé sur une optode à l'aide d'une membrane de dialyse (B)

Afin de mesurer les performances de ce biocapteur nous l'avons placé dans une solution de tampon phosphate (80 ml). Une fois la concentration en dioxygène stabilisée, on injecte 400 μl de H_2O_2 à 30 % dans le milieu (avec une agitation vive). On note ensuite les variations de la concentration en dioxygène à la surface de la membrane au cours du temps (Figure 47).

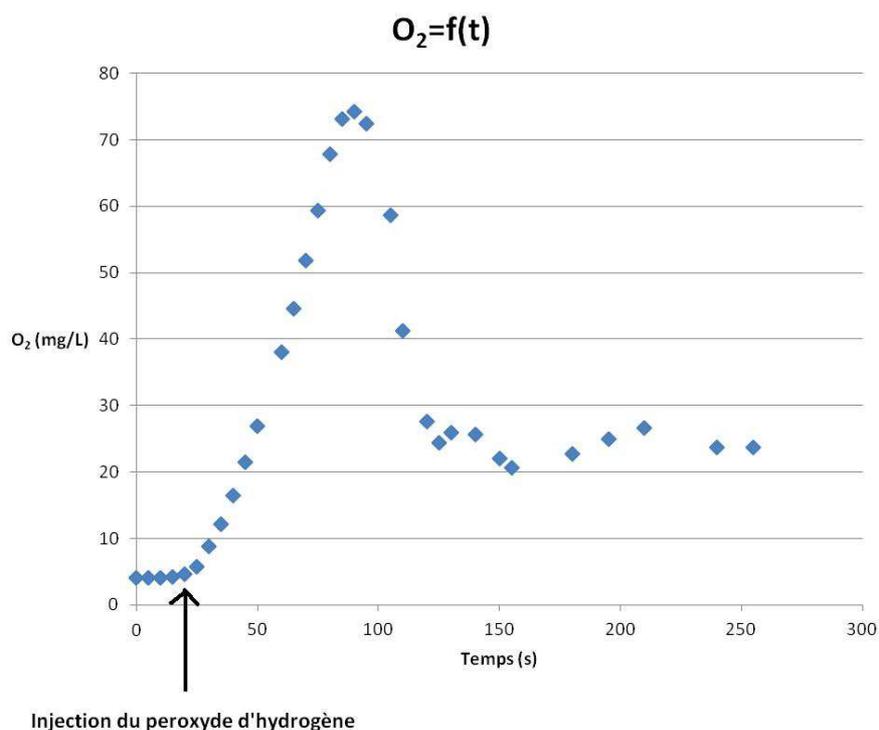


Figure 47 : $[\text{O}_2] = f(t)$ après 2 injections successives de 0,5 % d' H_2O_2 sur gel d'agarose

Après injection du substrat on assiste en quelques secondes au début de la réaction puis la concentration en dioxygène dans le milieu réactionnel passe de 3mg/l à plus de 70 mg/l en 60 secondes. La concentration atteint un maximum à 73 mg/l puis décroît durant 60 secondes jusqu'à atteindre un palier autour de 25 mg/l. Cette stabilisation correspond à un état d'équilibre du dioxygène au sein du gel.

La réaction se déroule en moins de 3 minutes et commence dès injection du substrat. Ainsi cette technique d'immobilisation couplée à l'utilisation de l'électrode de Clark est très efficace pour mesurer l'activité catalase de *C. reinhardtii*.

12.2.2 En bille d'alginate

Après avoir travaillé en gel d'agarose nous avons synthétisé dans notre laboratoire des billes d'alginate. C'est une technique d'encapsulation très répandue et réputée pour sa biocompatibilité. Une fois les billes d'alginate réalisées nous avons commencé par réaliser le même montage qu'avec le gel d'agarose. Mais le format « bille » ne se prête pas à une immobilisation rigoureuse à l'aide de la membrane de dialyse.

C'est pourquoi nous avons choisi un autre mode de fixation : à l'aide d'un fil d'acier nous avons formé un collier contenant une ou plusieurs perles. Ainsi la bille d'alginate peut être correctement immobilisée au contact de l'électrode (Figure 48).

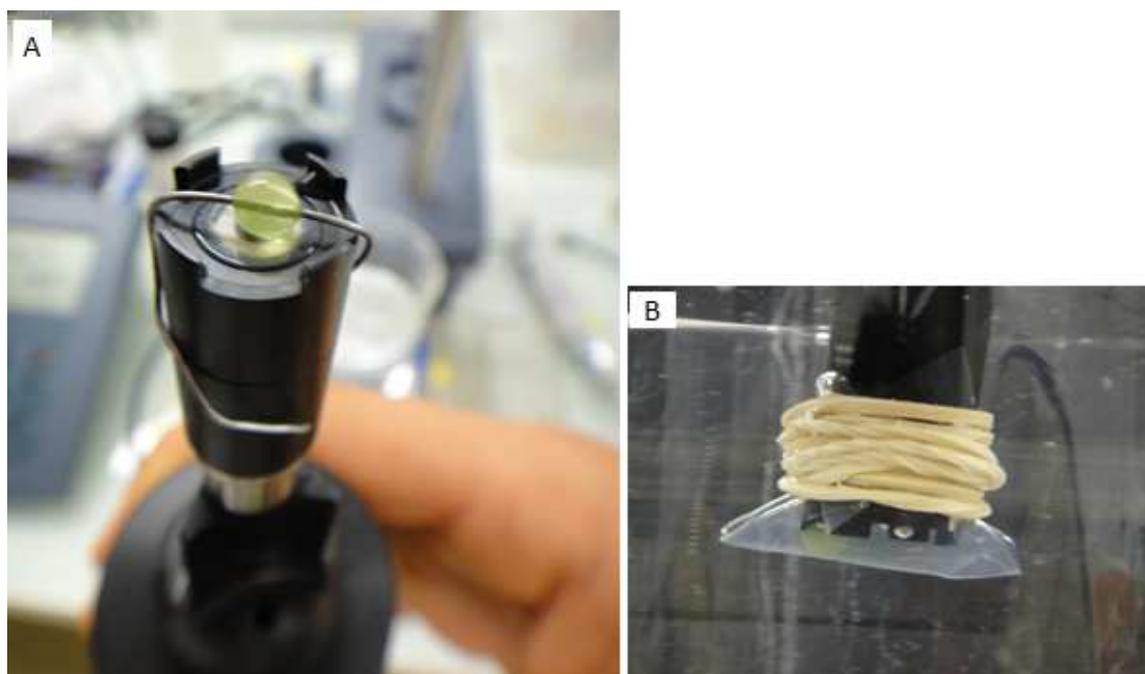


Figure 48 : bille d'alginate immobilisée sur un fil d'acier (A) et à l'aide d'une membrane de dialyse (B)

Cette technique permet aussi d'utiliser une optode (Figure 49) puisque les billes peuvent être placées au plus près du capteur sans perturber son fonctionnement. En revanche les résultats ne sont pas meilleurs que ceux obtenus sur algues libres car l'oxygène libéré se dissout dans le milieu réactionnel. De plus une optode a une gamme de travail bien plus réduite qu'une électrode de Clark et a donc tendance à saturer rapidement.

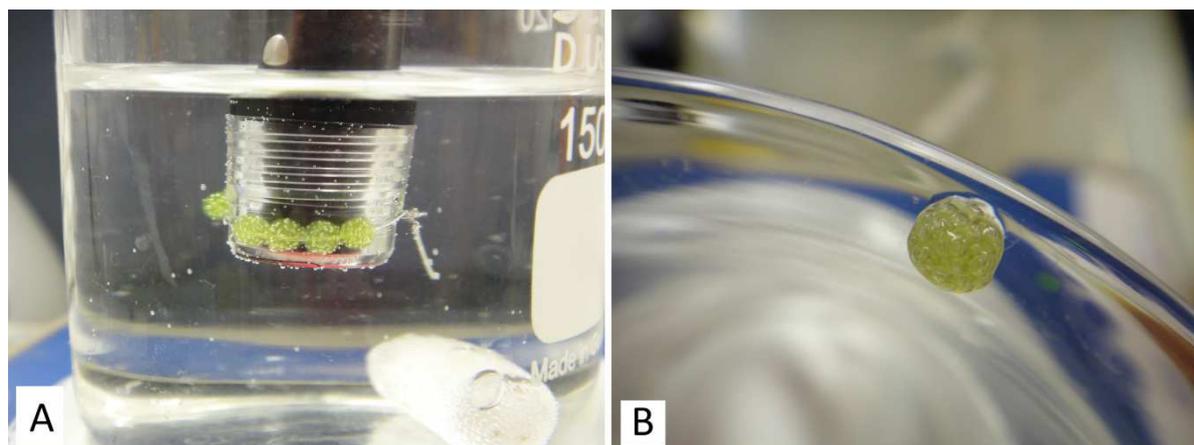


Figure 49: billes d'alginate fixées à l'optode (A) et zoom sur une bille après réaction avec le H_2O_2 (B)

La Figure 50 présente la cinétique de formation du dioxygène après trois injections de peroxyde d'hydrogène. Tout comme avec l'immobilisation en gel d'agarose, le biocapteur réagit immédiatement après la première injection jusqu'à atteindre un maximum (≈ 24 mg/l) puis la concentration diminue progressivement. Une seconde injection 3 minutes plus tard n'entraîne qu'un très léger pic et, si l'on injecte à nouveau du substrat 3 minutes après, le capteur ne réagit plus. La concentration en dioxygène diminue jusqu'à atteindre un palier (≈ 10 mg/l) ce qui est proche de la solubilité maximale du dioxygène à $20^\circ C$ (9,09 mg/l). On constate donc un phénomène de saturation du capteur, ou plutôt du biorécepteur (inhibition par le produit de la réaction ou par excès de substrat?).



Figure 50 : $[O_2] = f(t)$ après 3 injections successives de 0,5 % d' H_2O_2 sur bille d'alginate immobilisée au contact d'une électrode de Clark

12.2.3 Sur sol-gel (seul)

Les techniques utilisées précédemment (agarose et alginate) ont fourni des résultats probants pour la mesure de l'activité catalase. Toutefois ces matériaux ont tous deux l'inconvénient d'être fragiles et de se dégrader rapidement. Nous nous sommes tournés vers la synthèse d'un matériau sol-gel, solide et inorganique, bien plus résistant à l'épreuve du temps.

A l'aide de la littérature (Nguyen-ngoc and Tran-minh, 2007) nous avons dans un premier temps réalisé de manière empirique différentes membranes de qualité variable au sein de notre laboratoire.

Un premier constat visuel montre que le matériau sol-gel obtenu a une structure granuleuse, irrégulière (Figure 51).



Figure 51 : membranes de matériau sol-gel contenant la souche d'algues CR

Nous avons ensuite, selon le même protocole qu'avec les gels d'agarose et les billes d'alginate, caractérisé la réaction enzymatique (Figure 52).



Figure 52 : $[O_2] = f(t)$ après 3 injections successives de 0,5% d' H_2O_2 sur sol-gel

Nous obtenons des résultats comparables aux essais menés avec la bille d'alginate mais avec une qualité de signal très dégradée, en raison de la structure du matériau. Nous retrouvons par ailleurs le même phénomène de saturation du biorécepteur.

12.2.4 Sur membrane alginate/sol-gel

Malgré les résultats obtenus avec l'agarose et l'alginate nous étions donc à la recherche d'une technique dotée de meilleures performances mécaniques (résistance, durabilité) en vue d'applications de terrain. Le premier matériau sol-gel réalisé de manière empirique ne remplissait pas les objectifs que nous nous étions fixés, en particulier au niveau de la transduction.

En quête d'un nouveau matériau alliant biocompatibilité et performances mécaniques nous nous sommes tournés vers l'équipe du P^r Sara A. Bilmes de l'Université de Buenos Aires, spécialisée dans la synthèse de matériaux inorganiques. Cette équipe a mis au point une technique innovante permettant d'immobiliser des organismes unicellulaires dans une matrice sol-gel en deux temps : encapsulation des cellules d'intérêt dans un gel d'alginate puis dépôt du matériau sol-gel (Figure 53 A), (Perullini et al., 2005, 2008, 2011). En mission au laboratoire INQUIMAE de l'Université de Buenos Aires⁸ nous avons appliqué cette technique en vue de l'immobilisation des microalgues de *C. reinhardtii*. La membrane est moulée en 2 temps dans le puits d'une microplaque avant d'être déposée à la surface de la sonde à oxygène. On immobilise ensuite cette membrane à l'aide d'un morceau de Parafilm® afin que celle-ci ne s'échappe pas au cours de l'expérience (Figure 53 B).

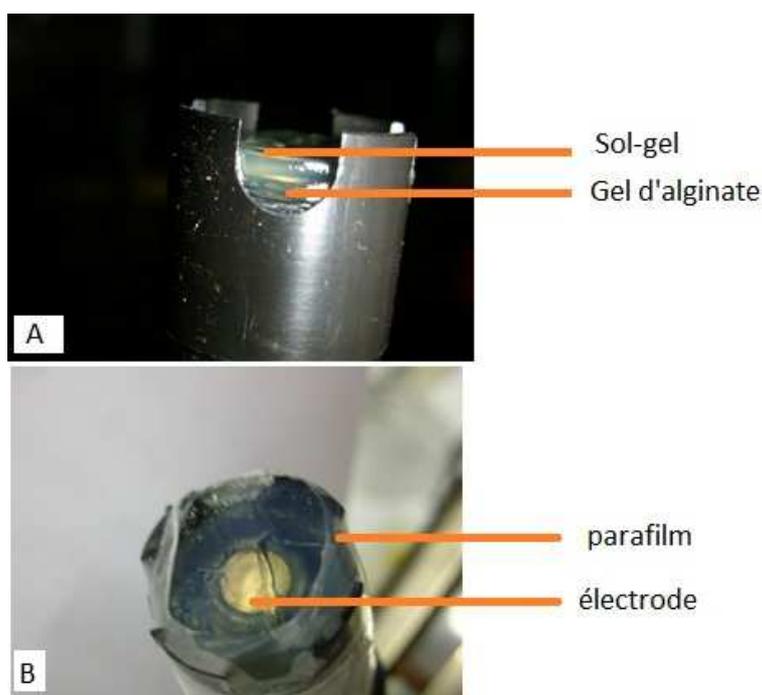


Figure 53 : double membrane alginate/sol-gel renfermant des cellules de *C. vulgaris*, vue de profil (A) et vue de haut (B)

On réalise ensuite la caractérisation des performances du biocapteur comme précédemment. On constate que ces performances dépendent de l'épaisseur de la couche de sol-gel, donc du volume déposé sur le gel d'alginate. De plus, les variations de concentration sont modérées (quelques mg/l) et la réaction s'étale sur environ 10 minutes.

⁸ Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía
Pabellón 2, Ciudad Universitaria, Buenos Aires, Argentina

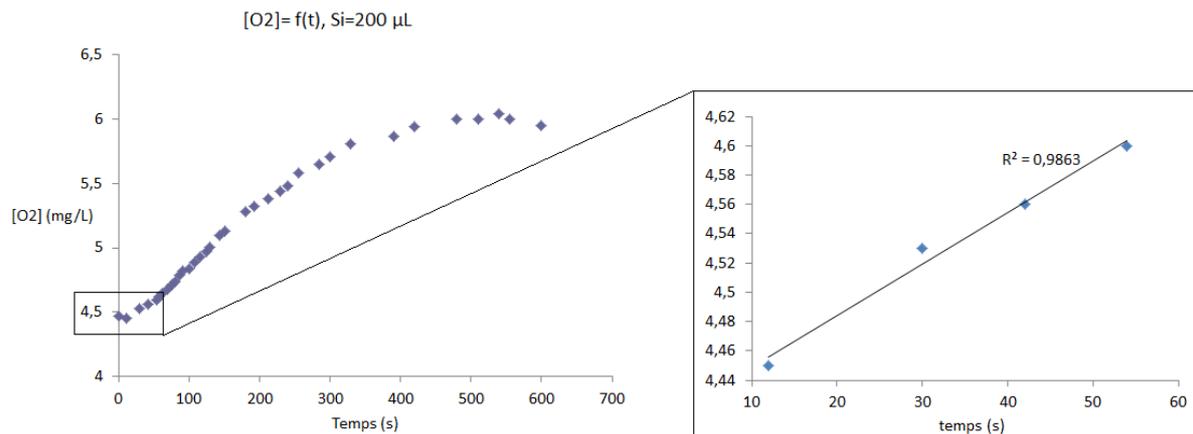


Figure 54 : cinétique de formation du dioxygène et vitesse initiale de réaction, volume de sol-gel = 200 µL

La vitesse initiale de réaction est de $0,0035 \text{ mg/l}\cdot\text{s}^{-1}$ lorsqu'on utilise 200 µl de matériau de sol-gel, soit 0,47 mm d'épaisseur (Figure 54). Mais lorsque l'épaisseur augmente à 0,71 mm (300 µl de matériau) la vitesse initiale passe à $0,0013 \text{ mg/l}\cdot\text{s}^{-1}$ (Figure 55).

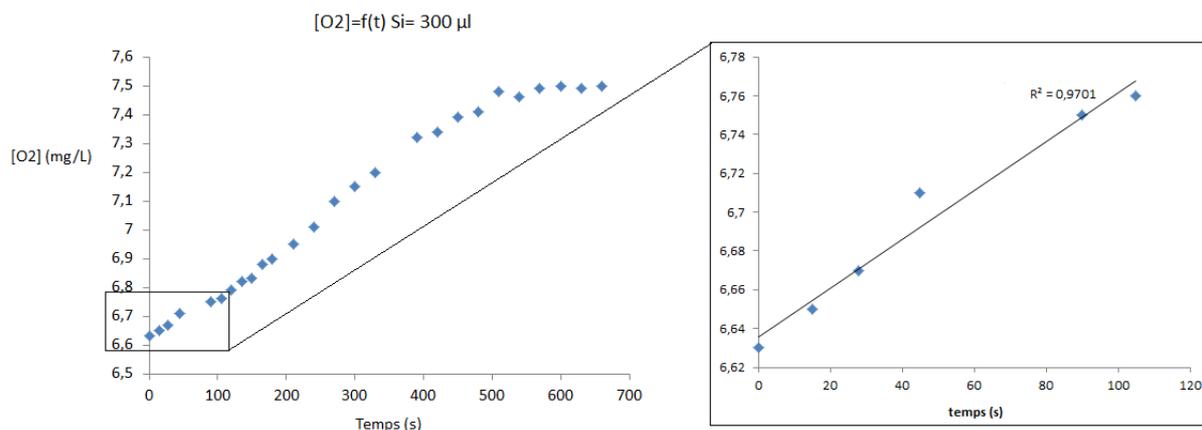


Figure 55 : cinétique de formation du dioxygène et vitesse initiale de réaction, volume de sol-gel = 300 µL

La membrane contenant 400 µl de Si s'est rompue avant d'avoir pu commencer les mesures et celle contenant 500 µl de Si n'a pas permis de constater d'évolution de la concentration en dioxygène dans le milieu, même après un laps de temps important. En revanche si on retire la membrane et que l'on réalise une mesure dans le milieu réactionnel, on remarque que la concentration en oxygène dans le milieu est bien supérieure à la concentration d'équilibre eau/air. Il y a bien eu réaction mais nous n'avons pu la détecter, sûrement à cause de la trop grande épaisseur de silicates. Aussi cette dernière technique est peu adaptée à l'immobilisation de *C. reinhardtii* en vue de la mesure de son activité catalase.

Néanmoins les grandes propriétés optiques (transparence) et mécaniques (résistance, durabilité) du matériau sol-gel en font un bon candidat pour les transducteurs optiques comme nous allons le voir ci-après.

12.2.5 Synthèse des techniques d'immobilisation sur capteur à oxygène

L'immobilisation optimale sur le capteur à oxygène est un compromis entre plusieurs contraintes : biocompatibilité, résistance mécanique, durabilité et porosité suffisante pour permettre les transferts des substrats et des réactifs.

Pour remplir cette tâche, gels d'agarose et d'alginate sont d'excellents biomatériaux qui ont fait leur preuve dans de nombreux domaines pour l'immobilisation de cellules entières. Dans le cas présent ils sont bien adaptés à l'évaluation de l'activité catalase. Mais le principal problème de ces membranes est leur durabilité, de nombreux auteurs ont rapporté leur manque de fiabilité dans le temps (Kamath and Park, 1993; Pallerla and Chambers, 1997; Lee and Heo, 2000). Ainsi à l'aide de partenaires argentins nous avons souhaité utiliser une nouvelle technique innovante associant une membrane d'alginate à un dépôt de matériau sol-gel. Ces supports d'immobilisation ont eu un succès relatif pour la mesure de l'activité catalase.

Malgré des performances limitées pour la détection de l'activité catalase, nous avons vu dans ce matériau un grand potentiel pour la transduction optique. En effet les qualités optiques de cet objet suggéraient des perspectives de travail intéressantes dans le domaine de la fluorescence de la chlorophylle. C'est pourquoi nous avons entrepris de caractériser le comportement de microalgues encapsulées dans ce nouveau matériau en vue de la détection de pesticides.

Le paragraphe 12.3 a fait l'objet d'une publication dans une revue internationale à comité de lecture :

Ferro, Y., Perullini, M., Jobbagy, M., Bilmes, S. A., & Durrieu, C. (2012). Development of a Biosensor for Environmental Monitoring Based on Microalgae Immobilized in Silica Hydrogels. *Sensors (Basel, Switzerland)*, **12**(12), 16879-16891.

Cette publication est disponible dans version originale en annexe.

12.3 Capteur à fluorescence

Les mesures de fluorescence de la chlorophylle sont des indicateurs très performants de la présence d'herbicides dérivés de l'urée, des triazines et des phénols. Ainsi de nombreux auteurs ont travaillé à la création de biocapteurs permettant la détection de pesticides basés sur l'étude de la fluorescence de la chlorophylle de microalgues (Naessens et al., 2000; Védrine et al., 2003; Peña-Vázquez et al., 2009). Le problème récurrent de ces biocapteurs pour une utilisation sur site est celui de l'immobilisation des cellules algales. Les techniques traditionnellement basées sur l'utilisation de gels d'alginate sont peu fiables sur le long terme car ces gels finissent par se dégrader et par se rompre.

Afin de palier à ces insuffisances, nous avons entrepris d'utiliser la technique de la double immobilisation alginate/sol-gel afin de développer un biocapteur optique à herbicides.

Nous avons travaillé avec les 3 souches d'algues déjà présentées : *C. vulgaris* (CV), *P. subcapitata* (PS) et *C. reinhardtii* (CR).

12.3.1 Biocompatibilité du matériau

Dans un premier temps il a fallu nous assurer de la biocompatibilité du matériau, premier critère fondamental de choix d'un matériau d'encapsulation. Le protocole est similaire à celui suivi dans la norme ISO 8692 sauf que dans le cas présent, le toxique considéré est le processus d'encapsulation. L'épaisseur de gel choisie est de 1,9 mm : c'est un compromis afin d'obtenir un matériau fin mais suffisamment résistant pour pouvoir être manipulé. La concentration initiale de microalgues choisie est de 10^4 cellules/ml.

La Figure 56 montre que le taux de croissance des CV est inchangé lors du processus d'immobilisation. En revanche on constate une légère inhibition pour les PS et les CR (respectivement 6 % et 13 %) ce qui reste très acceptable.

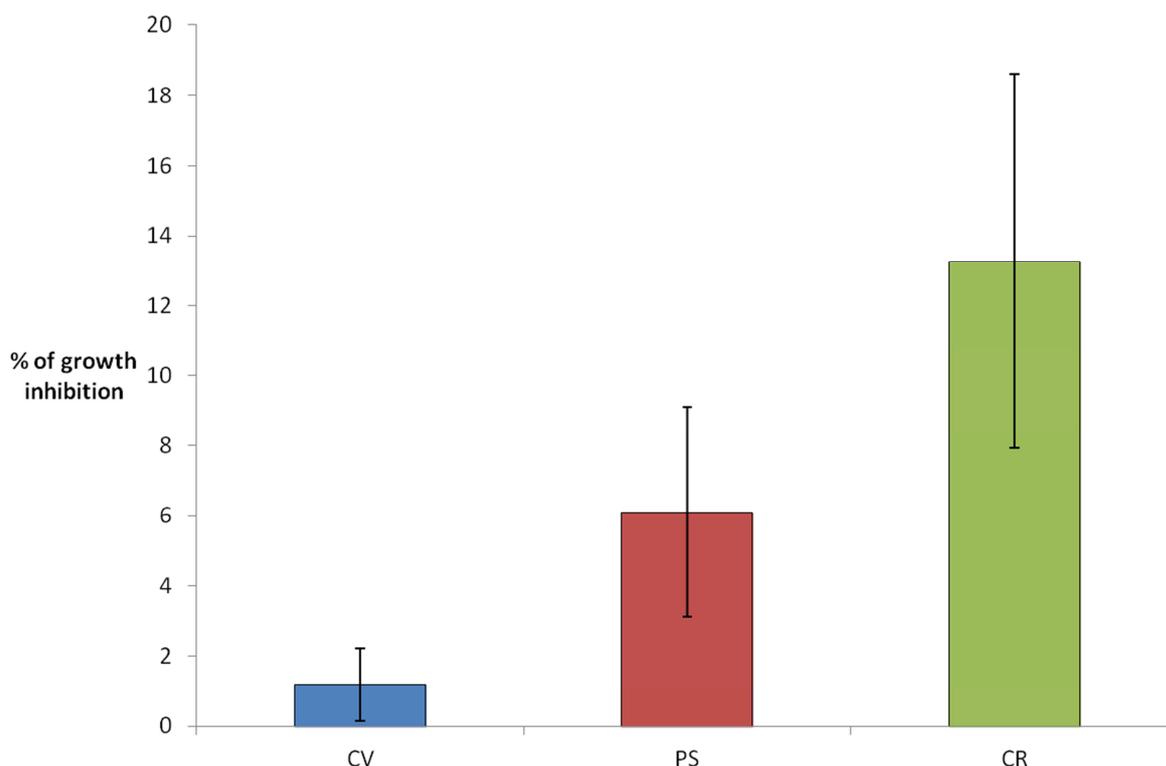


Figure 56 : % d'inhibition de la croissance après les deux étapes d'immobilisation du matériel cellulaire (couche de silice de 1,9 mm) comparé aux algues libres (non immobilisées)

12.3.2 Mesure de la fluorescence

Il a fallu nous assurer ensuite de la qualité optique du matériau et du fait qu'il n'influait pas dans les mesures optiques que nous souhaitions réaliser.

Ainsi l'utilisation d'alginate de sodium entraîne une très légère perte de la qualité optique par rapport au milieu témoin (Figure 57). En revanche la gélification à l'aide du chlorure de calcium et l'utilisation du matériau sol-gel n'entraîne aucune modification significative de la qualité du signal.

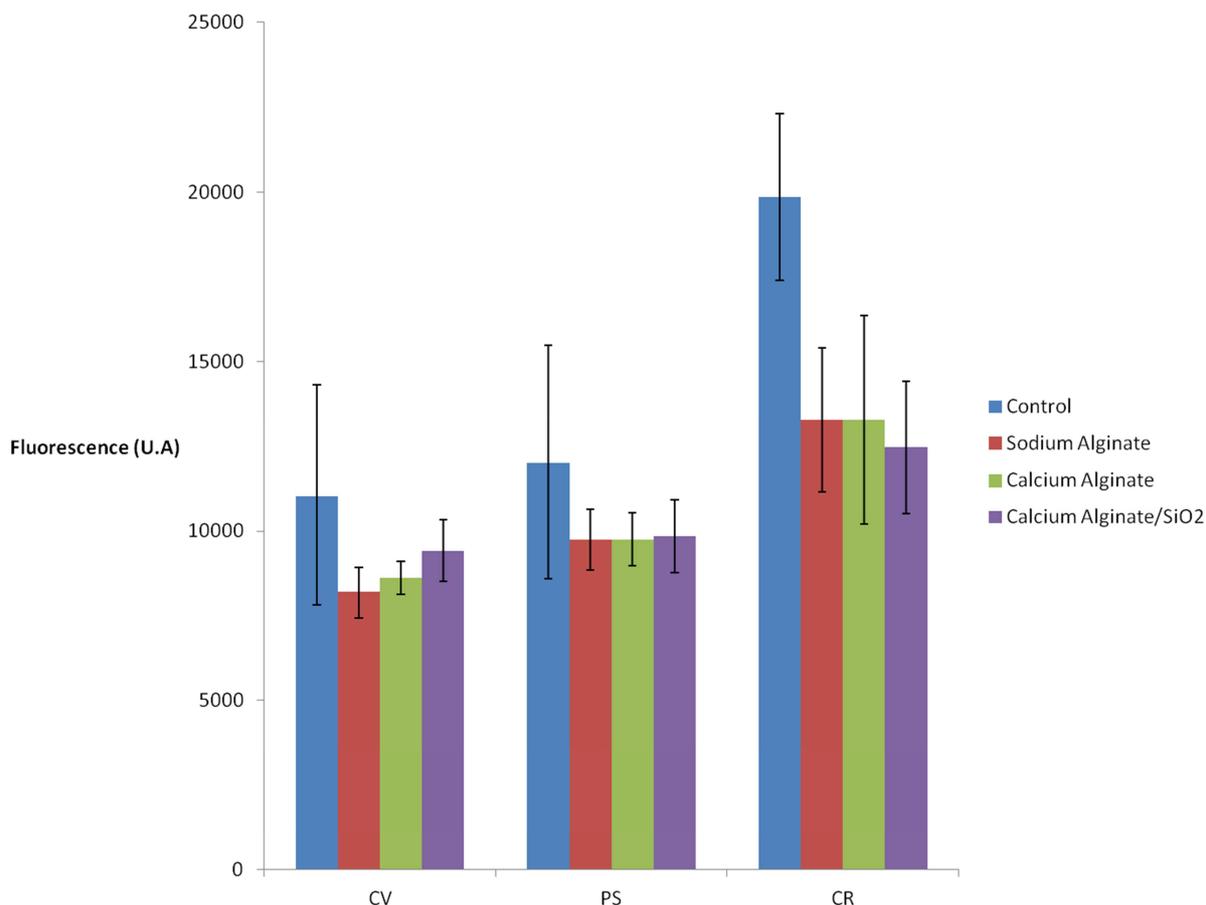


Figure 57 : fluorescence de la chlorophylle (en unité arbitraire) 1h après le dépôt dans la microplaque : dans le milieu de culture à l'état libre (control, en bleu), dans le milieu de culture additionné de 2% de Na(I)-alginate (alginate de sodium, en rouge), encapsulé dans le Ca(II)-alginate (alginate de calcium, en vert), et après la procédure d'immobilisation en deux étapes (alginate de calcium /SiO₂, en violet)

12.3.3 Effet du DCMU sur la fluorescence

Selon la Figure 58, il y a 40 % de baisse de l'augmentation de fluorescence lorsque *C. vulgaris* est cultivée avec l'ajout de 2 % d'alginate de sodium. Cela pourrait être en partie attribuable à la perte de fluorescence de la chlorophylle observée en l'absence de DCMU (voir Figure 57). Cependant, le fait d'immobiliser les algues dans l'alginate de calcium ou dans l'alginate de calcium associé au sol-gel ne conduit pas à des pertes supplémentaires de fluorescence.

L'augmentation de la fluorescence des *P. subcapitata* libres et en suspension dans l'alginate, l'alginate de calcium et dans la matrice hybride alginate de calcium/silice, ne montre pas de différences significatives (dans les 4 cas l'augmentation après empoisonnement est d'environ 50 % ± 20 %).

Enfin, pour la souche de *C. reinhardtii*, après le piégeage dans le sol-gel l'augmentation de la fluorescence est forte, avec une faible variabilité ($75 \% \pm 5$) et proche de la valeur témoin (algues libres: $90 \% \pm 10$).

Ces résultats montrent la capacité du biocapteur à microalgues encapsulées à détecter le DCMU avec une précision comparable à celle obtenue avec des algues libre. L'étape suivante consiste à déterminer les limites de détection (concentration et temps) et la possibilité de détection d'un autre herbicide tel que l'atrazine.

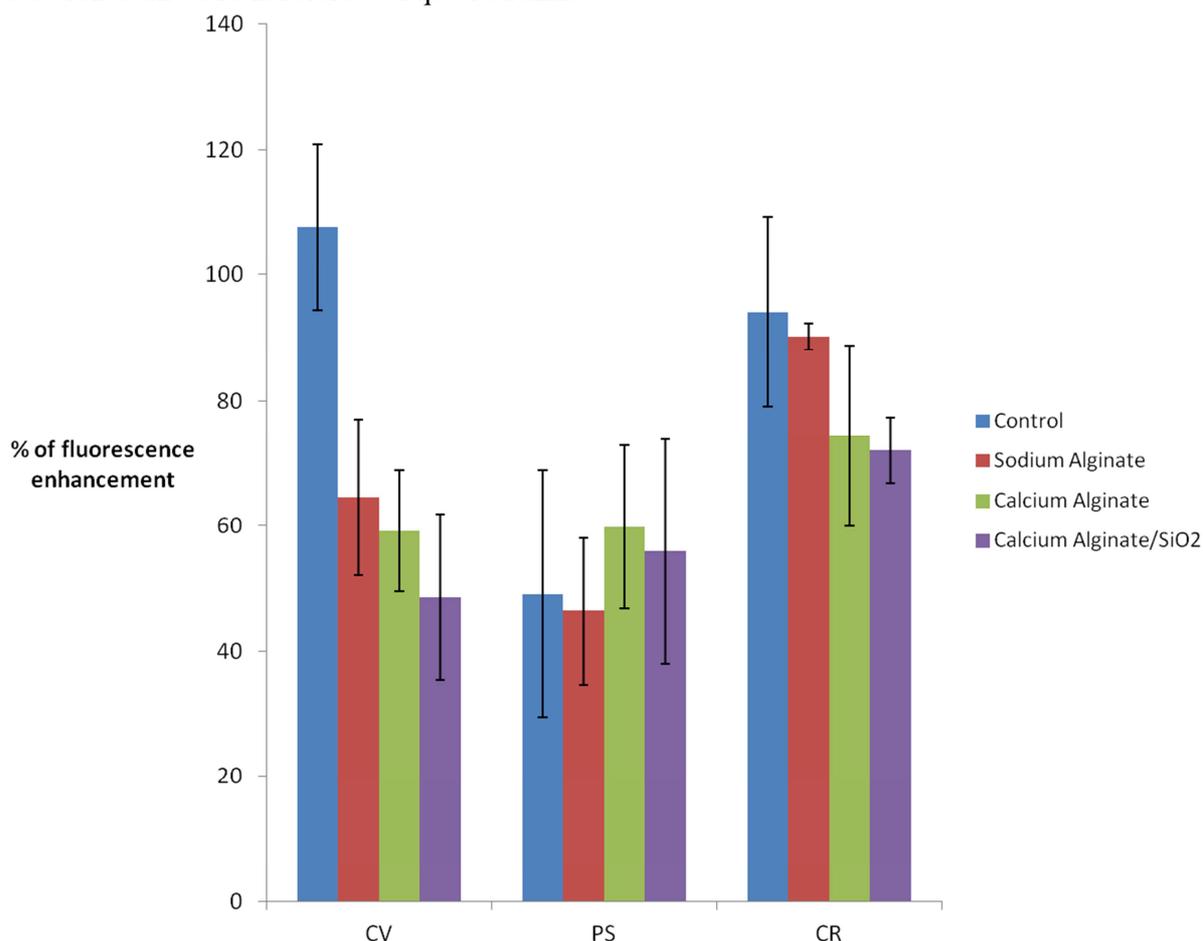


Figure 58 : % d'augmentation de la fluorescence chlorophyllienne après 40mn d'exposition au DCMU (4 mg/L) en fonction de la technique d'immobilisation et de la souche d'algue utilisée : dans le milieu de culture à l'état libre (control, en bleu), dans le milieu de culture additionné de 2% de Na(I)-alginate (alginate de sodium, en rouge), encapsulé dans le Ca(II)-alginate (alginate de calcium, en vert), et après la procédure d'immobilisation en deux étapes (alginate de calcium /SiO₂, en violet)

12.3.4 Effet de l'atrazine sur la fluorescence

La Figure 59 résume les résultats obtenus avec les trois souches d'algues après une exposition à l'atrazine. Après 40 minutes de contact sur *C. vulgaris*, nous avons obtenu une limite de détection de $0,1 \mu\text{M}$ quel que soit le procédé d'immobilisation, ce qui indique qu'à cette concentration, il n'y a pas de différence entre les différentes méthodes d'encapsulation. Après augmentation de la concentration d'atrazine, l'augmentation de la fluorescence de la chlorophylle des algues piégées dans la silice ne croit plus, contrairement à ce qui est observé pour les algues libres et pour les autres méthodes d'encapsulation, qui montrent effectivement une relation dose-réponse.

Avec *P. subcapitata*, la limite de détection après 40 minutes est encore de 0,1 μM pour les PS libres, les PS en suspension dans de l'alginate de sodium et les PS dans l'alginate de calcium, mais se trouve être plus élevée pour les PS encapsulées dans l'alginate de calcium et la silice (1 μM).

Dans le cas de *C. reinhardtii*, la perte de sensibilité entre les algues libres et celles encapsulées est très forte, quelle que soit la méthode d'immobilisation, mais comparées aux autres souches, les CR sont les plus sensibles. Par exemple, sur les algues piégées à l'intérieur des hydrogels de silice après une exposition de 40 minutes à 1 μM , l'augmentation de la fluorescence est de 57 % pour les CR, 42 % pour les PS et 32 % pour les CV. Par ailleurs, la limite de détection après 40 mn est la plus faible avec *C. reinhardtii*: 0,1 μM pour tous les lots testés, y compris ceux avec l'alginate de calcium - silice.

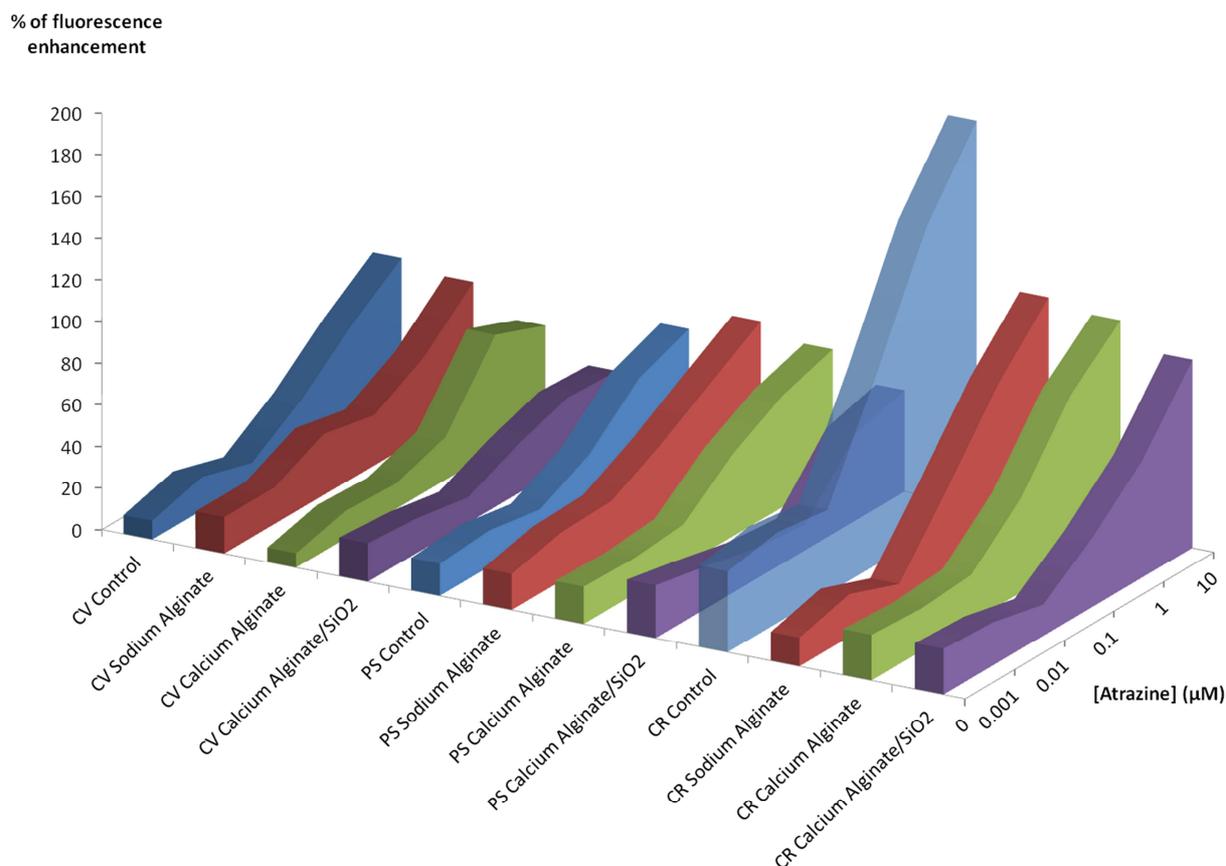


Figure 59 : % d'augmentation de la fluorescence chlorophyllienne après 40mn d'exposition à l'atrazine en fonction de la technique d'immobilisation et de la souche d'algue utilisée : dans le milieu de culture à l'état libre (control, en bleu), dans le milieu de culture additionné de 2% de Na(I)-alginate (sodium alginate, en rouge), encapsulé dans le Ca(II)-alginate (calcium alginate, en vert), et après la procédure d'immobilisation en deux étapes (calcium alginate/SiO₂, en violet)

Le Tableau 65 résume les résultats obtenus avec la méthode d'encapsulation en deux étapes alginate/sol-gel après exposition à l'atrazine et après différents temps de contact. Quand il n'y a pas de polluants (0 μM , 1ère colonne), il y a une augmentation de la fluorescence après 40 minutes d'exposition. Ceci pourrait être expliqué par la croissance de la culture. Plus le temps d'exposition est élevé et plus la fluorescence l'est également, excepté entre 5 heures et 24 heures, avec une exposition aux polluants de 10 μM . On observe dans ce cas une décroissance de l'augmentation de la fluorescence de *C. reinhardtii*, ceci pouvant être attribué à une toxicité importante de l'atrazine et une mortalité cellulaire.

Enfin, le choix de la souche est un facteur important pour la sensibilité du biocapteur. Par exemple, après 5 h d'exposition aux polluants à 1 μM , l'augmentation de la fluorescence est d'environ 71 % avec la souche CV, 49 % avec les algues PS et enfin 92 % avec les algues CR. Il s'agit d'un résultat général, ce qui nous permet de trier les algues dans en fonction de leur sensibilité aux herbicides dans l'ordre suivant : CR > CV > PS.

Tableau 65 : % d'augmentation de la fluorescence chlorophyllienne après exposition à l'atrazine (0 à 10 μM) de microalgues immobilisées dans l'alginate et le sol-gel après 40 mn, 5 h et 24 h d'exposition

% d'augmentation de la fluorescence		[Atrazine] (μM)					
Souche	Temps de contact	0	0.001	0.01	0.1	1	10
CV	40 mn	18.5 \pm 2.73	16.65 \pm 11.95	12.29 \pm 2.93	23.44 \pm 8.9	32.17 \pm 7.19	30.95 \pm 1.42
	5 h	24.83 \pm 4.39	23.24 \pm 4.03	25.92 \pm 3.94	46.89 \pm 8.7	71.49 \pm 11.22	74.11 \pm 4.69
	24 h	76.72 \pm 1.82	30.93 \pm 14.17	31.22 \pm 3.78	60.55 \pm 2.23	91.78 \pm 13.62	77.86 \pm 3.68
PS	40 mn	25.37 \pm 5.09	20.44 \pm 8.69	14.85 \pm 10.01	12.39 \pm 8.60	41.71 \pm 6.40	48.77 \pm 11.38
	5 h	19.02 \pm 2.69	21.36 \pm 8.60	17.37 \pm 9.93	22.11 \pm 10.63	48.97 \pm 1.54	62.27 \pm 4.3
	24 h	20.42 \pm 1.02	25.47 \pm 8.17	23.04 \pm 10.42	29.57 \pm 11.40	68.13 \pm 2.46	48.68 \pm 2.01
CR	40 mn	21.91 \pm 5.78	20.71 \pm 11.15	15.02 \pm 3.28	33.64 \pm 20.89	56.52 \pm 23.77	90.49 \pm 7.1
	5 h	28.91 \pm 3.35	32.07 \pm 12.68	26.41 \pm 2.13	58.75 \pm 26.79	91.68 \pm 25.08	136.97 \pm 9.37
	24 h	33.44 \pm 5.65	37.49 \pm 13.61	28.17 \pm 1.67	62.7 \pm 23.82	71.53 \pm 25.95	85.12 \pm 15.2

12.3.5 Effets des rejets de temps sec

Après avoir montré les capacités de ce biocapteur à détecter certains types d'herbicides nous avons souhaité le tester sur des effluents réels. Pour cela nous avons procédé comme précédemment en remplaçant l'herbicide par un effluent de temps sec prélevé le 03/03/2011, soit à Ecully soit à Chassieu. Le temps d'exposition est de 24 h et l'effluent est retiré avant la mesure de fluorescence pour être remplacé par de l'eau ultrapure. Le code couleur concernant la technique d'immobilisation des algues reste inchangé.

Sur les effluents de Chassieu on remarque des « augmentations négatives », c'est-à-dire des diminutions de la fluorescence après exposition (Figure 60). Nos échantillons ne contiennent pas que des herbicides et leurs concentrations sont inférieures aux limites de detections du biocapteur (limite d'environ 215 ng/l pour l'atrazine). Il est donc logique que nous ne constatons pas d'augmentations importantes de la fluorescence comme c'était le cas sur les solutions d'herbicides pures. On note également une variabilité importante, en particulier sur les algues immobilisées dans l'alginate de calcium et dans l'alginate de calcium associé à la silice.

Au vu des faibles variations constatées (entre -10 % et +10 %) et de la variabilité importante, ces premières mesures ne sont pas significatives.

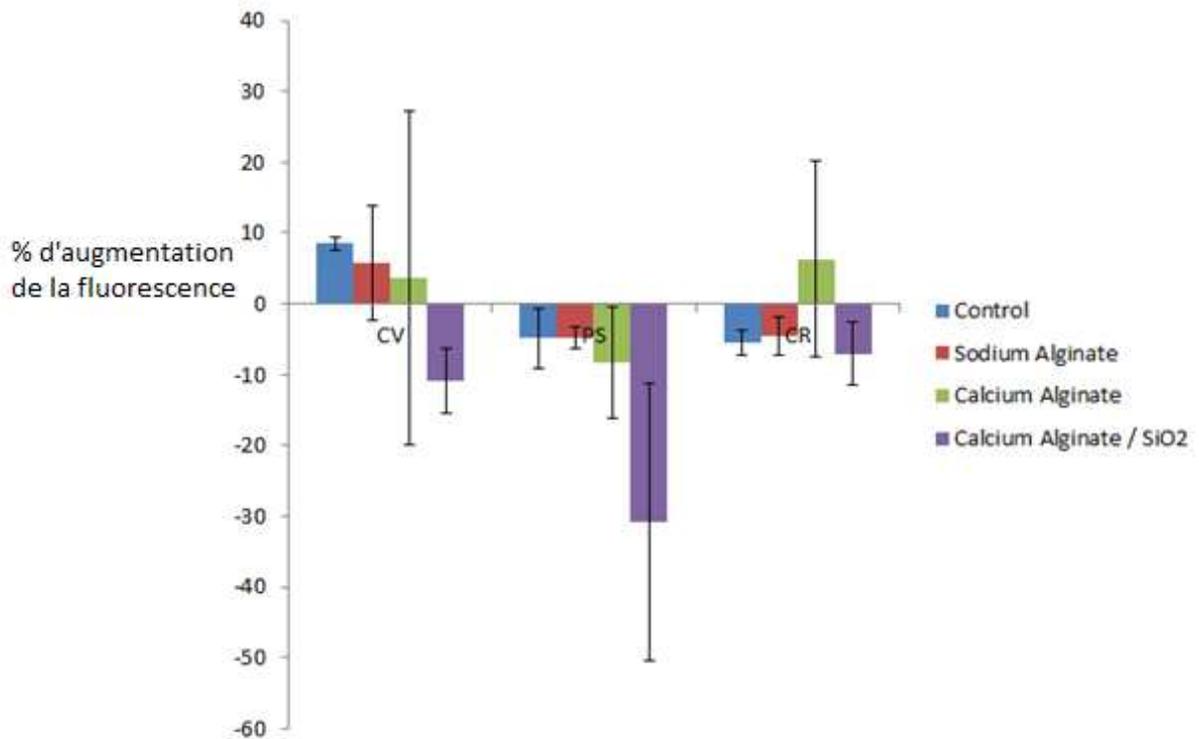


Figure 60 : % d'augmentation de la fluorescence chlorophyllienne après 24 h d'exposition au rejet de temps sec de Chassieu prélevé le 03/03/2011 en fonction de la technique d'immobilisation et de la souche d'algue utilisée

Sur le rejet d'Ecully il y a globalement une augmentation de la fluorescence mais là encore, beaucoup de variabilité (Figure 61). Pour les mêmes raisons qu'avec l'effluent de Chassieu ces résultats ne sont pas significatifs.

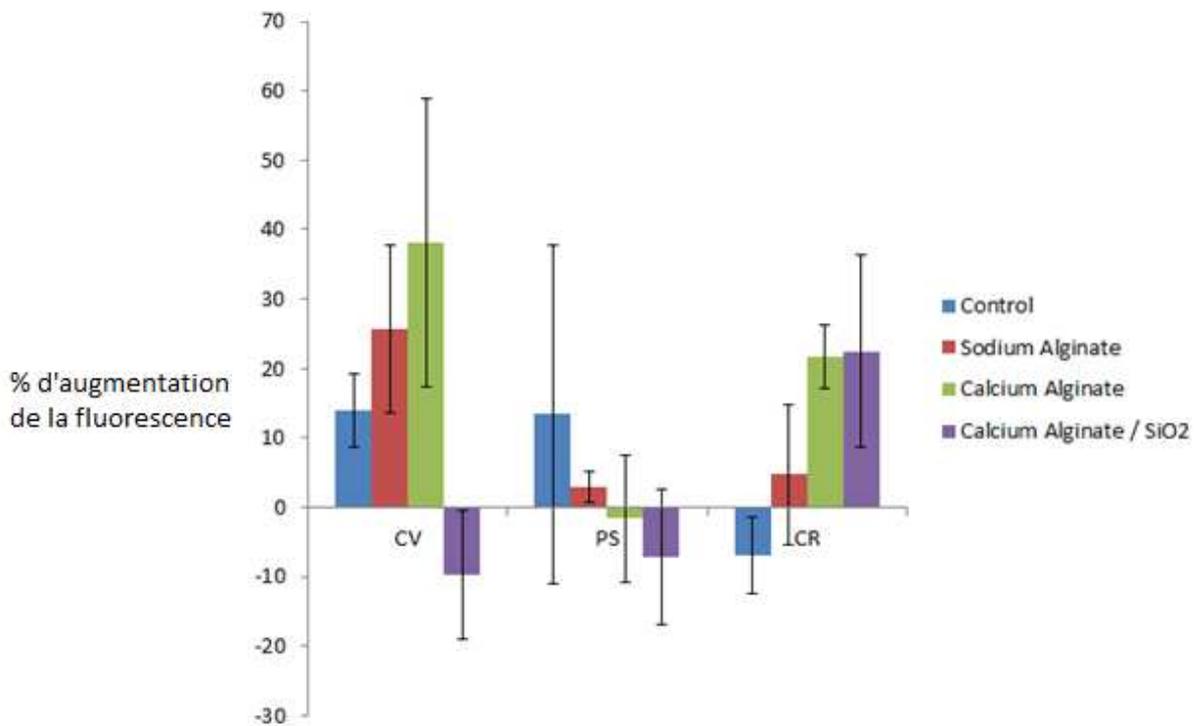


Figure 61 : % d'augmentation de la fluorescence chlorophyllienne après 24h d'exposition au rejet de temps sec d'Ecully prélevé le 03/03/2011 en fonction de la technique d'immobilisation et de la souche d'algue utilisée

Au vu de ces résultats nous avons jugé plus pertinent de réaliser des mesures de l'efficacité photosynthétique, c'est-à-dire de comparer la variation du niveau de fluorescence avant et après empoisonnement au Diuron entre un lot témoin et un lot exposé à un effluent comme nous l'avons fait sur algues libres (cf. partie 11.2)

En utilisant la souche CV et après 24 h de contact avec l'effluent de Chassieu on constate une activité résiduelle d'environ 60 % sur algues libres, dans l'alginate de sodium et immobilisées dans l'alginate de calcium (Figure 62). En revanche l'utilisation du sol-gel entraîne une augmentation de l'activité résiduelle (environ 80 %). On masque alors la toxicité de l'effluent. Ce phénomène se reproduit avec les algues PS et les CR.

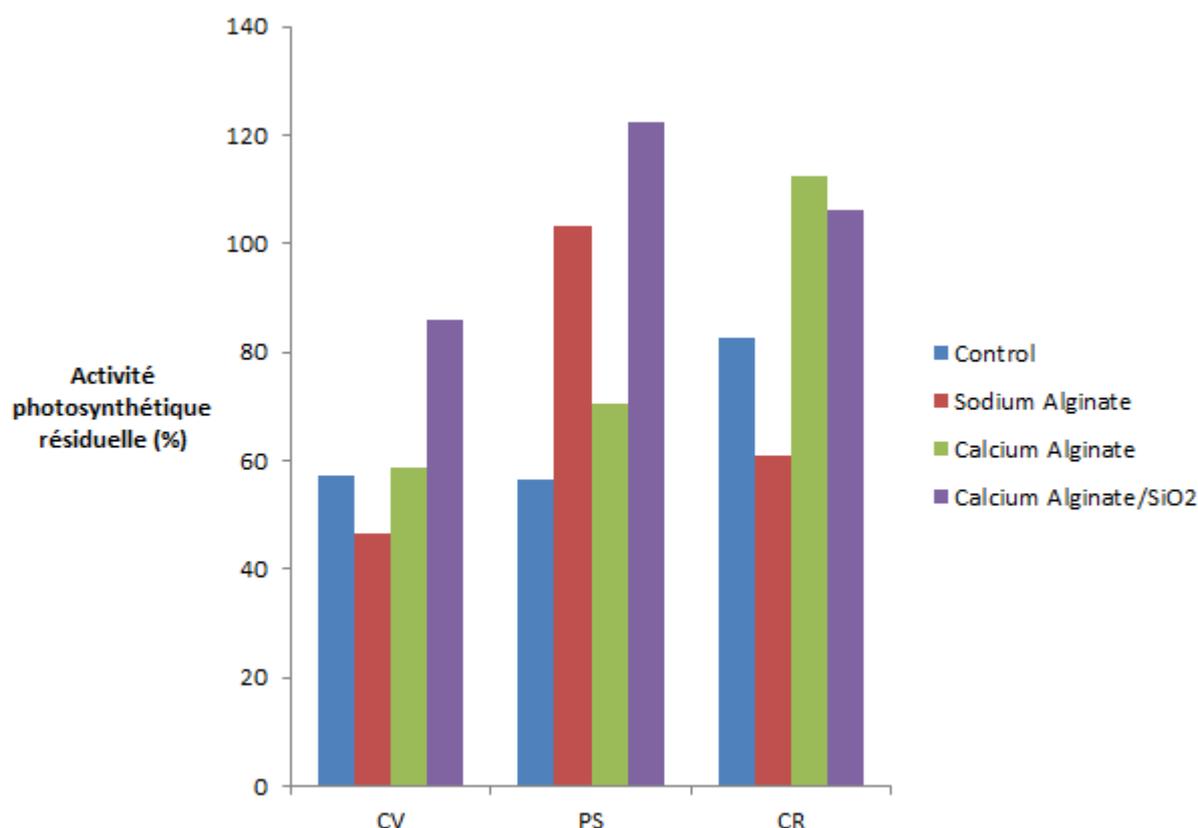


Figure 62 : % d'activité résiduelle après 24h d'exposition au rejet de temps sec de Chassieu prélevé le 03/03/2011 en fonction de la technique d'immobilisation et de la souche d'algue utilisée

Après exposition au rejet d'Ecully, les algues CV ont comme précédemment une activité résiduelle d'environ 80 % (Figure 63). La présence d'alginate de sodium et de calcium entraîne une augmentation de cette activité (> 100 %) mais paradoxalement l'immobilisation combinée de l'alginate de calcium et du sol-gel fournit la même indication qu'avec les algues libres.

Avec les PS et les CR comme avec les CV, l'alginate masque la toxicité en augmentant le pourcentage d'activité résiduelle. En revanche l'utilisation du sol-gel diminue cette activité pour les PS et l'augmente pour les CR.

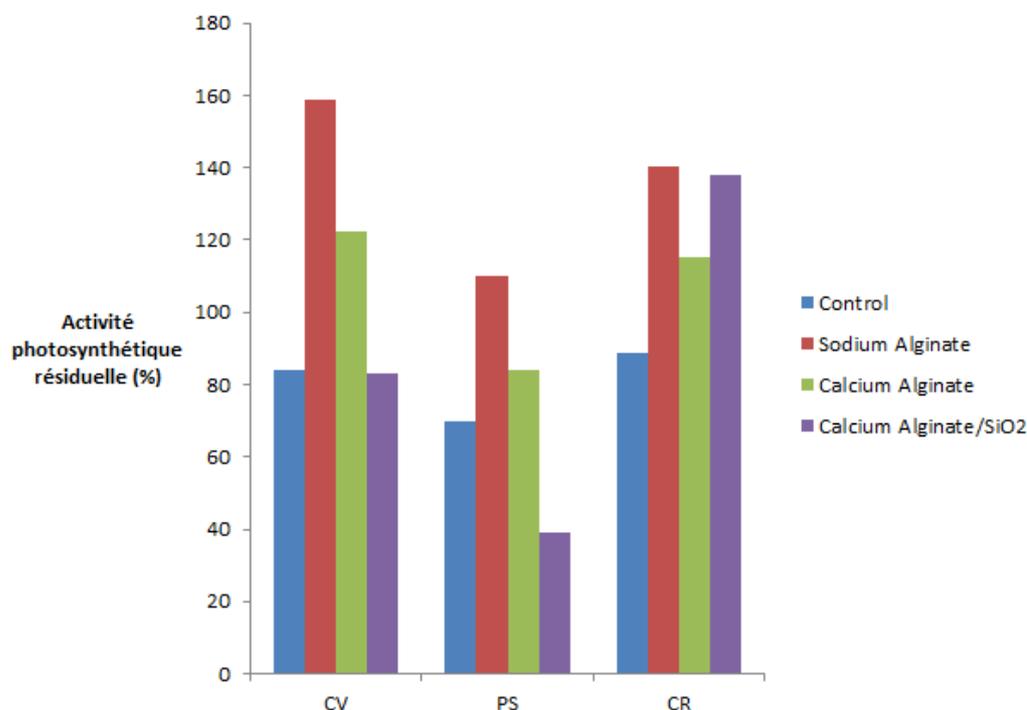


Figure 63 : % d'activité résiduelle après 24h d'exposition au rejet de temps sec d'Ecully prélevé le 03/03/2011 en fonction de la technique d'immobilisation et de la souche d'algue utilisée

12.3.6 Synthèse sur les techniques d'immobilisation sur capteur à fluorescence

Dans cette étude, nous démontrons la faisabilité de l'utilisation d'un hydrogel inorganique translucide pour construire un biocapteur optique avec des cellules algales immobilisées. Selon nos résultats et en accord avec des études précédentes (Darder et al., 2010), l'immobilisation d'algues vertes dans un sol-gel en deux étapes présente une biocompatibilité élevée; cette méthode d'encapsulation est facile à réaliser et permet d'obtenir une matrice avec de bonnes performances optiques et mécaniques. En outre, les précurseurs de silice et de particules polymères utilisés dans cette synthèse sont des réactifs à faibles coûts, ce qui est intéressant du point de vue de possibles applications futures. L'activité des cellules d'algues entières immobilisées au sein de l'hydrogel de silice peut être évaluée à partir de mesures de fluorescence de la chlorophylle. La transparence et la structure de la couche d'algues permet une mise en contact direct avec les fibres optiques pour produire une émission de fluorescence détectable par un fluorimètre. En outre, ce biocapteur à cellules entières fonctionnant sans réactif est économiquement très intéressant car il ne nécessite ni support, ni un indicateur fluorescent pour surveiller les niveaux d'herbicides dans l'environnement.

L'utilisation de cette technique d'immobilisation est facilitée par la transparence optique, la stabilité mécanique et l'inertie chimique de la silice hôte. Les propriétés optiques sont d'une importance cruciale à la fois pour la croissance des algues à la surface du biocapteur et pour la méthode de détection basée sur la détermination de l'augmentation de fluorescence de la chlorophylle. De plus, la porosité de la matrice de silice (dans le domaine des mésopores) peut être régulée par le procédé de synthèse sol-gel utilisé. Ainsi, dans la théorie, les propriétés de transport de la matière hôte peuvent être choisies judicieusement afin de permettre une diffusion libre des polluants en milieux aqueux et de les rendre accessibles aux

cellules algales. Cette technique a été appliquée à la détermination du DCMU et de l'atrazine, herbicides connus pour inhiber le photosystème II des algues. Parmi les souches d'algues testées, *Chlamydomonas reinhardtii* est l'espèce la plus sensible pour la détermination de l'atrazine, avec une limite de détection de 0,1 μM après 40 minutes d'exposition. Ce biocapteur optique à cellules algales pourrait être utilisé comme un dispositif d'alerte précoce pour détecter les herbicides dans les effluents.

Mais lorsque l'on travaille sur des effluents réels les résultats ne sont pas conformes à la théorie. En effet les résultats obtenus sur les algues immobilisées diffèrent beaucoup de ceux obtenus sur algues libres, avec une variabilité importante. Ceci peut s'expliquer par la présence de polluants en phase particulaire dans les rejets urbains. Ces particules de tailles et de natures chimiques variées ont tendance à s'adsorber sur le support d'immobilisation, modifiant la charge polluante biodisponible pour les microalgues. L'alginate de calcium est un matériau présentant une grande affinité pour les métaux, et est d'ailleurs utilisée comme agent chélatant dans des procédés de dépollution (Gotoh et al., 2004; Vijaya et al., 2008).

Avant une mise en œuvre *in situ* de ce type de capteur, non seulement les limites de détection doivent être améliorées mais il faut également limiter le phénomène de filtre occasionné par le matériau utilisé pour l'immobilisation. Les concentrations en atrazine et en DCMU dans les effluents sont de l'ordre de 1 à 800 ng/l et les normes européennes de qualité de l'environnement (NQE) sont de 200 ng/l pour DCMU et 600 ng/l pour l'atrazine (Le parlement européen et le conseil de l'union européenne, 2008).

Sur des travaux antérieurs, il a été montré que l'utilisation de cellules *C. vulgaris* comme biorécepteur permettait la détermination d'herbicides antiphotosystème II (PSII) qui ciblent la fluorescence du PSII des algues (Védrine et al., 2003). Dans les mêmes conditions ($[C. vulgaris] = 1,5 \times 10^6$ cellules/ml et le pH du tampon phosphate 7,0) la limite de détection de l'atrazine était de 1 $\mu\text{g/l}$ (5×10^{-3} μM) avec une augmentation de fluorescence de 1 %. Ces résultats ont été obtenus avec un fluorimètre haute sensibilité (Fluorolog Spex 2). Nous pensons qu'avec l'aide d'un fluorimètre plus précis et en améliorant la méthode d'immobilisation pour diminuer la variabilité, nous pourrions encore réduire ces limites de détection. Toutefois cela ne résout pas le problème de rétention des polluants ; pour supprimer ce biais on peut envisager par exemple de ne travailler que sur les polluants en phase dissoute en préfiltrant les effluents.

Conclusion

Après avoir montré que l'activité catalase pouvait être utilisée comme biomarqueur de toxicité pertinent (11.1.4), nous avons souhaité développer un biocapteur permettant la mesure de cette activité sur les sites de l'assainissement pluvial. Dans ce but nous avons cherché le meilleur moyen d'immobiliser les microalgues à la surface du transducteur. Nos travaux ont montré que l'agarose et l'alginate étaient tous deux de bons candidats pour remplir ce rôle. Toutefois, de nombreuses études pointant la faible durabilité de ces matériaux nous ont amené à explorer d'autres voies pour l'encapsulation des biorécepteurs. Ainsi nous avons appliqué la technique mixte associant gel d'agarose et hydrogel silicaté (sol-gel) pour immobiliser les cellules. Les résultats bien que décevants pour la mesure de l'activité catalase laissent entrevoir des perspectives d'utilisation plus larges avec un transducteur optique. Grâce à cette technique novatrice nous avons développé un biocapteur pour la détection de certains herbicides basé sur la mesure de la fluorescence chlorophyllienne.

13 Une station autonome pour les mesures de terrain

13.1 Solutions techniques

Le principe général du dispositif est de faire tenir la totalité du laboratoire en une structure unique, de taille modeste et pouvant fonctionner de façon autonome sur le terrain (ou plutôt semi-terrain). En fait ce dispositif a vocation à être placé au niveau d'un ouvrage instrumenté par l'OTHU, dans un bungalow fermé, au sec avec de l'électricité mis à notre disposition par la fédération de recherche (cf. 5.1 et 13.3).

Nous sommes partis sur la base d'un meuble contenant 4 étagères, chaque niveau ayant un rôle bien particulier (Figure 64). Nous détaillerons d'abord chaque groupe fonctionnel avant de décrire le fonctionnement global du dispositif. On distingue donc 4 groupes fonctionnels :

- Le groupe capteurs ; composé de 2 microélectrodes positionnées à l'intérieur de béchers;
- Le groupe hydraulique ; composé de 2 électrovannes d'entrée, 2 de sortie, d'une pompe péristaltique et d'un programmeur d'arrosage ;
- Le groupe substrat ; composé d'un vérin électrique, de 2 seringues, d'une prise électriques programmable via protocole TCP/IP ;
- Le groupe acquisition ; composé d'un automate programmable, d'un *lock-in*, d'un générateur de tension et d'un ordinateur portable.

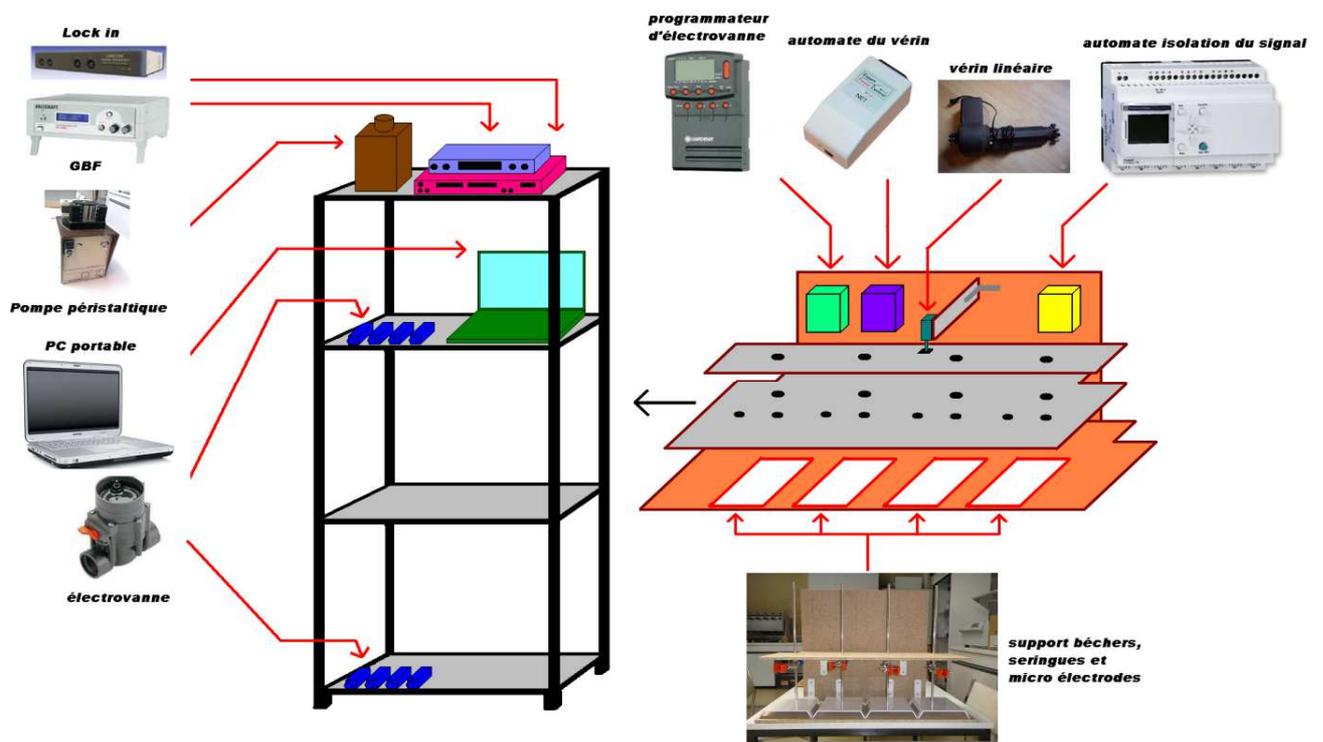


Figure 64 : plan initial de la station autonome de mesure de toxicité in situ (Dambre, 2011)

13.1.1 Le groupe capteurs

La solution retenue repose sur un système à 2 capteurs indépendants permettant d'effectuer 2 mesures distinctes à des intervalles prédéfinis par l'opérateur.

Chaque groupe capteur (Figure 65) a pour rôle de maintenir une électrode au-dessus d'un béccher dans lequel un mélange tampon sera maintenu le temps que le groupe capteur effectue sa mesure. Ainsi, l'électrode sera conservée en milieu humide sans subir les dégradations liées à la pollution du milieu réactionnel détourné du bassin. Au moment de la mesure, le béccher (fabriqué sur mesure par la Verrerie Villeurbanaise⁹) sera purgé et son contenu remplacé par les eaux du canal de dérivation pour un contact avec les algues puis d'effectuer la mesure.

Chaque électrode ayant pour vocation d'effectuer une mesure unique, la conservation de l'électrode une fois la mesure effectuée ne rentre pas en ligne de compte.

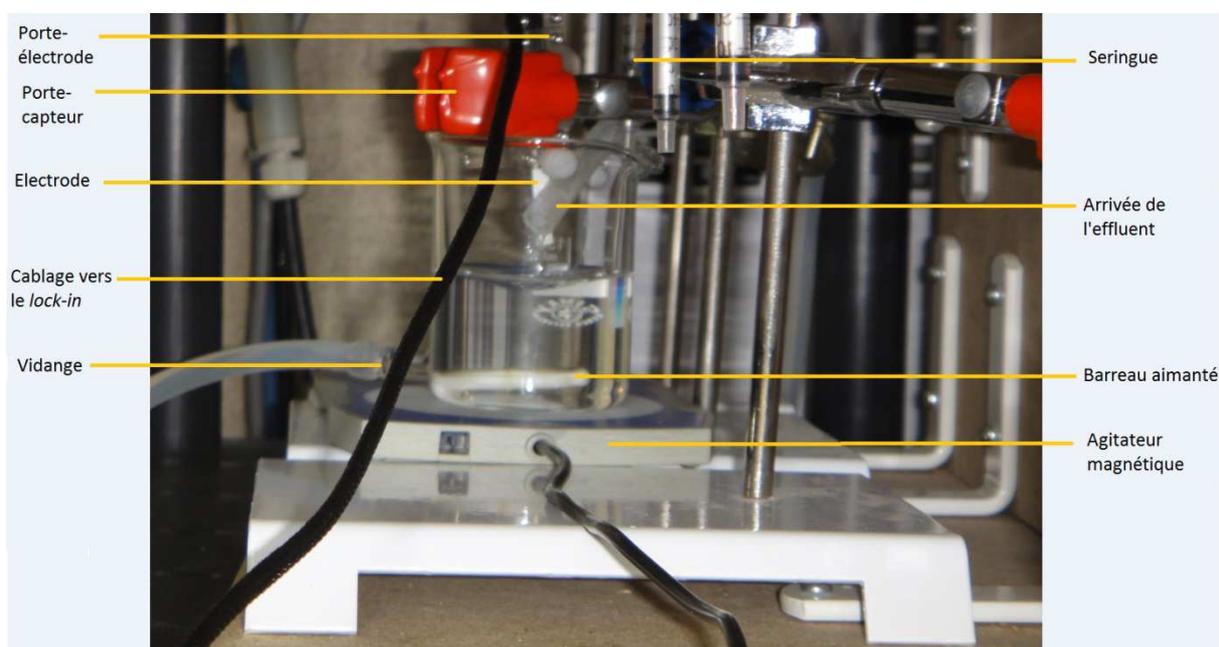


Figure 65 : zoom sur le groupe capteur

13.1.2 Le groupe hydraulique

Il est constitué d'un système de détournement des eaux à partir du canal de dérivation situé à l'intérieur du bungalow. Le détournement de l'eau est programmé et temporisé à l'aide d'un système « pompe / électrovannes » automatisé et piloté par un boîtier de commande. Le groupe hydraulique (Figure 66) a pour vocation de modifier le contenu des bécchers des groupes capteurs avant la mesure en les purgeant pour en vider la solution tampon, puis en les remplissant des eaux polluées un temps donné (exposition des électrodes et mesure).

⁹ Verrerie Villeurbanaise – 27 Rue Léon Blum 69100 Villeurbanne, France

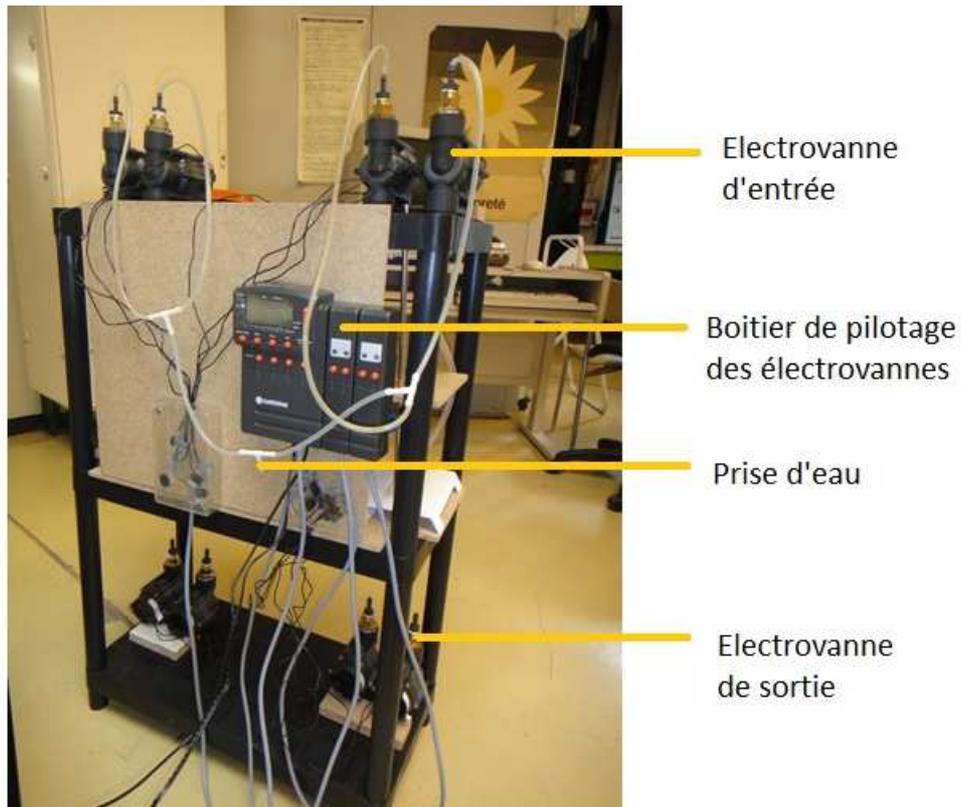


Figure 66 : montage des éléments hydraulique (la pompe péristaltique n'est pas visible)

13.1.3 Le groupe substrat

Le groupe substrat (Figure 67) est un montage enfichable sur le groupe capteur afin de distribuer la quantité requise de substrat nécessaire à chaque mesure (témoin ou essai). Il se compose d'un vérin linéaire agissant sur des seringues pré-remplies du substrat adéquat et disposées sur un rail fixe au-dessus des béchers.



Figure 67 : groupe substrat

Le vérin est commandé informatiquement par liaison Ethernet (protocole TCP/IP) via une prise 220 V (Figure 68). Une interface opérateur/prise a été élaborée spécialement à cet effet (Figure 69). Cette interface permet de définir l'heure de mise en route du vérin et sa durée de fonctionnement.



Figure 68 : prise programmable via port Ethernet

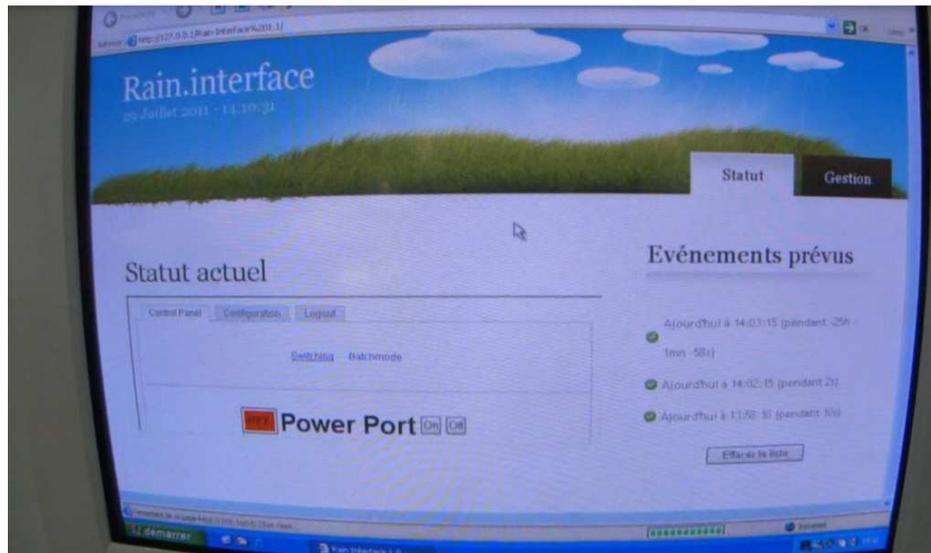


Figure 69 : interface utilisateur pour le pilotage du vérin via la prise programmable

13.1.4 Le groupe acquisition

Il remplace le binôme SR830 / PC du laboratoire et devait à l'origine intégrer un système automatisé d'isolation du signal issu des différents capteurs afin de mesurer le signal de l'électrode en cours de mesure. Mais la gestion d'un automate de contrôle du signal entrant et sortant associé au *lock-in* aurait été trop compliquée et coûteuse.

Les différents éléments électroniques sont séparés et sélectionnés pour coller le mieux possible aux caractéristiques recherchées tout en tenant compte des critères d'encombrement et de coût. On retrouve donc un générateur du signal, une détection synchrone séparée et programmable et un outil informatique équipé des logiciels d'acquisition pour enregistrer les données brutes (Figure 70).

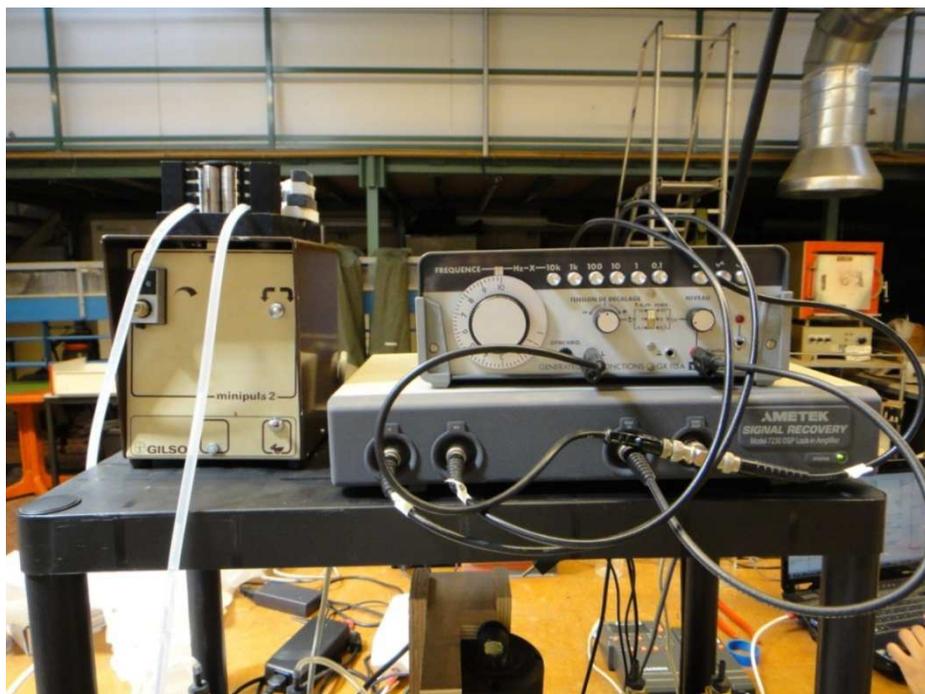


Figure 70 : le groupe acquisition (sur la droite) composé du *Lock-in*, d'un générateur de tension et d'un ordinateur (au second plan). On retrouve sur la gauche de cette photographie la pompe péristaltique du groupe hydraulique

13.2 Fonctionnement global

Que se passe-t-il lorsqu'un événement pluvieux est annoncé ?

- L'opérateur installe le matériel et configure l'heure à laquelle il souhaite démarrer les mesures. Il remplit ensuite les 2 béciers avec la solution témoin, s'assure que la pompe péristaltique est bien amorcée et peut ensuite quitter les lieux ;
- Avant l'événement pluvieux, une mesure témoin est réalisée grâce à la solution présente dans les béciers : le vérin électrique se met en route. Ce dernier est programmé via l'ordinateur à l'aide de la prise programmable. Le vérin pousse les seringues pour injecter du substrat dans le bécier. La réaction se déroule, les variations de conductivité étant mesurées et enregistrées grâce au logiciel Labview installé sur le PC. Une fois l'acquisition des données réalisée, l'électrovanne de purge se met en route et les béciers se vidangent ;
- Les eaux pluviales qui ont ruisselé sur le bassin versant arrivent à l'exutoire. La pompe péristaltique prélève une partie de ces eaux dans le canal de dérivation et distribue un échantillon dans un des 2 béciers à l'aide des électrovannes. Le fonctionnement de la pompe ainsi que des électrovannes est régi par le programmeur d'arrosage ;
- Une fois le bécier rempli, le vérin électrique se remet en route. Une nouvelle dose de substrat est réinjectée, une nouvelle réaction se déroule. Les variations de conductivité étant toujours enregistrées avec Labview ;
- Lorsque la réaction est terminée le bécier se vidange grâce à l'électrovanne de purge.

Il est possible de refaire une session de test grâce au second capteur mais il faut le connecter au *lock-in* car nous n'avons pas installé d'automate permettant de réaliser automatiquement cette manœuvre. Il suffit ensuite de réitérer ce protocole. On peut donc réaliser 2 mesures en semi autonomie.

13.3 Premiers essais sur site

Les premiers essais ont eu lieu dans le bungalow qui jouxte le bassin de rétention de Chassieu. Nous avons placé notre station de travail entre le canal de dérivation et un des deux préleveurs automatique (Figure 71).

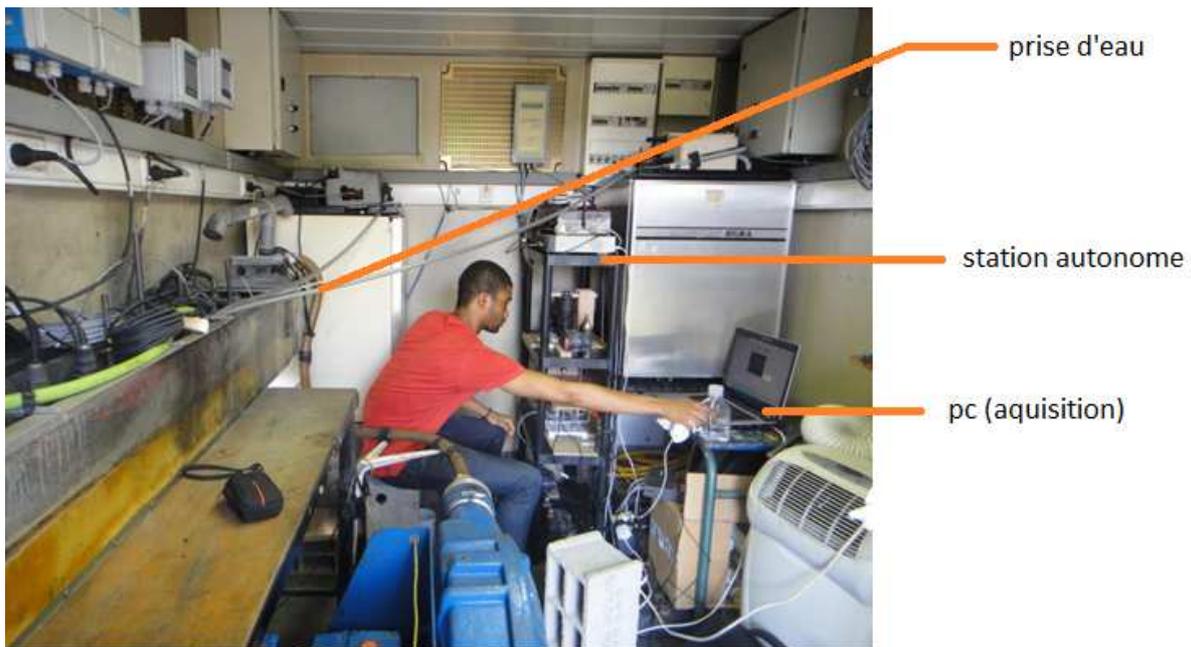


Figure 71 : premiers essais *in situ*

Les premiers essais menés sur le site de Chassieu à la mi-juillet 2012 n'ont pas fourni de données exploitables. Comme on peut le voir sur la Figure 72 le signal témoin est très peu bruité (A) mais lorsqu'on enregistre le signal de la même microélectrode en contact avec un échantillon de temps sec (B) le bruit de fond est trop important pour pouvoir détecter les activités enzymatiques.

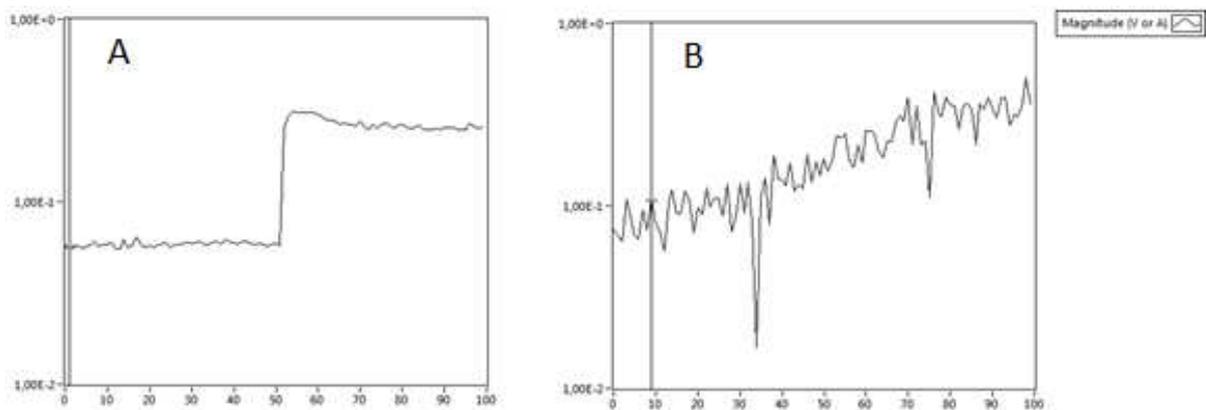


Figure 72 : mesure témoin (A) et après 5 mn de contact avec les eaux de temps sec de Chassieu (B)

Nous avons formulé une hypothèse pour expliquer ce phénomène que nous n'avions pas anticipé. Les mesures réalisées jusqu'alors au laboratoire ont toujours été réalisées dans de l'eau ultrapure ou dans un tampon (Tris-HCl). Aussi sur le terrain nos mesures ont été faites directement sur les rejets urbains et non dans une eau propre en exposant préalablement un capteur comme c'était le cas. Les eaux urbaines sont très chargées en ions et en matières en suspension. Le *lock-in* n'arrive pas à détecter le faible signal provenant du capteur dans le bruit ambiant.

13.4 Synthèse

Nous voyons ici qu'il n'est pas aisé de transposer un dispositif expérimental du laboratoire, où nous contrôlons tous les paramètres, vers le terrain.

En plus des problèmes techniques rencontrés : fuites, désamorçage de la pompe, mauvaise acquisition des données... le principal biais est l'absence de résultats exploitables à cause du bruit trop important causé par les eaux brutes.

Plusieurs solutions sont à envisager pour surmonter cet obstacle. On peut tout d'abord travailler sur le *lock-in* afin de trouver un filtrage adéquat. Mais rien ne garantit que cette idée fonctionne car plus la précision est grande et plus le bruit est important. Ainsi en diminuant le bruit ambiant on risque de ne plus détecter les petites variations de conductivité à proximité du capteur dues aux réactions enzymatiques. Une autre solution consisterait à filtrer les eaux entrantes afin de supprimer les matières en suspensions. Mais nous perdriions ainsi une part importante d'information quant à l'effet toxique de certains polluants majoritairement présents sous forme particulaire. Enfin on peut imaginer un système plus lourd qui à l'aide d'une seconde pompe reliée à une réserve d'eau ultrapure réalimenterait le béccher après un temps d'exposition au rejet et vidange du béccher. Mais ceci complique le fonctionnement et augmente le coût de la station de mesure.

Ainsi l'implication de professionnels de l'automatisme et du traitement du signal est indispensable à la réussite de ce type de projet.

Conclusion

La finalité du biocapteur conductimétrique est une utilisation sur site pour la surveillance en ligne des rejets urbains de temps de pluie. Le dispositif de mesure utilisé au laboratoire, inutilisable en l'état sur le terrain, a pu être adapté pour fonctionner sur site grâce à la fabrication d'une station de mesure de taille modeste pouvant fonctionner en semi autonomie dans un environnement adéquat (bungalow équipé).

Au cours de sa construction, les plans de fabrication initiaux ont été modifiés (simplifiés) afin de coller aux contraintes du terrain et les premiers essais ont pu avoir lieu.

Nous avons démontré grâce à ce projet la faisabilité d'un tel dispositif. Toutefois nous n'avons pas anticipé le fait qu'il n'était pas possible de mesurer les activités enzymatiques directement dans les eaux pluviales. Aussi ce dispositif nécessite encore une mise au point avant de pouvoir recueillir des données exploitables quant à la toxicité *in situ* des effluents.

Malgré les difficultés rencontrées nous pensons que c'est un outil indispensable et que ces travaux doivent se poursuivre, à condition de disposer de personnel pouvant passer du temps sur site et de moyens matériels suffisants.

Partie D : Discussion générale

14 Discussion de la méthode

Cette partie du document est destinée à l'analyse de la méthode que nous avons suivie pour répondre à la problématique initialement posée.

14.1 Caractérisation des échantillons

Nous avons prélevé 25 échantillons de rejets urbains, 16 par de temps de pluie et 9 par temps sec sur 3 bassins versants différents. Nous discutons ici de la pertinence du choix de ces stations.

14.1.1 Choix des sites

Les sites sélectionnés devaient répondre à un double enjeu : comporter des ouvrages d'assainissement pluvial et également être situés en aval de bassins versants représentatifs de situations urbaines. Ces sites ont également été sélectionnés en raison de leur histoire : le bassin de Chassieu et le déversoir d'orage d'Ecully sont étudiés depuis de nombreuses années et instrumentés dans le cadre de l'OTHU. Notre travail s'inscrit dans une continuité et a vocation à être poursuivi dans cette fédération de recherche.

A l'intérieur de ce cadre de travail nous avons sélectionné les combinaisons suivantes : zone résidentielle/déversoir d'orage, zone industrielle/bassin de rétention et zone routière/bassin de rétention. Dans un premier temps nous avons sélectionné un quatrième site représentatif du périurbain avec une occupation du sol mixte, terrains agricoles et zones commerciales. Les eaux de ruissellement du bassin versant collectées aboutissent en principe à un bassin de rétention. Mais après plusieurs visites de ce bassin par temps de pluie nous n'avons pu recueillir d'échantillon fautes d'apports en eau suffisants. On peut penser que la faible imperméabilisation du bassin versant suffise à infiltrer des pluies d'intensités faibles à moyennes comme c'est en général le cas. Une autre hypothèse est que le réseau de collecte est défectueux et ne permette pas d'alimenter le bassin en eau. Ce site fut donc rapidement abandonné.

Nous avons donc choisi 3 combinaisons de sites/modes de gestion parmi 8 possibles si l'on prend en compte les 4 bassins versants listés ci-avant et 2 modes de gestion (traditionnels ou alternatifs), ce qui est faible au regard du nombre de situations possibles. Néanmoins ces 3 situations représentent des cas concrets, retrouvés communément dans le paysage français de l'assainissement pluvial. Ainsi notre étude est pertinente et fait sens pour les professionnels travaillant sur ces ouvrages.

14.1.2 Méthodes d'échantillonnage

Les sites d'étude de Chassieu et d'Ecully sont équipés de préleveurs automatiques. Toutefois ces derniers manquent de fiabilité et ont subi plusieurs périodes d'arrêt pour maintenance durant la thèse. C'est pourquoi, dès le début de nos travaux, nous avons choisi de prélever les effluents manuellement, à un instant donné d'un évènement pluvieux ou au cours d'une période de temps sec. Ceci nous a permis de récolter un maximum d'échantillons et d'avoir une grande réactivité.

Il aurait été possible de collecter plus d'échantillons mais cela n'aurait pas été pertinent car le volume de travail pour réaliser les nombreux bioessais et les mesures à l'aide du biocapteur conductimétrique est très important et aurait été fait au détriment d'autres travaux.

14.1.3 Polluants retenus

Nous avons choisi d'étudier trois grandes catégories de polluants dans les échantillons récoltés pour plusieurs raisons :

- ils sont typiques des activités urbaines ;
- ils sont dangereux pour les organismes aquatiques ;
- ce sont ceux les plus fréquemment retrouvés dans la littérature ;
- ils doivent être surveillés dans le cadre de la DCE.

Bien évidemment ces raisons découlent les unes des autres ! Pour cause de moyens financiers nous n'avons pas pu réaliser d'analyses systématiques des micropolluants organiques. Ainsi pour certains rejets nous disposons que de peu de valeurs pour pouvoir tirer des tendances. Toutefois au regard de l'occupation des sols de nos bassins versants et des moyens à notre disposition nos choix étaient rationnels et justifiés.

Eventuellement, afin de réaliser plus de mesures sur les micropolluants organiques en diminuant les coûts, nous aurions pu sélectionner moins de molécules et conserver uniquement les plus fréquemment retrouvées dans la littérature. Mais dans ce cas nous n'aurions eu aucune certitude de résultats ; le risque serait alors de passer à côté de polluants non présélectionnés.

14.2 Evaluation de la toxicité grâce aux bioessais

14.2.1 Bioindicateur retenu

Nous avons justifié le choix des microalgues d'eau douce pour plusieurs raisons : ce sont des espèces ubiquistes des milieux aquatiques, à la base des chaînes trophiques, sensibles aux polluants présents dans les RUTP et faciles à cultiver au laboratoire. D'autre part il existe une littérature abondante à leur sujet. Nous avons pu au cours de nos travaux confirmer ces faits.

Nous aurions pu choisir également un type trophique supérieur, un animal broutant les microalgues (*D. magna* par exemple) et simuler ainsi un écosystème miniature en microcosmes. Mais la mise en œuvre expérimentale beaucoup plus lourde ne nous aurait pas permis le développement des biocapteurs. De plus en s'élevant dans les chaînes trophiques on risque également d'élever le degré de complexité dans l'interprétation des données.

Avec le recul de nos travaux, les microalgues sont effectivement de bons bioindicateurs de toxicité, très simples à manipuler et qui se prêtent bien à ce type d'étude, que ce soit en bioessais ou pour le développement de biocapteurs.

14.2.2 Biomarqueurs sélectionnés

Le choix des activités enzymatiques comporte des avantages mais aussi des inconvénients. D'une part la mesure de ces activités nous permet dans certains cas de mettre en évidence la présence de certains composés. Mais comme nous l'avons vu, dans un cocktail de polluants aussi complexe qu'un effluent urbain, il peut exister des phénomènes de synergie ou d'antagonisme. Aussi, ces activités ne peuvent être en soi des marqueurs de la présence de tel ou tel composé comme ce peut être le cas avec des solutions synthétiques pures.

En revanche, ces activités sont d'excellents marqueurs de l'impact du métabolisme algal et c'est là tout leur intérêt dans notre étude. L'activité des enzymes est intimement liée aux besoins cellulaires. Le suivi des activités enzymatiques est donc un bon indicateur du stress subi par l'organisme. Le choix de plusieurs biomarqueurs intervenant à plusieurs échelles du métabolisme était un choix important. Le cocktail de polluants présents dans les effluents n'impacte pas de la même manière toutes les activités cellulaires. Les bioessais et les mesures en biocapteurs mesurent des atteintes différentes sur l'organisme cible avec des sensibilités également différentes. En multipliant les marqueurs de stress nous avons pu croiser les données pour affiner la description des effets produits.

D'autre part, l'approche matrice nous permet de travailler sur un effluent réel. Nous l'avons utilisée dans la grande majorité des essais sans filtration ni dilution préalables. Cette approche peut être critiquable car dans le milieu naturel les organismes sont rarement exposés à un rejet pur. Il y a un facteur de dilution important grâce au débit du cours d'eau ou au volume de la masse d'eau considérée. Toutefois nous justifions cette approche en mettant en avant le fait qu'elle permet de maximiser le risque pour les communautés exposées.

De plus, en travaillant au développement de biocapteurs nous avons vu l'intérêt d'utiliser une matrice environnementale plutôt que sur certaines substances prises séparément. L'approche substance seule aurait été insuffisante. En effet, les polluants contiennent des particules en suspension qui modifient la réponse du capteur. C'est un phénomène que nous n'aurions pas vu en travaillant sur des solutions synthétiques de polluants.

14.3 Développement de biocapteurs

Nos objectifs initiaux, découlant de la problématique, étaient d'adapter les bioessais aux conditions de terrain et d'étudier la réponse du biocapteur conductimétrique en présence des rejets urbains. Ces 2 objectifs s'inscrivent dans notre démarche de surveillance des milieux récepteurs. Dans cette perspective nous avons initialement choisi de concentrer nos efforts sur les activités enzymatiques.

Dans un premier temps nous avons évalué l'intérêt du suivi de l'activité catalase et dans un second temps le comportement de la phosphatase alcaline et de l'acétylcholinestérase mesurées en biocapteur conductimétrique en présence d'effluents réels. Nos travaux ont fait ressortir le fait que l'activité catalase est potentiellement un bon biomarqueur de toxicité bien que trop peu d'essais aient été effectués sur des effluents réels. Nous avons travaillé à la construction d'un biocapteur pour la mesure de cette activité sur site, construction au cours de laquelle nous avons été amenés à étudier de près les techniques d'immobilisation des microalgues. Nous avons ainsi pu construire un biocapteur mesurant l'activité catalase bien qu'il n'ait pas été testé sur le terrain. Les biocapteurs conductimétriques ont quant à eux bien réagi face à nos échantillons même si les résultats comportaient des différences par rapport aux essais menés sur algues libres. Il était surtout indispensable d'évaluer leurs performances avant de les installer sur les sites d'assainissement pluvial. Au niveau de la méthode de travail suivie, nous avons pris en compte les résultats obtenus au fur et à mesure de nos expérimentations. Ceci nous a amené à travailler sur les techniques d'immobilisation des microalgues et donc sur la transduction optique.

L'adaptation des bioessais, et en particulier l'étude des techniques d'immobilisation, nous a amené à travailler dans un deuxième temps sur un biocapteur permettant de détecter les

herbicides. Celui-ci a fourni des résultats intéressants sur les solutions de polluants synthétiques mais les travaux menés sur les matrices environnementales ont montré les limites de ce type de capteur.

Avec le recul de nos travaux, nous pouvons dire que d'un point de vue méthodologique il a été très important de rester ouvert, réactif et flexible quant aux travaux à mener pour répondre à la problématique. Les apports de la recherche dans un domaine peuvent s'appliquer à d'autres et il est fondamental de ne pas cloisonner les activités. Peut-être aurions-nous dû concentrer initialement nos efforts sur la fluorescence de la chlorophylle. La transduction optique est plus fiable pour une utilisation de terrain que la transduction chimique malgré des inconvénients liés aux techniques d'encapsulation des organismes. Bien évidemment ces remarques ne peuvent se faire qu'*a posteriori*, mais mettent en avant des perspectives de recherche intéressante comme nous le verrons dans la partie E.

14.4 Une station de mesures pour le terrain

La conception d'un outil de mesure fiable et automatisé à notre échelle impliquait un grand nombre de contraintes. Le dispositif devait être peu cher, facile à programmer et à assembler en en temps limité en faisant appel le moins possible à des compétences externes.

Au cours de l'assemblage de la station, malgré les précautions prises en amont, nous nous sommes aperçus que les choix techniques initiaux étaient encore trop ambitieux pour les moyens et compétences dont nous disposions. Aussi, avant de pouvoir mener les premiers essais, ceux-ci ont dû être révisés, mais ne remettaient pas en question la méthodologie et les performances finales du dispositif.

Notre approche semblait intéressante malgré le relatif échec des premières mesures de terrain. Nous pouvons regretter le manque d'essais de laboratoire simulant les conditions réelles avant de partir travailler sur le terrain. Dans tous les cas, le protocole de travail a été adapté aux conditions de terrain qui sont chaque fois différentes.

15 Discussion des résultats

Après la synthèse globale des résultats réalisée en amont, nous souhaitons ici l'analyser avec un certain recul afin de décrire la contribution de notre travail aux données écotoxicologiques actuelles concernant les RUTP. Nous mettons en avant les apports d'informations et de méthodologies qui nous ont permis d'améliorer l'état des connaissances sur la problématique de l'impact sur les écosystèmes récepteurs ainsi que dans le domaine de la surveillance environnementale.

15.1 Résultats d'analyse

Les sites que nous avons sélectionnés drainent des eaux pluviales et de ruissellement conformes aux précédentes études réalisées sur les mêmes bassins versants mais également dans d'autres régions (en France et à l'international). Comme toujours avec les effluents urbains, la variabilité est très importante, mais les grandes catégories de polluants sont systématiquement présentes. Comme nous pouvions nous y attendre, les classes de polluants reflètent les activités présentes sur le bassin versant.

On peut néanmoins se poser la question de la pertinence de ces analyses, chères, souvent peu précises au regard des faibles concentrations recherchées. De plus, au vu du faible nombre d'échantillons collectés sur deux ans, il est certain que l'on passe à côté d'évènements drainant de grandes quantités de polluants. Mais il faut replacer ces analyses dans le contexte de notre travail de thèse qui était d'évaluer et de comprendre l'impact des RUTP sur les microalgues. La connaissance de la composition des effluents était un élément indispensable afin d'analyser les réactions des organismes exposés à ces effluents.

15.2 Résultats des bioessais

Nous avons vu que l'activité estérase était affectée dès 2 h de contact avec les rejets de temps sec comme de temps de pluie, que ce soit en termes d'inhibition ou de stimulation. Ces résultats peuvent être comparés aux études antérieures utilisant ces bioessais.

Guedri (2010) a évalué l'effet de certains pesticides (Diuron, méthyl paraoxon, méthyl parathion et triazine) sur l'AE de *C. vulgaris*. Après 2 h d'incubation pour l'ensemble des pesticides testés, l'inhibition apparaît à partir de 100 ppb (1ppb pour la triazine). Il a réalisé également un classement de ces substances selon leur toxicité vis-à-vis de l'AE : triazine > méthyl paraoxon > diuron > méthyl parathion. En revanche les essais menés sur 3 métaux (Cd, Zn et Pb) n'ont montré aucun effet d'inhibition même à 1 ppm. L'échantillon prélevé le 03/03/11 à Chassieu est le plus chargé en pesticides avec plus de 800 ng/l de Diuron. Mais contrairement aux travaux de Guedri nous assistons à une très forte stimulation de l'AE, avec une activité résiduelle de presque 2000 % après 24 h de contact. Dans les 2 cas les pesticides sont très préjudiciables pour l'AE et on peut imaginer dans notre cas qu'associés à d'autres polluants les pesticides tendent à la stimuler plus qu'à l'inhiber.

Durrieu *et al.* (2010) ont étudié l'impact de rejets routiers sur l'AE de *C. vulgaris*. Ils ont réalisé deux campagnes de mesures et ont obtenu 160 % et 110 % d'activité résiduelle par rapport aux témoins. Ces campagnes de mesures se rapprochent de nos travaux effectués sur des effluents réels pour lesquels nous avons également constaté des activations de l'AE.

Hadjoudja *et al* (2009) ont mis en évidence des stimulations de l'AE de *C. vulgaris* en présence de cuivre. Après 5 h de contact à des concentrations allant de 0,2 à 2 μM . Ces auteurs ont constaté une stimulation de l'AE avec des activités résiduelles atteignant 200 %. En revanche après 24 et 48 h d'exposition les activités résiduelles sont inférieures à 50 % dès que la concentration en cuivre est supérieure à 0,5 μM . Ces auteurs expliquent la stimulation qui apparaît après 5 h d'exposition peut être expliquée par l'action rapide du cuivre sur la membrane des cellules algales. Le cuivre augmenterait la perméabilité de la membrane, permettant ainsi à cette dernière de prendre en charge plus de substrat (FDA), associé à une hyperpolarisation de la membrane. De plus le produit de la réaction (fluorescéine) est sensible au pH : l'intensité de sa fluorescence augmente avec le pH. Aussi l'augmentation apparente de l'AE après adjonction du cuivre est plus certainement due aux mécanismes intracellulaires de régulation ionique du pH. En revanche après 24 et 48 h d'exposition la relation dose-effet est certainement due à l'inhibition de l'AE

Certains de nos rejets ont une concentration en cuivre importante, l'échantillon de temps de pluie prélevé à Ecully le 24/02/2011 en comporte ainsi 18,92 $\mu\text{g/l}$ soit 1,2 mM. Nous sommes ainsi en droit de penser que la très forte activation constatée après 2 h de contact soit en partie due à la présence de ce métal (le seul détecté dans cet échantillon). Mais la stimulation de l'AE perdure après 24 et 48 h d'exposition ce qui nous laisse penser que d'autres molécules sont responsables de ces activations (nutriments ?).

Comme avec l'AE, par temps sec comme par temps de pluie, nous avons constaté des phénomènes de stimulation de l'APA. Des études antérieures ont montré des résultats similaires notamment les travaux de (Chouteau, 2004) et (Guedri, 2010) sur *C. vulgaris*. Deux hypothèses ont pu être formulées, il peut s'agir de la stimulation des défenses cellulaires, pouvant se traduire par l'activation de certaines enzymes ou de l'action de certains métaux comme le cadmium pouvant jouer un rôle d'ions activateurs (Linden et al., 1977).

L'effet de rejets industriels sur l'APA de *C. vulgaris* a été mesuré par Badreddine (1996). Ce rejet, riche en éléments traces métalliques, impacte de manière très importante l'APA avec une activité résiduelle de 5 % après quelques heures de contact. Nous voyons qu'il existe un effet de seuil à partir duquel il n'y a plus stimulation mais inhibition de l'APA.

Durrieu *et al.* (2010) ont étudié l'impact de rejets routiers sur l'APA de *C. vulgaris*. Sur deux campagnes de mesure, l'activité résiduelle de l'APA était respectivement de 150 % et de 200 % vis-à-vis des témoins. Selon les auteurs ces stimulations seraient liées à la présence de métaux adsorbés sur la fraction particulaire.

L'APA a également été mesurée par Regoli et Principatob (1995) sur des tissus (glandes digestives et branchies) de moules de méditerranée avant et après exposition à des éléments traces métalliques (cuivre à 60 $\mu\text{g/l}$) durant 3 semaines. L'APA diminue dans les glandes digestives de moules exposées au cuivre et exposés à des eaux contaminées. Selon les auteurs cette inhibition représente la première étape de réaction de l'organisme aux contaminants métalliques.

Les résultats de mesure des activités estérase et phosphatase alcaline sont très variables, à mettre en lien avec la variabilité de la composition des rejets. Ce travail nous fournit des éléments de compréhension concernant l'impact des rejets sur les activités enzymatiques mais à notre sens nous montrent surtout la complexité de l'interprétation des résultats, tant les polluants étudiés agissent à différentes échelles de fonctionnement cellulaire.

Concernant l'activité catalase, peu d'auteurs l'ont étudié sur des microalgues dulçaquicoles; Bonet *et al.* (2012) ont étudié l'effet du zinc (400 µg/l) sur l'activité catalase d'un biofilm d'eau douce durant un mois. Ils ont mis en évidence une corrélation positive entre l'accumulation de zinc et l'activité catalase. Selon ces auteurs le temps de réponse rapide de l'activité après l'exposition (+ 43 % d'activité 24 h après la mise en contact) en fait un bon indicateur précoce de toxicité.

Les mesures de l'efficacité photosynthétique ont permis d'évaluer l'effet des rejets urbains sur la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique. Ce sont les seuls essais pour lesquels nous avons réalisé des mesures sur l'effluent pur et après une filtration à 0,45 µm. Globalement, sur les échantillons purs on constate que le bassin versant de Bron est le plus préjudiciable pour la photosynthèse, suivis de ceux d'Ecully et de Chassieu. Mais ce classement relatif varie en fonction du temps d'exposition. Sur les échantillons filtrés on constate plusieurs réponses, différentes de celles obtenues à partir des échantillons bruts. Un échantillon filtré peut être moins préjudiciable pour l'efficacité photosynthétique ce qui laisse penser que la majeure partie de la toxicité est portée par la fraction particulaire. Un échantillon brut qui stimulait l'efficacité photosynthétique (ou qui n'avait pas d'effet) peut devenir après filtration source d'inhibition. La fraction > 0,45 µm est certainement source de nutriments, ce qui masque les effets toxiques contenus dans la fraction dissoute. Enfin, un échantillon sans effet significatif pour la photosynthèse peut devenir après filtration une source de stimulation de l'efficacité photosynthétique. Dans ce cas la fraction particulaire porte tout ou partie des effets toxiques et la fraction dissoute, riche en éléments nutritifs, compense ces effets.

La mesure de l'efficacité photosynthétique est un bioessai utilisé couramment par les écotoxicologues. Durrieu *et al.* (2010) ont étudié la fluorescence de la chlorophylle *a* sur des cellules de *C. vulgaris* après exposition à des rejets de bassins routier. Sur leur première campagne de mesures ils ont montré une stimulation de la fluorescence, liée selon les auteurs aux contaminants chimiques (non déterminés) présents dans le rejet étudié. Nous pouvons mettre en parallèle cette étude avec la nôtre, réalisées toutes deux sur des échantillons réels complexes. Tout comme ces auteurs nous assistons à une stimulation de l'activité photosynthétique et il est difficile d'incriminer une molécule en particulier au vu de la variabilité de composition de nos échantillons.

Bonet *et al.* (2012) ont étudié la fluorescence de la chlorophylle *a* sur un biofilm d'eau douce exposé à du zinc (400 µg/l). En augmentant le temps d'exposition, et donc la bioaccumulation de zinc, des altérations physiologiques et des dommages structuraux ont été relevés par les auteurs (après 3 jours) avec une réduction de la biomasse algale et une augmentation des pigments accessoires (caroténoïdes). Ces modifications peuvent expliquer la modification de l'efficacité photosynthétique observée plus tardivement (après 7 jours). Des études antérieures ont montré le lien entre stress oxydatif et augmentation des caroténoïdes chez de nombreuses espèces végétales et algales (Ledford and Niyogi, 2005). Dans leur étude l'augmentation du ratio OD 430/665 (densités optiques), indicateur du changement de pigments, peut être reliée à la défaillance de la machinerie photosynthétique des communautés exposées au zinc.

Du zinc a été détecté 6 fois sur 7 dans les échantillons de temps sec de Chassieu (absence dans l'échantillon du 25/04/12, mesure de fluorescence non réalisée) de 100 à 800 µg/l. Toutefois la concentration en zinc ne semble pas jouer sur l'activité photosynthétique résiduelle. La complexité physicochimique d'un échantillon d'effluent urbain laisse entrevoir

l'existence de phénomènes d'interactions avec les autres contaminants présents dans les rejets (herbicides notamment).

Ainsi les mesures de l'efficacité photosynthétique nous ont permis de mettre en lumière l'impact de la composante particulaire ce qui n'avait pu être fait à partir des mesures d'activité enzymatiques. Ces essais ont encore montré la variabilité d'impact des rejets sur le compartiment algal.

Les essais de croissance menés à l'aide du milieu Oligo LC montrent que les rejets impactent la croissance dans 82 % des cas. C'est l'essai le plus sensible que nous avons réalisé et le seul normalisé (bien que nous ayons adapté le protocole pour travailler avec *C. vulgaris*). Signalons l'effet du milieu de culture sur l'évaluation de la toxicité. Nous avons remarqué en comparant les résultats des essais réalisés avec le milieu Oligo LC avec ceux réalisés avec le milieu ISO que ces deux milieux n'étaient pas équivalents pour les mesures de la croissance cellulaire. Ce phénomène est dû à la composition du milieu ISO. Ce dernier est peu concentré en nutriments et les microalgues ont tendance à être carencées en certains ions. Aussi, le rejet peut apporter un complément utile au développement de la cellule, et comparativement au témoin il se peut qu'on constate alors une croissance plus importante (tant que le rejet n'est pas trop chargé en toxiques). Le milieu AFNOR, bien plus concentré en nutriments, permet alors d'éviter ce phénomène pour ne prendre en compte que l'effet toxique. Nous voyons ici que selon la méthode suivie les résultats peuvent être différents, et qu'il est donc fondamental de prendre en compte les questions méthodologiques lors de l'interprétation des résultats.

Le suivi de la croissance cellulaire est un essai, qui, par le passé a fait ses preuves dans l'évaluation de la toxicité des polluants sur lesquels nous travaillons. Comparons nos résultats avec des études antérieures :

Badredine (1996) a étudié l'effet de divers polluants sur la croissance de *C. vulgaris* en milieu Oligo LC sur 5 jours. Il a pu classer les pesticides selon leur toxicité, ainsi le Diuron (DCMU) impacte fortement la croissance alors que d'autres comme le glyphosate et le lindane sont moins préjudiciables. Il a montré que les éléments traces métalliques inhibaient également la croissance cellulaire, suivant une relation dose-effet. Les métaux produisant le plus d'effets sur la croissance sont le mercure, le cuivre et le cadmium puis viennent ensuite le plomb, le chrome, le zinc et le nickel. Sur le bassin de Bron, le rejet prélevé le 19/10/11 est 3 fois plus chargé en cuivre que celui prélevé le 02/01/12, ce qui peut expliquer son plus fort impact sur la croissance cellulaire (de plus aucun pesticide n'a été détecté sur ces 2 échantillons).

Angerville (2009) a également montré l'effet des métaux sur la croissance algale. Elle a calculé des CE₅₀ selon la norme en vigueur et a établi un classement des éléments selon leur dangerosité : Cu (26 µg/l) > Pb (58 µg/l) – Cd (46 µg/l) > Zn (119,8 µg/l) ce qui est concordant avec l'étude précédente et nos résultats sur les effluents de Bron.

Plus récemment (Bonet et al., 2012) ont étudié l'effet du zinc (400 µg/l) sur la biomasse d'un biofilm d'eau douce. Ils ont mis en évidence une diminution de la croissance de la biomasse de 33 % par rapport au témoin 72 h après exposition au zinc (49 % après 7 jours et 76 % après 35 jours). On notera que les niveaux de contamination utilisés par Bonet *et al.* (2012) et par Angerville (2009) sont atteints dans certains rejets, pouvant expliquer ainsi les inhibitions constatées. Toutefois, cette dernière a également mis en évidence grâce à des mélanges binaires des effets synergiques et antagonistes légers. La plupart de nos effluents étant des mélanges complexes de plusieurs métaux, on peut penser que ces phénomènes sont accentués.

D'autres auteurs ont étudié l'effet de matrices environnementales sur la croissance cellulaire de *C. vulgaris*. Les eaux prélevées dans des bassins routiers lors de 2 campagnes ont montré des résultats intéressants. Les premiers effluents récoltés ont entraîné une inhibition de la croissance de 100 %, et de l'ordre de 60 % après une dilution de 0,5. Les effluents prélevés lors de la seconde campagne ont inhibé la croissance de 70 % lorsqu'ils étaient utilisés bruts et de 20 % après une dilution de 0,5 (Durrieu et al., 2010).

Ces travaux mettent en évidence la prépondérance de la composante particulaire dans les mécanismes de perturbation de la croissance cellulaire.

Poursuivons notre discussion sur le traitement statistique. Nous avons vu que ce dernier permet de mettre en évidence, de « révéler » des relations existantes entre les données disponibles.

Nous avons donc pu constater de grandes tendances, ou plutôt confirmer des phénomènes que nous avons pu lire dans la littérature ou présupposer. Ainsi du point de vue de la composition des rejets, les nutriments sont dilués par les eaux pluviales, et donc leur concentration est inversement proportionnelle aux volumes précipités. On remarque également que les concentrations en micropolluants sous forme particulières et en métaux sont corrélées aux nombres de jours de temps sec ayant précédés l'événement pluvieux. Les dépôts s'accumulent sur le bassin versant et la pluie vient lessiver les particules métalliques et organiques.

D'un point de vue toxicité on ne retrouve pas systématiquement les liens métaux – inhibition de l'APA, micropolluants organiques – inhibition de l'AE et pesticides – inhibition de l'efficacité photosynthétique comme cela est généralement décrit dans la littérature. Ce peut être le cas, mais ce n'est pas la norme. Il existe donc un effet cocktail, certains composés contrebalançant ou amplifiant les effets des premiers. Mais malgré ce traitement statistique nous sommes incapables de mettre en avant certaines associations de polluants plus toxiques que d'autres pour tel ou tel paramètre physiologique.

Par le passé, des auteurs ont réalisé ce type de traitement statistique sur des biofilms de réacteurs de station d'épuration exposés à des concentrations variables en chlorure de sodium (Cortés-Lorenzo et al., 2012). Ils ont étudié différentes activités enzymatiques : estérase, phosphatase acide, phosphatase alcaline, protéase et glucosidase et ont confronté ces activités à différents paramètres physicochimique (DCO, MES, DBO₅, pH, salinité et date du prélèvement des microorganismes) au cours d'une analyse canonique de la redondance. Ils ont ainsi mis en évidence que la salinité et la date du prélèvement étaient les deux paramètres les plus importants qui expliquaient les modifications des activités enzymatiques.

Devant la variabilité des résultats et même avec notre analyse statistique il apparaît bien difficile de caractériser avec certitude et de manière univoque l'impact écologique d'un rejet. Mais malgré la difficulté d'interprétation des données, ce panel de biomarqueurs et de réponses doit être vu comme un atout et non une barrière dans l'étude de l'impact des rejets. Tous les échantillons recueillis provoquent des effets sur le métabolisme cellulaire et mettent en évidence l'existence d'un impact pour le milieu récepteur. Les différents effets nous fournissent des informations sur le mode et la voie de cet impact. Une efficacité photosynthétique stimulée associée à une faible inhibition de la croissance cellulaire peut être annonciatrice d'un bloom algal. Une inhibition de la croissance cellulaire et des activités enzymatiques présage d'un impact fort sur les capacités de maintien du phytoplancton.

15.3 Développement des biocapteurs

Nous avons en premier lieu travaillé à l'aide d'un biocapteur conductimétrique à cellules algales pour la mesure de l'activité acétylcholinestérase (AChE) et de la phosphatase alcaline. C'est la première fois que ce dispositif était utilisé sur des matrices environnementales.

L'APA mesurée en biocapteur ne varie que très peu au cours du temps. Celui-ci réagit dès 2 h de contact et sa réponse reste stable après 24 h et 48 h de contact avec les polluants. En moyenne il y a stimulation pour les échantillons de temps de pluie, entre 150 % et 250 % d'activité résiduelle. Les échantillons de temps sec de Chassieu, quant à eux, sont sans effet sur l'APA et l'unique échantillon d'Ecully testé est fortement toxique (activité résiduelle inférieure à 10 %).

Nous disposons de résultats d'études précédentes menées sur les biocapteurs conductimétriques. Toutefois aucune étude n'a été réalisée sur des effluents réels, seulement sur des solutions synthétiques de polluant ; aussi ces travaux nous fournissent des pistes pour interpréter nos résultats mais ne sont pas directement transférables. Chouteau *et al.* (2005) ont montré que des solutions d'éléments traces métalliques, seuls ou en mélanges binaires, inhibaient l'APA à partir de concentrations de 10 ppb en Cd ou en Zn. En revanche, ils n'ont pas mis en évidence d'effets de synergie ou d'antagonisme. Dans leur étude, les auteurs ont également mis en avant la sensibilité de l'AChE à certains pesticides organochlorés (méthyl – paraxon) à partir de 100 ppb (inhibition constatée de -20 %). Mais leur étude a été menée sur des temps courts, entre 1 h et 4 h d'exposition et nous n'avons pas d'information quant aux effets à plus long terme.

Guedri *et al.* (2010) ont mis en évidence des stimulations de l'APA pour de faibles concentrations en ETM, en particulier avec le zinc et le plomb (1 ppb). Il arrive fréquemment que nos échantillons contiennent des concentrations de cet ordre de grandeur, pouvant en partie expliquer les inhibitions constatées.

Dans la grande majorité des cas nous n'avons pas trouvé de concordance entre résultats des mesures réalisées sur algues libres et celles réalisées en biocapteurs. Ceci est certainement dû à la différence de proportion entre le nombre de cellules exposées pour une même quantité de contaminant (il existe un rapport de 1000 entre le biocapteur et le puits d'une microplaque). La différence de densité cellulaire et donc d'exposition aux polluants peut expliquer en partie l'absence de concordance entre les résultats réalisés sur algues libres et ceux réalisés sur algues immobilisées. Notons que ceci n'est pas un bon ou un mauvais résultat, et il était important d'avoir réalisé ces mesures en biocapteur au laboratoire avant des essais sur site afin d'avoir pris conscience de ce phénomène.

Le développement d'un biocapteur pour la mesure de la catalase s'est arrêté finalement à une étude de faisabilité. Nous ne l'avons pas exploité pour réaliser des mesures *in situ* car notre temps a été absorbé par le développement d'un autre outil pour la détection des herbicides.

Les résultats obtenus en utilisant l'immobilisation sur gel d'agarose ou d'alginate sont prometteurs, bien que d'après la littérature ces gels ne soient pas les plus adaptés à une utilisation prolongée. Aussi la recherche d'une nouvelle technique d'immobilisation plus performante nous a conduit à travailler sur les hydrogels silicatés (matériaux sol-gel).

Au vu des faibles performances conductimétrique du matériau (détection de l'oxygène sur électrode de Clark) et des grandes propriétés mécaniques et optiques, nous avons travaillé à la fabrication d'un capteur plus prometteur pour la détection des herbicides. Le capteur que nous avons développé n'est pas le premier du genre, ni le plus sensible si on se réfère aux données de la littérature (Naessens et al., 2000; Nguyen-Ngoc and Tran-Minh, 2007; Nguyen-Ngoc et al., 2009). En revanche c'est la première fois que la technique mixte gel d'alginat associée au sol-gel est appliquée à l'immobilisation des microalgues et en vue de la fabrication d'un biocapteur. Ici encore, notre travail a consisté au développement d'un prototype et à une étude de faisabilité, des mesures sur site n'ayant pas été réalisées. En revanche les mesures faites à partir des effluents de temps secs récoltés sur Chassieu et Ecully nous ont permis de pointer les limites de notre capteur. Celui-ci est peu adapté à des effluents aussi complexes (probablement à cause de la pollution particulaire) et nécessite un prétraitement des matrices environnementales est nécessaire. Une autre voie de travail consiste à améliorer la technique d'encapsulation. Il faut pouvoir contrôler la porosité du matériau tout en conservant ses propriétés mécaniques et optiques.

15.4 Les mesures réalisées sur le terrain

Les besoins d'outils de surveillance de la toxicité des effluents urbains sont importants et le *monitoring* en continu est une voie de travail privilégiée. Après avoir montré la pertinence des biomarqueurs enzymatiques et testé les performances du biocapteur conductimétrique sur effluents réels, il a fallu franchir la dernière étape, celle de la transposition au terrain.

Nous sommes donc parvenus à réaliser des mesures de terrain de manière semi-automatisée, mais comme nous l'avons vu précédemment ces mesures étaient non exploitables en raison de la charge ionique importante des effluents urbains. Avec le recul que nous avons aujourd'hui, nous voyons les limites de notre travail. Des essais préliminaires en laboratoire simulant les conditions réelles de manière réaliste auraient peut-être permis d'anticiper les problèmes que nous allions rencontrer et nous aurions pu ajuster le dispositif en conséquence.

Recommandations

Ce travail nous permet de tirer des enseignements sur la situation actuelle concernant la gestion des rejets urbains et la surveillance environnementale. Nous proposons quelques recommandations afin d'améliorer ces deux points.

Pour une meilleure gestion des RUTP

Comme le veut l'adage, le meilleur déchet est celui qu'on ne produit pas. Si l'on veut résoudre le problème de l'impact des RUTP il est indispensable de réduire les volumes à la source. A court terme ceci peut se faire de deux manières :

1. Travailler sur la gestion des eaux de temps sec : mauvais branchements, fuites, infiltrations dans le réseau... le réseau séparatif pluvial sert trop souvent à drainer des eaux qui doivent normalement rejoindre la station d'épuration. Non seulement par temps sec on déverse de faibles volumes de manière chronique et diffuse, fortement concentrés en polluants, mais par temps de pluie on contribue à augmenter la charge polluante des eaux pluviales.

2. Gérer les eaux à la parcelle afin de limiter le ruissellement et de favoriser l'infiltration, c'est-à-dire généraliser le recours aux techniques alternatives. On limite ainsi les apports au réseau et *in fine* les rejets de polluants. Mais c'est une solution principalement applicable aux constructions neuves. Il existe toutefois des dispositifs facilement adaptables aux constructions individuelles comme des récupérateurs d'eaux de pluie. Gageons que la mise en place de la taxe pluviale incitera ce genre de comportement.

Bien que ces types d'action permettraient de limiter de manière importante à l'échelle locale les entrées de polluants dans les milieux aquatiques, le réseau unitaire et séparatif tel qu'il est constitué actuellement continuera de drainer la majorité des eaux pluviales et à les rejeter au milieu naturel. Ce ne seraient bien évidemment pas un problème si les volumes et les niveaux de pollution n'étaient pas si importants.

Aussi, une autre approche bien plus efficace sur le long terme consisterait à ne pas se focaliser uniquement sur les modes de traitement ou de gestion mais sur la qualité des eaux pluviales. La ville, donc les activités humaines, engendre une quantité incalculable de molécules qui se retrouvent inévitablement dans l'environnement, et *in fine*, dans l'air, l'eau et l'alimentation des êtres vivants. Ces molécules et leur produit de dégradation (dont nous n'avons vu qu'une partie infinitésimale dans notre étude), sont toxiques pour l'Homme et son environnement. Leur usage doit au mieux disparaître ou *a minima*, diminuer et être géré de façon bien plus rigoureuses afin d'éviter leur propagation au sein de tous les compartiments de notre planète (atmosphère, hydrosphère, biosphère, etc.). Dans nos sociétés contemporaines cette assertion peut sembler utopiste car ces molécules sont liées à des usages et des biens de consommation considérés comme indispensables, même s'ils sont la plupart du temps superflus. Pour voir le jour cette démarche nécessite une réelle remise en question de nos modes de vie et de nos choix sociétaux et c'est à mon sens la seule qui puisse remplir les exigences de qualité et durabilité de nos masses d'eaux.

Ainsi la gestion durable des eaux pluviales, et des territoires de manière générale, ne pourra pas uniquement passer par des solutions réglementaires et techniques mais devra nécessairement être accompagnée d'un changement de paradigme concernant les rapports qu'entretiennent les Hommes avec leur environnement.

Pour une meilleure surveillance environnementale

Il faut continuer à investir dans les dispositifs de *monitoring in situ*. Ils constituent un complément aux capteurs physicochimiques et doivent devenir à l'avenir des moyens de surveillance privilégiés. Ces dispositifs doivent être le plus simple possible afin de limiter les pannes et les interventions de maintenance. Ils ne remplaceront pas les bioessais de laboratoire mais leur seront complémentaires. Leur vocation n'est pas exploratoire (acquisition de nouveaux savoirs) mais de fournir un diagnostic rapide sur le niveau de pollution de l'effluent et son potentiel d'écotoxicité.

Quant aux dosages des éléments chimiques, ces derniers doivent être utilisés avec intelligence, c'est-à-dire répondre à des questions précises dans un cadre strict. Ils ne doivent pas servir à autre chose qu'à informer sur la composition de l'échantillon X prélevé au temps t. En d'autres termes il ne faut pas chercher à extrapoler la réponse d'un seul contrôle à la qualité globale d'une masse d'eau ou d'un effluent. *A contrario* bien utilisées, les analyses physicochimiques peuvent être des informations précieuses dans un cadre plus large.

La surveillance environnementale ne doit pas se limiter au simple lieu et moment du rejet mais doit s'étaler sur des périmètres et des durées plus importants car les effets d'une pollution peuvent être différés dans le temps et dans l'espace.

Partie E : Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale

Typologie des rejets urbains

Bien que la caractérisation physicochimique des effluents ne fût pas au cœur de notre problématique, ces informations sont un atout indéniable si l'on veut comprendre les effets toxiques des rejets urbains sur les organismes aquatiques.

Les polluants rencontrés, leurs concentrations et répartitions sont en concordance avec les précédentes études menées sur ces bassins versants ou ailleurs. Nos sites d'études constituent ainsi de bons modèles de travail et des résultats généraux, transposables à d'autres bassins versants, peuvent en être tirés de cette étude.

L'étude physicochimique a mis en avant plusieurs phénomènes, notamment la grande rémanence des composés organiques. Ainsi, on détecte encore trop souvent du Diuron, pourtant interdit depuis 2002 (Journal Officiel du 5 avril 2002). Nous avons vu également qu'après la fermeture du parking poids lourds de Bron la concentration en HAP augmentait au cours du temps dans les eaux pluviales. L'arrêt des nuisances n'est pas concomitant avec l'arrêt des activités, information importante à prendre en compte dans des projets de réhabilitation par exemple.

Impacts écologiques des rejets urbains pour le milieu récepteur

Pouvons-nous répondre de manière claire et sans ambiguïté à notre question initiale : quel est l'impact des rejets urbains de temps de pluie sur le compartiment algal des écosystèmes aquatiques ?

L'analyse des substances et les biomarqueurs sélectionnés nous ont permis de réaliser une étude écotoxicologique dotée d'un grand réalisme écologique. Sur les microalgues nous avons pu étudier 2 activités enzymatiques, la croissance cellulaire et la fluorescence chlorophyllienne. Cette batterie de bioessais, bien que permettant de disposer de plusieurs types d'information différentes, a l'inconvénient d'entraîner une complexification dans l'interprétation des résultats.

Certains tests sont plus sensibles que d'autres, mais globalement tous montrent que les rejets urbains de temps sec comme de temps de pluie impactent les activités étudiées, souvent dans des proportions importantes. Certes nous avons privilégié des essais sur des échantillons bruts non dilués, ce qui est éloigné de la réalité car le milieu récepteur dilue l'effluent. Mais le fait est que ces rejets sont très préjudiciables pour le compartiment algal, producteur primaire à la base des chaînes trophiques. Une perturbation affectant les premiers niveaux trophiques est susceptible de se transmettre au reste de la chaîne alimentaire modifiant l'ensemble de l'écosystème (modèle *bottom-up*).

Ainsi malgré certaines incertitudes, l'impact des RUTP sur le compartiment algal (et probablement sur les organismes supérieurs) des écosystèmes aquatiques est donc certain.

Les outils de terrain

Les gestionnaires d'ouvrage d'assainissement pluvial n'ont à l'heure actuelle aucun vrai outil de terrain à leur disposition pour quantifier l'impact écotoxique potentiel d'un effluent sur le milieu récepteur. Ainsi le deuxième enjeu de ce travail était de développer de nouveaux biomarqueurs de toxicité et d'adapter les bioessais existants afin de faire face aux contraintes du terrain.

Nos travaux ont montré la pertinence d'utiliser l'activité catalase comme nouveau biomarqueur de toxicité en complément des autres activités enzymatiques. Mais une fois ce diagnostic posé, il est essentiel de pouvoir sortir du laboratoire et réaliser des mesures de terrain. Dans cette perspective la question prioritaire à se poser est celle de l'encapsulation des organismes.

C'est pour cela que nos efforts se sont concentrés sur la mise au point d'un matériau de qualité pour nos mesures. Ce matériau à base de silice s'est avéré peu adapté aux mesures électrochimiques mais fort performant pour les mesures optiques. Ainsi nos efforts ont été récompensés à ce niveau-là et montrent que les biocapteurs à transduction optique basés sur l'encapsulation d'organismes vivants est une piste sérieuse pour le *monitoring* en ligne et sur site.

En parallèle la réalisation d'une station de mesure autonome des activités enzymatiques a été riche en enseignements malgré l'absence de résultats exploitables. Ces travaux nous ont prouvé la faisabilité d'un tel projet mais nous ont surtout permis de mettre en lumière les manques à combler pour parvenir à nos fins, et ce, quel que soit le type de biocapteur ou le site en question. Ces manques sont en fait des verrous techniques qui doivent pouvoir être levés sans trop de difficultés à condition de disposer de temps et des compétences adéquates, souvent pluridisciplinaires. C'est là que se situe le véritable enjeu, réunir des moyens et l'ensemble des acteurs au service de la protection de l'environnement.

Perspectives

Dans le domaine des bioessais

Les bioessais sont à l'heure actuelle les seuls outils pertinents dont dispose l'écotoxicologue pour évaluer la toxicité d'une molécule ou d'une substance. Ils ont hélas une portée limitée, nécessitent matériel et qualification, et ne peuvent renseigner l'expérimentateur que sur des questions précises à une échelle réduite. Nos travaux nous renseignent sur les effets des RUTP sur le compartiment algal qu'il est possible d'extrapoler (avec prudence et certaines réserves !) à une échelle plus grande en vertu des modèles écologiques décrits dans la littérature.

Aussi il serait intéressant de poursuivre les expérimentations en évaluant la dangerosité des effluents sur des organismes supérieurs. On peut imaginer de travailler sur les animaux broutant les microalgues (crustacés par ex.) en menant une expérience simulant un écosystème miniature en microcosmes. De même il serait intéressant d'augmenter le nombre de niveaux trophiques en mésocosmes ainsi que les durées d'expérimentation pour évaluer les effets à long terme. On obtiendrait ainsi une idée plus fine sur la modification de la structure d'un écosystème en présence de rejets urbains.

Dans le domaine des biocapteurs

Le champ d'étude des biocapteurs est en pleine expansion et en est qu'à ses débuts. Ce domaine ouvre des champs d'applications infinis et la surveillance de l'environnement en est un parmi d'autre qui doit profiter des avancées de la connaissance dans les autres disciplines (santé/médecine notamment).

Trop peu de réalisations pourtant prometteuses ont encore passé la porte des laboratoires. Les travaux à venir vont bousculer le domaine de la métrologie car à la surveillance physicochimique va pouvoir venir s'ajouter une surveillance d'ordre écologique. Ainsi le biocapteur à catalase que nous avons souhaité développer doit ainsi passer des essais de laboratoire aux essais de terrain et prouver ses capacités en termes d'évaluation écotoxicologique.

Les outils optiques sont certainement plus adaptés à une utilisation en continue sur le terrain. Ils sont robustes et ont déjà leur preuve dans le domaine de la métrologie (mesure de la turbidité, dosage de l'oxygène, ...) Les biocapteurs du futur privilégieront très certainement ce mode de transduction.

Dans le domaine de l'hydrologie urbaine

Les études portant sur les rejets urbains de temps de pluie ont permis de les caractériser finement : volumes, nature et flux de polluants, etc. L'enjeu n'est désormais plus là.

Aujourd'hui les gestionnaires commencent à intégrer dans leur projet les grands principes d'une gestion durable des eaux pluviales : réduction du risque inondation, réduction des atteintes au milieu récepteur, réalisation paysagères, etc. Ainsi ils se tournent peu à peu vers les techniques alternatives au côté des fabricants qui innovent chaque jour en la matière.

Mais même si depuis de nombreuses années les techniques de gestion traditionnelles semblent à bout de souffle il faut néanmoins prendre le temps d'étudier les ouvrages d'assainissement pluvial alternatif. L'infiltration est préconisée lorsque cela est techniquement possible mais quelles sont les performances épuratoires des sols ? Quels impacts à long terme des noues et tranchés drainantes sur la qualité des sols ? Il faut prendre le temps d'étudier ces techniques alternatives et de les comparer en termes de toxicité aux effluents sortant d'un bassin de décantation pour un même bassin versant donné. Autant de travaux de recherche qu'il est indispensable de poursuivre si l'on souhaite véritablement arriver à une gestion « intégrée des eaux pluviales en zone urbaine ».

Bibliographie

Aalderink, R.H., Van Duin, E.H.S., Peels, C.E., and Scholten, M.J.M. (1990). Some characteristics of run-off quality from a separated sewer system in Leleystad, The Netherlands. Proceedings of: *the 5th International Conference on Urban Storm Drainage, (Osaka, Japan)*, pp. 427–432.

AASQA-Rhône-Alpes (2010). Bilan de la qualité de l'air en Rhône-Alpes.

Abel, A.P., Weller, M.G., Duveneck, G.L., Ehrat, M., and Widmer, H.M. (1996). Fiber-optic evanescent wave biosensor for the detection of oligonucleotides. *Analytical Chemistry* **68**, 2905–2912.

Abu-Rabeah, K., Atias, D., Herrmann, S., Frenkel, J., Tavor, D., Cosnier, S., and Marks, R.S. (2009). Characterization of electrogenerated polypyrrole-benzophenone films coated on poly(pyrrole-methyl metacrylate) optic-conductive fibers. *Langmuir: the ACS Journal of Surfaces and Colloids* **25**, 10384–10389.

ADEME (2005). Développement d'une méthode de sélection des tests biologiques de toxicité et de génotoxicité adaptée à différents scénarii.

ADEME (2007). Evaluation des risques pour les écosystèmes dans le domaine des sites pollués. Définitions, concepts et usages des outils existants.

Admiraal, W., Barranguet, C., Van Beusekom, S. a, Bleeker, E. a, Van den Ende, F.P., Van der Geest, H.G., Groenendijk, D., Ivorra, N., Kraak, M.H., and Stuijzand, S.C. (2000). Linking ecological and ecotoxicological techniques to support river rehabilitation. *Chemosphere* **41**, 289–295.

AFNOR (1980). Détermination de l'inhibition de croissance de *Scenedesmus subspicatus* par une substance.

Agence de l'eau Artois Picardie (2002). Quand les toxiques se jettent à l'eau... Guide technique.

Akyilmaz, E., and Dinçkaya, E. (2005). An amperometric microbial biosensor development based on *Candida tropicalis* yeast cells for sensitive determination of ethanol. *Biosensors & Bioelectronics* **20**, 1263–1269.

Akyilmaz, E., and Turemis, M. (2010). An inhibition type alkaline phosphatase biosensor for amperometric determination of caffeine. *Electrochimica Acta* **55**, 5195–5199.

Akyilmaz, E., Yaşa, I., and Dinçkaya, E. (2006). Whole cell immobilized amperometric biosensor based on *Saccharomyces cerevisiae* for selective determination of vitamin B1 (thiamine). *Analytical Biochemistry* **354**, 78–84.

Angerville, R. (2009). Evaluation des risques écotoxicologiques liés au déversement de Rejets Urbains par Temps de Pluie (RUTP) dans les cours d'eau: Application à une ville française et à une ville haïtienne. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.

- Arakawa, T., Koshida, T., Gessei, T., Miyajima, K., Takahashi, D., Kudo, H., Yano, K., and Mitsubayashi, K. (2011). Biosensor for L-phenylalanine based on the optical detection of NADH using a UV light emitting diode. *Microchimica Acta* **173**, 199–205.
- Arambourou, H. (2011). Un exemple d'indicateur de suivi environnemental des rivières : les instabilités de développement affectant le chironome (diptère). Acte du Congrès : *22èmes Journées Scientifiques de l'Environnement - reconquête des environnements urbains: les défis du 21ème siècle*, (Créteil, France), pp. 7.
- Arica, M.Y., Kaçar, Y., and Genç, O. (2001). Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in Ca-alginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from an aqueous solution. *Bioresource Technology* **80**, 121–129.
- Armstrong, J.W., Thom, R.M., and Chew, K.K. (1980). Impact of a combined sewer overflow on the abundance, distribution and community structure of subtidal benthos. *Marine Environmental Research* **4**, 3–23.
- Artieres, O. (1987). Les dépôts en réseau d'assainissement unitaire. Thèse de doctorat, Université Louis Pasteur (Strasbourg).
- Aryal, R., Vigneswaran, S., Kandasamy, J., and Naidu, R. (2010). Urban stormwater quality and treatment. *Korean Journal of Chemical Engineering* **27**, 1343–1359.
- Asch, G. (2010). Les capteurs en instrumentation industrielle - 7ème Edition, Editions Dunod (Paris)
- Ashley, R.M., Fraser, A., Burrows, R., and Blanksby, J. (2000). The management of sediment in combined sewers. *Urban Water* **2**, 263–275.
- Ashley, R.M., WOTHERSPOON, D.J.J., Goodison, M.J., McGregor, I., and Coghlan, B.P. (1992). The deposition and erosion of sediments in sewers. *Water Science and Technology* **26**, 1283–1296.
- Atienzar, F.A., and Depledge, M.H. (2002). 4-n-Nonylphenol and 17-b estradiol may induce common DNA effects in developing barnacle larvae. *Environmental Pollution* **120**, 735–738.
- Babut, M., and Dorioz, J.M. (2009). PCB et lacs : historique, données générales sur la contamination biologique, les sédiments et perspectives. Actes du congrès : *Colloque PCB*, (Thonon Les Bains, France).
- Babut, M., and Miege, C. (2007). Contamination des poissons et des sédiments du Rhône par les polychlorobiphényles, rapport du Cemagref.
- Bachoc, A. (1992). Le transfert des solides dans les réseaux d'assainissement unitaires. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Badin, A.L., Monier, A., Volatier, L., Geremia, R.A., Delolme, C., and Bedell, J.-P. (2011). Structural stability, microbial biomass and community composition of sediments affected by the hydric dynamics of an urban stormwater infiltration basin. Dynamics of physical and microbial characteristics of stormwater sediment. *Microbial Ecology* **61**, 885–897.

- Badreddine, I. (1996). Mise au point d'un test de toxicité basé sur la mesure de l'Activité de la Phosphatase Alcaline de microphytes. Thèse de doctorat, Université de Savoie.
- Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B., Luch, A., Seidel, A., and Iversen, P.L. (2002). Responses of Human Cells to PAH-Induced DNA Damage. *Polycyclic Aromatic Compounds* **22**, 771–780.
- Balades, J.D., Guichars, T., Legret, M., and Madiec, H. (1994). Gestion de la pollution des eaux pluviales par chaussées réservoirs en milieu urbain. *TSM* 631–638.
- Bay, S., Jones, B.H., Schiff, K., and Washburn, L. (2003). Water quality impacts of stormwater discharges to Santa Monica Bay. *Marine Environmental Research* **56**, 205–223.
- Becouze-Lareure, C. (2010). Caractérisation et estimation des flux de substances prioritaires dans les rejets urbains par temps de pluie sur deux bassins versants expérimentaux. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- Bertrand-Krajewski, J.-L. (2006). Les polluants des rejets urbains par temps de pluie: natures, concentrations, flux, caractéristiques physicochimiques, solides en suspension et répartition temporelle durant les événements pluvieux. Cours d'Hydrologie urbaine, partie 7, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- Björklund, K., Cousins, A.P., Strömvall, A.-M., and Malmqvist, P.-A. (2009). Phthalates and nonylphenols in urban runoff: Occurrence, distribution and area emission factors. *The Science of the Total Environment* **407**, 4665–4672.
- Blanchard, M., Teil, M.J., Ollivon, D., Garban, B., Chestérikoff, C., and Chevreuil, M. (2001). Origin and distribution of polyaromatic hydrocarbons and polychlorobiphenyls in urban effluents to wastewater treatment plants of the Paris area (France). *Water Research* **35**, 3679–3687.
- Boller, M. (2004). Towards sustainable urban stormwater management. *Water Science & Technology* **4**, 55–65.
- Bonet, B., Corcoll, N., and Guasch, H. (2012). Antioxidant enzyme activities as biomarkers of Zn pollution in fluvial biofilms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **80**, 172–178.
- Borchardt, D., and Sperling, F. (1997). Urban stormwater discharges: Ecological effects on receiving waters and consequences for technical measures. *Water Science and Technology* **36**, 173–178.
- Borchardt, D., and Statzner, B. (1990). Ecological impact of urban stormwater runoff studied in experimental flumes: Population loss by drift and availability of refugial space. *Aquatic Sciences* **52**, 299–314.
- Borden, R.C., Black, D.C., and McBlief, K. V (2002). MTBE and aromatic hydrocarbons in North Carolina stormwater runoff. *Environmental Pollution* **118**, 141–152.
- Boudriot, P. D. (1988). Essai sur l'ordure en milieu urbain à l'époque pré-industrielle. *Histoire, économie et société*, **7**(2), 261-281.

- Bouxin, G. (2008). Les techniques d'analyse factorielle et d'ordination, Disponible sur Internet à l'adresse suivante : <http://users.skynet.be/Bouxin.Guy/ASDV/ASDV.htm>. 82 pp.
- Boyle, N.R., and Morgan, J. a (2009). Flux balance analysis of primary metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Systems Biology* **3**, 4.
- Bressy, A. (2010). Flux de micropolluants dans les eaux de ruissellement urbaines. Effets de différents modes de gestion des eaux pluviales. Thèse de doctorat, Université Paris-Est.
- Bröker, P., Lücke, K., Perpeet, M., and Gronewold, T.M. a. (2012). A nanostructured SAW chip-based biosensor detecting cancer cells. *Sensors and Actuators B: Chemical* **165**, 1–6.
- Burm, R.J. (1967). The bacteriological effect of combined sewer overflows on the Detroit River. *Journal (Water Pollution Control Federation)* **39**, 410–424.
- Burton, G.A., Pitt, R., and Clark, S. (2000). The Role of Traditional and Novel Toxicity Test Methods in Assessing Stormwater and Sediment Contamination. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **30**, 413–447.
- Butte, W., and Heinzow, B. (2002). Pollutants in house dust as indicators of indoor contamination. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **175**, 1–46.
- Buxton, L.E., and Murdoch, R.N. (1981). Zinc and magnesium in the uterus of the pregnant and pseudopregnant mouse and the effects of Mg²⁺ ions on uterine alkaline phosphatase. *Australian Journal of Biological Sciences* **34**, 211–220.
- Carbiener, R., Tremolieres, M., and Muller, S. (1995). Végétation des eaux courantes et qualité des eaux : une thèse, des débats, des perspectives. *Acta Bot. Gallica* **142**, 489–531.
- Cauzzi, N. (2007). Evaluation de l'éco-compatibilité de sédiments contaminés, traités ou non par un procédé physico-chimique, dans le cadre d'un scénario de dépôt en gravière. Etude en microcosmes aquatiques. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- Charrier, T., Chapeau, C., Bendria, L., Picart, P., Daniel, P., and Thouand, G. (2011a). A multi-channel bioluminescent bacterial biosensor for the on-line detection of metals and toxicity . Part II : technical development and proof of concept of the biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 1061–1070.
- Charrier, T., Durand, M., Jouanneau, S., Dion, M., and Perneti, M. (2011b). A multi-channel bioluminescent bacterial biosensor for the on-line detection of metals and toxicity. Part I : design and optimization of bioluminescent bacterial strains. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 1051–1060.
- Châtel, a, Hamer, B., Talarmin, H., Dorange, G., Schröder, H.C., and Müller, W.E.G. (2010). Activation of MAP kinase signaling pathway in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as biomarker of environmental pollution. *Aquatic Toxicology* **96**, 247–255.
- Chebbo, G. (1992). Solides des rejets pluviaux urbains, caractérisation et traitabilité, Thèse de doctorat, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées (Marne la Vallée).

- Chebbo, G., Bachoc, A., Laplace, D., and Le Guennec, B. (1995). The transfer of solids in combined sewer networks. *Water Science and Technology* **31**, 95–105.
- Chocat, B. (1997). Encyclopédie de l'hydrologie urbaine et de l'assainissement. Editions Tech & Doc Lavoisier (Paris).
- Choi, C.J., Berges, J. a, and Young, E.B. (2012). Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: variable responses among freshwater microalgae. *Water Research* **46**, 2615–2626.
- Chouteau, C. (2004). Développement d'un biocapteur conductimétrique bi-enzymatique à cellules algales. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- Chouteau, C., Dzyadevych, S., Chovelon, J.-M., and Durrieu, C. (2004). Development of novel conductometric biosensors based on immobilised whole cell *Chlorella vulgaris* microalgae. *Biosensors & Bioelectronics* **19**, 1089–1096.
- Chouteau, C., Dzyadevych, S., Durrieu, C., and Chovelon, J. (2005). A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples. *Biosensors & Bioelectronics* **21**, 273–281.
- CITEPA (2012). Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France. Séries sectorielles et analyses étendues.
- Clark, L.C., and Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences* **102**, 29–45.
- CNRS (2000). L'eau douce, une ressource précieuse. Délégation à l'information scientifique et technique du CNRS, document électronique, <http://www.cnrs.fr/cw/dossiers/douseau/accueil.html>
- Conseil général du Rhône - Service agriculture et environnement (2009). Schéma d'Aménagement et de Gestion des Eaux de l'Est lyonnais.
- Constant, A. (1995). Evaluation de la pollution des eaux de ruissellement du boulevard périphérique parisien. *TSM* 809–810.
- Cornish-Bowden, A., Jamin, M., and Saks, V. (2005). Cinétique enzymatique, Editions EDP Sciences, collection Grenoble Sciences, pp. 463.
- Corsi, S.R., Harwell, G.R., Geis, S.W., and Bergman, D. (2006). Impacts of aircraft deicer and anti-icer runoff on receiving waters from Dallas/Fort Worth international airport, Texas, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 2890.
- Cortés-Lorenzo, C., Rodríguez-Díaz, M., López-Lopez, C., Sánchez-Peinado, M., Rodelas, B., and González-López, J. (2012). Effect of salinity on enzymatic activities in a submerged fixed bed biofilm reactor for municipal sewage treatment. *Bioresource Technology* **121**, 312–319.

Cosnier, S., Senillou, A., Gra, M., Comte, P., Vlachopoulos, N., Jaffrezic, N., and Martelet, C. (1999). A glucose biosensor based on enzyme entrapment within polypyrrole films electrodeposited on mesoporous titanium dioxide. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **469**, 176–181.

Cournoyer, B., and Perrodin, Y. (2009). Rejets urbains, risques sanitaires et écologiques. Actes du congrès : *4e Journée technique de l'OTHU, Lyon*.

CSTEE (2001). EC Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment, Opinion on the results of the Risk Assessment of: 4-NONYLPHENOL (Branched) AND NONYLPHENOL - Report version (Human Health effects): November 2000. *Opinion expressed at the 22nd CSTEE plenary meeting, Brussels, 6/7 March 2001*.

Dambre, D. (2011). Miniaturisation d'un biocapteur pour le contrôle *in situ* de la qualité des milieux aquatiques. Travail de fin d'études, Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat (Vaulx-en-Velin).

Daouk, T. (2011). Effets de contaminations d'embryons et d'adultes de poissons zèbres (*Danio rerio*) par des PCB et des HAP. Thèse de doctorat, Université de la Rochelle.

Darder, M., Aranda, P., Burgos-Asperilla, L., Llobera, A., Cadarso, V.J., Fernández-Sánchez, C., and Ruiz-Hitzky, E. (2010). Algae-silica systems as functional hybrid materials. *Journal of Materials Chemistry* **20**, 9362.

Datry, T. (2003). Urbanisation et qualité des nappes phréatiques - Réponses des écosystèmes aquatiques souterrains aux pratiques d'infiltration d'eau pluviale. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1.

Davis, A.P., Shokouhian, M., and Ni, S. (2001). Loading estimates of lead, copper, cadmium, and zinc in urban runoff from specific sources. *Chemosphere* **44**, 997–1009.

De Reviere, B. (2002). Biologie et phylogénie des algues, Tome 1, Editions Belin, pp. 351.

Dembélé, A. (2010). MES, DCO et polluants prioritaires des rejets urbains de temps de pluie: mesure et modélisation des flux événementiels. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.

Desbordes, M., and Hémain, J.. (1990). Further Research Needs for Impact Estimates of Urban Storm Water Pollution. *Water Science & Technology* **22**, 9–14.

Drapper, D., Tomlinson, R., and Williams, P. (2000). Pollutants concentrations in road runoff: southeast queensland case study. *Journal of Environmental Engineering* **126**, 313–320.

Dujardin, C. (2011). Développement de protocoles de mesures d'activités enzymatiques d'algues unicellulaires: des bio-marqueurs de pollution des milieux aquatiques. Travail de fin d'études, Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat (Vaulx-en-Velin).

Durand, C. (2003). Caractérisation physico-chimique des produits de l'assainissement pluvial. Origine et devenir des métaux traces et des polluants organiques. Thèse de doctorat, Université de Poitiers.

- Durrieu, C., Badreddine, I., and Daix, C. (2003). A dialysis system with phytoplankton for monitoring chemical pollution in freshwater ecosystems by alkaline phosphatase assay. *Journal of Applied Phycology* 289–295.
- Durrieu, C., Chovelon, J.M., Barthet, L., Chouteau, C., and Védrine, C. (2006). Algal biosensors for aquatic ecosystems monitoring. *The European Physical Journal Applied Physics* 205–209.
- Durrieu, C., Guedri, H., Fremion, F., and Volatier, L. (2011). Unicellular algae used as biosensors for chemical detection in Mediterranean lagoon and coastal waters. *Research in Microbiology* **162**, 908–914.
- Durrieu, C., Guedri, H., Gaillard, I., Hammada, M., and Chouteau, C. (2010). Impact d’eaux de ruissellement de chaussées sur le métabolisme d’algues unicellulaires. Actes du congrès : *Novatech, techniques et stratégies durables pour la gestion des eaux urbaines par temps de pluie*, (Lyon, France)
- Durrieu, C., and Tran-Minh, C. (2002). Optical Algal Biosensor using Alkaline Phosphatase for Determination of Heavy Metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **51**, 206–209.
- Dwight, R.H., Catlin, S.N., and Fernandez, L.M. (2012). Amounts and distribution of recreational beach expenditures in southern California. *Ocean & Coastal Management* **59**, 13–19.
- Dzyadevych, S., Shul’ga, A.A., and Patskovsky, S. V (1994). Thin film conductometric sensors for enzyme biotransducers. *Russian Journal of Electrochemistry* **30**, 987–991.
- Ellis, J.B. (2000). Risk assessment approaches for ecosystem responses to transient pollution events in urban receiving waters. *Chemosphere* **41**, 85–91.
- Eltzov, E., and Marks, R.S. (2011). Whole-cell aquatic biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **400**, 895–913.
- Even, S., Poulin, M., Mouchel, J.-M., Seidl, M., and Servais, P. (2004). Modelling oxygen deficits in the Seine River downstream of combined sewer overflows. *Ecological Modelling* **173**, 177–196.
- Ferro, Y., and Durrieu, C. (2012). Impacts De Rejets Urbains Par Temps De Pluie Sur Le Métabolisme d’Algues Unicellulaires. Actes du congrès : *Polluants Émergents: Quels Défis Pour Une Meilleure Gestion De L’eau ?*, Ecole des Mines de Nantes, 1^{er} et 2 février 2012, Nantes, France
- Ferro, Y., Perullini, M., Jobbagy, M., Bilmes, S., and Durrieu, C. (2012). Development of a Biosensor for Environmental Monitoring Based on Microalgae Immobilized in Silica Hydrogels. *Sensors (Basel, Switzerland)* **12**, 16879–16891.
- Foulquier, A., Malard, F., Mermillod-Blondin, F., Datry, T., Simon, L., Montuelle, B., and Gibert, J. (2009). Vertical change in dissolved organic carbon and oxygen at the water table region of an aquifer recharged with stormwater: biological uptake or mixing? *Biogeochemistry* **99**, 31–47.

- Foulquier, A., Malard, F., Mermillod-Blondin, F., Montuelle, B., Dolédec, S., Volat, B., and Gibert, J. (2011). Surface Water Linkages Regulate Trophic Interactions in a Groundwater Food Web. *Ecosystems* **14**, 1339–1353.
- Gast, H., Suykerbuyk, R.E., and Roijackers, R.M. (1990). Urban Storm Water Discharges: Effects upon Plankton Communities. *Water Science & Technology* **22**, 155–162.
- Geldreich, E.E., Best, L.C., Kenner, B.A., and Van Donsel, D.J. (1968). The bacteriological aspects of stormwater pollution. *Journal (Water Pollution Control Federation)* **40**, 1861–1872.
- Geldreich, E.E., and Kenner, B.A. (1969). Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *Journal (Water Pollution Control Federation)* **41**, 336–352.
- Gersberg, R.M., Daft, D., and Yorkey, D. (2004). Temporal pattern of toxicity in runoff from the Tijuana River Watershed. *Water Research* **38**, 559–568.
- Gilbert, L., Jenkins, A.T.A., Browning, S., and Hart, J.P. (2011). Development of an amperometric, screen-printed, single-enzyme phosphate ion biosensor and its application to the analysis of biomedical and environmental samples. *Sensors and Actuators B: Chemical* **160**, 1322–1327.
- Gilbin, R. (2001). Caractérisation de l'exposition des écosystèmes aquatiques à des produits phytosanitaires : spéciation, biodisponibilité et toxicité. Thèse de doctorat, Université Montpellier I; Université de Genève.
- Gnecco, I., Berretta, C., Lanza, L.G., and La Barbera, P. (2004). Storm water pollution in the urban environment of Genoa, Italy. *Atmospheric Research* **77**, 60–73.
- Göbel, P., Dierkes, C., and Coldewey, W.G. (2007). Storm water runoff concentration matrix for urban areas. *Journal of Contaminant Hydrology* **91**, 26–42.
- Gonçalves, A., Rocher, V., and Pichon, S. (2009). Qualité bactériologique des eaux de la région parisienne. De l'eau d'égout au milieu récepteur. *TSM* **3**, 1–12.
- González-Sánchez, M.I., Rubio-Retama, J., López-Cabarcos, E., and Valero, E. (2011). Development of an acetaminophen amperometric biosensor based on peroxidase entrapped in polyacrylamide microgels. *Biosensors & Bioelectronics* **26**, 1883–1889.
- Gorman, D.S., and Levine, R.P. (1965). Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **54**, 1665–1669.
- Gotoh, T., Matsushima, K., and Kikuchi, K.-I. (2004). Preparation of alginate–chitosan hybrid gel beads and adsorption of divalent metal ions. *Chemosphere* **55**, 135–140.
- Gourlay, C. (2004). Biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les écosystèmes aquatiques : influence de la matière organique naturelle et anthropique. Thèse de doctorat, Ecole Nationale du Génie Rural, des Eaux et Forêts (Nancy).

- Grand-Lyon (2008). Guide pratique aménagement et eaux pluviales, Editions du Grand Lyon.
- Grapentine, L., Rochfort, Q., and Marsalek, J. (2004). Benthic Responses to Wet-Weather Discharges in Urban Streams in Southern Ontario. *Water Qual. Res. J. Canada* **39**, 374–391.
- 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.
- Gromaire, M.C. (1998). La pollution des eaux pluviales urbaines en réseau d'assainissement unitaire : caractéristiques et origines. Thèse de doctorat, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées (Marne la Vallée).
- Gromaire, M.C., Garnaud, S., Gonzalez, A., Chebbo, G., and BreLOT, E. (1999). Characterisation of urban runoff pollution in Paris. *Water Science & Technology* **39**, 1–8.
- Gromaire, M.C., Garnaud, S., Saad, M., and Chebbo, G. (2001). Contribution of different sources to the pollution of wet weather flows in combined sewers. *Water Research* **35**, 521–533.
- Grynkiewicz, M. (2003). Pesticides in precipitation from an urban region in Poland between 1998 and 2000. *Water Air and Soil Pollution* **149**, 3–16.
- Guedri, H. (2010). Mise au point de biocapteurs basés sur la mesure d'activités enzymatiques de cellules algales pour la surveillance des milieux aquatiques. Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.
- Guedri, H., and Durrieu, C. (2008). A self-assembled monolayers based conductometric algal whole cell biosensor for water monitoring. *Microchimica Acta* **163**, 179–184.
- Guedri, H., and Durrieu, C. (2009). Development of a conductometric algal whole cells biosensor for phosphate monitoring. *Sensor Letters* **7**, 788–794.
- Guenther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H., and Raecker, T. (2002). Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environmental Science & Technology* **36**, 1676–1680.
- Gupta, K., and Saul, A. (1996). Suspended solids in combined sewer flows. *Water Science & Technology* **33**, 93–99.
- Gupta, R., and Chaudhury, N.K. (2007). Entrapment of biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: problems and future prospects. *Biosensors & Bioelectronics* **22**, 2387–2399.
- Hadjoudja, S., Vignoles, C., Deluchat, V., Lenain, J.-F., Le Jeune, A.-H., and Baudu, M. (2009). Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* using flow cytometry. *Aquatic Toxicology* **94**, 255–264.
- Hall, K., McCallum, D., Lee, K., and MacDonald, R. (1998). Characterization and aquatic impacts of combined sewer overflows in Greater Vancouver. British Columbia. *Water Science and Technology* **38**, 9–14.

- Harremoës, P. (1982). Immediate and delayed oxygen depletion in rivers. *Water Research* **16**, 1093–1098.
- Hart, W.C., and Waller, D.H. (1993). Contribution of urban runoff to bacteriological contamination of a suburban recreational lake. In *Proceedings of the 6th International Conference on Urban Storm Drainage, Niagara Falls*, pp. 212–217.
- Hatch, A.C., and Burton, A.J. (1999). Sediment toxicity and stormwater runoff in a contaminated receiving system: consideration of different bioassays in the laboratory and field. *Chemosphere* **39**, 1001–1017.
- Hendji, A.M.N., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Clechet, P., Shlu'ga, A.A., Strikha, V.I., Netchiporuk, L.I., Soldatkin, A.P., and Wlodarski, W.B. (1993). Sensitive detection of pesticides using a differential ISFET-based system with immobilized cholinesterases. *Analytica Chimica Acta* **281**, 3–11.
- Hnaïen, M., Lagarde, F., Bausells, J., Errachid, A., and Jaffrezic-Renault, N. (2011). A new bacterial biosensor for trichloroethylene detection based on a three-dimensional carbon nanotubes bioarchitecture. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **400**, 1083–1092.
- Huang, T.S., Tzeng, Y., Liu, Y.K., Chen, Y.C., Walker, K.R., Guntupalli, R., and Liu, C. (2004). Immobilization of antibodies and bacterial binding on nanodiamond and carbon nanotubes for biosensor applications. *Diamond and Related Materials* **13**, 1098–1102.
- Huntley, S., Ianuzzi, T., Avantaggio, J., Carlson-Lynch, H., Schmidt, C., and Finley, B. (1997). Combined sewer overflows (CSOs) as sources of sediment contamination in the lower Passaic River, New Jersey. II. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls. *Chemosphere* **34**, 233–250.
- Hvitved-Jacobsen, T. (1982). The impact of combined sewer overflows on the dissolved oxygen concentration of a river. *Water Research* **16**, 1099–1105.
- Hwang, H.-M., and Foster, G.D. (2006). Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban stormwater runoff flowing into the tidal Anacostia River, Washington, DC, USA. *Environmental Pollution* **140**, 416–426.
- Ianuzzi, T., Huntley, S., Schmidt, C., Finley, B., McNutt, R., and Burton, S. (1997). Combined sewer overflows (CSOs) as sources of sediment contamination in the lower Passaic river, New Jersey. I. Priority pollutants and inorganic chemicals. *Chemosphere* **34**, 213–231.
- INERIS (2007). Données technico-économiques sur les substances chimiques en France - Trifluraline.
- Institut français de l'environnement (2008). Les services publics de l'assainissement en 2004. Les dossiers de L'IFEN, **30**.
- Irvine, K.N., Perrelli, M.F., McCorkhill, G., and Caruso, J. (2005). Sampling and modeling approaches to assess water quality impacts of combined sewer overflows. The importance of a watershed perspective. *Journal of Great Lakes Researches* **31**, 105–115.

- Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Chevolot, Y., and Cloarec, J.-P. (2007). Biosensors and bio-bar code assays based on biofunctionalized magnetic microbeads. *Sensors (Basel, Switzerland)* **7**, 589–614.
- Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., and Clechet, P. (1994). Capteurs chimiques et biochimiques. *Techniques de l'ingénieur. Analyse et caractérisation* **10**, P360R420.1–P360R420.20.
- Jobling, S., Coey, S., Whitmore, J.G., Kime, D.E., Look, K.J.W. Van, Mcallister, B.G., Beresford, N., Henshaw, A.C., Brighty, G., Tyler, C.R., et al. (2002). Wild intersex roach (*Rutilus rutilus*) have reduced fertility 1. *Biology of Reproduction* **67**, 515–524.
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M.G., and Sumpter, J.P. (1995). A variety of environmentally persistent chemicals, including some phtalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environmental Health Perspectives* **103**, 582–587.
- Jobling, S., Sheahan, D., Osborne, J. A., Matthiessen, P., Sumpter, J.P., and Sheanan, D. (1996). Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**, 194–202.
- Jongman, R.H.G., Ter Braak, C.J.F., and Van Tongeren, O.F.R. (1987). Data analysis in community and landscape ecology (Pudoc Wageningen).
- Joshi, R., Janagama, H., Dwivedi, H.P., Senthil Kumar, T.M. a, Jaykus, L.-A., Schefers, J., and Sreevatsan, S. (2009). Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of Salmonella *Enterica serovars*. *Molecular and Cellular Probes* **23**, 20–28.
- Jung, S., Arnaud, F., Bonté, P., Chebbo, G., Lorgeoux, C., Winiarski, T., and Tassin, B. (2008). Temporal evolution of urban wet weather pollution: analysis of PCB and PAH in sediment cores from Lake Bourget, France. *Water Science & Technology* **57**, 1503–1510.
- Kamath, K.R., and Park, K. (1993). Biodegradable hydrogels in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **11**, 59–84.
- Kleo, K., Schäfer, D., Klar, S., Jacob, D., Grunow, R., and Lisdat, F. (2012). Immunodetection of inactivated Francisella tularensis bacteria by using a quartz crystal microbalance with dissipation monitoring. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **404**, 843–851.
- Komínková, D., Stránský, D., St'astná, G., Caletková, J., Nabelková, J., and Handová, Z. (2005). Identification of ecological status of stream impacted by urban drainage. *Water Science & Technology* **51**, 249–256.
- Krejci, V., Dauber, L., Novak, B., & Gujer, W. (1987, August). Contribution of different sources to pollutant loads in combined sewers. Proceeding of: *4ème conférence internationale «Urban Storm Drainage», Lausanne* (Vol. 31, pp. 34-39).

- Kreutzberger, W.A., Race, R.A., Meinholz, T.L., Harper, M., and Ibach, J. (1980). Impact of Sediments on Dissolved Oxygen Concentrations following Combined Sewer Overflows. *Journal (Water Pollution Control Federation)* **52**, 192–201.
- Kueh, C.S.W., and Lam, J.Y.C. (2008). Monitoring of toxic substances in the Hong Kong marine environment. *Marine Pollution Bulletin* **57**, 744–757.
- Kumlanghan, A., Kanatharana, P., and Asawatreratanakul, P. (2008). Microbial BOD sensor for monitoring treatment of wastewater from a rubber latex industry. *Enzyme and Microbial Technology* **42**, 483–491.
- Lagarde, F., and Jaffrezic-Renault, N. (2011). Cell-based electrochemical biosensors for water quality assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **400**, 947–964.
- Lamprea-Maldonado, D.K. (2009). Origine de la pollution en milieu urbain : quantification des sources de polluants dans les eaux et sédiments. Thèse de doctorat, Université de Nantes.
- Lan, W., Chen, G., Cui, F., Tan, F., Liu, R., and Yushupujiang, M. (2012). Development of a novel optical biosensor for detection of organophosphorus pesticides based on methyl parathion hydrolase immobilized by metal-chelate affinity. *Sensors (Basel, Switzerland)* **12**, 8477–8490.
- Lanyon, Y.H., Tothill, I.E., and Mascini, M. (2006). An Amperometric Bacterial Biosensor Based on Gold Screen-Printed Electrodes for the Detection of Benzene. *Analytical Letters* **39**, 1669–1681.
- Lawrence, B., Alagumanikumar, N., Prithivikumar, N., Jeyakumar, N., Ramadas, V., and Natarajan, B. (2013). Effect of surface modification on the porous silicon infiltrated with biomolecules. *Applied Surface Science* **264**, 767–771.
- Leblanc, J. (2004). Etude de l'alimentation totale française. Mycotoxines, minéraux et éléments traces, rapport de l'INRA, pp. 72.
- Ledford, H.K., and Niyogi, K.K. (2005). Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant, Cell and Environment* **28**, 1037–1045.
- Lee, J. (2000). Characterization of urban stormwater runoff. *Water Research* **34**, 1773–1780.
- Lee, K., and Heo, T.-R. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in stimulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 869–873.
- Lee, S., Kim, K.B., and Kim, Y. Il (2012). Mass sensitivity calculation of the protein layer using love wave SAW biosensor. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **12**, 6107–6112.
- Lee, S.M., Min, K.D., Woo, N.C., Kim, Y.J., and Ahn, C.H. (2003). Statistical models for the assessment of nitrate contamination in urban groundwater using GIS. *Environmental Geology* **44**, 210–221.

- Legret, M. (2001). Pollution et impact d'eaux de ruissellement de chaussées, Editions du LCPC (Paris).
- Lehmann, M., Chan, C., Lo, A., Lung, M., Tag, K., Kunze, G., Riedel, K., Gruendig, B., and Renneberg, R. (1999). Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adenivorans* for a microbial sensor immobilized with poly (carbamoyl) sulfonate (PCS) Part II: application of the novel biosensor to real samples from coastal and island region. *Biosensors & Bioelectronics* **14**, 295–302.
- Lehmann, M., Riedel, K., Adler, K., and Kunze, G. (2000). Amperometric measurement of copper ions with a deputy substrate using a novel *Saccharomyces cerevisiae* sensor. *Biosensors & Bioelectronics* **15**, 211–219.
- Lei, Y., Chen, W., and Mulchandani, A. (2006). Microbial biosensors. *Analytica Chimica Acta* **568**, 200–210.
- Lei, Y., Mulchandani, P., Chen, W., Wang, J., and Mulchandani, A. (2004). *Arthrobacter* sp. JS443-based whole cell amperometric biosensor for p-nitrophenol. *Electroanalysis* **16**, 2030–2034.
- Linden, G., Chappellettoro, M., and Lazdunski, M. (1977). Milk alkaline phosphatase. Stimulation by Mg²⁺ and properties of the Mg²⁺ site. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **483**, 100–106.
- Liu, J., and Mattiasson, B. (2002). Microbial BOD sensors for wastewater analysis. *Water Research* **36**, 3786–3802.
- Luch, A., Greim, H., Buters, J.T.M., Mahadevan, B., Baird, W.M., Doehmer, J., Seidel, A., and Glatt, H. (2002). The Role of Cytochrome P450 1B1 in Dibenzo[a,l]pyrene-induced Carcinogenesis. *Polycyclic Aromatic Compounds* **22**, 781–789.
- Marsalek, J., Rochfort, Q., Mayer, T., Servos, M., Dutka, B., and Brownlee, B. (1999). Toxicity testing for controlling urban wet-weather pollution: advantages and limitations. *Urban Water* **1**, 91–103.
- Marty, J., Olive, D., and Asano, Y. (1997). Measurement of BOD: correlation between 5-day BOD and commercial BOD biosensor values. *Environmental Technology* **12**, 333–337.
- McCarthy, S.D., Rafferty, S.P., and Frost, P.C. (2010). Responses of alkaline phosphatase activity to phosphorus stress in *Daphnia magna*. *J Exp Biol* **213**, 256–261.
- McGrath, T.F., Elliott, C.T., and Fodey, T.L. (2012). Biosensors for the analysis of microbiological and chemical contaminants in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **403**, 75–92.
- MEDD, et Agences de l'eau (2003). Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau - Grilles d'évaluation SEQ-Eau (Version 2).

- Melegari, S.P., Perreault, F., Moukha, S., Popovic, R., Creppy, E.E., and Matias, W.G. (2012). Induction to oxidative stress by saxitoxin investigated through lipid peroxidation in Neuro 2A cells and *Chlamydomonas reinhardtii* alga. *Chemosphere* **89**, 38–43.
- Miao, Y., Chia, L., Goh, N., and Tan, S. (2001). Amperometric glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in chitosan matrix cross-linked with glutaraldehyde. *Electroanalysis* **13**, 347–249.
- Ministère de l'écologie et du développement durable (2007). Circulaire du 07/05/07 définissant les “normes de qualité environnementale provisoires (NQE_p)” des 41 substances impliquées dans l'évaluation de l'état chimique des masses d'eau ainsi que des substances pertinentes du programme national de réduction des substances dangereuses dans l'eau.
- Miquel, G. (2001). Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.
- Miquel, G. (2003). Rapport sur la qualité de l'eau et de l'assainissement en France. Office parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.
- Monod, R. (1978). Bilan des dix dernières années d'épuration dans le bassin du Léman. *TSM* 21–23.
- Morrisey, D.J., Turner, S.J., Mills, G.N., Williamson, R.B., and Wise, B.E. (2003). Factors affecting the distribution of benthic macrofauna in estuaries contaminated by urban runoff. *Marine Environmental Research* **55**, 113–136.
- Motelay-Massei, a, Garban, B., Tiphagne-larcher, K., Chevreuil, M., and Ollivon, D. (2006). Mass balance for polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban watershed of Le Havre (France): transport and fate of PAHs from the atmosphere to the outlet. *Water Research* **40**, 1995–2006.
- Mullis, R., Revitt, D.M., and Shutes, R.B.E. (1997). The impacts of discharges from two combined sewer overflows on the water quality of an urban watercourse. *Water Science & Technology* **36**, 195–199.
- Mullis, R., B Ellis, J., M Revitt, D., and E Shutes, R.B. (1994). An Evaluation of the Toxic Influences on *Asellus Aquaticus* (L) in an Urban Stream Environment. *Water Science & Technology* **9**, 199–207.
- Mullis, R.M., Revitt, D.M., and Shutes, R.B.E. (1996). A statistical approach for the assessment of the toxic influences on *Gammarus pulex* (Amphipoda) and *Asellus aquaticus* (Isopoda) exposed to urban aquatic discharges. *Water Research* **30**, 1237–1243.
- Naessens, M., Leclerc, J.-C., and Tran-Minh, C. (2000). Fiber optic biosensor using *Chlorella vulgaris* for determination of toxic compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **46**, 181–185.
- Narang, J., Chauhan, N., Singh, A., and Pundir, C.S. (2011). A nylon membrane based amperometric biosensor for polyphenol determination. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **72**, 276–281.

- Newall, P., and Walsh, C.J. (2005). Response of epilithic diatom assemblages to urbanization influences. *Hydrobiologia* **532**, 53–67.
- Ngabe, B., Bidleman, T.F., and Scott, G.I. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in storm runoff from urban and coastal South Carolina. *The Science of the Total Environment* **255**, 1–9.
- Nguyen-Ngoc, H., Durrieu, C., and Tran-Minh, C. (2009). Synchronous-scan fluorescence of algal cells for toxicity assessment of heavy metals and herbicides. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72**, 316–320.
- Nguyen-Ngoc, H., and Tran-Minh, C. (2007). Fluorescent biosensor using whole cells in an inorganic translucent matrix. *Analytica Chimica Acta* **583**, 161–165.
- Nygaard, G., Komarek, J., Kristiansen, J., and Skulberg, O.L. (1986). Taxonomic designations of the bioassay algal NIVA-CHL1 (*Selenastrum capricornutum*) and some related strains. *Opera Botanica* **90**, 1–46.
- Ohno, R., Ohnuki, H., Wang, H., Yokoyama, T., Endo, H., Tsuya, D., and Izumi, M. (2013). Electrochemical impedance spectroscopy biosensor with interdigitated electrode for detection of human immunoglobulin A. *Biosensors & Bioelectronics* **40**, 422–426.
- Olivieri, V.P., Kawata, K., and Say-Hua, L. (1989). Microbiological impacts of storm sewer overflows : some aspects of the implication of microbiological indicators for receiving waters. *Urban Discharges and Receiving Water Quality Impacts* (London).
- Osaka, T., Matsunaga, T., Nakanishi, T., Arakaki, A., Niwa, D., and Iida, H. (2006). Synthesis of magnetic nanoparticles and their application to bioassays. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **384**, 593–600.
- Osbild, D., Babut, M., and Vasseur, P. (1995). Les biocapteurs appliqués au contrôle des eaux : Revue - État de l'art. *Revue des Sciences de l'Eau/Journal of Water Science* **8**, 505–538.
- OSPAR Commission (2001). Nonylphenol / Nonylphenoethoxylates. Hazardous substances series, pp. 20.
- Ouerghi, O., Touhami, A., Jaffrezic-Renault, N., Martelet, C., Ouada, H. Ben, and Cosnier, S. (2002). Impedimetric immunosensor using avidin-biotin for antibody immobilization. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)* **56**, 131–133.
- Pallerla, S., and Chambers, R.P. (1997). Characterization of a Ca-Alginate-immobilized *Trametes versicolor* bioreactor for decolorization and AOX reduction of paper mill effluents. *Bioresource Technology* **60**, 1–8.
- Palma, P., Palma, V.L., Fernandes, R.M., Soares, A.M.V.M., and Barbosa, I.R. (2008). Acute toxicity of atrazine, endosulfan sulphate and chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, relative to their concentrations in surface waters from the Alentejo region of Portugal. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **81**, 485–489.

Paniel, N., Radoi, A., and Marty, J.-L. (2010). Development of an electrochemical biosensor for the detection of aflatoxin M1 in milk. *Sensors (Basel, Switzerland)* **10**, 9439–9448.

Parent-Raoult, C. (2004). Etude en systèmes artificiels de laboratoire des effets de Rejets Urbains de Temps de Pluie sur les communautés périphytiques: influence de facteurs d'exposition. Thèse de doctorat, Université Claude Bernard Lyon 1.

Parent-Raoult, C., and Boisson, J.C. (2007). Impacts des rejets urbains de temps de pluie (RUTP) sur les milieux aquatiques : État des connaissances. *Revue des Sciences de l'Eau/Journal of Water Science* **20**, 229–239.

Le parlement européen et le conseil de l'union européenne (2008). Directive 2008/105/CE du parlement européen et du conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementales dans le domaine de l'eau.

Payne, J.F., Fancey, L.L., Rahimtula, A.D., and Porter, E.L. (1987). Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **86**, 233–245.

Pedersen, E.R., and Perkins, M.A. (1986). The use of benthic invertebrate data for evaluating impacts of urban runoff. *Hydrobiologia* **139**, 13–22.

Pelmont, J. (1995). Enzymes : catalyseurs du monde vivant, Presses universitaires de Grenoble (Grenoble).

Peña-Vázquez, E., Maneiro, E., Pérez-Conde, C., Moreno-Bondi, M.C., and Costas, E. (2009). Microalgae fiber optic biosensors for herbicide monitoring using sol-gel technology. *Biosensors & Bioelectronics* **24**, 3538–3543.

Penders, E.J.M., Spengelink, A., Hoogenboezem, W., Rotteveel, S.G.P., Maas, J.L., and Alink, G.M. (2012). Genotoxic effects in the Eastern mudminnow (*Umbra pygmaea*) after prolonged exposure to River Rhine water, as assessed by use of the in vivo SCE and Comet assays. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **53**, 304–310.

Perrodin, Y., Donguy, G., Pandard, P., and Andres, S. (2010). Guide méthodologique pour l'évaluation des risques écologiques liés à la restauration de carrières de la zone littorale à l'aide de sédiments de dragage portuaires prétraités.

Perullini, M., Amoura, M., Roux, C., Coradin, T., Livage, J., Japas, M.L., Jobbágy, M., and Bilmes, S.A. (2011). Improving silica matrices for encapsulation of *Escherichiacoli* using osmoprotectors. *Journal of Materials Chemistry* **21**, 4546.

Perullini, M., Jobbágy, M., Moretti, M.B., Garcia, S.C., and Bilmes, S.A. (2008). Optimizing Silica Encapsulation of Living Cells: In Situ Evaluation of Cellular Stress. *Chemical Material* **20**, 3015–3021.

Perullini, M., Jobbágy, M., Soler-Illia, G.J.A.A., and Bilmes, S.A. (2005). Cell Growth at Cavities Created Inside Silica Monoliths Synthesized by Sol-Gel. *Chem. Mater.* **78**, 3806–3808.

- Pimentel, D., Acquay, H., Biltonen, M., Rice, P., Silva, M., Nelson, J., Lipner, S., Giordano, S., Horowitz, A., and D'Amore, M. (1993). Assessment of environmental and economic impacts of pesticide use. In *The Pesticide Question: Environment, Economics and Ethics*, D. Pimentel, and H. Lehman, eds. (NYC, New York USA: Routledge/Chapman and Hall), pp. 47–84.
- Pitt, R., Field, R., Lalor, M., and Brown, M. (1995). Urban stormwater toxic pollutants: assessment, sources, and treatability. *Water Environment Research* **67**, 16.
- Pitt, R., Maestre, A., and Morquecho, R. (2004). The National Stormwater Quality Database (NSQD, version 1.1).
- La Point, T.W., and Waller, W.T. (2000). Field assessments in conjunction with whole effluent toxicity testing. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 14–24.
- Pratt, J.M., Coler, R.A., and Godfrey, P.J. (1981). Ecological effects of urban stormwater runoff on benthic macroinvertebrates inhabiting the Green River, Massachusetts. *Hydrobiologia* **83**, 29–42.
- Qureshi, A. (1979). Microbiological studies on the quality of urban stormwater runoff in Southern Ontario, Canada. *Water Research* **13**, 977–985.
- Ramade, F. (2007). *Introduction à l'écotoxicologie: fondements et applications*, Editions Tech & Doc Lavoisier, (Paris).
- Ramanathan, K., and Danielsson, B. (2001). Principles and applications of thermal biosensors. *Biosensors & Bioelectronics* **16**, 417–423.
- Ranchet, J., Penaud, F., Le Grand, R., Constant, A., Obry, P., and Soudieu, B. (1993). Comparaison d'une chaussée pavée et d'une chaussée drainante du point de vue de leur comportement hydraulique et de leur impact sur la dépollution des eaux de pluie. *Bulletin de liaison des laboratoires des ponts et chaussés* **11**, 79–84.
- Rebillard, J.-P. (1989). Etude *in situ* de la variation de la fluorescence algale induite par le DCMU. Mémoire de DEA, Université de Metz.
- Regel, R.H., Ferris, J.M., Ganf, G.G., and Brookes, J.D. (2002). Algal esterase activity as a biomeasure of environmental degradation in a freshwater creek. *Aquatic Toxicology* **59**, 209–223.
- Regoli, F., and Principatob, G. (1995). Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic Toxicology* **31**, 143–164.
- Rochfort, Q., Grapentine, L., Marsalek, J., Brownlee, B., Reynoldson, Thompson, S., Milani, C., and Logan, D. (2000). Using benthic assessment techniques to determine combined sewer overflow and stormwater impacts in the aquatic ecosystem. *Water Qual. Res. J. Canada* **365–397**.

- Rogers, K.R., and Poziomek, E.J. (1996). Fiber optic sensors for environmental monitoring. *Chemosphere* **33**, 1151–1174.
- Roland, J.-C., El Maarouf-Bouteau, H., and Bouteau, F. (2008). Atlas biologie végétale, Editions Dunod (Paris).
- Rollin, C., Grange, D., and Chouteau, C. (2010). Evaluation de l'impact des rejets de déversoirs d'orage par analyse de la colonisation de substrats artificiels par la macrofaune benthique et les diatomées. Actes du congrès : *Collaboration entre collectivités et laboratoires de recherche autour de l'hydrologie urbaine. Intérêt, modalités, résultats. (Cité des Congrès-Nantes: Nantes métropole; LCPC)*, pp. 161–172.
- Rollin, C., and Quiot, F. (2006). Recommandations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines. Guide méthodologique.
- Rossi, L. (1998). Qualité des eaux de ruissellement urbaines. Thèse de doctorat, Ecole polytechnique fédérale de Lausanne.
- Rule, K.L., Comber, S.D.W., Ross, D., Thornton, a, Makropoulos, C.K., and Rautiu, R. (2006). Sources of priority substances entering an urban wastewater catchment--trace organic chemicals. *Chemosphere* **63**, 581–591.
- Samoura, C.A. (2004). Evaluation de la toxicité de mélanges de métaux (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn) sur l'algue d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata*. Thèse de doctorat, Université de Genève.
- Sansalone, J.J., and Buchberger, S.G. (1997). Partitioning and First Flush of Metals in Urban Roadway Storm Water. *Journal of Environmental Engineering* **123**, 134–143.
- Santiago, S., Becker van Slooten, K Chèvre, N., Pardos, M., Benninghoff, C., Dumas, M., Thybaud, E., and Garrivier, F. (2002). Guide pour l'utilisation des tests écotoxicologiques, avec les daphnies, les bactéries luminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement.
- Saporta, G. (2006). Probabilités, analyse des données et statistique, Editions Technip.
- Schaarup-Jensen, K., and Hvitved-Jacobsen, T. (1990). Dissolved Oxygen Stream Model for Combined Sewer Overflows. *Water Science & Technology* **22**, 137–146.
- Schiff, K., and Bay, S. (2003). Impacts of stormwater discharges on the nearshore benthic environment of Santa Monica Bay. *Marine Environmental Research* **56**, 225–243.
- Schiff, K., Bay, S., and Stransky, C. (2002). Characterization of stormwater toxicants from an urban watershed to freshwater and marine organisms. *Urban Water* **4**, 215–227.
- Seager, J., and Abrahams, R. (1990). The Impact of Storm Sewage Discharges on the Ecology of a Small Urban River. *Water Science & Technology* **22**, 163–171.
- Seager, J., and Maltby, L. (1989). Assessing the impact of episodic pollution. *Hydrobiologia* **188-189**, 633–640.

- Seidl, M., Huang, V., and Mouchel, J.M. (1998). Toxicity of combined sewer overflows on river phytoplankton: the role of heavy metals. *Environmental Pollution* 107–116.
- Shailaja, M.S., and D'Silva, C. (2003). Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere* **53**, 835–841.
- Simelevicius, D., Baronas, R., and Kulys, J. (2012). Modelling of amperometric biosensor used for synergistic substrates determination. *Sensors (Basel, Switzerland)* **12**, 4897–4917.
- Stachowski-haberkorn, S., Becker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Coroller, L., and De, D. (2008). Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. *Aquatic Toxicology* **89**, 232–241.
- Stein, E.D., Tiefenthaler, L.L., and Schiff, K. (2006). Watershed-based sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban storm water. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 373–385.
- Suárez, J., and Puertas, J. (2005). Determination of COD, BOD, and suspended solids loads during combined sewer overflow (CSO) events in some combined catchments in Spain. *Ecological Engineering* **24**, 199–217.
- Syndicat intercommunal du lac d'Annecy (1991). Suivi de la qualité du lac d'Annecy, rapport d'étude, dossier principal.
- Taylor, S.L., Roberts, S.C., Walsh, C.J., and Hatt, B.E. (2004). Catchment urbanisation and increased benthic algal biomass in streams: linking mechanisms to management. *Freshwater Biology* **49**, 835–851.
- Tekaya, N., Saiapina, O., Ben, H., and Lagarde, F. (2013). Ultra-sensitive conductometric detection of pesticides based on inhibition of esterase activity in *Arthrospira platensis*. *Environmental Pollution* **178**, 182–188.
- Tengberg, A., Hovdenes, J., Andersson, J.H., Brocandel, O., Diaz, R., and Hebert, D. (2006). Evaluation of a lifetime-based optode to measure oxygen in aquatic systems. *Limnology and Oceanography : Methods* **4**, 7–17.
- Thornton, I., Butler, D., Docx, P., Hession, M., Makropoulos, C., McMullen, M., Nieuwenhuijsen, M., Pitman, A., Rautiu, R., Sawyer, R., et al. (2001). Pollutants in urban waste water and sewage sludge. Final report prepared for European Commission Directorate-General Environment.
- Timur, S., Anik, U., Odaci, D., and Gorton, L. (2007). Development of a microbial biosensor based on carbon nanotube (CNT) modified electrodes. *Electrochemistry Communications* **9**, 1810–1815.
- Tissier, C., Morvan, C., Bocquené, G., Grossel, H., James, A., and Marchand, M. (2005). Les substances prioritaires de la directive cadre sur l'eau (DCE) - Fiches de synthèse.
- Varanasi, U. (1991). Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment (CRC Press, Inc.).

- Védrine, C., Leclerc, J.-C., Durrieu, C., and Tran-Minh, C. (2003). Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. *Biosensors & Bioelectronics* **18**, 457–463.
- Vijaya, Y., Popuri, S.R., Boddu, V.M., and Krishnaiah, a. (2008). Modified chitosan and calcium alginate biopolymer sorbents for removal of nickel (II) through adsorption. *Carbohydrate Polymers* **72**, 261–271.
- Villalobos, P., Acevedo, C.A., and Valde, E. (2010). A BOD monitoring disposable reactor with alginate-entrapped bacteria. *Biosystems Engineering* 961–970.
- Villarroel, M.J., Sancho, E., Ferrando, M.D., and Andreu, E. (2003). Acute, chronic and sublethal effects of the herbicide propanil on *Daphnia magna*. *Chemosphere* **53**, 857–864.
- Wagner, A., and Geiger, W. (1996). New criteria for stormwater discharges into urban streams. *Water Science & Technology* **34**, 41–48.
- Wakida, F.T., and Lerner, D.N. (2005). Non-agricultural sources of groundwater nitrate: a review and case study. *Water Research* **39**, 3–16.
- Walsh, C.. (2000). Urban impacts on the ecology of receiving waters: a framework for assessment, conservation and restoration. *Hydrobiologia* **431**, 107–114.
- Wan, K., Chovelon, J.M., and Jaffrezic-Renault, N. (2000). Enzyme-octadecylamine Langmuir-Blodgett membranes for ENFET biosensors. *Talanta* **52**, 663–670.
- Wang, G., Gang, X., Zhou, X., Zhang, G., Huang, H., Zhang, X., and Wang, L. (2013). Electrochemical immunosensor with graphene/gold nanoparticles platform and ferrocene derivatives label. *Talanta* **103**, 75–80.
- Wang, Y.-X., Ye, Z.-Z., Si, C.-Y., and Ying, Y.-B. (2012). Application of Aptamer Based Biosensors for Detection of Pathogenic Microorganisms. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **40**, 634–642.
- Weitz, H.J., Campbell, C.D., and Killham, K. (2002). Development of a novel, bioluminescence-based, fungal bioassay for toxicity testing. *Environmental Microbiology* **4**, 422–429.
- Van der Werf, H.M.G. (1996). Assessing the impact of pesticides on the environment. Agriculture, *Ecosystems and Environment* **60**, 81–96.
- Willemsen, G., Gast, H., Franken, R.O., and Cuppen, J.G. (1990). Urban Storm Water Discharges: Effects upon Communities of Sessile Diatoms and Macro-Invertebrates. *Water Science & Technology* **22**, 147–154.
- Xanthopoulos, C., and Hahn, H. (1993). Anthropogenic pollutants wash-off from street surfaces. In Proceedings of: *the 6th International Conference on Urban Storm Drainage, Niagara Falls*, pp. 417 – 422.

Xia, W., Li, Y., Wan, Y., Chen, T., Wei, J., Lin, Y., and Xu, S. (2010). Electrochemical biosensor for estrogenic substance using lipid bilayers modified by Au nanoparticles. *Biosensors & Bioelectronics* **25**, 2253–2258.

Xiao, C., and Luong, J.H.T. (2005). Assessment of cytotoxicity by emerging impedance spectroscopy. *Toxicology and Applied Pharmacology* **206**, 102–112.

Yakovleva, M., Buzas, O., Matsumura, H., Samejima, M., Igarashi, K., Larsson, P.-O., Gorton, L., and Danielsson, B. (2012). A novel combined thermometric and amperometric biosensor for lactose determination based on immobilised cellobiose dehydrogenase. *Biosensors & Bioelectronics* **31**, 251–256.

Zgheib, S. (2009). Flux et sources des polluants prioritaires dans les eaux urbaines en lien avec l'usage du territoire. Thèse de doctorat, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées.

Zhao, Y., Pang, D., Hu, S., and Wang, Z. (1999). DNA-modified electrodes; part 4: optimization of covalent immobilization of DNA on self-assembled monolayers. *Talanta* **49**, 751 – 756.

Annexes

Annexe I : Quelques biocapteurs pour les milieux aquatiques (Eltzov and Marks, 2011)

Table 2 Some proposed aquatic biosensors

Whole-cell organism	Target analyte	Minimum concentration	Reporter method	Reference
<i>Pseudomonas putida</i> (JS444)	Neurotoxic organophosphate	277 ppb	Amperometric	[91]
<i>Escherichia coli</i>	Cadmium	600 ppb	Amperometric	[93]
<i>Flavobacterium</i>	Organophosphates (paraxon)	0.01 mM	Amperometric	[96]
<i>Escherichia coli</i>	Penicillin	1 mM	Potentiometric	[98]
<i>Escherichia coli</i>	Penicillin	5 mM	Potentiometric	[99]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cu ²⁺	0.5 mM	Amperometric	[157]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Atrazine, DCMU, toluene, and benzene	2.0, 0.05, 1,550 and 3,000 µM	Amperometric	[174]
<i>Escherichia coli</i>	Benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene	10, 20, and 50 µM	Colorimetric	[134]
Bovine pulmonary artery endothelial cells and bovine lung microvessel endothelial cells	Pentachlorophenol	0.38 mM	Impedance sensing	[153]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Cd ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Pb ²⁺	1 ppb	Conductivity	[170]
	Zn ²⁺	10 ppb		
<i>Thiobacillus</i> (sulfur-oxidizing bacteria)	Heavy metal (chromium)	5 ppb	Conductivity	[102]
<i>Vibrio fischeri</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> 10568, <i>Escherichia coli</i> HB101, <i>Pseudomonas putida</i> TVAS, and <i>Escherichia coli</i> DH5a	Chlorinates	0.01 µM	Bioluminescence	[104]
<i>Escherichia coli</i>	Heavy metal ions Hg ²⁺ , As ²	74 mg/l (Hg) 58 mg/l (As)	Bioluminescence	[47]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EDC	20 µg/l	Bioluminescence	[160]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EDC	0.08 µg/l	Bioluminescence	[50]
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (A2)	Mitomycin C	0.1 mg/l	Bioluminescence	[107]
<i>Escherichia coli</i>	Mitomycin C	100 ppb	Bioluminescence	[41]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> HK44	Naphthalene and salicylate	1.2 and 0.5 mg/l	Bioluminescence	[109]
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Cu ²⁺	1 µM	Bioluminescence	[110]
<i>Escherichia coli</i> (GC2)	Hydrogen peroxide	0.88 mM	Bioluminescence	[112]
<i>Vibrio fischeri</i>	Dichlorophenols, trichlorophenols and tetrachlorophenols	1 mg/l	Bioluminescence	[116]
<i>Escherichia coli</i> (TV1061,DPD2794)	<i>p</i> -Chlorophenol, Mitomycin C	10 and 32 µg/l	Bioluminescence	[77]
<i>Escherichia coli</i>	Tributyltin	0.02 µM	Bioluminescence	[123]
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (A506)	Toluene Trichloroethylene	3.3±1.8 µM 35.6±16.6 µM	Fluorescence	[128]
<i>Escherichia coli</i>	Hg ⁺²	100 nM	Fluorescence	[130]
<i>Ralstonia metallidurans</i> (CH34)	Pb ²⁺	250 µM	Fluorescence	[131]
<i>Escherichia coli</i>	As	50 µg/l	Fluorescence	[132]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Herbicide	0.1 µg/l	Fluorescence	[180]
<i>Chlorella vulgaris</i>	Atrazine, simazine, isotroturon, and diuron	0.25, 0.5, 0.025, and 0.025 µg/l	Fluorescence	[181]

DCMU 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, EDC endocrine disruptive compounds

Annexe II : Normes de qualité environnementales

(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
N°	Nom de la substance	Numéro CAS (1)	NQE-MA (2) Eaux de surface intérieures (2)	NQE-MA (2) Autres eaux de surface	NQE CMA (3) Eaux de surface intérieures (3)	NQE CMA (3) Autres eaux de surface
(1)	Alachlore	15972-60-8	0,3	0,3	0,7	0,7
(2)	Anthracène	120-12-7	0,1	0,1	0,4	0,4
(3)	Atrazine	1912-24-9	0,6	0,6	2,0	2,0
(4)	Benzène	71-43-2	10	8	50	50
(5)	Diphényléthers bromés (2)	32534-81-9	0,0005	0,0002	sans objet	sans objet
(6)	Cadmium et ses composés (suivant les classes de dureté de l'eau) (4)	7440-43-9	≤ 0,08 (classe 1) 0,08 (classe 2) 0,09 (classe 3) 0,15 (classe 4) 0,25 (classe 5)	0,2	≤ 0,45 (classe 1) 0,45 (classe 2) 0,6 (classe 3) 0,9 (classe 4) 1,5 (classe 5)	≤ 0,45 (classe 1) 0,45 (classe 2) 0,6 (classe 3) 0,9 (classe 4) 1,5 (classe 5)
(6 bis)	Tétrachlorure de carbone (2)	56-23-5	12	12	sans objet	sans objet
(7)	Chloroalcane C10-13	85535-84-8	0,4	0,4	1,4	1,4
(8)	Chlorfenvinphos	470-90-6	0,1	0,1	0,3	0,3
(9)	Chlorpyrifos (éthylchlorpyrifos)	2921-88-2	0,03	0,03	0,1	0,1
(9 bis)	Pesticides cyclodienes: Aldrine (2) Dieldrine (2) Endrine (2) Isodrine (2)	309-00-2 60-57-1 72-20-8 465-73-6	Σ = 0,01	Σ = 0,005	sans objet	sans objet
(9 ter)	DDT total (2) (4) para-para-DDT (2)	sans objet 50-29-3	0,025 0,01	0,025 0,01	sans objet sans objet	sans objet sans objet
(10)	1,2-Dichloroéthane	107-06-2	10	10	sans objet	sans objet
(11)	Dichlorométhane	75-09-2	20	20	sans objet	sans objet
(12)	Di(2-éthylhexyl)phthalate (DEHP)	117-81-7	1,3	1,3	sans objet	sans objet
(13)	Diuron	330-54-1	0,2	0,2	1,8	1,8
(14)	Endosulfan	115-29-7	0,005	0,0005	0,01	0,004
(15)	Fluoranthène	206-44-0	0,1	0,1	1	1
(16)	Hexachlorobenzène	118-74-1	0,01 (2)	0,01 (2)	0,05	0,05
(17)	Hexachlorobutadiène	87-68-3	0,1 (2)	0,1 (2)	0,6	0,6
(18)	Hexachlorocyclohexane	608-73-1	0,02	0,002	0,04	0,02
(19)	Isoproturon	34123-59-6	0,3	0,3	1,0	1,0
(20)	Plomb et ses composés	7439-92-1	7,2	7,2	sans objet	sans objet
(21)	Mercure et ses composés	7439-97-6	0,05 (2)	0,05 (2)	0,07	0,07
(22)	Naphthalène	91-20-3	2,4	1,2	sans objet	sans objet
(23)	Nickel et ses composés	7440-02-0	20	20	sans objet	sans objet
(24)	Nonylphénol (4-nonylphénol)	104-40-5	0,3	0,3	2,0	2,0
(25)	Octylphénol (4-(1,1', 3,3' - tétraméthylbutyl)- phénol)	140-66-9	0,1	0,01	sans objet	sans objet
(26)	Pentachlorobenzène	608-93-5	0,007	0,0007	sans objet	sans objet
(27)	Pentachlorophénol	87-86-5	0,4	0,4	1	1
(28)	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (4) Benzo(a)pyrène Benzo(b)fluoranthène Benzo(k)fluoranthène Benzo(g,h,i)perylène Indeno(1,2,3-cd)pyrène	sans objet 50-32-8 205-99-2 207-08-9 191-24-2 193-39-5	sans objet 0,05 Σ = 0,03 Σ = 0,002 Σ = 0,002	sans objet 0,05 Σ = 0,03 Σ = 0,002 Σ = 0,002	sans objet 0,1 sans objet sans objet sans objet	sans objet 0,1 sans objet sans objet sans objet
(29)	Simazine	122-34-9	1	1	4	4
(29 bis)	Tétrachloroéthylène (2)	127-18-4	10	10	sans objet	sans objet
(29 ter)	Trichloroéthylène (2)	79-01-6	10	10	sans objet	sans objet
(30)	Composés du tributylétain (tributylétain- cation)	36643-28-4	0,0002	0,0002	0,0015	0,0015
(31)	Trichlorobenzènes	12002-48-1	0,4	0,4	sans objet	sans objet
(32)	Trichlorométhane	67-66-3	2,5	2,5	sans objet	sans objet
(33)	Trifluraline	1582-09-8	0,03	0,03	sans objet	sans objet

Annexe III : Milieu AFNOR LC

Les réactifs utilisés pour la préparation du milieu doivent être de pureté analytique reconnue et l'eau utilisée doit être de l'eau distillée stérile de conductivité inférieure ou égale à $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Préparation des solutions-mères (solutions stocks) :

Les solutions-mères suivantes peuvent être conservées à 4°C pendant une durée maximale d'un mois.

<i>Solution de base</i>	<i>Solution d'oligo-éléments</i>
<p style="text-align: center;"><u>Solution n°1</u></p> <p>Nitrate de calcium ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2,4\text{H}_2\text{O}$) 4 g</p> <p>Eau q.s.p 100 ml</p>	<p style="text-align: center;"><u>Solution n°5</u></p> <p>Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4,5\text{H}_2\text{O}$) 30 mg</p> <p>Heptamolybdate d'ammonium [(NH_4)$6\text{Mo}_7\text{O}_{24},4\text{H}_2\text{O}$] 60 mg</p> <p>Sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$) 60 mg</p> <p>Chlorure de cobalt ($\text{CoCl}_2,6\text{H}_2\text{O}$) 60 mg</p> <p>Nitrate de manganèse ($\text{Mn}(\text{NO}_3)_2,4\text{H}_2\text{O}$) 60 mg</p> <p>Acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2,\text{H}_2\text{O}$) 60 mg</p> <p>Acide borique (H_3BO_3) 60 mg</p> <p>Eau q.s.p. 1000 ml</p>
<p style="text-align: center;"><u>Solution n°2</u></p> <p>Nitrate de potassium (KNO_3) 4 g</p> <p>Eau q.s.p 100 ml</p>	
<p style="text-align: center;"><u>Solution n°3</u></p> <p>Sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$) 4 g</p> <p>Eau q.s.p 100 ml</p>	<p style="text-align: center;"><u>Solution n°6</u></p> <p>Citrate de fer (III) ($\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7,5\text{H}_2\text{O}$) 1,625 g</p> <p>Sulfate de fer (III) ($\text{FeSO}_4,7\text{H}_2\text{O}$) 0,625 g</p> <p>Chlorure de fer (III) ($\text{FeCl}_3,6\text{H}_2\text{O}$) 0,625 g</p> <p>Eau q.s.p. 1000 ml</p>

Préparation du milieu de culture et d'essai

Préparer le milieu de culture et d'essai en ajoutant successivement :

- Solution n°1 : 1 ml
- Solution n°2 : 1 ml
- Solution n°3 : 1 ml
- Solution n°4 : 1 ml
- Solution n°5 : 0,5 ml
- Solution n°6: 0,5 ml

Compléter à 1 000 ml avec de l'eau et stériliser à l'autoclave à $(121 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ pendant 20 minutes. Vérifier que le pH est de $7,1 \pm 0,1$. Ajuster éventuellement avec une solution diluée d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de sodium.

Annexe IV : Milieu TAP

Composition du milieu	Pour 1 l
Solution Tris acétique	10 ml
Tampon phosphate II	1 ml
Solution de métaux traces	5 ml
Solution A	10 ml
Acide acétique glacial	0,25 ml
pH final	7,00

Solution Tris-acide acétique glacial (pour 100 ml) :

- 10 ml acide acétique glacial
- 24,2 g de Tris base

Tampon phosphate II (pH théorique 7,20, pour 100 ml) :

- 10,8 g de K_2HPO_4
- 5,6 g de KH_2PO_4

Solution A (Solution de Beijerink) (pour 500 ml) :

- 20 g de NH_4Cl
- 5 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 2,5 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$

Solution de métaux traces (solution modifiée de Hutner) :

- Ajouter 5 g de Na_2EDTA à 400 ml de H_2O
- Ajuster le pH de 6,5 à 6,8 avec du 2N KOH ± 10 ml. (Ne pas utiliser de l'hydroxyde de sodium)
- Ajouter les composés suivants dans l'ordre. Laisser chaque composé se dissoudre avant de rajouter le suivant.

$FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,5 g

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 2,2 g

H_3BO_3 : 1,14 g

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$: 0,51 g

$CuSO_4 \cdot 5H_2O$: 0,16 g

H_2MoO_4 (0,073 g de $Na_2MoO_4 + 2H_2O$) : 0,098 g

$CoCl_2 \cdot 6H_2O$: 0,16 g

Compléter à 500 ml et autoclaver, la solution doit être vert pâle et vire au violet lors du stockage.

Annexe V : Composition physicochimique des rejets

	Site	Date	Unité	NO ₃ ⁻	PO ₄ ²⁻	K ⁺
Effluents de temps sec	Chassieu	18/01/2011	mg/l	62,2	1,2	7,3
		03/02/2011	mg/l	79,7	1,2	13,9
		03/03/2011	mg/l	16,1	0,5	5,7
		20/05/2011	mg/l	67	7,8	17,3
		20/02/2012	mg/l	27,5	0,6	4,8
		16/03/2012	mg/l	18,7	14,3	4
		25/04/2012	mg/l	33,9	0,2	8,2
	Ecully	03/02/2011	mg/l	40,9	18,7	18,6
		03/03/2011	mg/l	134	10,7	17,8
	Effluents de temps de pluie	Chassieu	24/02/2011	mg/l	13,4	<0,1
13/07/2011			mg/l	6,5	<0,1	1,3
19/10/2011			mg/l	15,4	1,25	<
02/01/2012			mg/l	5,3	0,02	0,9
05/01/2012			mg/l	4,8	0,17	1
21/05/2012			mg/l	1	<	1,1
Ecully		24/02/2011	mg/l	108,5	6,5	11,3
		19/10/2011	mg/l	12	5,9	10,5
		22/05/2012	mg/l	5,3	1,6	5
Bron		31/05/2011	mg/l	/	/	/
	13/07/2011	mg/l	<0,1	<0,1	6,5	
	19/10/2011	mg/l	18,5	1,96	2,2	
	02/01/2012	mg/l	8,5	0,36	0,5	
	22/05/2012	mg/l	0,19	0,01	0,3	
Limite de bonne qualité (SEQ V2)			mg/l	50	0,5	

	Site	Unité	Date	Pb	Cd	Cr	Ni	Cu	Zn	
Effluents de temps sec	Chassieu		18/01/2011	µg/l	<	<	<	7,95	13,24	180
			03/02/2011	µg/l	<	0,22	<	5,55	29,45	800
			03/03/2011	µg/l	<	<	<	20,13	3,22	220
			20/05/2011	µg/l	<	0,24	<	18,38	11,2	270
			20/02/2012	µg/l	0,64	<	6,9	1,77	5,68	100
			16/03/2012	µg/l	0,49	3,16	0,56	3,09	11,41	130
			25/04/2012	µg/l	<	<	0,56	4,46	5,26	<
	Ecully		03/02/2011	µg/l	<	<	<	3,27	22,02	<
			03/03/2011	µg/l	<	<	<	1,6	26,78	<
	Effluents de temps de pluie	Chassieu		24/02/2011	µg/l	<	0,23	<	3,19	12,88
			13/07/2011	µg/l	<	<	<	2,89	9,41	<
			19/10/2011	µg/l	2,19	0,16	1,41	4,7	12,69	270
			02/01/2012	µg/l	<	<	<	<	6,44	<
			05/01/2012	µg/l	<	<	<	<	5,79	130
			21/05/2012	µg/l	<	<	1,2	<	10,76	<
Ecully			24/02/2011	µg/l	<	<	<	<	18,92	<
			19/10/2011	µg/l	1,76	<	<	<	12,09	<
			22/05/2012	µg/l	<	<	1,22	<	8,41	<
			31/05/2011	µg/l	<	<	<	<	7,59	<
Bron		13/07/2011	µg/l	<	2,1	<	<	4,04	<	
		19/10/2011	µg/l	<	<	<	<	15,42	<	
		02/01/2012	µg/l	<	<	<	<	5,36	<	
		22/05/2012	µg/l	<	0,14	0,18	<	1,87	<	
		NQE		7,2	0,08	3,4	20	1,4	7,8	

Site	Date	Unité	Atr	D	Y HCCH	I	PCP	Sim	4-NP	OP	A	F	N	B(a)P	B(b)f	B(k)f	Acen	Fluo	Phen	Pyr	B(a)a	Chry	
Effluents de temps sec	Chassieu	18/01/11	ng/l	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
		03/02/11	ng/l	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
		03/03/11	ng/l	19,9	833	<	82,9	12,1	44,2	21,3	<	70,9	54,3	78,9	<	<	<	101,5	204,4	440,6	30,8	<	<
		20/05/11	ng/l	7,7	17,7	<	<	<	5,1	40,4	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
		20/02/12	ng/l	5,8	9,7	<	<	<	7,4	24	8	<	2,3	92	<	<	<	6,4	<	13	3,6	<	<
		16/03/12	ng/l	<	4,8	<	<	<	<	1114	38	<	2,1	17	<	<	<	<	<	<	4,1	<	<
		25/04/12	ng/l	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
	Ecully	03/02/11	ng/l	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
		03/03/11	ng/l	2,9	25		<	<	2,8	<	<	<	<	35				<	<	9,5	<		
Effluents de temps de pluie	Chassieu	24/02/11	ng/l	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
		13/07/11	ng/l	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
		19/10/11	ng/l	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
		02/01/12	ng/l	2,5	25	7,2	2,7	<	<	26	11	<	5,9	182	<	<	<	19	18	53	8	<	<
		05/01/12	ng/l	1,7	20	<	1,7	<	<	555	33	<	4	108	<	<	<	10	<	16	5,7	<	<
		21/05/12	ng/l	<	43	<	<	<	<	133	16	<	4,2	131	<	<	<	9,4	14	<	6,7	<	<
	Ecully	24/02/11	ng/l	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
		19/10/11	ng/l	2	12,2	<	<	<	2,9	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<
		22/05/12	ng/l		238	<	<	<	2,8	201	8,6	<	<	117	<	<	<	10	15	<	3,1	<	<
		31/05/11	ng/l	<	<	<	<	<	<	<	<	<	10,2	33,2	<	<	<	<	<	9,2	11,4	<	<
Bron	13/07/11	ng/l	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	
	19/10/11	ng/l	<	<	<	<	<	<	<	<	<	13	16	<	<	<	<	<	8,3	12,3	<	<	
	02/01/12	ng/l	<	<	<	<	<	<	10	<	<	28	104		14		4,7	9,8	116	23	8,6	8,7	
	22/05/12	ng/l	<	<	<	1,9	<	<	23	<	<	56	111	11	37	18	7	<	33	48	23	25	
NQE			600	200	/	300	400	1000	300	100	100	100	2400	50	Σ = 30		700	300	110	24	5	6	

Annexe VI : Article

Sensors **2012**, *12*, 16879-16891; doi:10.3390/s121216879

OPEN ACCESS**sensors****ISSN 1424-8220**

www.mdpi.com/journal/sensors

Article

Development of a Biosensor for Environmental Monitoring Based on Microalgae Immobilized in Silica Hydrogels

Yannis Ferro^{1,*}, **Mercedes Perullini**^{2,*}, **Matias Jobbagy**², **Sara. A. Bilmes**² and **Claude Durrieu**¹

¹ Université de Lyon; ENTPE; CNRS; UMR5023 LEHNA; Rue Maurice Audin, 69518 Vaulx-en-Velin, France; E-Mail: claudedurrieu@entpe.fr

² INQUIMAE-DQIAQF, Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Ciudad Universitaria Pab. II, C1428EHA Buenos Aires, Argentina; E-Mails: jobbag@qi.fcen.uba.ar (M.J.); sarabil@qi.fcen.uba.ar (S.A.B.)

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: yannis.ferro@entpe.fr (Y.F.); mercedesp@qi.fcen.uba.ar (M.P.); Tel.: +33-47-2047-776 (Y.F.); Fax: +33-47-2046-254 (Y.F.); Tel.: +54-11-4576-3378 (M.P.); Fax: +54-11-4576-3341 (M.P.).

Received: 29 October 2012; in revised form: 30 November 2012 / Accepted: 4 December 2012 / Published: 6 December 2012

Abstract: A new biosensor was designed for the assessment of aquatic environment quality. Three microalgae were used as toxicity bioindicators: *Chlorella vulgaris*, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii*. These microalgae were immobilized in alginate and silica hydrogels in a two step procedure. After studying the growth rate of entrapped cells, chlorophyll fluorescence was measured after exposure to (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) (DCMU) and various concentrations of the common herbicide atrazine. Microalgae are very sensitive to herbicides and detection of fluorescence enhancement with very good efficiency was realized. The best detection limit was 0.1 μM , obtained with the strain *C. reinhardtii* after 40 minutes of exposure.

Keywords: biosensor; algae; chlorophyll fluorescence; DCMU; atrazine; sol-gel; herbicides

1. Introduction

Deterioration of the aquatic environment by pollutants is an important problem. Among all of them, heavy metals and herbicides constitute a priority preoccupation: they are frequently found in surface and ground waters and are harmful to aquatic organisms [1–5]. The need for convenient, quick and reliable methods to assess pollutant toxicity is more essential than ever. Environmental monitoring of pollutants with automatic systems applied online and allowing rapid response is one of the best ways to control the quality of the environment. Real time analysis offers the advantage of detecting rapidly the presence of pollutants before they cause any damage. Such a strategy is only possible through biosensors [6].

Photosystem II (PSII)-based biosensors are reported to be able to detect herbicides in the environment [7]. Various herbicides, including the urea, triazine, and phenolic based herbicides, target the vegetal PSII. These substances inhibit photosynthetic electron flow by blocking the PSII quinone binding site and thus modify chlorophyll fluorescence. Many biosensors based on algal chlorophyll fluorescence measurement were developed and have demonstrated the suitability of this technique for herbicide detection [8–11].

An important point in the design of algal biosensors is the question of cell-binding. One of the most commonly employed procedures, based on the immobilization of microalgae within calcium crosslinked alginate beads is intrinsically biocompatible [12–16], but such matrices are disrupted in water as well as by alginate biodegradation. In the last decade, there have been huge improvements in the development of biocompatible synthetic routes to entrap biological entities within pure inorganic matrices [17–23]. Among them, routes based on sol-gel chemistry [24] are unique in offering the necessary mild conditions for building composite materials based on robust silica hydrogels and biological entities where the bio-activity gives rise to a wide range of sensing possibilities [25–27].

The design of biosensors based on direct silica encapsulation is limited by the restricted cell viability, but recent work has demonstrated the possibility of cell division inside inorganic matrices by means of a two-step encapsulation procedure based on sol-gel chemistry [28–30]. This strategy expands the range of possible applications as cells can not only be entrapped within silica hydrogels, but are also able to grow inside, even for periods of months [31]. In addition, the inherent homogeneous and mesoporous texture of the silica hydrogel provides a shield preventing the release of entrapped cells, as well as the contamination of the inner culture by exogenous strains. Moreover, in previous works we have demonstrated the long-term viability of algal cells encapsulated in an alginate-silica hybrid matrix [32].

In this paper, translucent alginate-silica matrices obtained by a sol-gel process have been investigated for entrapment of three algal strains in order to improve biosensor fabrication. After a biocompatibility assay of the inorganic host material, the effects of algal immobilization were tested on their ability to determine herbicides.

2. Experimental Section

2.1. Cell Cultures

Chlorella vulgaris, *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Chlamydomonas reinhardtii* were used. Algal strains were purchased from The Culture Collection of Algae and Protozoa (Cumbria, United Kingdom). *C. vulgaris* and *P. subcapitata* were grown in Lefebvre-Czarda medium [33] whereas *C. reinhardtii* was grown in trisacetate phosphate (TAP) medium [34] and were transplanted weekly under sterile conditions (autoclaving 20 minutes, 130 °C, 1.3 bars).

Algae were maintained in a nycthemeral cycle of 16 hours of illumination at 5,000 lux and eight hours of darkness.

2.2. Immobilization Method

In a two-step procedure, cells were previously immobilized in Ca(II)-alginate beads which was subsequently trapped in the inorganic matrix, avoiding any harmful contact of cells with any silica precursors (Figure 1). This procedure based on inexpensive silica precursors has already been employed for yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), bacteria (*Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*), algae (*Chlorella vulgaris*), fungi (*Stereum hirsutum*) and plant cells (BY2 tobacco and carrot phloematic tissue) [31].

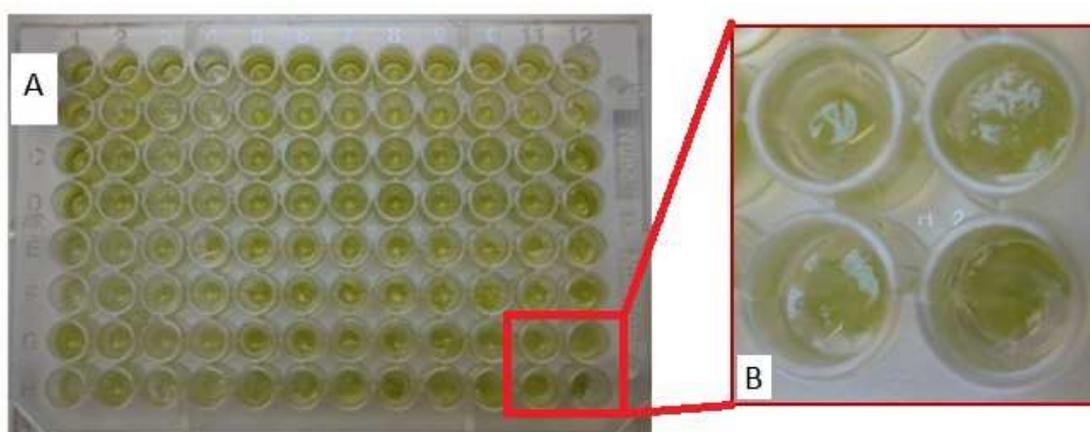


Figure 1: Photograph of the biosensor with *C. reinhardtii* (A); Zoom on wells with two step-immobilized algae (B)

2.2.1. Alginate Beads and Gels

Formation of alginate beads was performed by dropwise addition of a 2% (w/w) Na(I)-alginate cells suspension in a 0.1 M CaCl_2 solution. After 10 min stirring, beads of about 3 mm diameter were easily collected by filtration. The Ca(II)-alginate polymer prevents cell contact with synthesis precursors.

Formation of alginate gel beads in 96 multiwells plate was performed by stirring a 50 μL aliquot of cells suspended with 50 μL of Tris-HCl buffer (10 mM, pH = 7.5) and 100 μL 2% Na(I)-alginate (resp. 100, 100 and 200 μL for 48 multiwell plates). This mixture was introduced in the cavities of the sample holder. Alginate cross-linking was built by immersing the sample holder into a 0.1 M CaCl_2 solution for 10 minutes.

2.2.2. Silica Hydrogels Synthesis

The second step of the immobilization procedure consists of a silicate (sodium silicate, Riedel-de Haën; NaOH 10%, SiO_2 27%) sol-gel process in the presence of commercial silica nanoparticles (LUDOX HS-40, 40% in water, obtained from Aldrich), leading to a nanoporous monolithic structure. Monoliths were prepared at room temperature by mixing volumes of the different precursor solutions to obtain a SiO_2 water molar relation of 3.8% with a fixed proportion of polymeric to particulate silica precursors (1:3) at constant pH = 6.5, adjusted with HCl.

2.3. Growth Rate of Algae Entrapped within Silicate-Ludox-Based Hydrogels

To evaluate the degree in which the development of algae is affected by the encapsulation in alginate and silica, the algal growth rate as a function of entrapment method was measured. The algal growth inside the voids was studied for individual cavities after 3 days of culture in LC liquid medium. At the initial time, calcium alginate beads with a content of 10^{-4} cells/mL were dispensed into 1.5 mL tubes (Eppendorf), and the silica encapsulation procedure was performed. After 3 days, the silica hydrogel was removed and samples were exposed to 0.05% potassium citrate to solubilize the Ca(II)-alginate beads. The total number of cells inside individual cavities was determined by counting cells in a Mallassez counting chamber. To analyze cellular growth, the percentage of inhibition (I) is calculated using the equation:

$$I = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} 100$$

where μ_i is the growth rate for test batch *i* (entrapped cells) and μ_c is the mean growth rate for the control batch (free cells). Test and control batches were run in triplicate.

2.4. Biosensor Performance

The herbicides (3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) (DCMU, 4 mg/L) and atrazine (10 μ M to 0.001 μ M) were used as examples of anti-PSII herbicides to evaluate the performance of the fluorescence biosensor (Table 1).

Table 1: Experimental design on the microplate Co: control (no herbicide), C1 = 0.001 μ M, C2= 0.01 μ M, C3=0.1 μ M, C4=1 μ M and C5 = 10 μ M. in free culture medium (in blue), in culture medium added with 2% Na(I)-alginate (sodium alginate, in red), encapsulated in Ca(II)-alginate (calcium alginate, in green), and after the two steps immobilization procedure (calcium alginate/SiO₂, in purple)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Co	Co	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	C5	C5
B	Co	Co	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	C5	C5
C	Co	Co	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	C5	C5
D	Co	Co	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	C5	C5
E	Co	Co	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	C5	C5
F	Co	Co	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	C5	C5
G	Co	Co	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	C5	C5
H	Co	Co	C1	C1	C2	C2	C3	C3	C4	C4	C5	C5

Response of the algal biosensor was obtained from the chlorophyll fluorescence emission at 682 nm under a 469 nm excitation light with a spectrofluorimeter (Fluostar, BMG). The biosensor response to herbicide was determined by the fluorescence enhancement (E) as soon as a defined amount of herbicide is added to the sample (the herbicide is dissolved in distilled water and added to free and entrapped algae).

For herbicides which inhibit PSII, the enhancement can be determined after 40 minutes using the following equation:

$$E = \frac{F_a - F_b}{F_b} 100$$

where F_b is the fluorescence for a test batch before contact with the herbicide and F_a is the fluorescence for the same test batch after the herbicide exposure.

All assays were undertaken with a thickness of silica layer around 1.9 mm and with the following cellular concentrations: [CV] $\approx 3.3 \cdot 10^6$ cells/mL; [PS] $\approx 1.4 \cdot 10^6$ cells/mL; [CR] $\approx 1.4 \cdot 10^6$ cells/mL.

3. Results and Discussion

3.1. Growth Rate of Entrapped Algae

In the design of biosensors with encapsulated photosynthetic cells, as well as for the design of devices based on optical detection systems it is mandatory to minimize the attenuation of the host matrix in the visible region [35]. The hydrogel properties depend on its microstructure, which can be controlled by sol–gel synthesis variables. In particular, optical properties of silica hosts obtained *via* a mixed aqueous route based on sodium silicate–silica nanoparticle mixtures can be improved by increasing the relative content of molecular precursors over colloidal silica [36]. By means of the two-step procedure and due to the protection provided by the Ca(II)-alginate pre-encapsulation, silica synthesis can be attempted under more cytotoxic conditions, allowing the use of a higher ionic strength than possible in one-pot encapsulation procedures. In a previous work, we investigated the degree to which the scattering of visible light affects the encapsulated algae growth rate, analyzing the number of *Chlorella vulgaris* cells developed in voids created inside silicate-Ludox hydrogels as a function of gel thickness [32]. Following the same encapsulation procedure as described in the previous section, except for the proportion of polymeric to particulate silica precursors, which was varied in the range 1:3 to 1:5, it was found that the growth of *C. vulgaris* was affected by both the attenuation of the matrix and the host thickness. However, for the matrix with higher polymeric precursor content, the growth rate was unaffected, even for gel thicknesses up to 4.0 mm.

In the present study, the optimized ratio of polymeric to particulate silica precursors (*i.e.*, 1:3) was investigated for the two-step encapsulation of *C. reinhardtii* (CR), *P. subcapitata* (PS) and *C. vulgaris* (CV). Silica hydrogel thickness was fixed at 1.9 mm, since in the previous study, regardless of the optical quality of the silica matrix, no detriment in CV growth rate was found for this silica thickness. At the initial time, calcium alginate beads with a content of 10^4 cells/mL were dispensed into acrylic molds, and the silica encapsulation was performed. The algal growth inside the voids was studied for individual cavities after 3 days of culture in AFNOR liquid medium. As shown in Figure 2 and in agreement with previous results, [32] CV growth rate was almost unaffected (growth inhibition $\approx 2\%$). For the other algal species, we could see a slight difference of sensibility, although in the three cases these results confirm the biocompatibility of the two-step procedure immobilization with a relatively low growth inhibition (6% and 13% for PS and CR, respectively).

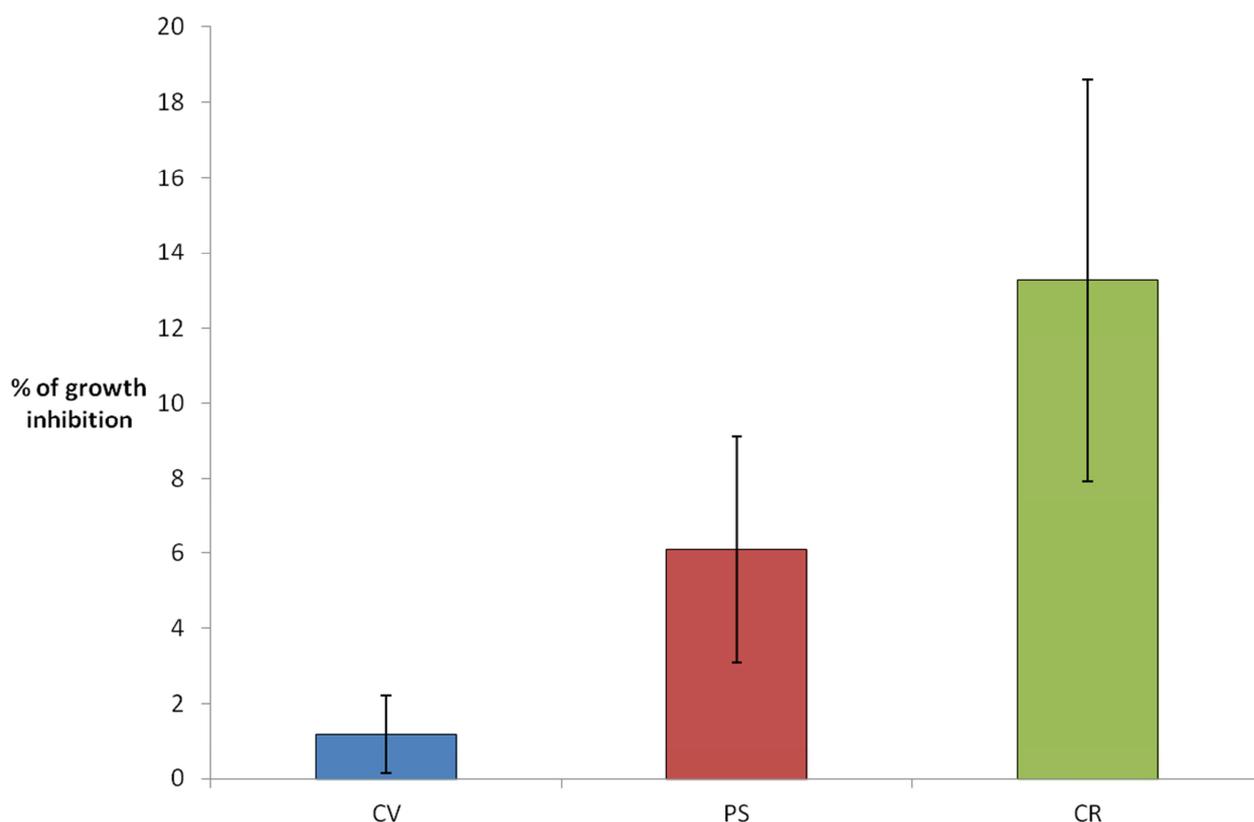


Figure 2: % of growth inhibition after the two steps immobilized algae (silica layer = 1.9 mm) in comparison with free algae (none immobilized). Three algal strains are compared : *C. vulgaris* (CV, in blue), *P. subcapitata* (PS, in red) and *C. reinhardtii* (CR, in green)

3.2. Algal Fluorescence Measurements

3.2.1. Immobilization Effect

Since algal cells are entrapped in an insoluble support, they are no longer in their natural environment. It is also necessary to assess their activity in the presence of various compounds added during the immobilization process.

Differences observed according to the immobilization method and the studied strains are slight (Figure 3). A small decrease of the fluorescence is observed when 2% Na(I)-alginate is added to the culture medium. The fact of immobilizing algae (in calcium alginate or in calcium alginate inside the silica matrix) does not lead to further loss of signal. Thus, the activity of algal cells entrapped within Ca(II)-alginate matrices—a standard procedure for biosensor applications—is not affected by our encapsulation procedure. On the other hand, this provides new evidence that light scattering by the silica matrix is negligible.

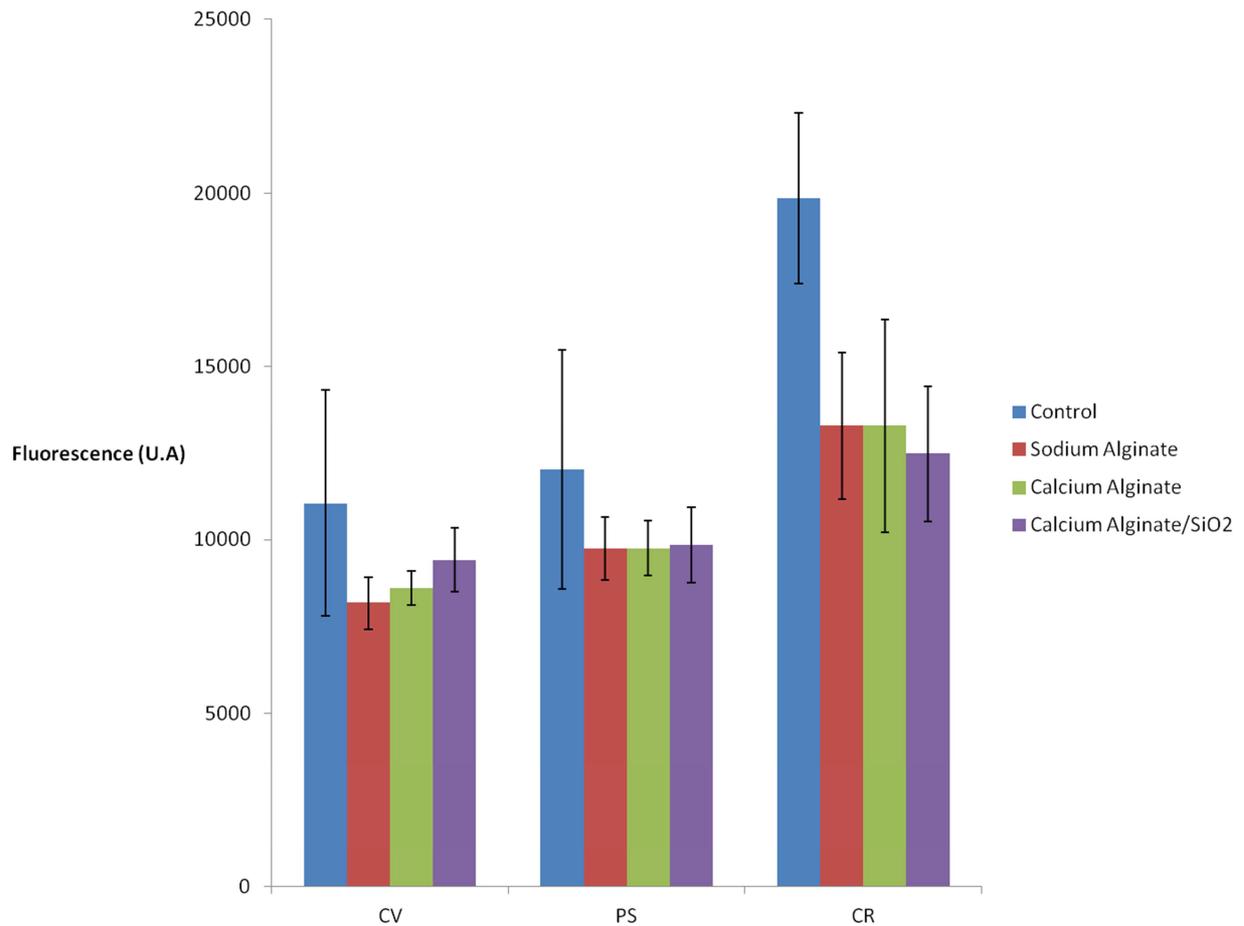


Figure 3: algal chlorophyll fluorescence 1 h after the deposition in microplate: in free culture medium (control, in blue), in culture medium added with 2% Na(I)-alginate (sodium alginate, in red), encapsulated in Ca(II)-alginate (calcium alginate, in green), and after the two steps immobilization procedure (calcium alginate/SiO₂, in purple). Three algal strains were used: *C. vulgaris* (CV), *P. subcapitata* (PS) and *C. reinhardtii* (CR).

3.2.2. Effect of DCMU on Chlorophyll Fluorescence

According to Figure 4, there is a 40% decrease in fluorescence enhancement when *C. vulgaris* is cultured with the addition of 2% Na(I)-alginate. This could be partially attributed to the loss of chlorophyll fluorescence observed in the absence of DCMU (see Figure 3). However, the fact of immobilizing algae [in Ca(II)-alginate or in Ca(II) alginate/silica matrix] does not lead to further enhancement losses.

Analyzing the *P.subcapitata* response to DCMU exposure, the fluorescence enhancement for free PS and PS suspended in alginate, Ca(II)-alginate and hybrid Ca(II)-alginate and silica, does not show significant differences (in all cases enhancement is around $50\% \pm 20\%$).

Finally, for the *C. reinhardtii* strain, after sol-gel entrapment fluorescence enhancement is strong, with a small variability ($75\% \pm 5$) and close to control (free algae: $90\% \pm 10$).

These results show the ability of the entrapped microalgae biosensor to detect DCMU with accuracy comparable to that obtained with free algae. The next step is the determination of the detection limits (time and concentration) and the possibility of sensing another herbicide such as the atrazine.

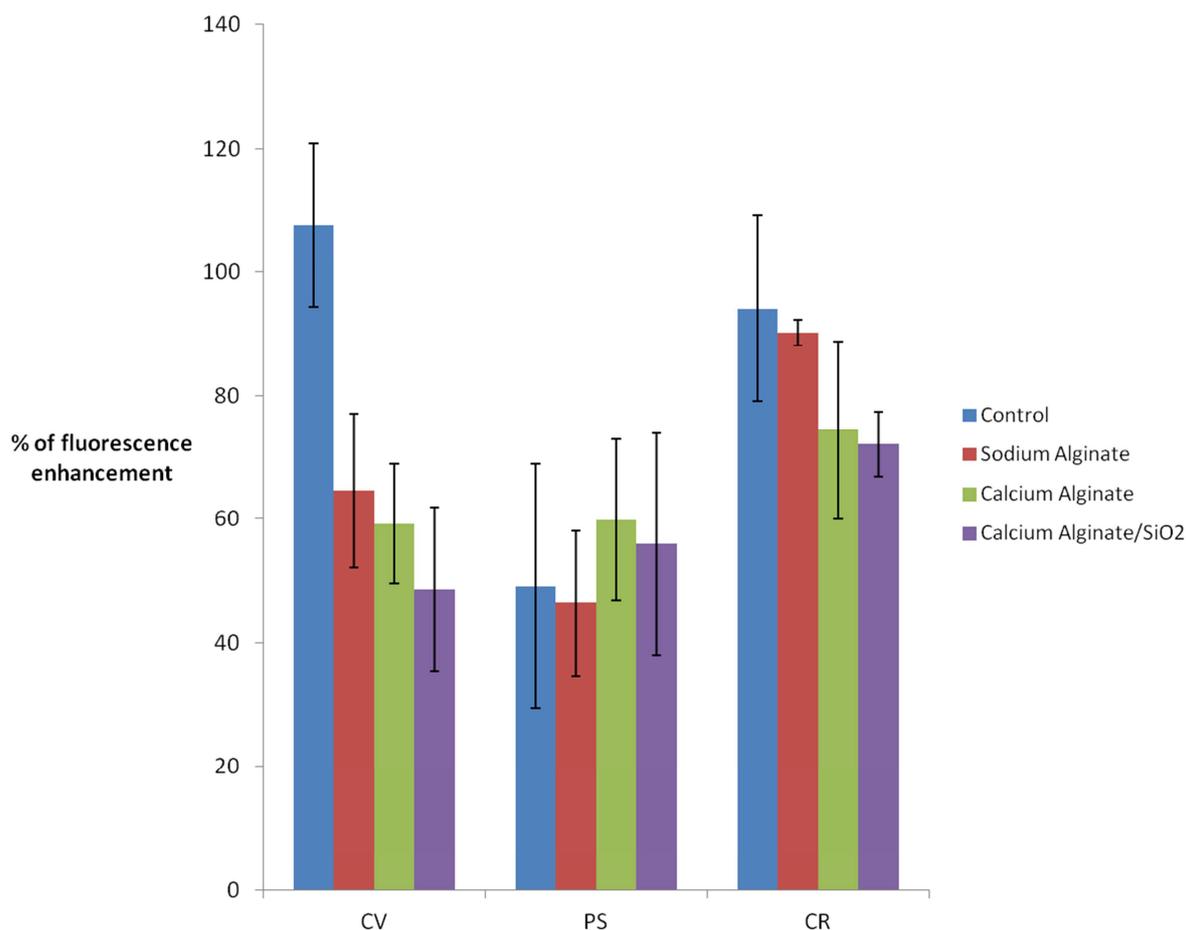


Figure 4: % of chlorophyll fluorescence enhancement after 40 min DCMU (4 mg/L) exposure according to entrapment method and algal strain: in free culture medium (control, in blue), in culture medium added with 2% Na(I)-alginate (sodium alginate, in red), encapsulated in Ca(II)-alginate (calcium alginate, in green), and after the two steps immobilization procedure (calcium alginate/SiO₂, in purple). Three algal strains were used: *C. vulgaris* (CV), *P. subcapitata* (PS) and *C. reinhardtii* (CR)

3.2.3. Effect of Atrazine on Chlorophyll Fluorescence

Figure 5 summarizes the results obtained with the three algal strains after atrazine exposure. After an exposure of 40 minutes on *C. vulgaris*, we obtained a detection limit of 0.1 μM for all the immobilization methods, indicating that at this concentration, there is no difference between different encapsulation methods. Upon increasing the atrazine concentration, the chlorophyll fluorescence enhancement of silica entrapped algae does not increase, contrary to what is observed for the free algae and for the other encapsulation methods, which effectively show a dose response.

With *P. subcapitata*, the detection limit after 40 minutes is still 0.1 μM for free PS, PS suspended in alginate, Ca(II)-alginate, but it is found to be higher for PS encapsulated in Ca(II)-alginate-silica (1 μM).

In the case of *C. reinhardtii*, the loss of sensibility between free algae and encapsulated ones is very strong, regardless of the entrapment method, but compared to the other strains the CR are the most sensitive. For example, on algae entrapped within silica hydrogels after a 40 minutes exposure to 1 μM , the fluorescence enhancement is 57% for CR, 42% for PS and 32% for CV. Furthermore, the limit of detection after 40 mn is the lowest with *C. reinhardtii*: 0.1 μM for all tests batches, even those with Ca(II)-alginate-silica.

% of fluorescence enhancement

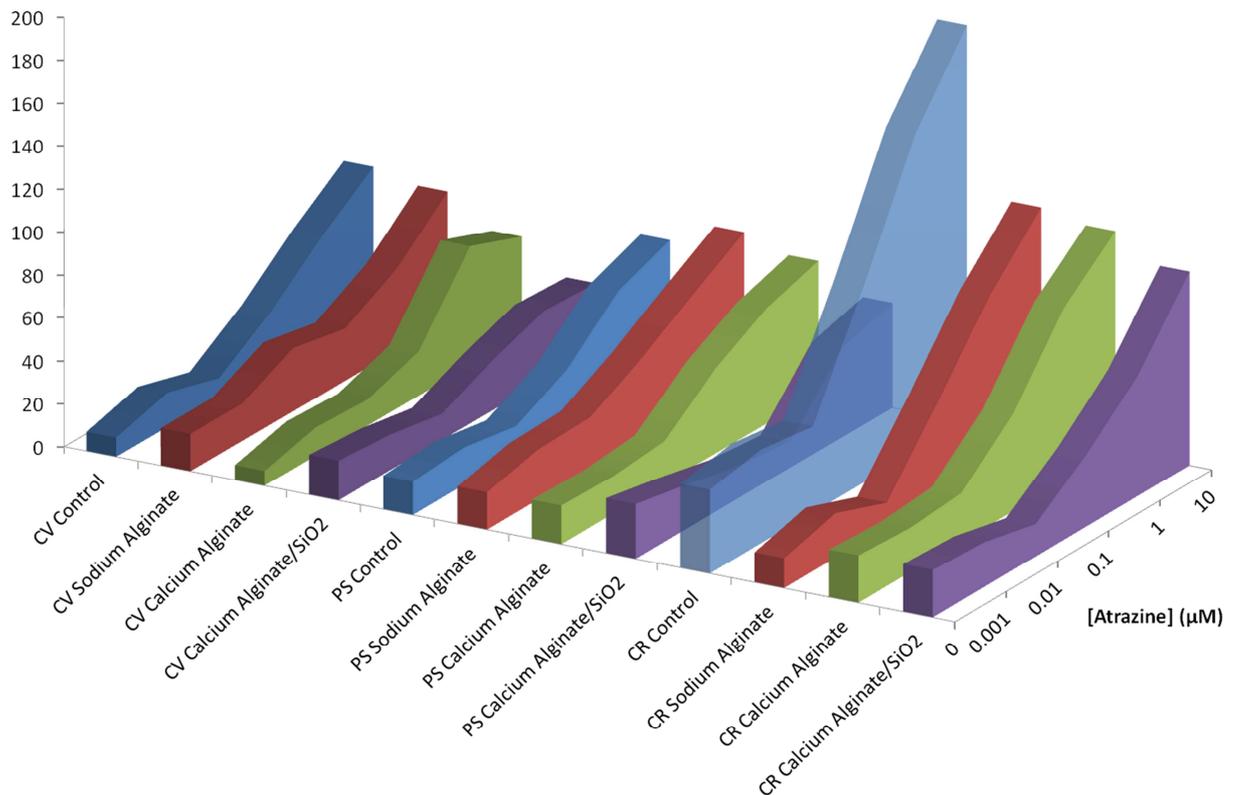


Figure 5: % of chlorophyll fluorescence enhancement after 40 min atrazine exposure according to entrapment method and algal strain. In free culture medium (control, in blue), in culture medium added with 2% Na(I)-alginate (sodium alginate, in red), encapsulated in Ca(II)-alginate (calcium alginate, in green), and with the two steps immobilization procedure (calcium alginate/SiO₂, in purple). Three algal strains were used: *C. vulgaris* (CV), *P. subcapitata* (PS) and *C. reinhardtii* (CR)

Table 2 summarizes the results obtained with the two steps encapsulation procedure after atrazine exposure to different contact times. When there is no pollutant (0 μM, 1st column), there is a fluorescence enhancement after 40 minutes. This could be explained by the growth of the culture. The time of exposure is important and the longer it is, the more is the fluorescence, but between 5 hours and 24 hours, with 10 μM pollutant exposure, we observe a decrease of the fluorescence enhancement for *C. reinhardtii*. This is attributed to an important toxicity of atrazine and the subsequent cellular mortality. Finally, the choice of the strain is an important factor for the sensitivity of the biosensor. For example after 5 h with 1 μM pollutant exposure, the fluorescence enhancement is around 71% with CV, 49% with PS and 92% with CR. This is a general result and our results allow us to sort algal strain according to their herbicide sensitivity in the following order: CR > CV > PS.

Table 2: % of chlorophyll fluorescence enhancement after contact with atrazine (0 to 10 μM) on algae entrapped within silica hydrogels according to different contact times (40 minutes, 5 hours and 24 hours). Three algal strains were used: *C. vulgaris* (CV), *P. subcapitata* (PS) and *C. reinhardtii* (CR)

% of Fluorescence Enhancement		[Atrazine] (μM)					
Algal Strain	Contact Time	0	0.001	0.01	0.1	1	10
CV	40 min	18.5 \pm 2.73	16.65 \pm 11.95	12.29 \pm 2.93	23.44 \pm 8.9	32.17 \pm 7.19	30.95 \pm 1.42
	5 h	24.83 \pm 4.39	23.24 \pm 4.03	25.92 \pm 3.94	46.89 \pm 8.7	71.49 \pm 11.22	74.11 \pm 4.69
	24 h	76.72 \pm 1.82	30.93 \pm 14.17	31.22 \pm 3.78	60.55 \pm 2.23	91.78 \pm 13.62	77.86 \pm 3.68
PS	40 min	25.37 \pm 5.09	20.44 \pm 8.69	14.85 \pm 10.01	12.39 \pm 8.60	41.71 \pm 6.40	48.77 \pm 11.38
	5 h	19.02 \pm 2.69	21.36 \pm 8.60	17.37 \pm 9.93	22.11 \pm 10.63	48.97 \pm 1.54	62.27 \pm 4.3
	24 h	20.42 \pm 1.02	25.47 \pm 8.17	23.04 \pm 10.42	29.57 \pm 11.40	68.13 \pm 2.46	48.68 \pm 2.01
CR	40 min	21.91 \pm 5.78	20.71 \pm 11.15	15.02 \pm 3.28	33.64 \pm 20.89	56.52 \pm 23.77	90.49 \pm 7.1
	5 h	28.91 \pm 3.35	32.07 \pm 12.68	26.41 \pm 2.13	58.75 \pm 26.79	91.68 \pm 25.08	136.97 \pm 9.37
	24 h	33.44 \pm 5.65	37.49 \pm 13.61	28.17 \pm 1.67	62.7 \pm 23.82	71.53 \pm 25.95	85.12 \pm 15.2

4. Conclusions

In this study, we demonstrate the feasibility of using an inorganic translucent hydrogel to construct an optical biosensor with immobilized algal cells. According to our results and in agreement with former studies [27], the sol-gel immobilization in two steps shows a high biocompatibility with green algae; this encapsulation method is easy to perform and allows one to obtain a matrix with good optical and mechanical performance. Furthermore, the polymeric and particulate silica precursors used in this synthesis are low cost reagents, which is stimulating from the point of view of the scaling up in future applications. The activity of algae whole cells immobilized within the silica hydrogel can be assessed from chlorophyll fluorescence measurements. The translucence of the structure allowed the algal layer to be placed directly in contact with the optical fibers to produce a fluorescence emission detectable by a fluorometer. In addition, this whole-cell reagentless biosensor is economically very interesting because it requires neither substrate nor fluorescent indicator to monitor herbicide levels in the environment.

The use of this entrapment technique is facilitated by the optical transparency, mechanical stability and chemical inertness of the silica host. Optical properties are of crucial importance for both the growing of photosynthetic algal cells inside the biosensing devices and for the detection method based on the determination of the chlorophyll fluorescence enhancement. Since the porosity of the silica matrix (in the range of mesopores) can be tuned by the sol-gel synthesis method used, the transport properties of the host material can be regulated in order to allow free diffusion of aqueous pollutants to make them accessible to algal cells. This technique has been applied to the determination of DCMU and atrazine, as examples of herbicides that are known to inhibit the algal PSII. Among the algal strains tested, *Chlamydomonas reinhardtii* is the most sensitive specie for atrazine determination, with a limit of detection of 0.1 μM after 40 minutes of exposure.

This optical algal biosensor could be used as an early-warning device to detect those pollutants in effluents. Performance and optimization studies with other herbicides are under

way and the results will be compared to other analytical techniques. Before an *in situ* implementation the limits of detection have to be improved. Concentrations of DCMU and atrazine in controlled effluents are around 0.1 and 10 µg/L and European Environmental Quality Standards (EEQS) are 0.2 µg/L for DCMU and 0.6 µg/L for atrazine [3,37,38].

On previous papers, we have shown that the use of *C. vulgaris* cells as a bioreceptor allowed the determination of the antiphotosystem II (PSII) herbicides group which target the algal PSII fluorescence [10]. Under the same conditions ($[C. vulgaris] = 1.5 \times 10^6$ cells/mL and phosphate buffer pH 7.0) the limit of detection of atrazine was 1 µg/L (5×10^{-3} µM) with 1% fluorescence increase. These results were obtained with a high sensitivity fluorometer equipped with single photon counting capabilities (the Spex Fluorolog 2). We believe that using a more accurate fluorometer and by improving the immobilization method to decrease the variability, we could further reduce these detection limits.

Acknowledgments

This work has been financially supported by the French Minister of Ecology and Sustainable Development, by the University of Lyon (Faculté des Sciences et Technologies) and CONICET GI-PIP 11220110101020, UBACyT 20020100100636 from Argentina.

References and Notes

1. Hanke, I.; Wittmer, I.; Bischofberger, S.; Stamm, C.; Singer, H. Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. *Chemosphere* **2010**, *81*, 422–429.
2. Reilly, T.J.; Smalling, K.L.; Orlando, J.L.; Kuivila, K.M. Occurrence of boscalid and other selected fungicides in surface water and groundwater in three targeted use areas in the United States. *Chemosphere* **2012**, *89*, 228–234.
3. Guzzella, L.; Pozzoni, F.; Giuliano, G. Herbicide contamination of surficial groundwater in Northern Italy. *Environ. Pollut.* **2006**, *142*, 344–53.
4. Davis, A.P.; Shokouhian, M.; Ni, S. Loading estimates of lead, copper, cadmium, and zinc in urban runoff from specific sources. *Chemosphere* **2001**, *44*, 997–1009.
5. Stankovic, S.; Jovic, M. Health risks of heavy metals in the mediterranean mussels as seafood. *Environ. Chem. Lett.* **2011**, *10*, 119–130.
6. Pandard, P.; Vasseur, P. Biocapteurs pour le contrôle de la toxicité des eaux: application des bioélectrodes algales. *Rev. Sci. Eau/J. Water Sci.* **1992**, *5*, 445–461.
7. Giardi, M.T.; Koblížek, M.; Masojídek, J. Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, *16*, 1027–1033.
8. Naessens, M.; Leclerc, J.-C.; Tran-Minh, C. Fiber optic biosensor using *Chlorella vulgaris* for determination of toxic compounds. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **2000**, *46*, 181–185.
9. Nguyen-Ngoc, H.; Tran-Minh, C. Fluorescent biosensor using whole cells in an inorganic translucent matrix. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *583*, 161–165.

10. Védrine, C.; Leclerc, J.-C.; Durrieu, C.; Tran-Minh, C. Optical whole-cell biosensor using *Chlorella vulgaris* designed for monitoring herbicides. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 457–463.
11. Peña-Vázquez, E.; Maneiro, E.; Pérez-Conde, C.; Moreno-Bondi, M.C.; Costas, E. Microalgae fiber optic biosensors for herbicide monitoring using sol-gel technology. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 3538–43.
12. Yang, C.-F.; Lee, C.-M. Pentachlorophenol contaminated groundwater bioremediation using immobilized *Sphingomonas* cells inoculation in the bioreactor system. *J. Hazard. Mater.* **2008**, *152*, 159–165.
13. Stormo, K.E.; Crawford, R.L. Preparation of encapsulated microbial cells for environmental applications. *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 727–730.
14. Lestan, D.; Lamar, R.T. Development of fungal inocula for bioaugmentation of contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **1996**, *62*, 2045–2052.
15. 15. Bashan, Y. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. *Appl. Environ. Microbiol.* **1986**, *51*, 1089–1098.
16. Arica, M.Y.; Kaçar, Y.; Genç, O. Entrapment of white-rot fungus *Trametes versicolor* in Ca-alginate beads: preparation and biosorption kinetic analysis for cadmium removal from an aqueous solution. *Bioresour. Technol.* **2001**, *80*, 121–129.
17. Nassif, N.; Bouvet, O.; Noelle Rager, M.; Roux, C.; Coradin, T.; Livage, J. Living bacteria in silica gels. *Nat. Mater.* **2002**, *1*, 42–44.
18. Amoura, M.; Nassif, N.; Roux, C.; Livage, J.; Coradin, T. Sol-gel encapsulation of cells is not limited to silica: Long-term viability of bacteria in alumina matrices *Chem. Commun.* **2007**, 4015–4017.
19. Avnir, D.; Coradin, T.; Lev, O.; Livage, J. Recent bio-applications of sol-gel materials. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 1013–1030.
20. Livage, J.; Coradin, T. Living cells in oxide glasses. *Rev. Mineral. Geochem.* **2006**, *64*, 315–332.
21. Meunier, C.F.; Dandoy, P.; Su, B.-L. Encapsulation of cells within silica matrixes: Towards a new advance in the conception of living hybrid materials. *J. Colloid. Interface Sci.* **2010**, *342*, 211–224.
22. Nguyen-ngoc, H.; Tran-minh, C. Sol-gel process for vegetal cell encapsulation. *Mater. Sci. Eng.* **2007**, *27*, 607–611.
23. Blondeau, M.; Coradin, T. Living materials from sol-gel chemistry: current challenges and perspectives. *J. Mater. Chem.* **2012**, *22*, 22335.
24. Brinker, C.J.; Scherer, G.W. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*; Academic Press, Inc: San Diego, CA, USA, 1990.
25. Léonard, A.; Dandoy, P.; Danloy, E.; Leroux, G.; Meunier, C.F.; Rooke, J.C.; Su, B.-L. Whole-cell based hybrid materials for green energy production, environmental remediation and smart cell-therapy. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 860–85.

26. Soltmann, U.; Böttcher, H. Utilization of sol–gel ceramics for the immobilization of living microorganisms. *J Sol-Gel Sci. Technol.* **2008**, *48*, 66–72.
27. Darder, M; Aranda, P; Burgos-Asperilla, L; Llobera, A; Cadarso, V.J.; Fernandez-Sanchez, C; Ruiz-Hitzky, E. Algae-silica systems as functional hybrid materials. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20*, 9362-9369.
28. Perullini, M.; Jobbágy, M.; Soler-Illia, G.J. A.A.; Bilmes, S.A. Cell Growth at Cavities Created Inside Silica Monoliths Synthesized by Sol-Gel. *Chem. Mater.* **2005**, *78*, 3806–3808.
29. Boninsegna, S.; Dal Toso, R.; Dal Monte, R.; Carturan, G. Alginate microspheres loaded with animal cells and coated by a siliceous layer. *J Sol-Gel Sci. Technol.* **2003**, *26*, 1151-1157.
30. Coradin, T.; Nassif, N.; Livage, J. Silica-alginate composites for microencapsulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2003**, *61*, 429-434.
31. Perullini, M.; Rivero, M.M.; Jobbágy, M.; Mentaberry, A.; Bilmes, S.A. Plant cell proliferation inside an inorganic host. *J. Biotechnol.* **2007**, *127*, 542–548.
32. Sicard, C.; Perullini, M.; Spedalieri, C.; Coradin, T.; Brayner, R.; Livage, J.; Jobbágy, M.; Bilmes, S.A. CeO₂ Nanoparticles for the Protection of Photosynthetic Organisms Immobilized in Silica Gels. *Chem. Mater.* **2011**, *23*, 1374–1378.
33. AFNOR, Détermination de l'inhibition de croissance de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. *Norme expérimentale NT90-304*, Association Française de Normalisation, Paris, France. 1980.
34. Gorman, D.S.; Levine, R.P. Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1965**, *54*, 1665–9.
35. Nguyen-Ngoc, H.; Durrieu, C.; Tran-Minh, C. Synchronous-scan fluorescence of algal cells for toxicity assessment of heavy metals and herbicides. *Ecotoxicol. Environ. Safety* **2009**, *72*, 316–20.
36. Perullini, M.; Jobbágy, M.; Bilmes, S.A.; Torriani, I.L.; Candal, R. Effect of synthesis conditions on the microstructure of TEOS derived silica hydrogels synthesized by the alcohol-free sol–gel route. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2011**, *59*, 174–180;
37. Gasperi, J.; Garnaud, S.; Rocher, V.; Moillon, R. Priority pollutants in wastewater and combined sewer overflow. *Sci. Total Envir.* **2008**, *407*, 263–272.
38. The European Parliament and the Council of the European Union. Directive 2008/105/EC of the European Parliament and the Council of 16 december 2008 on Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy; 2008; pp. 84–97.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

FOLIO ADMINISTRATIF

THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

NOM : FERRO

DATE de SOUTENANCE :

Prénoms : Yannis, Julien

TITRE : Evaluation de l'impact des rejets urbains de temps de pluie sur le compartiment algal des écosystèmes aquatiques.
Mise au point d'outils pour la surveillance des milieux récepteurs.

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : AAAAISALXXXX

Ecole doctorale : Chimie de Lyon

Spécialité : Sciences de l'Environnement Industriel et Urbain

RESUME : La gestion des eaux pluviales constitue un défi important à relever dans les villes du monde entier : aujourd'hui on ne compte plus les problèmes d'inondation et de pollution, problèmes chroniques qui tendent à s'amplifier à mesure que l'urbanisation grandit. Une gestion durable de ces eaux est au cœur des enjeux du XXI^e siècle et afin de répondre à ces problèmes le Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable a engagé une opération de recherche. Parmi les problèmes posés par les eaux pluviales notre étude se focalise sur les rejets urbains de temps de pluie (RUTP). Ces rejets constituent un apport important et imprévisible de nombreux polluants pour les masses d'eaux réceptrices. La pollution des RUTP est étudiée depuis de nombreuses années et, alors que connaissance en la matière s'affine, il n'existe à l'heure actuelle aucune étude de grande ampleur permettant d'identifier l'impact des RUTP sur les écosystèmes récepteurs. Notre travail a consisté à étudier l'impact de différents échantillons de RUTP collectés sur 3 sites d'assainissement pluvial de l'agglomération lyonnaise sur l'environnement. Nous nous sommes dotés de bioindicateurs pertinents, les microalgues d'eau douce, organismes unicellulaires à la base des chaînes trophiques et très sensibles aux polluants présents dans les RUTP. Nous avons réalisé des bioessais écotoxicologiques connus de la littérature et contribué au développement de nouveaux indicateurs de toxicité. De plus nous avons cherché à adapter ces bioessais pour permettre leur utilisation sur le terrain. En parallèle nous avons travaillé à l'amélioration d'un biocapteur enzymatique à cellules algales. Nous avons évalué ses performances sur les échantillons de RUTP et nous avons ensuite construit une station de mesure automatisée afin de réaliser des mesures directement sur les sites d'assainissement (*on line monitoring*).

MOTS-CLES : RUTP ; bioessais ; biocapteurs ; microalgues ; activités enzymatiques ; fluorescence chlorophyllienne ; sol-gel ; écotoxicologie

Laboratoire (s) de recherche : Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (LEHNA), Equipe Impacts des Polluants sur les Ecosystèmes au sein de l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat (ENTPE) à Vaulx en Velin (69)

Directeurs de thèse:

Claude DURRIEU

Yves PERRODIN

Président de jury :

Composition du jury :

Mme Claude DURRIEU, ITPE, Enseignant-Chercheur, LEHNA - ENTPE

M. Yves PERRODIN, Directeur de recherche, LEHNA - ENTPE

Mme Nicole JAFFREZIC-RENAULT, Directeur de recherche, ISA - Université Claude Bernard Lyon 1

Mme Sylvie BARRAUD, Professeur, LGCIE - INSA de Lyon

Mme Sara A. BILMES, Professeur, INQUIMAE - Université de Buenos Aires

Mme Valeria MEZZANOTTE, Professeur, DISAT - Université de Milan Bicocca

Mme Marie-Christine GROMAIRE, Chargée de recherche, LEESU – ENPC

M. Canh TRAN-MINH, Professeur honoraire, retraité de l'Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint Etienne