

Projet Seine-Aval 5

CRAPPSE

« Contamination et RéActivité de Pesticides et de
Pharmaceutiques dans l'estuaire de Seine »

Avril 2018

Coordination : Patrick Mazellier

Co-auteurs : Laura Fuster, Hélène Budzinski, Jeanne Garric, Jérôme
Couteau, Sélim. Aït-Aïssa



TABLE DES MATIERES

RESUME EXECUTIF	4
SCIENTIFIQUES AYANT PARTICIPE AU PROJET	7
PARTICIPANTS AU SUIVI DE PROJET	7
RESULTATS	8
Introduction	8
1 Zone d'étude et stratégie d'échantillonnage	10
1.1 Descriptif des types d'échantillonnage réalisés	10
1.2 Sites d'étude	11
1.2.1 Caractérisation des apports	11
1.2.2 Suivi de molécules traceurs dans le milieu	11
2 Caractérisation des apports en contaminants en estuaire de Seine	12
2.1 Caractérisation des apports en molécules biologiquement actives	12
2.1.1 Préparation des échantillons pour les bioessais <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	12
2.1.2 Présence de composés dioxin-like et de perturbateurs endocriniens	12
2.1.3 Présence de composés génotoxiques et pro-génotoxiques	16
2.2 Caractérisation des effets toxiques sur des organismes à cycle courts	17
2.2.1 Espèces et protocole de tests	18
2.2.2 Résultats	21
2.2.3 Conclusions	24
2.3 Apports en contaminants polaires : pharmaceutiques, pesticides, désinfectants et filtres UV	25
2.3.1 Choix des molécules et synthèse des protocoles analytiques appliqués	25
2.3.2 Niveaux et profils de contamination en composés pharmaceutiques	26
2.3.3 Niveaux et profils de contamination en pesticides et biocides	28
2.3.4 Niveaux de contaminations en filtres UV.	31
2.3.5 Récapitulatifs des flux apportés en Seine	32
3 Présence de molécules traceurs en estuaire amont grâce à l'utilisation d'échantillonneurs passif en parallèle des prélèvements ponctuels	36
4 Réactivité des contaminants apportés en estuaire de Seine	40
4.1 Dégradation à l'obscurité en présence de bouchon vaseux	40
4.1.1 Descriptif des expériences d'incubation en microcosmes	40
4.1.2 Bilan de la réactivité des composés organiques	41
4.1.3 Evolution des activités biologiques au cours des phénomènes de dégradation	45
4.2 Photodégradation solaire	46



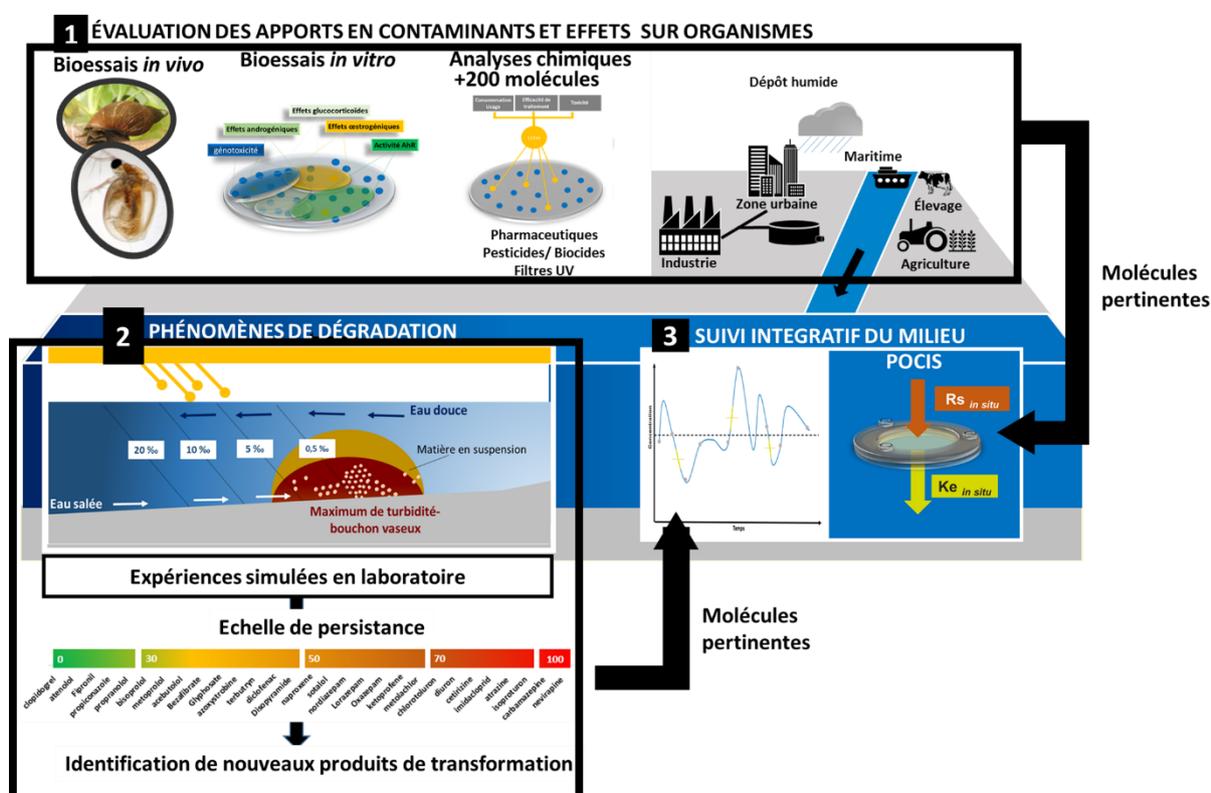
4.2.1	Descriptif des expériences d'irradiation solaire simulées	46
4.2.2	Réactivité des contaminants dans un échantillon prélevé et évolution des activités biologiques sous irradiation solaire simulée	47
5	Apport de la spectrométrie de masse haute résolution à la surveillance chimique.	51
5.1	Identification de nouveaux produits de transformation	52
5.2	Identification de molécules non ciblées par les analyses classiques	55
	Conclusion	58
	BIBLIOGRAPHIE	61
	ANNEXE 67	
	Liste des molécules recherchées dans le projet CRAPPSE.	67



RESUME EXECUTIF

Le projet CRAPPSE propose une approche pluridisciplinaire de l'étude de la contamination de la Seine et de son estuaire par les composés organiques polaires. Pour cela, ce projet étudie un large spectre de contaminants de polarité moyenne à élevée, en incluant des composés soit classés comme émergents, soit utilisés comme pesticides ou biocides. Ce projet a également pour objectifs de mieux appréhender les phénomènes de dégradation des molécules organiques et l'évolution de la toxicité associée. Ce projet s'articule ainsi en 3 axes :

- Caractérisation des apports en contaminants polaires en estuaire de Seine et recherche des produits de dégradation.
- Dégradation des contaminants à l'obscurité et photodégradation solaire.
- Caractérisation des effets toxiques des échantillons.



- **Caractérisation des apports en contaminants en estuaire de Seine**

L'objectif était de caractériser les apports en estuaire de Seine d'une grande diversité de contaminants polaires et via deux voies d'entrée : le barrage de Poses caractérisant les apports amont (Paris) et le rejet de la principale station de traitement des eaux usées (STEU) de l'estuaire : le petit Quevilly. Pour cela, tous les 2 mois pendant un an, un effluent de STEU moyenné 24h et un échantillon ponctuel provenant de Poses ont été récoltés. Cet échantillonnage a été complété par un échantillonnage passif de type POCIS de janvier à Mars 2015. La première phase de cette tâche a démontré l'omniprésence des composés pharmaceutiques (pour certains déjà étudiés lors du projet Seine-Aval 4 MEDSEINE) et des pesticides, grâce à 12 protocoles analytiques ultra-traces. Les résultats en lien avec les

composés pharmaceutiques sont conformes à ceux observés lors du projet antérieur MEDSEINE : un apport majoritaire provenant de l'amont (30 fois supérieur à Poses) a été observé. Pour aller plus loin, de nouveaux composés pharmaceutiques ont été recherchés : les nouveaux anticoagulants (NACO) qui tendent à devenir des molécules préoccupantes dans l'environnement de par l'augmentation de leur vente et de leur consommation ces dernières années. Certaines de ces molécules (dabigatran) ont été retrouvées jusqu'à 510 ng.L⁻¹ en sortie de STEU. D'autres grandes classes de contaminants ont été recherchées : les désinfectants et en particulier le triclosan qui a été retrouvé à des concentrations de 17 ng.L⁻¹ à Rouen (effluent traité).

Le potentiel toxique des échantillons a été mesuré à l'aide d'un panel de bioessais *in vitro* ciblant différentes familles de toxiques telles que des perturbateurs endocriniens (composés œstrogéniques, androgéniques et glucocorticoïdes), des composés dioxine-like et des composés génotoxiques ou pro-génotoxiques. Les campagnes menées entre mai 2014 et mars 2015, ont révélé des profils d'activités montrant la présence, dans l'effluent de STEU et dans l'eau de Seine, de composés ayant une activité de type œstrogénique, glucocorticoïdique et génotoxique, quelle que soit la période d'échantillonnage. Ces résultats appuient ceux précédemment rapportés dans le cadre du projet Seine-Aval 4 MedSeine.

- **Réactivité des contaminants apportés en estuaire de Seine**

- ✓ *Dégradation à l'obscurité en présence de bouchon vaseux (BV)*

Le rôle accélérateur ou inhibiteur de ce milieu récepteur particulier (BV) dans la dégradation des composés présents en sortie de STEU de Rouen a été étudié. Deux incubations *in vitro* d'eaux estuariennes (Seine en Juillet 2015 et Gironde en octobre 2015) mélangées à l'effluent de STEU ont été réalisées. Au total, sur les 50 échantillons récoltés, 8 protocoles analytiques ont été utilisés sur la phase dissoute pour évaluer la dégradation des composés pharmaceutiques, des pesticides et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP - en lien avec le projet Seine—Aval 5 MOSAIC). L'ensemble des données obtenues a permis d'évaluer les cinétiques de dégradation et le temps de demi-vie des composés en fonction des différents milieux étudiés (matières en suspension, salinité, stérilisation). Au final, un indice de persistance a été calculé pour chaque molécule permettant de donner une échelle relative de la stabilité des composés en Seine. Cette approche devrait permettre de mieux prendre en compte la persistance dans le cadre de la priorisation des molécules préoccupantes pour l'estuaire de Seine. En parallèle des analyses chimiques, différents bioessais *in vitro* ont été réalisés afin d'évaluer l'évolution des activités biologiques. Sur les différents tests appliqués (ER, AR et génotoxicité), aucune augmentation significative des effets n'a pu être observée. Cependant, une analyse globale par spectrométrie de masse haute résolution a été initiée dans le but de mettre en avant les produits de transformation générés durant ces expériences d'incubation. Les premiers résultats ont mis en avant l'élimination de 939 composés et la formation de près de 794 molécules au cours des 21 jours d'incubation. Au vu du nombre important de signaux détectés dans ces matrices, l'élucidation plus précise des structures des produits de transformation générés nécessitera un effort supplémentaire qui pourra s'étendre sur plusieurs mois.

✓ *Photodégradation solaire*

Dans un premier temps l'objectif a été d'évaluer la stabilité de divers contaminants polaires et l'évolution des activités biologiques, au sein d'un échantillon naturel. Pour cela, un effluent de la STEU de Rouen a été irradié sous un rayonnement solaire artificiel (SUNTEST CPS+, Atlas). Neuf protocoles analytiques ont été appliqués afin d'évaluer la stabilité des contaminants apportés en Seine. Aucune augmentation des effets biologiques étudiés n'a pu être mise en évidence (génétoxicité, activités œstrogéniques et androgéniques). Dans un deuxième temps, des études cinétiques ont été réalisées sur des molécules sélectionnées pour leur occurrence, leur toxicité ou le manque de données bibliographiques. Les cinétiques de dégradation et les temps de demi-vie en eau ultrapure (photodégradation directe) et en eau de rivière (photodégradation directe et indirecte) ont été calculés. Pour certaines familles (fluoroquinolones et NACO) dont les données bibliographiques sont encore rares, l'impact de la matière organique et des ions dissous sur les cinétiques de dégradation a été évalué. Un travail complémentaire en spectrométrie de masse haute résolution a permis d'identifier et de confirmer la structure de 4 photoproduits, et de suspecter la structure d'un grand nombre de produits de transformation issus de la dégradation du dabigatran, de l'apixaban, du rivaroxaban, de l'ofloxacine, de la sarafloxacine, de la danofloxacine et de l'abacavir.

- **Présence de produits de transformation dans le milieu**

Dans le but d'évaluer la présence de composés traceurs et de rechercher la présence des produits de transformation identifiés en laboratoire, une campagne d'échantillonnage de 6 mois a été initiée fin novembre 2016. Trois sites ont été choisis : Oissel, La Bouille et Caudebec. Pour pallier les faibles concentrations de ces milieux, des échantillonneurs passifs de type Polar Organic Chemical Sampler (POCIS) ont été exposés pendant 1 mois sur site, et des échantillonnages ponctuels ont été réalisés en parallèle. Les deux objectifs majeurs de cette phase ont été : ⁽¹⁾ de réaliser une approche quantitative afin d'évaluer les concentrations de quelques composés traceurs dans ces milieux ; ⁽²⁾ d'utiliser les capacités de concentration des POCIS et la spectrométrie de masse haute résolution pour évaluer la présence des produits de transformation identifiés en laboratoire.

SCIENTIFIQUES AYANT PARTICIPE AU PROJET

- **Equipe 1** : UMR EPOC, LPTC, Université de Bordeaux

Coordination scientifique : Hélène Budzinski

Autres chercheurs (ou équivalents) : Laura. Fuster, Edith. Parlanti, Patrick. Mazellier, Aurélien Trivella, Karyn. Le Menach, Patrick Pardon, Marie-Hélène. Dévier, Emmanuel Geneste

- **Equipe 2** : Laboratoire d'écotoxicologie, IRSTEA

Coordination scientifique : Jeanne Garric

Autres chercheurs (ou équivalents) : Hervé Queau, Alexandre Sapin

- **Equipe 3** INERIS

Coordination scientifique : Sélim. Aït-Aïssa

Autres chercheurs (ou équivalents) : Emmanuelle Marechal-Maillot

- **Equipe 4** TOXEM

Coordination scientifique : Jérôme Couteau

Autres chercheurs (ou équivalents) : Géraldine Loppion

PARTICIPANTS AU SUIVI DE PROJET

Personnes ayant contribué au suivi du projet ou ponctuellement à un atelier de travail.

Acteurs de l'estuaire : Guillaume Fresnel (Métropole Rouen Normandie), Olivier Pascoet (Métropole Rouen Normandie), Barbara Leroy (AESN), Claire Berville (GPMR).

Scientifiques : Yves Lévi* (Université Paris Sud – Groupe Santé publique-environnement), Claude Amiard-Triquet (Université de Nantes)

Introduction

La qualité des eaux est impactée par les apports en contaminants résultant de différentes activités anthropiques. Ainsi des milliers de molécules avec des propriétés physico-chimiques diverses sont apportées dans les écosystèmes aquatiques. Ces molécules proviennent d'usages multiples : industriels, domestiques et agricoles. Le bassin versant de la Seine représente un territoire de 78 600 km², soit 12% de la superficie nationale, plus d'un quart de la population française et 30 % de l'activité agricole du pays. Ce territoire est occupé à 7,1 % par des zones urbaines comme notamment l'agglomération parisienne et à 66.5 % par des terres agricoles. En raison de pressions urbaines et agricoles massives, l'apport de contaminants, en estuaire de Seine, doit être renseigné. Ces composés sont introduits par différents vecteurs comme par exemple les rejets de stations de traitement des eaux usées (STEU), le lessivage et le ruissèlement ou encore les introductions directes via des bassins d'élevage aquacoles ou rejets accidentels.

Différentes directives visent à améliorer la qualité des eaux, c'est notamment le cas de la directive cadre sur l'eau (2000/60/CE) qui vise à atteindre un bon état écologique et chimique des masses d'eau. En effet, les contaminants historiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les polychlorobiphényles (PCB) et les pesticides organophosphorés ont déjà fait l'objet de nombreuses études. Cependant, l'état chimique n'est pas toujours représentatif de la qualité écologique des masses d'eau. Ce constat est en partie dû au nombre restreint de molécules concernées par la surveillance chimique des masses d'eau. En effet, par contraste aux 70 000 milles molécules utilisées quotidiennement, seulement 45 substances prioritaires / prioritaires dangereuses sont concernées par la surveillance chimique (2013/39/CE), pour des raisons économiques ou techniques. En complément, une liste de vigilance annexe, incluant 8 pesticides, 6 composés pharmaceutiques et 3 hormones, a également été rajoutée en 2015.

Pourtant, le nombre de composés identifiés n'a cessé d'augmenter depuis ces dernières années grâce aux progrès de la chimie analytique et notamment de la spectrométrie de masse. Ces avancées ont permis la mise en évidence de nouvelles molécules dites d'intérêt émergent dont font partie les composés polaires (produits pharmaceutiques et de soin personnel, pesticides, hormones). Même à faibles concentrations, certains composés peuvent engendrer une toxicité et des activités biologiques comme notamment des effets génotoxiques ou encore des perturbations endocriniennes. Par ailleurs, au niveau de l'Union Européenne (UE), une liste intégrant 553 molécules suspectées d'être des perturbateurs endocriniens a d'ores et déjà été établie. Dans cette liste, différentes classes chimiques sont représentées comme notamment un grand nombre de pesticides et biocides utilisés couramment. Par ailleurs, à l'échelle nationale, des campagnes prospectives de surveillance chimique ont été mises en place en concomitance de différents plans tels que le plan micropolluants (2010-2013) ou le plan 2011-2015 sur les résidus médicamenteux.

Différentes études prospectives ont été menées ces dernières années afin de mettre en évidence les contaminants les plus retrouvés dans les eaux de surfaces. Une recherche de 223 molécules potentiellement toxiques a été menée afin de réaliser une première évaluation du risque chimique au niveau de 91 bassins hydrographiques européens. En définitive, 14 % des bassins suivis présentent un risque de contamination aiguë et 42 % sont concernés par un risque chronique (Malaj et al., 2014). Busch et son équipe ont recherché 970 molécules



dans différentes rivières européennes. Sur l'ensemble des molécules recherchées, 426 ont été détectées au moins une fois. Les pesticides, les médicaments et les biocides sont les molécules les plus représentées avec respectivement 41, 30 et 21% des molécules retrouvées (Busch et al., 2016).

En terme de surveillance chimique, des méthodes analytiques ciblées toujours plus pointues permettent de déterminer la présence de composés à l'état de traces voir d'ultra-traces (ng.L^{-1}), même si, ces méthodes ciblées nécessitent une présélection des molécules à suivre et ne rendent pas compte de l'ensemble des molécules présentes dans une matrice. Le développement de techniques innovantes en spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) permet d'améliorer le screening de l'ensemble des molécules présentes. Cependant ce type de méthodes reste, à l'heure actuelle, longue et difficile à mettre en œuvre. Afin de pallier ces limites, l'utilisation d'outils alternatifs basés sur la biodétection des molécules actives a déjà montré sa pertinence (Creusot et al., 2014). Ces bioessais *in vitro* permettent ainsi de détecter la présence de composés par leur mécanisme d'action (génétoxicité ou liaison aux récepteurs impliqués dans la perturbation endocrinienne).

Du fait des interactions potentielles entre ces molécules, la prise en compte de la présence de ces contaminants dans un mélange complexe en perpétuelle évolution est inévitable. En plus d'être présents en mélange, ces molécules subissent des phénomènes de dégradation (hydrolyse, biodégradation, photodégradation). Ainsi, la présence et le devenir d'une molécule sont dépendants de ses paramètres intrinsèques ($\log K_{OW}$, solubilité, pKa) mais également du milieu récepteur (matières en suspension, température, rayonnement solaire, micro-organismes). Ces processus peuvent conduire à la génération de produits de transformation qui sont encore trop peu pris en compte dans l'évaluation du risque, alors qu'ils sont susceptibles d'occasionner des effets toxiques plus importants que les molécules mères (Escher et Fenner, 2011). Du fait d'un manque de données sur la présence et la dégradation des contaminants, l'évaluation du risque environnemental reste peu fiable. De plus, l'impact écotoxicologique nécessite préalablement l'obtention d'une vision globale quant à la présence et au devenir de ces molécules mais aussi la mise en œuvre de techniques afin d'identifier de nouveaux produits de transformation mais surtout les molécules (mère ou produits de transformation) biologiquement préoccupantes.

Le projet Seine-Aval 4 MedSeine avait déjà permis d'obtenir des informations solides quant à la contamination de l'estuaire de Seine en médicament. Le projet CRAPPSE propose une approche pluridisciplinaire de l'étude de la contamination de la Seine ainsi que de son estuaire par les composés organiques polaires. Pour cela, ce projet étudie un large spectre de contaminants de polarité moyenne à élevée, en incluant des composés soit classés comme émergents, soit utilisés comme pesticides ou biocides. Ce projet a également pour objectifs de mieux appréhender les phénomènes de dégradation des molécules organiques et l'évolution de la toxicité associée. Ce projet s'articule ainsi en 3 axes :

- Caractérisation des apports en contaminants polaires en estuaire de Seine et recherche des produits de dégradation.
- Dégradation des contaminants à l'obscurité et photodégradation solaire.
- Caractérisation des effets toxiques des échantillons.

1 Zone d'étude et stratégie d'échantillonnage

1.1 Descriptif des types d'échantillonnage réalisés

L'échantillonnage ponctuel est un prélèvement d'eau à un temps et un endroit donné. Il représente une image instantanée de la contamination (Figure 1A). En ce sens, il n'est pas toujours représentatif des fluctuations des concentrations dans le compartiment dissous. Dans le cas de l'effluent de STEU, des échantillons moyennés 24h ont été prélevés. Ce type de prélèvement est un mélange de plusieurs prélèvements réalisés au même endroit mais à des temps différents, il permet ainsi de lisser les variations journalières. Ce type d'échantillonnage a donc été choisi pour caractériser le rejet de la station d'épuration qui peut être variable au cours d'une journée.

Dans le même ordre d'idée, dans le but de pallier les problèmes de variabilités temporelles (Figure 1A) et de suivre l'évolution de la contamination sur plusieurs jours, des échantillonneurs passifs de type POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) ont été associés à certains prélèvements ponctuels. Classiquement ils sont composés d'un adsorbant (ou d'un absorbant) capable de piéger les contaminants chimiques du milieu à analyser sans mécanisme d'extraction actif. Ce type d'échantillonneur est particulièrement adapté aux molécules polaires (forte affinité avec l'eau) en raison de leur $\log K_{OW}$ (coefficient octanol / eau) compris entre 2 et 4. Chaque POCIS assemblé en laboratoire, contient 200 mg de phase solide adsorbante (OASIS® HLB : copolymère de divinylbenzène et n-vinylpyrrolidone) emprisonnée entre deux membranes semi-perméables en polyéthersulfone (PES) de 0,1 μm de diamètre de pores (Figure 1B). L'ensemble est maintenu entre deux anneaux en acier inoxydable. Après assemblage en laboratoire, les échantillonneurs sont montés sur des supports métalliques « Hodler », placés dans des cages protectrices (Figure 1C). L'ensemble est immergé dans l'eau pour une durée variable allant de quelques jours dans les eaux suspectées d'être fortement contaminées, jusqu'à 1 mois pour les milieux les plus dilués. La phase adsorbante extraite en laboratoire peut par la suite être testée biologiquement via des tests *in vitro* ou être caractérisée d'un point de vue chimique.

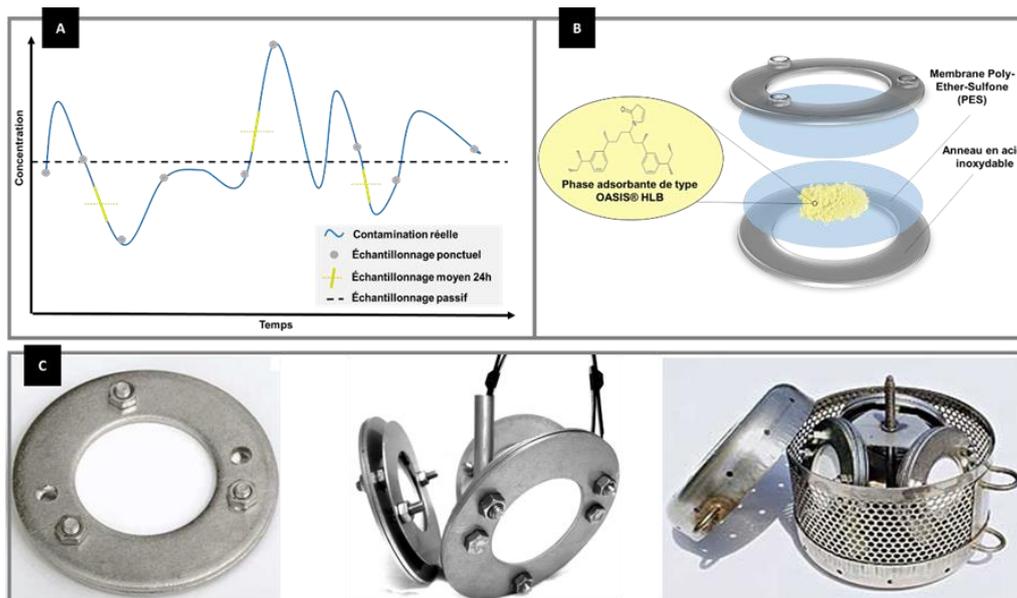


Figure 1 : A : Représentation schématique des différents types d'échantillonnage et de leur intégration de la contamination ; B : vue éclatée d'un échantillonneur passif de type POCIS ; C : Photographies (de gauche à droite) d'un POCIS, d'un holder et d'une cage.



1.2 Sites d'étude

1.2.1 Caractérisation des apports

Deux points d'entrée ont été échantillonnés (Figure 2): le barrage de Poses caractérisant les apports amont (Paris) et le rejet de la principale station de traitement des eaux usées (STEU) de l'estuaire : le petit Quevilly qui possède une capacité nominale de 500 000 équivalents habitant et un débit de référence de $85000 \text{ m}^3 \cdot \text{j}^{-1}$. Les deux sites ont été suivis tous les 2 mois pendant 1 an par le prélèvement des échantillons ponctuels au niveau du barrage de Poses et d'échantillon moyenné 24h au niveau de l'effluent de STEU. Les différentes campagnes se sont échelonnées entre mai et 2014 et mars 2015 (Figure 2).

Les échantillons récoltés pendant cette année de suivis ont permis d'évaluer les apports en composés polaires mais également de réaliser les tests *in vitro* et *in vivo*. Dans le cas des bioessais, le principal challenge a été de concentrer suffisamment les masses d'eau, et en particulier au niveau du barrage de Poses, afin d'abaisser les limites de détection des différents bioessais. Pour ce faire, 5 L d'eau de sortie de STEU et 10 L prélevés au barrage de Poses ont été concentrés respectivement 2000 et 4000 fois pour chaque campagne d'échantillonnage. Pour compléter ce suivi, des échantillonneurs passifs de type POCIS ont été exposés lors d'une cinétique de 4 semaines, pendant le mois de janvier, aux effluents de la STEU du Petit Quevilly. Le but était de comparer ce type d'échantillonnage au prélèvement moyenné 24h quant à la biodétection des composés (*tests in vitro*). La même démarche a été réalisée au niveau du site de Poses où des échantillonneurs passifs ont été exposés pendant 4 semaines lors de 2 campagnes (janvier-février 2015 ; février-mars 2015). Le but a été ici de concentrer la contamination afin d'améliorer la sensibilité des tests *in vitro* qui demandent de grands facteurs de concentration.

1.2.2 Suivi de molécules traceurs dans le milieu

Dans le but d'évaluer la présence de composés traceurs et de rechercher la présence des produits de transformation identifiés en laboratoire, une campagne d'échantillonnage de 6 mois a été initiée fin novembre 2016. Trois sites ont été choisis : Oissel, La Bouille et Caudebec (Figure 2). Pour pallier les faibles concentrations de ces milieux, des échantillonneurs passifs de type Polar Organic Chemical Sampler (POCIS) ont été exposés entre 22 et 34 jours, et des échantillonnages ponctuels ont été réalisés en parallèle (Figure 2). Les deux objectifs majeurs de cette phase ont été : **(1)** de réaliser une approche quantitative afin d'évaluer les concentrations de quelques composés traceurs dans ces milieux ; **(2)** d'utiliser les capacités de concentration des POCIS et la spectrométrie de masse haute résolution pour évaluer la présence des produits de transformation préalablement identifiés en laboratoire.



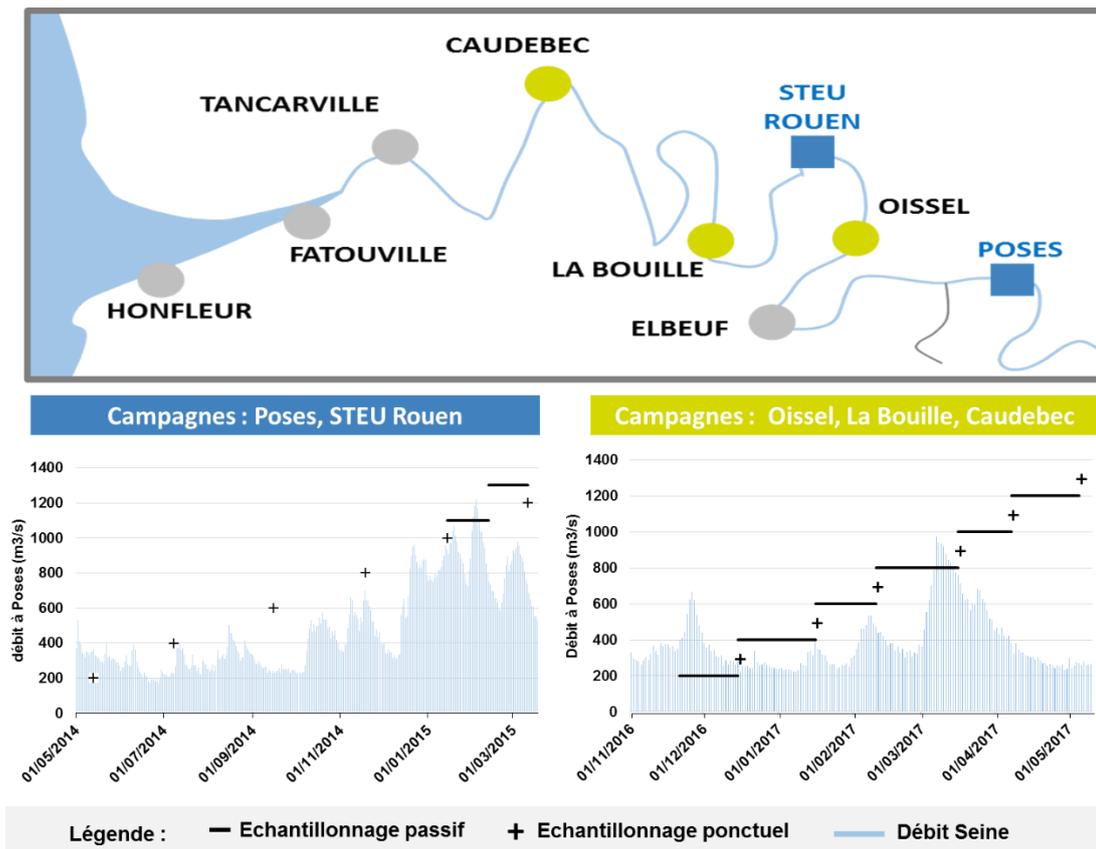


Figure 2 : Récapitulatif de la zone étudiée et des différentes campagnes d'échantillonnage réalisées.

2 Caractérisation des apports en contaminants en estuaire de Seine

2.1 Caractérisation des apports en molécules biologiquement actives

2.1.1 Préparation des échantillons pour les bioessais *in vitro* et *in vivo*

Différents biotests ont été appliqués sur l'ensemble des échantillons récoltés au niveau de Poses et de la STEU de Rouen. Le principal challenge est de concentrer suffisamment les masses d'eau et en particulier au niveau du barrage de Poses afin d'abaisser les limites de détection des différents tests. Pour ce faire, les échantillons ont été extraits sur un système SPE-DEX 4790® (Automated Extractor System ; Horizon Technology) et évaporés à sec sur un système Multivapor P 12® (Buchi) puis repris dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Au final, les échantillons ont été concentrés 2000 (sortie de STEP) à 4000 (barrage de Poses) fois. Ces échantillons reconcentrés ont été utilisés pour l'ensemble des bioessais (*in vitro* et *in vivo*).

2.1.2 Présence de composés dioxin-like et de perturbateurs endocriniens

Des bioessais *in vitro* ont été utilisés pour mesurer les activités de type perturbateurs endocriniens (PE) et dioxine-like (DL) dans les échantillons. Ces bioessais sont basés sur l'utilisation de cultures cellulaires exprimant des récepteurs spécifiques des œstrogènes, des androgènes, des glucocorticoïdes ou de la dioxine (Figure 3; Tableau I).

Tableau I : Bioessais *in vitro* pour l'évaluation des activités PE et DL. *Les cellules MDA-kb2 coexprimant les récepteurs AR et GR, une co-exposition avec la flutamide (anti-androgène) permet de déterminer l'implication de AR dans le cas d'une réponse positive du bioessai.

Bioessais	Activité	Principe	Unité en quantité d'équivalents-toxique relatifs à la substance de référence de chaque test
MELN	Œstrogénique	Récepteur des œstrogènes (ER) humain / luciférase	Equivalents-œstradiol (E2-Eq ng/L)
MDA-kb2*	Androgénique et glucocorticoïdique	Récepteurs des androgènes (AR) et des glucocorticoïdes (GR) humain / luciférase	Equivalents-Dihydrotestostérone (DHT-Eq ng/L) ou -Dexaméthasone (Dex-Eq µg/L)
MDA-kb2	Anti-androgénique	Récepteurs des androgènes (AR) humain activité / luciférase	Equivalents-Flutamide (FLU-Eq µg/L)
PLHC-1	HAP-like	Récepteur de la dioxine (AhR) / activité EROD	Equivalents-BaP (BaP-Eq µg/L)

La présence de molécules capables d'activer ces récepteurs va induire l'activation d'un gène rapporteur dont l'intensité de réponse est proportionnelle à la concentration en substance(s) active(s). La calibration du test par une molécule de référence, permet de quantifier l'activité de l'échantillon en équivalents-toxiques (Bio-TEQ) (Figure 3).

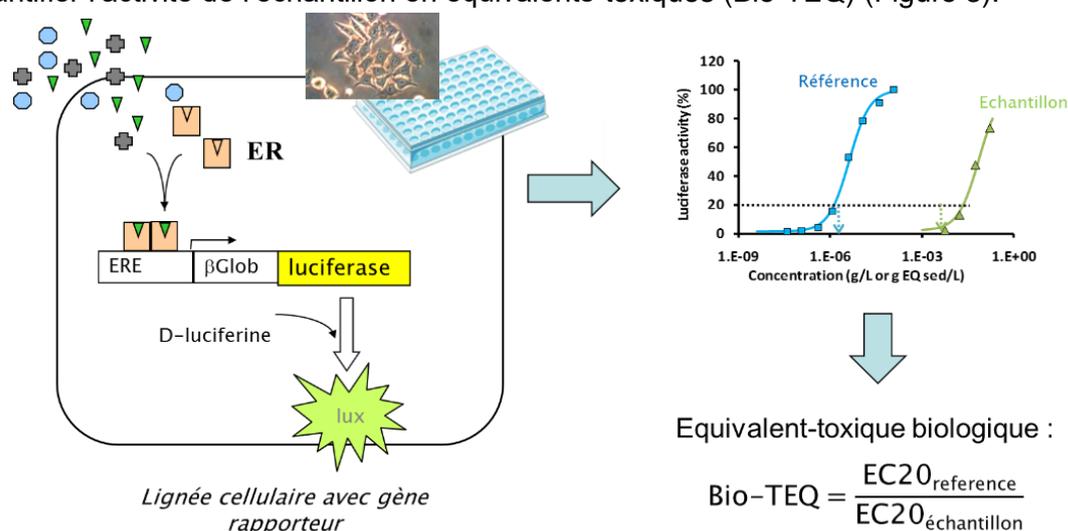


Figure 3 : Principe des bioessais *in vitro* utilisant des lignées cellulaires qui expriment un gène rapporteur (luciférase) activé par les récepteurs des hormones (ER) ou de la dioxine. Le schéma illustre les principales étapes de leur utilisation pour la quantification d'équivalent-hormone ou équivalent-toxique (Bio-TEQ) dans un extrait organique environnemental.

Les résultats montrent des profils d'activités multiples sur les deux sites investigués. L'effluent de STEU est ici clairement identifié comme une source significative et continue dans le temps de composés hormonaux de type œstrogénique (Figure 4 A) et glucocorticoïde (Figure 4 B), ce qui s'explique assez logiquement par les apports des eaux usées domestiques. Les bioessais ont été appliqués aux échantillons issus des campagnes de prélèvements d'eau de Seine à Poses et à la STEU de Rouen, de mai 2014 à mars 2015. Les résultats sont présentés dans la Figure 4.

Aucune activité (anti)androgénique significative n'est observée dans notre étude, bien que les effluents de STEU urbaines soient parfois décrits comme une source en composés androgéniques, en particulier en stéroïdes androgènes d'origine humaine (Bellet et al., 2012).

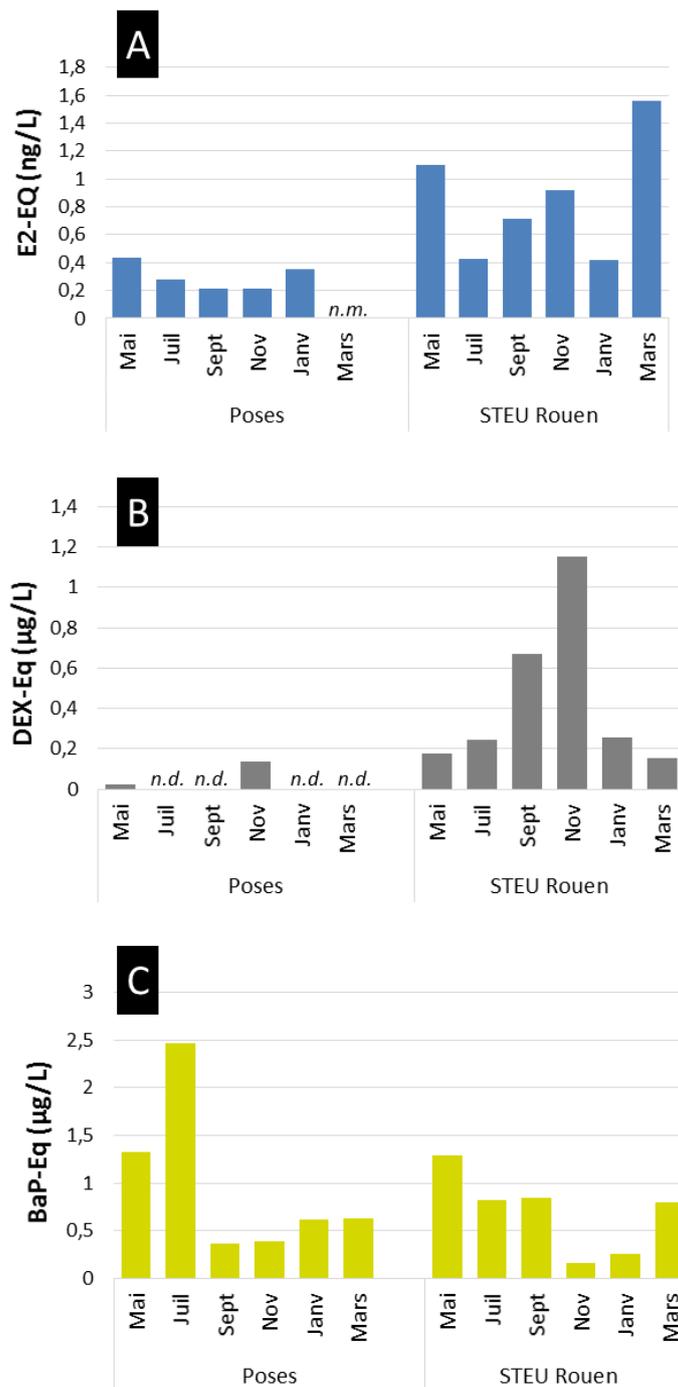


Figure 4 : Evolution des activités *in vitro* de type (A) œstrogénique (ER), (B) glucocorticoïde (GR) et (C) HAP-like (AhR) dans l'eau de Seine à Poses et l'effluent de STEU à Rouen au cours des 6 campagnes de mai 2014 à mars 2015. STEU de Rouen = prélèvement moyenné 24 h ; eau de Seine à Poses = prélèvement ponctuel. n.d. activité non détectée ; n.m. non mesurée (pas de donnée).

Ce résultat est cependant à mettre en regard de la présence de fortes activités de type glucocorticoïdes dans l'effluent qui, avec les androgènes, sont co-détectés par le bioessai MDA-kb2. Il n'est donc pas exclu que des traces de composés androgéniques soient présentes mais masquées dans le bioessai par la présence des glucocorticoïdes. L'utilisation d'un bioessai *in vitro* spécifique du récepteur des androgènes (AR) permettrait de conclure de manière plus définitive sur la présence/absence de ligands de AR dans nos échantillons. Enfin, des analyses supplémentaires ont été réalisées à titre exploratoire sur certains échantillons de STEU et d'eau de Seine pour évaluer la présence de ligands analogues de la progestérone



à l'aide d'un bioessai spécifique du récepteur de cette hormone (PR). Toutefois, aucune activité agoniste ou antagoniste PR n'a été observée (résultats non montrés).

Il est intéressant de noter que les concentrations en œstradiol-équivalents (E2-Eq) mesurées dans l'eau de Seine à Poses (valeur moyenne de $0,3 \pm 0,09$ ng E2-Eq.L⁻¹) et dans l'effluent (valeur moyenne de $0,9 \pm 0,4$ ng E2-Eq.L⁻¹) sont équivalentes ou supérieures à la norme de qualité environnementale préconisée pour l'œstradiol (0.4 ng.L⁻¹) dans le cadre de la directive européenne cadre sur l'Eau (Aït-Aïssa et Creusot, 2014). De plus, concernant l'activité œstrogénique *in vitro*, des valeurs guides au-delà desquelles il existerait un risque pour l'environnement aquatique ont été récemment proposées par différents auteurs. Selon les études, ces valeurs guides varient de 0,3 à 0,5 ng E2-Eq.L⁻¹ (Jarošová et al., 2014; Kunz et al., 2015; Van Der Osst et al., 2017). Il est à noter que, sur la base de ces valeurs, les concentrations que nous reportons dans l'eau de Seine à Poses conduiraient à déclasser ce site du point de vue réglementaire.

Des activités de type HAP-like (Figure 4 C) sont systématiquement détectées dans l'effluent de STEU et/ou dans l'eau de Seine, à des niveaux assez similaires ce qui suggère des origines multiples pour ces composés (à la fois eaux usées et pollutions plus diffuses). En général, les concentrations en B(a)P-Eq reportées ici sont en accord avec celles obtenues au cours du projet MedSeine en ce qui concerne la STEU de Rouen (Budzinski et al., 2014).

Ces campagnes ont révélé des profils d'activités montrant la présence, dans l'effluent de STEU et dans l'eau de Seine, d'activités de type œstrogénique, glucocorticoïdes et HAP-like. Le prélèvement ponctuel présente néanmoins plusieurs limites : 1) d'une part du point de vue de la représentativité de l'échantillon dans le temps puisqu'il reflète l'état de contamination à un moment fixe donné et ne prend pas en compte des variations dans le temps ; 2) d'autre part du point de vue logistique, puisqu'il a nécessité le prélèvement et le transport au laboratoire de volumes relativement conséquents d'eaux. Nous avons montré par le passé l'utilité d'utiliser des échantillonneurs passifs de type POCIS pour surveiller les activités *in vitro* dans l'eau (Tapie et al 2011, Creusot et al 2014). Dans le projet CRAPPSE, nous avons appliqué les mêmes bioessais *in vitro* aux POCIS déployés sur les sites de Poses et Rouen en 2015. Les résultats sont présentés dans le Tableau II.

Les résultats du Tableau II montrent les profils observés dans les extraits POCIS. L'effluent de STEU est clairement une source de composés à activité ER et GR. Ces activités sont également retrouvées sur le site de Poses, avec toutefois des activités GR très faibles (détectées mais non quantifiées). Concernant les activités HAP-like, les témoins d'extraction « laboratoire » et « terrain » se sont avérés positifs, possiblement à cause d'une contamination via l'air ambiant. L'échantillon de STEU reste cependant significativement plus contaminé. Enfin, nous avons étendu le diagnostic à l'évaluation de l'activité dioxin-like. Ce bioessai consiste à exposer les cellules pendant 24 h afin de minimiser la contribution des HAP qui sont rapidement (quelques heures) métabolisés par les cellules. Ce test a permis de montrer la présence dans les échantillons de Poses et de Rouen de ligands du récepteur AhR à des niveaux supérieurs à ceux présents dans les blancs. Les niveaux mesurés en composés activateurs de AhR restent cependant très faibles et sont majoritairement associés à des composés de type HAP.



Tableau II : Suivi des activités ER, GR et AhR dans les extraits de POCIS déployés sur les sites de Poses et de Rouen. (n.d. non détecté).

	Activité œstrogénique	Activité glucocorticoïde	Activité HAP-like (AhR - 4 h d'expo)	Activité dioxin-like (AhR - 24 h d'expo)
	ng E2-Eq/g HLB	ng DEX-Eq/g HLB	µg BaP-Eq/g HLB	ng TCDD-Eq/g HLB
Blanc "laboratoire"	n.d.	n.d.	0,6	n.d.
Blanc "terrain"	n.d.	n.d.	2,7	n.d.
Poses, Campagne 1	1,5	<LOQ	2,0	2,0
Poses, Campagne 2	2,2	<LOQ	0,8	1,0
STEU Rouen	34,8	9332	13,1	7,9

2.1.3 Présence de composés génotoxiques et pro-génotoxiques

Le SOS Chromotest est un test bactérien colorimétrique qui met en œuvre une souche génétiquement modifiée d'*E. Coli* (PQ37), chez laquelle a été opérée une fusion entre le gène *sfiA* (gène impliqué dans la mise en place de la réponse « SOS ») et un gène *lacZ* rapporté (gène codant pour la β-galactosidase). Lors de dommages à l'ADN entraînant un blocage de la fourche de réplication, de nombreux gènes intervenant dans la réparation d'ADN sont exprimés dont le gène *sfiA*. L'expression de ce gène induit donc l'expression du gène *LacZ* rapporté qui elle est quantifiable par la mesure de l'activité β-galactosidase. Ainsi, plus un composé est génotoxique, plus le taux d'altérations de l'ADN de la souche sera élevé, plus le système de réparation « SOS » sera induit et plus l'activité enzymatique β-galactosidase de la bactérie sera importante (Figure 5).

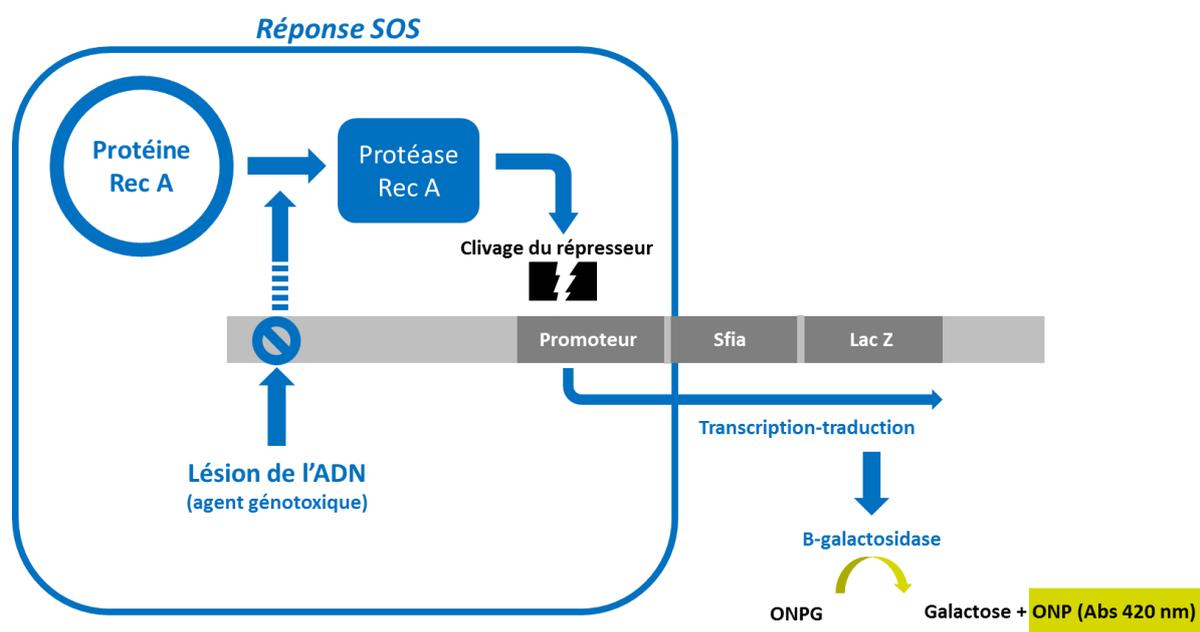


Figure 5 : Principe du SOS Chromotest.

Ainsi, à l'aide de réactifs spécifiques, l'induction de cette activité enzymatique est mesurée et relativisée par rapport à celle de l'alkaline phosphatase (contrôle de l'expression protéique) afin de déterminer le SOS Induction Factor (SIF) (Quillardet et Hofnung, 1985). L'évaluation de la génotoxicité à l'aide du SOS Chromotest a été réalisée sans et avec activation métabolique (S9). L'activation métabolique permet d'évaluer la génotoxicité de molécules nécessitant une bio-activation par les enzymes de détoxification.

Dans le cadre de cette étude d'induction de la réponse SOS dans les bactéries, la souche PQ37 d'*E. Coli*, a été exposée en triplicat à différentes concentrations d'extraits de sortie de STEU du barrage de Poses en présence et en l'absence d'une activation métabolique mammalienne (mix-S9). Parallèlement à ces analyses, des gammes de témoins positifs avec S9 (B[a]P) et sans S9 (NQO) ont été réalisées afin de déterminer des équivalents en molécules de référence pour chaque extrait de chacune des campagnes de prélèvements. Un test statistique (test de STUDENT) a ensuite été réalisé pour déterminer les différences significatives entre les SIF obtenus pour chaque concentration d'extrait testée et les témoins négatifs (DMSO avec ou sans S9). Les valeurs significativement différentes au risque 0,05 ont été utilisées pour déterminer les équivalents en molécules de référence.

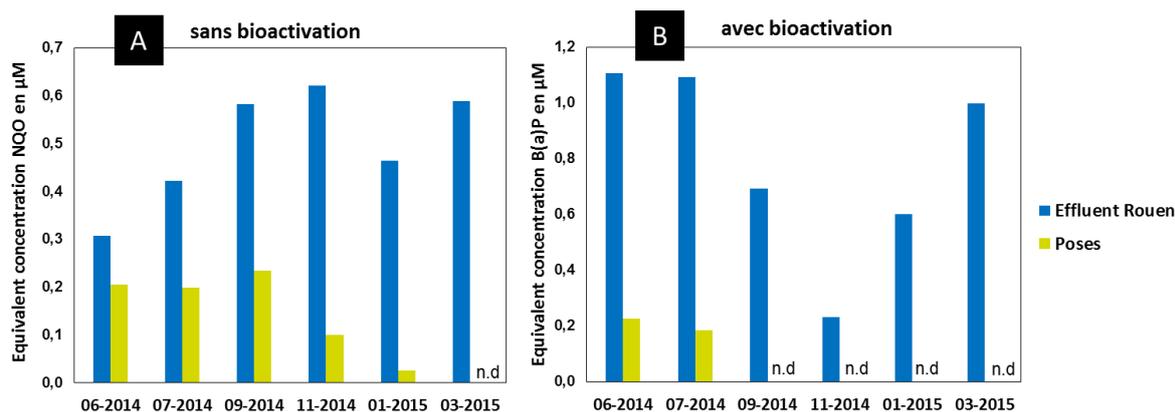


Figure 6 : Génotoxicité des extraits des différentes campagnes de prélèvements en équivalents de molécules de références (A : B[a]P avec S9 ; B : NQO sans S9).

L'évaluation de la génotoxicité montre que l'on retrouve un potentiel génotoxique direct (sans bioactivation) à la fois en sortie de STEU et au niveau du barrage de Poses. Cependant, ce potentiel est nettement plus important en sortie de STEU dans la mesure où il est de 1,5 à 6 fois plus important.

Le potentiel progénotoxique (avec bioactivation) est très faible au niveau du barrage de Poses. En effet, sur 4 des 6 prélèvements réalisés aucun potentiel génotoxique n'a été détecté. En sortie de STEU, le potentiel progénotoxique est plus important mais présente une variabilité assez importante (effet saisonnier ou efficacité de la STEU).

2.2 Caractérisation des effets toxiques sur des organismes à cycle courts

La toxicité potentielle des deux sites échantillonnés, le milieu récepteur au barrage de Poses et les effluents de la station d'épuration, a été évaluée à l'aide de deux bioessais sur invertébrés. Ces essais ont été sélectionnés pour répondre aux contraintes de l'étude, et en particulier la faible quantité d'échantillon disponible pour ces expérimentations du fait de l'extraction préalable. Ces essais ont été réalisés sur les extraits des échantillons ponctuels prélevés entre mai 2014 et mars 2015 (Cf. § I.1.1). La pré-concentration des échantillons (4000 fois pour l'eau à Poses et 2000 fois pour les effluents de STEU) nous a permis de réaliser des gammes de dilution, tout en recherchant une potentialité de toxicité, sur les extraits concentrés des milieux. En effet, on ne s'attend pas à une toxicité à court terme du milieu récepteur, alors que la présence de molécules actives, voire toxiques à long terme peut être suspectée dans nos zones d'étude.

2.2.1 Espèces et protocole de tests

Deux espèces d'invertébrés ont été retenues pour la mesure de la toxicité des échantillons, un crustacé cladocère *Ceriodaphnia dubia* sur lequel la survie des juvéniles a été mesurée durant 48 h d'exposition, et le gastéropode pulmoné *Lymnea stagnalis*, présent dans nos milieux d'eau douce. Sur cette espèce nous avons suivi le développement embryonnaire jusqu'à éclosion des juvéniles. Ces deux modèles sont cultivés au laboratoire. Les juvéniles de *C.dubia* et les masses d'œufs de lymnées utilisés lors des essais proviennent des adultes en culture.

Ces deux espèces sont largement utilisées en écotoxicologie et font l'objet de procédures de test normalisé pour le suivi de la reproduction en particulier (*C. dubia*, (AFNOR-NF T 90-376, 2003); *L. stagnalis*, (OCDE, 2016). Par ailleurs, la petite taille des organismes permet de travailler dans de petits volumes adaptés aux types d'échantillon dont nous disposons. Ces deux modèles nous permettent de suivre des critères d'effets sensibles et de natures différentes un effet systémique impactant la survie, et un effet plus ciblé sur l'embryogénèse. Des atteintes à la survie des juvéniles et des embryons sont de plus susceptibles d'affecter la dynamique des populations.

La survie des néonates de cériodaphnie a été mesurée selon un protocole identique au protocole d'essai sur la survie de *D. magna* (AFNOR-NF EN ISO 6341, 2012). La mesure de l'embryotoxicité sur les limnées est moins courante et aucun protocole normalisé n'étant disponible, nous avons suivi le protocole mis en œuvre par Bandow et Weltje (2012). Ces auteurs exposent des œufs individuellement, après extraction des masses pondues par les adultes. D'autres auteurs travaillent directement sur les masses, enveloppes gélatineuses contenant entre 20 et 100 œufs environ (Leung et al., 2007; Mazur et al., 2013). L'utilisation des œufs isolés permet un suivi individuel plus aisé et la mesure de plusieurs critères d'effet. Les protocoles d'essai mis en œuvre sont brièvement décrits ci-dessous.

Survie néonates *C. dubia*

Les cériodaphnies sont élevées en bouteilles de verre d'une contenance de 2 L de milieu M4. Elles sont maintenues dans une armoire thermostatée à une température de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, avec un éclairage jour/nuit de 16 : 8h. Tous les jours ouvrables, les cériodaphnies sont nourries d'une suspension algale (*Pseudokirchneriella subcapitata*). La quantité distribuée (10^5 cellules par cériodaphnie) est complétée par 1 mL de Spiruline concentrée à $1,25 \text{ g.L}^{-1}$. Tous les débuts de semaines, le milieu de culture de chaque bouteille est renouvelé de moitié avec un milieu neuf.

La veille du test, 12 femelles adultes minimum sont isolées dans des récipients de 30 mL contenant du milieu M4 et de la nourriture. Les récipients sont placés dans une armoire thermostatée à $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, sans contrôle d'humidité et un cycle jour/nuit 16 : 8h. Les juvéniles produits sont triés le matin et utilisés pour le test. Pour ce faire, 10 mL de la solution d'essai sont introduits dans des tubes en verre de 30 mL, avec 5 cériodaphnies âgées de moins de 24h. Pour chaque concentration, quatre réplicas sont réalisés. Les échantillons sont placés dans une armoire thermostatée à $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, à l'obscurité pendant 48h, et sans ajout de nourriture. La survie des juvéniles est mesurée (individus mobiles) après 24 et 48H d'exposition.

Développement et éclosion *L. stagnalis*

Les organismes utilisés pour la reproduction sont issus de parents sauvages prélevés dans le Rhône, puis maintenus au laboratoire en élevage. Ils ont été calibrés ($30 \pm 2 \text{ mm}$; $2,3 \pm 0,3 \text{ g}$) et sont maintenus dans deux aquariums de 20 L remplis d'eau de forage (pH 7,2-7,5 ;



conductivité 520 μS), avec un renouvellement d'eau continu (température $20 \pm 1^\circ\text{C}$) et nourris ad libitum avec de la laitue.

Afin de démarrer le test avec des œufs âgés de moins de 24h, la veille du test, toutes les masses sont retirées des aquariums. Le jour du test, deux masses au minimum, âgées de $24 \pm 1\text{h}$ sont récoltées avec précaution. Les masses sont détachées de leur support (paroi aquarium, coquilles ...) et remises immédiatement dans un récipient adéquat contenant l'eau du milieu à la même température. Les embryons sont extraits des masses gélatineuses à l'aide d'une pince et d'un scalpel sous une loupe binoculaire. Dès leur extraction, afin de s'assurer de leur répartition et de leur qualité, ils sont immédiatement isolés dans les puits d'une microplaque 96 puits remplis de 250 μL d'eau d'élevage. Tout œuf suspect (chorion endommagé, double fécondation, œuf éclaté...) est éliminé (Figure 7). Parallèlement une plaque 96 puits est préparée, contenant 250 μL de solution d'essai. Après vérification de leur qualité, les œufs sont transférés dans la plaque contenant les solutions d'essai. Pour chaque plaque les œufs sont issus de plusieurs masses afin d'obtenir des données indépendantes de la masse. Une fois les œufs introduits (10 individus par concentration), la microplaque est recouverte d'un couvercle et placée dans une armoire thermostatée à $21 \pm 1^\circ\text{C}$, avec un cycle jour/nuit 16 : 8h, sans contrôle d'humidité.

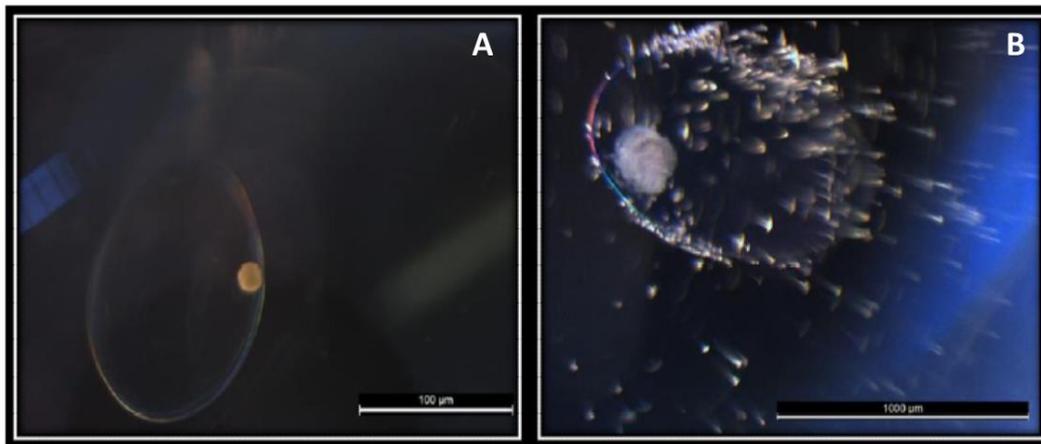


Figure 7 : Visualisation d'un œuf intact (A) et d'un œuf éclaté (B).

Quatre stades de développement sont aisément observables, d'une durée totale variant autour de 12 jours à la température d'essai choisie (Figure 8A). La Figure 8 B présente, pour comparaison, des embryons (fin stade HIPPO) normaux et anormaux. Pendant toute la durée du test et jusqu'à l'éclosion complète des organismes témoins, des renouvellements partiels du milieu sont réalisés deux fois par semaine, le lundi et vendredi. Pour ce faire 150 μL de milieu sont retirés à l'aide d'une micropipette et remplacés par 150 μL de milieu neuf. Chaque jour, à heure fixe les œufs sont observés à la loupe binoculaire directement dans le puit d'essai. Le stade de développement est noté, ainsi que toutes malformations ou anomalies. A partir du stade Hippo (environ 7 jours) le rythme cardiaque est mesuré pendant 30 secondes sous loupe binoculaire et la présence des yeux est notée, puis que les embryons éclos. Le test est terminé quand 90% au moins des embryons témoins ont éclos, (entre 12 et 15 jours dans les conditions d'essais).



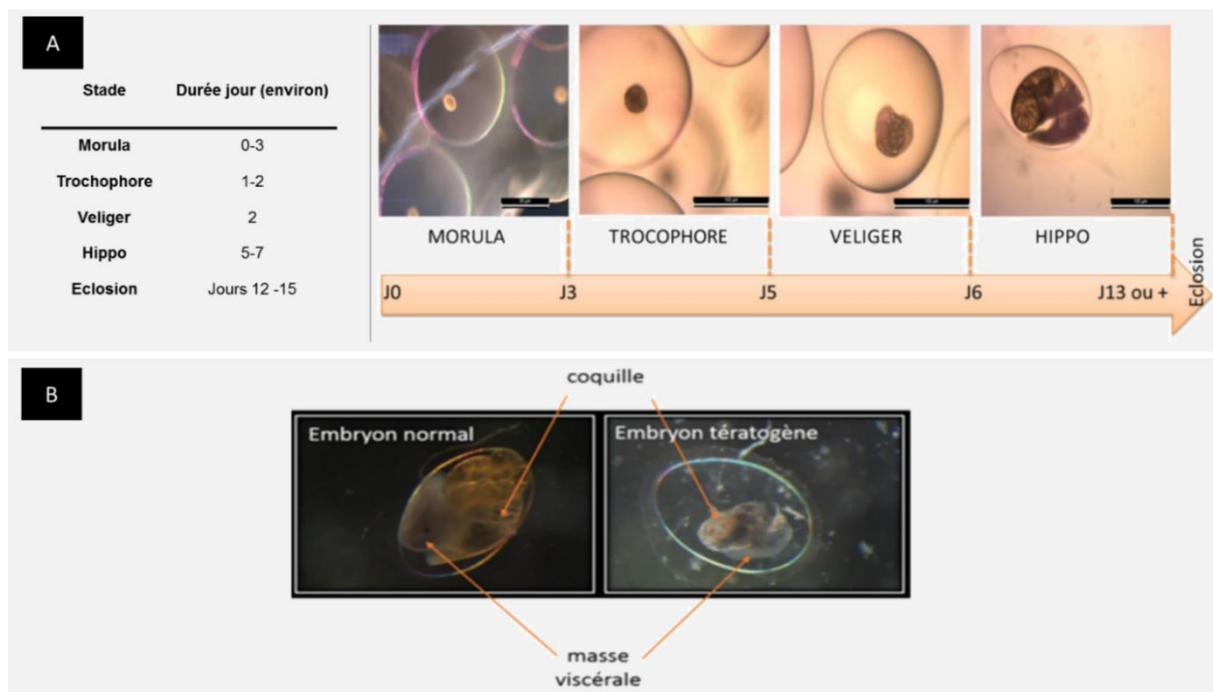


Figure 8 : (A) Développement embryonnaire de *Lymnaea stagnalis* ; (B) Embryons de limnée (stade Hippe).

Pour les essais, 3 critères de toxicité ont été plus particulièrement étudiés sur les embryons : la survie, la taille (surface mesurée à partir de photographie sous loupe binoculaire) et enfin l'éclosion. Le taux de croissance par jour est ensuite calculé à partir des mesures de surfaces entre le stade trochophore et le début du stade hippe (J4 et J7).

Réalisation des essais

Les tests sont réalisés en utilisant des extraits d'effluents de STEU concentrés 2000 fois et des extraits d'eau de surface du barrage de Poses concentrés 4000 fois. Ces extraits repris dans du DMSO, ont été ensuite envoyés au laboratoire où ils ont été conservés à 4°C.

Six extraits correspondant aux six dates différentes d'échantillonnage ont été testés (Cf. § I 1.1). Ces échantillons ont été prélevés au niveau de la station d'épuration de Rouen et au niveau du barrage de Poses en amont de Rouen. Pour chacun d'eux, nous disposons de 4 échantillons devant être testés simultanément:

- l'extrait de l'effluent de la station d'épuration (ES),
- l'extrait d'eau de surface (P),
- un blanc DMSO (Bd) dans lequel sont repris et conservés les extraits,
- un blanc d'extraction (Bex) pour vérifier l'absence de toxicité éventuel lié au protocole d'extraction.

Le Tableau III présente les concentrations testées pour les extraits et les blancs (DMSO et extraction).

Pour chaque extrait, nous avons réalisé avec de l'eau de milieu d'essai (eau de forage pour la limnée et M4 pour la céridaphnie) une série de dilutions. La gamme réalisée (Tableau III) permet de représenter le milieu de départ (1X), et de rechercher une potentialité toxique dans les eaux. Pour l'effluent de station d'épuration, susceptible de présenter une toxicité, nous avons inclus une dilution au ½ du milieu initial.

Tableau III : Conditions de réalisation des essais sur effluents (Es) et eau de surface à Poses (P).

Dates de prélèvement Cf. Fig 3	Echantillons	Concentrations				T°C test C. Dubia	T°C tests limées
0514	ES	20X	2X	1X	0,5X	21,9 ±0,2	22, 5 ±0,3
	EP	40X	10X	1X			
	Bex		Dilution 1/100 ^{ème}				
	Bd		Dilution 1/100 ^{ème}				
0714	ES	20X	2X	1X	0,5X	22, 1±0,3	22,3±0,4
	EP	40X	10X	1X			
	Bex		Dilution 1/100 ^{ème}				
	Bd		Dilution 1/100 ^{ème}				
0914	ES	20X	2X	1X	0,5X	22,5±0,2	22,3±0,4
	EP	40X	10X	1X			
	Bex		Dilution 1/100 ^{ème}				
	Bd		Dilution 1/100 ^{ème}				
1114	ES	20X	2X	1X	0,5X	22,3±0,1	22,5±0,3
	EP	40X	10X	1X			
	Bex		Dilution 1/100 ^{ème}				
	Bd		Dilution 1/100 ^{ème}				
0115	ES	20X	2X	1X	0,5X	22,0±0,2	22,6±0,4
	EP	40X	10X	1X			
	Bex		Dilution 1/100 ^{ème}				
	Bd		Dilution 1/100 ^{ème}				
0315	ES	20X	2X	1X	0,5X	22,0±0,1	22,6±0,3
	EP	40X	10X	1X			
	Bex		Dilution 1/100 ^{ème}				
	Bd		Dilution 1/100 ^{ème}				

Pour les 2 blancs, une dilution au 100^{ème} a été choisie afin de représenter la concentration en DMSO et en eau d'extraction présente dans les extraits à la plus forte concentration testée, 20X pour les effluents et 40X pour les eaux de surface. Ceci afin d'être en mesure de déterminer si les effets observés dans les plus fortes concentrations des extraits sont dus soit à ces derniers eux-mêmes, soit au DMSO ou à l'eau d'extraction utilisés.

2.2.2 Résultats

Test d'embryotoxicité sur *Limnea stagnalis*

Ces travaux nous ont permis, en premier lieu de valider différents critères de toxicité retenus pour le test d'embryogénèse de limnée dans nos conditions d'essai. Pour illustration, nous présentons la gamme de taille attendue pour les individus témoins au cours de leur développement (Figure 9 A) et le suivi du rythme cardiaque (battement /30s) des individus témoins en fonction de la taille mesurée (stade Hippo) (Figure 9 B) qui montre que cette variable est indépendante de la taille à ce stade et permet de caractériser le bon état des organismes.



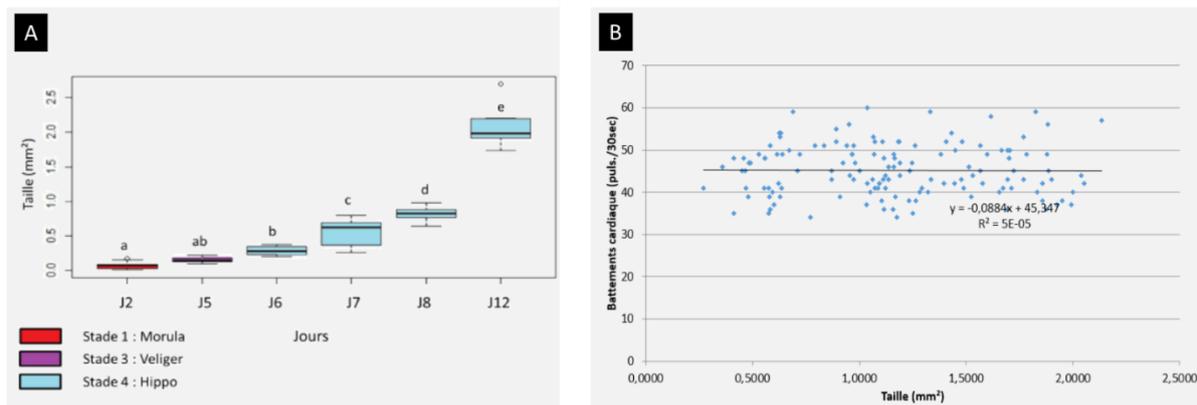


Figure 9 : (A) Distribution des tailles des embryons au cours du développement ; (B) Distribution de la fréquence cardiaque d'embryons de limnées (stade hippo).

Lors des essais sur extraits, les résultats sur les témoins, taux de survie des cériodaphnies (80%) et taux d'éclosion des limnées (> 90% en 12 jours) ont tous été satisfaisants et ont permis de valider les essais.

- Les résultats sur le taux de croissance ne sont pas disponibles pour les échantillons des séries ES1114 et P0514 du fait d'erreur de manipulation.
- Les résultats, taux de croissance des embryons, taux et temps 50 d'éclosion (durée nécessaire pour atteindre 50% d'éclosion) ont été calculés puis comparés au moyen de tests statistiques appropriés (après vérification de la normalité et de l'homogénéité des variances). Ils sont synthétisés dans les Figure 10 A et B et les tableaux ci-dessous.

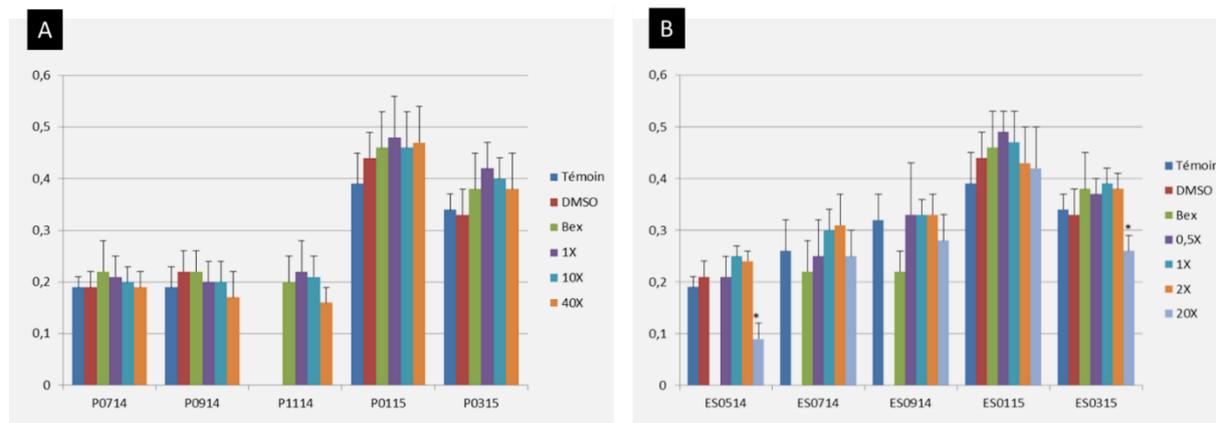


Figure 10 : Taux de croissance des embryons exposés aux extraits d'eaux de surface (A) et d'effluents (B).

On observe un effet significatif sur le taux de croissance des organismes et sur leur développement (petits embryons malformés), comparativement aux témoins (eau, DMSO et Bex) pour deux extraits d'effluents (ES414 et ES0315), mais à la plus forte concentration testée uniquement (X20). Ces effets ne sont plus observables pour des dilutions plus grandes. A contrario, aucun effet significatif n'est mesuré sur les extraits des eaux de surface même à la plus forte concentration (X40). Les taux d'éclosion à 12 jours (%) et le temps 50 d'éclosion sont présentés ci-dessous (Tableau IV).

Tableau IV : Taux et TE50 (jour) d'éclosion des embryons de limnées exposés aux extraits d'effluent (ES) et d'eau de surface (P). NC non calculable.

	0514		0714		0914		1114		0115		0315	
	% Eclos	TE ₅₀										
Témoin	100	10	100	10	78	9,8	100	10,8	100	10	100	10,5
DMSO1%	100	10,8	100	10	100	10	80	10,9	90	11,1	100	11,6
Bex1%	89	10,5	80	10,3	90	10,4	100	11	90	10	80	11,1
P1X	100	10	100	9,5	100	9,9	100	10,5	90	10	100	10,1
P10X	100	10	100	9,2	100	10	90	10,7	100	10	100	10,6
P40X	80	10,9	100	10	100	10,1	70	11,3	70	11	80	11,6
ES0,5X	100	10,1	50	11,8	80	NC	100	9,9	100	9,8	90	9,8
ES1X	90	10	100	11,5	100	NC	80	10,2	100	10	100	9,9
ES2X	100	10	100	11,5	100	NC	89	10,2	100	10	100	9,8
ES20X	0	~	78	11,8	100	NC	90	11,4	80	11,4	100	11

On ne note pas d'effet significatif sur le taux ou le temps d'éclosion sur 12 jours, durée d'exposition à laquelle nous avons réalisé les comparaisons, sauf pour l'extrait ES20X 0514, ce qui confirme le caractère toxique de cet extrait déjà souligné par le faible taux de croissance. Néanmoins ce caractère toxique n'est plus détectable pour la concentration 2X.

Inversement on ne note pas d'effet sur l'éclosion pour l'extrait ES315, malgré une faible croissance comparée aux témoins. Mais on notera cependant que cette croissance reste dans les gammes des taux de croissance mesurés sur les autres lots d'embryons de limnées.

Survie *Ceriodaphnia dubia*

Les résultats sont présentés Tableau V. Contrairement à ce qui avait été observé avec les embryons de limnées, la concentration de DMSO testée (1%) a généré une mortalité significative chez les juvéniles de cériodaphnie, de même que les blancs d'extraction. De ce fait, il n'est pas possible de tirer de conclusions définitives sur la toxicité des plus fortes concentrations testées (40X et 20X) pour les extraits d'eau de surface et d'effluent respectivement. Les effets observés aux plus fortes concentrations des eaux de surface notamment (P0514, P0914) ne peuvent pas être imputées exclusivement à ces effluents, compte tenu des mortalités observées dans les contrôles d'extraction. Excepté pour l'échantillon ES0714, pour ce qui concerne les extraits d'effluents, on note une mortalité importante pour les extraits concentrés 20 fois. L'exposition aux extraits d'effluent conduit à une surmortalité des organismes comparativement aux contrôles (DMSO et Bex) en particulier pour les échantillons ES0514 ; ES0914 et ES1114.



Tableau V: Taux de survie (%) en 48H des juvéniles *C. dubia* exposés aux extraits d'eau de surface (P) ou d'effluent (ES).

	Echantillons					
	0514	0714	0914	1114	0115	0315
Témoin	90	100	100	95	80	80
DMSO1%	30	0	30	100	45	0
Bex1%	25	25	35	55	10	0
Eaux de surface						
P1X	96	100	100	100	95	90
P10X	100	100	10	100	95	100
P40X	5	100	10	80	85	76
Effluents						
ES0,5X	95	86	80	95	100	85
ES1X	86	96	100	95	100	100
ES2X	95	100	100	100	95	100
ES20X	0	60	0	5	15	5

2.2.3 Conclusions

Les essais que nous avons conduits montrent que l'on ne détecte pas de toxicité globale significative sur les eaux de surface non concentrées (1X) ou sur les concentras, comparativement aux témoins d'extraction. Ce résultat amène à conclure que l'eau du milieu n'induit pas de danger à court terme sur la survie des organismes sensibles, comme les néonates d'invertébrés que nous avons exposés. Mais ces résultats ne préjugent pas d'un risque à plus long terme avec une exposition affectant la totalité du cycle de vie des individus.

Concernant les effluents, les résultats sont plus contrastés et certains échantillons ont induit des effets délétères, signalant la présence de molécules toxiques aux fortes concentrations. Une telle concentration de molécules dangereuses, est susceptible d'être atteinte par bioconcentration dans le cas de molécules bioaccumulables déversées en continu avec les effluents et rémanentes dans le milieu récepteur. C'est notamment le cas de certains composés pharmaceutiques, comme l'érythromycine, qui sont bioaccumulées et qui peuvent être retrouvés à des concentrations de 4 µg/kg dans des poissons prélevés en zone estuarienne (Du et al., 2016).

Conclusions concernant les molécules biologiquement actives

Les échantillons prélevés au niveau de l'estuaire de Seine et en sortie de STEU (Rouen) n'ont pas engendré de toxicité à court terme sur les invertébrés. Concernant les effluents, les résultats sont plus contrastés et certains échantillons ont induit des effets délétères, signalant la présence de molécules toxiques aux fortes concentrations. Les plus hautes concentrations testées sont, dans le cas de l'effluent, 20 fois plus haute que celle réellement retrouvées. L'atteinte de ces niveaux de concentrations dans des organismes peut être envisagée par bioaccumulation. La bioaccumulation sur de longues périodes de temps, pourrait ainsi conduire à des perturbations physiologiques. Par ailleurs, les bioessais *in vitro*, ont été utilisés comme des marqueurs précoces de la présence de molécules préoccupantes pour les organismes. En effet, l'activation de récepteurs aux œstrogènes, androgènes, dioxine-like signale la présence de molécules étant susceptibles d'engendrer des risques à long terme (effet sur le métabolisme, la reproduction, ou atteintes du matériel génétique). Les résultats obtenus dans CRAPPSE ouvrent ainsi sur des pistes pour la mise en œuvre d'une campagne de surveillance de quelques biomarqueurs bien ciblés sur poissons par exemple.



2.3 Apports en contaminants polaires : pharmaceutiques, pesticides, désinfectants et filtres UV

2.3.1 Choix des molécules et synthèse des protocoles analytiques appliqués

Les études réalisées se sont focalisées sur la recherche de contaminants plutôt polaires en phase dissoute. Une première liste de 200 molécules a été établie incluant des molécules mères et certains produits de transformations associés. Un grand nombre des molécules ciblées font partie des composés d'intérêt décrits au niveau européen comme prioritaires, d'intérêt émergent ou encore pertinents à surveiller dans les eaux de surface. Ces composés se découpent en trois grandes classes: les composés pharmaceutiques (130), les pesticides-biocides (64) et les filtres UV (6). Les composés pharmaceutiques sélectionnés incluent des molécules à usage médical et vétérinaire correspondant à plus de 15 classes thérapeutiques différentes. Les 64 pesticides et biocides étudiés comprennent des fongicides, insecticides, et herbicides qui peuvent être répartis en fonction du type d'usage (agricole, biocides ou interdit). En raison du nombre important de molécules sélectionnées, différentes stratégies analytiques ont été utilisées. Au total, les 200 molécules sont divisées en 10 groupes correspondant aux 10 procédures analytiques employées (Tableau VI). Le détail de l'ensemble des molécules est présenté en annexe.

Tableau VI : Description des différentes filières analytiques utilisées en fonction des groupes de molécules ciblées. (AQUAREF, 2009; Capdeville, 2011; Belles, 2012; Aminot, 2013; Creusot et al., 2013; Dévier et al., 2013; Aminot et al., 2015; Le Coadou et al., 2016).

	Groupes (nombre de composés)	Méthode d'extraction	Séparation -détection	Quantification	Axes	Réf.
Pharmaceutiques	Groupe 1 (54)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1, 2	Aminot et al., (2015)
	Groupe 1-a (8)	Injection directe	LC-MS/MS	EI	2	-
	Groupe 2 (2)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1	Dévier et al., (2013)
	Groupe 3 (5)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1	Dévier et al., (2013)
	Groupe 4 (65)	SPE classique	LC-MS/MS	EE+EI	1	Capdeville (2001)
Pesticides / biocides	Groupe 5 (3)	Injection directe	LC-MS/MS	AD	1, 2	-
	Groupe 6 (56)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1, 2	Belles et al., (2013)
	Groupe 6-a (9)	SPE en ligne	LC-MS/MS	EI	2	-
	Groupe 7 (2)	Injection directe	LC-MS/MS	EI	1, 2	-
	Groupe 8 (4)	SPME en ligne	GC-MS/MS	EI	1, 2	Le Coadou et al., (2016) ; Cruz (2015)
FUV	Groupe 9 (2)	SPE classique	LC-MS/MS	EE	1, 2	Aquaref (2008)
	Groupe 10 (6)	SPE classique	LC-MS/MS	EI	1	Aminot (2013)
	Non ciblée	SPE classique	bioessais <i>in vitro</i> + LC-QTOF	-	1,2,3	Creusot et al., (2013)

SPE : extraction sur phase solide ; **SPME**: microextraction sur phase solide ; **LC** : chromatographie en phase liquide ; **GC** : chromatographie en phase gazeuse ; **MS/MS** : spectrométrie de masse en tandem ; **QTOF** : quadripôle/temps de vol ; **EI** : étalonnage interne, **EE** : étalonnage externe, **AD** : ajouts dosés, **FUV**: filtres ultra-violets

2.3.2 Niveaux et profils de contamination en composés pharmaceutiques

Les composés pharmaceutiques sélectionnés incluent des molécules à usage médical et vétérinaire correspondant à plus de 19 classes thérapeutiques différentes, permettant ainsi de réaliser un screening assez large. Des concentrations cumulées en composés pharmaceutiques 10 à 20 fois supérieures à celles mesurées à Poses ont été retrouvées en sortie de la STEU de Rouen (Figure 11 A): Au niveau de Poses les concentrations totales varient entre 0,8 à 2,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ contre 16 et 36 $\mu\text{g.L}^{-1}$ au niveau de l'effluent de la STEU de Rouen.

Les profils de contamination moyens retrouvés au niveau de Poses et de l'effluent de la STEU de Rouen sont présentés Figure 11 B. Les deux matrices présentent des profils de contamination en composés pharmaceutiques similaires dominés par des antiépileptiques (23-32%) comme la gabapentine et la carbamazépine. La contamination est également marquée à environ 15% par des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) comme le diclofénac, ibuprofène et le kétoprofène. Les bêtabloquants, les antidépresseurs (10 %) font également partie des molécules les plus représentées. Répartis en plusieurs classes chimiques (quinolones, macrolides, tétracyclines, sulfonamides), les antibiotiques ont été retrouvés en quantité importante dans les deux matrices. Pour aller plus loin, de nouveaux composés pharmaceutiques ont été recherchés : les nouveaux anticoagulants oraux (NACO) qui sont utilisés depuis 2008, tendent à devenir des molécules préoccupantes dans l'environnement. A l'heure actuelle, aucune donnée n'est disponible concernant la présence de ces 3 molécules dans l'environnement. Ne représentant que 2 % de l'empreinte moyenne de contamination en médicaments totaux, ces molécules et en particulier le dabigatran, ont été retrouvées jusqu'à 510 ng.L^{-1} en sortie de STEU et 30 ng.L^{-1} au niveau du barrage de Poses.

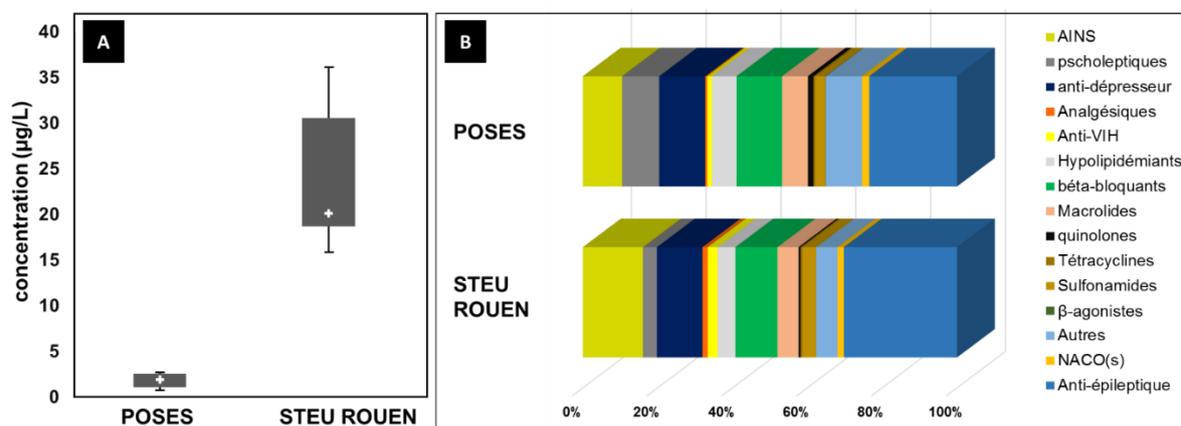


Figure 11 : Concentrations moyennes cumulées (A) et empreintes de contamination moyennes (B) au niveau de Poses et de l'effluent de la STEU de Rouen réparties en fonction des différentes classes thérapeutiques recherchées.

Les données de quelques molécules « traceurs » ont été comparées aux résultats antérieurs obtenus en 2006 et en 2011. Globalement, à Poses les concentrations de ces molécules « traceurs » ont peu évolué. En revanche, au niveau de la sortie du Petit Quevilly, certaines molécules ont des concentrations 10 fois supérieures aux campagnes précédentes. C'est notamment le cas de l'ibuprofène dans l'effluent de Rouen qui a présenté d'importantes variations de concentrations en fonction des campagnes allant de 13 à 1082 ng.L^{-1} .



Tableau VII : Evolution des concentrations de quelques molécules « traceurs » à Poses (A) et en sortie du Petit Quevilly (B). Les données représentent les concentrations moyennes en ng.L⁻¹ [min-max] (Togola et Budzinski, 2007; Budzinski et al., 2014).

ng/l	A. Poses			B. STEU Petit Quevilly (Rouen)		
	Togola (2006)	MEDSEINE (2011)	CRAPSSE (2015)	Togola (2006)	MEDSEINE (2011)	CRAPSSE (2015)
caféine	138 [nd-762]	202 [99-427]	300 [nd-486]	59[16-130]	33 [9-66]	64 [8-124]
carbamazépine	57 [26-104]	57 [26-104]	40 [20-67]	324[nd-858]	376 [178-539]	514 [386-632]
ibuprofène	151 [6-611]	33 [nd-67]	23 [8-48]	48 [nd-342]	30 [11-77]	386 [13-1082]
gemfibrozil	31 [5-86]	11 [3-115]	25 [3-116]	69 [9-164]	14 [2-34]	119 [21-436]
naproxène	110 [12-275]	42 [19-79]	24 [9-43]	146 [nd-267]	116 [57-188]	307 [29-712]
diclofénac	55 [7-116]	41 [12-102]	60 [nd-112]	470 [14-282]	852 [631-1156]	633 [464-744]
kétoprofène	110 [12-275]	43 [3-115]	18 [2-32]	71 [21-1136]	247 [154-409]	257 [100-443]

En plus de la grande diversité de médicaments retrouvée au niveau de Poses et de l'effluent de STEU, métabolites sont également présents en Seine. La Figure 12 présente les concentrations et le pourcentage molécule mère / métabolites à Poses et au niveau de l'effluent de la STEU de Rouen. Pour tous les temps échantillonnés, les concentrations en hydroxy-ibuprofène étaient supérieures à celles de son produit parent : l'ibuprofène. De même, alors que la carbamazépine est retrouvée en moyenne à des concentrations de 40 ng.L⁻¹ à Poses, la trans-10,11 dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine a été retrouvée à des concentrations 180 ng.L⁻¹. Ce constat est similaire au niveau de l'effluent de Rouen et est cohérent avec les données acquises aux niveaux d'études internationales. En effet, ces composés sont en fait connus pour être les principaux métabolites issus de la transformation de l'ibuprofène et de la carbamazépine dans le corps humain. Ces métabolites sont fréquemment retrouvés à des concentrations supérieures à celles des composés parents dans les eaux de STEU ou dans les eaux de surface (Besse et Garric, 2008; Botta et Dulio, 2012; Bueno-Martínez et al., 2014; Ebele et al., 2017).

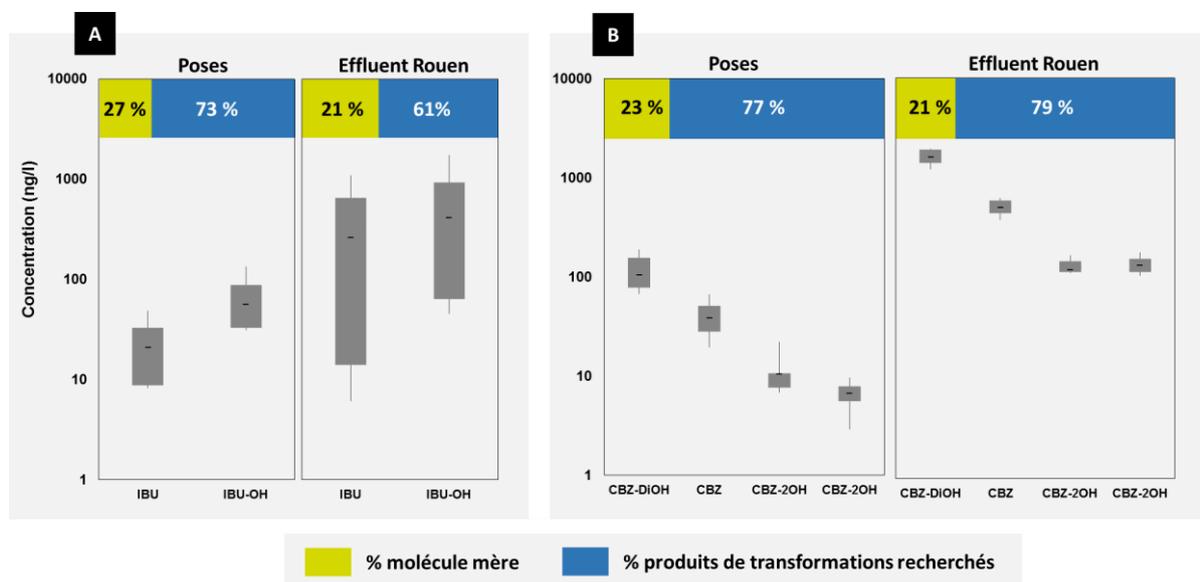


Figure 12 : Niveaux de concentration en (A) ibuprofène (IBU) et 2-hydroxy-ibuprofène (IBU-OH) et en (B) de carbamazépine (CBZ) et des certains produits de transformation : Trans-10,11 dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine (CBZ-DiOH) ; 2-hydroxy-carbamazépine (CBZ-2OH) et 3-hydroxy-carbamazépine (CBZ-2OH). Les résultats présentent les concentrations sous forme de box-plot et le pourcentage de molécule mère (vert) / produits de transformation (bleu) à Poses et au niveau de l'effluent de la STEU de Rouen (estimé par rapport à la concentration totale de la molécule mère et de ses produits de transformation). Le graphique regroupe les résultats de 6 campagnes d'échantillonnage réalisées de mai 2014 à mars 2015.

Les molécules les plus abondantes (diclofénac, carbamazépine, ibuprofène et gabapentine) font également partie des molécules les plus retrouvées en moyenne dans les

eaux de surface au niveau mondial (Hughes et al., 2013). Les concentrations moyennes retrouvées en estuaire de Seine ont été comparées à celles d'un autre estuaire français, l'estuaire de la Gironde, d'estuaires européens et de manière plus globale à différentes données au niveau mondiale dans les eaux de surface (Tableau VIII). Les concentrations moyennes en carbamazépine, diclofénac, ibuprofène et gabapentine sont 4 à 6 fois supérieures à celles retrouvées dans la Garonne. L'estuaire de Seine possède des concentrations moyennes 2 à 20 fois inférieures aux moyennes mondiales qui ont été recensées par Hughes et al., (2013).

Tableau VIII : Comparaison des concentrations moyennes en médicaments retrouvées dans les rivières et estuaires aux niveaux : français, européen et mondial. (a) (Aminot et al., 2016) ; (b) (Pedelucq, 2016) ; (c) (Loos et al., 2015) ; (d) (Tousova et al., 2017) ; (e) (Gonzalez-Rey et al., 2015) ; (f) (Ter Laak et al., 2010) ; (g) (Hughes et al., 2013).

Concentration ng.L ⁻¹	France		Europe		Monde Eaux de surface ^g
	Seine*	Garonne ^{a,b}	Rivières ^{c,d}	Estuaires ^{e,f}	
Carbamazépine	40,5	12	87	46	174
Diclofénac	56,8	8,6	53	26,6	136,5
Ibuprofène	23,4	5,5	25	15,7	503,8
Gabapentine	448,2	34,4	-	-	208,1

2.3.3 Niveaux et profils de contamination en pesticides et biocides

Les produits phytosanitaires sont à ce jour utilisés en milieu agricole mais également pour des applications urbaines (particuliers, collectivités). Les produits biocides (stricts) sont employés pour un usage urbain sous forme, par exemple, de désinfectants, de produits antiparasitaires ou de produits de revêtements (peinture anti-salissures).

La Figure 13 décrit les pesticides représentant plus de 95 % de la contamination de Poses (A) et de la sortie de la STEU de Rouen (B). Dans les deux matrices, le glyphosate et l'AMPA sont les composés majoritairement retrouvés avec des concentrations pouvant atteindre 1 µg.L⁻¹ dans l'effluent de Rouen. Ce résultat n'est pas surprenant car ces composés sont également les plus retrouvés à l'échelle du bassin de la Seine (Blanchoud et al., 2011). Le glyphosate est en effet l'herbicide le plus utilisé dans le monde. Bien qu'autorisé que pour un usage agricole, il est couramment utilisé pour l'entretien des espaces urbains et industriels. Les diagrammes de la Figure 13 présentent la répartition des pesticides retrouvés à Poses et au niveau de la STEU de Rouen en fonction des usages autorisés (agricole, biocides, mixte et interdit). Globalement, sur une année, des profils différents ont été mis en évidence au niveau de ces deux sites.

Poses est marquée par la présence de pesticides utilisés en agriculture dans le bassin de la Seine comme notamment le métolachlore (MET). Le métolachlore a été interdit d'utilisation et a été remplacé par un produit très proche le S-métolachlore. On retrouve également au niveau de Poses, des concentrations plus élevées de deux de ces métabolites : le métolachlore OA et ESA dont les concentrations peuvent atteindre 20 ng.L⁻¹ en moyenne. La présence de métolachlore et métazachlore (MTZ) peut notamment être reliée à leur utilisation dans la maïsiculture au niveau du bassin versant. Parmi les composés autorisés pour un usage agricole, on retrouve des herbicides tels que le chlortoluron (CHLT) et l'isoproturon (ISO) qui sont notamment utilisés pour les cultures de blé tendre et d'orge d'hiver. Ces résultats sont



cohérents avec les données acquises sur l'amont de l'estuaire par le projet PIREN-Seine (Blanchoud et al., 2011).

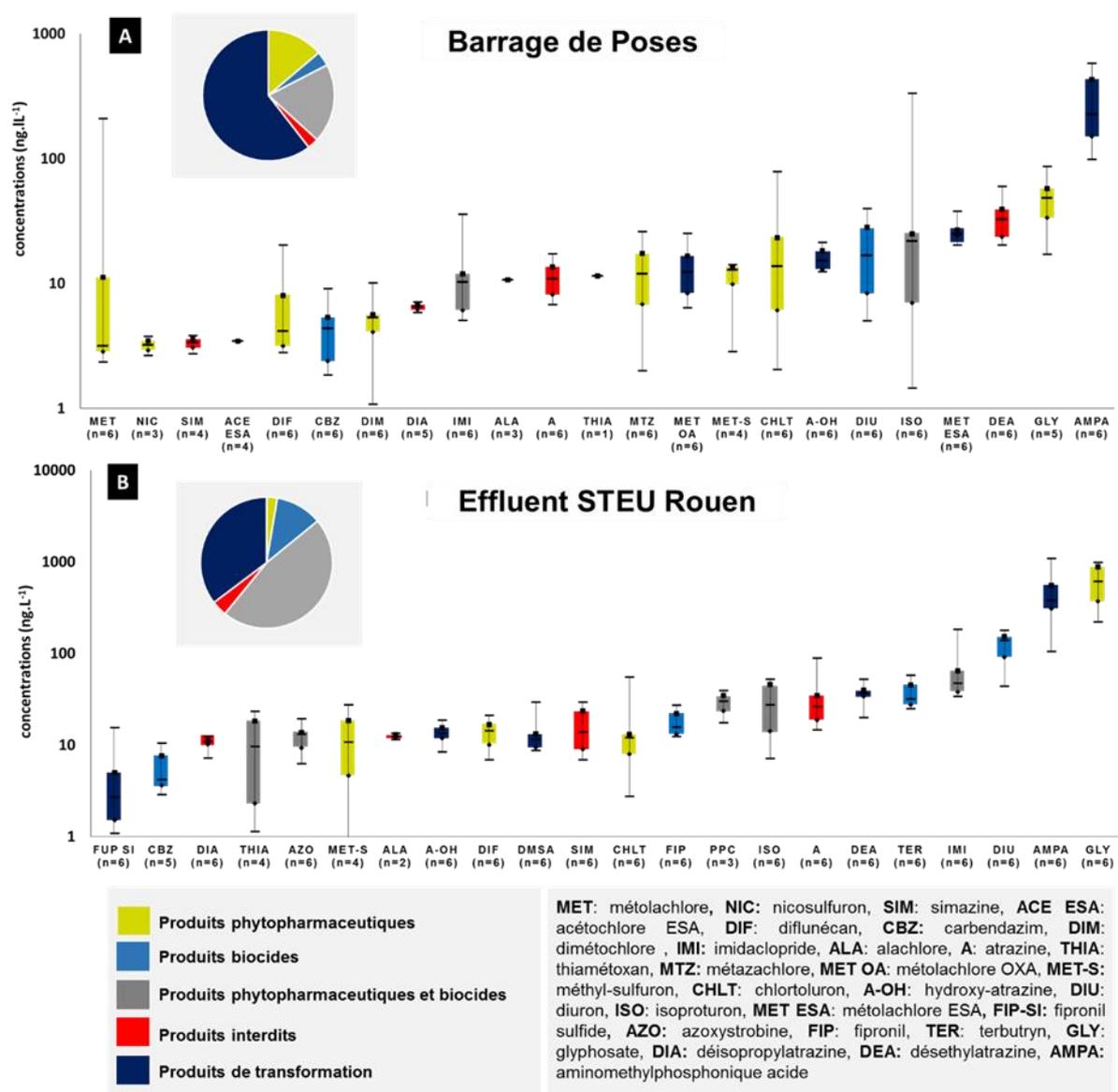


Figure 13 : Pesticides majoritairement retrouvés au niveau de Poses (A) et de l'effluent de la STEU de Rouen (B). Les résultats expriment les concentrations moyennes (ng.L⁻¹) obtenues entre mai 2014 et mars 2015. Le diagramme dans les encadrés gris présente la répartition en fonction des usages, des pesticides retrouvés en moyenne à Poses et dans l'effluent de la STEU de Rouen. Les couleurs de box plot renseignent sur les usages autorisés de ces pesticides dans la législation française.

Au niveau l'effluent de la STEU, des concentrations importantes en pesticides à usage biocide ont été retrouvées allant de 17 ng.L⁻¹ (fipronil) jusqu'à 122 ng.L⁻¹ en moyenne pour le diuron. On y retrouve principalement des molécules connues pour être des traceurs de rejets urbains comme le diuron (DIU), l'imidaclopride (IMI), la terbutryne (TER) ou encore le propiconazole (PPC). Malgré leur interdiction d'utilisation, certains pesticides et leurs métabolites sont encore retrouvés au niveau de ces deux sites. C'est notamment le cas de l'atrazine qui a été interdit en 2001 mais qui a pu être quantifié au niveau des deux sites à des concentrations moyennes de 35 ng.L⁻¹ en sortie de STEU et 11 ng.L⁻¹ à Poses. Sa présence

témoigne d'anciens usages au niveau du bassin versant ou d'usages frauduleux qui ont toujours lieu sur le territoire. Les produits de dégradation de l'atrazine (2-hydroxy-atrazine et deséthylatrazine) font également partie des molécules les plus retrouvées avec des concentrations parfois plus importantes que celles de la molécule d'origine.

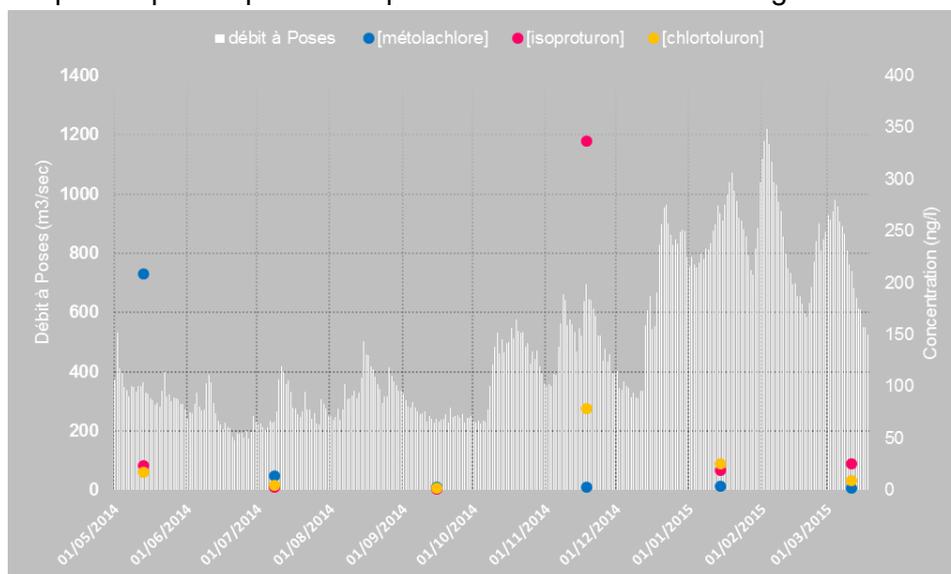


Figure 14 : Concentrations en métolachlore, chlortoluron et isoproturon mesurées au niveau du barrage de Poses de mai 2014 à mars 2015.

A Poses, les concentrations de certaines molécules ont montré une augmentation importante lors des périodes d'épandages, et indépendantes du débit de la Seine. En effet, une utilisation saisonnière marquée du métolachlore en mai 2014 (209 ng.L^{-1}) et de l'isoproturon (336 ng.L^{-1}) en novembre 2014 a été mise en évidence. Le reste de l'année, hors période d'épandage les niveaux de concentrations de ces molécules n'excèdent pas 10 ng.L^{-1} .

Bien que présents à l'état de traces (ng.L^{-1}) dans le milieu, certains pesticides présentent un fort enjeu environnemental. En raison de sa PNEC très faible ($0,77 \text{ ng.L}^{-1}$), le fipronil fait partie des molécules pertinentes à suivre dans les eaux de surface. Cet insecticide dont l'usage agricole a été suspendu depuis 2013 en Europe, reste autorisé en tant qu'antiparasitaire à usage vétérinaire. A Poses et au niveau de l'effluent de la STEU de Rouen, ce composé et quelques-uns de ses produits de transformation ont été suivis. Les concentrations retrouvées au niveau des deux sites sont présentées Figure 15. Dans les deux matrices, le fipronil a été détecté lors de toutes les campagnes à des concentrations variant de $12,5$ à $27,2 \text{ ng.L}^{-1}$ en sortie de STEU et de $0,4$ à $2,6 \text{ ng.L}^{-1}$ à Poses. Bien que retrouvé à des niveaux faibles, le fipronil est retrouvé presque systématiquement au-dessus de sa PNEC. Certains produits de transformation du fipronil : les fipronil sulfide, sulfone et desulfinyl ont également été retrouvés au niveau des deux sites mais à des concentrations inférieures à celles de la molécule mère.

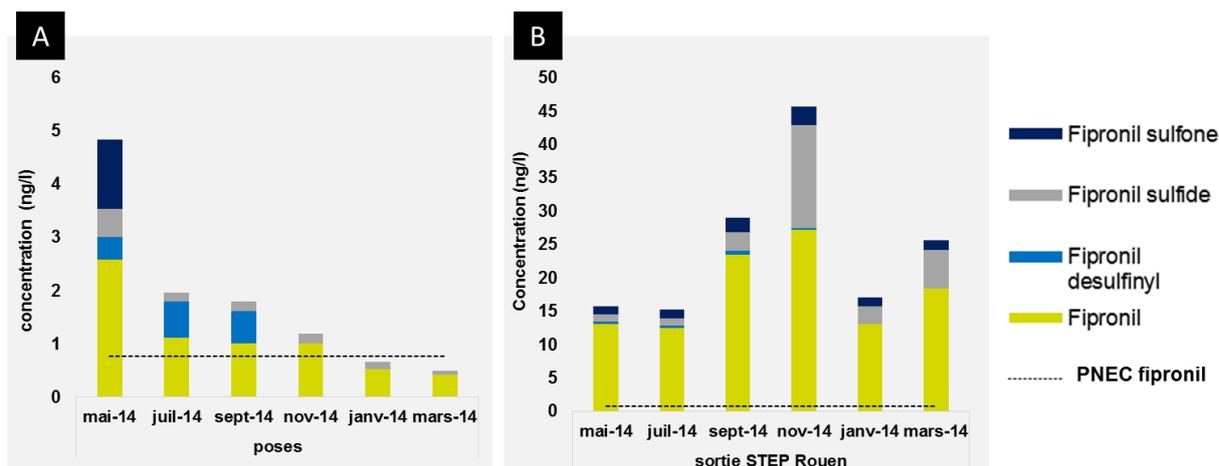


Figure 15 : Concentration (ng.L⁻¹) en fipronil au niveau du barrage de Poses (A) de l'effluent de la STEU de Rouen (B).

Les concentrations individuelles de certains pesticides ont été comparées aux concentrations retrouvées pour des rivières et estuaires français et européens. Les concentrations retrouvées au niveau de la Seine sont équivalentes à celles qui ont été retrouvées dans la littérature (Tableau IX). On peut toutefois noter, la présence en Seine d'isoproturon à des concentrations 3 à 37 fois supérieures à celles recensées dans les eaux de surfaces européennes.

Tableau IX : Comparaison des concentrations [min – max] (ng.L⁻¹) en pesticides dans la Seine à Poses (2014-2015) avec les données disponibles dans la littérature. *cette étude, (a) Botta et al., (2009), (b) Tapie et al., (2011), (c) Dufour, (2017), (d) Cruz, (2016), (e) Tousova et al., (2017), (f) Caracciolo et al., (2012), (g) Orlikowska et al., (2015).

	France			Europe	
	Seine*	Rivières ^{a,b,c}	Estuaire ^d	Rivières ^{e,d,f}	Estuaires ^g
AMPA	98 - 497	200 - 2 000	-	-	-
atrazine	7 - 17	30	2,6	1 - 12	1 - 40
diuron	5 - 40	1-70	1 - 20	1 -150	2 - 13
fipronil	0,4 - 2,6	0,3- 8,3	0,1 - 7,7	0,2 - 4	-
glyphosate	17 - 87	100 - 1 000	-	-	-
imidaclopride	5 - 35	2 - 66	2 - 25	2 -15	-
isoproturon	1 - 336	0,1- 12	3 - 110	1 - 25	1 - 9
métolachlore	2 - 200	0,5 - 108	1 - 8	-	-
terbutryne	2 - 7	0,5 -6,8	0,2 - 2	1 - 11	8 - 10

2.3.4 Niveaux de contaminations en filtres UV.

Selon la directive européenne 76/768/EEC sur les cosmétiques, un filtre UV est défini comme «une substance qui, contenue dans les produits cosmétiques solaires, vise à filtrer certains rayons UV afin de « protéger la peau de certains effets nocifs de ces rayons». Actuellement, 27 filtres UV sont autorisés en cosmétique dans Union Européenne, dont 26 molécules organiques. Ces composés sont employés dans la formulation de nombreux produits de soins corporels (peau, cheveux, baume à lèvres, ...). Ces molécules font partie des molécules dites d'intérêt émergent du fait du manque de données concernant leur occurrence (Richardson et Kimura, 2016). Les composés tels que l'oxybenzone, le 4-MBC et l'EHMC ont la capacité de se bioaccumuler (Gago-ferrero et al., 2015). En effet, des



concentrations pouvant aller jusqu'à 112 ng/g⁻¹ de lipides ont été mesurées dans des gardons prélevés dans des lacs suisses (Balmer et al., 2005). Il en est de même pour l'octocrylène, qui a été quantifié à 782 ng.g⁻¹ dans des foies de dauphin. Des études ont montré le potentiel bioaccumulation et de perturbation endocrinienne de ces molécules, renforçant le besoin de renseigner leur occurrence dans les eaux. Certains filtres UV comme l'octocrylène ou le 4-MBC sont suspectés d'être des perturbateurs endocriniens (Schlumpf et al., 2001; Fent et al., 2010). Dans ce contexte, 6 filtres UV organiques ont été recherchés à Poses et au niveau de l'effluent de la STEU de Rouen. Les résultats sont présentés Figure 16.

Les concentrations cumulées varient entre 12 et 200 ng.L⁻¹ à Poses et entre 124 et 883 ng.L⁻¹ en sortie de STEU. Ces concentrations sont donc assez variables. Généralement des concentrations plus importantes ont été mises en évidence pendant les périodes estivales et en particulier pour l'octocrylène qui présente des concentrations plus élevées en été. Le profil de contamination est similaire dans les deux matrices (Figure 16 B), et est dominé notamment par l'octocrylène avec des concentrations moyennes de 36 ng.L⁻¹ à Poses et 105 ng.L⁻¹ dans l'effluent. Il est important de noter la présence de 4-MBC avec des concentrations allant de 9 à 63 ng.L⁻¹ à Poses et de 37 à 477 ng.L⁻¹ en sortie de STEU. Les niveaux retrouvés en sortie de STEU et au niveau de Poses sont cohérents avec différentes autres études (Tsui et al., 2014; Ramos et al., 2016).

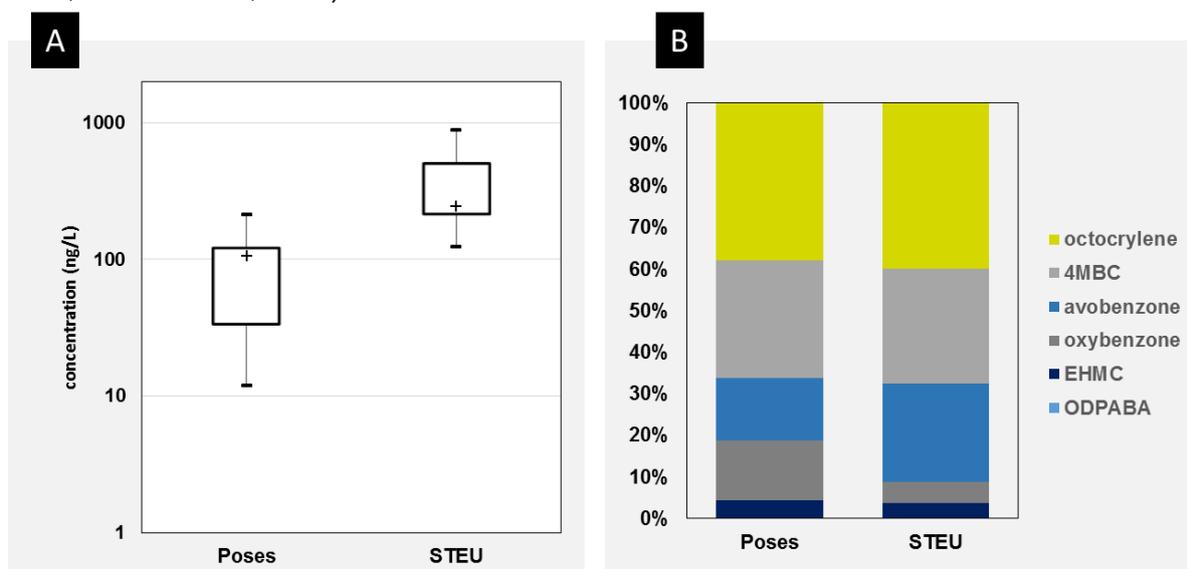


Figure 16 : Concentrations moyennes cumulées en filtres UV (A) et empreintes de contamination moyenne (B) au niveau de Poses et de l'effluent de la STEU de Rouen.

2.3.5 Récapitulatifs des flux apportés en Seine

Pour évaluer les apports majoritaires, une approximation des flux en composés apportés dans l'estuaire a été calculée. Pour cela, les données de concentrations en contaminants ont été corrigées par le débit moyen de la Seine (Banque Hydro, <http://hydro.eaufrance.fr/>) pour Poses et le débit de référence de la STEU (<http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr/>).

$$Flux = \sum_{i=1}^n Q_i \times C_i \frac{Q_i \times C_i}{\sum_{i=1}^n Q_i} \times Q_m$$

Q_i : Débit instantanée à Vernon

C_i : Concentration au moment du prélèvement

Q_m : Débit moyen sur la période considérée



La Figure 17 présente les flux extrapolés annuels en contaminants organiques au niveau du barrage de Poses et de la sortie de la STEU de Rouen. On constate que le barrage de Poses apporte en moyenne 38 fois plus de composés pharmaceutiques, 100 fois plus de filtres UV et 300 fois plus de pesticides. Comme indiqué Figure 17, le flux de pesticides médian est de $13 \pm 2 \text{ kg.an}^{-1}$ en sortie de la STEU de Rouen, et atteint $4640 \pm 4139 \text{ kg.an}^{-1}$ au niveau du barrage de Poses. Ce résultat est d'autant plus contrasté pour les composés à usage strictement agricole, qui ne sont pas ou peu retrouvés en sortie de station de traitement. Les composés pharmaceutiques sont apportés à l'estuaire par la STEU à hauteur de $630 \pm 260 \text{ kg.an}^{-1}$ contre $25\,803 \pm 17\,190 \text{ kg.an}^{-1}$ pour le barrage de Poses. Ce résultat est conforme aux données obtenues précédemment dans le projet Medseine (SA4).

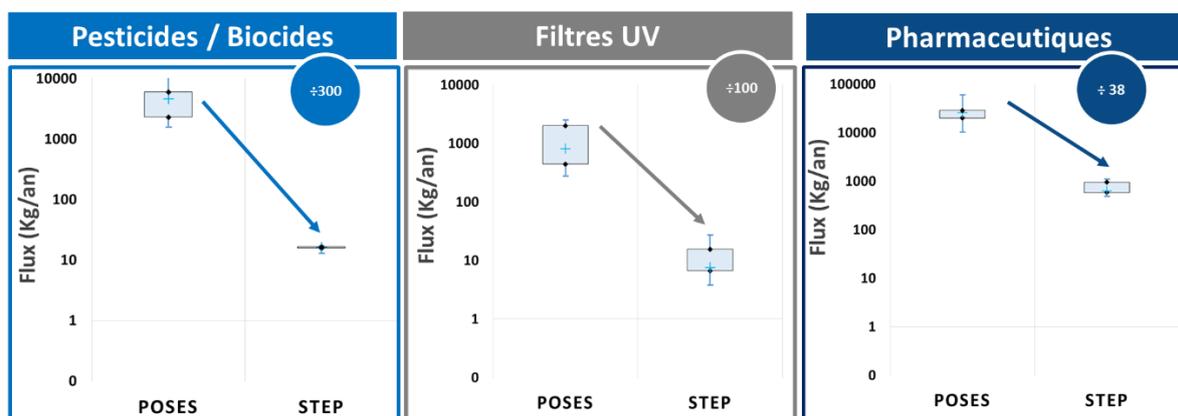


Figure 17 : Flux extrapolés annuels (en kg/an) de pesticides, filtres UV et composés pharmaceutiques entrants dans l'estuaire de Seine par le barrage de Poses et apportés par la sortie de la STEU de Rouen.

Le niveau de concentration au niveau du barrage de Poses (apport majoritaire) de mai 2014 à mars 2015 a été représenté par le 95ème percentile des concentrations maximales (MEC95) relevées sur ces 6 campagnes dans le but de simuler une situation au pire des cas rencontrés. Le degré de dépassement est alors calculé comme le rapport entre la MEC95 et les valeurs de PNEC de chaque molécule considérée. Les PNEC utilisées dans cette étude dérivent de la littérature nationale et internationale et ont été déjà utilisées au cours d'exercices de priorisation (Tableau 24). Cependant, il est à noter que cette approche a été réalisée à titre exploratoire en se basant sur les plus petites valeurs de PNEC recensées dans la littérature (Besse and Garric, 2008; Von der Ohe et al., 2011; Dulio et al., 2013; Botta and Dulio, 2014; Minguez et al., 2016; Anses, 2017; INERIS, 2017; Touseva et al., 2017). En effet, certaines valeurs ont été établies à partir de modèles QSAR et ne sont donc pas robustes. Une dimension supplémentaire à cette approche a été rajoutée en intégrant le nombre de dépassement de la PNEC sur les 6 points d'échantillonnage réalisés.



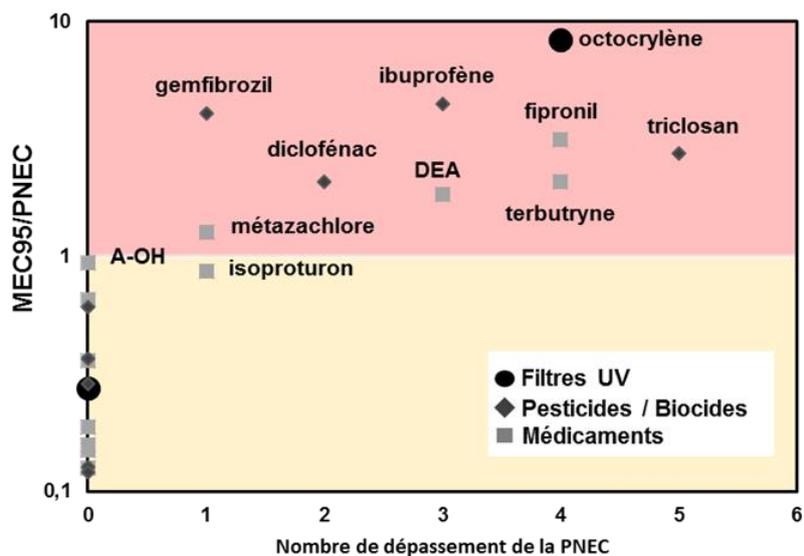


Figure 18 : Mise en évidence des composés problématiques apportés en Seine en fonction du risque (MEC95/PNEC) associé au nombre de dépassements de la PNEC sur la base de 6 échantillonnages ponctuels.

Des molécules préoccupantes en estuaire de Seine (rouge) au regard de leurs concentrations supérieures à leur PNEC ont été identifiées. Cette catégorie regroupe 5 pesticides, 4 composés pharmaceutiques et 1 filtre UV. Le triclosan, l'imidaclopride, l'octocrylène, le fipronil et la terbutryne font partie des molécules les plus préoccupantes en raison du nombre de dépassement de la PNEC (4-5 fois/ 6). Alors que l'atrazine n'est pas retrouvé dans cette catégorie, son produit de transformation (DEA) y est classé avec un taux de dépassement de 50 % (Figure 17).

Tableau X : Comparaison des concentrations et flux en molécules préoccupantes avec deux estuaires européens [1] (Aminot et al., 2016), [2] (Aminot, 2013), [3] (Cruz, 2016) et [4] (Ter Laak et al., 2010). C_{moy} : concentration moyenne ; F_{moy} : flux moyen, M : médicament, P/B : pesticides/biocides, FUV : filtres UV.

		Poses (Seine)		Garonne ^{1, 2,3}		Rhin ⁴	
		79650 km ² 12 millions d'habitant 450 m ³ .s ⁻¹		56000 km ² 4 millions d'habitant 340 m ³ .s ⁻¹		197100 km ² 58 millions d'habitant 2000 m ³ .s ⁻¹	
		C _{moy} ± ect	F _{moy} ± ect	C _{moy} ± ect	F _{moy} ± ect	C _{moy} ± ect	F _{moy} ± ect
classe		ng.L ⁻¹	g.j ⁻¹	ng.L ⁻¹	g.j ⁻¹	ng.L ⁻¹	g.j ⁻¹
4-MBC	FUV	28,4 ± 18,7	1267 ± 1252	< LQ	< 0,4	-	-
octocrylène	FUV	54,3 ± 45,4	1139 ± 1418	75 ± 50	5590 ± 1660	-	-
carbamazépine	M	40,6 ± 17,6	1503 ± 376	12,0 ± 7,0	250 ± 110	122	16942
clarithromycine	M	13,4 ± 8,3	645 ± 324	-	-	15	2890
diclofénac	M	60,5 ± 32,6	2142 ± 1864	8,6 ± 6,1	400 ± 870	55	11238
érythromycine	M	64,1 ± 41,8	3447 ± 3535	-	-	-	-
ibuprofène	M	23,4 ± 16,9	1008 ± 973	5,5 ± 2,6	180 ± 90	26	4142
ketoprofène	M	17,8 ± 8,2	507 ± 332	27 ± 12	1100 ± 1400	-	-
sulfaméthoxazole	M	27,4 ± 31,5	1391 ± 604	-	-	32	5959
triclosan	M	1,3 ± 0,5	63 ± 53	-	-	-	-
gemfibrozil	M	25,2 ± 44,4	1427 ± 2607	0,9 ± 0,4	24 ± 17	-	-
atrazine	P/B	11,3 ± 4,1	437 ± 133	2,3 ± 0,1	29 ± 44	-	-
chlorotoluron	P/B	23,2 ± 28,6	1348 ± 1816	3,6 ± 4,9	110 ± 180	-	-
diuron	P/B	19,4 ± 13,9	664 ± 342	3,5 ± 1,2	96 ± 56	-	-
imidaclopride	P/B	13,3 ± 11,5	592 ± 415	19,9 ± 51,5	446 ± 967	-	-
isoproturon	P/B	68,4 ± 131,7	4050 ± 7969	1,1 ± 0,5	30 ± 17	-	-
terbutryn	P/B	3,0 ± 1,6	107 ± 43	0,4 ± 0,1	12 ± 17	-	-
azoxystrobine	P/B	3,7 ± 2,4	162 ± 130	0,6 ± 0,3	3 ± 7	-	-
métolachlore	P/B	9,1 ± 10,8	303 ± 298	120,6 ± 180,6	3254 ± 6065	-	-
2-hydroxy-atrazine	P/B	16,0 ± 3,6	669 ± 269	<LQ	-	-	-
DEA	P/B	34,6 ± 14,9	1313 ± 380	5,7 ± 1,0	151 ± 49	-	-
métazachlor	P/B	12,9 ± 8,7	614 ± 483	0,8 ± 0,5	22 ± 20	-	-
diflufenican	P/B	4,3 ± 2,5	182 ± 1113	1,4 ± 0,7	31 ± 31	-	-

Bilan sur la caractérisation des apports en Seine :

- ✓ Des molécules biologiquement actives (perturbateurs endocriniens, composés dioxine-like, et génotoxiques) ont été retrouvées aux niveaux des deux sites à des niveaux parfois supérieurs aux recommandations en vigueur.
- ✓ Des résultats plus contrastés ont été mis en évidence pour la toxicité globale à court terme (test *in vivo*). Des effets délétères sur les espèces sensibles ont été mis en évidence avec l'effluent de la STEU mais pas avec l'eau de Poses.
- ✓ Une grande diversité de pesticides et de composés pharmaceutiques est apportée en Seine, et majoritairement par le barrage de Poses. Ces apports peuvent être très variables en fonction de l'usage des molécules, comme c'est notamment le cas pour certains pesticides.
- ✓ Des produits de transformation ont également été retrouvés et ce au niveau des deux sites. Leur niveau de concentrations est parfois bien supérieur à celui de la molécule mère. Ceci souligne l'importance de prendre en compte les produits de transformation dans l'évaluation du risque mais aussi le besoin d'identifier de nouveaux produits de transformation.



3 Présence de molécules traceurs en estuaire amont grâce à l'utilisation d'échantillonneurs passif en parallèle des prélèvements ponctuels

L'étude menée à Poses et en sortie de STEU a permis de sélectionner les molécules majoritairement retrouvées. Pour des raisons pratiques (l'échantillonnage passif classique ne marche pas pour ces deux molécules) et en raison du grand nombre d'échantillons, le glyphosate et l'AMPA n'ont pas été inclus dans ce suivi bien que soient les pesticides quantifiés aux plus fortes concentrations. Cette liste regroupe 8 composés pharmaceutiques (aténolol, sotalol, carbamazépine, gabapentine, oxazépam, diclofénac, ibuprofène et son métabolite le 2-hydroxy ibuprofène) et 14 pesticides (métolachlore, isoproturon, fipronil, diuron, imidaclopride, propiconazole, atrazine, fipronil sulfone, fipronil sulfide, fipronil-desulfinyl, DEA, hydroxyatrazine, métolachlore OA et ESA). Les molécules sélectionnées sont également cohérentes avec la représentativité de différentes sources. Ainsi, les médicaments et certains pesticides (fipronil, diuron, imidaclopride, propiconazole) sont des traceurs d'usage urbain (vectorisés par les effluents de STEU). Les autres pesticides sont des traceurs d'usage agricole (métolachlore, isoproturon) et également interdits (atrazine). Certains produits de transformation (fipronil sulfone, fipronil sulfide, fipronil-desulfinyl, DEA, hydroxyatrazine, métolachlore OA et ESA) ont également été inclus afin de mettre en évidence de potentiels phénomènes de transformation.

Afin d'évaluer la présence des contaminants en estuaire, trois sites (Oissel, La Bouille et Caudebec) ont été suivis pendant 6 mois par des échantillonnages ponctuels et passifs. Lors de ce suivi, 22 composés traceurs (pharmaceutiques, pesticides et produits de transformation) ont été étudiés. Ces 22 molécules ont été extraites par 2 extractions sur phase solide, ainsi qu'un protocole de microextraction sur phase solide dans le cas des échantillons ponctuels, et d'une extraction globale dans le cas des échantillonneurs passifs. Chaque extrait a ensuite été analysé suivant 4 méthodes analytiques différentes. Sur l'ensemble, des dispositifs installés, certains ont subi des dégradations (membranes percées, vol, cages emportées par la Seine notamment au niveau du site Oissel).

Une première évaluation de l'état de contamination en composés traceurs a été réalisée sur les échantillons ponctuels récoltés pendant les 6 mois d'échantillonnage. Les concentrations totales moyennes des 22 molécules et les profils de contamination de chaque site sont présentés Figure 19. Les concentrations sont très variables pour les différents sites, oscillant entre environ 500 et 1300 ng.L⁻¹. La diminution des concentrations le long de l'estuaire n'est pas marquée. De manière globale, les profils de contamination des trois sites sont similaires, dominés par les composés pharmaceutiques et notamment avec de fortes concentrations en gabapentine allant jusqu'à 800 ng.L⁻¹ au niveau d'Oissel. Concernant les médicaments, ces données sont du même ordre grandeur que celles retrouvées dans le Rhin (Ter Laak et al., 2010) mais généralement trois fois supérieures à celle mesurées dans l'estuaire de la Gironde (Aminot et al., 2016). Le pesticide le plus représenté est l'isoproturon avec des concentrations de 95 ng.L⁻¹ en décembre 2016.



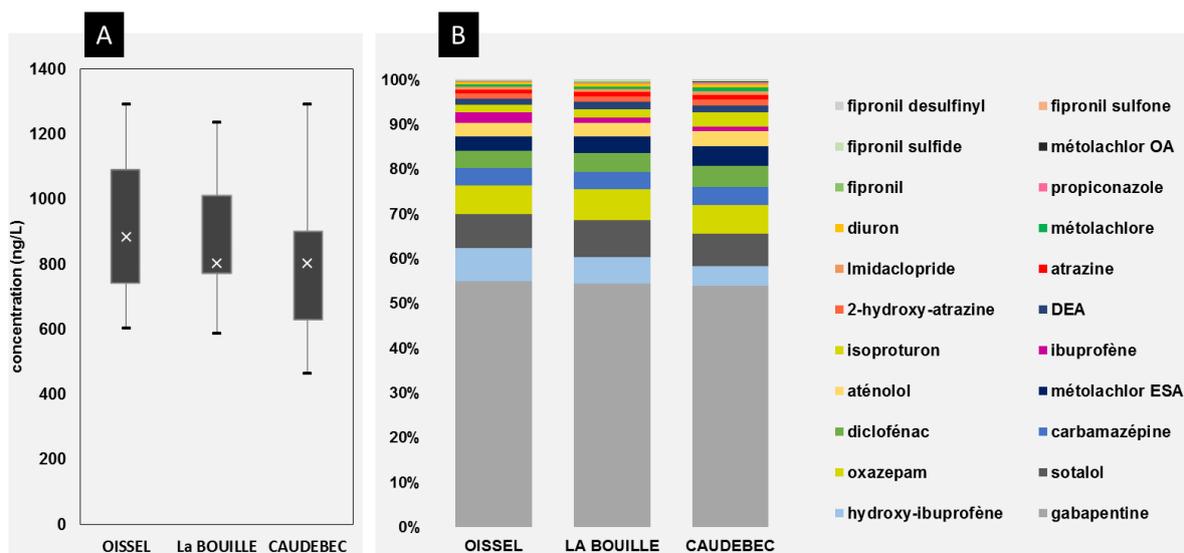
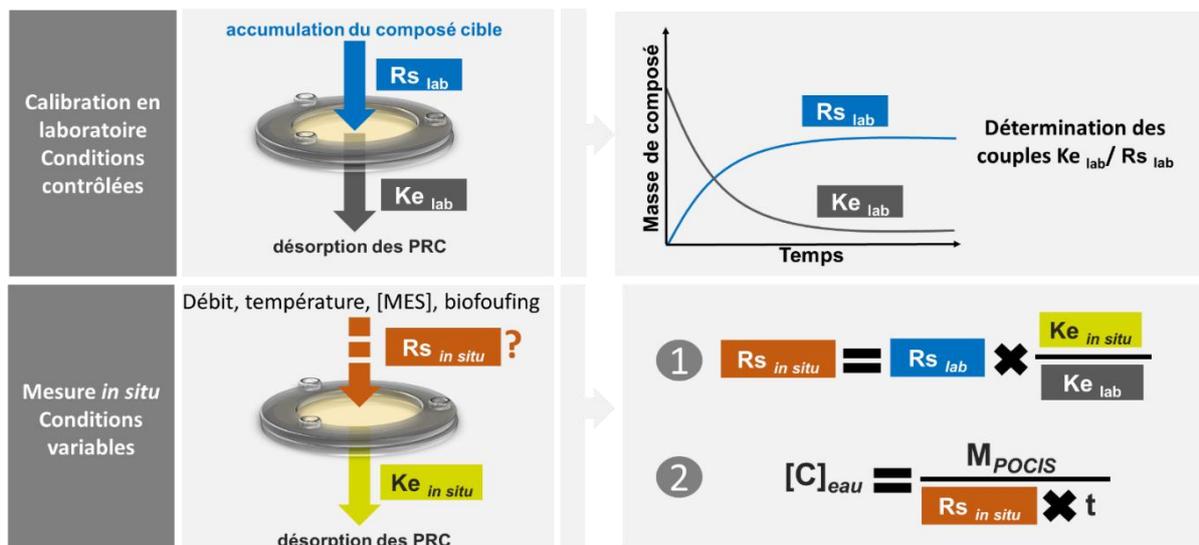


Figure 19 : Concentrations moyennes cumulées (A) et empreintes de contamination moyenne (B) des 22 molécules recherchées dans les échantillons ponctuels récoltés au niveau d'Oissel, La Bouille et Caudebec, de décembre 2016 à mai 2017.

Cependant, les informations données par l'échantillonnage ponctuel ne reflètent qu'une image de la contamination à un instant donné. Afin d'apporter une vision complémentaire et plus intégrative, des échantillonneurs de type POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) ont donc été utilisés. Dans le cas d'une caractérisation d'un point de vue chimique par échantillonnage passif, l'utilisation de l'approche PRC (Performance Reference Compound) permet d'améliorer l'aspect quantitatif de l'outil d'échantillonnage (Figure 18). Les PRC sont des molécules non interférentes, isotopiquement substituées dont la désorption durant la période d'immersion permet de calculer indirectement un taux d'échantillonnage (R_s). En effet, la désorption des PRC ($K_{e\ lab}$) et l'absorption des composés cibles ($R_{s\ lab}$) dans l'outil ont été calibrées lors de précédentes études en laboratoire (Vrana et al., 2005; Mazzella et al., 2010; Belles et al., 2014). Le R_s en conditions réelles est fortement soumis aux conditions du milieu tels que la température, le débit, le biofouling ou encore la salinité (Togola et Budzinski, 2007) (Figure 18). Cependant, à partir de la constante de désorption des PRC du POCIS vers le milieu ($K_{e\ in\ situ}$), il est possible de déterminer la constante d'absorption des composés dans les conditions d'exposition réelles ($R_{s\ in\ situ}$). Dans le cadre de ce travail, trois PRC ont été utilisés : la DIA d5 (déisoproyl-atrazine d5), la caféine C13 et le salbutamol d3. Le taux d'échantillonnage et les coefficients de désorption utilisés sont dérivés de différentes expérimentations réalisées en laboratoire et en conditions estuariennes (Aminot, 2013; Belles et al., 2014; Dufour, 2017).





PRC : Performance reference Compounds ; **Rs** : taux d'échantillonnage (en L/j) ; **Ke** : constante de désorption des PRC (en L/j) ; **[C]_{eau}** : concentration composés cible dans l'eau (ng/l) ; **M_{POCIS}** : masse composés dans phase du POCIS (ng) ; **t** : temps (jour)
lab : déterminé en laboratoire ; **in situ** : déterminé à partir des POCIS exposés dans le milieu

Figure 20 : Principe de quantification par la démarche corrective utilisant des PRC.

Deux composés n'ont pas pu être quantifié en ng.L^{-1} : (1) La gabapentine qui bien que présente à de très fortes concentrations dans les échantillons ponctuels, cette molécule ne s'accumule pas dans l'outil dans sa configuration pharmaceutique (Pédelucq, 2016) ; (2) l'hydroxy-ibuprofène en raison du manque de données fiables concernant son taux d'échantillonnage (molécules atteignant très rapidement la phase d'équilibre d'accumulation) (Aminot, 2013).. Le comparatif des concentrations totales, en pharmaceutiques et en pesticides, obtenues au niveau du site de La Bouille par échantillonnages ponctuel et passif, est présenté Figure 21. Les concentrations présentées ne prennent pas en compte la gabapentine et l'hydroxy-ibuprofène, pour les raisons énoncées ci-dessus. Les échantillonneurs passifs représentent dans la plupart des cas les données obtenues dans le cadre de l'échantillonnage ponctuel. Des différences importantes ont été constatées entre les concentrations ponctuelles et POCIS durant le mois de décembre. Ce résultat est cohérent avec une intégration d'une contamination ponctuelle de la Seine, en isoproturon, résultant de son épandage à ces périodes. Effectivement sur le mois décembre les concentrations moyennées en isoproturon retrouvées au niveau des 3 sites varient entre 64 et 188 ng.L^{-1} . De surcroît, l'utilisation des échantillonneurs passifs permet dans de nombreux cas d'abaisser les limites de quantification d'un grand nombre de composés. Ceci peut représenter un point clé, notamment dans le cadre du suivi de composés actifs à très faibles concentrations comme c'est le cas du fipronil. Ce composé a été quantifié au-dessus de sa PNEC lors de tous les échantillonnages réalisés. L'utilisation des échantillonneurs passifs a permis d'abaisser les limites de détection du fipronil et de ses métabolites d'un facteur allant de 2 à 10.



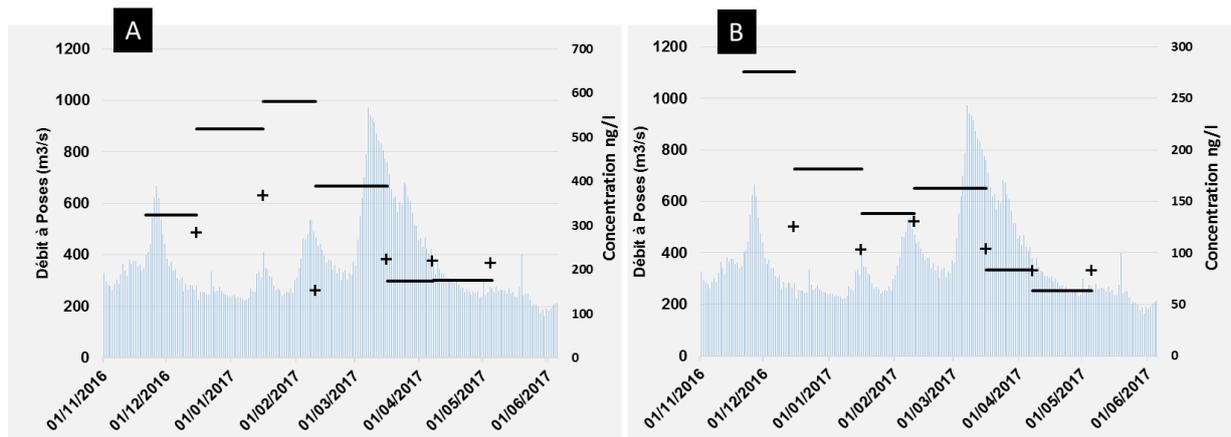


Figure 21 : Concentrations totales en composés pharmaceutiques (A) et en pesticides (B), déterminées à partir d'échantillons ponctuels (croix) ou de POCIS (traits), au niveau du site de La Bouille.

L'évolution moyenne des concentrations mesurées dans les POCIS, en pesticides et en pharmaceutiques, est présentée Figure 22. Alors que les concentrations entre Oissel et La Bouille ne sont pas significativement différentes, une diminution significative des concentrations à Caudebec a pu être constatée. Globalement, une diminution des concentrations de l'amont vers l'aval a pu être mise en évidence.

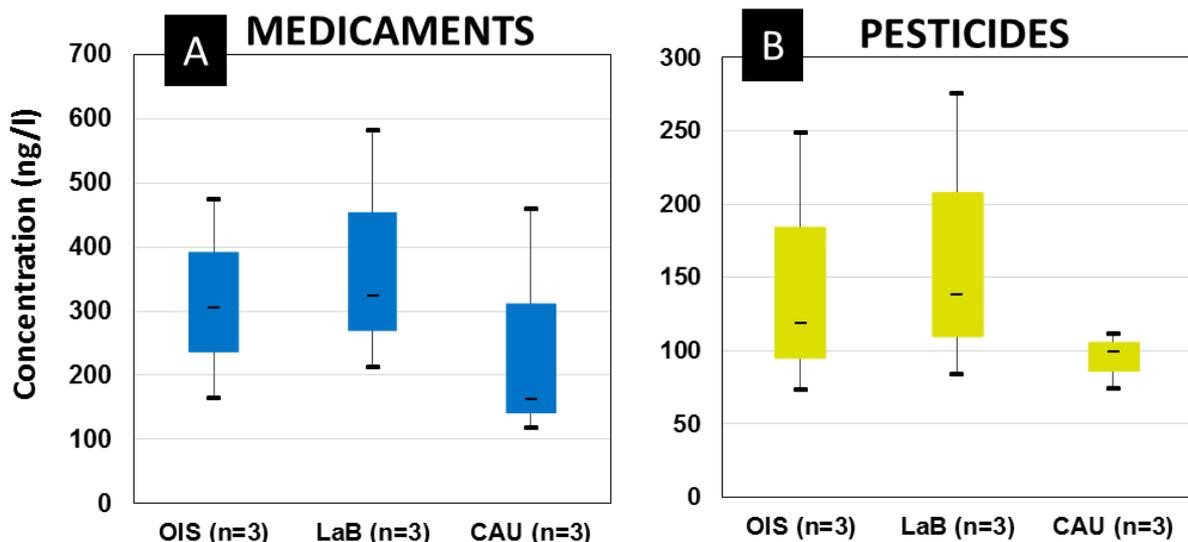


Figure 22 : Evolution de la concentration des composés pharmaceutiques (A) et des pesticides (B) dans l'estuaire de Seine. Les concentrations ont été évaluées à partir des POCIS sur les périodes de décembre 2016, février 2017, avril 2017. OIS : Oissel, LaB : La Bouille, CAU : Caudebec.

Pour attribuer un niveau de risque, les MEC95 (95^{ème} percentile des concentrations maximale) ont été comparées aux PNEC trouvées dans la littérature de chaque molécule (Besse et Garric, 2008; Botta et Dulio, 2012; Minguez et al., 2016). Parmi les molécules suivies par échantillonnage passif sur l'ensemble des sites du milieu, quatre molécules s'avèrent problématiques : l'isoproturon, le fipronil, l'ibuprofène et le diclofénac (Figure 23). En effet, les concentrations de ces molécules dépassent les concentrations prédites sans effet d'un facteur allant de 1 à 17. La fréquence de dépassement de la PNEC sur les 6 mois d'échantillonnage (3 sites confondus) est toujours supérieure à 50 % et peut aller jusqu'à 92 voire 100 % dans le cas du diclofénac et de l'ibuprofène.



Figure 23 : Mise en évidence des composés problématiques en Seine en fonction du risque (MEC95/PNEC).

Bilan sur la présence de molécules traceurs dans le milieu:

- ✓ Une diminution des concentrations totales a été observée de l'amont vers l'aval.
- ✓ L'échantillonnage passif représente un bon outil pour donner une image intégrée de la contamination, et pour abaisser les limites de quantification.
- ✓ Quatre molécules présentent des concentrations problématiques en Seine (> PNEC) : l'isoproturon, le fipronil, l'ibuprofène et le diclofénac.
- ✓ Cependant à ce stade des informations sur la stabilité des contaminants organiques sont nécessaires pour mieux évaluer leur devenir dans l'ensemble de l'estuaire.

4 Réactivité des contaminants apportés en estuaire de Seine

4.1 Dégradation à l'obscurité en présence de bouchon vaseux

4.1.1 Descriptif des expériences d'incubation en microcosmes

Le bouchon vaseux ou zone maximale de turbidité est une zone estuarienne présentant un potentiel réactionnel particulier combinant accumulation de matières en suspension et population bactérienne importante. Dans cette zone d'importantes variations de turbidité et de salinité peuvent être observées. Le rôle accélérateur ou inhibiteur de ce milieu récepteur particulier dans la dégradation des composés présents en sortie de STEU de Rouen a été étudié. Deux incubations *in vitro* d'eaux estuariennes mélangées à l'effluent de STEU ont été réalisées. Pour ces expériences, le prélèvement de 100 L de chaque bouchon vaseux a été nécessaire. Le bouchon vaseux de la Seine a été récolté le 12 Juillet 2015 (turbidité 999 NTU, réseau SYNAPSES) au niveau du pont de Tancarville. Les échantillons ont été prélevés dans des bouteilles ambrées de 5 L préalablement calcinées. Le bouchon vaseux de la Garonne a été prélevé au niveau de Bègles, le 28 septembre 2015, à mi-jusant, durant un fort coefficient de marée permettant d'obtenir une turbidité maximale (supérieure à la saturation des sondes de la station Magest de Bordeaux, 9 999 NTU).



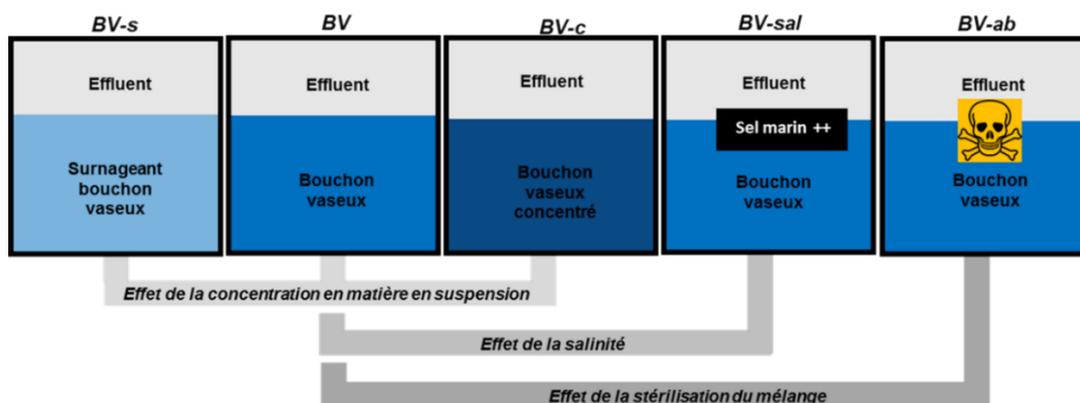


Figure 24 : Description des conditions expérimentales des incubations Seine et Gironde.

Le détail des conditions expérimentales est présenté Figure 24. Les eaux prélevées en Seine et en Garonne ont été dans un premier temps laissées à décanter quelques heures dans le but de récupérer un surnageant et un concentrât afin d'alimenter respectivement les conditions BV-s et BV-c. Les aquariums BV, BV-sal et BV-ab ont été préparés avec les concentrations originelles en matières en suspension (MES) des bouchons vaseux prélevés et sans phase de décantation. L'ajout de 100 mg.L^{-1} de chlorure mercurique dans l'aquarium BV-ab a permis d'obtenir un contrôle stérile. Dans la condition BV-sal, du sel marin a été ajouté jusqu'à obtenir une salinité de 5‰.

L'étude de dégradation en présence de bouchon vaseux a été conduite dans des aquariums en verre de 25 L. L'oxygénation de l'eau est régulée par un bullage d'air en continu et l'homogénéisation de la masse d'eau est assurée par un système de brassage. L'ensemble de l'expérimentation a été réalisé à l'obscurité et dans une pièce thermostatée à 20°C . Un suivi quotidien de la température ($^\circ\text{C}$), salinité (Sal), oxygène dissous et du pH, a été réalisé durant les 21 jours d'incubation sans aucun renouvellement d'eau. Des prélèvements d'eau ont été effectués 10 min après le mélange initial (T_0), puis après 7, 14, 17 et 21 jours d'incubation. Ces 50 échantillons ont ensuite été répartis en différentes filières analytiques : analyses chimiques ciblées (pharmaceutiques et pesticides), non ciblées et bioessais *in vitro*. Pour compléter les données obtenues, des analyses de la matière organique dissoute (carbone organique dissous et mesures de fluorescence et absorbance UV) ont été conduites à tous les temps prélevés et pour chaque aquarium.

4.1.2 Bilan de la réactivité des composés organiques

Comportement type des pesticides et pharmaceutiques

L'évolution globale des pesticides et des pharmaceutiques en phase dissoute dans l'ensemble des conditions étudiées est présentée Figure 25. Les concentrations totales ont été normalisées par celles de la carbamazépine, connue pour être stable, afin d'atténuer les effets d'évaporation d'eau et sont exprimées en pourcentage du T_0 .

L'ensemble des conditions a abouti à une diminution des concentrations en contaminants allant de 30 à 63%. Des différences ont été néanmoins constatées en fonction des conditions expérimentales. Tout d'abord, à concentration en MES équivalente, l'empoisonnement de l'aquarium avec du chlorure mercurique (témoin abiotique) a pour effet de ralentir et limiter la disparition des composés en phase dissoute (Figure 25 A). En effet, une diminution des concentrations de 51% a été observée dans la condition standard (BV) contre seulement 30%



dans le témoin stérile. La méthode de stérilisation par chlorure mercurique a déjà été appliquée avec succès dans différentes études (Fitzhugh et al., 2003). Ce résultat suggère l'implication d'une part biotique dans les phénomènes de dégradation de certains composés. Les matières en suspension sont connues pour jouer un rôle crucial dans les processus géochimiques et sur la réactivité des contaminants. Un effet de la concentration en matières en suspension sur le taux d'abatement a également été mis en évidence (Figure 25 B). En effet, plus la charge particulaire augmente, plus la diminution des concentrations est importante au bout de 21 jours passant de 40% à 63% dans les conditions les plus turbides. En revanche, aucun effet de la salinité sur les concentrations totales n'a pu être mis en avant (Figure 25). Le niveau d'abatement le plus élevé a été observé dans l'aquarium présentant les fortes concentrations en matières en suspension, condition la plus proche du bouchon vaseux de la Seine. Ce résultat tend à confirmer le rôle d'épuration des zones turbides pour les molécules organiques ciblées.

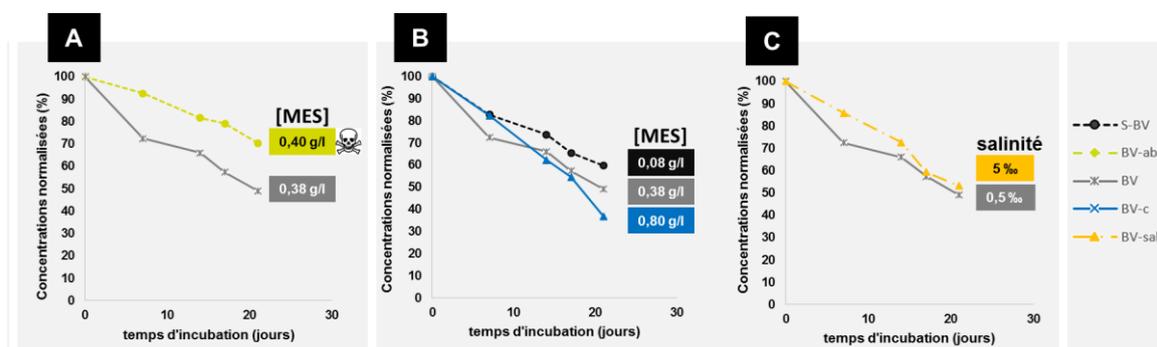


Figure 25 : (A) Comparaison témoin abiotique (BV-ab) et condition biotique (BV) ; effet de la concentration en matière en suspension (B) et de la salinité (C) sur l'évolution des concentrations globales des pesticides et des composés pharmaceutiques. Les données représentent la concentration totale en composés, normalisée par celle de la carbamazépine et sont exprimés en pourcentage du T0.

Ce résultat global n'est pas représentatif de la diversité de réactivité des contaminants pris individuellement. Les cinétiques de dégradation des différents composés recherchés et détectés ont été calculées pour chaque aquarium. Il est possible à partir de ces cinétiques de distinguer 3 comportements types qui sont exposés Figure 26 :

- **Type propiconazole (A):** les concentrations dans l'ensemble des conditions décroissent selon la même cinétique. Dans le cas où les cinétiques de diminution des concentrations sont similaires dans les conditions biotiques et abiotiques (oxazépan, propiconazole, terbutryne, fipronil), la biodégradation ne semble pas être le processus d'atténuation majoritaire. Les processus mis en jeu sont donc plutôt abiotiques (hydrolyse, sorption).
- **Type diuron (B):** L'évolution des concentrations est dépendante de la présence de matières en suspension, stérilisation, et de la salinité. Ce type représente la majorité des composés recherchés. En raison de la relative stabilité des concentrations dans le témoin abiotique ($HgCl_2$), la diminution des concentrations semble être le résultat d'une dégradation biotique.
- **Type atrazine (C):** les concentrations en composés restent stables dans les 5 conditions sur l'ensemble de la durée d'incubation (>80% du T0).



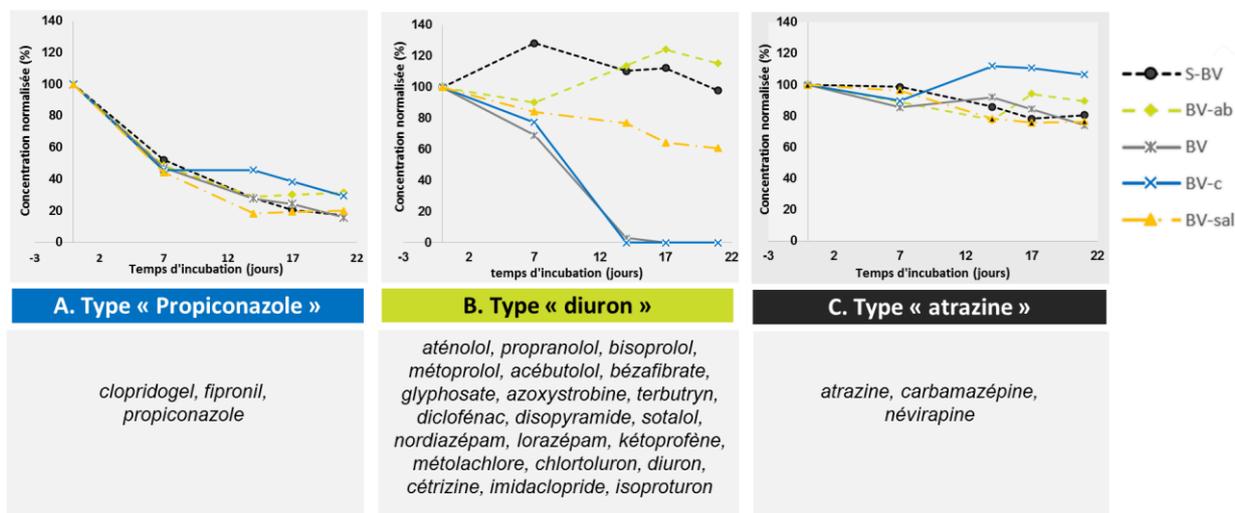


Figure 26 : Comportements types des molécules détectées dans les incubations *in vitro* en Seine. Les données représentent la concentration en composé normalisée par celle de la carbamazépine et exprimées en pourcentage du T0.

Etude des temps de demi-vie et élaboration d'une échelle de persistance

Dans le but, d'évaluer la persistance des molécules mères détectées au cours de ces expériences d'incubation, le temps de demi-vie de chaque molécule détectée a été calculé pour toutes les conditions expérimentales. Un modèle exponentiel simple a été appliqué pour calculer les temps de demi-vie. Cette méthodologie se base sur les travaux réalisés par différentes équipes (Benotti et Brownawell, 2009; Yamamoto et al., 2009). Il est possible d'établir une échelle de stabilité empirique en se basant sur l'ensemble des temps de demi-vie calculés. Pour cela une note est attribuée pour chaque molécule et pour chaque condition suivant le barème suivant, si le temps de demi-vie est :

- < 7 jours..... 1
- > 7 jours et < 14 jours..... 20
- > 14 jours et < 21 jours..... 40
- > 21 jours et < 28 jours..... 60
- >28 jours..... 80
- Concentrations stables..... 100

La note moyenne obtenue pour l'ensemble des conditions environnementales permet d'extrapoler un indice de persistance en phase dissoute.

Pour aller plus loin, il est possible d'intégrer ces données de persistance en Seine aux paramètres d'occurrence et aux données de toxicité (PNEC) connues. Le diagramme présenté, Figure 27, combine des informations sur le niveau de risque de chaque molécule et son niveau de persistance en Seine. Cette approche s'inspire des travaux réalisés lors d'une étude prospective 2012 sur les contaminants émergents (Botta et Dulio, 2012). Le niveau de concentration au niveau du barrage de Poses (apport majoritaire) de mai 2014 à mars 2015 a été représenté par le 95^{ème} percentile des concentrations maximales (MEC95) relevées sur ces 6 campagnes dans le but de simuler une situation au pire des cas. Pour attribuer un niveau de risque, les MEC95 ont été comparées aux PNEC trouvées dans la littérature de chaque molécule (Besse et Garric, 2008; Botta et Dulio, 2012; Minguez et al., 2016). Ainsi, différentes catégories de molécules peuvent être identifiées :

- **Des molécules encore non préoccupantes** comprenant des composés au niveau de contamination inférieur à la PNEC (MEC95/PNEC inférieur à 0,1) et une persistance en phase dissoute faible (indice de persistance inférieur à 50). Cette

catégorie rassemble l'ensemble des bêtabloquants et certains pesticides comme le glyphosate et l'azoxystrobine.

- **Des molécules déjà préoccupantes en estuaire de Seine** au regard de leur persistance et leurs concentrations supérieures à leur PNEC. Cette catégorie regroupe des pesticides majoritairement retrouvés en Seine comme l'isoproturon et le diuron mais aussi certains composés pharmaceutiques comme le diclofénac et l'ibuprofène. Parmi ces molécules, certaines sont d'ores et déjà prises en compte dans le cadre de la DCE (diuron et isoproturon) et d'autres ont été ajoutées à la liste de surveillance parallèle (« Watch list ») comme notamment le diclofénac.

- **Des molécules à surveiller en raison :**

- de leur persistance en phase dissoute (indice supérieur à 50) : ces molécules pourraient devenir préoccupantes si leur niveau de concentration tend à augmenter (exemple : carbendazime, oxazépam, métolachlore),
- de leur degré de dépassement de la PNEC. Cette catégorie regroupe deux molécules : le fipronil et la terbutryne.

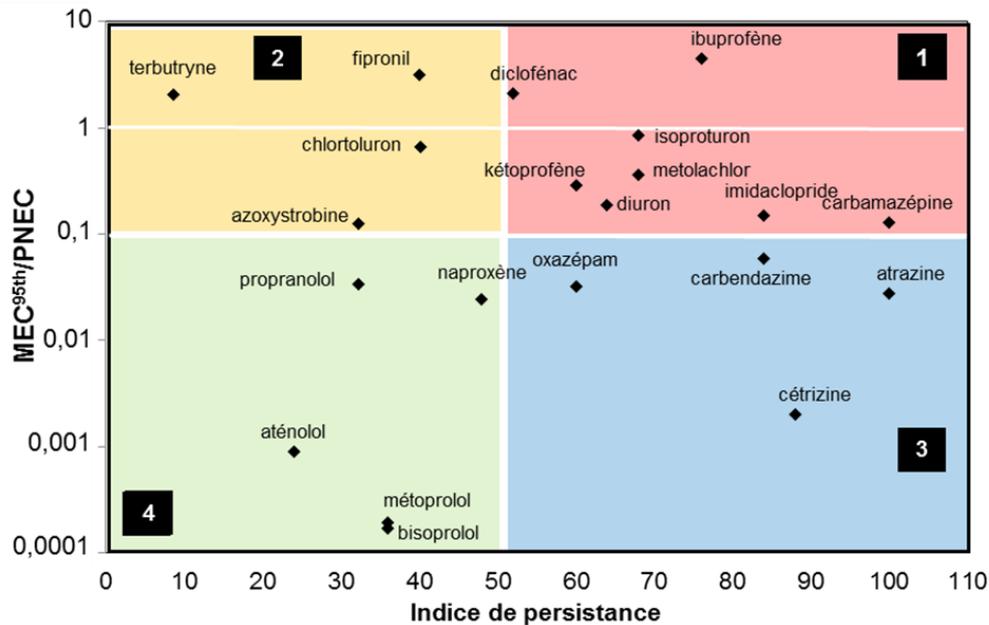


Figure 27 : Mise en évidence des composés problématiques en Seine en fonction du risque (MEC95/PNEC) associé mais également de leur niveau de persistance en Seine.

Le fait qu'une molécule se dégrade ne diminue pas forcément le risque associé. Deux produits de transformation du diuron ont été également suivis durant les 21 jours d'incubation. L'évolution des concentrations dans les différents aquariums issus de la dégradation en Seine est présentée Figure 28. Dans les aquariums avec de faibles concentrations en matières en suspension, et stérilisé, la stabilité du diuron est associée à une absence de produits de dégradation. En revanche, dans l'ensemble des aquariums avec de fortes concentrations en matières en suspension, une diminution marquée des concentrations a été observée. A la plus faible salinité (0,05‰), une disparition totale du diuron est observée en moins de 15 jours. Dans l'aquarium artificiellement salé (5‰), une diminution plus lente des concentrations en diuron a été mise en évidence. La diminution des concentrations en diuron est accompagnée par la détection de 2 produits de transformation issus de la dégradation microbienne : le (dichlorophénylméthyl)-urée (1343 DCPMU) et en particulier le dichlorophényl-urée (134



DCPU) issu de la déméthylation de la fonction amine. Le potentiel toxique de ces produits de transformation a déjà été évalué individuellement et en mélange par Escher et al. (2009) par l'utilisation de modèle prédictif. Sur la base de données de présence dans l'environnement et de toxicités prédites, cette étude a montré que l'absence de prise en compte des produits de transformation du diuron peut engendrer une sous-estimation du risque environnemental de 70 % (Escher et al., 2009).

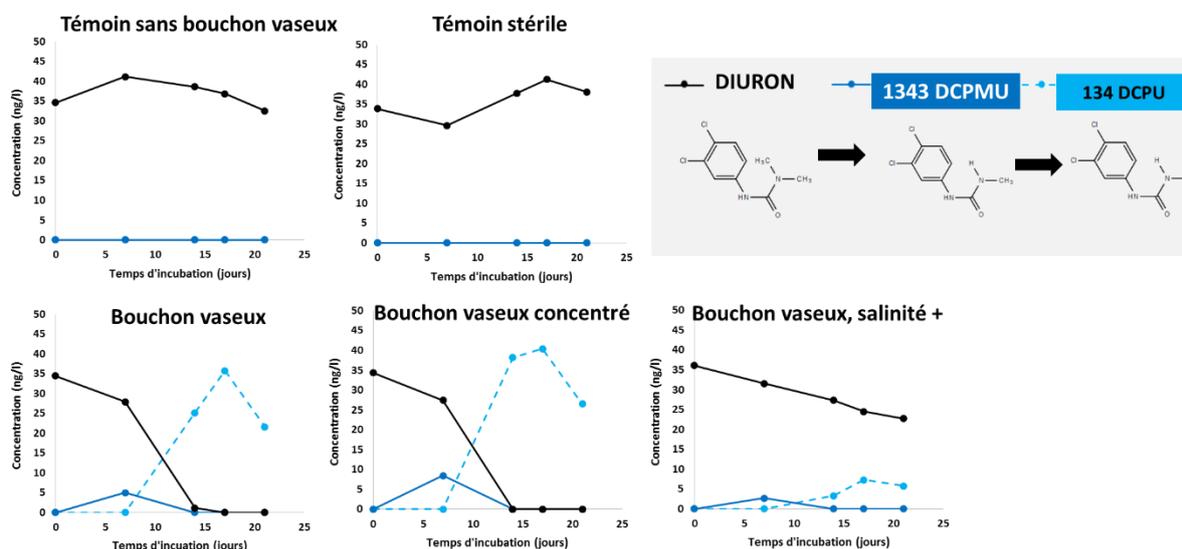


Figure 28 : Evolution des concentrations (ng.L⁻¹) en diuron et en ses produits de transformation dans les différentes conditions expérimentales.

4.1.3 Evolution des activités biologiques au cours des phénomènes de dégradation

En parallèle des analyses chimiques ciblées, différents bioessais *in vitro* ont été réalisés dans le but de caractériser l'évolution des activités biologiques au cours des phénomènes de dégradation. Les résultats sont présentés Tableau XI.

Tableau XI : Récapitulatif des activités biologiques observées lors des expériences d'incubation en présence du bouchon vaseux de la Seine. + : échantillon actif ; - : échantillon inactif.

		Activité ER	Activité AR/GR	Génotoxicité	
		-	-	-S9	+ S9
Sans bouchon vaseux	$t_{initial}$	-	+	+	+
	t_{21}	-	-	-	+
Contrôle stérile	$t_{initial}$	-	+	+	-
	t_{21}	-	-	-	-
Bouchon vaseux	$t_{initial}$	-	+	+	-
	t_{21}	-	-	-	-
Bouchon vaseux concentré	$t_{initial}$	-	+	+	+
	t_{21}	-	-	-	+
Bouchon vaseux, salinité +	$t_{initial}$	-	+	+	+
	t_{21}	-	-	-	+

Aucune activité œstrogénique n'a été détectée dans l'ensemble des conditions et temps étudiés. A l'inverse, la présence de molécules capables d'interagir avec les récepteurs AR et GR a été mise en évidence. Au bout de 21 jours d'incubation, aucune activité n'a été observée, témoignant de la dégradation des molécules actives ciblées à des concentrations inférieures aux limites de détection des bioessais. Au vu des résultats, il semble que les molécules organiques à l'origine du potentiel génotoxique direct se dégradent facilement et cela quelles que soient les conditions testées. En effet, aucun potentiel génotoxique direct n'a été détecté après 21 jours de dégradation. Au contraire, les molécules organiques responsables du potentiel progénotoxique semblent moins biodégradables dans la mesure où chaque potentiel progénotoxique mesuré à T0 a également été mesuré après 21 jours. Cette expérimentation montre que les molécules organiques génotoxiques directes sont moins stables et donc plus facilement dégradables que les molécules organiques progénotoxiques.

4.2 Photodégradation solaire

4.2.1 Descriptif des expériences d'irradiation solaire simulées

Les réactions photochimiques induites par le rayonnement solaire dans le compartiment aquatique ont été simulées grâce à un réacteur photochimique : SUNTEST CPS (Atlas, Illinois, USA). Cet appareil est constitué d'une lampe à arc Xénon et de deux filtres permettant d'éliminer les rayonnements ultraviolets et infrarouges. Le spectre continu de 400 à 600 nm émis est comparable au spectre d'émission du rayonnement solaire naturel. La température de la chambre d'irradiation est maintenue à 25°C et l'intensité d'irradiation a été fixée à 250 W.m⁻². Les phénomènes de photodégradation solaire peuvent être le résultat de deux types de réaction :

- Des réactions de phototransformation directes qui dépendent de paramètres intrinsèques à la molécule comme le coefficient d'absorption molaire ou le rendement quantique.
- Des réactions de phototransformation indirectes qui dépendent de l'action intermédiaire d'espèces chimiques oxydantes qui sont générées par les rayonnements solaires.

Les expériences de photodégradation peuvent être différenciées en fonction des questions scientifiques posées (Figure 29). Les expériences réalisées sur des échantillons naturels non enrichis en composés d'intérêt permettent d'évaluer de façon préliminaire la dégradation des molécules en milieu complexe. A l'inverse, l'utilisation de matrices plus simples enrichies en composés permettent d'obtenir des informations sur : **(1)** les éléments qui régulent les phénomènes de photodégradation indirectes (matières organiques, ions) ; **(2)** la présence de produits de transformation générés.



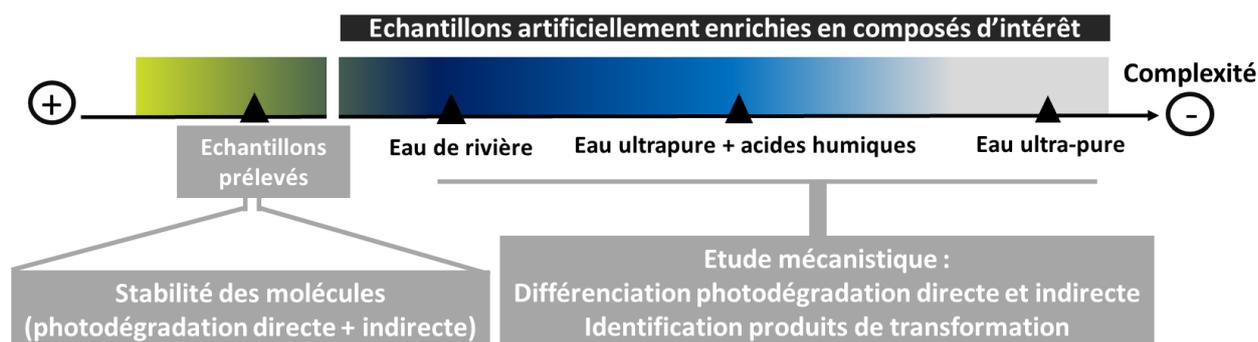


Figure 29 : Représentation schématique des différentes stratégies adoptées pour évaluer la photodégradation des molécules ciblées.

4.2.2 Réactivité des contaminants dans un échantillon prélevé et évolution des activités biologiques sous irradiation solaire simulée

L'objectif a été d'évaluer la stabilité de divers contaminants polaires et l'évolution des activités biologiques, au sein d'un échantillon naturel. Pour cela, un effluent de la STEU de Rouen a été irradié sous un rayonnement solaire artificiel. Ainsi, un réacteur ouvert (L x D : 20 cm x 2,5 cm) couplé à un système de recirculation a été installé à l'intérieur de la chambre d'irradiation. L'effluent irradié (1,1 L) est stocké dans le réservoir et circule à un débit important de manière à rendre négligeable le temps de séjour de la solution dans le réacteur devant le temps total d'irradiation. En raison de la limite de volume de la cuve de recirculation, l'expérience a donné lieu à 4 prélèvements : T0, T200 min, T400 min et T1440 min (24h).

Neuf protocoles analytiques ultra-traces ont été appliqués afin d'évaluer la stabilité des contaminants apportés en Seine. Différents bioessais *in vitro* ont également été réalisés afin d'évaluer l'évolution des molécules actives. Les résultats obtenus sont présentés Tableau XII.

Aucune activité œstrogénique n'a pu être mise en évidence avant et après irradiation. Une activité AR/GR a été détectée dans l'effluent initial ($T_{initial}$). L'irradiation durant 24h de l'effluent a eu pour effet de diminuer de façon significative cette activité, témoignant ainsi de la dégradation des molécules capables d'interagir avec les récepteurs aux androgènes. Un constat similaire peut être fait, en ce qui concerne les molécules génotoxiques et progénotoxiques. L'évaluation de la génotoxicité à l'aide du SOS-Chromotest (Voir paragraphe I.2.1a p16) montre qu'après une irradiation de 24 heures aucun potentiel génotoxique n'est mis en évidence, que cela soit avec ou sans activation métabolique (S9).

Tableau XII : Activités biologiques de l'effluent de la STEU de Rouen avant ($t_{initial}$) et après 24h d'irradiation solaire ($t_{24h\ irradié}$).

Mécanismes ciblées	Matériel biologique	Activation métabolique	$t_{initial}$	$t_{24h\ irradié}$
Récepteur aux œstrogènes (ER)	lignée cellulaire MELN		-	-
Récepteur AR/GR	lignée cellulaire MDA-Kb2		+	-
Génotoxicité	E.Coli PQ37	sans S9	+	-
		avec S9	+	-

Concernant la caractérisation chimique, ces 4 points de mesure n'ont pas été suffisants pour calculer des cinétiques de dégradation et les temps de demi-vie associés. Cependant, il est possible de réaliser une échelle de persistance en prenant en compte le pourcentage

restant au bout de 24 h d'irradiation solaire (Figure 30). Dans ces échantillons, les substances suivantes ont été identifiées : ofloxacine, propranolol, rivaroxaban, dabigatran, névirapine, oxazépam, carbamazépine, aténolol. Les résultats montrent que le pourcentage de dégradation varie de façon importante au sein même d'une même famille de composés et a *fortiori* lorsque les composés n'appartiennent pas à la même famille chimique. Ce constat met en avant la difficulté de généraliser sur le comportement photochimique des micropolluants sur la seule base des familles thérapeutiques. Pour une meilleure compréhension du devenir environnemental des micropolluants organiques, les études doivent donc être conduites au cas par cas et en fonction de la structure chimique.

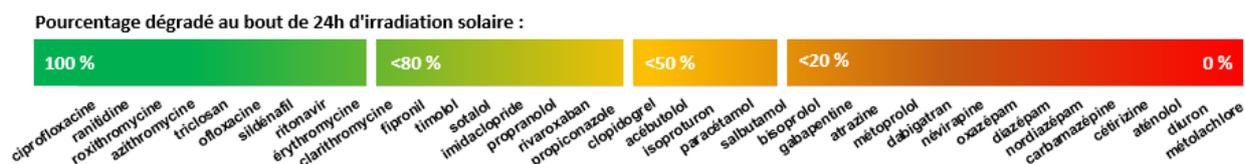


Figure 30 : Echelle de persistance des molécules dans l'effluent de Rouen après 24 h d'irradiation simulée.

Bien qu'en partie bien éliminés, certains contaminants peuvent s'avérer problématiques. L'étude de la photodégradation du fipronil a permis de montrer une diminution de sa concentration (Figure 31). Avec une valeur de PNEC très faible de 0,77 ng.L⁻¹, l'insecticide semble très toxique pour l'environnement. Malgré la dégradation partielle du composé en 24 h, la concentration en fipronil reste supérieure à 0,77 ng.L⁻¹, et la formation d'autres composés, bien que moins toxiques, ne permet potentiellement pas de diminuer la toxicité pour le milieu.

La photodégradation du fipronil s'accompagne de la formation du fipronil-desulfinyl (perte du radical sulfinyle). En effet, le fipronil-desulfinyl, possède une concentration inférieure à la limite de quantification (LQ = 0,32 ng.L⁻¹) au temps initial T0. Lors de l'irradiation solaire simulée, sa concentration augmente, passant de 0,71 ng.L⁻¹ à 200 minutes jusqu'à 1,57 ng.L⁻¹ après 24h. Une étude antérieure (Bobé et al., 1998), avait déjà observé la formation le fipronil-desulfinyl suite à des phénomènes d'irradiations solaires. Néanmoins, malgré de faibles concentrations et une toxicité plus faible du fipronil-desulfinyl (LC50 = 150 ± 21 µg.L⁻¹) par rapport à la molécule mère (64 ± 22 µg.L⁻¹) (Schlenk et al., 2001), des études ont montré que le produit de dégradation semble plus stable vis à vis des phénomènes de photodégradation (t_{1/2} = 120-134 h contre 10-125 h pour le fipronil) (Ngim et al., 2000).

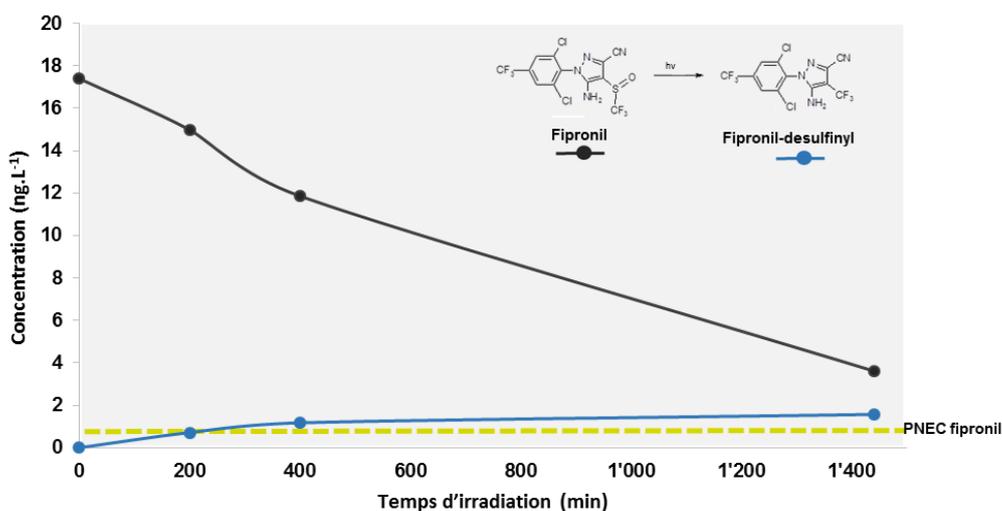


Figure 31 : Photodégradation du fipronil dans l'effluent de la STEU de Rouen.

La réactivité photochimique des micropolluants en milieux artificiellement reconstitués et dopés a porté sur des molécules sélectionnées (Tableau X) pour leur occurrence (groupe A), leur toxicité (groupe B) ou le manque de données bibliographiques (groupe C). Des études plus approfondies ont été réalisées sur deux familles de médicaments : les fluoroquinolones (FQ) et les nouveaux anticoagulants oraux (NACO). Pour ces deux familles, les données présentes dans la littérature concernant leur occurrence et leurs processus de dégradations abiotiques restent à étoffer, en particulier pour les NACO. Les FQ sont des antibactériens de synthèse ; trois molécules ont été choisies, l'ofloxacine, la sarafloxacine, et la danofloxacine. Les NACO sont des anticoagulants administrés par voie orale et ont pour vocation de compléter/remplacer les antivitamines K. Les substances étudiées sont le rivaroxaban, le dabigatran, et l'apixaban.

L'étude de la dégradation abiotique de l'ensemble des molécules montre qu'aucune réaction d'hydrolyse n'a lieu à température ambiante. En revanche, les molécules sont dégradées sous rayonnement solaire simulé. Les cinétiques observées suivent toutes un ordre 1 apparent. Les temps de demi-vie (heures) des molécules dans différentes matrices sont présentés. Tableau XIII L'étude des molécules appartenant aux groupes A et B, s'est focalisée sur les phénomènes photodégradation en eaux purifiées et en eaux de rivière. Certaines molécules sont stables aux temps d'irradiation étudiés : aténolol, ibuprofène et métoprolol. A l'inverse, certaines molécules sont particulièrement instables dans l'eau ultrapure. En effet, le diclofénac, l'abacavir et les fluoroquinolones ont des temps de demi-vie inférieurs à 1h. L'irradiation en milieu complexe (matière organique dissoute, ions) peut engendrer :

- aucun effet sur les cinétiques de dégradation (exemple : diclofénac)
- une accélération des cinétiques de dégradation (exemple : carbamazépine, propranolol)
- un ralentissement des cinétiques de dégradation (exemple : sarafloxacine, abacavir).

Pour ces deux familles (fluoroquinolones et NACO) pour lesquelles les données bibliographiques sont encore rares, l'impact de la matière organique et des ions dissous sur les cinétiques de dégradation a été évalué.

Tableau XIII : Temps de demi-vie calculés de certaines molécules artificiellement dopées dans différentes matrices irradiées en laboratoire. (- : non étudié ; n.d. non déterminée par absence de points expérimentaux).

	Eau purifiée	Eau de rivière	Eau purifiée + acides humiques	Eau minérale	Eau purifiée + NO ₃ ⁻	Eau purifiée + NO ₃ ⁻ + HCO ₃ ⁻	
groupe A	Aténolol	stable	stable	-	-	-	
	Carbamazépine	stable	44	-	-	-	
	Diclofénac	0,58	0,60	-	-	-	
	Ibuprofène	stable	stable	-	-	-	
	Métoprolol	stable	stable	-	-	-	
	Naproxène	3,45	2,41	-	-	-	
	Oxazépam	25	19	-	-	-	
	Propranolol	18,73	3,93	-	-	-	
	Sotalol	stable	2,37	-	-	-	
groupe B	Abacavir	n.d.	5,7	-	-	-	
	Névirapine	stable	19	-	-	-	
groupe C	Danofloxacine	0,03	0,04	0,39	-	-	
	Ofloxacine	0,23	1,17	2,31	-	-	
	Sarafloxacine	0,08	0,20	0,45	-	-	
	Apixaban	n.d.	96,3	-	23,6	10,4	26,9
	Rivaroxaban	2,3	2,3	-	2,2	2	-
	Dabigatran	19,9	24,1	-	7,4	6,8	-

La photodégradation du danofloxacin (pH = 7,5) conduit à des $t_{1/2}$ de 0,03, 0,04 et 0,39 heures tandis que celle du sarafloxacin conduit à des $t_{1/2}$ de 0,08, 0,2, et 0,45 heures respectivement dans une eau purifiée, une eau de rivière, et une eau purifiée dopée en acides humiques. L'évolution des $t_{1/2}$ de ces deux molécules en fonction de la matrice aqueuse est identique à celle de l'ofloxacin.

Les résultats de photolyse du rivaroxaban montrent que ce dernier se dégrade rapidement par voie directe dans l'eau purifiée. Le $t_{1/2}$ mesuré est de 2,3 heures. Lorsque le rivaroxaban est irradié dans une eau minérale (Volvic) ou une eau de rivière (l'Isle, Périgueux, Dordogne) aucun changement significatif du $t_{1/2}$ n'a été observé. Le rivaroxaban ne subit donc aucune photosensibilisation apparente dans les conditions de l'expérience. Le rendement quantique polychromatique de photolyse est de $0,044 \text{ mol.E}^{-1}$.

Dans le cas du dabigatran la situation est différente. Ce composé se dégrade dans une eau purifiée sous l'effet du rayonnement solaire avec un $t_{1/2}$ de 19,9 heures. La dégradation est accélérée dans l'eau de Volvic avec un $t_{1/2}$ de 7,4 heures. L'ajout d'ions nitrates (concentration égale à celle mesurée dans l'eau de Volvic : $7,2 \text{ mg.L}^{-1}$) à de l'eau purifiée a permis de montrer l'effet photosensibilisant (formation de radicaux hydroxyles) de ces ions envers le dabigatran. Le $t_{1/2}$ obtenu est de 6,8 heures. La barre d'erreur sur les $t_{1/2}$ étant de $\pm 10\%$, l'accélération de la photolyse peut être attribuée principalement aux ions nitrates. A l'inverse, dans une eau de rivière la photolyse du dabigatran est ralentie avec un $t_{1/2}$ de 24,1 heures. Pourtant, la concentration en ions nitrates mesurée dans cette eau (environ $7,0 \text{ mg.L}^{-1}$) est proche de celle de l'eau de Volvic. Ce résultat peut être expliqué par la présence de matière organique dissoute (MOD) qui agit probablement en tant que piègeur de radicaux hydroxyles. Enfin, le rendement quantique polychromatique de photolyse du dabigatran a été évalué à $2,2 \times 10^{-4} \text{ mol.E}^{-1}$. La photolyse directe du dabigatran est donc 200 fois moins efficace que celle du rivaroxaban.

Pour l'apixaban, après 19 heures d'irradiation aucune dégradation n'a été observée dans l'eau purifiée. La dégradation de l'apixaban par voie directe est donc négligeable. Dans l'eau de Volvic, le $t_{1/2}$ mesuré est de 23,6 heures. L'étude de la photolyse du composé dans l'eau purifiée dopée en ions nitrates ($7,2 \text{ mg.L}^{-1}$) a permis de mesurer un $t_{1/2}$ de 10,4 heures. Comme dans le cas du dabigatran, ces ions induisent une réaction photosensibilisée. Toutefois, cette dernière cinétique est plus rapide que celle observée dans l'eau de Volvic. Un ou plusieurs autres ions induisent donc un ralentissement de la cinétique dans l'eau minérale. Les ions hydrogénocarbonates sont principalement à l'origine du piégeage des radicaux hydroxyles. Effectivement, l'ajout d'ions nitrates ($7,2 \text{ mg.L}^{-1}$) et hydrogénocarbonates ($74,0 \text{ mg.L}^{-1}$) à de l'eau purifiée permet d'obtenir un $t_{1/2}$ de 26,9 heures (contre 23,6 heures dans l'eau de Volvic). Enfin, dans l'eau de rivière le $t_{1/2}$ de l'apixaban est de 96,3 heures indiquant que la MOD agit probablement en tant que piègeur de radicaux hydroxyles.



Bilan sur la réactivité des contaminants :

- ✓ Les phénomènes de dégradation à l'obscurité sont régis par les concentrations en matières en suspension, la salinité, et la présence de micro-organismes. En ce sens, la zone de turbidité maximale possède un rôle épurateur en accélérant les cinétiques de dégradation.
- ✓ Le comportement photochimique des molécules est diversifié et nécessite des études plus approfondies pour évaluer notamment l'impact des éléments dissous (MOD, ions..) sur les cinétiques de dégradation.

5 Apport de la spectrométrie de masse haute résolution à la surveillance chimique.

L'ensemble des analyses a été effectué avec un spectromètre de masse hybride quadripôle/temps de vol (i.e. quadrupole/ time of flight, Q-TOF) qui permet d'allier sélectivité et résolution. L'utilisation du Q-TOF en temps qu'analyseur en temps de vol (mode MS) permet d'obtenir la masse exacte (inférieure à 5 ppm) et la formule brute de chaque molécule présente (Figure 32). L'utilisation en tandem des deux analyseurs (mode MS/MS) permet de sélectionner et fragmenter les molécules d'intérêt afin d'obtenir son spectre de fragmentation et des informations sur sa structure. Ces deux modes d'acquisition ont été utilisés soit simultanément dans un mode données-dépendant (i.e. « auto-MS/MS ») pour les matrices les plus simples ou en deux injections pour les matrices les plus complexes. L'acquisition des spectres par le détecteur a été réalisée à une fréquence de 2 GHz sur une gamme de masse de 70 à 1700 m/z . Les ions précurseurs ont été fragmentés à différentes énergies de collision allant de 10 à 40 eV.

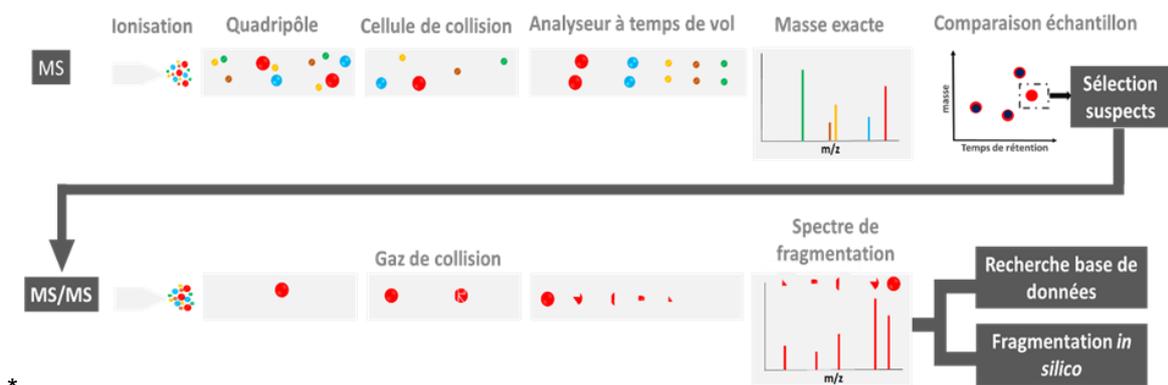


Figure 32 : Représentation simplifiée de l'analyse avec un spectromètre de masse hybride Quadripôle-temps de vol (Q-TOF).

5.1 Identification de nouveaux produits de transformation

Un travail d'identification des produits de transformation issus de la photodégradation solaire de 7 molécules a été mené. Au total, sept composés pharmaceutiques provenant de 3 classes thérapeutiques ont été sélectionnés sur différents critères : **(1)** présence dans

l'environnement, **(2)** toxicité suspectée même à faible concentration, **(3)** molécules dont les données concernant leur photodégradation encore trop éparses.

L'identification des produits de transformation a été réalisée à partir d'échantillons d'eau ultrapure ou eaux minérales artificiellement enrichies en composés. Pour chaque molécule étudiée, trois types d'échantillons ont été récoltés et étudiés :

- un échantillon non irradié (temps initial ou T0) représentant le témoin,
- des échantillons irradiés à différents temps : des temps à faible et fort taux de conversion afin de pouvoir discriminer les produits de transformations primaires des secondaires,
- Un échantillon placé dans la chambre d'irradiation mais protégé par un papier aluminium : témoin obscurité. Cet échantillon subit les variations thermiques qu'engendre la chambre d'irradiation.

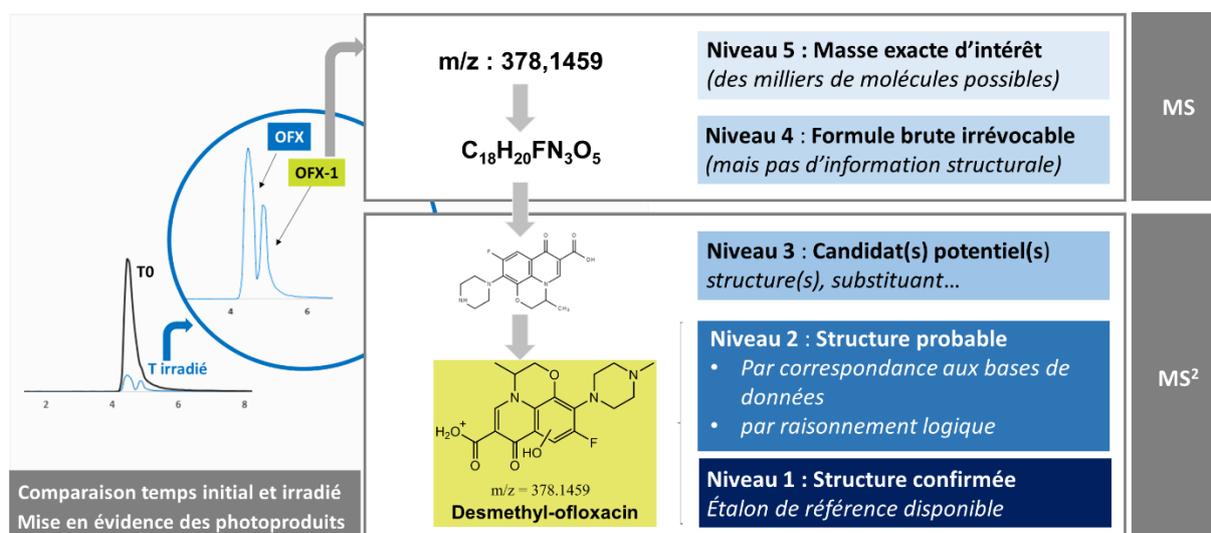


Figure 33 : Niveaux d'identification des produits de transformation à partir de l'exemple du photoproduit majoritaire de l'ofloxacin (nomenclature des niveaux adaptée de Schymanski et al. (2014)).

Après analyses, une première phase de retraitement a été effectuée sur le logiciel MassHunter Qualitative (Agilent Technologies). Les différentes étapes et niveaux d'identification sont résumés dans la Figure 33 en prenant l'exemple de l'identification du photoproduit majoritaire de l'ofloxacin.

- Les caractéristiques moléculaires des ions possédant une intensité 10 fois supérieure au bruit de fond ont été recherchées et extraites par l'algorithme de la fonction MFE (Feature by Molecular Extraction). Cette première phase permet d'obtenir les caractéristiques de base des ions présents comme la masse exacte et les amas mono-isotopiques, l'état de charge. Ce niveau représente le niveau 5 d'identification (m/z : 378,1459 dans le cas du produit de transformation de l'ofloxacin).

- A partir de ces informations, les formules brutes sont établies. La liste des atomes probables a été ajustée en se basant sur la formule brute de la molécule mère. Seules les formules obtenant un score supérieur à 70% sont générées (niveau d'identification 4). Ce score compare la masse obtenue expérimentalement à celle calculée à partir de la formule générée, avec un delta fixé à 5 ppm.

- Une phase de sélection des composés d'intérêt est réalisée afin de mettre en évidence, les composés non initialement présents dans les témoins avant irradiation et dans les témoins « obscurité ». Pour cela, la liste des ions présents dans les témoins est comparée à celle des



ions de l'échantillon d'intérêt grâce à l'utilisation du logiciel MassProfiler (Agilent Technologies). Cette étape est indispensable pour évaluer les ions pertinents à fragmenter qui sont présents uniquement dans l'échantillon d'intérêt.

- Après fragmentation des ions d'intérêt, les spectres de fragmentation ont été comparés à différentes bases de données spectrales : base de données interne au laboratoire, Metlin et MassBank (libre-service) et Forensic (Agilent Technologies). Si aucune correspondance n'est trouvée, des logiciels de fragmentation *in silico* sont utilisés afin d'obtenir des informations complémentaires sur la structure du composé et réduire le nombre de suspects. Deux logiciels ont été utilisés lors de ces travaux : Molecular Structure Correlator et Metfrag (<https://msbi.ipb-halle.de/MetFrag/>). En fonction du niveau de preuve, l'identification est alors d'un niveau 3 ou 2.

- L'étape ultime de confirmation consiste à injecter dans les mêmes conditions, l'étalon analytique (s'il est commercialement disponible) et le composé présent dans l'échantillon. L'identification est confirmée (niveau d'identification 1) si le temps de rétention chromatographique, la masse exacte et le spectre de fragmentation correspondent entre le composé inconnu et l'étalon analytique.

Au final, ce travail en spectrométrie de masse haute résolution a permis d'identifier et confirmer la structure de 4 photoproduits (l'ofloxacin-n-oxide, le N-déméthyl-ofloxacin, le N-desméthyldanofloxacin, et le 4-aminobenzamidine) de suspecter la structure d'un grand nombre de produits de transformation issus du dabigatran, apixaban, rivaroxaban, ofloxacin, sarafloxacin, danofloxacin et de l'abacavir. L'ensemble des photoproduits est récapitulé dans le Tableau XIV.

Tableau XIV : Récapitulatifs de l'ensemble des photoproduits détectés et identifiés.

	Molécules mères	Code	m/z	Formule Brute	Niveau identification	Nom composés
NACO(s)	Dabigatran	DAB	472.2116	C ₂₅ H ₂₆ N ₇ O ₃	-	4-aminobenzamidine
		DAB-1	136.0874	C ₇ H ₁₀ N ₃	1	
		DAB-2	323.1145	C ₁₇ H ₁₅ N ₄ O ₃	2	
		DAB-3	279.1248	C ₁₆ H ₁₅ N ₄ O	2	
	Rivaroxaban	RIV	436.0739	C ₁₉ H ₁₉ ClN ₃ O ₅ S	-	
		RIV-1	436.0732	C ₁₉ H ₁₉ ClN ₃ O ₅ S	2	
	Apixaban	API	460.2012	C ₂₅ H ₂₆ N ₅ O ₄	-	
		API-1	191.1186	C ₁₁ H ₁₅ N ₂ O	3	
		API-2	287.1146	C ₁₄ H ₁₅ N ₄ O ₃	3	
		API-3	354.1581	C ₁₈ H ₂₀ N ₅ O ₃	3	
		API-4	476.1939	C ₂₅ H ₂₆ N ₅ O ₅	3	
		API-5	476.1939	C ₂₅ H ₂₆ N ₅ O ₅	3	
		API-6	446.1818	C ₂₄ H ₂₄ N ₅ O ₄	3	
	API-7	458.1820	C ₂₅ H ₂₄ N ₅ O ₄	3		
Fluoroquinolones	Ofloxacin	OFX	362.1437	C ₁₈ H ₂₁ FN ₃ O ₄	-	Desmethyl-ofloxacin Ofloxacin-n-oxide
		OFX-1	364.1323	C ₁₇ H ₁₉ FN ₃ O ₅	3	
		OFX-2	348.1357	C ₁₇ H ₁₉ FN ₃ O ₄	1	
		OFX-3	378.1459	C ₁₈ H ₂₁ FN ₃ O ₅	1	
	Danofloxacin	DAN	358.1571	C ₁₉ H ₂₁ FN ₃ O ₃	-	Desmethyl-danofloxacin
		DAN-1	344.1410	C ₁₈ H ₁₉ FN ₃ O ₃	1	
		DAN-2	328.1666	C ₁₈ H ₂₂ N ₃ O ₃	2	
	DAN-3	346.1567	C ₁₈ H ₂₁ FN ₃ O ₃	2		
	Sarafloxacin	SAR	386.1313	C ₂₀ H ₁₈ F ₂ N ₃ O ₃	-	
		SAR-1	370.1205	C ₁₉ H ₁₇ FN ₃ O ₄	3	
		SAR-2	384.1365	C ₂₀ H ₁₉ FN ₃ O ₄	3	
		SAR-3	342.1255	C ₁₈ H ₁₇ FN ₃ O ₃	3	
	SAR-4	400.1309	C ₂₀ H ₁₉ FN ₃ O ₅	3		
	AntiVIH	Abacavir	ABA	287.1615	C ₁₄ H ₁₈ N ₆ O	-
ABA-1			288.1461	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₂	3	
ABA-2			247.1313	C ₁₁ H ₁₄ N ₆ O	2	
ABA-3			319.1521	C ₁₄ H ₁₈ N ₆ O ₃	3	
ABA-4			289.1411	C ₁₃ H ₁₆ N ₆ O ₂	3	
ABA-5			275.1256	C ₁₂ H ₁₄ N ₆ O ₂	3	

Concernant les fluoroquinolones, ce travail d'identification a abouti à l'identification de 3 photoproduits d'un niveau 1 (confirmée par l'injection d'un étalon analytique) : le N-déméthyl-ofloxacin, l'ofloxacin-n-oxide et le N-déméthyl-danofloxacin. L'irradiation solaire de l'ofloxacin, de la danofloxacin et de la sarafloxacin a respectivement générée la formation de 3, 3 et 4 photoproduits (Tableau XIV). La formation de déméthyl-ofloxacin et celle de l'ofloxacin n-oxide ont déjà été recensées dans des études en laboratoire visant à étudier la dégradation de l'ofloxacin sous l'action de traitements d'ozonation (Carbajo et al., 2015; Tay and Madehi, 2015), de photocatalytique (Calza et al., 2008) et de biodégradation (Gros et al., 2014). Bien que non confirmé en raison de l'absence de données concernant leur fragmentation (données MS/MS), la formation de déméthyl-ofloxacin et celle de l'ofloxacin n-oxide, lors de phénomènes d'irradiation solaire avaient déjà été suspectée (Zgad Zaj et al., 2015). L'irradiation de la danofloxacin (DAN) a conduit à l'observation de 3 photoproduits: DAN-1 (m/z : 344,1410), DAN-2 (m/z : 328,1666), et DAN-3 (m/z : 346,1567) (Tableau XIV). La présence des produits de transformation de m/z équivalents avait également déjà été mis en évidence dans différentes études qui reproduisaient la photodégradation solaire et les traitements UV appliqués en STEU dans de l'eau ultrapure ou de rivière (Liu et al., 2011; Sturini et al., 2012a, 2012b; Hubicka et al., 2014). Une confirmation par l'injection d'un étalon

analytique a permis de confirmer l'identité du photoproduit DAN-1 (m/z : 344,1410) : le N-déméthyl-danofloxacin.

Le travail initié sur l'identification des photoproduits de trois NACO (apixaban, dabigatran, rivaroxaban) a permis de mettre en évidence la présence de 2 photoproduits pour le dabigatran, d'un composé pour le rivaroxaban et de 7 molécules pour l'apixaban (Tableau XIV). En raison de leur utilisation récente, les données bibliographiques concernant ces molécules sont encore très limitées en ce qui concerne leur occurrence et leur toxicité dans l'environnement. Cependant, ce travail a permis l'identification (niveau 1) de la 4-aminobenzamidine comme photoproduit majoritaire du dabigatran.

Un des objectifs suivant a été de rechercher dans différentes matrices, les produits de phototransformation qui avaient été préalablement identifiés lors des expériences en laboratoire. Un des problèmes concernant la recherche des produits de transformation dans l'environnement réside dans l'absence des standards analytiques. Face à ce problème, la spectrométrie de masse haute résolution offre également de nouvelles perspectives. Effectivement l'injection des solutions irradiées a permis d'obtenir les spectres de fragmentation de chaque photoproduit mais aussi leur temps de rétention. A partir de ces informations, il est possible de réaliser un criblage suspect de l'ensemble des photoproduits présents dans un échantillon (Figure 33). Le choix des échantillons sélectionnés s'est basé sur les données d'ensoleillement récupérées au niveau de Rouen (<http://www.meteociel.fr/>). Des extraits issus des échantillonnages ponctuels et passifs avec des mois d'ensoleillement intense (avril, septembre) mais aussi pour le comparatif des mois d'ensoleillement faibles (février et janvier) ont été analysés. Aucun produit de transformation identifié en laboratoire (Tableau XIV) durant les expériences de photodégradation n'a pu être mis en évidence dans les échantillons prélevés en Seine qu'ils soient issus de l'échantillonnage ponctuel ou de l'échantillonnage passif.

5.2 Identification de molécules non ciblées par les analyses classiques

Il existe actuellement deux procédures analytiques différentes afin d'identifier des molécules dans l'environnement. Les contaminants peuvent être identifiés et quantifiés par des méthodes analytiques ciblées en utilisant des étalons analytiques. Cependant ces méthodes requièrent des étapes de présélection et de priorisation des molécules à suivre (Figure 34). A l'inverse, des méthodes de criblages non ciblés permettent d'identifier la présence d'une molécule alors qu'elles n'étaient pas préalablement ciblées, recherchées, priorisées (Figure 34).

Pour aller plus loin, et sur un panel réduit d'échantillon une approche non ciblée a été réalisée dans le but de mettre en évidence des composés non recherchés par les méthodes classiques. Le criblage non ciblée, s'intéresse à l'ensemble des composés présents dans l'échantillon. L'ensemble des pics détectés sont considérés et les molécules les plus abondantes sont automatiquement fragmentées dans le but d'obtenir des informations sur leurs structures (mode Auto MS/MS). Les spectres de fragmentation ont été comparés à différentes bases de données dans le but d'identifier le plus de molécules. De façon exploratoire, certains extraits issus de l'échantillonnage passif (Caudebec, Oissel, La Bouille et effluent de la STEU) ont été analysés avec une méthode non ciblée.



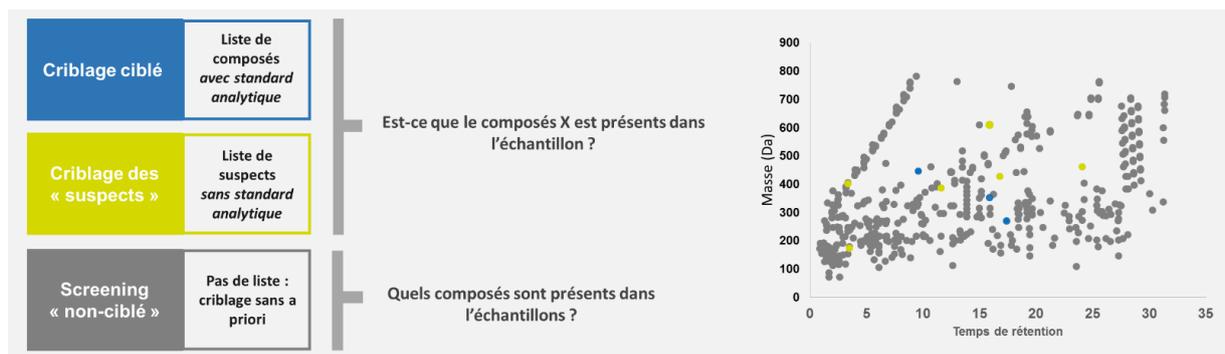


Figure 34 : Les différentes stratégies d'analyses en spectrométrie de masse haute résolution (adapté de Togola et al., (2015)).

Cette approche préliminaire a permis par simple comparaison aux bases de données préexistantes (METLIN, Forensic) de mettre en évidence la présence probable de 26 molécules qui n'avaient pas été incluses initialement dans les listes des 200 molécules ciblées. L'ensemble des molécules identifiées à un niveau de confiance entre 1 et 2 (cf. Figure 32) est décrit dans le La spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) ne couvre pas l'ensemble des molécules réellement présentes dans un échantillon. En effet, sa représentativité est limitée en amont par les phases d'échantillonnage, d'extraction et d'analyses chromatographiques, et par le mode d'ionisation. De plus, la confirmation des molécules présentent est fortement dépendante de l'implémentation des bases de données en ligne, et de la commercialisation des étalons analytiques. Cependant, à l'heure actuelle, les méthodes basées sur la HRMS représentent un outil de diagnostic puissant pour mieux cibler par la suite des molécules à fort enjeu environnemental au niveau d'un estuaire (occurrence, toxicité). En effet, utilisées de façon complémentaire aux analyses ciblées elles permettent a posteriori d'identifier et de mettre en avant des molécules non recherchées a priori.

Tableau XV. En sortie de Rouen (E), plus de 24 molécules sont probablement présentes, contre seulement 12 qui ont été également retrouvées dans l'estuaire de Seine (Caudebec (C), La Bouille (L), Oissel (O)). Parmi ces molécules, des médicaments de diverses classes thérapeutiques sont bien représentés. Cinq molécules sont ubiquistes : le dénatonium, l'ibésartan, la lidocaïne, le tramadol, et la venlafaxine. Certains métabolites ont également été retrouvés : c'est notamment le cas des métabolites de la méthadone (EEDP). Parmi ces molécules, certaines sont déjà connues pour engendrer des effets à des concentrations de 30 ng.L⁻¹ (Tousova et al., 2017). On retrouve également des molécules mères associées à leurs produits de métabolisation, comme par exemple, la venlafaxine et la o-desméthylvenlafaxine ou encore le tramadol et le o-desméthyltramadol.

La spectrométrie de masse haute résolution (HRMS) ne couvre pas l'ensemble des molécules réellement présentes dans un échantillon. En effet, sa représentativité est limitée en amont par les phases d'échantillonnage, d'extraction et d'analyses chromatographiques, et par le mode d'ionisation. De plus, la confirmation des molécules présentent est fortement dépendante de l'implémentation des bases de données en ligne, et de la commercialisation des étalons analytiques. Cependant, à l'heure actuelle, les méthodes basées sur la HRMS représentent un outil de diagnostic puissant pour mieux cibler par la suite des molécules à fort enjeu environnemental au niveau d'un estuaire (occurrence, toxicité). En effet, utilisées de façon complémentaire aux analyses ciblées elles permettent a posteriori d'identifier et de mettre en avant des molécules non recherchées a priori.

Tableau XV : Liste des molécules probablement présentes (niveau 2 d'identification) dans les échantillons d'Oissel (O), Caudebec (C), La Bouille, et de la sortie de la STEU (E). Les échantillons de type POCIS ont été analysés en LC-QTOF (ionisation positive).

Composés	Formule	CAS	Niveau identification*	Sites	Usage / Origine
Amisulpride	C17H27N3O4S	71675-85-9	2	E, L, C	neuroleptique
Articaïne	C13H20N2O3S	23964-58-1	2	L, C	anesthésique local
Atazanavir	C38H52N6O7	198904-31-3	2	L, C	anti-VIH
Céliprolol	C20H33N3O4	56980-93-9	2	E, C	béta-bloquant
Dénatonium	C21H29N2O	3334-33-6	2	E, L, C, O	anesthésique local
Dextrophan	C17H23NO	125-73-5	2	E	métabolite actif dextrométhorphan (opiacé)
Diacétolol	C16H24N2O4	28197-69-5	2	E, C	béta-bloquant
Dimoxystrobine	C19H22N2O3	149961-52-4	2	E	fongicide
EDDP	C20H23N	-	2	E	metabolite primaire de la méthadone
Escitalorпам	C20H21FN2O	128196-01-0	1	E	antidépresseur
Fexofénadine	C32H39NO4	83799-24-0	2	E	antihistaminique
Irbesartan	C25H28N6O	138402-11-6	2	E, L, C, O	antihypertenseur
Lamotrigine	C9H7Cl2N5	84057-84-1	2	E	anticonvulsivant
Lévométhadone	C21H27NO	125-58-6	2	E	analgésique (opioïde)
Lidocaïne	C14H22N2O	137-58-6	2	E, L, C, O	anesthésique local / anti-arythmique
Miansérine	C18H20N2	24219-97-4	2	E	antidépresseur
DEET	C12H17NO	134-62-3	2	E, C	répulsif, insecticide
O-Desméthyltramadol	C15H23NO2	-	2	E	metabolite du Tramadol
O-desméthylvenlafaxine	C16H25NO2	93413-62-8	2	E	antidépresseur
Pirimiphos-méthyl	C11H20N3O3PS	29232-93-7	2	E	insecticide
Propafénone	C21H27NO3	54063-53-5	2	E	antiarythmique
Sitagliptin	C16H15F6N5O	486460-32-6	2	E	antidiabétique
Tramadol	C16H25NO2	27203-92-5	2	E, L, C, O	antalgique
Triapríde	C15H24N2O4S	51012-32-9	2	E	neuroleptique
Trospium	C25H30NO3	10405-02-4	2	E, L, C	anticholinergique
Venlafaxine	C17H27NO2	93413-69-5	1	E, L, C, O	antidépresseur
Vérapamil	C27H38N2O4	52-53-9	2	E	inhibiteur calcique

* : selon Schymanski et al., 2004a ; E : Effluent Rouen, L: La Bouille, C: caudebec, O: Oissel



Conclusion

Les contaminants d'intérêt émergents tels que les médicaments, les biocides, les pesticides polaires, mais également des molécules biologiquement actives (génotoxiques, perturbateurs endocriniens, ...) sont bien présents en estuaire de Seine à des concentrations parfois supérieures à celles retrouvées dans d'autres estuaires français (notamment la Gironde). Ces contaminants sont majoritairement apportés par Poses, et proviennent donc des usages du bassin versant amont. Les molécules suivies de longue date dans l'estuaire (pharmaceutiques), n'ont subi que de faibles variations de concentrations depuis 10 ans. Cependant, de nouvelles molécules ont pu être mises en avant comme notamment, l'octocrylène, la gabapentine, ou encore des anticoagulants tels que le dabigatran. De plus, l'approche par la spectrométrie de masse haute résolution a permis de mettre en avant la présence de molécules encore non recherchées en estuaire de Seine et pourtant connues pour engendrer des effets sur les organismes. Le comportement des molécules est très dépendant des conditions environnementales et de la structure de la molécule : matières en suspension, salinité, lumière, matière organique. Ainsi, l'évaluation du risque environnemental doit prendre en compte la persistance des composés parents de manière adaptée au milieu d'étude mais également la formation de produits de transformation. Une présentation synthétique des différentes approches appliquées dans CRAPPSE, et de leurs intérêts respectifs, est présentée Figure 35 et 36.

Le projet CRAPPSE a permis ainsi d'apporter :

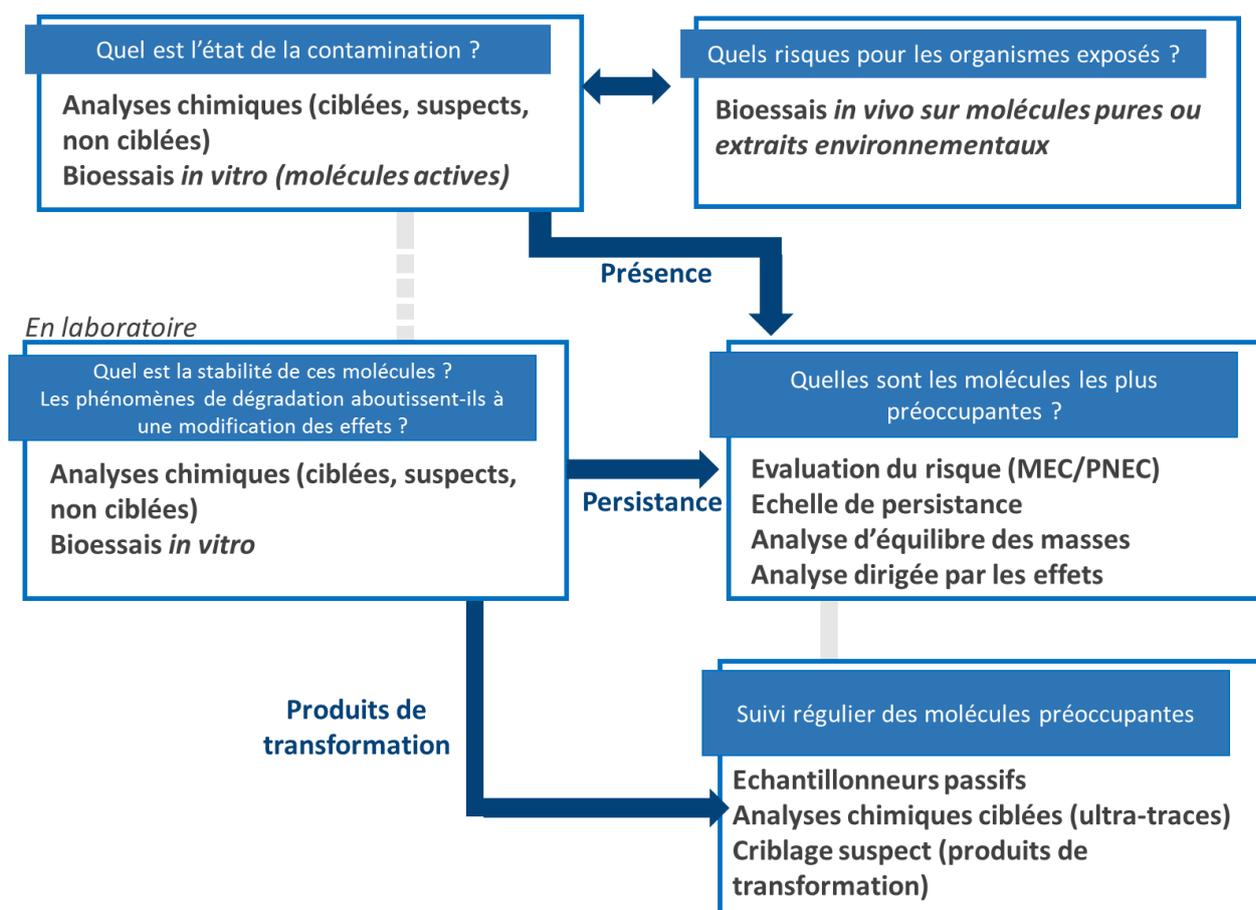
- **De nouvelles données quant à la présence, par des méthodes analytiques multi-résidus, ultra-traces, de divers contaminants polaires :**
 - ✓ de divers composés pharmaceutiques emblématiques dont l'occurrence avait déjà été étudiée et permettant d'avoir une évolution de l'impact de l'anthropisation, des pratiques et des usages sur les niveaux de contaminations sur plus 10 ans.
 - ✓ de molécules peu ou encore jamais étudiées en Seine (gabapentine, filtres UV, nouveaux anticoagulants, filtres UV, désinfectants).
 - ✓ d'un large spectre de pesticides, couvrant des usages agricoles, urbains mais aussi correspondant à des composés interdits.
- **Des approches intégratives pour rechercher les contaminants ou détecter les molécules actives**
 - ✓ par des batteries de bioessais *in vitro*
 - ✓ par l'utilisation d'outils d'échantillonnage intégratif (POCIS)
- **De nouvelles données quant à la stabilité de ces molécules en mélange suite :**
 - ✓ à l'irradiation solaire (approche avec différents niveaux de complexité)
 - ✓ en présence du bouchon vaseux de la Seine afin de qualifier son rôle épurateur
- **De nouveaux produits de transformation identifiés :**
 - ✓ par des méthodes de spectrométrie de masse avancées (spectrométrie de masse haute résolution)
 - ✓ et recherchés dans le milieu par outils d'échantillonnage intégratif (POCIS)
- **Des connaissances sur de nouvelles molécules non recherchées initialement et mises en évidence par spectrométrie de masse haute résolution.**
- **Des informations préliminaires concernant le risque associé à ces molécules pour les organismes exposés.**



Ce travail ouvre de nouvelles perspectives :

- Caractériser la contamination par des méthodes de screening chimiques, en combinant les différentes approches de la spectrométrie de masse haute résolution (ciblée, suspect, non-ciblée), et ce de manière plus poussée et plus systématique. L'utilisation de ces méthodes couplées à des analyses statistiques pourrait ainsi permettre d'obtenir des empreintes moléculaires caractéristiques de certains sites en Seine, des sources (STEU, amont, ...) mais aussi de discriminer plus finement la saisonnalité de la contamination.
- Renforcer les connaissances sur l'identification et la recherche de nouveaux produits de transformation sur de nouvelles classes de molécules pertinentes (pesticides, molécules actives).





		Type d'information	Intérêts
Echantillonnage	Ponctuel	Image instantanée de la contamination	Image instantanée de la contamination Mise en évidence de pic de contamination
	POCIS	Image intégrée de la contamination	Intégration de la variabilité temporelle Abaissement des limites de quantification Mise en évidence de tendance sur de longue période
Analyses chimiques	Ciblées	quantitatif	Limites de quantification niveau ultra-trace (ng.L ⁻¹) Diminution des faux positifs Adaptées au suivi réglementaire (NQE)
	Suspects	qualitatif	Criblage rapide de molécules d'intérêt (composés mères et produits de transformation)
	Non ciblées	qualitatif	Empreinte globale de la contamination Mapping des spots de contamination Mise en évidence de composés non initialement recherchés Identification d'inconnus (dont produits de transformation)
Bioessais in vitro et approches bioanalytiques	-	semi-quantitatif	Mise en évidence molécules biologiquement actives Mapping des spots de contamination Identification des molécules biologiquement actives par analyse dirigée par les effets
Bioessais in vivo	-	quantitatif	Mise en évidence des effets toxiques à l'échelle d'un organisme

Figure 35 : Synthèse des outils utilisés dans CRAPPSE et de leurs intérêts.



BIBLIOGRAPHIE

- AFNOR-NF EN ISO 6341, 2012. Qualité de l'eau - Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Essai de toxicité aiguë.
- AFNOR-NF T 90-376, 2003. Water quality—determination of chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in 7 days.
- Aït-Aïssa, S., Creusot, N., 2014. Validation de la mesure de l'activité oestrogénique dans les matrices environnementales - Revue bibliographique. Rapp. AQUAREF DRC-15-136927-12327A, 30.
- Aminot, Y., 2013. Etude de l'impact des effluents urbains sur la qualité des eaux de la Garonne : application aux composés pharmaceutiques et aux filtres UV, N°4961. Université de Bordeaux.
- Aminot, Y., Le Menach, K., Pardon, P., Etcheber, H., Budzinski, H., 2016. Inputs and seasonal removal of pharmaceuticals in the estuarine Garonne River. *Mar. Chem.* 185, 3–11. doi:10.1016/j.marchem.2016.05.010
- Aminot, Y., Litrico, X., Chambolle, M., Arnaud, C., Pardon, P., Budzinski, H., 2015. Development and application of a multi-residue method for the determination of 53 pharmaceuticals in water, sediment, and suspended solids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 8585–8604. doi:10.1007/s00216-015-9017-3
- Anses, 2017. AGRITOX [WWW Document]. URL <http://www.agritox.anses.fr/php/donnees-essentielles.php>
- AQUAREF, 2009. Analyse HPLC-ESI-MS/MS du glyphosate et de l'AMPA dans les eaux de surface (phase dissoute) 1–8.
- Balmer, M.E., Buser, H., Mu, M.D., Poiger, T., Faw, A., Federal, S., 2005. Occurrence of Some Organic UV Filters in Wastewater, in Surface Waters, and in Fish from Swiss Lakes. *Environ. Sci. Technol.* 953–962.
- Bandow, C., Weltje, L., 2012. Development of an embryo toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis* using the model substance tributyltin and common solvents. *Sci. Total Environ.* 90–95.
- Belles, A., 2012. Développement et applications environnementales des échantillonneurs passifs pour la surveillance des écosystèmes aquatiques, n°4723. Université de Bordeaux.
- Belles, A., Tapie, N., Pardon, P., 2014. Development of the performance reference compound approach for the calibration of " polar organic chemical integrative sampler " (POCIS). *Anal. Bioanal. Chem.* 406, 1131–1140. doi:10.1007/s00216-013-7297-z
- Bellet, V., Hernandez-raquet, G., Dagnino, S., Seree, L., Pardon, P., Bancon-Montiny, C., Fenet, H., Creusot, N., Aït-Aïssa, S., Cavailles, V., Budzinski, H., Antignac, J.P., Balaguer, P., 2012. Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Res.* 6, 1912–1922. doi:10.1016/j.watres.2012.01.013
- Benotti, M.J., Brownawell, B.J., 2009. Microbial degradation of pharmaceuticals in estuarine and coastal seawater. *Environ. Pollut.* 157, 994–1002. doi:10.1016/j.envpol.2008.10.009
- Besse, J., Garric, J., 2008. Human pharmaceuticals in surface waters : Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. *Toxicol. Lett.* 176, 104–123. doi:10.1016/j.toxlet.2007.10.012
- Blanchoud, H., Barriuso, E., Chevreuil, M., Guery, B., Moreau-Guigon, E., Schott, C., Théry, S., Tournebise, J., 2011. Les pesticides dans le bassin de la Seine. Program. PIREN-



SEINE 67.

- Bobe, A., Meallier, P., Coste, C.M., 1998. Kinetics and Mechanisms of Abiotic Degradation of Fipronil (Hydrolysis and Photolysis). *J. Agric. Food Chem.* 46, 2834–2839.
- Botta, F., Dulio, V., 2014. Résultats de l'étude prospective 2012 sur les contaminants émergents dans les eaux de surface continentales de la métropole et des DOM, Rapport final DRC-13-136939-12927A.
- Botta, F., Dulio, V., 2012. Etude sur les contaminants émergents dans les eaux françaises Résultats de l'étude prospective 2012 sur les contaminants émergents dans les eaux de surface continentales de la métropole et des DOM. ONEMA.
- Botta, F., Lavison, G., Couturier, G., Alliot, F., Moreau-Guigon, E., Fauchon, N., Guery, B., Chevreuil, M., Blanchoud, H., 2009. Transfer of glyphosate and its degradate AMPA to surface waters through urban sewerage systems. *Chemosphere* 77, 133–139. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.05.008
- Budzinski, H., Forget-Leray, J., Aït-Aïssa, S., 2014. MEDSEINE, étude de la contamination par les médicaments de l'estuaire de Seine. Application des capteurs passifs à un meilleur diagnostic de leur présence, flux, et impact toxique. *Rapp. Seine-Aval*.
- Bueno-Martínez, M.J.M., Herrera, S., Munaron, D., 2014. POCIS passive samplers as a monitoring tool for pharmaceutical residues and their transformation products in marine environment. *environ. Sci. Pollut. Res.* doi:10.1007/s11356-014-3796-5
- Busch, W., Schmidt, S., Kühne, R., Schulze, T., Krauss, M., Altenburger, R., 2016. Micropollutants in European Rivers: A Mode of Action survey to support the development of Effect-Based Tools for water monitoring wibke. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 1887–1899. doi:10.1002/etc.3460
- Calza, P., Medana, C., Carbone, F., Giancotti, V., Baiocchi, C., 2008. Characterization of intermediate compounds formed upon photoinduced degradation of quinolones by high-performance liquid chromatography / high-resolution multiple-stage mass spectrometry. *Rapid communications mass Spectrom.* 22, 1533–1552. doi:10.1002/rcm
- Capdeville, M.J., 2011. Etudes des cycles biogéochimiques des contaminants organiques dits "émergents" dans les systèmes aquatiques, n°4303. Thèse. Université de Bordeaux.
- Caracciolo, A.B., Patrolecco, L., Lenola, M. Di, Grenni, P., 2012. Degradation of Emerging Pollutants in Aquatic Ecosystems. *Chem. Eng. Trans.* 28, 37–42.
- Carbajo, J.B., Petre, A.L., Rosal, R., Herrera, S., Letón, P., García-calvo, E., Fernández-alba, A.R., Perdígón-melón, J.A., 2015. Continuous ozonation treatment of ofloxacin: Transformation products, water matrix effect and aquatic toxicity. *J. Hazard. Mater.* 292, 34–43. doi:10.1016/j.jhazmat.2015.02.075
- Creusot, N., Budzinski, H., Balaguer, P., Kinani, S., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S., 2013. Effect-directed analysis of endocrine-disrupting compounds in multi-contaminated sediment: identification of novel ligands of estrogen and pregnane X receptors. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 2553–2566. doi:10.1007/s00216-013-6708-5
- Creusot, N., Tapie, N., Pardon, P., Sanchez, W., Thybaud, E., Porcher, J., Budzinski, 2014. Identification of synthetic steroids in river water downstream from pharmaceutical manufacture discharges based on a bioanalytical approach and passive sampling. *Environ. Sci. Technol.* 48, 6549–3657. doi:dx.doi.org/10.1021/es405313r |
- Cruz, J.M., 2016. Etude de la contamination par les pesticides des milieux eau, air et sols: développement de nouveaux outils et application à l'estuaire de la Gironde. Université de Bordeaux.
- Dévier, M., Le Ménach, K., Viglino, L., Di, L., Lachassagne, P., Budzinski, H., 2013. Ultra-trace analysis of hormones, pharmaceutical substances, alkylphenols and phthalates in two



- French natural mineral waters. *Sci. Total Environ.* 443, 621–632. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.10.015
- Du, B., Haddad, S.P., Luek, A., Scott, W.C., Saari, G.N., Burket, S.R., Breed, C.S., Kelly, M., Broach, L., Rasmussen, J.B., Chambliss, C.K., Brooks, B.W., 2016. Bioaccumulation of human pharmaceuticals in fish across habitats of a tidally influenced urban bayou. *Environ. Toxicol. Chem.* 35, 966–974. doi:10.1002/etc.3221
- Dufour, V., 2017. Etude de la contamination chimique des ressources en eau en lien avec la pression urbaine et les changements globaux - Application à l'agglomération Bordelaise. Université de Bordeaux.
- Dulio, V., Andres, S., Dulio, V., 2013. Recommandations du Comité Experts Priorisation auprès du MEDDE pour la sélection des substances pertinentes à surveiller dans les milieux aquatiques pour le second cycle de la DCE (2016-2021), Rapport AQUAREF 2013.
- Ebele, J.A., Abdallah, M.A., Harrad, S., 2017. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerg. Contam.* 1–16. doi:10.1016/j.emcon.2016.12.004
- Escher, B.I., Baumgartner, R., Lienert, J., Fenner, K., 2009. Predicting the ecotoxicological effects of transformation products. *Hdb Env. Chem.* 2, 205–244.
- Escher, B.I., Fenner, K., 2011. Recent advances in environmental risk assessment of transformation products. *Environ. Sci. Technol.* 45, 3835–3847. doi:DOI: 10.1021/es1030799
- Fent, K., Kunz, P.Y., Zenker, A., Rapp, M., 2010. A tentative environmental risk assessment of the UV-filters. *Mar. Environ. Res.* 69, S4–S6. doi:10.1016/j.marenvres.2009.10.010
- Fitzhugh, R., Lovett, G., Vanterea, R., 2003. Biotic and abiotic immobilization of ammonium, nitrite, and nitrate in soils developed under different tree species in the Catskill Mountains, New York, USA. *Global Chang. Biol.* 9, 1591–1601. doi:10.1046/j.1529-8817.2003.00694.x
- Gago-ferrero, P., Díaz-cruz, M.S., Barceló, D., 2015. UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. *Sci. Total Environ.* 518–519, 518–525. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.03.026
- Gonzalez-Rey, M., Tapie, N., Le, K., Dévier, M., Budzinski, H., João, M., 2015. Occurrence of pharmaceutical compounds and pesticides in aquatic systems. *Mar. Pollut. Bull.* 96, 384–400. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.04.029
- Gros, M., Cruz-morato, C., Marco-urrea, E., 2014. Biodegradation of the X-ray contrast agent iopromide and the fluoroquinolone antibiotic ofloxacin by the white rot fungus *Trametes versicolor* in hospital wastewaters and identification of degradation products. *Water Res.* 60, 228–241. doi:10.1016/j.watres.2014.04.042
- Hubicka, U., Ruomska-Witek, B., Zmudski, P., Stanislawski, M., Krzek, J., 2014. Analytical Methods evaluation of the degradation process and spectrometry. *Anal. Methods* 6, 2490–2498. doi:10.1039/c3ay42300j
- Hughes, S.R., Kay, P., Brown, L.E., 2013. Global synthesis and critical evaluation of pharmaceutical data sets collected from River systems. *Environ. Sci. Technol.* 47, 661–677.
- INERIS, 2017. INERIS chemical portal [WWW Document]. URL <http://www.ineris.fr/substances/fr/>
- Jarošová, B., Bláha, L., Giesy, J.P., Hilscherová, K., 2014. What level of estrogenic activity determined by in vitro assays in municipal waste waters can be considered as safe? *Environ. Int.* 64, 98–109.



- Kunz, P.Y., Kienle, C., Carere, M., Homazava, N., Kase, R., 2015. In vitro bioassays to screen for endocrine active pharmaceuticals in surface and waste waters. *J. Pharm. Biomed. Anal.* doi:10.1016/j.jpba.2014.11.018
- Le Coadou, L., Le Ménach, K., Labadie, P., Dévier, M., Pardon, P., Augagneur, S., Budzinski, H., 2016. Quality survey of natural mineral water and spring water sold in France : Monitoring of hormones , pharmaceuticals , pesticides , perfluoroalkyl substances , phthalates , and alkylphenols at the ultra-trace level. *Sci. Total Environ.* 1–12. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.11.174
- Leung, K.M., Grist, E., Morley, N., Morrill, D., Crane, M., 2007. Chronic toxicity of tributyltin to development and reproduction of the European freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Chemosphere* 66, 1358–1366.
- Liu, Z., Zhou, X., Zhang, H., 2011. An integrated method for degradation products detection and characterization using hybrid ion trap / time-of-flight mass spectrometry and data processing techniques : Application to study of the degradation products of danofloxacin under stressed condition. *Anal Bioanal Chem* 399, 2475–2486. doi:10.1007/s00216-010-4629-0
- Loos, R., Gawlik, B.M., Locoro, G., Rimaviciute, E., Contini, S., Bidoglio, G., 2015. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environ. Pollut.* 157, 561–568. doi:10.1016/j.envpol.2008.09.020
- Malaj, E., Ohe, P.C. Von Der, Grote, M., Kühne, R., Mondy, C.P., Usseglio-polatera, P., 2014. Organic chemicals jeopardize the health of freshwater ecosystems on the continental scale. *PNAS* 111, 9546–9554. doi:10.1073/pnas.1321082111
- Mazur, R., Wagner, A., Zhou, M., 2013. The application of the *Lymnaea stagnalis* embryo-test in the toxicity bioindication of surfactants in fresh waters. *Ecol. Indic.* 30, 190–195.
- Mazzella, N., Lassalde, S., Moreira, S., Delmas, F., Mazellier, P., Huckins, N.J., 2010. Evaluation of the use of Performance Reference Compounds in an Oasis-HLB adsorbent based passive sampler for improving water concentration estimates of polar herbicides in freshwater. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1713–1719.
- Minguez, L., Pedelucq, J., Farcy, E., Ballandonne, C., Budzinski, H., 2016. Toxicities of 48 pharmaceuticals and their freshwater and marine environmental assessment in northwestern France. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 4992–5001. doi:10.1007/s11356-014-3662-5
- Ngim, K.K., Mabury, S.A., Crosby, D.G., 2000. Elucidation of Fipronil Photodegradation Pathways. *J. Agric. Food Chem.* 2, 4661–4665.
- OCDE, 2016. Guideline for the testing of chemicals: *Lymnaea stagnalis* Reproduction Test 243.
- Orlikowska, A., Fisch, K., Schulz-Bull, D.E., 2015. Organic polar pollutants in surface waters of inland seas. *Mar. Pollut. Bull.* 101, 860–866. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.11.018
- Pedelucq, J., 2016. Etude de la présence , du devenir et de l' impact des psychotropes dans la Garonne estuarienne (France) et le fleuve Saint Laurent (Québec , Canada).
- Quillardet, P., Hofnung, M., 1985. The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutat. Res.* 147, 65–78.
- Ramos, S., Homem, V., Alves, A., Santos, L., 2016. A review of organic UV- filters in wastewater treatment plants. *Environ. Int.* 86, 24–44. doi:10.1016/j.envint.2015.10.004
- Richardson, S.D., Kimura, S.Y., 2016. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.* 546–582. doi:10.1021/acs.analchem.5b04493
- Schlenk, D., Huggett, D.B., Allgood, J., Bennett, E., Rimoldi, J., Beeler, A.B., Block, D., Holder, A.W., Hovinga, R., Bedient, P., 2001. Environmental contamination and toxicity of Fipronil



- and its Degradation products to *Procambarus* sp.: Field and Laboratory Studies. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 332, 325–332. doi:10.1007/s002440010255
- Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., Lichtensteiger, W., 2001. In vitro and in vivo estrogenicity of UV Screens. *Environ. Health Perspect.* 109, 239–244.
- Schymanski, E.L., Jeon, J., Gulde, R., Fenner, K., Ru, M., Singer, H.P., Hollender, J., 2014. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: Communicating confidence. *Environ. Sci. Technol.* 2097–2098.
- Sturini, M., Speltini, A., Maraschi, F., Profumo, A., Pretali, L., Irastorza, E.A., Fasani, E., Albini, A., 2012b. Photolytic and photocatalytic degradation of fluoroquinolones in untreated river water under natural sunlight. *Appl. Catal. B, Environ.* 119–120, 32–39. doi:10.1016/j.apcatb.2012.02.008
- Tapie, N., Devier, M.H., Soulier, C., Creusot, N., Menach, K. Le, Vrana, B., Budzinski, H., 2011. Passive samplers for chemical substance monitoring and associated toxicity assessment in water. *Water Sci. Technol.* 63, 2418–2427. doi:10.2166/wst.2011.129
- Tay, K.S., Madehi, N., 2015. Ozonation of ofloxacin in water: By-products, degradation pathway and ecotoxicity assessment. *Sci. Total Environ.* 520, 23–31. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.03.033
- Ter Laak, T.L., Van der Aa, M., Houtman, C.J., Stoks, P.G., Van Wezel, A., 2010. Relating environmental concentrations of pharmaceuticals to consumption: A mass balance approach for the river Rhine. *Environ. Int.* 36, 403–409. doi:10.1016/j.envint.2010.02.009
- Togola, A., Budzinski, H., 2007. Development of Polar Organic Integrative Samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems. *Anal. Chem.* 79, 6734–6741.
- Togola, A., Lardy-fontan, S., Soulier, C., 2015. Rapport de positionnement sur l'utilisation de la spectrométrie de masse haute résolution pour le criblage environnemental. Program. d'activité AQUAREF BRGM/RP-65, 65.
- Tousova, Z., Oswald, P., Slobodnik, J., Blaha, L., Muz, M., Hu, M., Brack, W., Krauss, M., Di, C., Tarcai, Z., Seiler, T., Hollert, H., Koprivica, S., Ahel, M., Schollée, J.E., Hollender, J., Suter, M.J., Hidasi, A.O., Schirmer, K., Sonavane, M., Ait-aissa, S., Creusot, N., Brion, F., Froment, J., Catarina, A., Thomas, K., Erik, K., Tu, S., Ouyang, X., Leonards, P., Lamoree, M., Osorio, V., Kolkman, A., Schriks, M., Spirhanzlova, P., Tindall, A., Schulze, T., 2017. European demonstration program on the effect-based and chemical identification and monitoring of organic pollutants in European surface waters. *Sci. Total Environ.* 602, 1849–1868. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.032
- Tsui, M.M.P., Leung, H.W., Wai, T., Yamashita, N., Taniyasu, S., Liu, W., 2014. Occurrence, distribution and ecological risk assessment of multiple classes of UV filters in surface waters from different countries. *Water Res.* 7, 0–10. doi:10.1016/j.watres.2014.09.013
- Van Der Osst, R., Sileno, G., Janse, T., Nguyen, M.T., Besselink, H., Brouwer, A., 2017. Simoni (Smart Integrated Monitoring) as a Novel Bioanalytical Strategy for Water Quality Assessment: Part II-field Feasibility Survey. *Environ. Toxicol. Chem.* doi:10.1002/etc.
- Von der Ohe, P. carsten, Dulio, V., Slobodnik, J., Deckere, E. De, Kühne, R., Ebert, R., Ginebreda, A., Cooman, W. De, Schüürmann, G., Brack, W., 2011. A new risk assessment approach for the prioritization of 500 classical and emerging organic microcontaminants as potential river basin specific pollutants under the European Water Framework Directive. *Sci. Total Environ.* 409, 2064–2077. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.01.054
- Vrana, B., Mills, G., Greenwood, R., Knutsson, J., Svensson, K., Morrison, G., Building, K.H., Sciences, B., Road, W.S., Transport, W.E., 2005. Performance optimisation of a passive sampler for monitoring hydrophobic organic pollutants in water. *J. Environ. Monit.* 7, 612–620.



- Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., Honda, Y., Tamura, I., Hirata, Y., Hayashi, A., Sekizawa, J., 2009. Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment : Laboratory photolysis , biodegradation , and sorption experiments. *Water Res.* 43, 351–362. doi:10.1016/j.watres.2008.10.039
- Zgadzaj, A., Skrzypczak, A., Welenc, I., Ługowska, A., Parzonko, A., Siedlecka, E., Sommer, S., Sikorska, K., Nałe, G., 2015. Evaluation of photodegradation , phototoxicity and photogenotoxicity of ofloxacin in ointments with sunscreens and in solutions. *J. Photochem. photobiology* 144, 76–84. doi:10.1016/j.jphotobiol.2015.01.015



ANNEXE

Liste des molécules recherchées dans le projet CRAPPSE.

Composés	Classes chimiques	méthodes d'extraction	Séparation	Détection
1-(2,4-dichlorophenyl)-urée (DCPU)	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
1-(3,4-dichlorophenyl)-3-méthylurée (DCPMU)	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
1-(3,4-dichlorophenyl)-urée (DCPU)	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
acétochlore	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
acétochlore ESA	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
acétochlore OA	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
alachlore	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
amétryne	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
atrazine	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
atrazine-2 hydroxy	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
azoxystrobine	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
bentazone	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
carbendazime	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
carbétamide	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
carbofuran	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
carbosulfan	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
chlorotoluron	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
chlorsulfuron	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
cyanazine	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
cyromazine	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
déséthylatrazine (DEA)	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
déisopropylatrazine (DIA) (DIA)	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
diflufénican	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
dimétachlore	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
diuron	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
DMSA	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
DMST	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
flazasulfuron	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
fluazifop-p-butyl	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
flusilazole	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
hexazinone	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
hydroxy-simazine	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
imidaclopride	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
irgarol	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
isoproturon	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
linuron	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
métazachlore	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
méthiocarbe	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
métolachlore	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
métolachlore ESA	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
métolachlore OA	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
métoxuron	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
metsulfuron-methyl	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
nicosulfuron	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS

promethryne	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
propachlore	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
propazine	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
propiconazole	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
prosulfuron	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
pymethroline	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
quizalofop-ethyl	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
quizalofop-p-tefuryl	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
simazine	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
terbutryne	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
terbutylazine	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
Terbutylazine-désethyl	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
thiamethoxan	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
glyphosate	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
acide aminométhylphosphonique (AMPA)	pesticides	SPE- offline	CL	MS/MS
fipronil	pesticides	SPME	CG	MS/MS
fipronil-desulfinyl	pesticides	SPME	CG	MS/MS
fipronil sulfide	pesticides	SPME	CG	MS/MS
fipronil sulfone	pesticides	SPME	CG	MS/MS
gabapentine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
abacavir	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
indinavir	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
lamivudine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
nelfinavir	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
névirapine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
ritonavir	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
saquinavir	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
bromazépam	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
nordiazépam	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
alprazolam	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
diazépam	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
oxazépam	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
lorazépam	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
clonazépam	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
méprobamate	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
paracétamol	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
bezafibrate	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
aténolol	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
bisoprolol	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
métoprolol	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
propranolol	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
sotalol	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
timolol	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
acébutolol	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
imipramine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
doxépine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
amitriptyline	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
fluoxétine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
primidone	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
carbamazépam	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
cétirizine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
ranitidine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
clenbutérol	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
caféine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
théophylline	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS

sildénafil	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
losartan	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
salbutamol	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
clopidogrel	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
terbutaline	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
disopyramide	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
oméprazole	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
zidovudine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
kétoprofène	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
naproxène	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
diclofénac	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
ibuprofène	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
hydroxy-ibuprofène	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
gemfibrozil	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
acide 4-chlorobenzoïque	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
acide fénofibrique	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
acide clofibrique	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
pravastatine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
atorvastatine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
10,11-dihydro carbamazépine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
2-hydroxy carbamazépine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
3-hydroxy carbamazépine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
trans-10,11 Dihydro-10-hydroxy-carbamazépine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
triclocarban	médicaments	injection directe	CL	MS/MS
triclosan	médicaments	injection directe	CL	MS/MS
apixaban	médicaments	injection directe	CL	MS/MS
dabigatran	médicaments	injection directe	CL	MS/MS
rivaroxaban	médicaments	injection directe	CL	MS/MS
oxybenzone	filtres UV	SPE- offline	CL	MS/MS
avobenzon	filtres UV	SPE- offline	CL	MS/MS
2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate C	filtres UV	SPE- offline	CL	MS/MS
octyl-dimethyl-PABA	filtres UV	SPE- offline	CL	MS/MS
3-(4-methylbenzylidène)camphor	filtres UV	SPE- offline	CL	MS/MS
octocrylène	filtres UV	SPE- offline	CL	MS/MS
5-fluorouracil	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
acide fusidique	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
acide oxolinique	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
acide pipémidique	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
amoxicilline	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
ampicilline	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
azithromycine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
bacitracine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
ceféalexine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
céfotaxime	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
cefpodoxime	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
ceftiofur	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
céfuraoxime	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
chloramphénicole	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
chlortétracycline	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
ciprofloxacine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
clarithromycine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
clindamycine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
cloxacilline	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
cyclophosphamide	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS

danofloxacin	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
daunorubicin	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
dicloxacillin	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
docétaxel	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
doxorubicin	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
doxycycline	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
enrofloxacin	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
épirubicin	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
érythromycine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
fluméquine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
gemcitabine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
ifosfamide	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
josamycine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
lincomycine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
marbofloxacin	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
methotrexate	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
métronidazole	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
monensine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
norfloxacine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
ofloxacin	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
oxacilline	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
oxytétracycline	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
pénicilline G	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
pénicilline V	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
rifampicine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
roxithromycine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
salinomycine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
sarafloxacin	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
spiramycine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
stavudine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
sulfadiazine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
sulfadiméthoxine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
sulfamérazine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
sulfaméthazine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
sulfaméthizole	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
sulfaméthoxazole	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
sulfanilamide	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
sulfapyridine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
sulfathiazole	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
tamoxifen	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
tétracycline	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
thiamphénicol	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
triméthoprime	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
tylosine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS
virginiamycine	médicaments	SPE- offline	CL	MS/MS

■ ■ ■ ■ ■ POUR PLUS D'INFORMATIONS SUR LE GIP SEINE-AVAL

www.seine-aval.fr

CONTACT

Groupement d'Intérêt Public Seine-Aval
Pôle Régional des Savoirs
115, Boulevard de l'Europe
76100 ROUEN
Tél : 02 35 08 37 64
gipsa@seine-aval.fr

En cas d'utilisation de données ou d'éléments de ce rapport, il devra être cité sous la forme suivante :

Mazellier P. (coord.), Fuster L., Budzinski H., Garric J., Couteau J., Ait-Aïssa S., 2018. Projet CRAPPSE « Contamination et RéActivité de Pesticides et de Pharmaceutiques dans l'estuaire de SeinE ». Rapport de recherche du programme Seine-Aval 5, 71 p.

Le GIP Seine-Aval ne saurait être tenu responsable d'évènements pouvant résulter de l'utilisation et de l'interprétation des informations mises à disposition.
Pour tout renseignement, veuillez contacter le GIP Seine-Aval.

Les membres financeurs du GIP Seine-Aval sont :

