HAL
open science

Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Contribution à l'amélioration de la phase " caractérisation des effets ".

Clotilde Boillot

To cite this version:

Clotilde Boillot. Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Contribution à l'amélioration de la phase " caractérisation des effets ".. domain_other. INSA de Lyon, 2008. Français. NNT : . tel-00289514

HAL Id: tel-00289514

https://theses.hal.science/tel-00289514

Submitted on 20 Jun 2008

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

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

N° d'ordre 2008 ISAL 0021
Année 2008

Thèse

Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques

Contribution à l'amélioration de la phase « caractérisation des effets »

présentée devant

L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

pour obtenir
le grade de docteur

École Doctorale de Chimie de Lyon
(chimie, procédés, environnement)

Spécialité Sciences de l'Environnement Industriel et Urbain

par
Clotilde Boillot
Soutenue le 28 avril 2008 devant la Commission d'examen

Jury composé de :

C. Dagot	Professeur (ENSIL, Limoges)	Rapporteur
V. Mezzanotte	Maître de Conférences (Univ. di Milano Bicocca)	Rapporteur
Y. Perrodin	Directeur de Recherche (LSE-ENTPE)	Directeur de thèse
R. Gourdon	Professeur (LGCIE, INSA de Lyon)	
L. Martel	Professeur associé (Univ. Laval, Québec) et CEAEQ	
F. Tissot-Guerraz	Maître de Conférences (Université Lyon 1)	
C. Bazin	Chef de projet (POLDEN, Villeurbanne)	Invité

Cette thèse a été effectuée au Laboratoire des Sciences de l'Environnement de l'ENTPE à Vaulx-en-Velin

INSA Direction de la Recherche - Écoles Doctorales 2007

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	**CHIMIE DE LYON** http://sakura.cpe.fr/ED206 M. Jean Marc LANCELIN Insa : R. GOURDON	M. Jean Marc LANCELIN Université Claude Bernard Lyon 1 Bât CPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 lancelin@hikari.cpe.fr
E.E.A.	**ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE** http://www.insa-lyon.fr/eea M. Alain NICOLAS Insa : D. BARBIER ede2a@insa-lyon.fr Secrétariat : M. LABOUNE AM. 64.43 – Fax : 64.54	M. Alain NICOLAS Ecole Centrale de Lyon Bâtiment H9 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60 97 Fax : 04 78 43 37 17 eea@ec-lyon.fr Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN
E2M2	**EVOLUTION, ECOSYSTEME, MICROBIOLOGIE, MODELISATION** http://biomserv.univ-lyon1.fr/E2M2 M. Jean-Pierre FLANDROIS Insa : S. GRENIER	M. Jean-Pierre FLANDROIS CNRS UMR 5558 Université Claude Bernard Lyon 1 Bât G. Mendel 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.26 23 59 50/ 06 07 53 89 13, Fax 04 26 23 59 49 e2m2@biomserv.univ-lyon1.fr
EDIIS	**INFORMATIQUE ET INFORMATION POUR LA SOCIETE** http://ediis.univ-lyon1.fr M. Alain MILLE Secrétariat : I. BUISSON	M. Alain MILLE Université Claude Bernard Lyon 1 LIRIS - EDIIS Bâtiment Nautibus 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44 82 94 Fax 04 72 44 80 53 ediis@liris.cnrs.fr - alain.mille@liris.cnrs.fr
EDISS	**INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTE** M. Didier REVEL Insa : M. LAGARDE	M. Didier REVEL Hôpital Cardiologique de Lyon Bâtiment Central28 Avenue Doyen Lépine 69500 BRON Tél : 04.72.35 72 32 Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr
	MATERIAUX DE LYON M. Jean Marc PELLETIER Secrétariat : C. BERNAVON 83.85	M. Jean Marc PELLETIER INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Blaise Pascal 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 Jean-marc.Pelletier@insa-lyon.fr
Math IF	**MATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE FONDAMENTALE** M. Pascal KOIRAN Insa : G. BAYADA	M.Pascal KOIRAN Ecole Normale Supérieure de Lyon 46 allée d'Italie 69364 LYON Cédex 07 Tél : 04.72.72 84 81 Fax : 04 72 72 89 69 Pascal.koiran@ens-lyon.fr Secrétariat : Fatine Latif - latif@math.univ-lyon1.fr
MEGA	**MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE** M. Jean Louis GUYADER Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12	M. Jean Louis GUYADER INSA de Lyon Laboratoire de Vibrations et Acoustique Bâtiment Antoine de Saint Exupéry 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72.18.71.70 Fax : 04 72 18 87 12 mega@lva.insa-lyon.fr
SSED	**SCIENCES DES SOCIETES, DE L'ENVIRONNEMENT ET DU DROIT** Mme Claude-Isabelle BRELOT Insa : J.Y. TOUSSAINT	Mme Claude-Isabelle BRELOT Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.69.72.76 Fax : 04.37.28.04.48 Claude-isabelle.brelot@univ-lyon2.fr

Remerciements

Au terme de ce travail effectué au Laboratoire des Sciences de l'Environnement de l'ENTPE, je voudrais remercier les nombreuses personnes qui m'ont aidé au niveau scientifique, mais également sur un plan plus personnel.

Je tiens tout d'abord à remercier Yves Perrodin, mon directeur de thèse sans qui ce travail n'aurait pu aboutir. Malgré ses responsabilités, il a toujours été disponible, patient et encourageant et a su m'initier à la recherche. Merci également à Christine Bazin, que je considère comme réelle co-encadrante de ce travail. Elle a su me transmettre ses connaissances en écotoxicologie, sa rigueur de travail et m'a également encouragé à entreprendre cette thèse.

Toute ma reconnaissance va ensuite à Christophe Dagot (ENSIL) et Valeria Mezzanotte (Univ. di Milano Bicocca) qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse. Merci également à Rémy Gourdon (LGCIE, INSA de Lyon), à Louis Martel (CEAEQ, Québec) et à Françoise Tissot-Guerraz (Université Lyon 1) d'avoir accepté de participer au jury de celle-ci.

Mes remerciements vont également aux Hospices Civils de Lyon (HCL) et tout particulièrement à Françoise Tissot-Guerraz qui a coordonné le projet au niveau des hôpitaux, ainsi qu'à Jérôme Droguet qui a suivi avec grand intérêt mon travail et a toujours pris le temps de répondre à mes questions. J'espère réellement que ce travail aidera les HCL à améliorer la gestion des effluents hospitaliers. Mes remerciements vont également à Michel Perraud et Jean-Charles Cetre qui se sont également largement investis dans le projet.

Je tiens également à remercier Ruth Angerville et Muriel Panouillères qui ont participé à ce travail, Jean-Marie Blanchard pour m'avoir aidé à comprendre le phénomène de « double effet », Rodolphe Gilbin pour son aide sur les effets combinés, Laurence Volatier pour ses conseils et sa grande contribution aux essais périphyton et Laurent Lassabatère pour sa précieuse aide en statistiques.

Un grand merci à Evens Emmanuel initiateur de cette thèse et Anne Alix pour sa disponibilité et sa participation à mon comité de pilotage.

Merci également à tous les membres du LSE pour leur dynamisme et leur bonne humeur et qui ont participé de près ou de loin à mes travaux de thèse. Tout d'abord l'équipe technique (comme on dit), Super Alicia, Isabelle et Thérèse, leur disponibilité et leur bonne humeur. Marco, la mémoire du LSE, tantôt pêcheur de cailloux, tantôt pêcheur d'effluents mais également dompteur de daphnies, bricoleur, chauffeur, organisateur de week-end et râleur professionnel… que feraient les doctorants du LSE sans ton aide ? Ensuite les enseignants-chercheurs : Thierry, Jean-Philippe, Alain, Sylvie, Laurence, Cécile, Bernard, Claude, Jean-Claude, Raphaël. Tous ont eu l'occasion de me donner un coup de main (scientifique ou moral) au cours de ces trois années de thèse. Enfin, les doctorants et ex-doctorants, mes co-bureaux préférés : David et Manue, Hélène (la réunionnaise), bien sûr, et puis Ruth, Anne-Laure, Houssem, Andry, Benjamin, Valérie, Céline, Xavier, Nico, Urbain, Muriel, Hélène (la nouvelle), Émilie. Je leur souhaite à tous une bonne continuation.

Je n'oublie pas trois anciens du labo, Martine, Gilles et Alex, et bien sûr ma famille et mes amis : Cédric, Johanne, Florian, mes parents, Adélaïde, Romane, Arnaud et puis Cam, Manu, Tibo, Klem, … qui m'ont donné (ou non) un coup main pour la relecture de ce mémoire et m'ont toujours apporté leur soutien.

Merci enfin à tous ceux que j'ai pu oublier…

Table des matières

Liste des communications **8**

Liste des abréviations **9**

Introduction **11**

Partie 1. Étude bibliographique **16**

Chapitre 1. Les effluents hospitaliers **17**

1. Origine des effluents liquides hospitaliers 18
2. Caractéristiques des effluents hospitaliers, état des lieux des connaissances 19
   2.1 Introduction 19
   2.2 Caractéristiques physico-chimiques 20
   2.3 Caractéristiques microbiologiques 24
   2.4 Caractérisation des rejets de nature radioactive 24
   2.5 Les rejets médicamenteux 25
   2.6 Caractéristiques écotoxicologiques 26
3. Substances suspectées d'être à l'origine de l'écotoxicité des effluents hospitaliers 28
   3.1 Introduction 28
   3.2 Les surfactants 29
      3.2.1 Généralités 29
      3.2.2 Les différents types de surfactants 30
      3.2.3 Effets sur les organismes aquatiques 31
   3.3 Les désinfectants 33
      3.3.1 Généralités 33
      3.3.2 Le glutaraldéhyde 35
      3.3.3 L'acide peracétique 37
      3.3.4 L'hypochlorite de sodium 39
   3.4 Les résidus médicamenteux 41
      3.4.1 Contamination des eaux par les résidus médicamenteux 41
      3.4.2 Impacts écotoxicologiques des résidus médicamenteux 42
   3.5 Les agents de contraste iodés 44
4. Législation relative à la gestion des effluents hospitaliers 45
   4.1 Le Code Général des Collectivités Territoriales 45
   4.2 Le Code de la Santé Publique 46
   4.3 Le Règlement Sanitaire Départemental 46
   4.4 Le Code de l'Urbanisme 47

4.5 Le Code de l'Environnement 47
4.6 Réglementation relative à certains produits 48

Chapitre 2. La caractérisation des effets écotoxicologiques dans les EDREcotox 49

1. Contexte international et présentation des méthodologies d'évaluation des risques écologiques 50
1.1 Introduction 50
1.2 Contexte international 51
1.3 Les trois phases d'une EDRE - méthodologie générale 52
1.3.1 Formulation du problème 53
1.3.2 La phase d'analyse 53
1.3.21 Caractérisation de l'exposition 54
1.3.22 Caractérisation des effets écotoxicologiques 54
1.3.3 Caractérisation du risque 54
2. Les différentes stratégies de caractérisation des effets 56
2.1 Introduction 56
2.2 Les approches « substances » 58
2.2.1 L'approche « substances » 58
2.2.2 L'approche « substances avec effets combinés » 60
2.2.21 Introduction 60
2.2.22 Définitions et terminologie 60
2.2.23 Modèles de détermination des effets combinés en écotoxicité des mélanges 63
2.2.24 Quelques repères au niveau des résultats d'études menés sur les d'effets combinés 67
2.3 Les approches « bioessais » 68
2.3.1 L'approche « batterie de bioessais mono-spécifiques » 69
2.3.11 Introduction 69
2.3.12 Sélection d'une batterie de bioessais mono-spécifiques 70
2.3.13 Les valeurs d'effet 72
2.3.2 L'approche « bioessai pluri-spécifique » 73
2.3.21 Introduction : mono-spécifique vs pluri-spécifique 73
2.3.22 Quelques exemples de bioessais pluri-spécifiques 75
2.4 Synthèse des différentes stratégies de caractérisation des effets 75
3. Les organismes utilisés dans cette étude 77
3.1 Organismes retenus pour les essais mono-spécifiques 77
3.1.1 Les producteurs primaires 77
3.1.11 Pseudokirchneriella subcapitata 77
3.1.12 Lemna minor 78
3.1.2 Les consommateurs primaires 79
3.1.21 Daphnia magna 79
3.1.22 Ceriodaphnia dubia 80
3.1.23 Brachionus calyciflorus 81
3.1.3 Les décomposeurs 82
3.1.31 Vibrio fischeri 82
3.2 Les communautés périphytiques 83
3.2.1 Définitions et terminologie 83
3.2.2 Structure et facteurs d'influence 83
3.2.3 Intérêt du périphyton comme un bio-indicateur 84
3.2.4 Utilisation du périphyton comme un bio-indicateur 85
3.2.41 Biodescripteurs périphytiques 85
3.2.42 Les différents types d'essais mis en place sur le périphyton 86

Partie 2. Matériels et méthodes 87

Chapitre 1. Effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers (vis-à-vis de *Daphnia magna*) 88

1. Substances d'étudiées 89
2. Choix du bioessai 90
3. Mise au point des mélanges 90
4. Mise en œuvre du bioessai 91
5. Traitement des résultats 93
   5.1 Modélisation des courbes concentrations-effets et calcul des CE50 93
   5.2 Outils d'analyse et d'interprétation des effets combinés 93

Chapitre 2. Caractérisation des effets d'un effluent hospitalier vis-à-vis de différents organismes aquatiques 94

1. Présentation du site pilote et échantillonnage 95
   1.1 Localisation et données concernant le site pilote 95
   1.2 Modalités de prélèvement 95
   1.3 Transport et conservation des échantillons 97
2. Caractérisation détaillée des échantillons (physico-chimie et microbiologie) 98
   2.1 Mesures de terrain 98
   2.2 Analyses physico-chimiques 98
   2.3 Analyses microbiologiques 101
3. Batteries de bioessais mono-spécifiques 102
   3.1 Sélection des batteries de bioessais 102
      3.1.1 Sélection de la batterie de bioessais simplifiée 102
      3.1.2 Sélection de la batterie de bioessais complète 103
   3.2 Mise en œuvre des bioessais 104
      3.2.1 Préparation des échantillons 104
      3.2.2 Inhibition de la mobilité de *D. magna* 105
      3.2.3 Inhibition de la luminescence de *V. fischeri* 105
      3.2.4 Inhibition de la croissance de la population de *P. subcapitata* 106
      3.2.5 Inhibition de la croissance de la population et de la reproduction de *C. dubia* 108
      3.2.6 Inhibition de la mobilité de *C. dubia* 109
      3.2.7 Inhibition de la reproduction de *B. calyciflorus* 110
      3.2.8 Inhibition de la croissance de la population de *L. minor* 111
   3.3 Traitement des résultats 112
4. Bioessai pluri-spécifique sur une communauté périphytique naturelle 112
   4.1 Introduction 112
   4.2 Collecte du substrat et du milieu d'essai 113
   4.3 Dispositif expérimental 114
   4.4 Mesure des effets sur le périphyton 115
      4.4.1 Estimation des activités photosynthétiques et respiratoires 116
      4.4.2 Mise en suspension du biofilm et détermination de la surface du biofilm 117
      4.4.3 Estimation de la biomasse totale 117
      4.4.4 Estimation de la biomasse algale 118

4.4.5 Traitement des résultats 119

Partie 3. Résultats 120

Chapitre 1. Effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers (vis-à-vis de *Daphnia magna*) 123

1. Écotoxicité des substances pures étudiées 124
2. Écotoxicité des mélanges (CE50) 126
   2.1 Les mélanges GA-surfactants 126
   2.2 Les mélanges APA-surfactants 128
   2.3 Les mélanges NaOCl-surfactants 130
   2.4 Synthèse 133
3. Étude des effets combinés des mélanges en ratios 50-50 *via* les modèles IA et CA 134
   3.1 Les mélanges GA-surfactants 134
   3.2 Les mélanges APA-surfactants 136
   3.3 Les mélanges NaOCl-surfactants 138
   3.4 Synthèse 140
4. Étude des effets combinés des mélanges à la CE50 *via* le modèle des TI 142
   4.1 TI des mélanges GA-surfactants 142
   4.2 TI des mélanges APA-surfactants 144
   4.3 TI des mélanges NaOCl-surfactants 146
   4.4 Synthèse 148
5. Synthèse générale : les effets combinés des mélanges désinfectants-surfactants 149
   5.1 Validation des résultats 149
   5.2 Effets combinés des mélanges désinfectants-surfactants 149

Chapitre 2. Effets d'un effluent hospitalier vis-à-vis de différents organismes aquatiques 151

1. Caractérisation détaillée des échantillons (physico-chimie et microbiologie) 152
   1.1 Mesures de terrain 152
      1.1.1 Suivi des débits 152
      1.1.2 Suivi de la température 152
      1.1.3 Suivi du pH 153
      1.1.4 Couleur des échantillons 154
   1.2 Caractérisation physico-chimique 154
      1.2.1 Paramètres communs aux échantillons périodiques et à l'échantillon moyen 154
         1.2.11 Le pH 155
         1.2.12 Le potentiel redox 155
         1.2.13 La conductivité 156
         1.2.14 La DCO et la DBO5 156
         1.2.15 Le COT 156
         1.2.16 Les MES 157
         1.2.17 Les ions ammonium 157
         1.2.18 Les chlorures 157
         1.2.19 Le chlore libre 157
         1.2.110 Les AOX 157
         1.2.111 Les détergents non-ioniques 158
         1.2.112 L'acétaldéhyde 158
         1.2.113 Le glutaraldéhyde 158

1.2.114 Synthèse des résultats *158*
1.2.2 Paramètres spécifiques à l'échantillon moyen 160
1.2.21 Le chlore total *160*
1.2.22 L'azote kjeldahl *161*
1.2.23 Les orthophosphates *161*
1.2.24 Le formaldéhyde *161*
1.2.25 L'indice phénol *161*
1.2.26 Les détergents anioniques et cationiques *162*
1.2.27 Les COHV *162*
1.2.28 Les cétones *162*
1.2.29 Les alcools *162*
1.2.210 Les métaux et l'arsenic *162*
1.2.211 Les acétates *163*
1.2.3 Les résidus médicamenteux 163
1.2.31 Les bêtabloquants *163*
1.2.32 Les anticancéreux : le cas du cyclophosphamide *163*
1.3 Caractérisation microbiologique 164
1.3.1 Paramètres communs aux échantillons périodiques et à l'échantillon moyen 164
1.3.2 Paramètres spécifiques à l'échantillon moyen 165
2. Réponses (CE20) des batteries de bioessais mono-spécifiques exposées aux effluents 165
2.1 Batterie de bioessais simplifiée exposée à la totalité des échantillons filtrés 165
2.1.1 Analyse générale des réponses 166
2.1.2 Sensibilité spécifique des différents bioessais 167
2.2 Batterie de bioessais complète exposée à l'échantillon moyen filtré 168
2.2.1 Analyse détaillée des résultats des essais de toxicité aiguë 169
2.2.2 Analyse détaillée des résultats des essais de toxicité chronique 170
2.3 Influence de la filtration sur les réponses de *Daphnia magna* et *Lemna minor* 172
2.4 Synthèse : effets des effluents sur les batteries de bioessais mono-spécifiques 174
3. Comparaison des résultats théoriques et expérimentaux (vis-à-vis de *Daphnia magna*) 175
4. Réponse d'une communauté périphytique naturelle exposée à l'effluent moyen brut 178
4.1 Résultats préliminaires : incidence de la congélation sur la toxicité de l'effluent 178
4.2 Analyses en composantes principales des résultats 179
4.2.1 Campagne d'essai « Hiver 2007 » 179
4.2.2 Campagne d'essai « Été 2007 » 181
4.3 Analyse détaillée, variable par variable 182
4.3.1 Effet de la concentration sur la structure du biofilm 182
4.3.11 Croissance globale du biofilm *182*
4.3.12 Croissance algale du biofilm *183*
4.3.2 Effet de la concentration sur le métabolisme du biofilm 184
4.3.21 Production primaire brute (activité photosynthétique) *184*
4.3.22 Activité respiratoire *185*
4.4 Synthèse des effets observés 186
Chapitre 3. EDREcotox liés aux rejets d'un effluent hospitalier dans un cours d'eau 188
1. Caractérisations communes aux différentes EDREcotox 189
1.1 Formulation du problème 189
1.1.1 Contexte et scénario 189
1.1.2 Paramètres d'évaluation et modèle conceptuel 190
1.1.21 Sources d'émission et stresseurs *190*
1.1.22 Voies de transferts et méthodes d'évaluation des expositions *191*
1.1.23 Écosystème à protéger et méthodes d'évaluation des effets *191*

1.1.24 Modèle conceptuel *192*
1.1.3 Plan d'analyse 194
1.2 Caractérisation des expositions 194
1.2.1 Caractérisation des sources 194
1.2.2 Caractérisation des transferts 195
1.2.3 Détermination des valeurs de caractérisation des expositions 195
2. Caractérisation des effets par les différents types d'approches 196
2.1 Approches « substances » et « substances avec effets combinés » 196
2.2 Approche « batterie de bioessais mono-spécifiques » 197
2.3 Approche « bioessai pluri-spécifique » 198
3. Caractérisation du risque par les différents types d'approches 199
3.1 Approche « substances » 199
3.2 Approche « substances avec effets combinés » 200
3.3 Approche « batterie de bioessais mono-spécifiques » 200
3.4 Approche « bioessai pluri-spécifique » 200
3.5 Synthèse, comparaison et analyse critiques des EDREcotox réalisées 201
3.5.1 Synthèse et comparaison des EDREcotox 201
3.5.2 Analyse critique des résultats des EDREcotox 201
3.5.21 Incertitudes associées à l'évaluation de l'exposition *201*
3.5.22 Incertitudes associées aux évaluations des effets *203*
3.5.23 Prise en compte des rejets produits par l'ensemble des hôpitaux de la ville étudiée *204*

Partie 4. Discussion 205

1. Effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers (vis-à-vis de *D. magna*) 206
1.1 Choix des substances étudiées 206
1.2 Intérêt des modèles d'étude des effets combinés dans les EDREcotox 206
1.3 Les effets combinés observés 207
1.3.1 Courbes concentrations-effets expérimentales et théoriques (modèles IA et CA) des mélanges étudiés en ratio 50-50 207
1.3.2 Modèle des TI de tous les mélanges étudiés à la CE50 207
1.3.3 Considérations générales 208
2. Effets d'un effluent hospitalier vis-à-vis de différents organismes aquatiques 209
2.1 Caractérisation physico-chimique de l'effluent 209
2.1.1 Mesures de terrain 209
2.1.2 Caractérisation physico-chimique en laboratoire 210
2.1.21 Considérations générales *210*
2.1.22 Les AOX *210*
2.1.23 Le chlore et les organochlorés *210*
2.1.24 L'ammonium *212*
2.1.25 Le formaldéhyde *212*
2.1.26 Le Fréon 113 *212*
2.1.27 Les alcools, l'acétone et l'acétaldéhyde *212*
2.1.28 Les métaux *213*
2.1.29 Les résidus médicamenteux *214*
2.1.3 Caractérisation microbiologique 215
2.2 Batteries de bioessais mono-spécifiques 215
2.2.1 Discussion des résultats 215

2.2.2 Sélection des batteries de bioessais 217
2.3 Bioessais sur une communauté périphytique naturelle 218
2.3.1 Effet de la saison 218
2.3.2 Recommandation pour la conservation des échantillons 219
2.3.3 Variabilité des résultats 219
3. Relations entre les différents résultats 221
3.1 Relations entre les paramètres analysés et les activités de l'hôpital 221
3.2 Substances théoriquement responsables de l'écotoxicité de l'échantillon moyen 222
4. La caractérisation des effets et les EDREcotox 224
4.1 Analyse critique des résultats 224
4.1.1 Pertinence écologique et aptitude à identifier les polluants responsables de perturbations des différentes approches utilisées 224
4.1.2 Approches « substances » *vs* « bioessais » 225
4.1.3 Cas des approches « substances » 225
4.1.31 Considérations générales 225
4.1.32 Devenir des polluants 225
4.1.4 Cas des approches « bioessais» 229
4.1.41 Considération générale 229
4.1.42 « pluri-spécifique » VS « mono-spécifiques » 229
4.1.5 Autres limites de l'étude 230
4.2 Recommandations en vue de l'utilisation de l'outil de caractérisation des effets 231
5. Recommandations pour la gestion des effluents hospitaliers 233
5.1 Gestion de la pollution à la source 233
5.1.1 Optimisation de la démarche qualité/traçabilité des substances utilisées dans l'hôpital 233
5.1.2 Suppression ou diminution de l'usage de certaines substances toxiques pour les organismes aquatiques 233
5.2 Amélioration du dispositif d'assainissement 235

Conclusions et perspectives 236

Références bibliographiques 244

Annexes 267

Liste des communications

Publications dans des revues à comité de lecture

Boillot C., Emmanuel E. et Perrodin Y. (2006) Étude des effets combinés du glutaraldéhyde et des surfactants contenus dans les effluents hospitaliers vis-à-vis de *Daphnia magna*. Déchets Sciences et Techniques, Vol. 42, pp.22-28

Panouillère M., **Boillot C.** et Perrodin Y. (2007) Study of the combined effects of peracetic acid-based disinfectant and surfactant contained in hospital effluents on *Daphnia magna*. Ecotoxicology, Vol. 16, n°3, pp. 327-340

Angerville R., **Boillot C.** et Perrodin Y. (accepté 2007) Evaluation of the combined effects of binary mixtures of sodium hypochlorite and surfactants against *Daphnia magna*. Environmental Management and Sustainable Development

Boillot C. et Perrodin Y. (in press 2007) Joint-action ecotoxicity of binary mixtures of glutaraldehyde and surfactants used in hospital: Use of TI model and Isoblogram representation. Ecotoxicology and Environmental Safety

Boillot C., Bazin C., Tissot-Guerraz F., Droguet J., Perraud M., Cetre J.C., Trepo D. et Perrodin Y. (accepté 2008) Daily physicochemical, microbiological and ecotoxicological fluctuations of a hospital effluent according to technical and care activities. Science of The Total Environment

Communication dans des congrès

Boillot C., Emmanuel E. et Perrodin Y. Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers vis-à-vis de la STEP locale et de l'écosystème aquatique récepteur - Acquis et perspectives (Poster). Rencontre ADEME, Paris, mars 2005

Boillot C. et Perrodin Y. Use of TI model to evaluate the joint-action ecotoxicity of binary mixture of glutaraldehyde and surfactants (Poster). 16th SETAC Europe, The Hague (Pays-Bas), mai 2006

Boillot C., Angerville R., Panouillère M. et Perrodin Y. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater discharge: Characterization of combined effect due to binary mixtures of three surfactants and three disinfectants towards *Daphnia magna* (Poster). 17th SETAC Europe, Porto (Portugal), mai 2007

Boillot C., Bazin C., Tissot-Guerraz F., Droguet J., Perraud M., Cetre J.C., Trepo D. et Perrodin Y. Ecototoxicological characterization of hospital wastewater: Evolution during one normal day of activity (Communication orale avec acte). 9th Cannes Water Symposium, juin 2007

Liste des abréviations

ADEME	Agence pour le DÉveloppement et la Maîtrise de l'Énergie
A1000	Anioxyde 1000
AFNOR	Agence Française de NORmalisation
AFSSAPS	Agence Française de Sécurité SAnitaire des Produits de Santé
ANDRA	Agence Nationale pour la gestion des Déchets RAdioactifs
AOX	Composés organohalogénés absorbables sur charbon actif.
APA	Acide PerAcétique
AQUIRE	AQUatic toxicity Information REtrieval database
Bq	becquerel
CA	Concentration Addition
CEAEQ	Centre d'Évaluation et d'Analyse Environnementale du Québec
CEx	Concentration Efficace x%.
CE50	Concentration Efficace 50 %. Concentration en polluant qui cause un effet toxique donné chez 50 % des individus exposés après un temps d'exposition normalisé
cfu	Unité Formant Colonie
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CLIN	Comité de Lutte contre les Infections Nosocomiales
CMC	Concentration Micellaire Critique. Concentration en tensioactifs à partir de laquelle les molécules se regroupent de manière organisée et forment alors des micelles
COT	Carbone Organique Total
COV	Composés Organiques volatils
COV	Composés Organiques Volatils
CSE	Concentration Sans Effet
CTAB	CetylTrimethylAmmonium Bromide
CV	Coefficient de Variation
DBO	Demande Biologique en Oxygène - Consommation en oxygène des micro-organismes présents leur permettant d'assimiler les substances organiques présentes
DCO	Demande Chimique en Oxygène - Consommation en oxygène par les oxydants chimiques forts pour oxyder les substances organiques et minérales de l'eau
DRASS	Direction Régional des Affaires Sanitaires et Sociales
ECB	European Chemicals Bureau
ECETOC	European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals
EDR	Évaluation Des Risques
EDRE	Évaluation Des Risques Écologiques
EDREcotox	Évaluation Des Risques Écotoxicologiques
ENTPE	École Nationale des Travaux Publics de l'Etat
EPA	Environmental Protection Agency
GA	GlutAradéhyde
IA	Independant Action
IC95	Intervalle de Confiance à 95%
ICPE	Installations Classées pour la Protection de l'Environnement

INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IR	Indice de Risque
IRSN	Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire
ISO	Organisation internationale de normalisation
IUCLID	International Uniform ChemicaL Information Database
LGCIE	Laboratoire de Génie Civil et d'Ingénierie Environnementale (INSA de Lyon)
LOEC	Lowest Observed Concentration Effect
LSE	Laboratoire des Sciences de l'Environnement
MATE	Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement
MEDD	Ministère de l'Écologie et du Développement Durable
MES	Matière en suspension
MS	Masse Sèche
MSSC	Masse Sèche Sans Cendre
NOEC	Non Observed Concentration Effect (Concentration sans effet observé). Concentration mesurée suite à des essais de toxicité chronique et pour laquelle aucun effet n'est observé
OCDE	Organisation du Commerce et du Développement Economique
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
PB	activité photosynthétique brute
PEC	Previsible Environnemental Concentration (Concentration prévisible dans l'environnement). Concentration que l'on s'attend à trouver dans le milieu suite aux différents apports.
PN	activité photosynthétique nette
PNEC	Previsible No Effect Concentration (Concentration sans effet prévisible sur l'environnement)
QSAR	Quantitative structure-activity relationship
R	activité respiratoire
RECORD	Réseau COopératif de Recherche sur les Déchets
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SFHH	Société Française d'Hygiène Hospitalière
SIDS	Screening Information DataSet
STEP	Station d'Epuration
TGD	Technical Guidance Document. Manuel technique d'évaluation des risques chimiques de l'ECB
TI	Toxicity Index
TU	Toxic Unit
TX	Triton X 100
US EPA	United States Environmental Protection Agency

Introduction

1. Contexte général

En France, la majorité des eaux usées domestiques et industrielles sont collectées puis épurées dans des stations d'épuration (STEP) avant d'être rejetées dans le milieu naturel (rivières, lacs, mers). Les STEP sont conçues pour épurer les eaux usées et limiter ainsi l'apport en excès de matière organique et de polluants minéraux dans le milieu naturel. De nombreux micropolluants sont toutefois peu épurés et se retrouvent dans le milieu naturel sans que leurs effets sur ces derniers ne soit véritablement connus. Les problèmes relatifs à la gestion de ces micropolluants et des substances à risques font ainsi partie des grandes préoccupations actuelles [Vindimian, 2006].

Dans ce contexte, la problématique des rejets d'effluents hospitaliers devient de plus en plus importante. En effet, ces établissements génèrent des volumes importants d'effluents liquides qui contiennent des substances spécifiques (résidus médicamenteux, réactifs chimiques, désinfectants, détergents, révélateurs et fixateurs radiographiques…) et sont susceptibles de disséminer des germes pathogènes. Ces effluents sont généralement évacués dans les réseaux urbains sans traitement préalable, au même titre que des eaux usées domestiques classiques.

Un certain nombre d'études sur la caractérisation des effluents hospitaliers ont été réalisées jusqu'à ce jour [Deloffre-Bonnamour, 1995; Leprat, 1999; Emmanuel, 2004b; Hartemann *et al.*, 2005; Zounkovà *et al.*, 2006]. Ces études ne portent toutefois que rarement sur une caractérisation physico-chimique et écotoxicologique approfondie des effluents. Par ailleurs, les premières études réalisées mettent en avant l'écotoxicité intrinsèque de ces effluents (5 à 15 fois supérieure à celle d'un effluent urbain) [Leprat, 1999].

Cette thèse se situe au cœur de la problématique des rejets d'effluents hospitaliers. Elle a pour ambition d'améliorer la connaissance des rejets d'effluents hospitaliers et de leurs effets sur les milieux aquatiques dans le cadre d'un scénario spécifique : **« le rejet des effluents d'un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France dans le réseau d'eaux usées en direction de la STEP puis du cours d'eau récepteur »**.

Depuis quelques années des méthodes d'évaluation des risques écologiques (EDRE) ont été développées dans différents domaines tels que la mise sur le marché de nouvelles substances chimiques [ECB, 2003], la gestion des sites pollués [CEAEQ, 1998; US EPA, 1998; Environment Agency of United Kingdoms, 2003], la gestion des sites de stockage et de valorisation des déchets, [ADEME, 2002]. Toutefois, très peu d'outils existent pour évaluer les risques écotoxicologiques (EDREcotox) liés à des scénarios spécifiques et engendrés par des sources de polluants en mélange tels que les effluents hospitaliers.

L'EDREcotox comprend traditionnellement trois étapes successives : (1) la formulation du problème, (2) l'analyse, qui est elle-même constituée de deux parties : la caractérisation des expositions et la caractérisation des effets écotoxicologiques, et enfin, (3) la caractérisation du risque écotoxicologique.

Cette thèse porte sur l'amélioration de la phase « caractérisation des effets », qui constitue une des phases primordiales des EDREcotox.

La phase « caractérisation des effets » peut être réalisée selon deux types d'approches : l'approche « substances » et l'approche « bioessais » (Figure 1).

- Les approches « substances » sont de deux ordres : l'approche substance seule, que nous nommerons « approche substances » (les effets de chacun des polluants stresseurs sont évalués de manière indépendante) et l'approche « substances avec effets combinés » (basée sur l'ensemble des stresseurs identifiés et qui considère leurs effets combinés vis-à-vis des écosystèmes cibles).
- Les approches « bioessais » peuvent également être abordées suivant deux niveaux : l'approche « batterie de bioessais » (qui considère les effets des stresseurs via une batterie de bioessais mono-spécifiques) et l'approche « bioessais pluri-spécifiques » (basée sur des niveaux d'organisation biologique plus élevés, de type communauté).

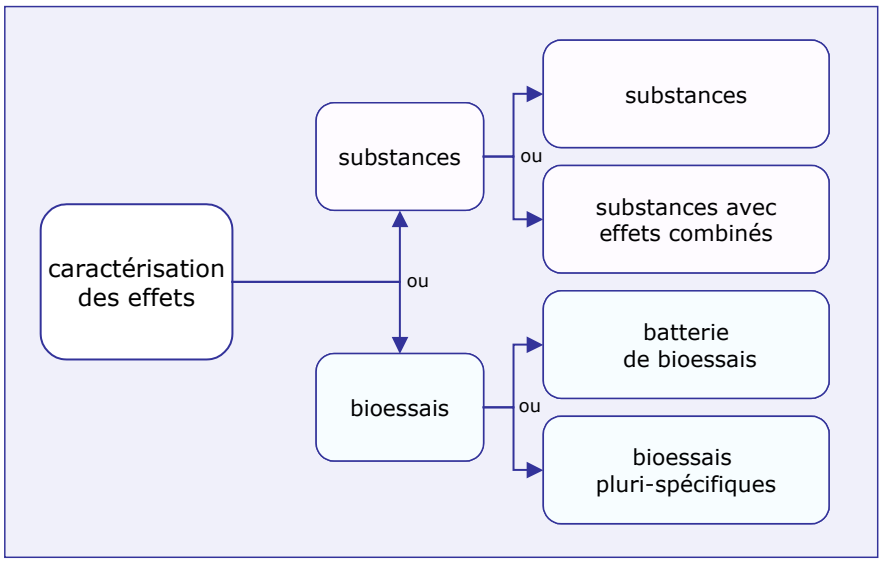


Figure 1 : Les différentes stratégies de caractérisation des effets écotoxicologiques

À l'occasion de cette thèse, ces différentes approches sont étudiées successivement pour le scénario précédemment présenté, ceci afin d'atteindre les différents objectifs présentés dans les paragraphes suivants.

2. Objectifs

Les objectifs de la présente thèse sont de trois ordres : scientifiques, méthodologiques et d'amélioration de gestion.

Les objectifs scientifiques visent à améliorer les connaissances sur les effets des effluents hospitaliers vis-à-vis des écosystèmes aquatiques :

- Les effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers (vis-à-vis de *Daphnia magna*) ;
- Les effets des effluents d'un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France vis-à-vis de différents organismes des écosystèmes aquatiques, par l'intermédiaire de la caractérisation physico-chimique détaillée d'un effluent hospitalier, d'une batterie de bioessais mono-spécifiques sélectionnés et d'un bioessai plurispécifique (sur une communauté périphytique naturelle).

Les objectifs méthodologiques visent à contribuer à l'amélioration des méthodologies d'évaluation des risques écotoxicologiques et plus particulièrement de la phase "caractérisation des effets" ; ceci d'un point de vue général et pour le scénario spécifique de « rejet des effluents hospitaliers dans le réseau des eaux usées en direction de la STEP puis du cours d'eau récepteur ».

Les objectifs d'amélioration de gestion visent à exploiter les résultats de cette thèse en fournissant des recommandations aux acteurs en charge de la gestion des effluents hospitaliers (responsables des hôpitaux, collectivités locales et services de l'État en charge du contrôle des effluents).

3. Structure du document

Pour atteindre les objectifs précédemment évoqués, l'étude se décompose en quatre parties principales.

La première partie consiste en une revue bibliographique détaillée des différents résultats, notions, concepts et méthodes essentiels à l'élaboration de ce travail. Elle se divise en deux chapitres. Le premier chapitre présente les effluents hospitaliers. Le second détaille les méthodologies d'évaluation des risques écotoxicologiques et les différents types d'approches de caractérisation des effets écotoxicologiques existants. Il se conclut par une présentation des organismes aquatiques utilisés à l'occasion de ce travail.

La deuxième partie présente le volet expérimental de l'étude et vise à justifier les choix des protocoles expérimentaux mis en œuvre dans ce mémoire de thèse. Cette partie se découpe en deux chapitres. Le premier chapitre se rapporte à l'étude des effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers (vis-à-vis de *Daphnia magna*). Le second chapitre concerne quant à lui les protocoles adoptés pour la caractérisation des effets des effluents de l'hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France vis-à-vis de différents organismes des écosystèmes aquatiques. Ce dernier présente tout d'abord le site étudié et la procédure d'échantillonnage, puis décrit les méthodes de caractérisation des effets retenus : caractérisation physico-chimique, microbiologique et écotoxicologique (la sélection de batteries de bioessais mono-spécifiques et les protocoles d'essais associés et enfin, le protocole d'essai sur une communauté périphytique).

La troisième partie expose, en trois chapitres, les résultats obtenus. Les deux premiers chapitres présentent les résultats expérimentaux obtenus. Le dernier chapitre est consacré à la réalisation d'EDREcotox basées sur les différents types de caractérisation des effets étudiés préalablement.

La quatrième et dernière partie reprend et discute les différents résultats. Elle s'attache plus particulièrement à comprendre et expliquer la présence de certains polluants dans l'effluent étudié, à faire un lien entre la toxicité des effluents et les activités de l'hôpital, à cibler les polluants théoriquement responsables de l'écotoxicité de l'effluent. Cette dernière partie s'achève enfin par l'élaboration d'une proposition de méthodologie de caractérisation des effets écotoxicologiques et par des recommandations pour une meilleure gestion des effluents hospitaliers.

Partie 1.

Étude bibliographique

Cette partie a pour objectif de faire le point sur les différents résultats, notions, concepts et méthodes issus de la littérature et essentiels à l'élaboration de ce travail. Elle se divise en deux chapitres.

Le premier chapitre consiste en une revue bibliographique des connaissances disponibles sur les effluents hospitaliers. Le second chapitre détaille les méthodologies d'évaluation des risques écologiques et plus particulièrement de caractérisation des effets dans le cadre des évaluations des risques écotoxicologiques (EDREcotox) et les différents types d'approches existants. Ce chapitre se termine finalement par la présentation des organismes utilisés à l'occasion de ce travail.

Chapitre 1.

Les effluents hospitaliers

Ce chapitre présente une revue bibliographique détaillée des connaissances existantes sur les effluents liquides hospitaliers : leur typologie, leur caractérisation, les molécules susceptibles d'être à l'origine de leur potentiel écotoxique et finalement, le cadre législatif français concernant leur rejet.

Ce chapitre permet de placer cette étude dans le contexte général décrit dans la littérature qui se révèle être la base de travail de ce mémoire de thèse.

1. Origine des effluents liquides hospitaliers

D'un point de vu qualitatif, les effluents liquides hospitaliers peuvent être classés en trois grandes catégories [Deloffre-Bonnamour, 1995; Emmanuel, 2004a] :

1) Les rejets d'origine domestique qui regroupent les eaux provenant des cuisines, les rejets résultant de l'hygiène des patients non contagieux et du personnel.

2) Les rejets assimilables à des effluents industriels qui sont générés par certains équipements spécifiques (blanchisseries, chaufferies, climatisations, ateliers, garages).

3) Les effluents spécifiques aux établissements de santé qui sont générés par les activités de soins, d'analyse et de recherche.

Cette dernière catégorie est responsable de la singularité des effluents hospitaliers et nécessite à ce titre, d'être détaillée. Les rejets liquides spécifiques aux activités médicales comprennent principalement :

a) Les effluents des services de soins qui contiennent des désinfectants (le glutaraldéhyde, l'hypochlorite de sodium, etc.), des détergents (surfactants cationiques, non-ioniques et anioniques), des résidus médicamenteux (antibiotiques, anticancéreux, etc.), des rejets contenant des métaux (révélateurs et fixateurs de radiographies) ou encore des rejets contenant des germes pathogènes qui sont souvent polyrésitants aux antibiotiques : germes présents dans les rejets humains (salmonelles, etc.), bactéries responsables des infections nosocomiales (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli,* etc.), des virus, des parasites.

b) Les effluents des services médico-techniques qui proviennent des salles d'opération et dans lesquels on retrouve entre autres des liquides biologiques très chargés en matières organiques : sang, urines, selles, liquide gastrique, aspiration trachéo-bronchite, liquides d'épanchement péritonéal ou pleural, de drainage ou d'irrigation, etc.

c) Les rejets résultant de l'entretien du matériel médical et des locaux médicaux qui contiennent des détergents, des détergents-désinfectants et des désinfectants avec des traces de matières organiques et des résidus médicamenteux.

d) Les rejets des laboratoires de recherches et d'analyses qui regroupent une très grande variété de molécules : du sang, des crachats, des urines, des acides (acétique, lactique, citrique), des bases (soude, etc.), des solvants, des hydrocarbures benzéniques (toluène et xylène), des désinfectants (formol, alcool éthylique, eau de Javel), des colorants, des effluents des services de radiologie (eaux de rinçage des clichés chargées en résidus argentiques) et des rejets provenant de la pharmacie (préparation de la teinture d'iode, désinfectants, etc.).

e) Les effluents des services de médecine nucléaire. Certains éléments radioactifs (iode 131, technétium 99m, etc.) sont susceptibles de dispersion, même si leur évacuation est soumise à réglementation.

D'un point de vu quantitatif, les hôpitaux consommeraient 400 à 1 200 litres d'eau par jour et par lit [Deloffre-Bonnamour, 1995; C. CLIN Paris-Nord, 1999]. La consommation d'eau par lit serait ainsi approximativement deux fois supérieure de celle attendue sur la base de « l'Équivalent-Habitant » [Mansotte, 2000].

De ces spécificités qualitatives et quantitatives découlent des caractéristiques détaillées singulières (physico-chimiques, microbiologiques et écotoxicologiques) que les paragraphes suivants visent à présenter.

2. Caractéristiques des effluents hospitaliers, état des lieux des connaissances

2.1 Introduction

Peu d'études s'intéressent à la caractérisation des effluents hospitaliers et ceux-ci sont le plus souvent considérés par les gestionnaires comme similaires aux effluents domestiques. L'US EPA [1989a] souligne que « les eaux usées provenant des hôpitaux sont essentiellement domestiques et peuvent être caractérisées par la mesure des paramètres globaux dans les limites suivantes : DBO5 : 50 à 400 mg/l, DCO : 150 à 800 mg/l, MEST : 60 à 200 mg/l et COT : 50 à 300 mg/l. Étant donné que les hôpitaux utilisent et rejettent un volume important d'eau, les polluants identifiés (métaux, radio-isotopes et autres substances chimiques) se diluent et se retrouvent à des concentrations souvent voisines de celles des effluents domestiques ». D'autres auteurs ne sont pas de cet avis. Mansotte [2000] note que les effluents hospitaliers présentent des caractéristiques physico-chimiques globales tout à fait semblables à la moyenne de celles d'eaux résiduaires urbaines à l'exception des détergents qui présentent une concentration significativement plus élevée. Leprat [1999] indique un niveau de pollution globale plus faible que les effluents domestiques, associé à la présence systématique de germes ayant acquis des caractères de résistance aux antibiotiques et à la présence ponctuelle de souches typiquement hospitalières. Pour Hartemann *et al.* [2005], les campagnes d'analyses réalisées selon les critères classiques de mesure de la pollution par les paramètres physico-chimiques globaux révèlent en général un niveau de pollution plus faible que celui des effluents urbains classiques. Mais ces résultats restent trompeurs car ils ne tiennent compte ni du volume rejeté ni de la composante

toxique des effluents. Un établissement de 1000 lits polluerait autant qu'une ville de 10 000 habitants [Hartemann *et al.*, 2005]. Hartemann *et al.* [2005] concluent qu'il convient de s'intéresser aux molécules éliminées et non pas à des paramètres physico-chimiques globaux.

2.2 Caractéristiques physico-chimiques

En 1989, l'US EPA a réalisé une campagne de caractérisation physico-chimique des effluents de quatre hôpitaux [US EPA, 1989a]. Sur les 400 paramètres analysés l'US EPA a publié une liste de 15 polluants prioritaires contenus dans les effluents hospitaliers :

- cinq composés organiques volatils : le benzène, le bromodichlorométhane, le chloroforme, le toluène et le 1,1-dichlorométhane ;
- deux composés organiques semi-volatils : le phénol et le 4-nitrophénol ;
- sept métaux : le chrome, le cuivre, le plomb, le mercure, le nickel, l'argent et le zinc ;
- et le cyanure.

Les pratiques et usages changent rapidement dans les hôpitaux et cette analyse aujourd'hui ancienne nécessite d'être actualisée.

Nous avons réalisé une synthèse des principales données disponibles concernant la caractérisation physico-chimiques d'effluents hospitaliers (Tableau 1). Le nombre de données publiées est très faible, seulement dix-sept études détaillées ont été recensées entre 1994 et 2005. Il faut ajouter à ce chiffre quelques études s'intéressant spécifiquement à un ou deux paramètres et dont les résultats ont été intégrés à l'analyse de ce tableau de synthèse. Il faut enfin noter que la majorité de ces données concerne des hôpitaux français.

Le Tableau 1 montre une très forte fluctuation des paramètres physico-chimiques en fonction des hôpitaux qui a par ailleurs été énoncée par Hartemann *et al.* [2005]. L'exemple de la DBO5 est flagrant : les valeurs mesurées oscillent entre 30 mg/l (hôpital G) et 1559 mg/l (hôpital L). Plusieurs éléments peuvent expliquer ce fait : (1) les hôpitaux ont des pratiques et usages différents en fonction de leurs spécialités médicales et de leurs contextes (géographique, socio-économique), (2) les pratiques et usages évoluent au cours du temps, (3) il s'agit d'accidents ponctuels et (4) des erreurs de transcription ont pu être réalisées lors de la publication de ces résultats. Leprat *et al.* [1996] ont d'ailleurs montré la grande variabilité de la charge polluante au sein d'un même établissement, selon le lieu de prélèvement.

Les données collectées laissent cependant ressortir un certain nombre de tendances. Les paramètres physico-chimiques globaux des effluents hospitaliers (DCO, DBO, MES, NTK) révèlent de manière générale une charge polluante similaire voire inférieure aux effluents domestiques [Leprat *et al.*, 1996; Mansotte, 2000; Hartemann *et al.*, 2005]. Mohee [2005] a d'ailleurs étudié les fluctuations de ces paramètres au cours d'une journée, en échantillonnant les trois périodes suivantes : 6h-9h30, 10h-16h et 16h30-18h. L'échantillon représentant la période 10h-16h était le moins « contaminé », les deux autres étaient relativement similaires (les

fourchettes de concentrations sont présentées dans le Tableau 1- hôpital O). Leprat *et al.* [1996] ont réalisé le même travail mais en échantillonnant les effluents sur des tranches de 2 heures. Ils ont mis en évidence des fortes pointes en DBO et DCO lors des activités de soins consécutives au lever des malades, et aux heures des repas (les fourchettes de concentrations sont présentées dans le Tableau 1- hôpital P).

Concernant des paramètres plus spécifiques, le Tableau 1 montre la présence quasi systématique d'AOX et désinfectants (dont des molécules chlorées) en concentrations élevées. Ces données sont confirmées par les études de Leprat [1998] et Jolibois *et al.* [2002]. Des concentrations parfois supérieures à 10 mg/l ont été dosées [Kümmerer *et al.*, 1998]. Selon Kummerer *et al.* [1998; 2001] et Steger-Hartmann *et al.* [1999], ce sont les agents de contraste iodés aux rayons X ainsi que certains solvants, désinfectants, détergents et médicaments chlorés (dont la présence est confirmée par le Tableau 1) qui contribueraient à l'existence de fortes concentrations en AOX dans le réseau d'assainissement. Ainsi, selon Hartemann *et al*. [2005], la charge en désinfectant peut varier entre 2 et 200 mg/l selon la taille de l'établissement et sa consommation en désinfectants. Des concentrations de glutaraldéhyde allant de 0,50 à 3,72 mg/l ont d'ailleurs été mesurées dans les effluents d'établissement de santé [Leprat, 1998].

Le Tableau 1 révèle également la présence ponctuelles de métaux lourds (argent, cuivre, zinc, plomb, mercure, chrome et nickel) et d'arsenic dans les effluent hospitaliers. Selon Kummerer [2001], les concentrations en métaux lourds seraient du même ordre de grandeur dans les effluents domestiques sauf pour le platine, le mercure et le gadolinium qui seraient en concentrations plus importantes dans les effluents hospitaliers.

paramètres	unités	hôpitaux																	synthèse min-max
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	
pH		7,3-7,7	5,0-8,5	7,4-7,5										8,8	7,7	7,3-7,8	5,8-8,3		5,0 -8,8
conductivité	µS/cm														313	11,2-14,9			11,2-313
DBO5	mg/l	102-114	65-172	50-53	88	110	246	30	310	670	800	285	500	1 559		149-333	20-535	162	20-1 559
DCO	mg/l	246-281	216-361	157-192	195	258	737	108	598	1525	1415	645	1 595	2 664	510	479-636	106-1 095	472	106-2 664
MES	mg/l	55-83	46-181	57-72	57,5	67,7	98,3	140						298		197-446	4,8-182	216	46-298
COT	mg/l	57	65-125	47,5										3 095					47,5-3 095
NH_4^+	mg/l	26,6	34,5-42,4	21,7													1,5-27,8		1,5-42,4
NTK	mg/l	33,2	38,8-59,6	28,8	21,1	33,2	49,1		56,6	58,3	68,3	18,3	45				3-25	43	3-68,3
NO_3^-	mg/l	<1	<1	<1											1				<1-1
PO_4	mg/l	8,3	8,4-17,3	6,15															6,15-17,3
P total	mg/l	3,06	3,19-5,41	2	4,4	3,06			5,5	36	19	14,5	24,5					10,4	2-24,5
chlorures	mg/l													359	179			371	179-371
chlore libre	mg/l				0,25													ND	0,25
chlore total	mg/l				0,45													ND	0,45
AOX	mg/l	0,3-1,05	0,15-4,96	0,59-0,76		0,69			2,12	0,985	0,707	0,765	5,395	1,61				437	0,15-437
argent	mg/l	0,01-0,125	<0,1-0,275	0,2-0,3		0,048			ND	0,25	ND	0,1	0,15	<0,0005				ND	<0,0005-0,3
cuivre	mg/l	<0,05-0,05	0,06-0,23	<0,05					ND	ND	ND	ND		0,112				0,081	<0,05-0,23
zinc	mg/l	0,07-0,12	0,67	0,18-0,2										0,536				0,31	0,07-0,67
plomb	mg/l	<0,1	<0,1	<0,1		<0,1								<0,0035	0,019			ND	<0,0035-0,019
mercure	mg/l	1,4-3,9	0,3-5,3	2,9-4,3		0,002	0,07					ND	ND	<0,0005				0,00222	<0,0005-5,3
cadmium	mg/l	<0,1	<0,1	<0,1										<0,007				ND	<0,007-<0,1
chrome	mg/l	<0,5	<0,5	<0,5										<0,004	0,197			ND	<0,004-0,197
nickel	mg/l	<0,5	<0,5	<0,5										<0,007	0,071			ND	<0,007-0,071
arsenic	mg/l	<0,5	<0,5	<0,5										0,011				0,0008	0,0008-0,011
cyanure	mg/l																	0,05	0,05
sulfures	mg/l																	ND	ND
détergent anioniques	mg/l	<0,01-0,36	<0,01	0,013-0,039	1,06	0,2													<0,01-1,06
tensioactifs	mg/l								4,8	11	6,1	2,9	4,8					27,72	27,72-6,1
formol	mg/l				1,07														1,07
glutaraldéhyde	mg/l				0,021														0,021
acétone	mg/l								0,371	0,234	0,019	0,08	0,073						0,019-0,371

paramètres	unités	hôpitaux																	synthèse min-max
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	
acétaldéhyde	mg/l								0,774	0,93	0,684	0,843	0,491						0,491-0,93
formaldéhyde	mg/l								0,517	0,265	0,106	0,102	0,302						0,102-0,517
phénols	mg/l								0,6	1,15	0,27	0,76	0,86						0,6-1,15
chloroforme	µg/l	4	10-36	13		4	23,5												4-36
1,1 dichloroétylène	µg/l	<4	<4	<4															<4
bromochlorométhane	µg/l	<0,2	<0,2	<0,2															<0,2
1,2 dichloroéthane	µg/l	<20	<20	<20															<20
1,1,1 trichloroéthane	µg/l	<0,2	<0,2	<0,2															<0,2
tétrachlorure de carbone	µg/l	<0,1	<0,1	<0,1															<0,1
dichlorobromométhane	µg/l	<0,1	<0,1	<0,1															<0,1
trichloréthylène	µg/l	<0,4	<0,4	<0,4															<0,4
dichlorobromoéthane	µg/l	<0,2	<0,2	<0,2															<0,2
tetrachloroéthylène	µg/l	<0,1	<0,1	<0,1															<0,1
benzène	µg/l	<20	<20	<20															<20
toluène	µg/l	<20	<20	<20															<20
xylène	µg/l	<20	<20	<20															<20

ND : Non Détecté (seuil de détection de la méthode analytique non précisé dans les études)

Hôpitaux et réf. biblio :

A : hôpital de Chambéry. 1994 [SOCOTEC ENVIRONNEMENT, 1994] ; **B** : hôpital Édouard Herriot de Lyon. 1994 [SOCOTEC ENVIRONNEMENT, 1994] ; **C** : hôpital Nord de Grenoble. 1994 [SOCOTEC ENVIRONNEMENT, 1994] ; **D** : hôpital Rangueil de Toulouse 1993 [Deloffre-Bonnamour, 1995] ; **E** : hôpital de Bordeaux tripode [Deloffre-Bonnamour, 1995] ; **F** : CHU de Limoges [Deloffre-Bonnamour, 1995] ; **G** : hôpital Lyon Sud 1995 [Deloffre-Bonnamour, 1995] ; **H** : hôpital d'Arpajon 1994 [Deloffre-Bonnamour, 1995] ; **I** : hôpital de Brétigny 1994 [Deloffre-Bonnamour, 1995] ; **J** : hôpital de Villiers 1994 [Deloffre-Bonnamour, 1995] ; **K** : hôpital de Villemoisson 1994 [Deloffre-Bonnamour, 1995] ; **L** : hôpital de Juvisy 1994 [Deloffre-Bonnamour, 1995] ; **M** : hôpital d'une grande ville du Sud-est de la France, valeurs max. 2002 [Emmanuel, 2004a] ; **N** : effluent de la fosse septique de l'hôpital de Port-au-Prince (Haïti), 2004 [Emmanuel, 2004a] ; **O** : SSRN hôpital (Mauritius),[Mohee, 2005] ; **P** : exutoire principal, hôpital Dupuytren (CHU Limoge) [Leprat *et al.*, 1996; Dremont et Hadjali, 1997] ; **Q :** Hôpital Jacques Monod Centre Hospitalier du Havre [Mansotte, 2000]

Tableau 1 : Synthèse bibliographique de la caractérisation physico-chimique des effluents hospitaliers

2.3 Caractéristiques microbiologiques

Sur le plan microbiologique, les effluents des établissements de santé seraient globalement moins chargés que les eaux usées urbaines [Leprat, 1999; Mansotte, 2000]. Emmanuel [2004a; 2005b] a trouvé des concentrations de 2.10^3 et 2.10^6 coliformes fécaux par 100 ml dans les effluents d'un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France alors que la concentration moyenne est de 10^8 / 100 ml dans les effluents urbains [Metcalf et Eddy, 1991; Barkay *et al.*, 1995]. Le danger résiderait plus dans la présence de certaines bactéries multirésistantes aux antibiotiques (*Proteus vulgaris*, Mycobactéries) et de certaines souches typiquement hospitalières (*Enterobacter sakazakii*) [SFHH, 1993; Leprat, 1998; Schwartz *et al.*, 2003; Emmanuel *et al.*, 2005b; Hartemann *et al.*, 2005]. Pour Mansotte [2000], les germes témoins représentent assez fidèlement le risque lié à la présence de pathogènes, dont les caractéristiques de résistance restent finalement assez banal dans le contexte hospitalier, si l'on excepte une résistance assez préoccupante aux quinolones. Leprat *et al.* [1996; 1999] ont montré la présence systématique de germes ayant acquis des caractères de résistances aux antibiotiques (*Proteus vulgaris*, Mycobactérie) et la présence ponctuelle de souches typiquement hospitalières (*Enterobacter sakazakii*) dans les effluents du CHU de limoges. En utilisant des entérocoques, des staphylocoques, des *Enterobactériaceae* et des bactéries hétérotrophiques en tant qu'indicateurs de présence des bactéries multirésistantes dans les biofilms formés dans le réseau d'assainissement hospitalier, Schwartz *et al.* [2003] ont relevé une importante présence de germes multirésistants aux antibiotiques.

2.4 Caractérisation des rejets de nature radioactive

Des sources radioactives sont utilisées en médecine à des fins thérapeutiques et pour établir des diagnostics *in vivo* ou *in vitro* [Fremery et Rigaud, 2001]. Certains de ces éléments sont utilisés en sources non-scellées et sont donc susceptibles de dispersion, même si l'évacuation de ces effluents est soumise à une réglementation stricte (voir page 48). L'iode^{131} est par exemple, utilisée pour le traitement de l'hyperthyroïdie des cancers thyroïdiens. Entre 60 et 70% de la dose administrée par voie orale est rejetée dans les urines [Dremont et Hadjali, 1997].

L'IRSN (Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire) est régulièrement amené à intervenir sur des problèmes liés à la présence de radioactivité artificielle d'origine médicale dans les STEP. Dans ce cadre, Adam *et al.* [2006] ont identifié et quantifié les radio-isotopes représentatifs de la classe des radiopharmaceutiques au sein des réseaux d'assainissement et dans les STEP. L'iode 131 et le technétium 99m ont été détectés en entrée de STEP, à des quantités pouvant dépasser 10 Bq/l dans le cas de l'iode 131 et allant jusqu'à 75 Bq/l dans le cas du technétium 99m. D'autre part, des mesures effectuées en 2005 sur les effluents d'un grand

hôpital du Sud-Est de la France ont révélé des concentrations en technétium 99m comprises entre < 6,1 et 164 Bq/l (données internes, 2005) qui restent dans la limitent établie par la réglementation.

2.5 Les rejets médicamenteux

Les résidus médicamenteux font partis des « polluants émergents » [Chapman, 2006]. Toutefois, il existe très peu de données concernant leur présence dans les effluents hospitaliers. On pourrait *a priori* penser que l'hôpital est le premier lieu de consommation de ces substances. Pourtant, selon l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité SAnitaire des Produits de Santé), les hôpitaux n'apparaissent pas être les plus gros consommateurs de médicaments français. En 2003, le pourcentage des ventes (en valeurs) de médicaments destinés à l'usage hospitalier était de 18,6% contre 81,4% pour les officines [Cavalié *et al.*, 2005]. À l'hôpital, ce sont les antinéoplasiques et les immunomodulateurs qui représentent désormais les postes de dépense les plus importants (25,7%). Les médicaments du sang et des organes hématopoïétiques se situent au deuxième rang devant les anti-infectieux. Les classements 2003 confirment que les pathologies lourdes, liées aux cancers et à l'infection par le VIH, représentent une part de plus en plus importante des achats de médicaments par les hôpitaux [Cavalié *et al.*, 2005]. Les traitements anticancéreux se font toutefois de plus avec un retour rapide du patient à domicile. Il sera enfin noté qu'une grande majorité des cinquante produits les plus vendus (en valeurs) aux hôpitaux sont réservés à l'usage hospitalier (l'antifongique itraconaeole, l'antibiotique vancomycine, etc.) [Cavalié *et al.*, 2003; Besse et Garric, 2007].

Les effluents hospitaliers auraient donc des caractéristiques différentes des effluents urbains en ce qui concerne les résidus médicamenteux (concentrations, types de molécules). Jusqu'à présent, ces caractéristiques ont été peu étudiées. Les études portent ainsi sur un nombre limité de molécules : les analgésiques, les antibiotiques, les anti-épileptiques, les bêtabloquants, les anti-cholestérols et les anticancéreux. Le Tableau 2 synthétise les données bibliographiques des concentrations en substances médicamenteuses dosées dans des effluents hospitaliers. Il a été élaboré à partir des références suivantes : [Aherne *et al.*, 1985; Steger-Hartmann *et al.*, 1996; Kümmerer *et al.*, 1997; Steger-Hartmann *et al.*, 1997; Hartmann *et al.*, 1998; Brown, 2004; Lindberg *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2007]. Les concentrations dosées sont toutes inférieures aux mg/l, la plus forte correspondant au paracétamol avec 177,7 µg/l.

substance pharmaceutique	classe pharmaco-thérapeutique	concentration dosée (min-max) dans des effluents hospitaliers (µg/l)	
ciprofloxacine	antibiotique	<0,038	101,0
métronidazole	antibiotique	0,1	90,2
sulfaméthoxazole	antibiotique	<0,004	12,8
ofloxacine	antibiotique	0,2	34,5
triméthoprime	antibiotique	0,05	15,0
doxycycline	antibiotique	<0,005	6,7
tétracycline	antibiotique	<0,015	1,5
lincomycine	antibiotique	0,3	2,0
pénicilline	antibiotique	0,85	5,2
méthotrexate	anti-cancéreux	1	1
métoprolol	bêtabloquant	0,4	25,1
paracétamol	antalgique	5,4	177,7
diclofénac	anti-inflammatoire	0,2	14,9
ibuprofène	anti-inflammatoire	0,069	9,0
cyclophosphamide	anti-cancéreux	0,019	4,5
ifosfamide	anti-cancéreux	<0,002	1,9

Tableau 2 : Synthèse bibliographique des concentrations en substances médicamenteuses dosées dans des effluents hospitaliers

2.6 Caractéristiques écotoxicologiques

Les données concernant la caractérisation écotoxicologique des effluents hospitaliers sont très limitées. Le potentiel écotoxicologique de ces effluents a cependant été reconnu en 1991 par la Société Française d'Hygiène Hospitalière (SFHH) sans pouvoir en expliquer l'origine. Une étude de Leprat [1998] rapporte d'ailleurs que les effluents du CHU de limoges sont 5 à 15 fois plus écotoxiques vis-à-vis de la bactérie *Vibrio fischeri* que des effluents domestiques.

Le Tableau 3 synthétise les données d'écotoxicité des effluents hospitaliers publiées.

valeur d'effet		CE50 (en %)				
organisme d'essai		*Pseudokirchneriella subcapitata*	*Daphnia magna*		Microtox®	
durée d'exposition		72h	24h	48h	15mn	30mn
Hôpitaux	A	-	50,3	33,2	-	-
	B	-	0,7	0,4	-	-
	C	-	48,7 - >90	-	7,9 - 18,6	-
	D	-	2,1 - 8,1	-	2,1 - 5,7	-
	E	-	46,3 - >90	-	25 - 53,5	-
	F	1,8 - 11,9	0,8 - 10	1,4 – 1,9	23,8 - >76,2	21,7- >76,2

Tableau 3 : Synthèse bibliographique de l'écotoxicité des effluents hospitaliers (CE50 en % volumique d'effluent)
Sources : **A** : hôpital n°1 [Villegas-Navarro *et al.*, 1997] ; **B** : hôpital n°2 [Villegas-Navarro *et al.*, 1997] ; **C** : hôpital de Chambéry [SOCOTEC ENVIRONNEMENT, 1994] ; **D** : hôpital Édouard Herriot [SOCOTEC ENVIRONNEMENT, 1994] ; **E** : hôpital de Grenoble [SOCOTEC ENVIRONNEMENT, 1994] ; **F** : hôpital d'une grande ville du sud-est de la France [Emmanuel *et al.*, 2005b]

Les tests de toxicité aigus Microtox® et Daphnie sont les plus couramment utilisés pour caractériser l'écotoxicité des effluents hospitaliers [Deloffre-Bonnamour, 1995; Villegas-Navarro *et al.*, 1997; Jehannin, 1999; Leprat, 1999; Emmanuel *et al.*, 2005b]. Avec une CE50 minimale de 0,8% vis-à-vis de la mobilité de *D. magna* en 24h, le Tableau 3 révèle que ces effluents sont très toxiques si l'on se base sur la proposition de classification de la qualité écotoxicologique des effluents de STEP établie par Santiago *et al.* [2002]. Le seul essai d'écotoxicité chronique mené sur un effluent hospitalier est celui vis-à-vis de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*. Il traduit la même tendance avec une CE50 de 1,8% pour l'échantillon étudié [Emmanuel *et al.*, 2005b].

Une étude de Leprat [1999] montre par ailleurs que ces effluents sont susceptibles d'induire une inhibition de l'activité des boues du bassin d'aération de STEP comprise entre 7 et 8% et donc, d'en affecter le fonctionnement.

Le potentiel écotoxicologique des effluents hospitaliers est aujourd'hui reconnu. Le paragraphe suivant vise à présenter les substances utilisées dans les hôpitaux et suspectées d'être à l'origine de cette écotoxicité.

3. Substances suspectées d'être à l'origine de l'écotoxicité des effluents hospitaliers

3.1 Introduction

Aucun travail n'a, à ce jour véritablement montré l'origine de la toxicité des effluents hospitaliers. En 1994, la SFHH et la DRASS ont piloté une importante étude sur trois hôpitaux de la région Rhône-Alpes. Les résultats ont permis de confirmer la toxicité élevée des effluents hospitaliers et d'émettre des hypothèses quant à son origine [Deloffre-Bonnamour, 1995]. La plus forte de ces hypothèses porte sur la présence de rejets contenant des produits détergents et des désinfectants. En 2004, Emmanuel proposait une seconde hypothèse : la présence de substances médicamenteuses [Emmanuel, 2004a]. De nombreuses études ont en effet montré la faible biodégradabilité et l'importante toxicité de nombreux médicaments qui pourraient contribuer à l'écotoxicité des effluents hospitaliers [Kümmerer *et al.*, 1997; Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Cleuvers, 2003; Ferrari *et al.*, 2003b]. La dernière hypothèse découle de l'utilisation d'agents de contraste iodés qui sont rapportés comme persistants dans l'environnement et participant activement à la formation d'AOX dans les réseaux d'assainissement [Kümmerer *et al.*, 1998; Fent *et al.*, 2006; Besse et Garric, 2007].

Au-delà des hypothèses proposées par la littérature, on peut s'interroger sur les quantités de produits qui sont consommées et donc rejetées par les établissements de santé. Selon Hartemann *et al.* [2005], les détergents et les désinfectants sont majoritaires au niveau quantitatif. La consommation annuelle de lessive est estimée à 12 tonnes / 1 000 lits / an, celle de savon entre 7 et 10 m^3, d'acide peracétique à 4,8 tonnes, de glutaraldéhyde à 2 tonnes et celle de chlore à 800 kg. Une étude réalisée au Centre Hospitalier du Havre (CHH) confirme ces résultats [Mansotte, 2000] : l'ensemble des produits achetés en 1996 par le CHH et utilisés par les services de soins et les laboratoires a été identifié et classé en 6 grandes familles (Figure 2). Au bilan, l'établissement a acheté 165 952 litres de produits chimiques, parmi lesquels les désinfectants et les produits d'entretien représentent à eux seuls plus des 2/3 de ces produits en volume.

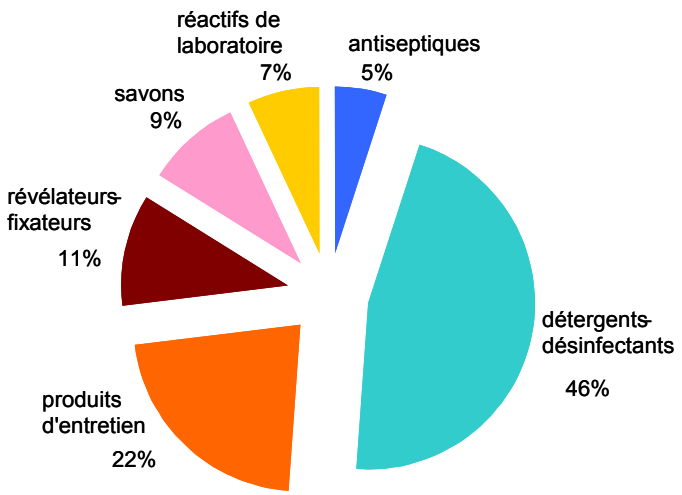


Figure 2 : Représentation des achats en volume de produits utilisés par les services de soins et les laboratoires au Centre Hospitalier du Havre en 1996 [Mansotte, 2000]

Si les quantités de produits médicamenteux généralement utilisés paraissent quantitativement négligeables, il s'avère que ces molécules peuvent induire des effets importants sur la faune aquatique [Hartemann *et al.*, 2005].

Il semble à présent nécessaire de présenter une synthèse des données (physico-chimie, biodégradabilité, écotoxicité) concernant les molécules à potentiels écotoxiques qui sont utilisées dans les hôpitaux : surfactants, désinfectants, médicaments et agents de contraste iodés.

3.2 Les surfactants

3.2.1 Généralités

De manière générale, on désigne par détergents tous les produits susceptibles de permettre une opération de nettoyage. Un des principes actifs des détergents est le surfactant (ou agent de surface ou tensioactif), qui constitue l'essentiel de la partie organique des détergents. Les surfactants sont des molécules amphiphiles. C'est à dire qu'elles contiennent au moins deux entités au comportement opposé vis-à-vis d'un solvant donné : une tête hydrophile et une queue lipophile (Figure 3). La tête polaire, chargée ou non, favorise la dissolution de la molécule dans les solvants (eau, glycérol, hydrazine...) et apporte la propriété cationique, anionique, amphotère ou non-ionique au surfactant. La queue apolaire est quant à elle formée de chaînes ou cycles hydrocarbonés [Bliefert et Perraud, 2001; Lavoué *et al.*, 2002]. Tant que la concentration en tensioactifs est faible, la partie hydrophobe des surfactants a tendance à fuir les solutions aqueuses et se place spontanément à l'interface qui lui procure un espace disponible. La formation du film mono moléculaire est alors majoritaire et engendre un abaissement rapide de

la tension superficielle. Mais lorsque la surface libre de la solution aqueuse ne se voit plus capable d'accueillir de nouvelles molécules, le film mono moléculaire entre en compétition avec la formation d'agrégats organisés de molécules : les micelles. On parle alors de la CMC ou Concentration Micellaire Critique [Le Perchec et Richard, 1994; Lin *et al.*, 2004]. La structure des surfactants engendrent des propriétés physico-chimiques spécifiques qui constituent le facteur essentiel dans les opérations de nettoyage [Rodier *et al.*, 1996].

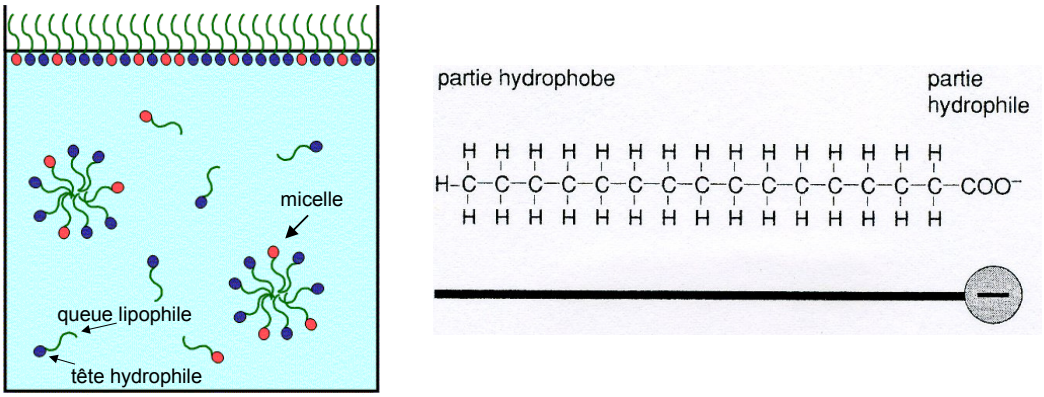


Figure 3 : Représentation modèle d'un tensioactif [Bliefert et Perraud, 2001 et http://web.mit.edu]

3.2.2 Les différents types de surfactants

Les surfactants anioniques sont généralement des détergents d'origine naturelle très utilisés : les savons (R-COO-M), les sels d'acides gras. Ils sont caractérisés par une partie hydrophile chargée négativement, qui peut être une terminaison carboxylate (RCOOH), sulfate ($R\text{-}O\text{-}SO_3^-$), sulfonate ($R\text{-}SO_3^-$) ou encore phosphate, et se présentent en général sous forme de sels de métaux alcalins (sodium ou potassium) ou d'ammonium. Le groupe hydrophobe typique est une chaîne hydrocarbonée en C_{12} à C_{15}, ramifiée ou linéaire. Les tensioactifs anioniques possèdent un pouvoir détersif important et sont particulièrement efficaces contre les particules (les substrats rencontrés étant souvent chargés négativement, les terminaisons anioniques favorisent la dispersion des particules par répulsion électrostatique). Ils sont également utilisés comme agents hydrotropes pour favoriser la solubilisation dans la solution détergente d'autres agents peu solubles dans l'eau (notamment certains tensioactifs non ioniques). Les tensioactifs anioniques présentent une faible activité bactériostatique réversible. Ils sont sensibles à la dureté de l'eau et certains sont susceptibles de subir une hydrolyse partielle dans la solution nettoyante [Lavoué *et al.*, 2002].

Les surfactants cationiques regroupent les amines oléiques éthoxylées, les diamines oléiques éthoxylées, les amides oléiques éthoxylées, les ammoniums quaternaires oléiques éthoxylés, les ammoniums quaternaires oléiques et les dérivés oléiques de l'imidazoline. Les plus courrant sont les ammoniums quaternaires ($R\text{-}NH_3 + X^-$). Les tensioactifs cationiques sont principalement utilisés pour leurs propriétés fongicides et bactéricides irréversibles que leur confère leur caractère nitré, ainsi que dans certaines préparations nettoyantes acides [Cox,

1994]. De ce fait, l'utilisation des tensioactifs cationiques est en général limitée au nettoyage acide [Lavoué *et al.*, 2002].

Les surfactants non-ioniques ($R\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}(CH_2\text{-}O\text{-}CH_2)_{n-1}\text{-}CH_2OH$) regroupent entre autres : les alcools alkoxylés, les alkyls polyglucosides, les alkanolamides non sulfatés et les acides gras éthoxylés. Ils correspondent à la classe de surfactant qui connaît actuellement le plus fort développement. Leur partie hydrophile est généralement de type éther de polyglycol qui permet en milieu neutre ou alcalin la formation de liaisons hydrogène avec l'eau. Ces tensioactifs se caractérisent par une faible sensibilité à la dureté de l'eau et au pH, ainsi que de faibles CMC, qui permettent une efficacité satisfaisante à basse température et en milieu neutre ou faiblement alcalin [Lavoué *et al.*, 2002].

Les surfactants amphotères (alkylbétaïnes, dérivés de l'imidazolinium, …) possèdent une partie hydrophile qui s'ionise différemment selon le pH du milieu [Thoumelin, 1995].En raison de leur coût élevée, cette classe de surfactant reste marginale mais est parfois utilisée en association à d'autres surfactants pour améliorer leurs performances [Lavoué *et al.*, 2002].

3.2.3 Effets sur les organismes aquatiques

Du fait de leurs propriétés physico-chimiques, les surfactants sont très souvent utilisés en tant que matière active des formulations des produits biocides [Massi *et al.*, 2003]. L'utilisation des biocides génère des effluents dangereux pour les écosystèmes car capables d'agir et de détruire les membranes biologiques. Il a en effet été établi que les parties hydrophiles et hydrophobes des tensioactifs interagissent rapidement avec les structures polaires ou apolaires des macromolécules comme les protéines et la cellulose ou avec les molécules dans les mélanges de substances [Cserháti *et al.*, 2002; Lavoué *et al.*, 2002]. En fonction de leur concentration et de la longueur de leur chaîne d'alkyl, les surfactants peuvent inhiber ou activer des enzymes. Les surfactants anioniques tels que le SDS (sodium dodecyl sulfate) peuvent solubiliser des protéines et aller jusqu'à leur dénaturation [Cserháti *et al.*, 2002; Lavoué *et al.*, 2002]. Les surfactants non-ioniques (tels que le Triton X100) sont également capables de solubiliser les protéines mais leur action sur les enzymes est moins claire [Lavoué *et al.*, 2002]. Quant aux surfactants cationiques, ils présentent différentes propriétés qui ne semblent pas généralisables [Cserháti *et al.*, 2002]. Le CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) est par exemple capable de favoriser l'absorption des hexamères d'insuline. D'autres surfactants cationiques peuvent inhiber certaines acétyltransférases et modifier la structure et l'activité d'enzymes. À faible concentration, les détergents peuvent modifier la co-formation des protéines membranaires de structure et sont ainsi responsables d'une perméabilisation et d'une lyse progressive de la cellule. À forte concentration, ils détachent la couche de phospholipides membranaires, action qui s'accompagne d'une perte progressive d'activité biologique de la cellule [Cserháti *et al.*, 2002; Lavoué *et al.*, 2002; Sirisattha *et al.*, 2004].

La toxicité des tensioactifs vis-à-vis des organismes aquatiques apparaît dans de nombreux travaux de recherches (Tableau 4). Les résultats rapportés sont très variables. Selon la directive 93/21/CEE relative à la classification européenne des substances chimiques, les effets sont compris entre très toxique pour le nonylphénols éthoxylés et non toxique pour l'alkylbenzènesulfonates [Lewis, 1992; Dirilgen et Ince, 1995; Lavoué *et al.*, 2002]. Ceci est en partie dû aux différents types d'études réalisées, aux performances inégales des méthodes d'analyse et aux nombreux composés différents testés à l'intérieur d'une même famille [Lavoué *et al.*, 2002]. Notons que plusieurs auteurs s'accordent à dire que le cladocère *Daphnia magna* s'avère globalement très sensible aux tensioactifs [Lal *et al.*, 1983; Lewis et Suprenant, 1983; Cserháti *et al.*, 2002].

	type de surfactant	organisme	réponse (mg/l) et source
Anionique	AS	mollusques, insectes, vers et crustacées	CE50 aiguë = 0,1 - 200 [Lavoué *et al.*, 2002]
		crustacés	NOEC chro. = 0,025 - 0,4 [Lavoué *et al.*, 2002]
	C_{11-9} LAS	communautés périphytiques situées en amont d'un rejet d'eaux usées	LOEC-21j = 3,3 mg/l [Lewis *et al.*, 1993] (photosynthèse, richesse des espèces)
		communautés périphytiques situées en amont d'un rejet d'eaux usées	LOEC -21j = 16,6 mg/l [Lewis *et al.*, 1993] (photosynthèse, chlorophylle-*a*)
	α-oléfinesulfonates	*Daphnia magna*	$C(L)E_{50}$ aiguë = 19 – 26 [Lavoué *et al.*, 2002]
	alkylsulfates	espèces d'eau douce	CL_{50} = 4 - 140 [Lavoué *et al.*, 2002]
	sodium dodecyl sulfate	invertébrés d'eau douce	CL/CE_{50} = 1,35 [INERIS, 2004]
			$NOEC/CE_{10}$ = 0,65 [INERIS, 2004]
non ionique	alcools éthoxylés	algues vertes	CE50 = 0,09 - 10,00 [Lavoué *et al.*, 2002]
		Daphnia magna	CE50 = 0,29 - 0,4 [Lavoué *et al.*, 2002]
	nonylphénols éthoxylés	truites	CE50 = 0,167 - 0,221 [Lavoué *et al.*, 2002]
		Daphnia magna	CE50 = 2,9 - 44 [Lavoué *et al.*, 2002]
	alkycoglucosides	poisson zèbre	CE50-96h = 3 – 101 [Lavoué *et al.*, 2002]
		algues vertes	CE50-72h = 6 - 21 [Lavoué *et al.*, 2002]
		Daphnia magna	CE50-48h = 7 – 20 [Lavoué *et al.*, 2002]
cationique	ethoxy sorbitant troleate	*Daphnia magna*	CL_{50}-48h = 20 [Boillot, 2004]
	CTAB	*Echinogammarus tibaldii*	CL_{50} = 21 [Nalecz-Jawecki *et al.*, 2003]
	CTAC	*Daphnia magna*	CE_{50}-24h = 0,1 - 58 [Nalecz-Jawecki *et al.*, 2003]
	$8C_{12}$ TMAC	communautés périphytiques, essai en canaux artificiels	LOEC-56j > 0.25 mg/l [Parent-Raoult, 2004 in Hoagland et al., 1996] (composition taxonomique algale)
	C_{12} TMAC	communautés périphytiques situées en amont du rejet de STEP (essais *in situ)*	LOEC-21j = 0.96 mg/l [Parent-Raoult, 2004 in Hoagland et al., 1996] (biomasse, chlorophylle-a, composition taxonomique algale)

Tableau 4 : Écotoxicité aquatiques des différentes classes de surfactants
[Abréviations : AS : AlkylbenzèneSulfonates ; LAS = Linear AlkylbenzeneSulfonate ; CTAC : CetylTrimethyl Ammonium Chloride ; CTAB : CetyltrimeThyl Ammonium Bromide ; TMAC TriMethyl Ammonium Chloride]

Lewis [1992] a cherché à identifier des facteurs environnementaux susceptibles de modifier la toxicité des tensioactifs et donc d'expliquer la variabilité observée dans les résultats. L'auteur indique que des tendances significatives se dégagent. Les données sont pourtant trop limitées pour en tirer des conclusions définitives. Ainsi, la dureté de l'eau semble augmenter la toxicité des tensioactifs anioniques, alors que celle des tensioactifs non ioniques subirait une influence inverse. Mercier [2002] ajoute que selon la nature des tensioactifs, la formation de micelles peut engendrer le piégeage de certains polluants et diminuer ainsi la toxicité de la solution. La CMC est donc déterminante dans l'évaluation de l'écotoxicité d'une formulation contenant des tensioactifs. Notons également que le danger associé à la présence dans les milieux aquatiques naturels de certains tensioactifs tels que les alkylphénol éthoxylés est aujourd'hui reconnu. Ceux-ci ont la propriété d'imiter les oestrogènes naturels et d'altérer ainsi le développement sexuel d'organismes en provoquant des effets tels que la féminisation des poissons [Jobling *et al.*, 1996].

La présence des surfactants est aujourd'hui avérée dans les effluents urbains [Swisher, 1991], les milieux aquatiques [Odokuma et Okpokwasili, 1997; Cserháti *et al.*, 2002] mais aussi dans les sédiments [CCPCT, 2000]. Les surfactants ne sont pas seuls dans ces différents milieux. La contamination liée aux mélanges et aux interactions reste la problématique principale, surtout lorsqu'il s'agit de molécules possédant de telles caractéristiques physico-chimiques. Les effets des mélanges de surfactants sont pourtant très peu étudiés. Lewis [1992] a montré que les effets combinés des mélanges huile/surfactants étaient généralement de type synergique. Emmanuel *et al.* [2005a] ont quant à eux, étudié les effets combinés du glutaraldéhyde et de trois surfactants (anionique, cationique et nonionique) vis-à-vis de trois organismes. L'étude a mis en évidence des réponses différentes (additivité synergie, antagonisme) en fonction des mélanges et des organismes.

3.3 Les désinfectants

3.3.1 Généralités

La norme AFNOR NF T72-101 [1981], définit la désinfection comme "une opération au résultat momentané permettant d'éliminer ou de tuer tous les micro-organismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux micro-organismes et/ou aux virus présents au moment de l'opération".

Les désinfectants sont des produits très largement utilisés, dans les hôpitaux, l'industrie et les foyers domestiques, soit en tant que tels, soit comme composants de produits cosmétiques (mousse à raser par exemple). Ces composés appartiennent à différentes classes chimiques et possèdent des spectres d'action variés (bactéricides, bactériostatiques, fongicides…). Cela

s'explique par les différentes spécificités qui permettent aux micro-organismes de se protéger des conditions extérieures [Besse et Garric, 2007].

L'utilisation des désinfectants en milieu hospitalier est très diversifiée (désinfection des surfaces, de l'instrumentation, de la peau (antiseptiques), des cuisines, etc.), ce qui engendre deux catégories de substances : les désinfectants courants et les désinfectants à utilisation restreinte [Emmanuel, 2004a].

Parmi les désinfectants les plus couramment utilisés, on peut notamment citer :

Les produits chlorés

L'eau de Javel et les autres hypochlorites sont les désinfectants les plus utilisés dans les hôpitaux. Ils appartiennent à la famille des halogènes et agissent en oxydant les acides aminés aromatiques des protéines, ce qui induit l'inhibition de certaines enzymes et une modification des protéines structurelles [Russell et Hugo, 2004]. Ils contribuent également à la formation d'AOX qui sont le plus souvent lipophiles, rémanents dans l'environnement et potentiellement toxiques pour les organismes aquatiques [Carey *et al.*, 1998].

Les produits contenant des aldéhydes et dérivés

Les aldéhydes sont des agents réducteurs qui réagissent avec les acides nucléiques et les groupements amines des protéines de structure et de fonction. Ils dénaturent les glycoprotéines de surface, inhibent les fonctions enzymatiques et nucléiques des cellules et ont donc une activité antivirale sur les virus enveloppés. Les dialdéhydes permettent de plus, la formation de ponts entre acides aminés. Ces ponts peuvent rigidifier les structures protéiques qui perdent alors leur activité biologique [Rihn *et al.*, 2001].

Le formaldéhyde (CH_2O) est le plus toxique de tous les aldéhydes.

Le glutaraldéhyde (CHO-3(CH_2)-CHO) est un dialdéhyde très utilisé dans la désinfection des appareils d'endoscopie. Sa nature volatile et irritante peut être responsable de dysfonctionnements pulmonaires comme l'asthme ou d'anomalies cutanées comme les eczémas allergiques chez le personnel médical exposé périodiquement à cette substance [Foussereau, 1985; Cullinan *et al.*, 1994; Jolibois *et al.*, 2002].

L'acide peracétique (CH_3-COOOH) : Il est de plus en plus utilisé dans les hôpitaux et tend à remplacer le glutaraldéhyde. Il n'existe pratiquement pas à l'état pur et se présente sous forme de solution aqueuse en mélange avec l'acide acétique et le peroxyde d'hydrogène [Bonnard *et al.*, 2001].

Parmi les désinfectants utilisés de façon restreinte, on peut citer :

Les produits à base d'alcool (R-OH) : L'alcool mélangé avec 20% d'eau est un désinfectant. Grâce à l'eau, l'alcool franchit les parois de la cellule et pénètre dans les bactéries où il dénature les protéines cytoplasmiques et membranaires et induit ainsi une inhibition des fonctions enzymatiques, une altération des membranes et entraîne une coagulation cytoplasmique qui tue la bactérie [Rihn *et al.*, 2001].

Les dérivés iodés halogénés agissent en oxydant les acides aminés aromatiques des protéines, induisant une inhibition de certaines enzymes et une modification des protéines structurelles [Russell et Hugo, 2004].

Les sels ammoniums quaternaires : Ils ont à la fois un pouvoir détergent et un pouvoir désinfectant (voir paragraphe 3.2). Ils se lient aux groupes phosphates et aux chaînes d'acides gras des lipides de la membrane cellulaire et altèrent ainsi les membranes, créant une fuite de constituants cellulaires et une coagulation cytoplasmique [Russell et Hugo, 2004].

Les dérivés phénoliques dénaturent les protéines cytoplasmiques et membranaires et induisent ainsi une inhibition des fonctions enzymatiques, une altération des membranes et entraînent une coagulation cytoplasmique [Russell et Hugo, 2004]. Ils ont un très bon pouvoir désinfectant, mais ne sont pas biodégradables. Dans le cas d'une désinfection préalable de l'eau par le chlore ou ses dérivés, les substances phénoliques peuvent générer des composés toxiques tels que les chlorophénols. L'un d'eux (le triclosan) a d'ailleurs été détecté dans des effluents de STEP et des eaux de surface [Kolpin *et al.*, 2002; Bendz *et al.*, 2005].

Certaines de ces molécules sont très actives sur les micro-organismes et leur large emploi pourrait contribuer à la contamination du milieu aquatique. Elles apparaissent globalement très toxiques pour les micro-organismes et particulièrement pour le cladocère *Daphnia magna* [C. CLIN Paris-Nord, 2000; Boillot, 2004].

Les paragraphes suivants sont dédiés à l'étude approfondie de trois désinfectants couramment utilisés dans les hôpitaux : le glutaraldéhyde, l'acide peracétique et l'hypochlorite de sodium et à leurs effets sur les écosystèmes aquatiques. Ces trois molécules seront étudiées dans la suite de ce travail. Cette base bibliographique permettra ainsi de mieux appréhender nos résultats.

3.3.2 Le glutaraldéhyde

Le glutaraldéhyde (GA) est un dialdéhyde dont les groupes carbonylés agissent avec les acides nucléiques et les groupements amines des protéines de structure et de fonction. Ils dénaturent les glycoprotéines de surface et inhibent les fonctions enzymatiques et nucléiques des cellules des micro-organismes [Sano *et al.*, 2005]. Ces propriétés en font un agent virucide très puissant et rapide dès la concentration préconisée de 2%. Il est à ce titre, utilisé en tant que biocide dans de nombreuses applications industrielles et notamment dans les hôpitaux, pour la désinfection à froid des instruments médicaux. En solution aqueuse, le GA est volatil, légèrement acide mais relativement stable et est classé comme toxique.

Selon Leung [2001], le GA serait toutefois facilement dégradable, relativement aux critères de classification de l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Économique) et très écotoxique dans le compartiment aquatique. En condition aérobie, le GA est métabolisé en

acide glutarique puis en CO_2, alors qu'en condition anaérobie, il serait métabolisé en 1,5-pentanediol et 3-formyl-6-hydroxy-2-cyclohexene-1-propanal.

Les propriétés physico-chimiques du GA sont présentées dans le Tableau 5.

caractéristique	valeur
formule	$C_5H_80_2$ (CHO-(CH2)3-CHO)
n° CAS	111-30-8
masse molaire	100,12 g/mol
Densité	0,72 kg/m^3
point de fusion	- 14°C
point d'ébullition	188°C à 1 002 hPa
tension de vapeur	22 à 23 hPa à 20°C
solubilité dans l'eau	100g/100g H_2O à 25 °C
Solubilité	soluble dans l'eau, l'alcool et le benzène
constante de Henry	1,1 .10^{-7} atm/m^3 mol
K_{OH}	2,4^e-11 cm^3/molécules
log K_{ow}	- 0,18

Tableau 5 : Propriétés physico-chimiques du GA [NICNAS, 1994; Sano *et al.*, 2005]

Le GA a été détecté dans les effluents hospitaliers, à des concentrations comprises entre 0,50 et 3,72 mg/l [Jolibois *et al.*, 2002]. Pour Leung [2001], le rejet de GA en concentration excessive dans le réseau d'assainissement urbain peut inhiber l'action des microorganismes et, de ce fait, compromettre la performance du traitement biologique des stations d'épuration. Peu de travaux sont pourtant consacrés à l'écotoxicité du GA vis-à-vis des organismes aquatiques (Tableau 6). Le GA s'avère être globalement toxique ou très toxique pour les organismes aquatiques (selon directive 93/21/CEE relative à la classification européenne des substances chimiques). Seule l'amphipode *Hyalella azteca* se révèle peu sensible au GA avec une CE50 de 289 mg/l [Sano *et al.*, 2003].

organisme	espèce	critère d'effet - durée d'exposition	réponse (mg/l)	référence
algue	*P. subcapitata*	croissance - 96h	CE50 = 1	[Ritter, 1990]
crustacé	*D. magna*	mobilité - 48h	CL50 = 16,3	[UCES, 1977]
		reproduction - 21 jours	CE50 = 0,35	[Vilkas, 1978a]
		reproduction - 21 jours	LOEC = 4,3	[CCR, 1990]
	C. dubia	mobilité - 48h reproduction - 7 jours	CL50 = 4.7 LOEC = 4.9	[Sano *et al.*, 2005]
oligochète	*L. variegatus*	mortalité - 24h	CL50 = 11.1	[Sano *et al.*, 2003]
amphipode	*H. azteca*	mortalité - 24h	CL50 = 289	[Sano *et al.*, 2003]
poisson	*O. mykiss*	mortalité (méthode statique) - 96h	CL50 = 11	[Leung, 2001]
	O. kisutch	mortalité (renouvellement continu) - 96h	CL50 = 3	[Leung, 2001]
	L. macrochirus	mortalité (méthode statique) - 96h	CL50 = 11,2	[Vilkas, 1978b]

Tableau 6 : Écotoxicité du GA pour les organismes aquatiques

La présence du GA en mélange avec d'autres produits chimiques, combinée à sa forte toxicité et ses effets sur les STEP biologiques pourrait engendrer un réel problème écologique. Pourtant, peu d'études portent sur les effets combinés du GA en mélange avec d'autres polluants. Sano *et al.* [2004] ont montré qu'un mélange glutaraldéhyde/surfactant était plus écotoxique que le glutaraldéhyde seul (la toxicité du surfactant n'était toutefois pas prise en compte dans cette étude). L'étude d'Emmanuel [2005a] révèle quant à elle, différents types d'action de mélanges GA/surfactants en fonction des organismes et du surfactant testée.

3.3.3 L'acide peracétique

L'acide peracétique (APA) est largement utilisé dans l'industrie agroalimentaire, du textile et du papier. Dans le domaine médical, il tend progressivement à remplacer le glutaraldéhyde pour la désinfection à froid des dispositifs médicaux. En effet, les risques sanitaires induits par la manipulation de l'APA sont plus faibles que ceux induits par la manipulation du GA [Rideout *et al.*, 2005].

L'APA (CH_3COOOH) a un fort pouvoir oxydant. C'est un acide faible, actif en solution et sous forme de vapeur. Son délai d'action est rapide, même à de faibles concentrations et contre des souches sauvages de microorganismes. Sa réactivité diffère en fonction du pH du milieu, il est actif à de faibles concentrations en milieu acide et nécessite de plus fortes concentrations en milieu alcalin. Les propriétés de l'APA (sporicide à basse température, actif en présence de matière organique et capacité de ne pas fixer les protéines) le rend particulièrement intéressant dans la gestion du risque de "Prion" [C. CLIN Sud-Est, 2005]. Pourtant, Huss [1994] note que la présence de matières organiques peut modifier l'activité désinfectante de l'APA.

Il est à noter que l'APA n'existe pas dans le commerce à l'état pur, mais en équilibre avec du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de l'acide acétique (CH_3COOH) [Bonnard *et al.*, 2001; C. CLIN Sud-Est, 2005].

$$CH_3COOOH + H_2O \leftrightarrow CH_3COOH + H_2O_2$$

Dans cet équilibre, seul l'APA et le peroxyde d'hydrogène présentent une action désinfectante avec une action plus efficace de la part de l'acide peracétique [Crebelli *et al.*, 2005]. La réaction d'équilibre tend à se déplacer car l'acide peracétique est peu stable [ECETOC, 2001; Kitis, 2004]. Celui-ci se dégrade spontanément et la dilution ainsi que la présence d'ions métalliques accélèrent cette dégradation [C. CLIN Sud-Est, 2005]. De plus, le peroxyde d'hydrogène (sous sa forme commerciale) se décompose aisément en eau et en dioxygène [INRS, 1992]. L'acide acétique est quant à lui peu toxique [INRS, 1997; PROLABO, 1997] et se dégrade très facilement [Vigorox, 2000; ECETOC, 2001].

Les propriétés physico-chimiques de l'APA sont présentées dans le Tableau 7.

caractéristique	valeur
Formule	CH_3COOOH
n° CAS	79-21-0
masse molaire	76,06
point de fusion	< 0°C
point d'ébullition	105°C
tension de vapeur (PAA 40%, H_2O_2 4,5%, HOAC 18%)	20 hPa à 20°C
solubilité	très soluble dans l'eau et l'éthanol
constante de Henry	0,22 Pa/m^3.mol
k_{OH}	$2,14.10^{-6}$
log K_{ow}	- 1,07

Tableau 7 : Propriétés physico-chimiques de l'APA [ECB, 2000b]

La toxicité de l'APA peut s'expliquer, car tout comme le peroxyde d'hydrogène, il présente une forte activité oxydante qui peut générer des radicaux libres, responsables d'un stress oxydatif pour les organismes aquatiques [Durand *et al.*, 2002; Elia *et al.*, 2006]. Le radical hydroxyle de l'APA présente une activité létale pour les bactéries [C. CLIN Sud-Est, 2005], qui pourrait l'être également pour d'autres organismes. Les propriétés bactéricides de l'APA ont par ailleurs, été largement étudiées.

À part quelques données provenant de l'European Chemicals Bureau [ECB, 2000b] et de l'European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals [ECETOC, 2001], aucun résultat n'a été publié concernant l'écotoxicité de l'APA. Il s'avère cependant être très toxique pour les organismes aquatiques (selon la directive 93/21/CEE relative à la classification européenne des substances chimiques et le Tableau 8).

organisme	espèce	critère d'effet durée d'exposition	réponse (mg/l)	référence
crustacé	*D. magna*	mobilité - 24h	CE50 = 6,6	[ECB, 2000b]
		mobilité - 48h	CE50 = 3,3	[ECB, 2000b]
		mobilité - 48h	CE50 = 1,1	Burgess et Forbis, 1983 in [ECETOC, 2001]
		mobilité - 48h	CE50 = 0,50	Douglas et Pell, 1986 in [ECETOC, 2001]
poisson	*B. rerio*	mortalité - 96h	CE50 = 1,0	Bazzon et al. 1997 in [ECETOC, 2001]
	L. macrochirus	mortalité - 96h	CE50 = 2,7	Terrel, 1987 in [ECETOC, 2001]
	O. mykiss	mortalité - 96h	CE50 = 0,91	Terrel, 1987 in [ECETOC, 2001]
	S. gairdneri	mortalité (semi-statique) - 96h	CL50 = 13	[ECB, 2000b]
algue	*P. subcapitata*	croissance - 72h	CE50 < 1,0	Petit-Poulsen, 1997 in [ECETOC, 2001]
	S. subspicatus	croissance - 72h	CE50 = 0,035-0,35 NOEC = 0,035	Licata-Massana, 1995 in [ECETOC, 2001]

Tableau 8 : Écotoxicité de l'APA pour les organismes aquatiques [ECB, 2000b; Elia *et al.*, 2006]

L'APA est un puissant biocide, capable d'engendrer des impacts biologiques non négligeables, mais du fait de sa biodégradation rapide en acide acétique, il n'a jamais été détecté dans l'environnement. Selon Kitis [2004], 5 mg/l d'APA formerait 13 mg/l d'acide acétique. La présence d'APA implique donc une importante augmentation de la matière organique dans les effluents.
Notons également que les effets combinés de l'APA en mélange avec d'autres molécules n'ont jamais été étudié.

3.3.4 L'hypochlorite de sodium

Couramment appelé « eau de javel », l'hypochlorite de sodium (NaOCl) est une solution, contenant entre 12,5% et 25% de chlore gazeux actif, qui a une très large gamme d'utilisation, autant dans les hôpitaux que les domaines industriels et domestiques [US EPA, 1994b; Brondeau *et al.*, 2000]. Ces propriétés physico-chimiques générales sont présentées dans le Tableau 9.

caractéristique	valeur
Formule	NaOCl
n° CAS	7681-52-9
masse molaire	74,4 g/mol
densité	1,23 g/cm^3
point de fusion	- 20 à - 30°C
point d'ébullition	96 à 120°C
tension de vapeur	17,4 à 25 hPa à 20°
solubilité	en toute proportion dans l'eau mais réagit avec de nombreux solvants organiques

Tableau 9 : Propriétés physico-chimiques du NaOCl [ECB, 2000a; INERIS, 2005a]

En contact avec l'eau potable ou les eaux usées, la solution réagit rapidement avec la matière organique pour produire une variété de composés organohalogénés [US EPA, 1989b]. Ces derniers sont le plus souvent lipophiles, persistants et toxiques vis-à-vis des milieux aquatiques [Emmanuel *et al.*, 2004].

Les équations ci-dessous montrent les différentes étapes de la transformation du NaOCl [Rodier *et al.*, 1996; Emmanuel *et al.*, 2004].

L'hypochlorite de sodium se transforme en acide hypochloreux (HClO) :

$$NaOCl + H_2O \rightarrow HClO + Na^+ + OH^-$$

Une réaction d'équilibre se forme alors avec l'ion hypochlorite (ClO^-) :

$$HClO \leftrightarrow H^+ + ClO^-$$

Il est à noter que l'ion hypochlorite et l'acide hypochloreux ont un fort pouvoir oxydant et bactéricide qui est plus prononcé dans le cas de l'acide hypochloreux. Le diagramme de Pourbaix du chlore (Figure 4) permet de discuter de la stabilité relative des espèces chlorées en

solution aqueuse. Ce diagramme, divisé en différentes zones en fonction du potentiel redox et du pH, informe sur les espèces prédominantes en solution. En solution aqueuse, la forme stable du chlore est généralement le Cl^-. Le Cl_2 se dismute en HClO et Cl^- pour les milieux dont le pH est compris entre 2,5 et 7,5 et en ClO^- et Cl^- pour les pH supérieures à 7,5 [Gaudin *et al.*, 2006].

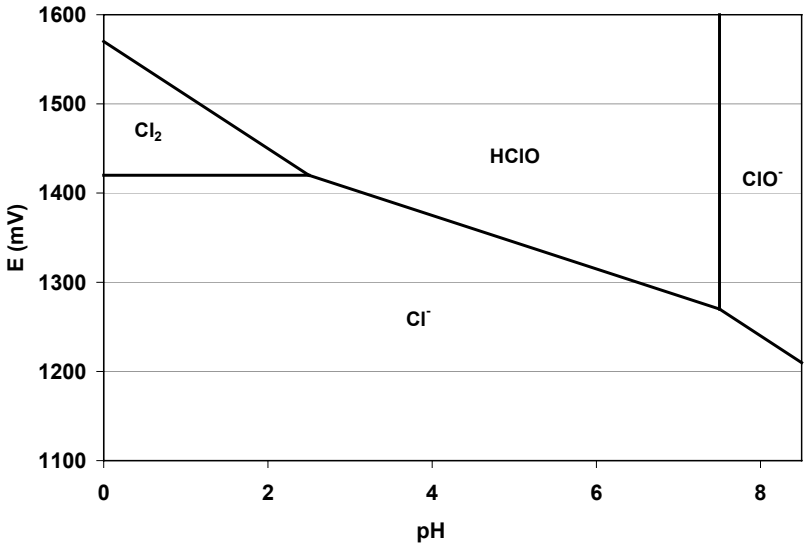


Figure 4 : Diagramme de Pourbaix du chlore

L'acide hypochloreux réagit principalement avec la matière organique (formation de composés organohalogénés tels que le chloroforme, le dichloromonobromométhane, le dibromomonométhane et le bromoforme) et les composés ammoniaqués (formation de chloramines) [Emmanuel *et al.*, 2004]. Les équations suivantes décrivent certains de ces processus qui ont lieu uniquement lorsque le chlore est en excès :

$HClO + NH_3 \rightarrow NH_2Cl$ (monochloramine) $+ H_2O$

$HClO + NH_2Cl \rightarrow NHCl_2$ (dichloramine) $+ H_2O$

$HClO + NHCl_2 \rightarrow NCl_3$ (trichloramine) $+ H_2O$

$RCOCH3 + 3\ HClO \rightarrow RCOOH + CHCl_3$ (chloroforme) $+ 2\ H_2O$

L'ion hypochlorite est également un oxydant fort ($ClO^- + H2O + 2e^- \rightarrow Cl^- + 2OH^-$). D'un point de vu biologique, il est environ 100 fois moins efficace que l'acide hypochloreux qui, pour ça part, traverse facilement les membranes cellulaires des micro-organismes en détruisant ainsi les substances intracellulaires nécessaires au maintien de la vie.

Revenons à l'hypochlorite de sodium : c'est un bactéricide, sporicide, fongicide et virucide mais malgré cela, peu de travaux sont consacrés à son écotoxicité vis-à-vis des organismes aquatiques. Les données réunis dans le Tableau 10 permettent cependant d'affirmer que l'hypochlorite de sodium est très toxique pour les écosystèmes aquatiques (selon la directive 93/21/CEE relative à la classification européenne des substances chimiques). Notons également que la littérature ne mentionne aucune étude consacrée aux effets combinés du NaOCl en mélanges avec d'autres substances. Cela dit, on sait que les produits de dégradations du chlore

(trihalométhanes, organohalogénés) se révèlent dangereux pour les écosystèmes aquatiques [Environnement Canada et Santé Canada, 1993].

organisme	espèce	critère d'effet - durée d'exposition	réponse (mg/l)	référence
invertébré d'eau douce		-	CL/CE50 = 0,005	[INERIS, 2005a]
crustacé	*Ceriodaphnia sp.*	mortalité - 24h	CL50 = 0,006	[ECB, 2000a]
	D. magna	mobilité - 24h	CL50 = 0,4	[Sano *et al.*, 2004]
			CE50 = 0,07 - 0,7	[ECB, 2000a]
algue	*D. tertiolecta*	biomasse - 24h	CE50 = 0,11	[ECB, 2000a]
	Chlorelle sp.	20h	CE40 = 0,6	[ECB, 2000a]
poisson	*D. polymorpha*	mortalité - 72h	CE50 = 23	[Sano *et al.*, 2004]
	P. promelas	mortalité - 96h	CL50 = 1,34-1,76	[ECB, 2000a]
rotifère	*B. calyciflorus*	1h	EC50 = 0,35-0,39	[ECB, 2000a]
oligochète	*L. variegatus*	mortalité - 24h	CL50 = 1,0	[Sano *et al.*, 2004]
amphipode	*H. azteca*	mortalité - 24h	CL50 = 3,7	[Sano *et al.*, 2004]
	G. fasciatus	mortalité - 96h	CL50 = 4	[ECB, 2000a]

Tableau 10 : Écotoxicité de l'hypochlorite de sodium pour les organismes aquatiques

Ces derniers paragraphes présentés une synthèse des principales caractéristiques disponibles sur les désinfectants et les surfactants qui sont les molécules les plus fortement suspectées d'être à l'origine de l'écotoxiques des effluents hospitaliers. Les paragraphes suivants portent sur les principales caractéristiques des autres molécules utilisées dans les hôpitaux, et suspectées, en moindre mesure de l'écotoxiques des effluents hospitaliers : les substances médicamenteuses et les agents de contraste iodés.

3.4 Les résidus médicamenteux

Comme il a été vu précédemment, les résidus médicamenteux font partie des « polluants émergents ». Un nombre important de ces molécules sont rejetées dans les effluents hospitaliers (analgésiques, antibiotiques, anti-épileptiques, bêtabloquants, anti-cholestérols et anticancéreux [Kümmerer, 2001; Heberer, 2002; Ferrari *et al.*, 2003a]. Dans les paragraphes suivant, nous reviendrons sur certains éléments tels que la contamination des eaux par les résidus médicamenteux, son origine et enfin son impact écotoxicologique.

3.4.1 Contamination des eaux par les résidus médicamenteux

Deux types de substances médicamenteuses sont susceptibles de contaminer l'environnement : les substances à visée thérapeutique humaine d'une part, et vétérinaires d'autre part [Heberer, 2002]. Les principales sources de contamination des eaux superficielles par les médicaments à visée humaine sont les effluents hospitaliers, domestiques et également des usines de fabrication et de conditionnement des médicaments [Besse et Garric, 2007]. Selon une récente synthèse

réalisée par Rabiet [2006], près de 3 300 composés à visés humaines sont actuellement utilisés en Europe. On peut citer comme principaux groupes :

- Les analgésiques ;
- Les antibiotiques ;
- Les anti-épileptiques ;
- Les antidiabétiques ;
- Les bêtabloquants (antagonistes du système sympathique) ;
- Les contraceptifs ;
- Les psychotropes ;
- Les cytostatiques (anti-cancéreux).

Ces substances se concentrent dans les STEP dont les procédés conventionnels n'apparaissent pas toujours suffisants à leur dégradation [Ternes, 1998]. Les taux d'abattement y sont très variables, proche de 0% pour le bêtabloquant aténonlol [Coquery *et al.*, 2007], ils peuvent atteindre des valeurs supérieures à 90% pour la plupart des anti-inflammatoires et des analgésiques [Besse et Garric, 2007; 2008].

La première détection de substances pharmaceutiques dans les effluents de STEP date des années 70 [Hignite et Azarnoff, 1977]. Dans les années 80, en Angleterre, un certain nombre de substances pharmaceutiques appartenant à différentes classes thérapeutiques (analgésiques, substances psychiatriques, antibiotiques) ont été détectées dans différents types d'eaux (effluents de STEP, rivières et eaux potables) à des concentrations atteignant le µg/l [Waggott, 1981; Watts *et al.*, 1983; Richardson et Bowron, 1985]. À partir des années 90, de nombreuses études se sont alors intéressées à ces nouvelles substances et ont révélé la présence quasi systématique de toutes les catégories de substances pharmaceutiques et cela dans tous les milieux, que se soient les effluents de stations d'épuration [Andersen *et al.*, 2003; Ferrari *et al.*, 2003b; Miege *et al.*, 2006; Coquery *et al.*, 2007], les eaux de surface [Ternes, 1998; Ashton *et al.*, 2004; Wiegel *et al.*, 2004], les eaux souterraines [Heberer *et al.*, 1998] mais aussi les eaux potables [Stan et Heberer, 1997; Heberer, 2002; Reddersen *et al.*, 2002]. Plus de 80 substances pharmaceutiques ou métabolites ont aujourd'hui été détectés dans l'environnement aquatique à des concentrations pouvant atteindre le µg/l [Hirsch *et al.*, 1999; Heberer, 2002; Rabiet, 2006].

3.4.2 Impacts écotoxicologiques des résidus médicamenteux

Par opposition à beaucoup de molécules mises sur le marché, les substances médicamenteuses (et leurs métabolites) sont spécifiquement conçues pour avoir des effets biologiques. Elles sont souvent persistantes et lipophiles, ce qui leur permet de se bioaccumuler et d'entraîner des effets sur les écosystèmes aquatiques et terrestres [Halling-Sørensen *et al.*, 1998]. Une fois ingérées, la plupart des substances médicamenteuses subissent des modifications biochimiques qui donnent naissance à des métabolites. Ceux-ci peuvent être plus ou moins actifs et/ou toxiques que le médicament initial. Un certain nombre de médicaments ne subit toutefois pas de biotransformation au sein de l'organisme et est excrété sous forme inchangée [Rabiet, 2006]. Selon Kummerer *et al.* [1997], le taux de médicaments non-métabolisé varie avec le patient, le médicament et le moment de la journée où celui-ci est administré.

Afin d'établir une priorisation des molécules pharmaceutiques à usages humains devant être surveiller dans les eaux superficielles continentales, Besse et Garric [2007], ont réalisé une synthèse bibliographique des données d'écotoxicité sur les trois principaux groupes taxonomiques d'organismes aquatiques (algues, invertébrés, poissons) servant communément de base aux évaluations des risques (Figure 5). Notons que les valeurs d'effets concernant les cyanophytes sont présentées séparément de celles des algues afin de préciser quelques comportements généraux de la toxicité des médicaments. Le jeu de données d'écotoxicité apparaît globalement très limité, surtout en ce qui concerne l'écotoxicité de type chronique. Il est même inexistant pour des substances telles que les anticancéreux qui semblent être prioritaires pour les hôpitaux. La majorité des valeurs d'écotoxicité aiguës recensés est comprise entre 1 et 100 mg/l pour les invertébrés et les poissons (Figure 5-a). D'une manière générale, les algues et plus particulièrement les cyanophytes représentent le groupe taxonomique le plus sensible, notamment envers les antibiotiques. Les antidépresseurs, le propranolol (bêtabloquant), l'amlodipine, le carvédiolol et les fibrates apparaissent enfin comme les substances les plus écotoxiques.

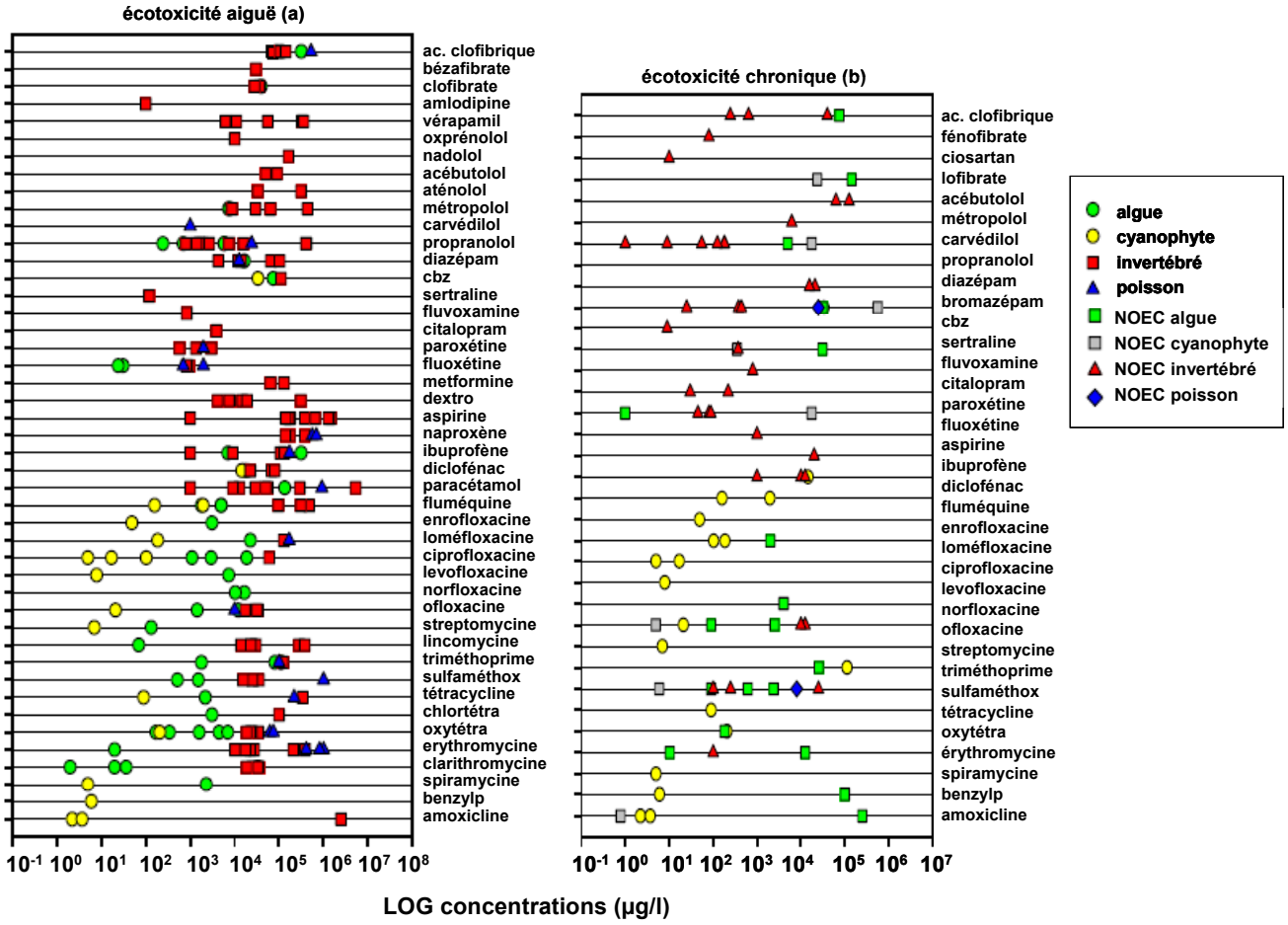


Figure 5 : Écotoxicité aiguë CE50 (a) et chronique (b) de composés pharmaceutiques pour les organismes aquatiques [Besse et Garric, 2007]

[Avec : Benzylp : benzylpénicilline, oxytétra : oxytétracycline, cbz :carbamazépine, sulfaméthox : sulfaméthoxazole, dextro : dextropropoxyphène]

3.5 Les agents de contraste iodés

Les produits de contraste iodés sont des molécules organiques destinées uniquement à un usage diagnostique. Ils représentent une des catégories de molécules les plus utilisées dans les hôpitaux et sont administrés aux patients afin d'opacifier certaines régions de l'organisme de manière à améliorer le contraste des radiographies [Haiß et Kümmerer, 2006]. Ces produits sont hydrosolubles et stables dans de bonnes conditions de conservation. Les préparations commerciales contiennent en outre des traces de iodures inorganiques et des métaux lourds qui participent à la stabilité à long terme (~ 3 ans). Ces molécules sont de faible taille, ce qui leur permet de franchir l'endothélium vasculaire là où il est fenêtré et de ne pas emboliser le réseau capillaire. Les données concernant le métabolisme indiquent que 80% des agents de contraste iodés sont extraites sous forme inchangée au bout de 24h [Haiß et Kümmerer, 2006; Besse et Garric, 2007]. Une dizaine de ces molécules est utilisée en France [Besse et Garric, 2007]. Nous ne disposons pas des données de consommation pour ces molécules mais selon Steger-Hartmann *et al.* [1999], 80% d'entre elles quitteraient le plus souvent les STEP sans aucune dégradation. Des mesures effectuées en région parisienne ont par ailleurs montré que ces molécules sont retrouvées dans les eaux de surface entre 30 et 450 ng/l mais aussi dans les eaux potables à hauteur de plusieurs dizaines de ng/l [Paffoni *et al.*, 2006]. Les produits de contraste iodés sont rapportés comme très persistants dans l'environnement, ils contribueraient également activement à la formation d'AOX [Steger-Hartmann *et al.*, 1999; Sprehe *et al.*, 2001; Fent *et al.*, 2006]. Il existe cependant peu de données concernant les effets de ces molécules sur les organismes aquatiques. La seule étude consiste en une évaluation des risques environnementaux de l'iopromide. Les résultats de la batterie de bioessais (CE50 > 10,0 g/l, NOEC ≥ 1,0 g/l) ont permis de conclure qu'il n'y a pas de risques pour les écosystèmes aquatiques [Steger-Hartmann *et al.*, 1999]. De nombreuses recherches s'interrogent aujourd'hui sur le devenir et les effets de ce type de molécules [Gartiser *et al.*, 1996; Kümmerer *et al.*, 1998; Kümmerer et Helmers, 2000; Haiß et Kümmerer, 2006; Besse et Garric, 2007].

Les trois premières parties de ce chapitre ont permis d'acquérir une meilleure connaissance des effluents hospitaliers en terme de typologie, de caractérisation physico-chimique, microbiologique et écotoxicologique. Ils se concluent par une présentation des molécules susceptibles d'être à l'origine de leur potentiel écotoxique. En complément, les prochains abordent le cadre législatif français relatif à la gestion des effluents hospitaliers.

4. Législation relative à la gestion des effluents hospitaliers

Les hôpitaux sont sans doute l'un des plus gros producteurs d'effluents chargés chimiquement et non soumis à des règles strictes d'épuration [Hartemann *et al.*, 2005].

À ce jour, la réglementation en matière de rejets d'effluents hospitaliers se limite à la circulaire n°429 du 8 avril 1975, relative aux problèmes d'hygiène publique dans les établissements hospitaliers. Ce texte distingue les hôpitaux reliés à une STEP communale des hôpitaux possédant leur propre système de traitement. Pour les hôpitaux raccordés à une STEP communale, il prévoit l'installation d'un dégrillage et une désinfection poussée des effluents provenant du service des contagieux. Les hôpitaux non reliés à une station communale doivent mettre en place un système de traitement par bassin de régulation des flux et une épuration biologique complète suivie ou non d'une désinfection avec digestion des boues. Le texte recommande également de prévoir un réseau séparatif pour les eaux pluviales.

À cette circulaire s'ajoute la réglementation générale non spécifique aux effluents hospitaliers mais applicable aux établissements de santé privés ou publics. Les paragraphes suivants se limiteront au cadre législatif français.

4.1 Le Code Général des Collectivités Territoriales

Les articles L2224-7 à L2224-12 définissent notamment le rôle et les compétences des communes en matière de collecte et d'assainissement des eaux usées. Les communes sont compétentes en matière d'assainissement des eaux usées. Elles assurent le contrôle des raccordements au réseau public de collecte, la collecte, le transport et l'épuration des eaux usées, ainsi que l'élimination des boues produites. Les communes et les groupements de collectivités territoriales, après avis de la commission consultative des services publics locaux, établissent pour chaque service d'eau et d'assainissement dont ils sont responsables, un règlement de service définissant, en fonction des conditions locales, les prestations assurées par le service ainsi que les obligations respectives de l'exploitant, des abonnés, des usagers et des propriétaires.

L'article R2224-19-6 définit l'obligation de paiement d'une redevance d'assainissement par l'auteur de déversements d'eaux usées autre que domestiques dans le réseau public d'assainissement.

Le Règlement d'Assainissement Communal Type définit par la circulaire n° 86-140 du 19 mars 1986 a pour rôle de définir les conditions et modalités auxquelles est soumis le déversement des eaux dans les réseaux d'assainissement. Il distingue les eaux usées domestiques et les eaux usées

industrielles. Ces dernières font l'objet d'une convention spéciale de déversement entre le gestionnaire du réseau et l'établissement raccordé.

L'arrêté du 22 juin 2007 relatif à la collecte, au transport et au traitement des eaux usées des agglomérations d'assainissement, stipule que les demandes d'autorisation de déversement d'effluents non domestiques dans le réseau de collecte ne peuvent être délivrées que lorsque le réseau est apte à acheminer ces effluents et que la station d'épuration est apte à les traiter. Ces effluents ne doivent pas contenir les substances visées par le décret n° 2005-378 du 20 avril 2005, ni celles figurant à l'annexe V de cet arrêté, dans des concentrations susceptibles de conduire à une concentration dans les boues issues du traitement ou dans le milieu récepteur supérieure à celles qui sont fixées réglementairement. L'autorisation de déversement définit, par ailleurs les paramètres à mesurer, la fréquence des mesures à réaliser et, si les déversements ont une incidence sur les paramètres DBO5, DCO, MES, NGL (azote global), PT, pH, NH_4^+, le flux et les concentrations maximales et moyennes annuelles à respecter pour ces paramètres. Notons enfin que ces dispositions ne concernent pas les ICPE (Installations Classées pour la Protection de l'Environnement).

4.2 Le Code de la Santé Publique

Les articles L1331-1 à L1331-16 mentionnent l'obligation de traitement des eaux usées. Ils déterminent les conditions de branchement au réseau d'assainissement public et imposent (en particulier l'article L1331-10) une autorisation préalable de la collectivité à laquelle appartiennent les ouvrages empruntés, pour tout déversement d'eaux usées autre que domestique avec au minimum un dégrillage avant rejet à l'égout.

4.3 Le Règlement Sanitaire Départemental

La circulaire du 9 août 1978 du Règlement Sanitaire Départemental Type est un modèle pouvant donner lieu à un arrêté préfectoral concernant les hôpitaux. Elle contient de nombreuses prescriptions intéressant l'ensemble des questions d'hygiène. L'article 29 concerne la séparation des eaux pluviales et des eaux usées et l'interdiction de déversement de certaines substances dans les réseaux d'assainissement (matières solides, liquides ou gazeuses susceptibles de provoquer un danger, hydrocarbures, acides, cyanures de sulfure, produits radioactifs, déchets d'autopsie, déjections et excrétions contagieuses…).

4.4 Le Code de l'Urbanisme

L'article L123-1 du Code de l'Urbanisme introduit la notion de plan local d'urbanisme. Ceux-ci délimitent les zones relatives à l'assainissement des eaux usées et pluviales. Les articles R111-8 et R111-12 prescrivent un réseau séparatif pour les eaux usées et les eaux pluviales et stipulent que l'évacuation des eaux résiduaires industrielles est autorisée dans le réseau d'assainissement public, mais peut être subordonnée notamment à un ou plusieurs prétraitements appropriés.

4.5 Le Code de l'Environnement

De nombreux établissements de santé sont concernés par les mesures visant les ICPE (Loi n°76-663 du 19 juillet 1976 modifiée). Ils sont soumis à cette réglementation s'ils exercent certaines activités ou possèdent certaines installations figurant dans la nomenclature des ICPE : stockage de gaz médicaux, combustion, blanchisserie, réfrigération compression, chauffage, radiologie conventionnelle, etc.. L'article 34 de l'arrêté du 2 février 1998 relatif aux prélèvements et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toute nature des ICPE soumises à autorisation fixe les valeurs limites de concentration imposées à l'effluent à la sortie de l'installation et avant raccordement à une station d'épuration urbaine (Tableau 11).

paramètre	valeur limite (mg/l)	si le rejet dépasse
température	30°C	
pH	5,5 à 8,5	
MEST	600	
DBO5	800	
DCO	2 000	15 kg/j de DBO5 ou
rapport DCO/DBO5	3	45 kg/j de DCO
azote global (exprimé en N)	150	
phosphore total (exprimé en P)	50	
indice phénol	0,3	3 g/j
chrome hexavalent	0,1	1 g/j
cyanures	0,1	1 g/j
Pb et composés	0,5	5 g/j
Cu et composés	0,5	5 g/j
Cr et composés	0,5	5 g/j
Ni et composés	0,5	5 g/j
Zn et composés	2	20 g/j
Mn et composés	1	10 g/j
Sn et composés	2	20 g/j
Fe ou Al et composés	si 5 mg/l pour l'un l'autre à 2 mg/l	20 g/j
composés organiques halogénés (AOX ou EOX)	1	30 g/j
hydrocarbures totaux	10	100 g/j
fluor et composés	15	150 g/j

Tableau 11 : Valeurs limites de concentration imposées à l'effluent à la sortie de l'installation avant raccordement à une station d'épuration urbaine (arrêté du 2.02.98)

4.6 Réglementation relative à certains produits

Il existe enfin des textes relatifs à certains produits présents en milieu hospitalier (liste non exhaustive) :

- *Les eaux grasses* : le Règlement Sanitaire Départemental, article 130-2 impose entre autres la mise en pace de bacs à graisses dans les cuisines.
- *Les huiles usagées et hydrocarbures* : Le décret du 21 novembre 1979 impose le ramassage et la valorisation des huiles usagées et hydrocarbures par des sociétés agrées.
- *Les produits radioactifs* : L'article 8 de l'arrêté du 30 octobre 1981 impose la collecte et le stockage des effluents radioactifs dans des cuves tampons. La circulaire DGS/SD7 D/DHOS/E 4 n° 2001-323 du 9 juillet 2001 relative à la gestion des effluents et des déchets d'activités de soins contaminés par des radionucléides impose le tri et le conditionnement le plus en amont possible. Les effluents doivent être stockés de façon distincte afin de permettre d'une part, un traitement local par décroissance radioactive de période inférieure à 100 jours et, d'autre part, une prise en charge des autres effluents par l'Agence Nationale pour la gestion des Déchets RAdioactifs (ANDRA). La radioactivité des effluents doit être contrôlée avant leur évacuation vers le réseau de collecte des eaux usées urbaines.
- *Les composés cytostatiques* : La circulaire n° 678 du 3 mars 1987 relative à la manipulation des médicaments anticancéreux recommande que l'élimination des déchets et matériels contaminés fasse l'objet d'un circuit spécifique et de précautions particulières.
- *Les produits détergents* : Le décret n°87-1055 du 24 décembre 1987 impose la biodégradabilité des détergents à au moins 90%.
- *Le mercure* : L'arrêté du 24 décembre 1998 et la circulaire du 20 juillet 1999 interdisent respectivement la mise sur le marché et l'utilisation dans les établissements de santé de thermomètres à mercure destinés à mesurer la température interne de l'homme.

En France, si les activités soumises à déclaration ou autorisation au titre des ICPE sont contrôlées, les autres rejets restent soumis aux obligations définies par les communes et leurs référents compétents en matière d'assainissement des eaux usées. Notons également qu'au niveau européen, il n'existe aucun texte spécifique évoquant le cadre législatif relatif à la gestion des effluents hospitaliers.

Au travers de ce chapitre bibliographique, nous avons pu voir la grande complexité des effluents hospitaliers, des polluants qu'ils renferment et de leur potentiel écotoxique, mais aussi la réglementation actuelle relative à la gestion de ces effluents. Au regard de ces données et de la méconnaissance des performances réelles des STEP, il apparaît aujourd'hui nécessaire de développer une méthodologie d'évaluation des risques, et notamment des effets écotoxicologiques des effluents hospitaliers.

Chapitre 2.

La caractérisation des effets écotoxicologiques dans les EDREcotox

Ce chapitre vise à présenter les méthodologies d'évaluation des risques écotoxicologiques (EDREcotox) et les outils qui y sont associés, l'accent étant mis sur la phase « caractérisation des effets écotoxicologiques », qui fait l'objet de cette thèse.

Nous présenterons dans un premier temps le contexte international et les méthodologies d'évaluation des risques écologiques (EDRE) dans lesquels s'inscrivent les EDREcotox. Dans un deuxième temps, nous nous centrerons sur les différentes stratégies de caractérisation des effets : les approches « substances » (« substances » et « substances avec effets combinés ») et les approches « bioessais » (« batterie de bioessais mono-spécifiques » et « bioessai pluri-spécifique ») seront présentées. Ce chapitre se conclue enfin par une présentation des différents organismes utilisés dans cette étude, préalable indispensable à la compréhension des effets écotoxiques que nous aborderons dans la partie résultats.

1. Contexte international et présentation des méthodologies d'évaluation des risques écologiques

1.1 Introduction

Plusieurs définitions du risque et de l'évaluation des risques (EDR) nécessitent d'être prises en considération. Selon Rivière [1998], « l'évaluation du risque est fondée sur la distinction fondamentale entre danger et risque ». Le danger est lié aux caractéristiques intrinsèques d'une substance, de provoquer des préjudices (à une personne, un organisme, un écosystème, etc.) alors que « le risque est la probabilité d'apparition d'effets toxiques après exposition des organismes à un objet dangereux ». Une définition plus ancienne de Suter [1993] énonce très clairement : « L'évaluation des risques est l'opération qui assigne des niveaux et des probabilités aux effets négatifs des activités humaines et des catastrophes naturelles ».

En matière d'EDR, on distingue classiquement les risques environnementaux et les risques sanitaires. Les risques environnementaux se déclinent en risques globaux comme l'effet de serre et en risques locaux relatifs aux écosystèmes, autrement dit les risques écologiques. Les écosystèmes peuvent subir des dommages liés à des aménagements physiques tels que des barrages, ou des dommages liés à la diffusion de composés toxiques. Dans ce dernier cas, on parlera plus précisément de risque écotoxicologique (EDREcotox). Les évaluations de risques écologiques (EDRE) sont développées dans un contexte de gestion des risques pour estimer les changements nuisibles induits sur les écosystèmes (effets) par l'activité anthropique (stresseurs). Les méthodologies d'EDRE peuvent alors être définies comme « des méthodes scientifiques qui estiment soit la probabilité d'apparition d'effets néfastes, soit la causalité d'impacts observés suite à une exposition à un ou plusieurs polluants » [Donguy et Perrodin, 2006].

Une EDRE se base toujours sur un scénario donné. Il s'agit alors de simuler les effets et le comportement des xénobiotiques dans un environnement simplifié. Les transferts de substances entre les différents compartiments abiotiques sont décrits par des systèmes d'équations plus ou moins complexes faisant intervenir les propriétés physico-chimiques des molécules. En ce qui concerne les compartiments biotiques, une sélection des espèces représentatives de différents niveaux trophiques est obligatoire [Devillers, 2000]. Selon Sourisseau [2006], le niveau d'agrégation du scénario influence de manière significative les résultats des EDRE et se révèle donc primordial.

1.2 Contexte international

Les premières méthodologies d'EDRE ont vu le jour au début des années 1990 avec la naissance d'une prise de conscience des risques encourus par les écosystèmes suite à leurs expositions à des pollutions d'origine anthropique. En 1992, l'US EPA proposait un premier guide méthodologique pour la gestion des sites industriels pollués. Suite à un certain nombre de travaux (et notamment ceux de Suter [1993]), le guide fut amélioré pour devenir « The Guideline for Ecological Risk Assessment » [US EPA, 1998] qui reste aujourd'hui encore la référence en matière d'EDRE [Rivière, 1998; Bermond, 2002; Hayet, 2006].

Depuis, ce guide a été repris par de nombreux pays et adapté à différents domaines tels que la gestion des sites pollués [CEAEQ, 1998; Environment Agency of United Kingdoms, 2003].

Toutefois, très peu d'outils existent pour évaluer les risques écotoxicologiques présentés par des sources de polluants en mélange (dépôts de déchets, sols pollués, rejets dans le milieu naturel d'effluents urbains ou industriels, etc.). Les méthodologies d'EDRE existantes portent essentiellement sur la caractérisation de l'écotoxicité intrinsèque des sources de pollution (effluents liquides ou gazeux, déchets, sédiments contaminés, etc.) et ne reflètent que très peu le risque qu'elles présentent dans un scénario donné. Sur le plan national, quelques méthodologies concernant des domaines très particuliers ont récemment été élaborées dans cet objectif. On peut citer ici la méthodologie de l'Ifremer [Alzieu, 2001], pour « l'évaluation des risques liés aux sédiments marins », celle du CETMEF [Babut et Perrodin, 2001; CETMEF, 2001], pour « l'évaluation des risques liés à la mise en dépôt des sédiments de dragage », celle de l'ADEME [2002], pour « l'évaluation de l'écocompatibilité de scénarios de stockage ou de valorisation de déchets » et beaucoup plus récemment, celle du LSE pour « l'évaluation des risques écologiques liés aux aménagements urbains et aux infrastructures de transport » [Donguy et Perrodin, 2006].

Une étude RECORD (Réseau COopératif de Recherche sur les Déchets) [2006] s'est récemment intéressée à l'analyse comparative de la variabilité de neuf méthodologies d'EDRE existantes et à la définition des conditions préférentielles d'utilisation de chacune. Trois types d'approches ont été identifiés [Hayet, 2006] :

- Les méthodologies d'approches dites « générales » ont été développées afin d'évaluer le risque écologique d'un site pour lequel plusieurs agents stresseurs, plusieurs vecteurs et plusieurs cibles sont identifiés.
- Les méthodologies d'approches dites par « matrice » ont été développées afin d'évaluer le risque écologique d'une "mixture globale" (tel qu'un sédiment ou un déchet) constituant la source de pollution du scénario étudié.
- Les méthodologies d'approches dites par « substances » ont été développées afin d'évaluer le risque écologique d'une substance destinée à la commercialisation.

Le Tableau 12 classe les différentes méthodologies d'EDRE en fonction de leur type d'approche et de leur applicabilité.

types d'approches	applications	principaux guides méthodologiques
générales	sites et sols pollués	- Guidelines for Ecological Risk Assessment- USA - [US EPA, 1998]. - Ecological Risk Assessment - United Kingdoms - [Environment Agency of United Kingdoms, 2003] - Guideline on Ecological Assessment - Australia - [NEPC, 1999]. - Procédure d'évaluation du risque écotoxicologique pour la réhabilitation des terrains contaminés - Québec - [CEAEQ, 1998].
matrices	matrices de type sédiment ou déchet	- Évaluation de l'écocompatibilité des scénarios de stockage et de valorisation des déchets - France - [ADEME, 2002]. - Évaluation écotoxicologique de sédiments contaminés ou de matériaux de dragage - France - [CETMEF, 2001]. - Évaluation détaillée des risques pour les écosystèmes. Gestion des sites et sols pollués - France - [MATE, 2000]
substances	substances destinées à la commercialisation	- Évaluation du risque environnemental des produits phytopharmaceutiques - France - [SSM-INRA 2004]. - Technical Guidance Document on Risk Assessment for new notified substances - European Union - [ECB, 2003].

Tableau 12 : Les différentes approches des méthodologies d'EDRE (applications et principaux guides) [RECORD, 2006]

1.3 Les trois phases d'une EDRE - méthodologie générale

Comme l'illustre la Figure 6, l'ensemble des méthodologies d'EDRE se conduisent classiquement suivant trois phases que cette partie vise à décrire brièvement : (1) la formulation du problème, (2) l'analyse, qui est elle-même constituée de deux parties : la caractérisation des expositions et la caractérisation des effets écologiques, et enfin, (3) la caractérisation du risque elle-même.

Il est à noter qu'une étude préliminaire généralement nommée *évaluation du danger* et visant à déterminer la nécessité ou non de réaliser une EDRE est généralement effectuée mais ne sera pas détaillée dans ce document.

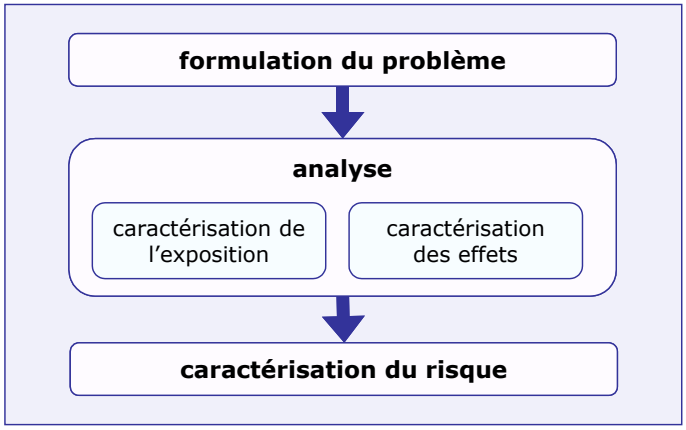


Figure 6 : Méthodologie générale d'une EDRE

1.3.1 Formulation du problème

La phase de formulation du problème est fondamentale, c'est une phase d'investigation et de choix techniques, à l'issue de laquelle un plan d'actions doit être clairement établi (identification des données à acquérir, des techniques de mesures et/ou d'évaluation et du cadre de l'interprétation) pour la réalisation effective des phases suivantes l'EDRE [Rivière, 1998; Babut et Perrodin, 2001; Bermond, 2002; Emmanuel, 2004a].

Selon l'US EPA [1998], cette phase comprend essentiellement les trois étapes suivantes:

1) Description détaillée du contexte et intégration des données disponibles.
   Cette étape a pour but de clarifier le scénario étudié. Il s'agit d'identifier les sources d'émission de polluants, les voies de transferts et les écosystèmes cibles à partir des connaissances existantes (limites géographiques et temporelles, stresseurs, cibles, vecteurs potentiels…).
2) Sélection des paramètres d'évaluation et élaboration du modèle conceptuel.
   Il s'agit de sélectionner les éléments des écosystèmes cibles à protéger relativement au scénario. Le modèle conceptuel correspond au support de la communication entre les évaluateurs et les gestionnaires, c'est un schéma qui permet une vision intégrée du scénario : Sélection des stresseurs, des sources d'émission, des voies de transfert, des écosystèmes cibles à protéger, des ratios massiques ou volumiques de dilution, des échelles spatiales et temporelles, des bioessais et points finaux d'évaluation (end-points) envisagés et des approches utilisées.
3) Élaboration d'un plan d'analyse.
   Cette étape achève la phase de formulation en insistant sur la nécessité de programmer l'évaluation et l'interprétation des données avant de débuter les analyses [Emmanuel, 2004a].

C'est lors de la phase de formulation du problème que le type d'approche de caractérisation des effets écotoxicologiques est sélectionné (substances ou bioessais). L'approche substance se base sur l'analyse physico-chimique des stresseurs (ex : plomb, PCBs, médicaments…) et utilise les valeurs des bases de données internationales d'écotoxicologie alors que l'approche bioessais considère les stresseurs en tant qu'une entité matrice (ex : effluent, déchet, sédiment…) sur laquelle sont réalisées des bioessais [Donguy et Perrodin, 2007].

1.3.2 La phase d'analyse

Elle consiste en l'acquisition des données nécessaires à la caractérisation des effets des polluants (caractérisation des effets écotoxicologiques) et de l'exposition des différentes cibles concernées (caractérisation de l'exposition) [Babut et Perrodin, 2001]. Ces deux opérations en constantes interactions sont menées en parallèles [Rivière, 1998].

1.3.21 Caractérisation de l'exposition

La caractérisation de l'exposition consiste à déterminer les probabilités de contact spatio-temporel entre les stresseurs et les populations cibles (récepteurs) [US EPA, 1998]. Elle passe donc par l'analyse des sources, des transferts depuis ces sources et de la distribution des stresseurs dans l'environnement. L'exposition dépend à la fois des concentrations des stresseurs dans les milieux et des caractéristiques et comportements des organismes cibles. Elle traduit au final, les doses absorbées par les populations cibles. Cette analyse peut être réalisée à l'aide de calculs théoriques et/ou sur la base de résultats expérimentaux [Babut et Perrodin, 2001].

Cette phase aboutit à la détermination d'une (de plusieurs ou d'un ensemble de) valeur(s) de caractérisation de l'exposition. Dans le cas d'une approche substance, on parle de la PEC (Predicted Environnemental Concentration), alors que dans le cas d'une approche bioessais, on parle du pourcentage de la matrice dans le milieu [Donguy et Perrodin, 2007]. Il s'agit dans les deux cas de la concentration que l'on s'attend à trouver dans le milieu suite aux différents apports. Cette détermination peut s'avérer complexe car il faut tenir compte de nombreux facteurs de modification pouvant intervenir dans les voies de transfert : dilution, évaporation, biodégradation, bio-accumulation, changement de spéciation des substances, caractéristiques de l'écosystème, etc.. L'exposition peut également être directe ou indirecte, à long ou à court terme, aiguë ou diffuse [Rivière, 1998; RECORD, 2005; Donguy et Perrodin, 2006].

1.3.22 Caractérisation des effets écotoxicologiques

Il s'agit de définir dans quelle mesure les organismes de l'écosystème cible sont significativement sensibles aux stresseurs auxquels ils sont exposés [Donguy et Perrodin, 2006]. Cette étape se base principalement sur des approches biologiques qui incluent des bioessais et bioindicateurs. Elle aboutit à l'acquisition de différentes valeurs d'effets écotoxicologiques (NOEC, CE20, CE50…) permettant de calculer la valeur d'absence d'effet significatif vis-à-vis de l'écosystème cible que l'on nomme parfois CSE (Concentration Sans Effet).

Dans la section suivante (2, page 56) nous nous intéresserons plus précisément aux deux types d'approches envisagées au cours de cette phase : l'approche substances (basée sur l'utilisation de bases de données internationales) et l'approche bioessais (basée sur la réalisation de bioessais mono spécifiques ou pluri-spécifiques).

1.3.3 Caractérisation du risque

La caractérisation du risque compile les résultats obtenus lors de la phase d'analyse. Elle consiste dans son principe général, à comparer le degré de présence d'un ou plusieurs stresseurs et la gravité de leurs effets sur les écosystèmes cibles. Le calcul ou l'estimation des incertitudes doit finalement être réalisé et associé au résultat. Selon les contraintes opérationnelles et les

données disponibles, plusieurs grands types de méthodes sont utilisables [US EPA, 1998; Babut et Perrodin, 2001] :

- Des études de terrain peuvent être réalisées sous réserves entre autres, d'établir un lien de causalité et seulement dans le cas d'une EDRE rétrospective.
- Les méthodes qualitatives caractérisent le risque en deux ou trois catégories, par exemple fort/faible/moyen, le plus souvent sur la base d'un jugement d'expert [Rivière, 1998]. Elles sont utilisables pour des démarches comparatives (deux types de contamination par exemple).
- Les méthodes de comparaison intégrant l'ensemble des relations stresseurs/réponses permettent d'estimer le niveau de risque associé à un niveau d'exposition donné. Ces méthodes sont particulièrement utiles pour tester plusieurs possibilités de réduction des risques, ou lorsqu'il y a différentes concentrations d'exposition (en fonction du temps ou de la zone géographie) et/ou d'effet (chronique/aigu) [Klaine *et al.*, 1996; Solomon *et al.*, 1996].
- La méthode du quotient compare l'estimation de l'exposition à celle d'absence d'effet sur les écosystèmes cibles et est éventuellement associée à une fourchette d'incertitude.

Compte tenu du fait que cette étude est principalement consacrée à la caractérisation des effets écotoxicologiques, nous avons choisi de travailler avec cette dernière méthode (du quotient) qui est la plus simple et la plus utilisée. Nous détaillerons donc uniquement cette méthode dans les prochains paragraphes.

La méthode du quotient aboutit au calcul d'un Indice de Risque (IR) qui s'applique aussi bien aux approches substances qu'aux approches bioessais (Tableau 13). Il se calcule de la manière suivante :

$$IR = \frac{\text{valeur de caractérisation de l'exposition}}{\text{valeur d'absence d'effet}} \qquad \text{(eq. 1)}$$

Ainsi, le calcul de IR permet de distinguer les cas où les milieux sont :

- Compatibles avec les usages constatés sans exposer les écosystèmes cibles à des niveaux de risques excessifs : le risque est dit « acceptable » lorsque IR ≤ 1 ;
- Incompatibles avec les usages constatés sans exposer les écosystèmes cibles à des niveaux de risques excessifs : le risque est dit « inacceptable » lorsque IR > 1.

approche	exposition	effets	IR
substances	PEC (mg/l, mg/kg) mesure sur site ou données connues ou obtenues par modélisation	PNEC (mg/l, mg/kg) à partir ou calculé à partir des bases de données d'écotoxicologiques et des règles du TGD	$\frac{PEC}{PNEC}$
bioessais	% matrice source (effluent, déchet, sol, etc.) dans le milieu récepteur (sol, rivière, lac, etc.)	% matrice créant un effet	$\frac{\text{\% matrice dans le mileu}}{\text{\% matrice sans effet}}$

Tableau 13 : Modalités de calcul de l'Indice de Risque (IR) pour les approches substances et bioessais [d'après Donguy et Perrodin, 2007]

Cette méthode est rapide et se prête bien à la communication des résultats. Elle est cependant une manière assez sommaire de caractériser les risques [US EPA, 1998; Babut et Perrodin, 2001] car elle repose sur un certain nombre de simplifications :

- Les effets et l'exposition sont tous deux simplifiés en une valeur, ce qui peut masquer des biais conceptuels, par exemple la fluctuation de la concentration d'exposition ;
- Les effets indirects ne sont pas facilement pris en compte, par exemple l'eutrophisation ;

2. Les différentes stratégies de caractérisation des effets

2.1 Introduction

Comme nous l'avons vu au travers des derniers paragraphes, en EDRE, la caractérisation des effets écotoxicologiques peut être réalisée selon deux types d'approches : l'approche substances et l'approche bioessais. La caractérisation des effets nécessite de choisir les processus à simuler et de hiérarchiser les phénomènes que l'on souhaite modéliser. La qualité des résultats produits s'en trouve fortement affectée. Selon Devillers [2000], cela expliquerait en partie que l'utilisation de différents modèles d'analyses des risques environnementaux puisse conduire à l'obtention de résultats différents et difficiles à interpréter.

Le paragraphe suivant vise à détailler les différentes stratégies de caractérisation des effets, tant au niveau de leur applicabilité que de leur pertinence écologique. C'est sur cette base que porte une partie essentielle de ce travail de thèse.

Typologie des stratégies de caractérisation des effets

Nous avons vu que l'approche substance considère l'analyse physico-chimique de la matrice stresseur (déchet, effluent) et se base sur les différents stresseurs (plomb, PCB, chlore,...) qu'elle contient ; alors que l'approche bioessais prend en compte la matrice stresseur comme une entité. Par ailleurs, chacune de ces deux approches (ou stratégies de caractérisation des effets) peut se subdiviser en deux sous stratégies.

Les approches « substances » sont de deux types : l'approche substance seule, que nous nommerons « approche substances » et l'approche « substances avec effets combinés ». L'« approche substance » prend en considération les effets de chacun des stresseurs de manière indépendante alors que l'approche « substances avec effets combinés » se base sur l'ensemble des stresseurs identifiés et considère leurs effets combinés vis-à-vis des écosystèmes cibles.

Les approches « bioessais » peuvent être abordées suivant deux niveaux : l'approche « batterie de bioessais » considère les effets des stresseurs via une batterie de bioessais mono-spécifiques alors que l'approche « bioessais pluri-spécifiques » se base sur des niveaux d'organisation biologique plus élevés, de type communauté.

Les quatre stratégies de caractérisation des effets qui résultent de ces considérations sont présentées dans la Figure 7.

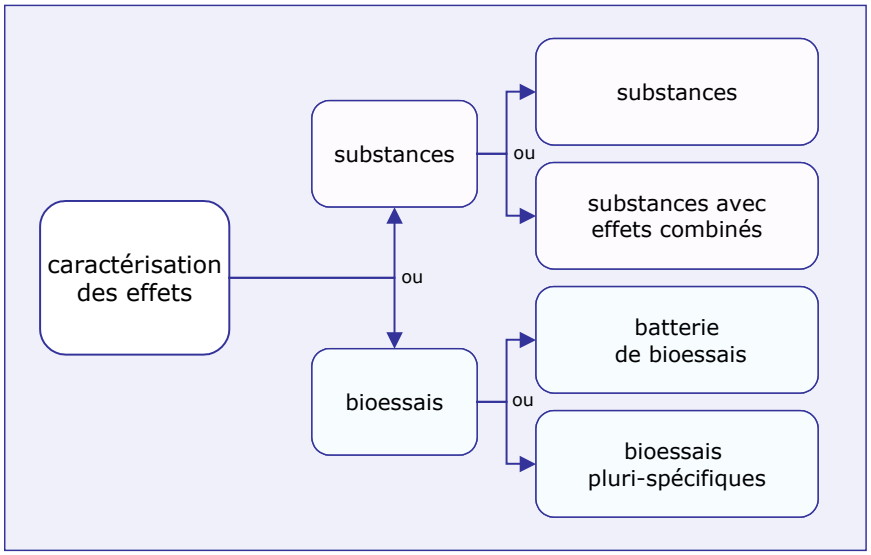


Figure 7 : Les différentes stratégies de caractérisation des effets

Ces quatre types d'approches répondent directement à des préoccupations différentes mais elles sont complémentaires pour appréhender globalement un problème. Pour Simon *et al.* [1998], une approche intégrée est nécessaire à la détermination de la toxicité d'un effluent pour un écosystème. La réelle difficulté du choix d'un type d'approche, réside dans le souhait du gestionnaire de disposer d'un outil répondant à un ensemble de critères et permettant de définir si la santé des écosystèmes récepteurs est affectée ou non. Selon Calow [1993], l'idéal serait un système qui répondrait à l'ensemble des cinq critères de performance suivants : le réalisme écologique, la répétabilité, la reproductibilité, la sensibilité, la fiabilité (précision) et la robustesse (facilité d'interprétation). *A priori,* aucun essai ne répond seul à l'ensemble de ces critères, et un compromis doit donc être fait.

Ces différentes approches, ainsi que les outils s'y rapportant, sont développés dans les paragraphes suivants.

2.2 Les approches « substances »

2.2.1 L'approche « substances »

L'approche substances est la manière la plus classique de caractériser les effets, elle se caractérise par trois étapes distinctes : l'identification des stresseurs potentiels (on parle également de traceurs de risque), la recherche des valeurs d'effet et le calcul des PNEC qui conclue cette approche. La Figure 8 identifie ces étapes et les outils qui y sont associés.

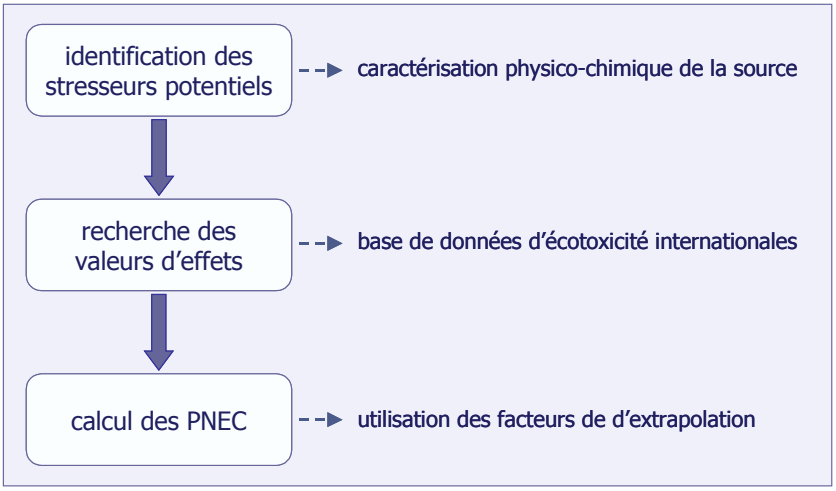


Figure 8 : Étapes et outils associés à l'approche « substance »

La première étape consiste en la caractérisation physico-chimique du ou des stresseurs peut être menée en amont de l'EDRE. Dans tous les cas, la difficulté réside dans le choix des paramètres à analyser, qui apparaît primordial à la détermination des stresseurs (risque d'écarter un stresseur potentiel). Le choix des polluants traceurs prend en compte la volonté de couvrir une gamme de polluants spécifiques et diversifiés (organiques ou minéraux, chimiques ou biologiques…) relative au scénario étudié. Il est également important de sélectionner des polluants agissant par le biais des différentes voies d'exposition présentes dans le scénario [Perrodin *et al.*, 2004].

La seconde étape fait appel aux bases de données d'écotoxicité internationales. Une recherche exhaustive des données d'écotoxicité existantes est réalisée pour chacun des traceurs sélectionnés, grâce aux bases de données accessibles depuis Internet (voir annexe 1), ainsi qu'à des logiciels spécialisés tels que TerraSys [Trépanier, 2005] ou des revues scientifiques.

La dernière étape consiste finalement à calculer les PNEC pour chacun des traceurs, en divisant la valeur d'effet obtenue pour l'organisme le plus sensible (pour chaque stresseur) par un facteur d'extrapolation (également appelé facteur de sécurité ou facteur d'incertitude).

En effet, l'extrapolation des effets obtenus avec quelques espèces à tout un écosystème fait intervenir un certain nombre d'incertitudes que l'INERIS [1999] et Forbes et Calow [2002] ont répertoriés :

- Les variations inter-expérimentateurs et inter-laboratoires ;
- Les variations intra-spécifiques liées à l'état physiologique des individus d'une même espèce ;
- Les variations inter-spécifiques résultant des différences de sensibilités entre les différentes espèces de l'écosystème vis-à-vis d'une substance ;
- Les extrapolations de la toxicité à court terme vers le long terme. Des effets sublétaux peuvent apparaître à long terme et mettre en danger une population, sans que cela ne puisse être détectable à court terme ;
- Les extrapolations des données de laboratoire qui ne tiennent pas compte de l'état initial de l'écosystème. Des effets additifs, synergiques ou antagonistes dus à la présence d'autres substances dans le milieu peuvent jouer un rôle et modifier les effets de la substance testée sur la biocénose.

Mon travail de DEA a d'ailleurs mis en avant la disparité des valeurs d'effet issues des bases de données internationales [Boillot, 2004].

L'importance des facteurs d'extrapolation dépend de la quantité d'informations disponible pour l'écosystème. Ainsi, si des données d'écotoxicité pour des espèces appartenant à des groupes taxonomiques et des niveaux trophiques différents existent, le facteur d'extrapolation sera plus faible que dans le cas où seulement quelques données sont disponibles [INERIS, 1999] Notons enfin que les valeurs des facteurs d'extrapolation varient en fonction des auteurs [Forbes et Calow, 2002], et que ceux de l'ECB (European Chemicals Bureau) sont utilisés de façon quasi majoritaire (Tableau 14).

données écotoxicologiques disponibles	facteurs d'extrapolation
au moins une C(E)L50 d'un essai court terme pour chacun des trois niveaux trophiques (poissons, invertébrés et algues)	1000
une NOEC d'un essai long terme (poisson ou invertébrés)	100
deux NOEC d'essais long terme avec deux espèces représentatives de deux niveaux trophiques (poissons et/ou invertébrés et/ou algues)	50
trois NOEC d'essais long terme pour au moins trois espèces représentant trois niveaux trophiques (poissons, invertébrés, algues)	10
données de terrain ou écosystème modèle	évalué au cas par cas

Tableau 14 : Facteurs d'extrapolation et conditions d'application pour la dérivation des PNEC aquatiques [ECB, 2003]. Les notes relatives aux conditions d'application de ces facteurs de sécurité sont rapportées en annexe 2.

L'étape de recherche des valeurs d'effet peut parfois être évitée et remplacée, pour certains traceurs, par des valeurs de PNEC « pré-calculées ». La base de données environnementales de l'INERIS [2006] propose de telles valeurs. Cette base est issue des démarches engagées par

différents pays ou organisations (Union Européenne, OCDE, France - INERIS, etc.), pour évaluer les risques environnementaux posés par certaines substances chimiques. Elle est chargée de recueillir les données extraites de différents dossiers (rapports d'évaluation des risques des substances existantes sur le site de l'ECB, rapports SIDS (Screening Information DataSet) sur le site de l'OCDE, etc.) de manière à les proposer en ligne (caractéristiques physico-chimiques et écotoxicologiques).

L'approche substance apparaît globalement très simpliste, et est souvent critiquée. Elle ne prend pas en compte les effets combinés des substances (entre elles et vis-à-vis des écosystèmes) et la biodisponibilité des substances est peu ou mal appréciée.

2.2.2 L'approche « substances avec effets combinés »

2.2.21 Introduction

Dans la partie précédente, nous avons vu qu'il n'y a pas de prise en compte des effets des mélanges de substances au niveau de l'approche substances. Or, il apparaît que dans la totalité des cas d'étude, un polluant n'intervient jamais seul. Il y a aujourd'hui une volonté d'appréhender les pollutions dans leur globalité et de prendre en compte les effets combinés des mélanges de substances.

L'approche « substances » classique se distingue de l'approche « substances avec effets combinés ». Cette dernière nécessite une étude préliminaire des effets combinés des substances mises en jeu dans le scénario de l'EDRE étudié (ou une synthèse des données existantes si elles sont suffisantes). Selon les types d'effets combinés trouvés, ceux-ci pourront être pris en compte dans le calcul d'une *PNEC globale* se rapportant au mélange de substances constituant la matrice de stresseurs. Force est de constater que dans le cas d'effets d'antagonismes ou de synergies, les effets combinés ne pourront être intégrés à la *PNEC globale* que de manière qualitative.

2.2.22 Définitions et terminologie

En écotoxicologie, l'étude des effets combinés des mélanges a pour objectif la détermination de la nature des interactions se produisant entre des substances chimiques en mélange et un(des) organisme(s) cible(s).

Il faut avant tout noter que les concepts et théories d'étude de l'écotoxicologie des mélanges ont été calqués sur ceux en vigueur dans un domaine très proche, la toxicologie. Le premier concept a été établi par Loewe et Muischnek [1926], et se base sur le fait que lorsque des substances sont en mélange, les concentrations d'effets s'additionnent [Greco *et al.*, 1995]. Les effets s'avèrent de nature additive quand une substance agit comme une dilution de l'autre, c'est à dire que l'écotoxicité du mélange est proportionnelle à l'écotoxicité et à la concentration des substances en mélange [Altenburger *et al.*, 1990].

En 1939, Bliss a introduit la notion de *site d'action* des substances (sur les organismes). Les substances agissent sur un ou plusieurs sites d'action pour produire un ou plusieurs effets (inhibition d'une enzyme, inhibition d'une activité musculaire, etc.). À ce titre, une substance peut agir et produire un effet de manière indépendante au sein d'un mélange. Chacune des substances contribue alors à une réponse ou à un effet global. Cette théorie repose sur l'étude des modes et mécanismes d'action des substances. Ces derniers sont responsables de la manière spécifique par laquelle une substance va induire un effet sur un organisme [Suter II, 2006].

Bliss [1939] a alors développé la première classification des effets combinés qui identifie trois types de mode d'action des substances en mélange :

(i) *Independent joint action* : les constituants agissent sur des sites d'actions différents et la réponse biologique d'un constituant n'est pas influencée par celle d'un autre ;

(ii) *Similar joint action* : les constituants agissent de manière indépendante sur les mêmes sites d'actions et la réponse biologique d'un constituant n'est pas influencée par un autre ;

(iii) *Synergistic action* : la réponse d'un mélange ne peut pas être appréhendée par les réponses isolées des constituants et dépend des effets combinés de ceux-ci [Yang, 1994; Mercier, 2002].

En se basant sur les résultats des travaux de Bliss [1939], Plackett et Hewlett [1952] ont par la suite élaboré, une classification pour un mélange de deux substances (Tableau 15) qui reste aujourd'hui encore d'actualité.

	similar joint action	dissimilar joint action
non-interactive	simple similar ou additivité des concentrations/des doses ou Loewe additivity	independent ou additivité des effets/des réponses ou Bliss independance
interactive	complex similar ou synergie/antagonisme de Loewe	dependent ou synergie/antagonisme de Bliss

Tableau 15 : Classification des interactions de deux substances (adapté de [Plackett et Hewlett, 1952])

Dans cette démarche « s*imilar joint action* » signifie que les substances agissent sur le même site d'action et « d*issimilar* », sur des sites différents. « *non-interactive* » signifie que la réponse biologique d'une substance n'est pas influencée par celle de l'autre (autrement dit que l'interaction est additive), « *interactive* » signifie que la réponse biologique d'une substance n'est pas influencée par celle de l'autre et que les effets sont donc plus qu'additifs (synergistes) ou moins qu'additifs (antagonistes).

Sans doute du fait de la complexité des concepts, une très grande variété de termes redondants existent et sont utilisés pour décrire l'écotoxicologie des mélanges, cela malgré les efforts d'un certain nombre d'auteurs [Plackett et Hewlett, 1952; Greco *et al.*, 1995; Seed *et al.*, 1995; Warne, 2003]. Il n'existe donc pas de consensus terminologique (Tableau 16) et la traduction

française des différents termes accroît cet état de confusion. Selon Seed *et al.* [1995], cette confusion générale nuit au développement de ce domaine d'étude. Il faut enfin noter que la majorité des études utilise abusivement les trois termes classiques : additivité, antagonisme et synergie sans forcément préciser si les substances agissent ou non sur le même site d'action [Hermens *et al.*, 1984; Greco *et al.*, 1995; Mercier, 2002; Warne, 2003]. Plus récemment, Faust [2001] a montré que le terme *site d'action* était interprété de différentes manières dans la littérature. Certains auteurs parlent de site biologique d'action identique [Warne, 2003; Brosché *et al.*, 2006], d'autres d'un même ou très similaire système biologique [Lin *et al.*, 2004], d'un mécanisme d'action identique [Thorpe *et al.*, 2006] ou encore d'un mode d'action écotoxicologique identique des substances en mélange [Barata *et al.*, 2006]. Un accord sur la définition de ce terme n'a pas été constaté.

synergism	additive	antagonism
greater than additive	expected action	less than additive
supra-additive	simple addition	infra-additive
potentiation	additive action	competitive addition
positive summation	summation	competitive antagonism
joint action	joint action	joint action
interaction	interaction	Interaction

Tableau 16 : Termes les plus utilisés pour décrire les différents types d'interactions existants [Warne, 2003]

Termes utilisés dans la suite de cette étude

En matière d'effets combinés, il existe donc deux variables différentes qui se déclinent elles-mêmes en deux sous-variables :

- Le site d'action des substances qui peut être identique ou non ;
- La réponse biologique des substances qui peut être dépendante ou indépendante.

Dans le cas de site d'action identique, nous utiliserons le terme « concentration » alors que dans le cas de sites d'action différents, nous utiliserons le terme d'« effet ». Lorsque la réponse biologique est indépendante, nous parlerons d'« additivité ». Lorsqu'elle est dépendante, nous parlerons d'« antagonisme », si la réponse écotoxique est moins qu'additive, et de « synergie » lorsque cette réponse est plus qu'additive. Prenons quelques exemples :

- Nous parlerons d'« additivité des concentrations » lorsque la réponse biologique des substances est indépendante et que les substances agissent sur des sites d'action identiques. La réponse du mélange sera alors égale à la somme des proportions des concentrations d'effet [Greco *et al.*, 1995].

- Nous parlerons d'« antagonisme des effets » lorsque les sites d'action sont différents et la réponse biologique dépendante et conduit à un effet inférieur à l'« additivité des effets ». L'écotoxicité du mélange conduit alors à une réponse inférieure à la somme des effets observés par les substances prises individuellement.

Les concepts décrits dans cette partie donnent lieu à un certain nombre de méthodes de détermination de la nature des effets combinés de mélanges de substances vis-à-vis d'un organisme.

2.2.23 Modèles de détermination des effets combinés en écotoxicité des mélanges

Certaines études différencient deux types de mélanges, les mélanges simples dont les composés sont identifiés et en nombre limité (inférieur à 10) et les mélanges complexes dont les composés sont en nombre important (supérieur à 10). Pour ce second type de mélange, Feron *et al.* [1995] préconisent d'isoler une dizaine des constituants les plus toxiques pour parvenir à un mélange simple défini. Le mélange est ensuite traité en tant que tel, sans omettre les risques d'incertitudes plus importants dus aux interactions possibles qui ne sont pas prises en compte [Feron *et al.*, 1995; Feron et Groten, 2002]. Mais la majorité des travaux sont actuellement réalisés sur des mélanges de substances deux à deux (on parle de mélanges binaires) qui permettent de mieux appréhender les problèmes d'effets combinés [Deneer, 2000].

Deux types de modèles d'étude, basés sur les sites d'action des substances en mélange, ont été développés en « écotoxicologie des mélanges » (Tableau 17). Ils concernent, d'une part, l'étude du caractère antagoniste ou synergique des effets combinés d'un mélange [Szabo, 1984; Yang, 1994; Mercier, 2002; Lin *et al.*, 2004; Emmanuel *et al.*, 2005a] et, d'autre part, la prédiction des effets d'un mélange à partir des effets des composés seuls [Altenburger *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 2002; Vighi *et al.*, 2003; Barata *et al.*, 2006; Junghans *et al.*, 2006].

sites d'action différents « concentrations »	même site d'action « effets »
Concentration addition (CA) TU (Toxic Unit) TI (Toxicity Index) ou HI (Hazard index) représentation isobolographique	*Independent Action* (IA)

Tableau 17 : Principales méthodes d'études des effets combinés en fonction des sites d'action des substances

Nous allons à présent détailler ces modèles.

2.2.231 Concentration Addition

Le modèle *Concentration Addition* (CA) a été développé par Loewe et Muischnek [1926] pour un mélange de *n* substances. Chaque substance intervient dans la toxicité du mélange proportionnellement à sa concentration. En d'autres termes, si un mélange contient trois substances agissant de la même manière et que chacune de ces substances est en concentration égale au tiers de sa CL50 pour un organisme, on doit alors s'attendre à ce que le mélange tue la moitié des organismes exposés [Suter II, 2006]. La CA permet d'estimer la réponse globale d'un

mélange (totalité de la courbe dose-réponse) mais se limite à l'étude d'un type d'effet (inhibition de la respiration par exemple), pour un ratio de substances qui reste fixe et dont la concentration globale varie [Barata *et al.*, 2006].

La CA est généralement défini par l'équation suivante :

$$CEx_{mix} = \left(\sum_{i=1}^{n} \frac{p_i}{CEx_i} \right)^{-1} \qquad \text{(eq. 2)}$$

avec : n est le nombre de substances i en mélange, p_i est la proportion de la substance i dans le mélange, CEx_i est la concentration de la substance i qui induit x% d'effet et CEx_{mix} est la concentration du mélange qui induit x% d'effet (en mg/l).

On peut obtenir *pi* par l'équation suivante :

$$p_i = Ci / Cmix \qquad \text{(eq. 3)}$$

avec : Ci la concentration de la substance i en mélange (en mg/l) et, $Cmix$ la concentration totale du mélange (en mg/l).

On a alors :

$$Cmix = \sum Ci \qquad \text{(eq. 4).}$$

Le modèle CA est utilisable pour des substances ayant le même site d'action, mais la plupart des études l'utilise pour toutes les substances qui sont capables de donner la même réponse toxicologique [Faust *et al.*, 2001; Cleuvers, 2003]. Ce modèle est le plus utilisé en écotoxicité des mélanges [Altenburger *et al.*, 2000; Walter *et al.*, 2002; Backhaus *et al.*, 2003; Vighi *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2004].

2.2.232 Independent Action

Le concept alternatif utilisé en écotoxicologie des mélanges a été développé par Bliss [1939] et se nomme *Independent action* (IA). Tout comme la CA, il permet de visualiser la réponse globale d'un mélange (totalité de la courbe dose-réponse). Par opposition à la CA, cette réponse se fait relativement aux réponses engendrées par les modèles d'additivité des effets. L'IA repose sur une *dissimilar action* des substances en mélange [Faust *et al.*, 2001; Backhaus *et al.*, 2003]. Les substances agissent sur des sites différents et de manière indépendante. C'est à dire que l'effet d'une molécule n'est pas modifié par la présence d'une autre [Cleuvers, 2003]. Un organisme mourra donc par exemple des effets de la substance en mélange à laquelle il est le plus sensible en terme de concentration [Suter II, 2006]. Le modèle IA se limite également à l'étude d'un type d'effet, pour un ratio de substances qui reste fixe et dont la concentration globale varie [Barata *et al.*, 2006].

L'effet d'un mélange de *n* substances peut alors être calculé à partir de l'équation suivante :

$$E(Cmix) = E(C_A + C_B + C_C + \ldots + Cn) = 1 - \prod_{i=1}^{n} \left(1 - E(Ci)\right) \qquad \text{(eq. 5)}$$

avec : C_i : la concentration de la substance i dans le mélange (en mg/l) ; $E(Cmix)$ et $E(Ci)$ sont respectivement l'effet du mélange de n substances et de la substance i (en % d'effet).

Le modèle IA implique que les substances qui, au sein d'un mélange, sont en concentration inférieure à leur concentration d'effet, ne contribuent en aucune façon à la toxicité globale du mélange [Backhaus *et al.*, 2003; Cleuvers, 2003].

Il faut enfin noter que ce modèle est très utilisé en écotoxicologie des mélanges et notamment en parallèle du concept *Concentration Addition* (Figure 9), afin de déterminer *a posteriori*, les modes d'action de substances au sein d'un mélange [Altenburger *et al.*, 2000; Backhaus *et al.*, 2003; Vighi *et al.*, 2003; Fraysse et Garric, 2005; Olmstead et LeBlanc, 2005; Garric et Coquery, 2006].

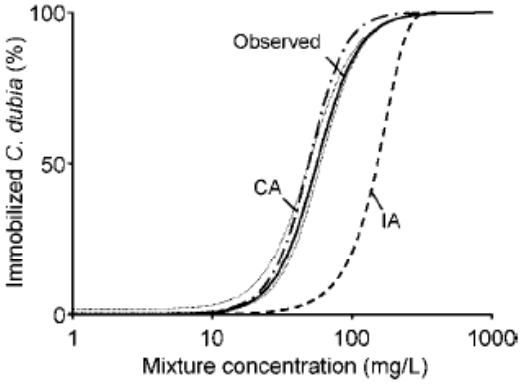


Figure 9 : Exemple de courbe dose-réponse comparant la CA et l'IA à des résultats expérimentaux pour un mélange de bêtabloquants et vis-à-vis de l'immobilisation de *Ceriodaphnia dubia* [Fraysse et Garric, 2005]

2.2.233 TU (Toxic Unit), TI (Toxicity Index) et isoboles

Les TU

Le modèle des TU est une approche d'analyse quantitative des effets des mélanges, introduite par Brown [1968] et Sprague [1970]. Il se base sur l'additivité des concentrations et permet d'accéder à une estimation de la déviation des effets combinés relativement à l'additivité des concentrations et en une valeur d'effet donné tel que la CE50 [EIFAC, 1980; Hermens et Leeuwangh, 1982; Environnement Canada, 1999; Warne, 2003]. Ce modèle très connu par les écotoxicologues permet d'accéder au modèle des TI et peut être exploité par la représentation des isoboles. Selon Yang [1994], les effets combinés au sein d'un mélange binaire peuvent être très différents suivant le ratio de chacun des constituants. Les modèles des TU, TI et les isoboles permettent l'accès aux effets combinés de mélanges en différents ratios.

Le calcul de TU pour une substance *i* se fait par l'équation suivante :

$$TUi = \left(Ci/CExi \right) \qquad \text{(eq. 6)}$$
$$= \left(pi * C_{mix} \right) / CExi$$

avec : TUi : Toxic Unit de la substance i ; Ci (ou $_{mix}$) : concentration de la substance i dans le mélange (ou $_{mix}$, du mélange) (en mg/l) ; $CExi$: concentration de la substance i qui induit x% d'effet (en mg/l) ; pi : pourcentage de i dans le mélange.

La somme des TU de deux substances permet d'accéder aux effets combinés du mélange de ces deux substances, car il s'agit de rapports sans dimension [Warne et Schifko, 1999; Junghans *et al.*, 2006]. Si la somme des TU des constituants du mélange est égale à 1, on pourra s'attendre à ce que les effets du mélange soient de type « additivité des concentrations » vis-à-vis de l'organisme étudié. Si la somme est inférieure à 1, on pourra s'attendre à des effets de type « antagonisme des concentrations ». Si elle est supérieure à 1, les effets seront de type « synergie des concentrations ».

La représentation isobolographique

La représentation graphique la plus utilisée dans l'étude des effets combinés de deux substances vis-à-vis d'un organisme est l'isobologramme qui, en écotoxicologie, a été introduit par Sprague [1970]. Il s'agit d'un graphique en deux dimensions qui permet de mettre en évidence les effets des interactions entre deux composés, mélangés en plusieurs proportions.

Les ordonnées et les abscisses représentent les TU relatives de chaque substance. C'est-à-dire que pour un mélange de deux composés A et B, on trouve en ordonnée : TU_B, et en abscisse : TU_A (Figure 10).

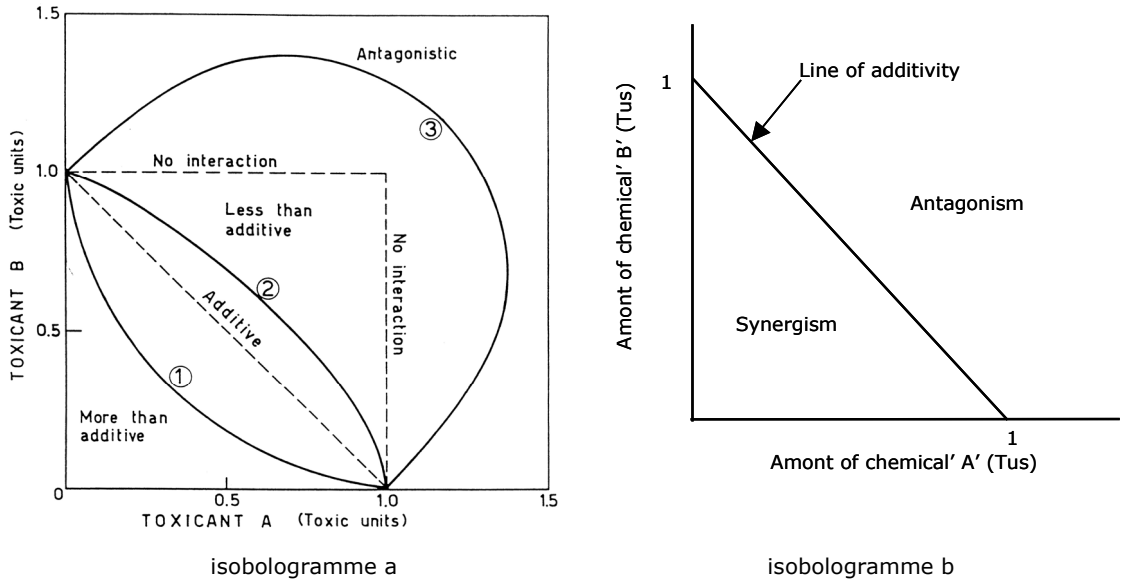


Figure 10 : Exemples d'isobologrammes
[a : "de compréhension" [Calamari et Alabaster, 1980], b : "qualitatif" [Warne, 2003]]

La littérature laisse transparaître deux manières d'interpréter les isoboles. La première est la plus complexe, elle tente d'aborder la compréhension des mécanismes d'action entre les substances et l'organisme d'étude [Sprague, 1970; Herbes et Beauchamps, 1977; Otitoloju, 2002] ; nous l'appellerons interprétation "de compréhension" (Figure 10-a). La seconde est plus simpliste, elle permet de décrire le caractère de la réponse toxique finale d'un mélange de substances en différentes proportions et vis-à-vis d'un organisme cible [Yang, 1994; Kortenkamp et Altenburger, 1998; Groten *et al.*, 2001; Warne, 2003] ; nous l'appellerons interprétation

"qualitative" (Figure 10-b). On lit alors l'isobologramme de la manière suivante : si les effets sont additifs, la courbe obtenue est une droite (line of additivity, Figure 10) ; si les effets sont synergiques, on obtient une courbe en bas et à gauche de cette droite et ; s'ils sont antagonistes, on obtient une courbe en haut et à droite de celle-ci.

Les TI (Toxicity Index)

Par extension du modèle TU, Marking [1977] et Belkhadir [1979] ont contribué au développement du modèle des TI (Toxicity Index of additive joint action of toxicants in a mixture). Il est également appelé « combination index » (I_c) ou « hazard index » (HI) et permet de dégager les caractéristiques générales des interactions dans un mélange de deux composés ou plus [Yang, 1994; Emmanuel, 2004a].

Le TI d'un mélange de *n* substances est calculé par l'équation suivante :

$$TI = \sum_{i=1}^{n} TUi \qquad \text{(eq. 7)}$$

On a alors :

TI = 1 : les effets combinés sont de type additivité des concentrations

TI > 1 : les effets combinés sont de type antagonisme des concentrations

TI < 1 : les effets combinés sont de type synergie des concentrations

Le modèle s'applique aux substances ayant le même mode d'action. Il faut enfin noter que l'hypothèse TI = 1 (impliquant l'additivité des concentrations d'effet) est souvent élargie. Ainsi, la EIFAC [1980] propose d'encadrer cette valeur de 1 de ± 0,5 et Deneer [2000], d'y appliquer un facteur de variation de 2, c'est-à-dire qu'il y a additivité pour des valeurs de TI comprises dans l'intervalle [0,5-2,0]. La proposition de Deneer [2000], se justifie par l'analyse statistique des résultats de 26 études menées entre 1972 et 1998 représentants au total un peu plus de 200 mélanges dont 132 différents.

2.2.24 Quelques repères au niveau des résultats d'études menés sur les d'effets combinés

Les études menées parallèlement sur les modèles IA et CA rapportent globalement que CA surestime l'écotoxicité d'un mélange alors que IA la sous estime [Nirmalakhandan *et al.*, 1997; Olmstead et LeBlanc, 2005; Junghans *et al.*, 2006]. Olmstead et LeBlanc [2005] considèrent que l'écotoxicité des mélanges d'hydrocarbures aromatiques polycycliques, serait mieux représentée par l'IA. Concernant des mélanges de pesticides, Junghans *et al,* [2006] ont évalué un facteur moyen de différence entre la CA et l'IA de 1,3 et un facteur maximal entre les valeurs de CE50 calculés par ces deux modèles de 2,5. Les auteurs concluent que l'estimation des effets de mélanges de pesticides (indépendamment de leurs modes d'action) via la CA assure une protection sans la surestimer. L'étude de Nirmalakhandan *et al.* [1997] confirme ce résultat en révélant que l'estimation de l'écotoxicité d'un mélange par la CA n'excède jamais l'écotoxicité expérimentale de mélanges d'un facteur d'erreur égal à 1,4. Barata *et al.* [2006], précisent que les réponses estimées avec l'IA seraient toujours plus proches de la réalité pour

des effets de type survie de l'organisme. Enfin Groten *et al.* [2001] ont démontré que la dépendance de la réponse biologique, se manifeste surtout lorsque les substances constituant le mélange, ont un rôle dans la biotransformation enzymatique ou agissent sur le métabolisme.

Force est de constater que la majorité des études se base sur l'additivité des concentrations qu'elle préconise comme une approche suffisante en modélisation de l'écotoxicité des mélanges. Cela permet généralement de conclure sur le fait qu'il y a additivité ou bien, une déviation de cette additivité, c'est à dire un antagonisme ou une synergie des concentrations d'effets. Selon Warne et Ross [1997], pour 70 à 80% des mélanges, l'additivité des concentrations serait vérifiée, 10 à 15% des mélanges auraient des effets d'antagonismes des concentrations et il en serait de même pour les effets de synergie des concentrations. Jensen et Sverdrup [2002], ont montré que le surfactant LAS n'a pas d'effet de synergie ou d'antagonisme des concentrations sur la toxicité du pyrène vis-à-vis de *Folsomia fimetaria*. La EIFAC [1980] a examiné la toxicité de 76 mélanges sur le poisson. Elle a trouvé des TI compris entre 0,4 et 26. 87% de ceux-ci appartenaient à l'intervalle 0,5-1,5 et la médiane des TI, était de 0,95. Une étude de Deneer [2000], portant sur plus de 200 mélanges de pesticides deux à deux conclue que 90% des mélanges répondraient au principe d'additivité des concentrations. Les déviations se produiraient plus dans le sens d'une augmentation, que dans celui d'une diminution des effets. Les études portant sur des mélanges de substances ou de préparations phytopharmaceutiques (toxicité aiguë, chronique, à court et long terme, mutagenèse et toxicité sur la reproduction) ont quant à elles montré des effets combinés variables [Warne et Hawker, 1995; Mercier, 2002; Warne, 2003]. Cependant, l'additivité des concentrations était la plus fréquemment rencontrée. L'étude de Warne et Hawker [1995] a également démontré que, plus le nombre de substances chimiques est important au sein d'un mélange, plus la probabilité d'interactions susceptibles d'induire des effets toxiques de type additivité des concentrations augmente.

Il existe cependant quelques exceptions à l'additivité des concentrations. Otitoloju [2002] trouve des effets combinés de type antagonisme des concentrations pour des mélanges binaires de métaux vis-à-vis de *Tympanotonus fuscatu*. Lewis [1992] rapporte que les effets combinés des mélanges surfactants/huile montrent en général une synergie des concentrations. Pour Suter [2006], la plupart des études montre des cas d'antagonisme mais des cas de synergie existent. Il ajoute que suivant le type d'exposition (aiguë ou chronique), les substances mettent en jeu des mécanismes d'action différents.

2.3 Les approches « bioessais »

La caractérisation des effets écotoxicologiques grâce aux bioessais, peut être réalisée avec différents niveaux d'organisation biologique et d'échelles d'expérimentation.

La méthode de caractérisation des effets reste relativement proche quelle que soit l'échelle choisie. Contrairement aux approches « substances », les approches « bioessais » se basent sur

la matrice de stresseurs dont les effets sont caractérisés expérimentalement par des essais sur des organismes ou communautés d'organismes. L'étape préliminaire d'identification des stresseurs par une caractérisation physico-chimique n'est donc pas nécessaire. Il s'agit ici de choisir de manière pertinente les bioessais à mener puis de les réaliser afin de déterminer le pourcentage de la matrice créant un effet sur les organismes cibles. Les facteurs de sécurité du TGD [ECB, 2003] (voir 2.2.1, page 58) sont ensuite généralement utilisés pour calculer le pourcentage de la matrice sans effet sur les organismes cibles.

Les paragraphes suivants sont consacrés à la présentation des différentes échelles de travail : les essais mono-spécifiques et la sélection d'une batterie de bioessais optimale d'une part, et les bioessais pluri-spécifiques d'autre part.

2.3.1 L'approche « batterie de bioessais mono-spécifiques »

2.3.11 Introduction

Historiquement, les premiers essais de laboratoire visaient à évaluer les effets létaux (effets aigus) ou sublétaux (effets chroniques) d'une substance sur des organismes issus d'une culture ou d'un élevage de laboratoire. Plus récemment, ces essais ont trouvé une application dans l'évaluation de l'écotoxicité de matrices complexes liquides ou solides tels que des effluents, des déchets ou des sols pollués [Volatier, 2004]. Les finalités de ces évaluations sont diversifiées : la gestion des déchets, des sols et des sites pollués ; la valorisation des boues en agriculture ; la classification des déchets ; ou encore la caractérisation des sources de pollution dans une problématique d'EDREcotox.

Les bioessais mono-spécifiques sont conduits dans des conditions expérimentales biotiques (espèce, âge) et abiotiques (température, photopériode, nature de l'éclairement, durée d'exposition, composition physico-chimique du milieu) contrôlées et souvent standardisées. Cela permet, d'une part, de fixer et maîtriser au mieux les facteurs connus pour influer sur la réponse des organismes et, d'autre part, de comparer des résultats obtenus, notamment sur différents polluants et entre différents laboratoires [Taub, 1989; Volatier, 2004; Clément, 2006]. Ils remplissent au mieux les critères de répétabilité, reproductibilité, fiabilité et robustesse. L'utilité des essais mono-spécifiques pour caractériser les substances ou les matrices complexes vis-à-vis de leurs caractéristiques écotoxiques intrinsèques n'est plus à prouver. Ils s'avèrent essentiels à l'obtention d'informations sur les concentrations (d'une substance ou d'une matrice) et les durées d'exposition qui induisent des effets sur la mortalité, la reproduction, la physiologie ou encore le comportement d'un organisme [Cairns Jr., 1983]. Chaque espèce d'organisme à ses propres sensibilités. Aujourd'hui, le « mythe » du bioessai universellement sensible à tous les polluants est abandonné [Cairns Jr., 1986] et les bioessais sont le plus souvent associés pour former des batteries de bioessais. Elles permettent alors de réaliser le screening le plus complet du potentiel toxique de la matrice ou des polluants considérés.

En EDREcotox, le concept le plus utilisé est le suivant : « protéger l'espèce la plus sensible, c'est protéger l'ensemble des espèces et par extension, les écosystèmes cibles ». Sur cette base, la communauté scientifique retient la concentration d'effet la plus sensible de la batterie de bioessais pour réaliser une EDRE. Toutefois, même menés en batterie, les essais mono-spécifiques ne peuvent représenter toutes les caractéristiques d'un écosystème. En effet, seul un faible pourcentage des organismes (moins de 1%) peut être maintenu en laboratoire et satisfaire les conditions expérimentales pré-requises à la réalisation d'un bioessai (par exemple avoir moins de 10% de mortalité dans le lot témoin) [Cairns Jr., 1983]. De plus, ces essais ne sont pas représentatifs des phénomènes de compétition, de prédation, des changements de fonction au sein des communautés, des flux d'énergies ou encore des cycles de nutriments. Malgré leur déficience théorique, les bioessais mono-spécifiques ont prouvé leur remarquable efficacité dans l'estimation des réponses, à de hauts niveaux d'organisation biologique [Cairns Jr., 1983].

Selon Maltby [1999], une question clef demeure : quels organismes doit-on utiliser ? La sélection d'une batterie de bioessais apparaît primordiale pour réaliser une caractérisation des effets pertinente.

De nombreuses batteries de bioessais sont proposées dans la littérature pour différents domaines et matrices d'études :

- Les substances [Radix *et al.*, 2000; Davoren et Fogarty, 2004; Kim *et al.*, 2007] ;
- Les effluents [Naudin *et al.*, 1995; Andrén *et al.*, 1998; Manusadzianas *et al.*, 2003; Ren et Frymier, 2003] ;
- Les sédiments [Davoren *et al.*, 2005] ;
- Les déchets [Clément *et al.*, 1996; Rojícková-Padrtová *et al.*, 1998; Isidori *et al.*, 2003; Pandard *et al.*, 2006] ;
- Les sols, boues et composts [Juvonen *et al.*, 2000; Schaefer, 2004].

Chaque équipe propose sa propre batterie définie sur ses propres critères. Face à cette multitude de batteries de bioessais, l'ADEME a jugé nécessaire de faire le point. Une méthode de sélection des tests biologiques de toxicité et de génotoxicité adaptée à différents scénarii a ainsi été développée à partir de l'étude de 177 publications [ADEME, 2005]. L'article proposé par Charissou *et al.* [2006] décrit cette démarche que nous avons choisie d'exposer dans le paragraphe suivants.

2.3.12 Sélection d'une batterie de bioessais mono-spécifiques

Selon Charissou *et al.* [2006], une batterie de bioessais doit être constituée d'au moins trois espèces différentes ou doit comprendre au moins trois critères d'effets mesurés sur une même espèce. Dans tous les cas, quelle que soit la combinaison d'espèces et/ou de critères d'effets, la batterie doit aboutir à au moins trois réponses biologiquement différentes. Le recensement des batteries rencontrées dans la littérature met en évidence une grande hétérogénéité des associations d'essais. Chacune des équipes propose sa propre batterie, établie suivant ses

propres critères [Charissou *et al.*, 2006]. Plus généralement, deux méthodes apparaissent dans la littérature :

- Une méthode *a priori*. Le choix des essais se base sur des critères prédéfinis ;
- Une méthode *a posteriori*. Le choix des essais est fixé à partir des résultats d'une large série d'échantillons et de bioessais.

D'après Charissou *et al.* [2006], l'élaboration d'une batterie d'essais doit regrouper ces deux approches. La démarche optimale d'élaboration d'une batterie d'essais peut ainsi se concevoir en suivant cinq étapes (Figure 11).

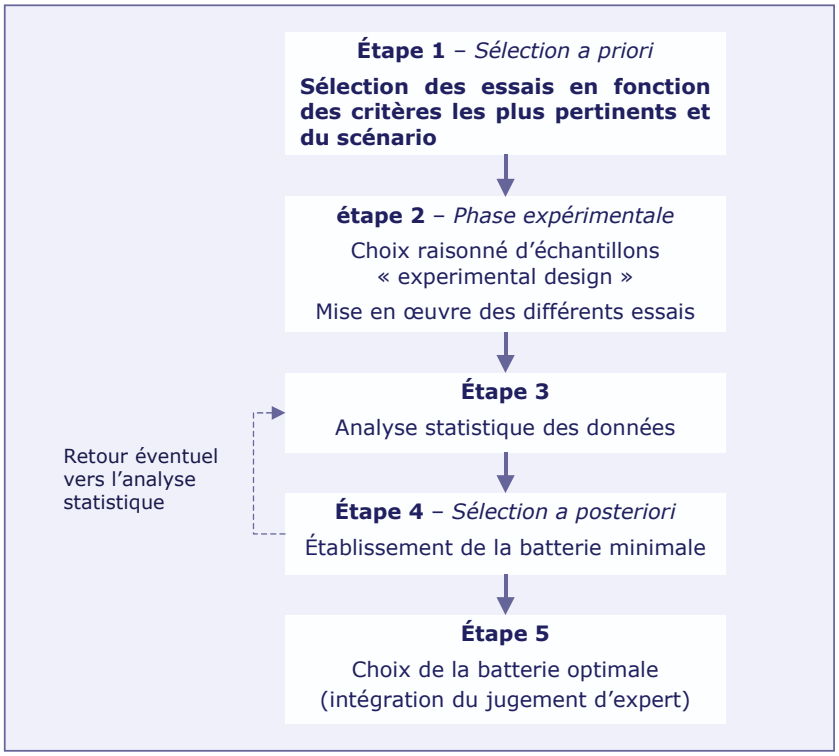


Figure 11 : Démarche optimale d'élaboration d'une batterie d'essais en fonction du scénario choisi d'utilisation des tests [Charissou *et al.*, 2006]

Tout d'abord, la sélection *a priori* des essais doit être guidée par l'objectif d'utilisation des résultats, que l'on appelle également le scénario (Étape 1 -Figure 11). Une certaine hiérarchie de critères de choix (structuration, redondance, possibilité de mise en œuvre, etc.) est à prendre en compte en fonction de cette finalité [ADEME, 2005; Charissou *et al.*, 2006]. Le Tableau 18 montre, d'une part, les différents critères de choix et, d'autre part, la classification de ces critères dans le cadre d'un scénario de caractérisation des sites et sols pollués et de la réalisation d'une EDRE [ADEME, 2005]. Une fois la batterie fixée, elle est mise en œuvre dans la phase expérimentale (Étape 2). À l'issue de cette seconde phase, une analyse statistique des résultats (Étape 3) permet de sélectionner parmi les tests retenus lors de l'Étape 1, ceux qui apparaissent les plus pertinents par rapport au scénario considéré (Étape 4). Il s'agit de la sélection *a*

posteriori. Finalement, le choix de la batterie optimale est réalisé à partir de l'intégration du jugement d'expert (Étape 5).

caractéristiques prépondérantes pour la sélection d'une batterie pour la caractérisation des sites et sols pollués et des EDR écosystèmes		importance de la caractéristique
bon rapport coût/efficacité		primordiale
absence de redondance des informations obtenues		primordiale
capacité de discrimination des matrices analysées		primordiale
structuration de la batterie	prise en compte de différents niveaux trophiques	primordiale
	types de toxicité et/ou critère d'effets	primordiale
	voies d'exposition	importante
critères de sélection des tests composant la batterie	rapidité de réponse	secondaire
	simplicité de mise en œuvre	primordiale
	Reproductibilité	primordiale
	Standardisation	primordiale
	Sensibilité	importante
	pertinence écologique	importante

Tableau 18 : Hiérarchisation des caractéristiques prépondérantes pour la sélection d'une batterie de bioessais en vue de la caractérisation des sites et sols pollués et de la réalisation d'une EDRE [ADEME, 2005]

2.3.13 Les valeurs d'effet

En EDREcotox, on utilise classiquement les CE50 pour les essais d'écotoxicité aiguës et les NOEC (ou parfois les LOEC) pour les essais chroniques [Steger-Hartmann *et al.*, 1999; Halling-Sørensen *et al.*, 2000; ECB, 2003; Ferrari *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2006; Maltby, 2006]. Mais le choix des valeurs d'effet fait régulièrement l'objet de controverses et la communauté scientifique n'est pas parvenue à un consensus sur ce point [Chapman, 2000; Isnard *et al.*, 2001]. Il s'agit de définir, pour les résultats d'une batterie de bioessais, à partir de quel pourcentage d'effet, on considère qu'il y a un effet significatif sur la santé des écosystèmes. On peut toutefois s'interroger sur la définition d'un écosystème en bonne santé. Cette question largement débattue, relève, de problématiques scientifiques mais également éthiques et socio-économiques [Calow, 1992; Xu *et al.*, 1999] qui pourraient sans doute faire l'objet de plusieurs programmes de recherche.

Revenons à l'utilisation des batteries de bioessais. Plusieurs aspects sont à prendre en compte : elles ne sont pas représentatives du milieu naturel et sont majoritairement (mais pas toujours) plus sensibles que celui-ci [Chapman, 2000]. L'utilisation de la NOEC ou de la LOEC est critiquée pour de nombreuses raisons. Principalement car ces valeurs dépendent de la gamme de concentrations et du nombre de réplicats choisis, mais, également, en raison de l'impossibilité d'y associer un intervalle de confiance [Bruijn et Van Leeuwangh, 1996; Chapman *et al.*, 1996; Isnard *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2001].

Les valeurs de CEX ont l'avantage d'être obtenues à partir des résultats expérimentaux, par des méthodes statistiques de régression. Il est reconnu que la CE50 est la valeur la plus fiable d'un

point de vue statistique [Bruijn et Van Leeuwangh, 1996; Isnard *et al.*, 2001]. Toutefois, cette valeur est, d'une part, très éloignée de la NOEC et, d'autre part, d'un point de vue éthique, il semble impensable de protéger uniquement 50% des organismes du milieu aquatique. La CE10 et parfois la CE05 ou la CE20 tendent à être de plus en plus utilisées [Pandard *et al.*, 2000; Van Beelen *et al.*, 2001; Richards et Cole, 2006] mais leur significativité statistique est souvent critiquée (surtout dans le cas de la CE05). Van Beelen et Fleuren-Kemilä [1999] utilisent des CE10 dans le cadre d'une EDREcotox et les considèrent comme « à peu près égales à des NOEC ». L'étude d'un jeu de 27 données d'écotoxicité réalisée par Isnard *et al.* [2001] montre que la CE10 et la CE05 sont les valeurs les plus proches de la NOEC. En contrepartie, ces valeurs dépendent fortement du modèle de régression choisi et les intervalles de confiance associés à ces valeurs sont souvent importants.

Une autre interrogation concerne la légitimité du choix d'un même pourcentage d'effet pour toutes les espèces. Peut-on en effet, considérer que 5% d'inhibition de la croissance d'une algue est équivalent à 5% de mortalité chez un poisson [Bruijn et Van Leeuwangh, 1996] ? Une étude récente, réalisée dans le cadre de la norme ISO/DIS 17616 [2006], répond à cette question en révélant des seuils de significativité biologique modulés (entre 20 et 30% - Tableau 19) selon la nature des bioessais et des critères d'effet mesurés.

catégorie d'essai	niveau trophique	espèce	référence	critère d'effet mesuré	seuils de significativité biologique
aiguë	décomposeur	*V. fischeri*	ISO 11348	luminescence	20% d'inhibition
	consommateur primaire	*D. magna*	ISO 6341	Immobilisation	20% d'inhibition
chronique	producteur	*L. minor*	ISO 20079	croissance	25 % d'inhibition
		P. subcapitata	ISO 8692	croissance	25 % d'inhibition
	consommateur primaire	*C. dubia*	ISO/CD 20665	mortalité et reproduction	mortalité et reproduction : 30 % d'inhibition
		B. calyciflorus	ISO/CD 20666	mortalité et reproduction	mortalité : 30 % d'inhibition reproduction : 25 % d'inhibition
génotoxique	décomposeur	*S. typhimurium*	ISO 13829	induction du gène UMC	augmentation d'un facteur de 2 du taux d'induction
			ISO 16240	induction du taux de colonies mutantes	augmentation d'un facteur de 2 du taux d'induction

Tableau 19 : Seuils de significativité biologique des critères d'effets mesurés lors de certains essais d'écotoxicité aquatiques [ISO/DIS 17616, 2006]

2.3.2 L'approche « bioessai pluri-spécifique »

2.3.21 Introduction : mono-spécifique *vs* pluri-spécifique

Les bioessais mono-spécifiques sont parfaitement adaptés à la caractérisation de l'écotoxicité intrinsèque d'une substance ou d'une matrice complexe, à l'évaluation de la réponse physiologique d'un organisme par rapport à un toxique, à l'étude des interactions de différentes sources de stress, à l'étude des acclimatations physiologiques et des adaptations géniques du

développement de la tolérance ou de la co-tolérance des organismes en réponse à un stress et enfin à l'étude des phénomènes de bioaccumulation [Cairns Jr. *et al.*, 1996]. Leur utilisation pour la caractérisation et la prédiction des effets à un niveau d'organisation biologique supérieur tels que les écosystèmes naturels est cependant contestée [Cairns Jr., 1983; Volatier, 2004]. Selon Taub [1997], même utilisés en batterie, les bioessais mono-spécifiques ne peuvent constituer un outil permettant de prédire les effets d'un toxique sur les écosystèmes naturels. La réponse de ceux-ci n'est pas prédictible à partir des réponses de quelques espèces testées isolément au laboratoire, car le fonctionnement des écosystèmes naturels dépend de processus en œuvre à différents niveaux d'organisation biologique, ceux des individus, des populations, des communautés et de l'écosystème [Cairns Jr. *et al.*, 1992; Clément, 2006]. Pratt *et al.* [1987] affirment qu'ils ne représentent pas à eux seuls un outil valable de prédiction des risques sur l'environnement, même s'ils restent essentiels.

L'une des questions centrales serait donc la suivante : les effets observés à l'échelle de l'individu dans le cadre d'essais mono-spécifiques permettent-ils de prédire les effets sur les populations et les communautés sachant que ces derniers sont évalués sur d'autres critères tels que la composition, la structure et la productivité [Cairns Jr. *et al.*, 1996] ? Le fait d'isoler une espèce supprime les relations existantes entre les espèces d'une part, et entre les espèces et l'environnement naturel d'autre part. Ainsi, les essais menés à des niveaux d'organisation biologique supérieurs font apparaître des propriétés non représentées lorsque l'organisme est considéré isolément [Cairns Jr. et Pratt, 1993]. Il existe enfin des phénomènes de compensation, qui assurent le maintien de la fonctionnalité de l'écosystème naturel, en permettant à des espèces de prendre le relais de celles perturbées [Vasseur, 2000]. Les possibilités d'adaptation des organismes, généralement observées lors d'une exposition fréquente et/ou prolongée, sont également à prendre en compte [Volatier, 2004]. Dans ce cadre, Cairns *et al.* [1996] notent qu'il apparaît complémentaire et nécessaire de travailler à des niveaux d'organisation biologique supérieurs aux bioessais mono-spécifiques.

A l'opposé des tests mono-spécifiques, les études *in situ* permettent d'étudier les impacts en conditions réelles d'une contamination du milieu par une (ou des) substance(s) toxiques(s). Celles-ci posent toutefois d'importants problèmes expérimentaux et sont très coûteuses [Clément, 2006]. Les bioessais pluri-spécifiques (mésocosmes et microcosmes) constituent une échelle de travail intermédiaire. Ils reproduisent des écosystèmes artificiellement clos par la mise en place de composantes abiotiques et de plusieurs espèces représentatives des niveaux trophiques du milieu aquatique simulé [Caquet *et al.*, 1996]. Ils permettent ainsi le contrôle de certains facteurs physico-chimiques (température, photopériodes, pH, oxygénation, etc.). Il faut noter que la distinction entre microcosmes et mésocosmes dépend essentiellement de la dimension des systèmes qui influencerait par ailleurs elle-même sur la qualité du contrôle [Petersen *et al.*, 1999; Caquet *et al.*, 2000]. Contrairement aux bioessais mono-spécifiques, les essais à l'échelle d'une communauté ou d'un écosystème présentent dans tous les cas une plus faible reproductibilité et un coût plus important [Cairns Jr. *et al.*, 1996]. La pertinence des

biodescripteurs et de l'échelle spatio-temporelle retenue influencent la fiabilité des résultats des microcosmes. Ainsi, selon Carpenter [1996], l'utilisation des résultats de microcosmes peut conduire à des erreurs d'appréciations importantes. Calow [1996] note pour sa part que les résultats d'un essai pluri-spécifique ne sont pas forcément plus généralisables que ceux d'essais mono-spécifiques.

2.3.22 Quelques exemples de bioessais pluri-spécifiques

Dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique, peu d'essais en microcosmes et en mésocosmes se font dans des conditions standardisées. Leur conception et leur dimensionnement sont variables d'une équipe de recherche à une autre et se fait au cas par cas, selon les objectifs de l'étude [Crossland et La Point, 1992; Cairns Jr. et Cherry, 1993]. Ils peuvent simuler des écosystèmes lotiques ou lentiques, être de volume variable, avoir des diversités d'organismes plus ou moins importantes, les biodéscripteurs choisis sont eux aussi très variables… . Voici une liste non exhaustive de certains d'entre eux se basant sur les volumes des systèmes :

- Les systèmes 150 millilitres [Parent-Raoult, 2004; Volatier, 2004] ;
- Les systèmes 1 litres [Leffler, 1981] ;
- Les systèmes 2 litres [Clément et Cadier, 1998; Cauzzi, 2007] ;
- Les systèmes 3 litres [Taub, 1989] ;
- Les systèmes 7,5 litres [Pratt *et al.*, 1987] ;
- Les systèmes 100 litres [Triffault-Bouchet, 2004; Clément *et al.*, 2005; Cauzzi, 2007] ;
- Les systèmes 600 litres [Van den Brink *et al.*, 2002] ;
- Les systèmes 180 litres « gravières » [Clément, 2006] ;
- Les canaux artificiels [Kreutzweiser *et al.*, 1995; Brunet, 2000; Parent-Raoult, 2004] ;
- Les rivières artificielles [Belanger *et al.*, 2004; Volatier, 2004; Rier et Stevenson, 2006] ;
- Les systèmes 8 m^3 [Caquet *et al.*, 2001] ;
- Les systèmes 12 m^3 [Caquet *et al.*, 1996] ;

De nombreuses études recensent les différents types de microcosmes, de mésocosmes et autres essais pluri-spécifiques [Crossland et La Point, 1992; Cairns Jr. et Cherry, 1993; Triffault-Bouchet, 2004; Clément, 2006].

2.4 Synthèse des différentes stratégies de caractérisation des effets

Que ce soit du point de vue du réalisme écologique, du coût, de la facilité d'interprétation des résultats, etc., chacune des approches de caractérisation des effets dans le cadre d'EDRE, décrites dans ce chapitre apporte son lot d'avantages et d'inconvénients. Le Tableau 20 vise à synthétiser l'ensemble des caractéristiques, avantages et limites se rapportant à chacune de ces approches.

types d'approches et caractéristiques	**substances** caractérisation des polluants analyse des substances prises individuellement. (Pb, Cd, Zn, …) Les valeurs d'effets utilisées sont issues des bases de données écotoxicologiques généralement obtenues à partir de bioessais sur des gammes de concentrations de la substance considérée.		**bioessais** caractérisation des matrices analyse des matrices (déchet, effluent, sol, boue, …). Les valeurs d'effets utilisées sont issues d'essais écotoxicologiques réalisés sur la matrice non diluée ou sur des gammes de dilutions de la matrice.	
	substances	**substances avec effets combinés** étude préliminaire ou utilisation des résultats existants des effets combinés des principaux polluants	**batterie de bioessais** sélection d'une batterie de bioessais	**bioessai pluri-spécifique** sélection du bioessai plurispécifique
avantages	- Les informations sur les effets sont disponibles pour les substances étudiées - Il est possible de fixer des objectifs de réhabilitation en terme de concentrations des substances dans les milieux		- Les interactions possibles entre les substances présentes dans le milieu d'étude sont prises en compte - Il y a une meilleure prise en compte de la biodisponibilité des polluants	
	- C'est la moins coûteuse et la plus simple des approches	- Les interactions (antagonismes ou synergies) entre les substances sont prises en compte		- La représentation des effets sur les dynamiques des communautés et des écosystèmes (compétition, biomagnification, …) est mieux prise en compte
limites	- La biodisponibilité des substances est peu ou mal appréciée - Un mauvais choix des traceurs peut entraîner une grave erreur d'interprétation des résultats		- La nature des substances présentes est incertaine (identification incertaine des sources) - les informations sur les « effets » ne sont pas disponibles pour les substances étudiées	
	- Les effets combinés ne sont pas pris en compte - C'est l'approche la moins pertinente du point de vu réalisme écologique	- Si l'étude préliminaire des effets combinés montre des effets différents d'additifs, la prise en compte de ces effets ne peut être que qualitative	-Le milieu récepteur cible n'est pris en compte que par des organismes pris individuellement dans des conditions d'essais standard - Il y absence de compétiteurs, prédateurs, parasites	- Les résultats sont difficiles à interpréter

réalisme écologique →

coût →

complexité, variabilité des résultats →

Tableau 20 : Synthèses des avantages et des limites des différentes stratégies d'approches de la caractérisation des effets dans les EDREcotox

3. Les organismes utilisés dans cette étude

La connaissance des caractéristiques principales concernant la biologie et la niche écologique des organismes utilisés au cours des essais réalisés dans cette étude est un préambule indispensable à l'explication des effets écotoxiques. Dans un premier temps, les organismes utilisés dans le cadre des essais mono-spécifiques et donnant lieu à des bioessais normalisés seront présentés par niveaux trophiques. Nous décrirons dans un deuxième temps, les communautés périphytiques utilisées dans le bioessai pluri-spécifique que nous avons retenu.

3.1 Organismes retenus pour les essais mono-spécifiques

3.1.1 Les producteurs primaires

Les producteurs primaires regroupent l'ensemble des végétaux autotrophes (plantes vertes, algues) qui utilisent l'énergie solaire pour la photosynthèse de substances organiques complexes à partir de substances minérales (inorganiques) simples [Ramade, 2002; Fontan *et al.*, 2007]. La composition de ce compartiment biotique dépend d'un grand nombre de facteurs dont les principaux sont les conditions climatiques, les ressources trophiques du milieu, la topographie des fonds et la nature du sédiment [Triffault-Bouchet, 2004].

3.1.11 *Pseudokirchneriella subcapitata*

Pseudokirchneriella subcapitata (anciennement *Selenastrum capricornutum* puis *Raphidocelis subcapitata*) est un organisme dulçaquicole de la famille des *Chlorophyceae*, représentatif des producteurs primaires. C'est une algue verte unicellulaire autotrophe obligatoire. Elle est présente dans une grande diversité de milieux aquatiques mais affectionne généralement les eaux calmes. À condition que la lumière soit en quantité suffisante, cette algue est susceptible de se développer dans la colonne d'eau, des sédiments ou sur des supports divers [Cauzzi, 2007]. On la trouve principalement dans les lacs oligotrophes-mésotrophes d'Amérique du Nord [Garric *et al.*, 1993; Parados, 1996]. De petite taille (en moyenne 5 à 6 µm), cette cellule a un volume moyen de 15-20 μm^3 (qui peut atteindre 60-70 μm^3 en phase stationnaire) qui a une forme très caractéristique de croissant. Elles sont isolées ou groupées en paquets irréguliers ou en colonies informes. N'ayant pas de flagelle, elle ne se déplace pas. Leur cytoplasme renferme principalement de la chlorophylle-*a*, de la chlorophylle-*b* et des pigments

caroténoïdes. La reproduction se fait par zoo-sporulation, il n'y a pas de division végétative dans cette famille. Selon Nygaard *et al.* [1986], la reproduction peut se faire par libération de 2, 4 ou 8 autospores, toutefois la production de 2 autospores est le phénomène le plus fréquent. La croissance des cultures suit une cinétique du premier ordre et les facteurs prépondérant à son développement (et donc à la valeur du taux de croissance) dépendent de la lumière, de la température mais aussi de la présence et de la disponibilité nutriments minéraux (azote et phosphore) et de carbone [Garric *et al.*, 1993].

En tant que producteurs primaires, ces algues permettent l'entrée du carbone inorganique dans le compartiment biotique des écosystèmes aquatiques par le biais de la photosynthèse. De part leur faible taille, leur forme et leur richesse en carbone, elles constituent généralement une partie importante de la nourriture consommée par le zooplancton [Cauzzi, 2007].

P. subcapitata a tout d'abord été cultivée, dans les années 70, pour étudier l'impact des nutriments sur la productivité primaire en relation avec l'eutrophisation des milieux aquatiques. Son utilisation s'est ensuite généralisée aux tests écotoxicologiques principalement en raison de sa facilité de culture et de sa croissance rapide (jusqu'à 3 doublements par jour [Nygaard *et al.*, 1986]). Elle présente donc l'intérêt de pouvoir caractériser rapidement une toxicité chronique à un niveau trophique primordial dans les écosystèmes sur les producteurs primaires qui se trouvent au début de la chaîne alimentaire [Chèvre, 2000; Vesseron, 2000; Emmanuel, 2004a].

3.1.12 *Lemna minor*

Lemna minor est un macrophyte flottant qui appartient à la famille des *Lemnaceae*. Cette lentille d'eau est principalement présente dans les milieux aquatiques de type lentique des zones tempérées de l'hémisphère Nord et est très représentative des cours d'eau français [Jean, 1991]. Elle se présente sous la forme de colonies (libres ou reliées entre elles par un fin pétiole) composées au minimum, de 2 à 4 frondes (ou cladodes) aplaties et lenticulaires de taille réduite (2 à 4 mm). Chacune possède une racine filiforme, transparente et d'un fin diamètre : La taille des racines (de 1 à 10 cm) est fortement liée à la disponibilité en éléments trophiques (azote et phosphore) dans le milieu aquatique [MATE, 1997; Cauzzi, 2007].

Bien qu'une reproduction sexuée soit possible, elle est très rare et ces végétaux se reproduisent la plupart du temps par multiplication végétative sous la forme de bourgeonnements successifs latéraux. Chaque fronde mère peut donner naissance à 10 à 20 frondes et a une durée de vie limitée de 3 à 7 semaines, d'où le caractère parfois envahissant du développement de ces végétaux [Clément, 1994; Cauzzi, 2007].

L. minor a une forte affinité vis-à-vis des milieux aquatiques riches en azote et phosphore, un développement important de ces macrophytes pouvant être le signe de la mise en place d'un état eutrophe.

Ces macrophytes sont une source de nourriture importante pour les oiseaux aquatiques, les gastéropodes, les tortues, les carpes, les gammares, etc. qui participent en retour à la dissémination de cette espèce [MATE, 1997; Triffault-Bouchet, 2004]. Elles fournissent également un abri et un support pour les petits invertébrés aquatiques, les insectes, les algues et les bactéries [Clément, 1994].

L'utilisation des tests vis-à-vis des lentilles d'eau en écotoxicologie est très intéressante du fait de leur sensibilité à de nombreux polluants, de leur culture relativement facile et des possibilités qu'elles offrent de tester des effluents colorés, turbides ou encore chargés en MES [Wang, 1990; Clément, 1994].

3.1.2 Les consommateurs primaires

Les consommateurs regroupent l'ensemble des êtres qui, ne pouvant tirer directement leur énergie de l'inorganique, la tirent d'autres êtres vivants. Les consommateurs primaires produisent de la matière organique mais dépendent totalement pour cela de la matière organique synthétisée par les producteurs primaires dont ils se nourrissent [Fontan *et al.*, 2007]. Ces consommateurs intermédiaires interagissent avec les producteurs primaires dont ils régulent les populations et subissent eux-mêmes la prédation des consommateurs secondaires constituant la macrofaune benthiques et pélagiques [Cauzzi, 2007].

3.1.21 Daphnia magna

Daphnia magna est un microcrustacé zooplanctonique dulçaquicole de la famille des *Daphnideae,* assez largement répandu dans la zone tempérée de l'hémisphère Nord (120 espèces présentes en Europe). Il est susceptible de coloniser une variété importante de types d'eaux douces : mares, mares temporaires, étangs, lacs, canaux de divers gabarits, cours d'eau à très faibles débits et bassins riches en matière organique et peu oxygénés. Bien que *Daphnia magna* soit le plus grand représentant du genre *Daphnia,* sa taille n'excède pas 6 mm. Elle se compose de deux parties : la tête et le corps. Le corps est latéralement comprimé et recouvert d'un exosquelette transparent (renouvelé par mue à l'occasion des 4 ou 5 étapes de croissance et de la ponte). La partie inférieure de l'exosquelette se termine par une épine apicale plus ou moins longue. Le milieu du corps est marqué par le tube digestif qui traverse l'animal de haut en bas se terminant au niveau de la griffe post abdominale. Sur la partie ventrale se situent des appendices formés de minuscules peignes qui permettent de filtrer le phytoplancton essentiel à la nourriture des daphnies. La partie dorsale constitue une chambre de maturation où sont déposés les œufs provenant des ovaires situés de part et d'autre de l'intestin. La tête de l'animal comprend un œil unique (rôle principalement lié à la perception de la photopériode et au phototropisme) ainsi que deux paires d'antennes. La paire la plus grande sert d'organe

locomoteur alors que la deuxième de taille beaucoup plus réduite est associée à la prise de nourriture. Le battement des appendices thoraciques crée un courant d'aspiration qui permet à l'animal de filtrer la colonne d'eau et de retenir les particules alimentaires [Chèvre, 2000; Cauzzi, 2007]. La daphnie nage en permanence pour assurer sa respiration et son alimentation, excepté lorsqu'elle est soumise à un stress [Vesseron, 2000; Santiago *et al.*, 2002].

La maturité sexuelle des individus est atteinte 7-8 jours après éclosion (à 21°C). Les daphnies peuvent se reproduire de manière sexuée ou asexuée. Lorsque les conditions environnementales sont favorables, la reproduction se fait par parthénogenèse (mode de reproduction asexué faisant intervenir des cellules somatiques) ; les individus femelles matures produisent des œufs qui donneront naissance, après éclosion, à des individus strictement identiques à la mère d'un point de vue génétique (clones). En revanche, dès que les conditions environnementales sont défavorables (fluctuation de la température par exemple), les femelles produisent un certain nombre d'individus mâles qui fécondent alors les femelles. Celles-ci produisent des œufs contenant des embryons dormants (ou œufs de résistances) appelés éphippies. Les éphippies peuvent rester en dormance pendant plusieurs mois en attendant le retour de conditions plus favorables qui permettront une reprise du cycle parthénogénétique [Chèvre, 2000; Cauzzi, 2007].

L'utilisation de *D. magna* pour les tests écotoxicologiques présente de nombreux avantages tels qu'un élevage relativement facile, une production de jeunes régulière et assez élevée, une reproduction parthénogénétique assurant une population stable génétiquement. Son immobilisation constitue une réponse d'exploitation facile pour une mesure de toxicité sachant que l'inhibition de la mobilité précède la mort dans la majorité des cas [Vesseron, 2000; Santiago *et al.*, 2002; Emmanuel, 2004a]. De plus, sa distribution planétaire et son rôle dans l'écosystème aquatique (elle constitue une part de l'alimentation des poissons planctophages, mais également celle des alevins et de certains invertébrés aquatiques.) en font un indicateur intéressant de l'impact potentiel d'un polluant sur l'environnement [Chèvre, 2000].

3.1.22 Ceriodaphnia dubia

Ceriodaphnia dubia est également un cladocère dulçaquicole de la famille des *Daphnideae*. C'est un organisme zooplanctonique filtreur. Il est assez rare, on le retrouve dans les zones libres et peu profondes de petits lacs ou d'étangs des zones tempérées de l'hémisphère Nord. *C. dubia* est de taille bien plus réduite que *D. magna* (entre 0,6 et 1,4 mm) et présente une morphologie différente. Sa petite taille lui permet d'utiliser, en plus des microalgues de taille réduite (*C. vulgaris*), des éléments appartenant au microplancton bactérien. Certaines études mettent en avant la possibilité pour *C. dubia* de se développer dans des eaux de lac prélevées et débarrassées de leur phytoplancton [Abrantes et Goncalves, 2003].

La reproduction suit le même schéma que celle de *D. magna* mais est beaucoup plus rapide. Elle est généralement parthénogénétique mais peut être sexuée (apparition d'individus mâles dans les populations) et conduire à la production d'embryons dormants si les conditions environnementales deviennent défavorables [Chèvre, 2000; Cauzzi, 2007]. La production de jeunes est quasi continue, ils sont expulsés de la mère après une période d'incubation de 24 à 36 heures. Les ceriodaphnies constituent une source de nourriture pour les poissons [Garric *et al.*, 1993].

L'utilisation de *C. dubia* pour les tests écotoxicologiques présente les même aspects pratiques que celle de *D. magna*, bien que l'élevage en soit légèrement plus difficile du fait de la sensibilité de l'organisme et de sa très petite taille. L'avantage par rapport à la daphnie est que sa reproduction rapide permet de réaliser un test de reproduction sur 7 jours (alors que dans le cas de la daphnie, le test est classiquement réalisé sur 21 jours).

3.1.23 *Brachionus calyciflorus*

Le rotifère *Brachionus calyciflorus* est un métazoaire pseudocoelomate microscopique très commun dans le plancton des eaux douces. De forme cylindrique et de très petite taille (de l'ordre du millimètre), il vit dans la colonne d'eau à des températures comprises entre 15 et 31°C [Arimoro, 2006]. *B. calyciflorus* possède, dans la région apicale, un appareil rotateur, formé de couronnes circulaires qui servent à la nage et à l'alimentation. Son corps est constitué de trois parties : la tête couronnée par l'appareil rotateur, le corps recouvert d'une cuticule transparente (la lorica) et le pied terminé par deux cirres qui forment une pince. Une glande dont la sécrétion permet la fixation y aboutit. La tête porte une double couronne ciliée dont le mouvement des cils évoque deux roues tournant en sens inverse et donnant le nom de l'embranchement. Leur rôle est locomoteur et capteur des proies [DEGREMONT, 1989; Clément, 1994].

Leur reproduction suit le même schéma que celle de *C. dubia* et de *D. magna* et s'effectue majoritairement par parthénogenèse. Les mâles sont rares et plus petits que les femelles. Ce rotifère présente des capacités importantes de vie ralentie par enkystement pouvant résister à 150°C pendant 35 minutes et à -272°C pendant plusieurs heures.

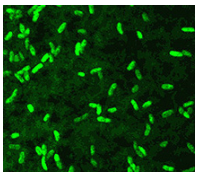
B. calyciflorus tient un rôle important au sein des écosystèmes du fait de la pression de prédation qu'il exerce sur les microalgues et les bactéries et de sa contribution à la production secondaire et à la nourriture des poissons et de quelques prédateurs invertébrés. Les rotifères sont sensibles aux toxiques et aux variations de charges en matière organique des eaux usées et se développent dans les boues activées des STEP.

B. calyciflorus est utilisé en écotoxicologie du fait de sa reproduction rapide, de sa sensibilité et de l'accessibilité commerciale du test sous forme de kits appelés Toxkits [Clément, 1994].

3.1.3 Les décomposeurs

Le compartiment des décomposeurs regroupe l'ensemble des champignons et des micro-organismes des sols ou des biotopes aquatiques qui décomposent et minéralisent la matière organique morte [Ramade, 2002].

3.1.31 Vibrio fischeri



Vibrio fischeri (anciennement *Photobacterium phosphoreum*) est une bactérie luminescente. C'est une espèce ubiquiste des océans, non pathogène pour l'homme et les mammifères. Cet organisme n'est pas représentatif des espèces présentes dans les eaux douces puisqu'il s'agit d'un organisme marin. La communauté scientifique s'accorde cependant sur le fait qu'il s'agit d'un bon modèle pour d'étude de la microflore des stations d'épuration.

La luminescence de cette bactérie est produite au cours d'un enchaînement de processus métaboliques de la glycolyse et de la respiration cellulaire, mettant en jeu l'enzyme luciférase et des coenzymes d'oxydoréduction [Mayfield, 1993]. L'inhibition d'une seule de ces nombreuses enzymes perturbe la luminescence.

L'essai d'écotoxicité aiguë standardisé utilisant *V. fischeri* est rapide à réaliser. Les systèmes de mesure associés ont été commercialisés au début des années 1980 sous le nom de Microtox® et de Lumistox®. L'essai a connu un succès rapide pour le suivi de la toxicité d'effluents de stations d'épuration domestiques et industrielles du fait de sa commercialisation sous forme lyophilisée ne nécessitant pas d'installation d'élevage [Jean, 1991; Santiago *et al.*, 2002].

3.2 Les communautés périphytiques

3.2.1 Définitions et terminologie

Si les définitions du terme « périphyton » varient selon les auteurs et le domaine considéré, il est clairement reconnu que le périphyton est avant tout un biofilm [Volatier, 2004]. Un biofilm est une communauté de micro-organismes (bactéries et/ou champignons et/ou algues et/ou protozoaires), adhérant entre eux et à une surface (le substrat) qui n'est pas nécessairement de type liquide/solide. Les micro-organismes présents dans le biofilm sont enveloppés et protégés par une matrice de polymères extracellulaires [Flemming, 1995; Wimpenny, 1996, 2000].

Le terme « périphyton » désigne quant à lui l'ensemble des organismes aquatiques (tant autotrophes, qu'hétérotrophes) vivant fixé à la surface des substrats immergés qu'ils soient minéraux ou biologiques [Ramade, 2002]. Des définitions plus complètes existent. Ainsi, Wetzel [1983] définit le périphyton comme un assemblage de micro-organismes vivant à la surface de substrats immergés d'origine minérale ou organique, et qui par ailleurs peuvent être vivants ou morts (Figure 12).

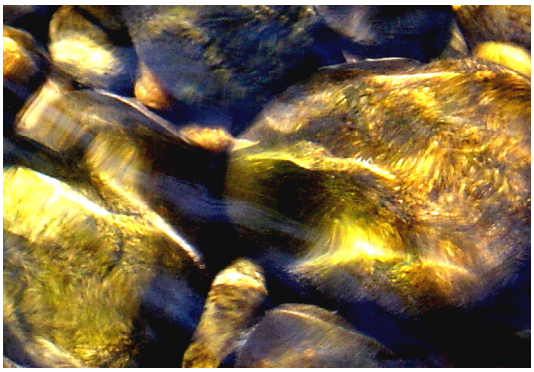


Figure 12 : Détails de galets colonisés par du périphyton

La terminologie des communautés diffère selon le type de substrat colonisé : l'*épilithon* pour les substrats minéraux (roches, galets, etc.), l'*épimétallon* pour les substrats métalliques, l'*épiphyton* pour les végétaux, l'*épixylon* pour les arbres vivants ou morts, et l'*épipelon* et l'*épipsammon* respectivement pour les sédiments limoneux et sableux [Parent-Raoult, 2004].

Notre travail se limite à l'épilithon que nous désignerons par le terme périphyton dans la suite de ce document.

3.2.2 Structure et facteurs d'influence

Principalement composé d'algues et de bactéries, le périphyton contient également des champignons, des protozoaires et des micro-métazoaires et est enchevêtré dans une matrice de

substances polymériques. Il forme donc un assemblage très varié d'organismes procaryotes ou eucaryotes, unicellulaires ou pluricellulaires, autotrophes (phototrophes, chimiotrophes) ou hétérotrophes. Ces organismes appartiennent à des niveaux trophiques différents : les producteurs primaires (organismes autotrophes), les décomposeurs (bactéries hétérotrophes) et les consommateurs (protozoaires brouteurs). Ils entretiennent des relations bénéfiques, telle la consommation des exsudats algaux par les bactéries, mais aussi des relations compétitives susceptibles de conduire à la prédominance de certaines espèces [Volatier, 2004].

Les polymères extracellulaires sont sécrétés par les organismes du biofilm et sont de compositions chimiques très variées (carbohydrates, protéines, acides nucléiques, acides humiques, phospholipides,...). Ils assurent l'intégrité du biofilm, jouant ainsi un rôle essentiel dans la protection des organismes contre les agressions extérieures naturelles ou anthropiques et les facteurs intrinsèques du milieu naturel biotique ou abiotique [Flemming, 1995; Volatier, 2004]. Cette matrice est également le siège d'échanges chimiques au sein du biofilm mais également avec la colonne d'eau.

Le développement du périphyton dépendant d'un ensemble de facteurs physiques, chimiques et biologiques : la lumière, la température, les caractéristiques hydrauliques (notamment la vitesse du courant), la nature du substrat, la physico-chimie de l'eau (notamment les teneurs en nutriments et en MES), et le broutage. Les interactions entre ces différents facteurs influence la biomasse, la composition spécifique, la physiologie et la physionomie des communautés périphytiques [Biggs et Close, 1989; Stevenson *et al.*, 1996; Flynn *et al.*, 2002; Parent-Raoult, 2004; Volatier, 2004; Francoeur et Biggs, 2006].

De part sa structure et les échanges qu'il entretient avec l'extérieur, le périphyton forme un assemblage dynamique dont l'évolution est continue tant au niveau de sa composition, que de sa structure ou de son fonctionnement [Mc Bain *et al.*, 2000].

3.2.3 Intérêt du périphyton comme un bio-indicateur

La structure du périphyton en fait un acteur fondamental dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Il participe à certains cycles biogéochimiques, contribue à la production primaire et ainsi, aux processus auto-épurateurs des cours d'eau. Tout facteur influençant son développement (qu'il soit anthropique ou naturel) peut par conséquent avoir des répercussions sur la dynamique de l'écosystème aquatique [Kostel *et al.*, 1999; Parent-Raoult, 2004; Volatier, 2004]. La nature écologique du périphyton en fait donc un bio-indicateur tout à fait pertinent et certains auteurs l'associent même à un microcosme fonctionnel [Hansson, 1989; Kostel *et al.*, 1999].

L'utilisation du périphyton comme bio-indicateur se justifie également selon Volatier [2004] par la réponse qu'il apporte à un certain nombre des critères énoncés par Cairns *et al.* [1993] pour le choix des marqueurs biologiques :

- Ubiquité : il colonise tous types de milieux aquatiques à toutes saisons ;

- Abondance et simplicité des opérations de collecte et de transport ;
- Mode de vie sédentaire ;
- Taux de reproduction élevé ;
- Sensibilité à des stress biotiques et abiotiques.

3.2.4 Utilisation du périphyton comme un bio-indicateur

3.2.41 Biodescripteurs périphytiques

Deux types d'approches, parfois utilisées en parallèles, coexistent pour évaluer l'impact d'une perturbation d'origine naturelle ou anthropique sur le périphyton [Guckert, 1996; Belanger *et al.*, 2004; Parent-Raoult, 2004; Volatier, 2004]. La première repose sur l'étude des modifications de la structure des populations : mesure de variables représentatives de la biomasse [Bonin et Travers, 1993; Lindstrom, 1996; Ameziane *et al.*, 2002] ou évaluation des modifications de la composition spécifique des communautés (approches par microscopie ou techniques moléculaires) [Havens *et al.*, 1999; Dyer *et al.*, 2003; Hill *et al.*, 2003; Schmitt-Jansen et Altenburger, 2005]. La seconde approche repose sur l'étude de la réponse fonctionnelle des communautés : mesure de diverses activités photosynthétiques ou hétérotrophes [Blanck, 1985; Bonin et Travers, 1993; Pearson et Crossland, 1996; Blanck et Dahl, 1998; Brown et Goulder, 1999; Nystrom *et al.*, 1999; Schmitt-Jansen et Altenburger, 2005]. Le Tableau 21 décrit les biodescripteurs usuellement rencontrés dans la littérature.

descripteurs structurels	biomasse	- biomasse totale (masse sèche) - masse organique (masse sèche sans cendre) - biomasse algale (chlorophylle a et autres pigments ou phéopigments chlorophylliens) - biomasse bactérienne - constituants spécifiques cellulaires : - carbohydrates, lipides, protéines… - éléments biogènes organiques et inorganiques (C, N, P) - autres : ADP, ATP…
	densité	- densité algale (dénombrement) - densité bactérienne (dénombrement)
	biovolume	- biovolume algal - biovolume bactérien
	composition taxonomique	- richesse, abondance et diversité algales (identification des taxons) - richesse, abondance et diversité bactériennes (identification des taxons et / ou des groupes fonctionnels)
	bioconcentration	- teneurs en xénobiotiques (métaux, PCB, etc.)
descripteurs fonctionnels	viabilité des bactéries	- intégrité membranaire
	activités métaboliques autotrophe et hétérotrophes	- production primaire (échanges gazeux, …) - respiration - incorporation de composés organiques (adénine, thymidine, acides aminés,…) ou minéraux (^{14}C,…) - activités enzymatiques intra- ou extra- cellulaires

Tableau 21 : Biodescripeurs périphytiques usuellement rencontrés [Parent-Raoult, 2004]

L'utilisation concomitante de plusieurs de ces descripteurs s'avère nécessaire pour évaluer et comprendre l'impact d'une perturbation sur une communauté périphytique. Un effet sur le fonctionnement n'implique pas nécessairement un effet sur la structure, notamment en cas de récupération ou d'adaptation des organismes. Plus généralement, sauf en cas de mortalité directe, les effets liés au métabolisme sont plus sensibles que ceux liés à des changements de structure. La réalité est cependant plus complexe car un changement de structure peut être observé sans que le métabolisme semble perturbé [Gessner et Chavet, 2002]. Dans ce cas, il s'avère que la (ou les) fonction(s) impactée(s) n'a(ont) pas été mesurée(s), ou bien que la fonction n'est pas propre aux espèces impactées et que d'autres espèces ont pris le relais. Selon Volatier [2004], le choix plus précis des variables biologiques suivies, doit être fonction de la nature des effets recherchés et de la maîtrise des protocoles de mesure.

3.2.42 Les différents types d'essais mis en place sur le périphyton

La littérature rend compte d'un certain nombre d'essais biologiques utilisant le périphyton comme bio-indicateur, mais aucun d'entre eux ne fait aujourd'hui l'objet d'une normalisation. Ces essais sont menés à différentes échelles : du terrain au laboratoire, des bioessais aux microcosmes, des systèmes statiques aux systèmes dynamiques.

Dans tous les cas, les essais « périphyton » nécessitent un certain nombre de choix relatifs à la nature du substrat, de la communauté et du milieu d'essai qui peuvent être d'origine naturelle ou artificielle. Ces paramètres vont naturellement influer sur le réalisme écologique de l'essai et la variabilité des résultats (Figure 13). Un essai réalisé à partir d'un milieu, d'une communauté et d'un substrat naturel engendre une plus grande hétérogénéité des résultats, une meilleure pertinence écologique et une plus grande facilité de mise en œuvre [Lamberti et Resh, 1985; Pashkevich *et al.*, 1996].

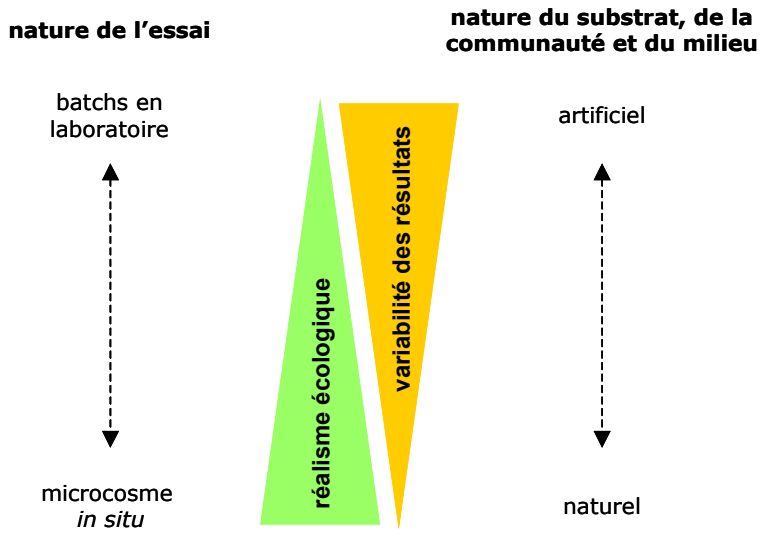


Figure 13 : Paramètres influant sur le réalisme écologique et la variabilité des résultats des essais périphyton

Partie 2.

Matériels et méthodes

L'objet de cette partie est de présenter et de justifier les choix les protocoles expérimentaux mis en œuvre dans ce mémoire de thèse. Elle se base sur la revue bibliographique présentée dans la partie précédente.

Cette partie se découpe en deux chapitres :

- Le premier chapitre est consacré aux protocoles définis pour l'étude des effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers (vis-à-vis de *Daphnia magna*). ces protocoles concernent l'étude des substances utilisées dans les établissements de santé et de leurs effets vis-à-vis de la mobilité du micro-crustacé *Daphnia magna*.

- Le second chapitre concerne les protocoles adoptés pour la caractérisation des effets des effluents d'un hôpital étudié vis-à-vis de différents organismes des écosystèmes aquatiques. Il présente tout d'abord le site étudié et l'échantillonnage, puis décrit les méthodes d'évaluations des effets adoptées : caractérisation physico-chimique et microbiologique, sélection de batteries de bioessais mono-spécifiques (et protocoles d'essais) et enfin, protocole d'essai sur communautés périphytiques.

Chapitre 1.

Effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers (vis-à-vis de *Daphnia magna*)

Ce chapitre vise à décrire les choix et protocoles expérimentaux mis en place à l'occasion de l'étude des effets combinés des substances susceptibles d'être à l'origine de la toxicité des effluents hospitaliers.

Il inclut donc le choix des substances et du bioessai, les protocoles de préparation des mélanges et de réalisation du bioessai, et finalement les méthodes sélectionnées pour le traitement des résultats et pour l'étude de la nature des effets combinés.

1. Substances d'étudiées

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographie, les désinfectants et les surfactants ont été identifiés comme étant les principaux responsables de l'écotoxicité des effluents hospitaliers. L'étude écotoxicologique de mélanges binaires désinfectant/surfactant est donc une première étape dans la compréhension des effets combinés des substances en mélange au sein des effluents hospitaliers.

Trois désinfectants et trois surfactants ont été sélectionnés pour cette étude. Le choix des substances a été réalisé au début de ce travail de thèse et se base sur la revue bibliographique (partie 1). L'étude *a posteriori* des substances utilisées dans le site étudié (hôpital choisi pour la suite de ce travail) est présentée à l'annexe 3. Ce travail permettra de discuter de la validité de la sélection des substances pour l'étude des effets combinés.

Les désinfectants sélectionnés pour cette étude sont le glutaraldéhyde (GA), l'acide peracétique (APA) et l'hypochlorite de sodium (NaOCl). Notons que l'APA est représenté par la formulation anioxyde 1000, car comme nous l'avons vu dans la revue bibliographique, l'acide peracétique n'existe pas à l'état pur. L'anioxyde 1000 est utilisé par les hôpitaux et sa principale substance active est l'acide peracétique.

Les surfactants sélectionnés représentent quant à eux les trois principales classes de surfactants et leurs modes d'action respectives. Il s'agit du dodécylsulfate de sodium (SDS, anionique), du Triton-X 100 (TX, non-ionique) et du bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB, cationique).

Les données commerciales de ces substances sont répertoriées dans le Tableau 22.

	nom et symbole	n°cas	formule	fournisseur	qualité
désinfectants	glutaraldéhyde GA	111-30-8	$C_5H_8O_2$	Prolabo	50% de GA en solution
	hypochlorite de sodium NaOCl	7681-52-9	NaOCl	Prolabo	10% de chlore actif en solution soit 250 g/l de NaOCl
	acide peracétique APA	79-21-0	CH_3COOOH	ANIOS (anioxyde 1000)	1500 ppm d'APA en solution
surfactants	dodécylsulfate de sodium SDS	151-21-3	$C_{12}H_{25}SO_4Na$	Merck	pharmacopée 85%
	Triton-X 100 TX	57-09-0	$C_8H_{17}C_6H_4O(CH_2CH_2O)_{9,5}H$	Merck	pour analyse 98-100%
	bromure d'hexadécyltriméthyl-ammonium CTAB	9002-93-1	$[CH_3(CH_2)_{15}N(CH_3)_3]Br$	Merck	pour analyse 99%

Tableau 22 : Données commerciales des substances étudiées

2. Choix du bioessai

L'étude des effets combinés des substances présentées dans le paragraphe précédent se limite à un bioessai. La sélection du bioessai répond aux critères suivants : sensibilité aux substances, répétabilité, simplicité de mise en œuvre, rapidité, usuel et normalisé.

Le choix s'est donc porté sur l'essai d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus en 24h, en suivant le protocole de la norme NF EN ISO 6341 (T90-301) [1996]. Pour trois raisons principales :

- la daphnie est un organisme très sensible aux agents surfactants [Lal *et al.*, 1983; Lewis et Suprenant, 1983] et aux mélanges de surfactants/désinfectants [Boillot, 2004] ;
- l'essai est normalisé, répétable, simple rapide [Keddy *et al.*, 1995] ;
- il s'agit de l'essai le plus répandu en écotoxicité aquatique [Keddy *et al.*, 1995].

Ce dernier point est des plus important car cela nous permettra de trouver un grand nombre de données d'écotoxicité dans les bases de données internationales. La caractérisation des effets dans le cadre d'une EDREcotox basée sur une approche de type « substances avec effets combinés » en sera ainsi simplifiée.

3. Mise au point des mélanges

Dans un premier temps, la toxicité aiguë des six substances pures, c'est-à-dire des trois désinfectants (GA, NaOCl et APA) et des trois surfactants (SDS, CTAB et TX-100) est expérimentalement testée vis-à-vis de la mobilité de *Daphnia magna* en 24h.

Des essais sont ensuite réalisés sur les neuf mélanges binaires suivants : GA/SDS, GA/CTAB, GA/TX, NaOCl/SDS, NaOCl/CTAB, NaOCl/TX, APA/SDS, APA/CTAB et APA/TX. D'après Yang [1994], la sélection des ratios de substances en mélange est primordiale car deux ratios différents peuvent induire des effets combinés dissemblables. Nous avons donc choisi d'ajuster les pourcentages massiques de désinfectant et de surfactant en mélange de 20 à 80%, de manière à tester cinq ratios par mélange : désinfectant 20% - surfactant 80% ; désinfectant 40% - surfactant 60% ; désinfectant 50% - surfactant 50% ; désinfectant 60% - surfactant 40% et désinfectant 80% - surfactant 20% (Figure 14). Ces pourcentages correspondent à ceux choisis par Otitoloju [2002] dans le cas de l'étude des effets combinés de mélanges binaires de métaux. Notons que pour l'APA, les ratios sont effectués à partir de la solution commerciale d'anioxyde 1000.

Au final, les essais sont donc menés sur six substances pures et quarante-cinq mélanges.

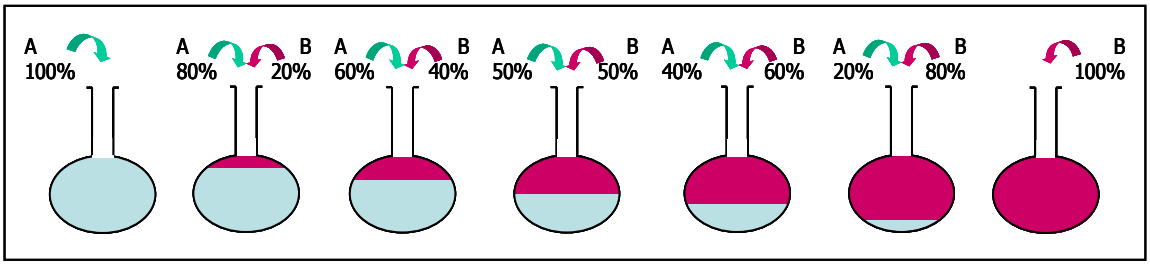


Figure 14 : Schéma des différents ratios de mélanges désinfectant (A) / surfactant (B) testés

Les solutions mères testées (autant pour les essais sur mélanges que sur substances pures) sont préparées sur la base 1,00 g de substance(s) dilué(s) dans 1l d'eau ultra-pure (soit 1,00 g/l) sauf pour celles contenant du CTAB qui du fait de sa faible solubilité, sont préparées à 100 mg/l. La préparation des mélanges se fait par pesée des substances avec une balance de précision de type AE 240 melter.

Des expérimentations préliminaires nous ont permis d'une part de définir les conditions de conservation des mélanges et d'autre part, de vérifier qu'il n'y a pas de diminution significative des concentrations en désinfectants au cours des essais. Les résultats ont permis de déterminer qu'une conservation maximale de quatre jours en flacon plein, fermé et à 4°C permet d'éviter un biais des résultats via la dégradation des solutions. Les dosages avant et après essais ont quant à eux, révélé qu'il n'y a pas de diminution significative des teneurs en désinfectants étudiés au cours des essais (en fin d'essai, il reste entre 80 et 100% de la quantité initiale de désinfectant). Notons que ces dosages n'ont pas pu être effectués sur le GA, dont l'analyse coûteuse ne peut pas être réalisée dans notre laboratoire. Compte-tenu du fait que la tension de vapeur de GA est du même ordre de grandeur que celles de l'APA et du NaOCl (voir partie 1, page 33), nous supposons que les résultats obtenus sont également valables pour le GA.

4. Mise en œuvre du bioessai

Les bioessais d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus en 24h [NF EN ISO 6341 (T90-301), 1996] sont réalisés au LSE à partir de daphnies maintenues en élevage parthénogénétique dans des aquariums de 2L. Les élevages se font à 20°C ± 2°C et sont soumis à un cycle 12h/12h de lumière et d'obscurité. Elles sont régulièrement nourries à partir d'un mélange de deux algues : *Chlorella vulgaris* et *Pseudokirchneriella subcapitata* (elles-mêmes cultivées au laboratoire).

L'essai consiste à déterminer les concentrations initiales (présentes en début d'essai) qui, en 24 et 48 heures, immobilisent entre 0 et 100% des daphnies mises en expérimentation.

Une gamme de 5 à 10 concentrations de la substance (ou du mélange) dans le milieu de référence normalisé est réalisée parallèlement à un témoin sans substance. Cette gamme est définie à partir d'essais préliminaires ou d'estimations de la toxicité par le modèle CA (voir partie 1, chapitre 2). L'essai se déroule en tubes à essais contenant 10 ml de solution, avec quatre répétitions de 5 daphnies âgées de moins de 24h par concentration. L'essai est statique et se déroule à l'obscurité, à une température de 20 ± 2°C (Figure 15).

Figure 15 : Dispositif expérimental de l'essai *Daphnia magna*

À la fin de la période d'essai, les daphnies mobiles sont visuellement dénombrées pour chacune des concentrations testées.

Calcul de l'effet inhibiteur (EI) de chaque dilution :

$$EI = 100 \times \frac{N_0 - N_{it}}{N_0} \qquad \text{(eq. 8)}$$

avec : N_0 : nombre de daphnies mobiles au temps zéro (20) et N_{it} : nombre de daphnies immobilisées en fin d'essai (24h)

Critères de validité de l'essai :

- La teneur en oxygène dissous mesurée dans le lot témoin en fin d'essai est supérieure ou égale à 2 mg/l ;
- Le pourcentage d'immobilisation observé dans les récipients témoins est inférieure ou égale à 10% ;
- La sensibilité de la souche est contrôlée par des essais réguliers avec le bichromate de potassium. Les valeurs de CE50-24h calculées dans le cadre de ces essais sont toujours comprises entre 0,6 et 1,7 mg/l.

5. Traitement des résultats

5.1 Modélisation des courbes concentrations-effets et calcul des CE50

Afin d'aborder la problématique des effets combinés de manière globale, deux niveaux d'effets sont adoptés. D'une part, les courbes concentrations-effets qui permettent d'aborder les effets combinés sur la globalité des valeurs d'effets. D'autre part les CE50, car se sont les valeurs les plus précises et robustes d'un point de vue bio-statistique [Gilbin, 2001].

Pour chaque essai, des courbes de toxicité « concentrations-effets » sont modélisées. Elles permettent notamment de calculer les concentrations induisant 50% (CE50) d'effet sur les populations d'organismes testées par rapport à la situation initiale. La modélisation des données de toxicité obtenues dans cette étude est effectuée à partir du programme Regtox version 6.6.2 (macro pour Microsoft Excel) développé par Vindimian *et al.* [1983]. Cet outil de régression est basé sur un algorithme robuste et rapide de recherche de solutions optimales par itérations successives (régression non linéaire), qui intègre l'équation de Hill [1910]. Il permet d'estimer les paramètres initiaux ainsi que les Concentrations d'Effet (CEX) encadrées d'intervalles de confiance à 95 % (estimés par une méthode « bootstrap » de 500 simulations type « Monte Carlo ») [Barrouillet *et al.*, 2001; Devez, 2004]. Les CEX sont exprimées en mg/l de substance (essais sur les substances pures) ou de mélange (essais sur les mélanges).

5.2 Outils d'analyse et d'interprétation des effets combinés

L'appréciation de la nature des effets combinés sera tout d'abord abordée par la comparaison des CE50 des différents ratios testés pour chacun des mélanges.

Dans un second temps, nous utiliserons les modèles CA et IA. Les courbes concentration-effets des mélanges en ratio 50-50 sont comparées aux courbes modélisées à partir de l'équation de Hill [1910] et des modèles CA et IA. Dans un dernier temps, le modèle des TI sera utilisé. Il vise à calculer la déviation des CE50 des mélanges (pour tous les ratios) au modèle CA. Notons (i) que ces différents modèles sont détaillées dans la revue bibliographique (voir partie 1, chapitre 2. 2.2.23) et, (ii) que la méthode des isobologrammes n'a pas été utilisée car elle se base sur CA et est donc redondante par rapport au modèle des TI.

Notons enfin que les essais NaOCl/surfactants et APA/surfactant ont fait l'objet des stages de master recherche de Ruth Angerville [2005] et de Muriel Panouillères [2006].

Chapitre 2.

Caractérisation des effets d'un effluent hospitalier vis-à-vis de différents organismes aquatiques

Ce chapitre rassemble les informations sur les méthodes utilisées pour évaluer les effets des effluents d'un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France vis-à-vis de différents organismes des écosystèmes aquatiques.

Après un bilan des connaissances actuelles sur l'hôpital étudié, nous présenterons les procédures d'échantillonnage, de transport et de conservation des échantillons.

Nous présenterons ensuite les paramètres et méthodes sélectionnés pour la caractérisation physico-chimique et microbiologique des effluents, indispensable à la caractérisation des effets des effluents par le biais des approches « substances » et « substances avec effets combinés ».

Les deux dernières parties de ce chapitre regroupent la caractérisation des effets des effluents par le biais des approches « batterie de bioessais mono-spécifiques » et « bioessai pluri-spécifique ». Ils détaillent d'une part, la sélection des batteries d'essais mono-spécifiques et la mise en œuvre de ceux-ci et, d'autre part, le protocole expérimental du bioessai pluri-spécifique sélectionné, à savoir le bioessai sur communautés périphytiques naturelles.

1. Présentation du site pilote et échantillonnage

1.1 Localisation et données concernant le site pilote

L'hôpital sélectionné pour cette étude se localise dans une grande ville du Sud-Est de la France. Pour des raisons de confidentialité il sera nommé « hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France » ou « hôpital étudié » dans la suite de ce document.

Cet hôpital a une capacité de 1 073 lits. Il rejette en moyenne 270 000 m^3/an d'effluent dans le réseau d'assainissent urbain de la ville [données internes, 2006], ce qui représente 0,15% des effluents traités par la STEP communale.

L'évolution des activités de l'hôpital au cours d'une journée est la suivante :

- De 6h30-7h à 13h : nettoyage désinfectant des unités techniques (chambres, sols…), activités de soins et fonctionnement des laboratoires (les laboratoires fonctionnent surtout pendant la période 9h-13h) ;
- De 13h à 17h : entretien des blocs opératoires (l'activité des laboratoires est réduite) ;
- De 17h à 19h : fin progressive de toutes les activités ;
- De 19h à 6h30 : période nocturne.

Notons que les services d'urgence et de maternité fonctionnent 24h/24.

Le point de prélèvement se situe au niveau du collecteur principal du site et réceptionne les trois-quarts des effluents liquides de l'hôpital. Il est notamment raccordé aux services suivants : médecine générale, chirurgie, réanimation, maternité, gynécologie, cancérologie, psychiatrie, laboratoires, … (l'annexe 4 détaille l'ensemble des différents services raccordés au point de prélèvement).

1.2 Modalités de prélèvement

Une discussion avec les responsables de l'hôpital concerné a permis de définir les conditions optimales de réalisation de la campagne de prélèvement (période, localisation, durée, modalités de prélèvement des échantillons et mesures des paramètres de terrain) en complément de l'application des bonnes pratiques habituelles pour ce genre d'opération [INERIS, 2002].

Les prélèvements ont été effectué entre le 12 avril 2006, 13h et le 13 avril 2006, 13h, par la société IRH Environnement qui dispose de tous les agréments appropriés à ce type d'opération.

Deux types d'échantillons sont constitués :

- Un échantillon moyen 24h sur la période 13h-13h ;
- Cinq échantillons périodiques correspondants à des fractions horaires de la journée découpées de la façon suivante : 5h-9h; 9h-13h; 13h-17h; 17h-23h et 23h-5h (échantillons moyens sur chacune des périodes).

Les tranches horaires sont choisies sur la base des courbes de fluctuation journalière du débit établies en 2005 par la société IRH sur le même point de prélèvement [Meugnier et Morel, 2005].

Sur le plan technique, l'échantillonnage est effectué avec plusieurs préleveurs automatiques de type EPIC 1011 installés en parallèle (Figure 16). L'échantillon moyen ne correspond ainsi pas à un mélange des échantillons périodiques. Ce type de préleveur est constitué d'une crépine de prélèvement, d'une pompe péristaltique et d'un stockage en mono-flacon. Les crépines sont positionnées en aval de déversoirs afin d'assurer un échantillonnage de qualité (pas de phénomène de décantation et une hauteur d'eau suffisante).

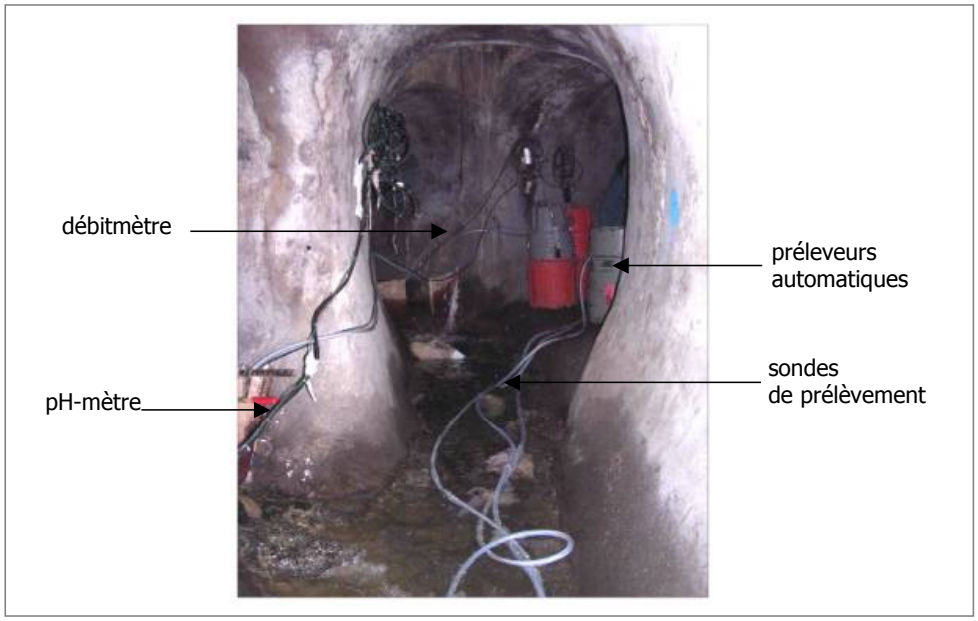


Figure 16 : Dispositif expérimental de prélèvement dans le réseau d'assainissement de l'hôpital

Les préleveurs sont asservis à un pas de temps choisi de manière à constituer des échantillons moyens pondérés au temps sur la période totale de prélèvement de 24h [SOCOTEC ENVIRONNEMENT, 1994; INERIS, 2002]. Classiquement, les prélèvements se font en asservissement du débit. Mais les débits nocturnes de l'hôpital ne permettent pas la constitution d'un volume d'effluent suffisant pour nos analyses (si le prélèvement se fait en asservissement du débit).

1.3 Transport et conservation des échantillons

Immédiatement après le prélèvement, l'échantillon moyen et les échantillons périodiques sont placés en caissons isothermes et transportés vers les différents laboratoires d'analyses retenus. Ceci permet de réaliser rapidement les analyses et de limiter l'évolution des échantillons (ce qui est en particulier très important pour la réalisation des bioessais). Le type de flaconnage utilisé (verre, polyéthylène, espace de tête) et certains types de traitement direct des échantillons (ex : acidification) sont choisis avec les laboratoires d'analyses (et détaillées dans les paragraphes suivants). Une fois au laboratoire les échantillons sont conservés à 4°C. Les expérimentations ne peuvent pas toutes être réalisées en parallèle. Il a donc été nécessaire de choisir un mode de conservation alternatif, la congélation, pour les essais périphyton (voir paragraphe 4, page 112) qui nécessitent la mise en place deux campagnes d'essai, en été et en hiver.

Pour Kosmala [1998], il n'existe pas de recommandation de conservation absolue (modes et durée de conservation). Cependant, compte-tenu de l'évolution des effluents conservés à 4°C [Woodiwiss et Fretwell, 1974; Naudin *et al.*, 1995], il est recommandé de congeler les échantillons pour mener des bioessais qui ne peuvent être mis en œuvre dans les 48h suivant l'échantillonnage [Naudin *et al.*, 1995]. Santiago *et al.* [2002] conseillent par ailleurs, de vérifier l'incidence de la congélation sur les propriétés écotoxicologiques des échantillons en procédant à un essai sur échantillon "frais" et sur échantillon décongelé. On sait en effet, que les cycles congélation/décongélation modifient la structure des particules en suspension et les équilibres physico-chimiques d'un effluent [Jean, 1991; Plagellat, 2004] et que ces modifications dépendent de la nature des échantillons et de l'activité biologique possible des échantillons [ISO 5667-10, 1992].

La congélation à -20°C est donc choisie comme mode de conservation des échantillons d'effluent pour la mise en œuvre des essais périphyton. Afin de limiter les réactions physico-chimiques intervenant pendant la période de décongélation, une décongélation lente des échantillons a été privilégiée. Les échantillons sont placés pendant environ 2jours à 4°C, puis pendant 12h dans le bain thermostaté d'essai pour une « mise à température ».

Notons que la mesure du pH et de la conductivité ainsi que le bioessai d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* en 24h sont réalisés sur échantillons frais et décongelés afin d'avoir une idée de l'incidence de la congélation sur les propriétés physico-chimiques de l'échantillon.

2. Caractérisation détaillée des échantillons (physico-chimie et microbiologie)

2.1 Mesures de terrain

Afin de suivre l'évolution continue du débit, de la température et du pH au cours du prélèvement, des mesures sont effectuées directement sur le terrain.

Les pas de temps de mesures suivants sont choisis : quatre minutes pour le débit et une minute pour le pH et la température.

2.2 Analyses physico-chimiques

Le choix des batteries d'analyses physico-chimiques est effectué sur la base de la revue bibliographique détaillée de la caractérisation physico-chimique des effluents hospitaliers et des produits utilisés dans les hôpitaux et susceptibles d'avoir un rôle important dans l'écotoxicité des effluents (voir partie 1, chapitre1). Notons que les moyens humains et financiers ont également limité nos choix.

Une batterie complète d'analyses est réalisée sur l'échantillon moyen (Tableau 23, Tableau 24 et Tableau 25), tandis qu'une batterie simplifiée d'analyses est retenue pour la caractérisation des échantillons périodiques (Tableau 23).

La batterie simplifiée d'analyses est confiées aux laboratoires Wessling (Tableau 23). La batterie complète d'analyses se partage entres les laboratoires Wessling (Tableau 23), le LGCIE (Laboratoire de Génie Civil et d'Ingénierie Environnementale) de l'INSA de Lyon pour les analyses de métaux (Tableau 24) et le CEMAGREF de Lyon pour les analyses de bêtabloquants (Tableau 25).

Le tableau ci-dessous présente les normes, les limites de quantification (LQ), le mode de traitement des échantillons, les méthodes d'analyses et le type de flaconnage des analyses physico-chimiques effectuées par les laboratoires Wessling sur les échantillons périodiques et le moyen-24h.

paramètre	norme	LQ	traitement de l'échantillon (filtré/ brut)	principe de l'analyse	flaconnage
pH	NFT90-008	-	brut	potentiométrie	PE
conductivité	EN 27888	10 µS/cm	brut	conductmétrie	PE
DBO5	EN 1899-1	3 mg/l	brut	dilution et ensemencement avec apport d'allylthio-urée	PE
DCO	DIN 38409 eq. NFT90-101	15 mg/l	brut	oxydation chimique des matières réductrices par excès de dichromate de potassium et dosage de l'excès par du sel de Mohr	PE
COT	EN 1484	0,5 µg/l	brut	oxydation des composés organiques (thermique en milieu acide) et dosage du CO_2 formé par spectrométrie infrarouge	ET
MES	NF EN 872	0,1 mg/l	brut	Filtration sur filtre en fibre de verre et déshydratation du filtre à 105°C	verre
AOX	EN 1485	10 µg/l	brut	Adsorption, combustion et coulométrie	verre et HNO_3
ammonium (NH_4^+)	NF EN ISO 11732	0,04 mg/l	brut	Analyse en flux par CFA (flux continue) et détection spectrométrique	PE
chlorures	NF EN ISO 10 304-1	1 mg/l	filtration 0,45µm après dilution dans l'eluant	Chromatographie ionique phase liquide	PE
chlore libre	aquaquant®	0,1 à 0,3 mg/l	brut	spectrophotométrie	verre
détergents non ioniques	NF EN 903	0,01 mg/l	brut	dosage par spectrophotométrie substances actives vis-à-vis du bismuth	verre
glutaraldéhyde et acétaldéhyde	-	0,01mg/l	filtration	dosage par GC/MS après d'une solution tampon avec du Pentafluorobenzylhydroxylamine dérivation avec du n-hexane	verre
chlore total	microquant®	1 mg/l	brut	spectrophotométrie	verre
azote kjeldahl*	EN 25663	3 mg/l	brut	minéralisation au sélénium, distillation et titrimétrie	PE
orthophosphate (PO_4) *	NF EN 1189	0,01 mg/l	filtration 0,45µm	Colorimétrie flux ondulé	verre
COHV*	NF EN ISO 10301-3	0,5 µg/l	brut	chromatographie en phase gazeuse	ET
détergents anioniques*	NF EN 903	0,1 mg/l	brut	Spectrophotométrie ubstances actives vis-à-vis du bleu de méthylène	verre
détergents cationiques*	-	0,02 mg/l	brut	méthodes colorimétriques	verre
formaldéhyde*	-	0,01mg/l	brut	photométrie	verre
indice phénols*	DIN 38409 H16-1	0,01mg/l	brut	photométrie	verre
acétates, acétone et alcools*	d'ap. EN ISO 10301	-	brut	chromatographie en phase gazeuse	ET

Tableau 23 : Normes, limites de quantification (LQ), traitement de l'échantillon, principe et flaconnage des analyses physico-chimiques effectuées par les laboratoires wessling sur les échantillons périodiques et le moyen -24h
[* : analyses effectuées uniquement sur l'échantillon moyen, ET : espace de tête, PE : polyéthylène]

Analyse des métaux et de l'arsenic

L'analyse est réalisée après acidification préalable de l'échantillon moyen à l'HNO_3, (ce qui permet d'avoir la fraction totale acido soluble) puis filtration à 0,45 µm. Les analyses sont effectuées par ICP-AES (spectrométrie d'émission atomique) et suivent la norme NF EN ISO 11885. Les différentes analyses et limites de quantification associées sont présentées dans le Tableau 24.

Métaux	Ag	As	Cd	Cr*	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
LQ (mg/l)	0,002	0,001	0,005	0,008	0,001	0,002	0,002	0,003	0,001

Tableau 24 : Limites de quantification (LQ) des analyses de métaux et de l'arsenic effectuées par le laboratoire LGCIE sur l'échantillon moyen-24h

Analyse des résidus médicamenteux

Un certain nombre d'investigations ont été entreprises dans le but de réaliser des analyses de résidus médicamenteux. Peu de laboratoires sont aujourd'hui en mesure d'effectuer ces analyses, d'autant plus que nos échantillons sont des effluents et non des eaux de surface ou souterraine. Nous nous sommes également heurté à des refus liés à la dangerosité des effluents hospitaliers. Quelques analyses ont cependant pu être effectuées et concernent le dosage de bêtabloquants dans l'échantillon moyen 24h. Nous avons également entrepris de faire une estimation de la concentration de cyclophosphamide (anticancéreux) sur la base des chiffres de consommation de l'hôpital étudié en 2006**.**

L'analyse des bêtabloquants est réalisée par le CEMAGREF de Lyon sur l'échantillon moyen filtré sur un filtre en fibre de verre de diamètre de pore 0,7 µm, puis acidifié. L'extraction des bêtabloquants se fait sur cartouche SPE échangeuse de cation (MCX, Maters). Les bêtabloquants sont ensuite analysées par chromatographie liquide haute pression couplée à une spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS).

Les différents bêtabloquants analysés et les limites de quantifications associées aux analyses sont présentées dans le Tableau 25.

bêtabloquant	Limite de quantification (ng/l)
acébutolol, métoprolol, propranolol, bisoprolol, timolol, nadolol et bétaxolol	5
oxprénolol, aténolol et sotalol	1

Tableau 25 : Limites de quantification des analyses de bêtabloquants effectuées par le CEMAGREF de Lyon sur l'échantillon moyen-24h

2.3 Analyses microbiologiques

Le choix des paramètres microbiologiques analysés est le suivant (Tableau 26) :

- Des indicateurs bactériologiques classiques : coliformes totaux, coliformes thermotolérants, entérocoques et staphylocoques, pour la caractérisation des échantillons périodiques et de l'échantillon moyen 24h. ;
- Des indicateurs spécifiques : *Staphylococcus aureus*, *Shigella sp.* et *Salmonella sp*., pour compléter la caractérisation de l'échantillon moyen.

Les staphylocoques sont des bactéries opportunistes responsables d'infections nosocomiales. Les *Shigella* sont des bactéries intestinales entéropathogènes à l'origine de dysenterie bacillaire. Elles sont éliminées par les selles et dispersées dans le milieu extérieur (sol, eau) où, en général, elles ne survivent pas longtemps. Le genre *Salmonella* appartient quant à lui à la famille des *Enterobacteriaceae*. Ce sont des bactéries du tube digestif qui sont éliminées et dispersées par les selles. Elles sont responsables de deux grandes catégories d'infections : les toxi-infections alimentaires (sérotypes rencontrés chez l'homme et les animaux) et les fièvres typhoïdes et para typhiques (sérotypes exclusivement humains).

Pour ces analyses, les échantillons sont conservés dans des flacons en verre.

paramètre	norme	traitement de l'échantillon	principe de l'analyse
coliformes thermotolérants**	EN ISO 9308-1	filtration 0,45 µm	filtration sur membrane suivie d'une mise en culture dans une gélose de différentiation et d'un calcul du nombre d'organismes
coliformes**	EN ISO 9308-1	filtration 0,45 µm	filtration sur membrane suivie d'une mise en culture dans une gélose de différentiation et d'un calcul du nombre d'organismes
entérocoques**	EN ISO 7899-1	filtration 0,45 µm	méthode miniaturisée (nombre le plus probable) filtration sur membrane suivie d'un ensemencement en milieu liquide
staphylocoques**	NF T 90420	filtration 0,45 µm	filtration sur membrane suivie d'un ensemencement en milieu liquide
salmonelles*	ISO 6579	filtration 0,45 µm	filtration, pré-enrichissement, enrichissement, isolement, identification
*Shigella**	PAL-F28		méthode interne
*Staphylococcus aureus**	ISO 6888		méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive

Tableau 26 : Normes des analyses microbiologiques réalisées par Wessling sur les échantillons périodiques et moyens [analyses effectuées : ** sur tous les échantillons (moyen et périodiques) ; * uniquement sur l'échantillon moyen]

3. Batteries de bioessais mono-spécifiques

3.1 Sélection des batteries de bioessais

Pour cette étude, nous avons choisi de sélectionner deux batteries de bioessais. Chacune d'elle a un objectif particulier portant sur un scénario différent. La première batterie (batterie simplifiée) vise à comparer les niveaux de toxicité de cinq échantillons d'effluents, représentant cinq périodes d'une journée d'activité de l'hôpital. La deuxième (batterie complète) a pour objectif une caractérisation approfondie de l'écotoxicité de l'effluent moyen d'une journée d'activité. Nous avons choisi de nous appuyer sur la démarche présentée par Charrissou *et al.* [2006], pour sélectionner ces deux batteries d'essais (voir partie 1, chapitre 2, page 70).

3.1.1 Sélection de la batterie de bioessais simplifiée

Selon Charissou *et al.* [2006], si l'objectif affiché d'une batterie de bioessais correspond à une hiérarchisation d'échantillons (soit l'objectif de la batterie simplifiée), des critères tels que la capacité discriminante des matrices analysées, la reproductibilité et la standardisation des essais apparaissent comme prépondérants. Sur cette base, nous avons choisi de sélectionner les trois bioessais normalisés les plus fréquemment mis en oeuvre pour le compartiment aquatique : le test d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*, le test d'inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri*, ainsi que le test d'inhibition de la croissance de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*. La littérature renforce ce choix en évoquant que se sont les trois essais minimaux et prédominants dans une batterie pour évaluer les impacts sur les écosystèmes aquatiques [Santiago *et al.*, 2002; ADEME, 2005]. Ces essais sont de plus rapides et simples à mettre en œuvre [Santiago *et al.*, 2002; Charissou *et al.*, 2006].

- L'essai d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* est traditionnellement l'essai le plus utilisé pour évaluer l'écotoxicité aquatique. L'essai est rapide, simple, peu coûteux, reproductible, standardisé, sensible et a une bonne pertinence écologique [Keddy *et al.*, 1995]. Cet essai de toxicité aiguë mesure l'inhibition de la mobilité qui apparaît lorsque ces organismes sont soumis à un stress.
- L'essai aigu d'inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri* (dit "essai Microtox®") a un haut pouvoir discriminant. L'inhibition de la luminescence de cette bactérie apparaît lorsque les organismes sont soumis à un stress.
- L'essai d'inhibition de la croissance de la population de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata* est souvent plus sensible que les autres essais. L'essai a l'intérêt de pouvoir caractériser rapidement une toxicité chronique à un niveau trophique primordial [Keddy *et al.*, 1995].

Les caractéristiques (organismes, niveaux trophiques, critères d'effets, durée d'exposition et normes) de ces trois essais sont répertoriés dans le Tableau 27.

3.1.2 Sélection de la batterie de bioessais complète

Le scénario attaché à la deuxième batterie de bioessais (batterie complète) a pour objectif la caractérisation approfondie de l'écotoxicité de l'effluent.

Une batterie de bioessais détaillée permet de diminuer les facteurs de sécurité classiquement appliqués pour la caractérisation des risques écotoxicologiques [ECB, 2003]. Pour Charrissou *et al.* [2006], il convient préférentiellement que les essais choisis soient complémentaires et non redondants. Toutefois, lorsque l'objectif concerne une évaluation des impacts environnementaux sur site, la priorité réside plus dans le fait de générer un grand nombre de données permettant d'établir des conclusions pertinentes, que dans le fait de ne pas disposer de résultats partiellement redondants [Charissou *et al.*, 2006].

Sur ces bases, la batterie complète sélectionnée intègre les trois essais constituant la batterie simplifiée, complétés par les essais suivants :

- L'essai d'inhibition de la croissance de la population et de la reproduction de *Ceriodaphnia dubia* permet d'ajouter deux critères d'effets fondamentaux n'apparaissant pas dans la batterie initiale, il est très discriminant et très sensible [ADEME, 2005].
- L'essai d'inhibition de la mobilité de *Ceriodaphnia dubia* permet de faire le lien entre les essais aigus et chroniques, lorsqu'il est couplé à l'essai d'inhibition de la reproduction du même organisme.
- L'essai d'inhibition de la reproduction de *Brachionus calyciflorus* complète la batterie. Cet organisme, très commun des eaux douces, contribue à la production secondaire et à la nourriture des poissons et de quelques prédateurs invertébrés. Cet essai chronique est simple, rapide, sensible, a une bonne pertinence écologique et ajoute une catégorie d'organisme à la batterie.
- L'essai d'inhibition de la croissance de la population de *Lemna minor* complète l'essai de croissance de l'algue unicellulaire. Cet organisme végétal est tout à fait adapté à l'évaluation de la toxicité d'un effluent car le test ne nécessite aucun traitement de l'effluent (filtration, aération,...) et permet ainsi d'accéder au potentiel écotoxique réel de l'effluent [Wang, 1990]. Le paramètre classique d'évaluation de la croissance repose sur le nombre de fronde observé. Nous avons choisi d'y ajouter un second paramètre se basant sur la surface restant verte en fin d'essai. Ce second point intègre les informations suivantes : surfaces des frondes des lentilles d'eau, surfaces des chloroses et des nécroses engendrées par le contact des lentilles avec l'effluent et complète donc le premier.

Le Tableau 27 présente la batterie complète de bioessais sélectionnés. Elle intègre six organismes, trois niveaux trophiques différents, deux types d'exposition (aiguë/chronique) ainsi que quatre critères d'effets différents.

	organisme	niveau trophique	type d'exposition	critère d'effet et durée d'exposition		norme
Batterie simplifiée	*Daphnia magna* (invertébré)	CP	aiguë	inhibition de la mobilité 24 et 48h		NF EN ISO 6341 (T90-301)
Batterie simplifiée	*Vibrio fischeri* (Microtox®) (bactérie)	D	aiguë	inhibition de la luminescence 15 et 30 min		ISO 11348-3
Batterie simplifiée	*Pseudokirchneriella subcapitata* (algue)	PP	chronique	inhibition de la croissance de la population - 72h		NF EN ISO 8662 (T90-304)
Batterie complète	*Ceriodaphnia dubia* (invertébré)	CP	aiguë	inhibition de la mobilité 24 et 48h		d'après NF EN ISO 6341 et ISO 20665
Batterie complète	*Ceriodaphnia dubia*	CP	chronique	inhibition de la croissance de la population et de la reproduction - 7j		PR NF ISO 20665
Batterie complète	*Brachionus calyciflorus* (rotifère)	CP	chronique	inhibition de la reproduction 48h		PR NF ISO 20666
Batterie complète	*Lemna minor* (lentille d'eau - végétal supérieur)	PP	chronique	inhibition de la croissance de la population - 7j	en « nombre de fronde »	ISO 20079
					en « surface verte »	d'après ISO 20079

Tableau 27 : Caractéristiques des essais attachés aux batteries simplifié et complète sélectionnées pour l'étude [CP : consommateur primaire ; D : décomposeur ; PP : producteur primaire]

3.2 Mise en œuvre des bioessais

3.2.1 Préparation des échantillons

Il est à noter que la majorité des essais requièrent l'utilisation d'échantillons filtrés à 0,45 µm. Ceci provient notamment du fait que les organismes concernés sont "physiquement" sensibles aux particules ou que la présence de particules ne permet pas de mettre en œuvre certains essais [Jauzein *et al.*, 1999].

Nous avons donc fait le choix de réaliser les essais sur les échantillons filtrés afin d'avoir des résultats comparables. Néanmoins, les essais ne nécessitant pas de filtration (*Daphnia magna* et *Lemna minor*) ont été effectués simultanément sur les échantillons filtrés et non filtrés, dans le but d'étudier l'influence des matières en suspensions (MES) sur l'écotoxicité des effluents.

La totalité des bioessais de cette partie de la thèse a été réalisée au laboratoire d'écotoxicité de Polden avec la collaboration de Christine Bazin.

3.2.2 Inhibition de la mobilité de *D. magna*

Cet essai est réalisé d'après la norme NF EN ISO 6341. le protocole détaillée a précédemment été présenté (voir partie 2, chapitre 1, page 91).

3.2.3 Inhibition de la luminescence de *V. fischeri*

Cet essai est réalisé d'après la norme ISO 11348-3 [1998]. Il consiste à évaluer l'inhibition de la luminescence produite par des suspensions de *Vibrio fischeri* (par rapport à un témoin) au contact d'une gamme de dilutions d'effluent après 15 et 30 minutes d'incubation.

L'essai est réalisé avec des organismes lyophilisés du commerce. Le milieu de dilution est de l'eau distillée salée à 20 g /l de NaCl.

Une gamme de 8 dilutions de l'effluent est réalisée dans des tubes à essais, parallèlement à deux témoins sans effluent. La salinité des effluents est ajustée à environ 20 g/l par ajout de NaCl. L'essai se déroule dans l'analyseur microtox (luminomètre thermostaté microtox M500, Microbics) à 15 ± 1°C (Figure 17). L'intensité lumineuse est mesurée en début et après 15 et 30 minutes d'incubation.

Figure 17 : Dispositif expérimental de l'essai microtox

Calcul de l'effet inhibiteur de chaque dilution

On calcule tout d'abord F_{kt} le facteur de correction traduisant l'évolution de la luminescence (mesurée en unités relatives) dans les suspensions bactériennes témoins :

$$F_{kt} = I_{kt} \times I_{t0} \qquad \text{(eq. 9)}$$

avec : I_{kt} : luminescence des témoins au temps t (15 ou 30 min) et I_{t0} : luminescence des témoins au temps zéro

Pour chaque dilution de l'échantillon, on calcule les I_{ct} (valeur corrigée de I_0 pour les cuves de mesure, immédiatement avant l'ajout de l'échantillon pour essai) à l'aide de l'équation suivante :

$$I_{ct} = I_0 \times \overline{F}_{kt} \qquad \text{(eq. 10)}$$

avec : $\overline{F}_{kt}$: moyenne des F_{kt} obtenus pour les témoins et I_0 : luminescence des suspensions au temps zéro

On calcule ensuite l'effet inhibiteur (H_t) de chaque dilution :

$$H_t = 100 \times \frac{I_{ct} - I_{Tt}}{I_{ct}} \qquad \text{(eq. 11)}$$

avec : I_{ct} : valeur corrigée de I_0 pour les cuves de mesure, immédiatement avant l'ajout de l'échantillon pour essai et I_{Tt} : luminescence de l'échantillon après un temps de contact donné

Critères de validité de l'essai :

- La valeur de F_{kt} pour un temps d'incubation de 30 minutes est comprise entre 0,6 et 1,8 ;
- L'écart observé entre les déterminations effectuées en double ne dépasse pas 3% de leur moyenne
- 18,7 mg/l de Cr^{6+} (sous forme de dichromate de potassium) provoque une inhibition des souches commerciales comprise entre 20 et 80% après un temps de contact de 30 minutes.

3.2.4 Inhibition de la croissance de la population de *P. subcapitata*

Cet essai chronique est réalisé d'après la norme NF EN ISO 8662 (T90-304) [2005]. Il consiste à évaluer l'inhibition de la croissance d'une population d'algues vertes unicellulaires *Pseudokirchneriella subcapitata* au contact d'une gamme de dilutions d'effluent.

L'essai est réalisé avec un inoculum d'algues *P. subcapitata* issu des cultures du laboratoire alors qu'elles sont en phase exponentielle de croissance. Les concentrations cellulaires initiales ne doivent pas excéder 10^4 cellules/ml. Le milieu de dilution est le milieu normalisé. Si nécessaire, un essai préliminaire est réalisé en 72 heures.

Pour l'essai définitif, une gamme de 5 dilutions de l'échantillon est réalisée parallèlement à un témoin sans effluent. L'essai se déroule en flacons contenant chacun 25 ml de solution d'essai, avec trois répétitions par dilution (et six répétitions pour le témoin). L'essai est statique, sous agitation magnétique et sous éclairage constant, à 23 ± 2°C. Un bain thermostaté (AlgenTest XT, ABIMED) équipée d'un agitateur magnétique multiposte et éclairé par des néons fournissant une intensité lumineuse de 8 000 lux (Figure 18).

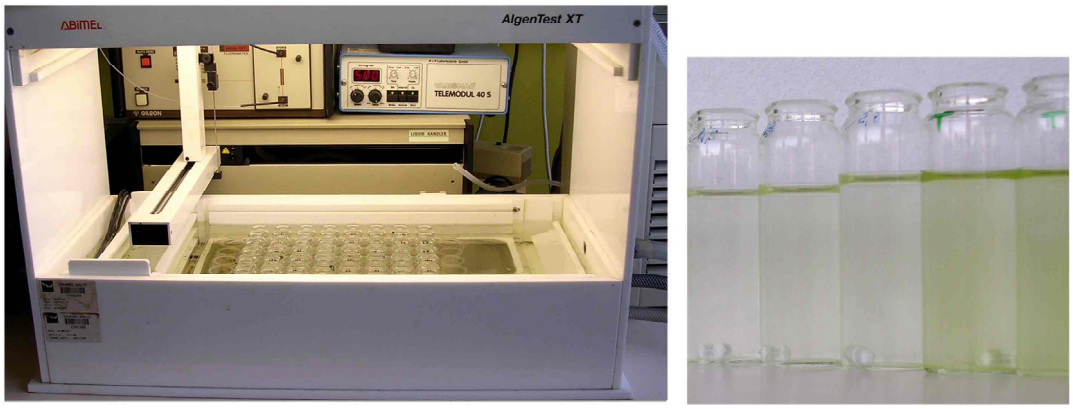


Figure 18 : Dispositif expérimental de l'essai *Pseudokirchneriella subcapitata*
[bain thermostaté AlgenTest XT et flacon en fin d'essai]

Les mesures de concentration algale sont réalisées en fin d'essai par comptage au microscope optique avec une cellule de Malassez.

Calcul de l'effet inhibiteur de chaque dilution

On calcule tout d'abord les taux de croissance spécifiques moyens, μ pour chaque culture d'essai :

$$\mu = \frac{\ln N_L - \ln N_0}{t} \qquad \text{(eq. 12)}$$

avec : t : durée de l'essai (72h) : N_0 : concentration cellulaire nominale initiale et N_L : concentration cellulaire mesurée en fin d'essai

Pour chaque dilution de l'échantillon, on calcule le pourcentage d'inhibition du taux de croissance ($I\mu i$) par rapport au taux de croissance moyen des lots témoins ($\overline{\mu t}$) :

$$I\mu i = 100 \times \frac{\overline{\mu t} - \mu i}{\overline{\mu t}} \qquad \text{(eq. 13)}$$

avec : $I\mu i$: pourcentage d'inhibition (taux de croissance) pour la concentration d'essai i ; $\overline{\mu t}$: taux de croissance moyen des lots témoins et μi : taux de croissance de la concentration d'essai i

Critères de validité de l'essai :

- La concentration cellulaire moyenne des lots témoin est multipliée par un facteur supérieur à 67 en 72 heures ;
- Le coefficient de variation des solutions témoins ne dépasse pas 5 % ;
- Le pH des solutions témoins n'a pas augmenté de plus de 1,5 unité pendant l'essai par rapport au pH du milieu de croissance ;
- La sensibilité de la souche du laboratoire est contrôlée par des essais réguliers avec le bichromate de potassium.

3.2.5 Inhibition de la croissance de la population et de la reproduction de *C. dubia*

Cet essai chronique est réalisé d'après la norme PR NF ISO 20665 [2007]. Il consiste à évaluer deux critères d'effet en 7 jours : (i) l'effet inhibiteur d'un effluent sur la croissance d'une population de crustacés (par rapport au nombre de mères initiales) et (ii) l'effet inhibiteur d'un effluent sur la reproduction d'une population de crustacés (par rapport au nombre de mères survivantes en fin d'essai).

L'essai est réalisé avec des organismes issus de l'élevage du laboratoire, âgés de moins de 24 heures au début de l'essai, et provenant de portées de huit jeunes au minimum (Figure 19). Le milieu de dilution est le milieu M4 de Elendt. Si nécessaire, un essai préliminaire est réalisé en 72 heures.

Pour l'essai définitif, une gamme de 5 dilutions de l'effluent est réalisée parallèlement à un témoin sans effluent. L'essai se déroule en flacons contenant chacun 50 ml de solution d'essai et une Cériodaphnie, avec dix répétitions par dilution. L'essai est semi-statique, avec renouvellement du milieu, alimentation des organismes et dénombrement des jeunes quotidiens à partir du 3ème jour de la période d'essai. Il est réalisé à 25°C ± 1°C, sous éclairage artificiel de faible intensité (300 lux maximum) et avec une photopériode de 16h jour et 8h de nuit.

Deux paramètres sont suivis pendant toute la durée de l'essai : la mortalité chez les mères, et le nombre de jeunes produits pour chaque mère.

Figure 19 : Repiquage des Cériodaphnies avant essai

Calcul de l'effet inhibiteur de chaque dilution

Pour chaque dilution, on calcule le pourcentage d'inhibition de la croissance de la population concernée par rapport au témoin.

$$Ic_i = 100 \times \frac{\overline{N}_{Ct} - \overline{N}_{Ce}}{\overline{N}_{Ct}} \qquad \text{(eq. 14)}$$

avec : I_{Ci} : pourcentage d'inhibition de la croissance (taux de croissance) pour la concentration d'essai i ; $\overline{N}_{Ct}$: nombre moyen de jeunes vivants dans le témoin et $\overline{N}_{Ce}$: nombre moyen de jeunes vivants dans la concentration d'essai i.

Pour chaque dilution, on calcule le pourcentage d'inhibition de la reproduction de la population concernée par rapport au témoin. Notons que seuls les réplicats où la mère adulte est vivante en fin d'essai sont pris en compte dans ce calcul.

$$I_{Ri} = 100 \times \frac{\overline{N}_{Rt} - \overline{N}_{Re}}{\overline{N}_{Rt}} \qquad \text{(eq. 15)}$$

avec : I_{Ri} : pourcentage d'inhibition de la reproduction pour la concentration d'essai i ; $\overline{N}_{Rt}$: nombre moyen de jeunes vivants dans les témoins où la mère adulte est vivante en fin d'essai et $\overline{N}_{Re}$: nombre moyen de jeunes vivants dans les concentrations d'essai i où la mère adulte est vivante en fin d'essai.

Critères de validité de l'essai

- La sensibilité de la souche du laboratoire est régulièrement contrôlée par des essais avec le sulfate de cuivre.

Pour les témoins :

- Le taux moyen de mortalité des femelles adultes en fin d'essai n'excède pas 20% ;
- La proportion de mâles n'excède pas 20% ;
- 60 % (ou plus) des femelles adultes produisent trois couvées pendant la durée de l'essai ;
- Le nombre moyen de jeune par femelle adulte est supérieur ou égal à 15.

3.2.6 Inhibition de la mobilité de *C. dubia*

Cet essai est adapté des normes NF EN ISO 6341 [1996] et ISO 20665 [2007]. Il consiste à déterminer les concentrations initiales (présentes en début d'essai) qui, en 24 et 48 heures, immobilisent entre 0 et 100% des ceriodaphnies mises en expérimentation.

L'essai est réalisé avec des organismes issus de l'élevage du laboratoire et âgés de moins de 24 heures. Si nécessaire, un essai préliminaire est réalisé en 24 heures.

Pour l'essai définitif, une gamme de 5 à 10 dilutions de l'effluent dans milieu M4 de Elendt (contient 2,5 mg/l d'EDTA) est réalisée parallèlement à un témoin sans effluent. L'essai se déroule en flacon contenant chacun 50 ml de solution d'essai et cinq ceriodaphnies, avec quatre répétitions par dilution. L'essai statique se déroule à l'obscurité à une température de 25 ± 2°C .

A la fin de la période d'essai (24h et 48h), on dénombre dans chaque tube à essai le nombre de ceriodaphnies mobiles.

Calcul de l'effet inhibiteur de chaque dilution : Il est identique à celui effectué dans le cadre de l'essai d'inhibition de la mobilité de *D. magna* (voir paragraphe 3.2.2, page 105).

Critères de validité de l'essai

- La teneur en oxygène dissous mesurée dans les témoins est supérieure ou égale à 2 mg/l ;
- Le pourcentage d'immobilisation observé pour les témoins est inférieure ou égale à 10%.

3.2.7 Inhibition de la reproduction de *B. calyciflorus*

Cet essai chronique est réalisé d'après la norme PR NF ISO 20666 [2007]. Il consiste à évaluer l'effet inhibiteur de l'effluent sur la reproduction d'une population de rotifères (nombre total d'individus, jeunes et mères) en 48h.

L'essai est réalisé avec des organismes provenant de cystes du commerce, âgés de moins de deux heures au début de l'essai. Le milieu de dilution est une solution synthétique. Si nécessaire, un essai préliminaire est réalisé en 48 heures.

Pour l'essai définitif, une gamme minimale de 5 dilutions de l'effluent est réalisée parallèlement à un témoin sans effluent. L'essai se déroule sur des microplaques composées de puits d'une contenance d'environ 1ml, avec huit réplicats au minimum par dilution. Un seul organisme est introduit par puits en début d'essai (Figure 20). L'essai est statique, sans renouvellement de milieu et l'alimentation des organismes (suspension d'algues unicellulaires) est assurée en début d'essai. Il est réalisé à 25 ± 1°C, à l'obscurité, dans une atmosphère saturée en humidité.

À la fin de la période d'essai (48h), on dénombre dans chaque puits le nombre total d'individus.

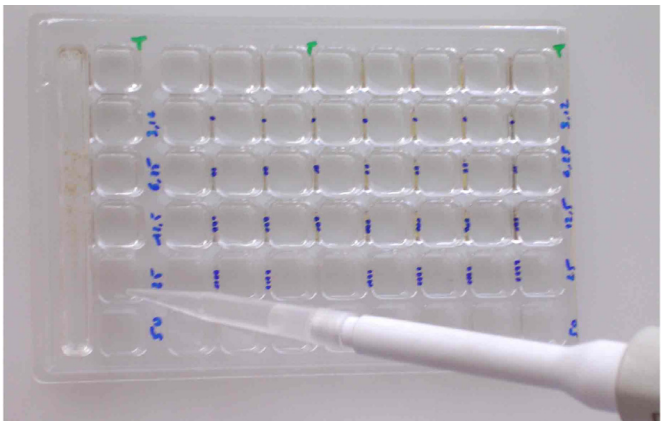


Figure 20 : Mise en route de l'essai *Brachionus calyciflorus* sur microplaque

Calcul de l'effet inhibiteur de chaque dilution : Il est identique à celui effectué dans le cadre de l'essai d'inhibition de croissance de la population de *C. dubia* (paragraphe 3.2.5 page 108*)*.

Critères de validité de l'essai :

- La reproduction de *B. calyciflorus* est observée dans au moins 87,5% des témoins ;
- Le nombre moyen de femelles vivantes par puits dans le lot témoin est supérieur ou égal à 3 en fin d'essai ;
- La sensibilité de la souche est contrôlée par des essais avec du sulfate de cuivre.

3.2.8 Inhibition de la croissance de la population de *L. minor*

Cet essai chronique est réalisé d'après la norme ISO 20079 [2005]. Il consiste à évaluer l'effet inhibiteur de l'effluent sur la croissance de populations de lentilles d'eau en 7 jours et en fonction de deux critères : le taux de croissance du nombre de fronde et de la surface verte.

L'essai est réalisé avec des colonies de deux ou trois frondes de *Lemna minor* issues d'une culture du laboratoire âgée de 7 à 10 jours. Le milieu de dilution est le milieu normalisé STEINBERG modifié.

Un essai préliminaire peut être réalisé. Pour l'essai définitif, une gamme d'au minimum cinq dilutions est réalisée parallèlement à un témoin sans échantillon. 10 à 16 frondes (colonies de 2 ou 3 frondes) sont introduites dans chaque bécher d'une contenance de 60 ml, avec trois réplicats par dilution. Cet essai statique est réalisé à 24 ± 2°C, sous éclairage continu de 8000 lux (Figure 21).

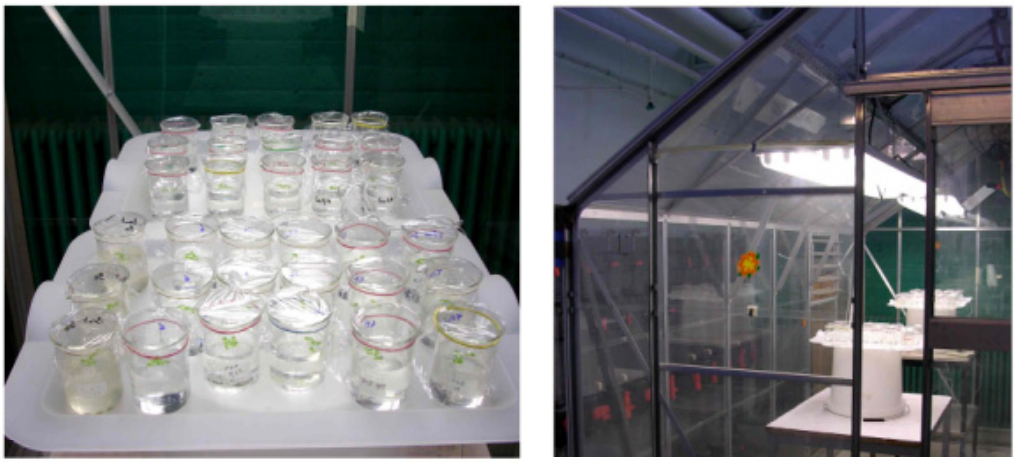


Figure 21 : Dispositif expérimental de l'essai *Lemna minor*

Les frondes sont dénombrées et photographiées en fin d'essai. La détermination du paramètre « surface verte » est faite par analyse d'images, avec le logiciel Mathlab 7.0 (MathWorks Inc.).

<u>*Calcul de l'effet inhibiteur de chaque dilution*</u>

Il est identique à celui effectué dans le cadre de l'essai d'inhibition de croissance de la population de *P. subcapitata* (voir paragraphe 3.2.4 page 106*)*.

<u>*Critères de validité de l'essai :*</u>

- Le taux de croissance obtenu pour le lot témoin est d'au moins 0,275 par jour.
- La sensibilité de la souche est contrôlée par un essai avec le chlorure de potassium dont la CE50 (nombre de frondes) est comprise entre 5,5 et 10,0 g/l.

3.3 Traitement des résultats

Pour chaque essai, des courbes de toxicité « concentrations-effets » sont modélisées. L'information contenue dans ces courbes est réduite pour travailler sur une valeur d'effet : la concentration induisant 20% d'effet (CE20) sur les populations d'organismes testées et par rapport à la population témoin. Un intervalle de confiance à 95% (IC95) est calculé pour chaque CE20.

La modélisation des données de toxicité est effectuée à partir du programme Regtox version 6.6.2 (macro pour Microsoft Excel) développé par Vindimian *et al.* [1983] qui a été décrit dans le cadre de la présentation des essais sur « substances » (voir partie1 1, chapitre 1. 5.1, page 93).

La comparaison des CE20 s'appuie sur la comparaison des IC95. Nous considérons que deux CE20 sont significativement différentes lorsque leurs IC95 sont disjoints [Clément, 1994].

4. Bioessai pluri-spécifique sur une communauté périphytique naturelle

4.1 Introduction

Pour mener à bien la caractérisation des effets des effluents hospitaliers par une approche bioessai pluri-spécifique, il était nécessaire de choisir un bioessai pluri-spécifique en adéquation avec le scénario d'étude, c'est-à-dire écologiquement pertinent (signification écologique, sensibilité, caractère discriminant, etc.), manipulable dans des conditions confinées (due à la dangerosité de notre effluent) et fonction de la maîtrise des protocoles de mesure. Dans ces conditions, le travail en batchs sur des communautés périphytiques naturelles nous a semblé être le meilleur compromis. De nombreux travaux ont montré l'intérêt de ces communautés en tant que bioindicateurs [Wetzel, 1983; Carpenter, 1996; Maltby, 1999; Parent-Raoult, 2004; Volatier, 2004].

Un certain nombre de considérations ont été prises en compte pour la sélection de la nature de la communauté et de son substrat. Les travaux de Parent-Raoult [2004] ont ainsi mis en évidence les nombreuses difficultés rencontrées lors d'essais de colonisation de substrats des communautés périphytiques naturelles en laboratoire : durée importante (environ 1 mois) et non maîtrise des organismes se colonisant de manière préférentielle aux substrats (développement quasi exclusif d'algues filamenteuses par exemple), et cela quelles que soient les conditions expérimentales de colonisation (éclairage, inoculum, milieu, nature du substrat). Les travaux de

Lewis *et al.* [2004] et de Volatier [2004] ont montré que les dispositifs artificiels de collecte de communautés naturelles, mis en place *in situ* sont sujets aux vandalismes et aux aléas climatiques [Lewis *et al.*, 2004; Volatier, 2004].

Les bioessais de laboratoires utilisant des communautés et des substrats naturels ont l'avantage d'être plus confinés (on parle de « batchs ») et peuvent ainsi permettre l'étude des effets de matrices ou substances dangereuses à manipuler. L'essai se déroule dans des conditions de température et de lumière contrôlées. Notons enfin que le protocole expérimental de ces bioessais a été développé au LSE lors des travaux de thèses de Volatier [2004] et de Parent-Raoult [2004].

Deux campagnes d'essais sont réalisées afin d'étudier la réponse des communautés naturelles sur deux périodes climatiques extrêmes. La première campagne a été réalisée au cours de l'hiver 2007 et la seconde au cours de l'été 2007.

4.2 Collecte du substrat et du milieu d'essai

La solution retenue est celle choisie par Parent-Raoult [2004]. Elle consiste à prélever des substrat naturels (petits cailloux d'environ 2 cm de diamètre), naturellement colonisés dans un petit cours d'eau du Rhône nommé la Rize (Figure 22). Ce cours d'eau a l'avantage d'être à proximité du laboratoire, d'avoir un régime hydraulique relativement stable et de présenter une bonne qualité physico-chimique [Parent-Raoult, 2004].

Figure 22 : La Rize (Rhône) au niveau du secteur de prélèvement des substrats naturels

Lors des deux campagnes, les substrats sont prélevés délicatement, de manière aléatoire dans une zone d'environ 4 m^2. Cette zone se caractérise par une ripisylve peu abondante, un faciès d'écoulement homogène (hauteurs d'eau inférieures à 30 cm, vitesses comprises entre 20 et 30

cm/s) et constitue la partie la plus exposée au soleil du cours d'eau. Les substrats sont ensuite rapidement transportés dans des bacs remplis d'eau du cours d'eau.

4.3 Dispositif expérimental

Le dispositif comporte 32 fioles à DBO en verre borosilicaté d'une contenance de 150 ml. Un barreau magnétique et une grille (permettant la rotation du barreau sans abîmer le biofilm) sont introduits préalablement dans chacune des fioles (Figure 23).

Les milieux d'essai sont constitués d'une dilution de l'effluent testé dans l'eau du milieu de collecte des cailloux (eau de la Rize). Une gamme de six concentrations d'effluent est choisie (à partir des résultats de la batterie de bioessais mono-spécifiques) pour ces essais : 6, 11, 18, 31, 53 et 90% (en % volumique d'effluent). Des essais témoins (absence d'effluent d'une part, et absence d'effluent et de biofilm d'autre part) sont menés en parallèle. Quatre réplicats sont testés par concentration.

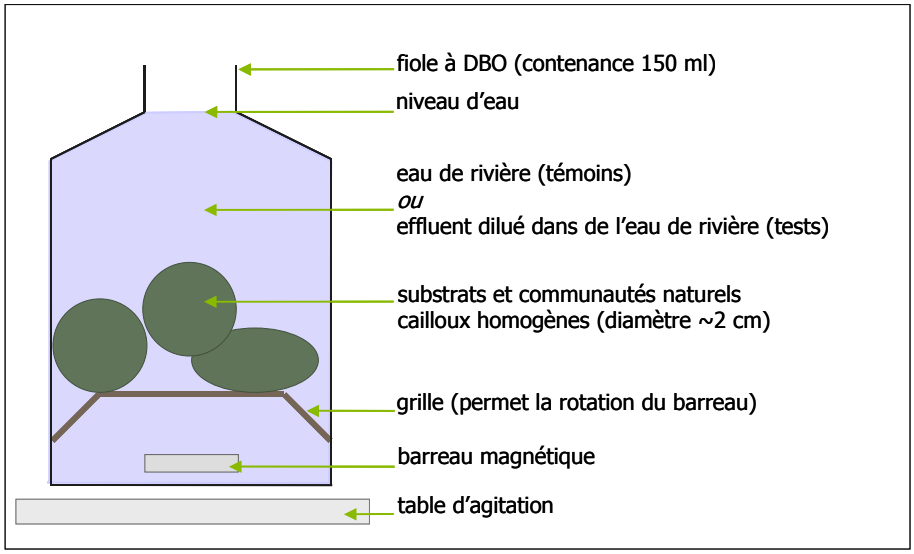


Figure 23 : Représentation schématique d'un batch (modifiée d'après Parent-Raoult, 2004)

Au début de la campagne, trois cailloux colonisés sont introduit dans chaque fiole préalablement remplie avec les milieux d'essai.

Les fioles sont disposées sur des plaques d'agitation (permettant d'éviter la décantation des particules et de créer un mouvement d'eau autour des substrats, comme dans la rivière), dans un bain thermostaté situé sous une rampe de néons (Figure 24). La température du bain thermostaté est fixée par rapport aux conditions observées sur le terrain lors de la collecte du périphyton, soit 13°C pour la campagne hiver et 17°C pour la campagne été. Les néons se composent d'un tube « lumière du jour » (Prestiflux TF P 58 JR/865) et d'un tube « lumière horticole » (Sylvania Grolux) disposés côte à côte et fournissant une intensité lumineuse de 8 000 lux. Ceux-ci sont reliés à un programmateur afin de pouvoir régler la photopériode en fonction des

conditions observées sur le terrain, soit : 12h30 de nuit et 11h30 de jour pour la campagne hiver et 11h30 de nuit et 12h30 de jour et pour la campagne été.

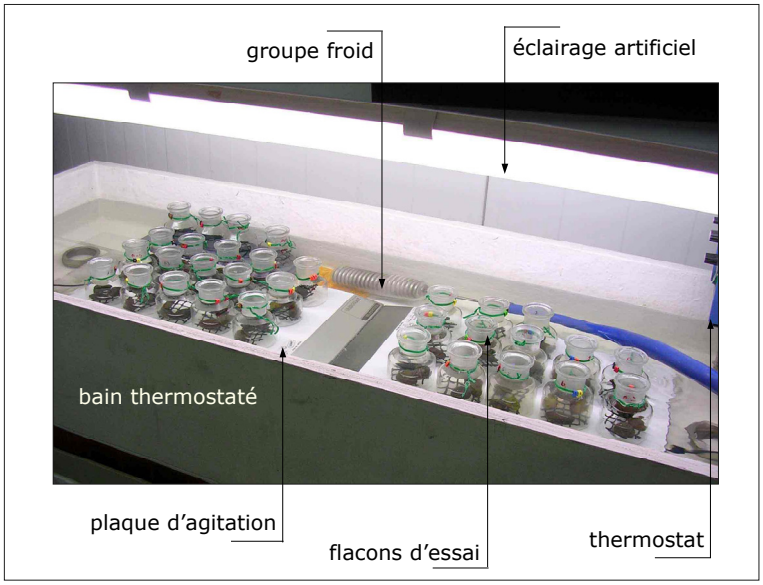


Figure 24 : Dispositif expérimental du bioessai sur périphyton

Enfin, conformément aux recommandations faites par Volatier [2004], la durée initiale de l'essai (14 jours) a été écourtée à 7 jours.

4.4 Mesure des effets sur le périphyton

Les descripteurs sont choisis d'une part afin d'avoir une bonne pertinence écologique (sélection de biodescripteurs structurels et fonctionnels) et d'autre part, dans les limites de la faisabilité en terme de moyens humains, financiers et analytiques.

La caractérisation des effets sur la **structure globale** de la communauté périphytique est réalisée en fin d'essai et sur toutes les concentrations testées, par :

- Mesure de la biomasse totale (estimée par la détermination de la masse sèche et de la masse sèche sans cendre) ;
- Mesure de la biomasse algale (estimée par mesure de la concentration en chlorophylle-*a* associée au dosage des phéopigments).

La caractérisation des effets sur le **métabolisme** de la communauté périphytique est réalisée en fin d'essai et sur toutes les concentrations testées, par :

- Mesure des activités photosynthétiques et respiratoires.

Notons que l'analyse des paramètres biomasse totale, biomasse algale et phéopigments nécessitent la mise en suspension du biofilm et donc le « sacrifice » de batchs. La mesure de l'activité photosynthétique est, quant à elle, non destructive et directement réalisée dans les fioles. Le protocole expérimental de fin d'essai est décrit schématiquement par la Figure 25.

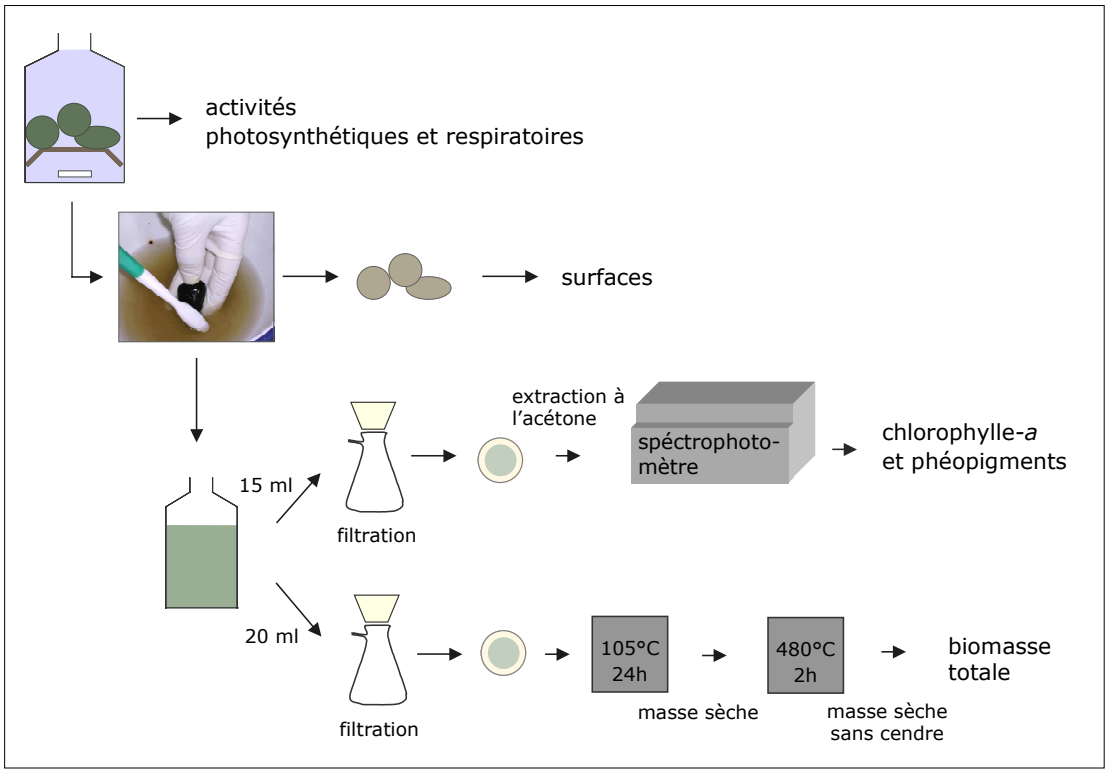


Figure 25 : Schéma du protocole expérimental de fin d'essai periphyton

4.4.1 Estimation des activités photosynthétiques et respiratoires

La mesure de l'activité photosynthétique est effectuée selon la méthode des flacons d'oxygène qui est également appelée « méthode des bouteilles claires et des bouteilles sombres » [Pelletier, 1983]. Cette méthode consiste en un dosage d'oxygène en système fermé et conduit à l'estimation de l'oxygène produit en phase claire et consommée en phase sombre.

La production d'oxygène mesurée en phase claire (production nette) correspond à la production brute diminuée des pertes par respiration. La consommation d'oxygène mesurée en phase sombre correspond quant à elle, à la respiration. L'activité photosynthétique des organismes autotrophes est estimée par la production primaire brute qui est obtenue par addition de la production nette et de la respiration (en supposant que les phénomènes respiratoires sont identiques en phase claire et en phase sombre).

Les mesures de respiration et de production nette sont réalisées directement dans les fioles, en début et fin d'incubation avec un oxymètre (Pioneer 65, Radiometer analytical). Lors des deux phases d'incubation chaque flacon est fermé hermétiquement (par graissage du col rodé) et de manière à ne pas enfermer de bulles d'air à l'intérieur (méthode par « débordement »). Notons enfin, qu'afin d'éviter un stress des communautés et de mesurer directement l'activité respiratoire, les mesures en phase sombre sont réalisées directement à la suite de la « période de nuit ».

Les activités respiratoires et photosynthétiques mesurées sont fonction des temps d'incubation et des caractéristiques du biofilm. Ainsi, afin de ne pas carencer le milieu en oxygène durant l'incubation en phase sombre et, de ce fait, ne pas « stresser » les biofilms, le temps d'incubation est préalablement défini pour chaque série de mesures (il est compris entre 2h et 2h30 pour nos deux campagnes). Pour l'incubation en phase claire, le temps d'incubation est également prédéfini pour ne pas sursaturer le milieu en oxygène (il est compris entre 1h et 1h30 pour nos deux campagnes).

Calculs des activités photosynthétiques

$$R = Ci - Cs \quad \text{(eq. 16)}$$

$$PN = Cc - Ci \quad \text{(eq. 17)}$$

$$PB = (Cc - Ci) + (Ci - Cs) \quad \text{(eq. 18)}$$

avec : R : activité respiratoire (mgO_2/l) ; PN : activité photosynthétique nette (mgO_2/l) ; PB : activité photosynthétique brute (mgO_2/l) ; Ci : concentration initiale de O_2 lors de la phase sombre ; Cs : Concentration finale de O_2 en phase sombre (et initiale de la phase claire) et Cc : Concentration finale de O_2 en phase claire.

Notons enfin que (i) les valeurs de production brute et de respiration des témoins sans substrat sont soustraites aux valeurs obtenues avec les biofilms et que (ii) la production brute et la respiration sont exprimées par unité de temps et de surface (mg $O_2/m^2/h$).

4.4.2 Mise en suspension du biofilm et détermination de la surface du biofilm

Le contenu de chacune des fioles est vidé dans un récipient dans lequel on brosse la surface des trois cailloux à l'aide d'une brosse à dent, afin de mettre en suspension le périphyton.

Les cailloux sont conservés pour estimer leur surface (surface du biofilm). Cette estimation se fait par un emballage minutieux des cailloux dans du papier aluminium qui est ensuite pesé avec une balance de précision de type AE 240 mettler [Kreutzweiser *et al.*, 1995].

4.4.3 Estimation de la biomasse totale

La biomasse totale est estimée par mesure de la masse sèche sans cendre (exprimée par unité de surface colonisée) selon la méthode utilisée par Scholz et Boon [1993]. Le protocole expérimental passe par la détermination de la masse sèche (MS) puis de la masse sèche sans cendre (MSSC). Cette estimation inclut donc, en plus de la matière organique vivante, la nécromasse et la matière organique provenant d'apports allochtones ou autochtones.

Des filtres GF/C Whatman (porosité : 1,2 µm) sont préalablement séchés (24h à 105°C) puis pesés (m_0). Ces filtres sont ensuite utilisés pour filtrer un aliquot de la suspension périphytique

de chacune des fioles. Le volume filtré ($V_{filtré}$) est variable selon la densité de la solution périphytique. Dans notre cas, la densité est relativement faible, $V_{filtré}$ a donc été fixé à 20 ml. Notons qu'afin de prélever un aliquot le plus représentatif possible de la totalité de la solution périphytique, celui-ci est constitué de deux prises successives de 10 ml et chacune d'elles est précédée d'une homogénéisation de la suspension par agitation manuelle.

Les filtres sont alors séchés à 105°C pendant 24h puis refroidis en dessiccateur. La mesure de la masse sèche est alors effectuée (m_1). La mesure de la masse minérale se fait de la même manière. Après calcination des même filtres à 480°C (four à moufles Ventoux HM, Serlabo) pendant 2h, puis refroidissement en dessiccateur, les filtres sont à nouveau pesés (m_2). Notons que les pesées sont effectuées sur une balance de précision (AE 240, mettler)

Calculs de la masse sèche sans cendre (estimation de la biomasse totale)

$$MS = \frac{1}{S} \times (m_1 - m_0) \times \frac{V_{suspension}}{V_{filtré}} \quad \text{(eq. 19)}$$

$$MSSC = \frac{1}{S} \times (m_1 - m_2) \times \frac{V_{suspension}}{V_{filtré}} \quad \text{(eq. 20)}$$

avec : MS : Masse Sèche (mg/m^2) ; MSSC : Masse Sèche Sans (mg/m^2) ; S : surface du substrat (m^2) ; m_0 : masse filtre séché (mg) ; m_1 : masse filtre séché après 105°C (mg) ; m_2 : masse filtre séché après 480°C (mg) ; $V_{suspension}$: volume total de la suspension périphytique (ml) et $V_{filté}$: volume de suspension filtré (ici 20 ml).

4.4.4 Estimation de la biomasse algale

La biomasse algale est estimée selon la méthode de SCOR-UNESCO avec une correction par rapport aux phéopigments (forme dégradée de la chlorophylle). Cette méthode [NF T 90-117, 1999] consiste au dosage spectrophotométrique de la chlorophylle-*a* et d'un indice phéopigments.

Un aliquot de 15 ml ($V_{filtré}$) est prélevé dans la suspension périphytique puis filtré (filtres GF/C Whatman ; porosité : 1,2 µm ; diamètre : 47 mm) sous une dépression légère afin de limiter l'éclatement des cellules et la dégradation de la chlorophylle. Les filtres sont ensuite repliés sur eux-mêmes, placés dans du papier aluminium et stockés deux semaines au plus à -18°C. En sortie du congélateur, les filtres sont immergés dans des tubes en verre contenant un volume donné d'acétone à 90% ($V_{acétone}$: 20 ml dans notre cas). Ils sont ensuite broyés grossièrement avec une tige en verre et enfin stockés à l'obscurité et à 4°C pendant 4 heures (phase d'extraction). Notons qu'afin de limiter son évaporation, l'acétone à 90 % est préparée au maximum 2 jours avant son utilisation. À la fin de cette période le contenu des tubes est filtré (filtres GF/C, diamètre : 25 mm). La teneur en chlorophylle-*a* et en phéopigments contenue dans un aliquot de filtrat (3 ml) est alors dosé par spectrophotométrie (Lambda 25 UV/visible, PerkinElmer) aux longueurs d'ondes suivantes : 410, 430, 630, 645, 663 et 750 nm.

Calculs des concentrations en chlorophylle-a (Ca *en g/m²*) *et en phéopigments* (Pa *en g/m²*)

$$Ca = \frac{V_{suspension}}{S} \times \frac{C}{100} \times \left(59 + 137{,}6\ \ln\left(\frac{A_{430} - A_{750}}{A_{410} - A_{750}}\right)\right) \quad \text{(eq. 21)}$$

$$Pa = \frac{V_{suspension} \times C}{S} \times \left(1 - \frac{59 + 137{,}6 \ln\left(\frac{A_{430} - A_{750}}{A_{410} - A_{750}}\right)}{100}\right) \quad \text{(eq. 22)}$$

avec :

$$C = \frac{V_{acétone}}{V_{filtré} \times L} \times \left[11{,}64 \times (A_{663} - A_{750}) - 2{,}16 \times (A_{645} - A_{750}) + 0{,}10 \times (A_{630} - A_{750})\right] \quad \text{(eq. 23)}$$

$V_{suspension}$: volume total de la suspension périphytique (ml) ; $V_{filté}$: volume de suspension filtré (ici 15 ml) ; $V_{acétone}$: volume d'acétone utilisé pour l'extraction suspension filtré (ici 20 ml) et S : surface du substrat (m^2) et L : parcours optique de la cuve (ici 1 cm).

4.4.5 Traitement des résultats

L'ensemble des données de chaque campagne est tout d'abord étudié à l'aide d'analyses en composantes principales (ACP) centrées et normées. Les données représentées dans un plan factoriel permettent d'expliquer au mieux l'effet de la concentration en effluent tous descripteurs confondus. Les ACP sont réalisée avec le logiciel ADE 4 [Thioulouse *et al.*, 1997, 2001].

La deuxième phase de l'analyse consiste à étudier les effets observés en fonction de la concentration en effluent et pour chacun des descripteurs utilisés. Les coefficients de variations (CV = écart-type / moyenne) sont calculés pour chacun des paramètres et permettent d'apprécier la précision de la mesure. Des analyse de variance à un facteur (concentration en effluent) sont également effectuées après vérification de la distribution normale des données (utilisation du test de Henry) et de l'égalité des variances (utilisation du test de Levene). Lorsque l'ANOVA-1 se révèle significative ($p < 0{,}05$), le test de Bonferroni est utilisé pour définir les concentrations qui engendrent un effet significatif ($p < 0{,}05$) voir très significatif ($p < 0{,}0001$) par rapport au témoin. Les ANOVA-1 sont réalisées avec le logiciel Statistica 7.0 (StatSoft France, 2007).

Partie 3.

Résultats

Cette partie est consacrée à la présentation des résultats.

Les deux premiers chapitres présentent les résultats de l'étude des effets des effluents hospitaliers. Le premier s'attache aux effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers vis-à-vis de la mobilité de *Daphnia magna*. Le second chapitre porte sur une matrice réelle. Il présente les résultats obtenus lors de la caractérisation physico-chimique, microbiologique et écotoxicologique d'un effluent hospitalier d'une grande ville du Sud-Est de la France.

Le troisième et dernier chapitre se consacre enfin à la réalisation d'EDREcotox basées sur les différents types d'effets étudiés préalablement.

Pour faciliter la lecture de cette partie, le lecteur pourra à tout moment se reporter aux grilles expérimentales (Tableau 28 et Tableau 29) qui résument les principales caractéristiques des expérimentations menées dans le cadre de ce travail, et dont les résultats sont présentés dans cette partie.

Paramètres		Conditions expérimentales
substances	désinfectants	- glutaraldéhyde (GA) - acide peracétique (APA) - hypochlorite de sodium (NaOCl)
	surfactants	- dodécylsulfate de sodium (SDS, anionique) - triton-X 100 (TX, non-ionique) - bromure d'hexadécyltriméthyl-ammonium (CTAB, cationique)
ratios testés pour les mélanges binaires désinfectant/surfactant (en % masse/masse)		- désinfectant 20% - surfactant 80% - désinfectant 40% - surfactant 60% - désinfectant 50% - surfactant 50% - désinfectant 60% - surfactant 40% - désinfectant 80% - surfactant 20%
conservations des mélanges		4 jours à 4°C
organisme - durée d'essai - norme		*Daphnia magna* Straus - 24h - NF EN ISO 6341
calculs des Concentrations d'Effet (CE 50) et modélisation des courbes concentration effet		Regtox - modèle de Hill [Hill, 1910]
méthodes d'étude des effets combinés	à la CE50 *pour tous les ratios testés*	- comparaison des CE50 - modèle des TI (Toxicity Index)
	sur la globalité des courbes concentrations-effets *pour les mélanges en ratio 50/50*	- modèle CA (Concentration Addition) - modèle IA (Independant Action)

Tableau 28 : Grille expérimentale relative à l'étude des effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers (vis-à-vis de *Daphnia magna*)

Prélèvements	
date	du 12 avril 2006 13h au 13 avril 2006 13h
lieu	collecteur principal d'un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France (reçoit les 3/4 des effluents de l'hôpital)
nature des échantillons	- 1 échantillon moyen 24h - 5 échantillons périodiques correspondant aux périodes : 13h-17h, 17h-23h, 23h-5h, 5h-9h et 9h-13h
suivis sur le terrain	pH, température et débit

Analyses physico-chimiques	
sur échantillons moyen et périodiques	pH, conductivité, DBO5, DCO, COT, MES, AOX, ammonium, chlorures, chlore libre, détergents non ioniques, glutaraldéhyde et acétaldéhyde
sur échantillon moyen	chlore total, azote kjeldahl, orthophosphates, COHV, acétates, alcools, détergents anioniques et cationiques, acétone, formaldéhyde, indice phénols, métaux (Ag, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn), As et bêtabloquants

Analyses microbiologiques	
sur échantillons moyen et périodiques	coliformes thermotolérants, coliformes, entérocoques, staphylocoques
sur échantillon moyen	salmonelles, *Shigella, Staphylococcus aureus*

Batteries de bioessais mono-spécifiques	
sur échantillons moyen et périodiques filtrés	*Daphnia magna* (aigu 24 et 48h), *Vibrio fischeri* (aigu 15 et 30 min), *Pseudokirchneriella subcapitata* (chronique 72h)
sur échantillon moyen filtré	*Ceriodaphnia dubia* (aigu 24 et 48h et chronique 7j), *Brachionus calyciflorus* (chronique 48h), *Lemna minor* (chronique 7j)
sur échantillons moyen et périodiques non filtrés	*Daphnia magna* (aigu 24h), *Lemna minor* (chronique 7j)

Bioessais sur communautés périphytiques naturelles		
nature des substrats et lieu de collecte	cailloux de taille homogènes (environ 2 cm de diamètres) la Rize (Rhône)	
nature du milieu de dilution	eau de la Rize	
concentrations testées (en % volumique d'effluent)	6 ; 11 ; 18 ; 31 ; 53 ; 90 1 témoin avec communauté et sans effluent 1 témoin sans communauté et sans effluent	
réplicats	4 réplicats par concentration	
durée de l'essai	7 jours	
caractérisation finale	activité photosynthétique (respiration/production) masse organique chlorophylle-*a* et phéopigments	
périodes d'essais	hiver (février 2007)	été (septembre 2007)
températures	13°C	17°C
photopériodes	12h30 nuit / 11h30 jour	11h30 nuit / 12h30 jour

Tableau 29 : Grille expérimentale relative à la caractérisation des effets d'un effluent hospitalier vis-à-vis de différents organismes des écosystèmes aquatiques

Chapitre 1.

Effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers (vis-à-vis de *Daphnia magna*)

Rappelons tout d'abord que les polluants retenus pour ce travail sont au nombre de six. Il s'agit de trois désinfectants : le glutaraldéhyde (GA), l'acide peracétique (APA) et l'hypochlorite de sodium (NaOCl) et de trois surfactants : le dodécylsulfate de sodium (SDS) qui est anionique, le triton-X 100 (TX) qui est non-ionique et le bromure d'hexadécyl-triméthylammonium (CTAB) qui est cationique.

Les résultats de ce chapitre sont présentés en quatre sections principales. La première et la seconde section sont consacrées à l'exposé des résultats de l'écotoxicité des substances pures d'une part et des mélanges d'autres part, vis-à-vis de la mobilité de *Daphnia magna* en 24 heures. La troisième et la quatrième section sont consacrées à l'étude des effets combinés via les modèles IA et CA puis via le modèle des TI. Elles utilisent donc les données acquises lors des deux premières sections. Il faut enfin noter que dans chacune de ces sections, nous présenterons les différents mélanges par désinfectants (c'est-à-dire : GA puis APA et enfin NaOCl).

1. Écotoxicité des substances pures étudiées

Les résultats des essais d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* en 24h menés sur les trois désinfectants et les trois surfactants sont abordés de deux manières. La Figure 26 présente les courbes concentrations/effets des substances permettant de visualiser la globalité des réponses des substances vis-à-vis de *D. magna*. Le Tableau 30 précise quant à lui, les valeurs des CE50, des intervalles de confiance à 95% (IC95) et des coefficients de variation (CV).

La Figure 26 révèle que l'écotoxicité des substances étudiées vis-à-vis de la mobilité de *D. magna* varient globalement de la manière suivante (du plus au moins écotoxique) : CTAB > NaOCl > GA > SDS > TX > APA. Les « écarts de toxicité » sont relativement importants puisqu'ils varient d'un facteur approximativement égal à 10^3 entre le CTAB et l'APA. Notons que les courbes de TX et APA se croisent à 80% d'effet, le TX devient alors plus écotoxique que l'APA.

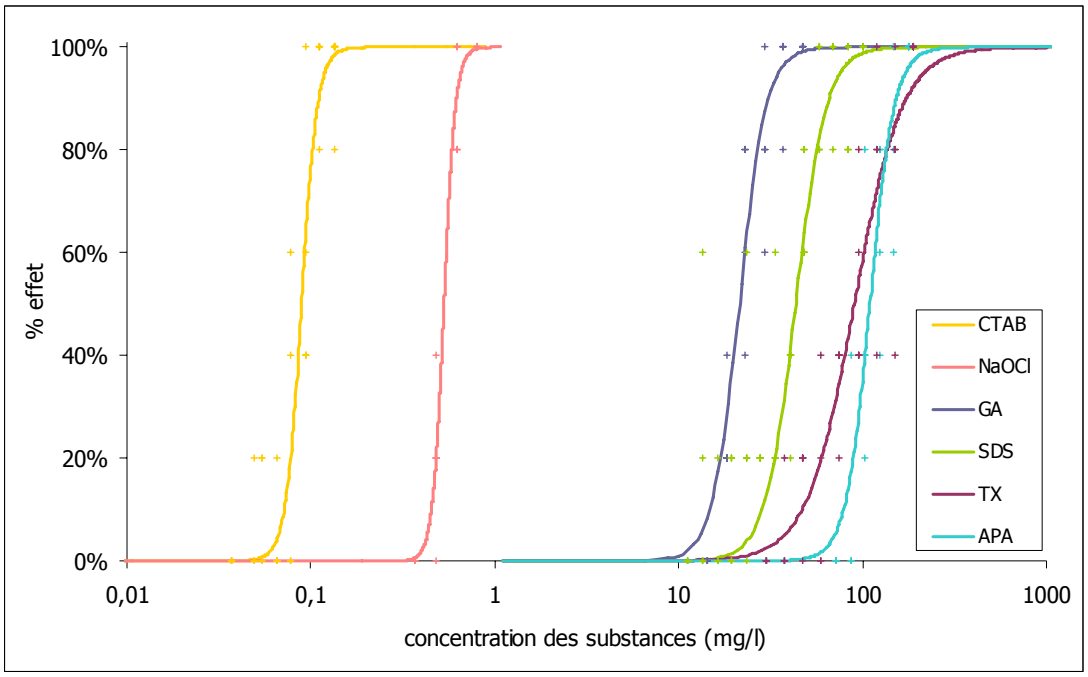


Figure 26 : Courbes concentrations/effets des substances d'études (GA, APA, NaOCl, SDS, TX et CTAB) vis-à-vis de l'inhibition de la mobilité de *D. magna* en 24h.

Les valeurs des CE50-24h des substances confirment la classification préétablie (Tableau 30). Avec une valeur de CE50 de 0,089 mg/l, la plus écotoxique des substances testées est le CTAB. À l'opposé, l'APA est la moins écotoxique des substances avec une CE50 de 109,7 mg/l.

Le plus écotoxique des désinfectants est le NaOCl (CE50 = 0,530 mg/l) dont la CE50 diffère d'un facteur approximativement égale à 40 avec GA (CE50 = 21,4 mg/l) et à 200 avec l'APA (CE50 = 109,7 mg/l), le moins écotoxique des désinfectants.

Concernant les surfactants, le CTAB est environ 500 fois plus toxique que le SDS et 1000 fois plus écotoxique que le TX. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui note que les surfactants cationiques et anioniques sont plus toxiques que les nonioniques [Rouse *et al.*, 1994; Park et Bielefeldt, 2003; Emmanuel *et al.*, 2005a].

substances		CE50 (mg/l)	IC 95 (mg/l)	CV (%)
désinfectants	GA	21,4	20,2 ; 22,6	5,6
	APA	109,7	102,4 ; 118,2	7,2
	NaOCl	0,530	0,494 ; 0,561	6,3
surfactants	SDS	43,3	39,2 ; 46,2	8,1
	TX	90,4	80,2 ; 103,6	13,0
	CTAB	0,089	0,084 ; 0,093	5,1

Tableau 30 : CE50 expérimentales des substances pures
[Abréviation : IC95 : Intervalle de Confiance à 95% ; CV : Coefficiant de variation]

Les coefficients de variation (Tableau 30) permettent d'appréhender la précision des données. Ils montrent que les mesures sont globalement de très bonne qualité (CV < 10%), sauf dans le cas du TX ou elle est de bonne qualité (CV < 15%).

2. Écotoxicité des mélanges (CE50)

2.1 Les mélanges GA-surfactants

La Figure 27 présente sous la forme de trois histogrammes, les variations des CE50-24h des mélanges GA-SDS, GA-TX et GA-CTAB en fonction des ratios de substances en mélange (i.e. : 20-80, 40-60, 50-50, 60-40 et 80-20) et vis-à-vis de la mobilité de *Daphnia magna* en 24 heures. Pour des raisons de simplification, nous utiliserons la notation GA20-SDS80 pour parler du mélange GA 20% - SDS 80% dans la suite de ce document.

Notons tout d'abord que les CE50 des mélanges sont toutes de bonne qualité puisque la totalité des coefficients de variation associés aux CE50 sont inférieures à 15% et que les 4/5ème sont même inférieures à 10%.

L'examen visuel des histogrammes montre que les valeurs des CE50 des mélanges (et leurs intervalles de confiance à 95%) sont approximativement incluses dans l'intervalle formé par les valeurs des CE50 des substances pures. La tendance générale est que les CE50 des mélanges diminuent avec l'augmentation de la proportion de substance la plus écotoxique du mélange. Les variations des valeurs de CE50 des mélanges paraissent combinées aux ratios et aux CE50 des substances pures présentes en mélanges. Il semble ainsi qu'il y ait une interdépendance entre l'écotoxicité des mélanges, la proportion de substances en mélange et la toxicité des substances pures.

Notons tout de même qu'avec une CE50 légèrement plus élevée que celle du SDS (CE50 = 43,3 mg/l, IC95 :39,2-46,2), le mélange GA20-SDS80 (CE50 = 50,0 mg/l, IC95 : 47,2-52,6) est le seul à sortir de ce cadre. Cette remarque pourrait également être faite pour le mélange GA20-TX80 dont la CE50 (101,5 mg/l, IC95 : 88,9-119,3) est supérieure à celle du TX (90,4 mg/l, IC95 : 80,2-103,6). Cependant, l'intervalle de confiance associé à la CE50 de ce mélange se confond avec celui de TX.

Concernant les mélanges GA-CTAB, l'allure de l'histogramme est légèrement différente. On peut observer une importante différence entre la CE50 du GA qui est de 21,4 mg/l (IC95 : 20,2-22,6) et celles des mélanges qui sont toutes inférieures à 0,5 mg/l. Les CE50 des mélanges sont voisines de celle du CTAB auquel les daphnies sont très sensibles (CE50 = 0,089 mg/l, IC95 : 0,0084-50,0095). La plus faible toxicité de GA (200 fois moins toxique) ne compense donc pas celle du CTAB.

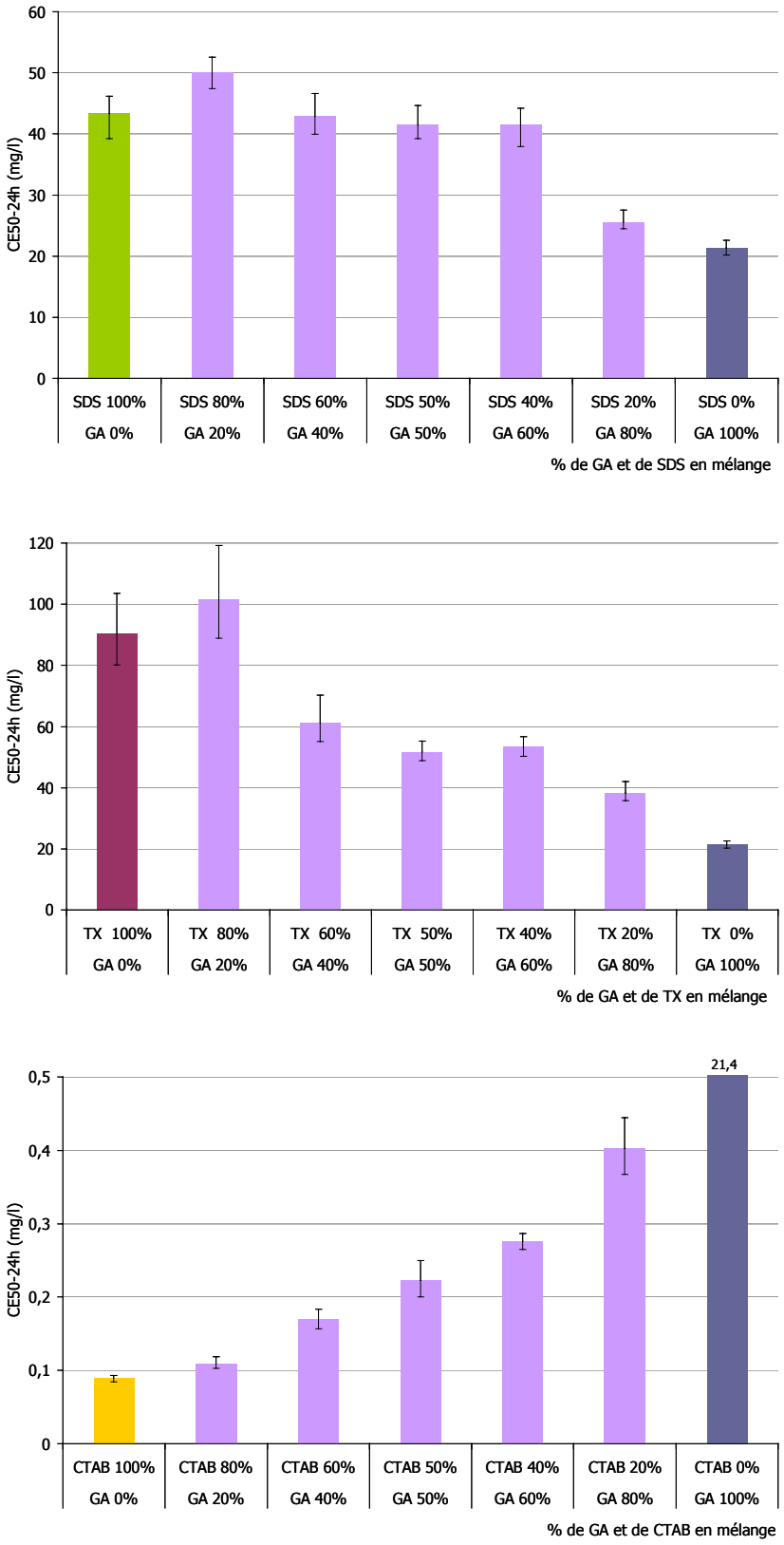


Figure 27 : CE50 et IC95 des mélanges GA-surfactants vis-à-vis de la mobilité de *D. magna* en 24h

2.2 Les mélanges APA-surfactants

La Figure 28 présente les variations des CE50-24h des mélanges APA-SDS, APA-TX et APA-CTAB en fonction des ratios de substances en mélanges et vis-à-vis de la mobilité de *D. magna* en 24h.

Notons tout d'abord que les CE50 des mélanges sont toutes de bonne qualité puisque la totalité des coefficients de variation associés aux CE50 sont inférieures à 15% et que les 7/8ème sont même inférieures à 10%.

L'examen visuel des histogrammes montre que deux groupes de résultats se distinguent clairement, les mélanges APA-SDS et APA-CTAB d'une part et les mélanges APA-TX d'autres part.

La tendance générale pour les mélanges APA-SDS et APA-CTAB est que les valeurs de CE50 des mélanges sont comprises entre les CE50 des substances pures. Elles diminuent avec le ratio d'APA en mélange (substance la moins écotoxique). Les valeurs de CE50 paraissent corrélées aux quantités et à l'écotoxicité de substances pures présentes. Notons tout de même, que la CE50 du mélange APA80-SDS20 sort de cette tendance puisque sa CE50 et son IC95 (CE50 = 128,2 mg/l, IC95 : 120,0-138,6) sont supérieures à celle de l'APA (CE50 = 109,7 mg/l, IC95 : 102,4-118,2). Concernant l'allure de l'histogramme des mélanges APA-CTAB, elle diffère légèrement des autres car les CE50 des mélanges sont toutes inférieures à 0,4 mg/l et donc très faibles relativement à celle de l'APA. L'APA est environ 1000 fois moins toxique que le CTAB, dont la forte toxicité n'est pas compensée par l'APA.

L'allure de l'histogramme des CE50 des mélanges APA-TX diffère complètement. Les CE50 des mélanges (entre 137,6 et 181,8) sont toutes supérieures à celles des substances pures. On peut ainsi observer une sorte de "cloche" dont le point culminant est la CE50 du mélange APA50-TX50 (181,8 mg/l), qui correspond au mélange APA-TX le moins écotoxique. Pour ces mélanges, il faut tenir compte du fait que contrairement aux autres mélanges, la toxicité des substances pures est relativement similaire puisque la CE50 de l'APA est de 109,7 mg/l et que celle de TX est de 90,4 mg/l.

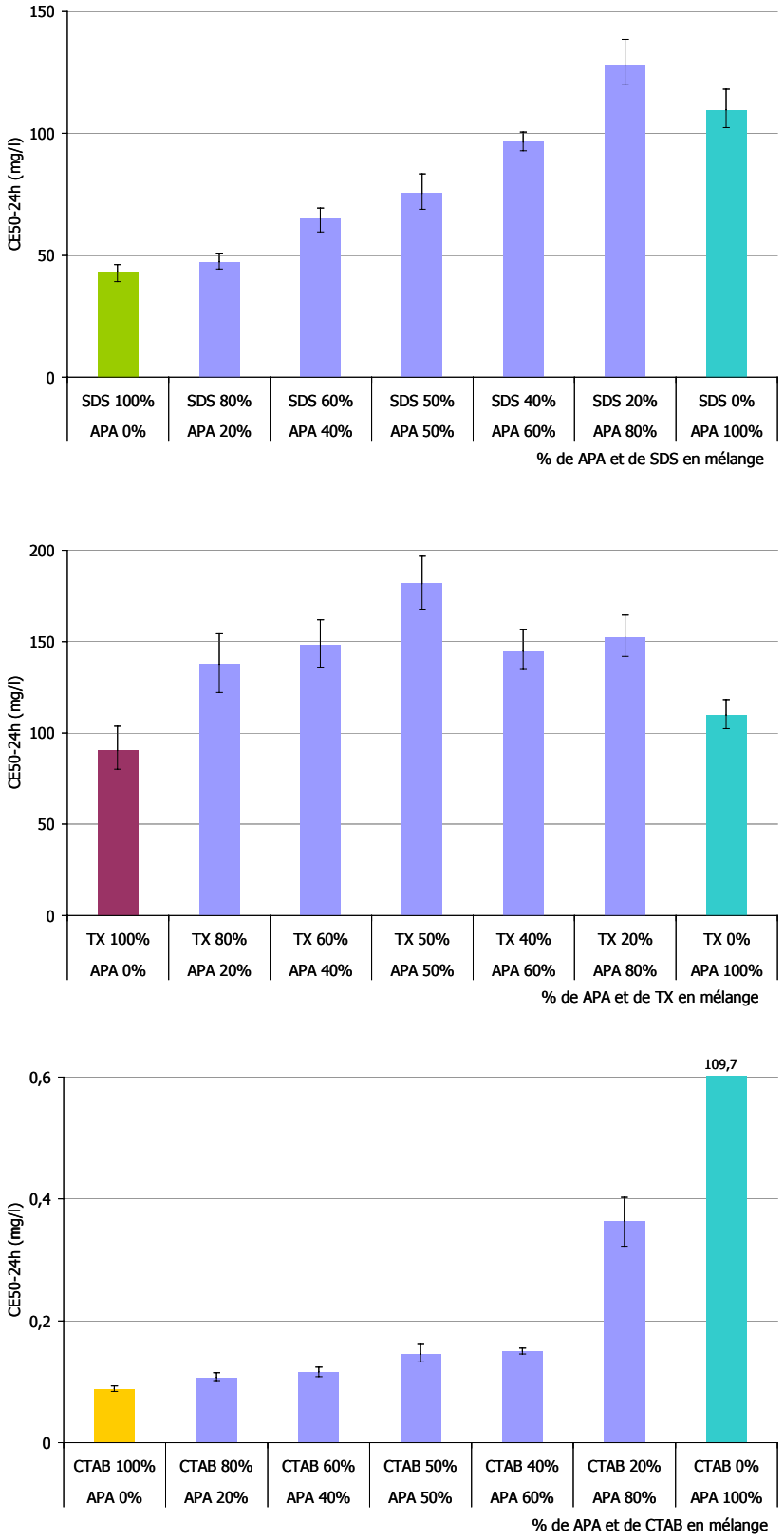


Figure 28 : CE50 et IC95 des mélanges APA-surfactants vis-à-vis de la mobilité de *D. magna* en 24h

2.3 Les mélanges NaOCl-surfactants

La Figure 29 présente les résultats des essais d'écotoxicité des différents mélanges NaOCl-surfactants (SDS, TX et CTAB), vis-à-vis de la mobilité de *D. magna* en 24 heures.

Notons tout d'abord que les CE50 des mélanges sont toutes de bonne qualité, puisque la totalité des coefficients de variation associés aux CE50 sont inférieures à 15% et que les 7/8ème sont même inférieures à 10%.

L'examen visuel des histogrammes montre que les valeurs de CE50 des mélanges NaOCl-surfactants sont comprises entre les valeurs de CE50 des substances pures. Les CE50 des mélanges augmentent avec la proportion de la substance pure la moins écotoxique du mélange. L'allure des histogrammes des CE50 laisse à penser que les CE50 des mélanges sont corrélées aux quantités et à l'écotoxicité des substances pures présentes dans les mélanges. Seul le cas du mélange NaOCl40-TX60 sort de cette constatation, sa CE50 encadrée de son IC95 (1,38 mg/l, IC95 : 1,26-1,54) sont inférieures aux CE50 et aux IC95 des mélanges NaOCl50-TX50 (1,83, IC95 : 1,70-1,92) et NaOCl20-TX80 (3,08 mg/l, IC95 : 2,85-3,37). La CE50 de mélange NaOCl40-CTAB60 (0,11 mg/l) semble être dans le même cas mais l'intervalle de confiance à 95% de ce mélange (0,10-0,13 mg/l) se confond avec celui du mélange NaOCl20-CTAB80 (0,11-0,15 mg/l).

La Figure 29 montre que les CE50 des mélanges NaOCl-SDS et NaOCl-TX sont respectivement inférieures à 3 mg/l et 4 mg/l. La CE50 du SDS est 30 fois plus élevée que celle de NaOCl20-SDS80 et celle du TX est 15 fois plus importante que celle de NaOCl20-TX80. Dans le cas de NaOCl-CTAB, substances pures et mélanges ont des CE50 proches et comprises entre 0,09 mg/l et 0,6 mg/l. Il faut rapprocher ces résultats du fait que NaOCl est le plus écotoxique des désinfectants étudiés et qu'il existe des intervalles importants entre son écotoxicité et celle des surfactants SDS et TX.

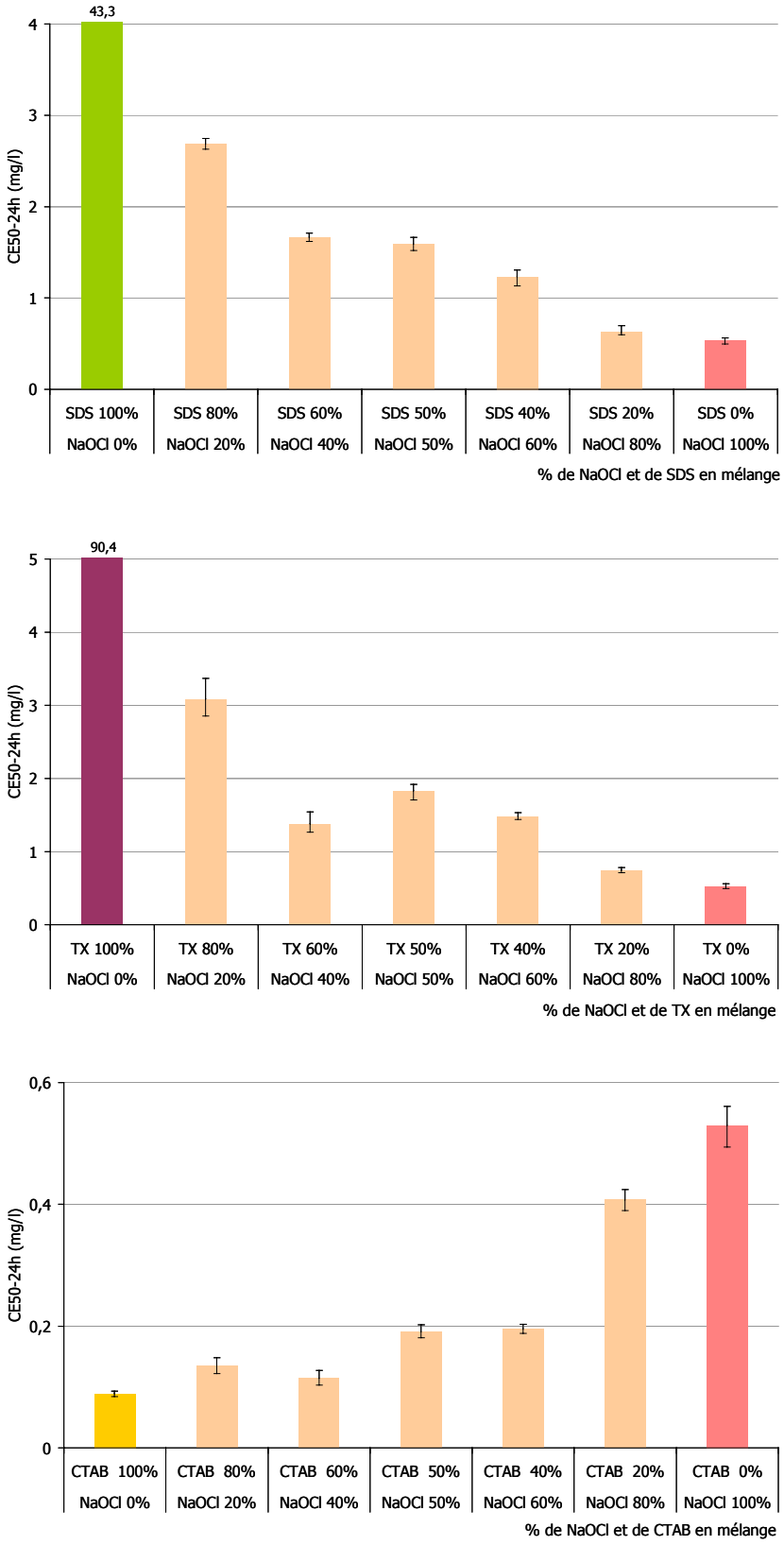


Figure 29 : CE50 et IC95 des mélanges NaOCl-surfactants vis-à-vis de la mobilité de *D. magna* en 24h

Remarque complémentaire

Au cours de la conduite des essais d'écotoxicité sur les mélanges NaOCl-SDS, des phénomènes plus ou moins marqués, que nous appellerons "double effet", ont été observés pour certains ratios et plus particulièrement pour le mélange NaOCl80-SDS20. La courbe d'effet augmente au début progressivement avec la concentration en mélange, puis le pourcentage d'effet diminue (alors que la concentration continue à augmenter) et augmente à nouveau finalement (Figure 30). Ce phénomène de "double effet" n'est pas décrit dans la littérature. Aussi, nous avons fait le choix d'entreprendre quelques investigations complémentaires afin de comprendre ce phénomène. Les résultats de ces expérimentations qui ne portent pas directement sur l'étude des effets combinés et sont donc détaillés en annexe 5.

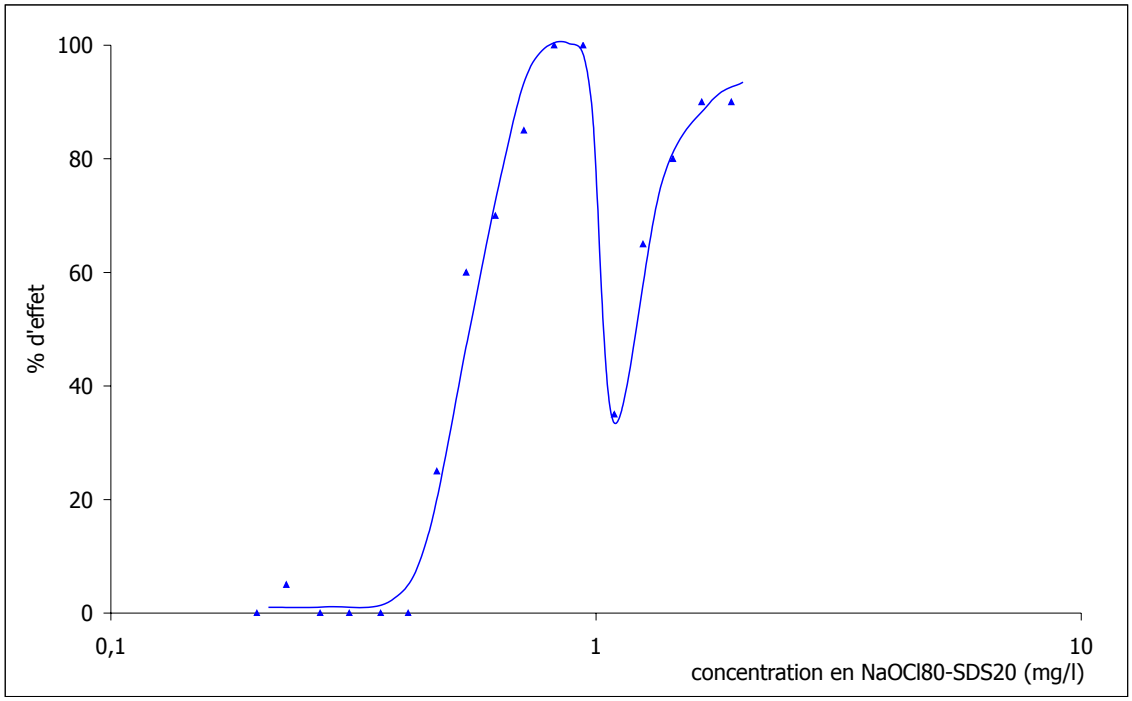


Figure 30 : Courbe concentration-effet du mélange NaOCl80-SDS20 vis-à-vis de *D. magna* : le "double effet"

2.4 Synthèse

Les histogrammes des CE50 des différents mélanges étudiés (Figure 27, 28 et 29), montrent une interdépendance entre les CE50 des mélanges, la quantité et l'écotoxicité des substances pures présentes dans les mélanges. Les CE50 des mélanges augmentent ainsi globalement, avec la proportion de la substance pure la moins écotoxique du mélange. Ces observations amènent à la conclusion qu'il n'y aurait à *priori* pas d'effet sensiblement important d'antagonisme ou de synergie entres les substances et vis-à-vis de la mobilité de *Daphnia magna* en 24h.

Le cas des mélanges APA-TX constituent une exception à ces résultats. Les CE50 de ces mélanges sont, pour tous les ratios étudiés, supérieures à celles de l'APA d'une part et du TX d'autre part. Il est intéressant de considérer, que c'est le cas pour lequel les substances en mélange ont le niveau de toxicité le plus proche ($CE50_{APA}$ = 109,7 mg/l, $CE50_{TX}$ = 90,4 mg/l).

Notons également le cas des mélanges GA20-SDS80 et APA80-SDS20 dont les CE50 sont significativement supérieures (relativement à leur IC95) aux CE50 des substances pures constituants ces mélanges. De manière opposée, la CE50 de NaOCl40-TX60 est significativement inférieure à celles des mélanges NaOCl20-TX80 et NaOCl50-TX50.

L'analyse des résultats dévoile des informations intéressantes en matière de degrés de toxicité. L'allure des histogrammes NaOCl-SDS, NaOCl-TX, GA-CTAB et APA-CTAB sont comparables avec des écarts très importants entre la CE50 de la substance pure la moins écotoxique du mélange et celles des mélanges. En considérant les facteurs de différences entre les CE50 des substances, on s'aperçoit que le NaOCl est environ 82 fois plus toxique que le SDS et 170 fois plus toxique que le TX, le CTAB est quant à lui 240 fois plus toxique que le GA et 1 232 fois plus toxique que l'APA. Alors que pour les autres mélanges, ces facteurs ne dépassent pas la valeur de 6 (cas du mélange NaOCl-CTAB). Les écarts de toxicité entre les substances pures auraient donc une influence sur l'écotoxicité des mélanges. Cela se retrouve pour tous les mélanges que l'on peut classer selon ces écarts (facteur entre la CE50 de la substance pure et celle du mélange) :

- facteur voisin de 1 : APA-TX.
- facteurs compris entre 2 et 6 : GA-SDS, GA-TX, APA-SDS, APA-TX et NaOCl-CTAB.
- facteurs supérieurs à 80 : GA-CTAB, APA-CTAB, NaOCl-SDS et NaOCl-TX.

Il faut enfin ajouter un point sur la validité de ces résultats. Les CE50 des mélanges sont toutes de bonne qualité puisque la totalité des coefficients de variation (CV) associés aux CE50 sont inférieures à 15% et que les 9/10ème sont même de très bonne qualité (CV < 10%).

3. Étude des effets combinés des mélanges en ratios 50-50 *via* les modèles IA et CA

Les Figures 31, 32 et 33 présentent les courbes concentrations-effets des mélanges en ratios 50-50 modélisées par le logiciel Regtox à partir des résultats expérimentaux des essais d'inhibition de la mobilité de *D. magna* en 24 heures. Elles comparent ces résultats aux courbes modélisées via l'IA et la CA. Rappelons que les courbes concentrations-effets modélisées par l'IA et la CA sont obtenues à partir de celles des substances pures composant le mélange (partie 1, page 63).

3.1 Les mélanges GA-surfactants

L'allure des courbes concentrations-effets expérimentales et modélisées via l'IA et la CA est complètement différente d'un mélange à l'autre (Figure 31).

La courbe concentrations-effets du mélange GA50-SDS50, se superpose presque totalement au modèle IA. Quel que soit le pourcentage d'effet observé, il y a donc une additivité des effets ou un antagonisme des concentrations.

La courbe concentrations-effets du mélange GA50-TX50 se situe globalement à de plus fortes concentrations que les modèles IA et CA. Il y a un antagonisme (des concentrations et des effets) dans le cas de ce mélange, et cela quel que soit le pourcentage d'effet observé.

La courbe concentrations-effets du mélange GA50-CTAB50 se positionne à de plus faibles concentrations de mélanges que les courbes des modèles IA et CA entre 0% et 20% d'effet, et à de plus fortes concentrations entre 20% et 100% d'effet. En conséquence, le mélange présente une synergie (des effets et des concentrations) entre 0% et 20% d'effet et un antagonisme (des effets et des concentrations) entre 20% et 100% d'effet.

Intéressons-nous au positionnement des courbes concentrations-effets des modèles IA et CA relativement aux concentrations des mélanges. Deux phénomènes sont observés ici. Dans le cas des mélanges GA50-SDS50 et GA50-TX50, les courbes de CA s'agencent à de plus faibles concentrations (plus écotoxique) que les courbes d'IA. La modélisation des effets de ces mélanges par la CA surestime donc l'écotoxicité par rapport à l'IA, elle est ainsi plus "protectrice". Alors que dans le cas du mélange GA50-CTAB50, les courbes d'IA et de CA se superposent. Les modèles (i) sous-estiment l'écotoxicité du mélange pour les faibles pourcentages d'effet et (ii), la surestiment dans les autres cas.

Notons enfin que les courbes concentrations-effets des différents mélanges paraissent relativement proches des courbes d'IA et de CA.

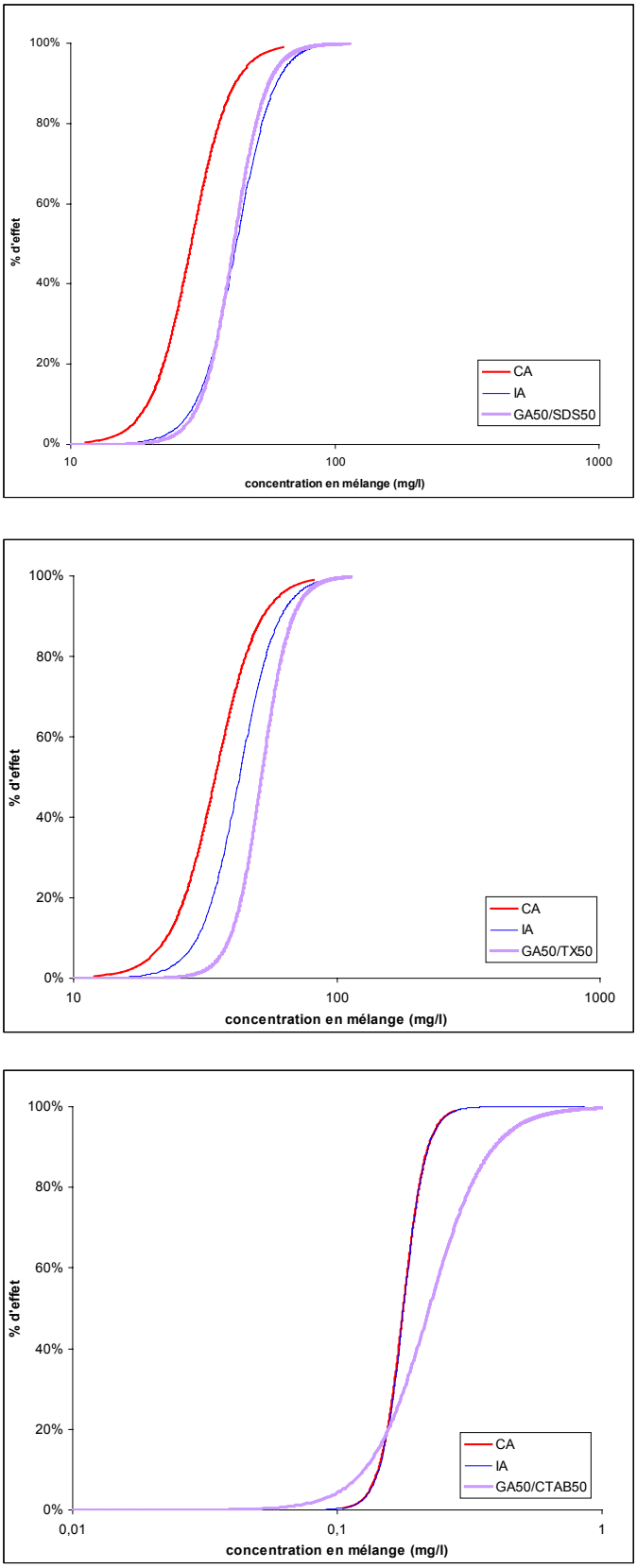


Figure 31 : Courbes concentrations-effets CA/IA des mélanges GA50-surfactants50

3.2 Les mélanges APA-surfactants

L'allure des courbes concentrations-effets expérimentales et modélisées via l'IA et la CA est complètement différente d'un mélange à l'autre (Figure 32).

La courbe concentrations-effets du mélange APA50-SDS50, se superpose au modèle CA entre environ 0% et 5% d'effet et au modèle IA entre 90% et 100% d'effet. Il y a donc (i) additivité des concentrations ou synergie des effets entre 0% et 5% d'effet ; (ii) antagonisme des concentrations ou synergie des effets entre 5% et 90% d'effet et finalement ; (iii) antagonisme des concentrations ou additivité des effets entre 90% et 100% d'effet pour le mélange APA50-SDS50.

La courbe concentrations-effets du mélange APA50-TX50 se positionne à de plus fortes concentrations de mélange que les modèles IA et CA. Il y a donc un antagonisme (des concentrations et des effets) dans le cas de ce mélange, et cela quel que soit le pourcentage d'effet observé.

La courbe concentrations-effets du mélange APA50-CTAB50 se situe à de plus faibles concentrations de mélange que l'IA et la CA entre 0% et 80% d'effet et à de plus fortes concentrations de mélange entre 80% et 100% d'effet. Le mélange présente donc (i) une synergie (des effets et des concentrations) entre 0% et 80% d'effet et (ii), un antagonisme (des effets et des concentrations) entre 80% et 100% d'effet.

Intéressons-nous au positionnement des courbes concentrations-effets des modèles IA et CA relativement au concentration des mélanges. Deux phénomènes sont observés ici. Dans le cas des mélanges APA50-SDS50 et APA50-TX50, les courbes de CA s'agencent à de plus faibles concentrations (plus écotoxique) que les courbes d'IA. La modélisation des effets de ces mélanges par la CA surestime donc l'écotoxicité par rapport à l'IA, et est ainsi plus "protectrice". Alors que les courbes d'IA et de CA se superposent, dans le cas du mélange APA50-CTAB50 et les modèles sous-estiment donc l'écotoxicité du mélange Les modèles surestiment l'écotoxicité du mélange pour les forts pourcentages d'effet et la sous-estime dans les autres cas.

Il faut enfin noter que les courbes concentrations-effets des différents mélanges, paraissent relativement proches des courbes d'IA et de CA.

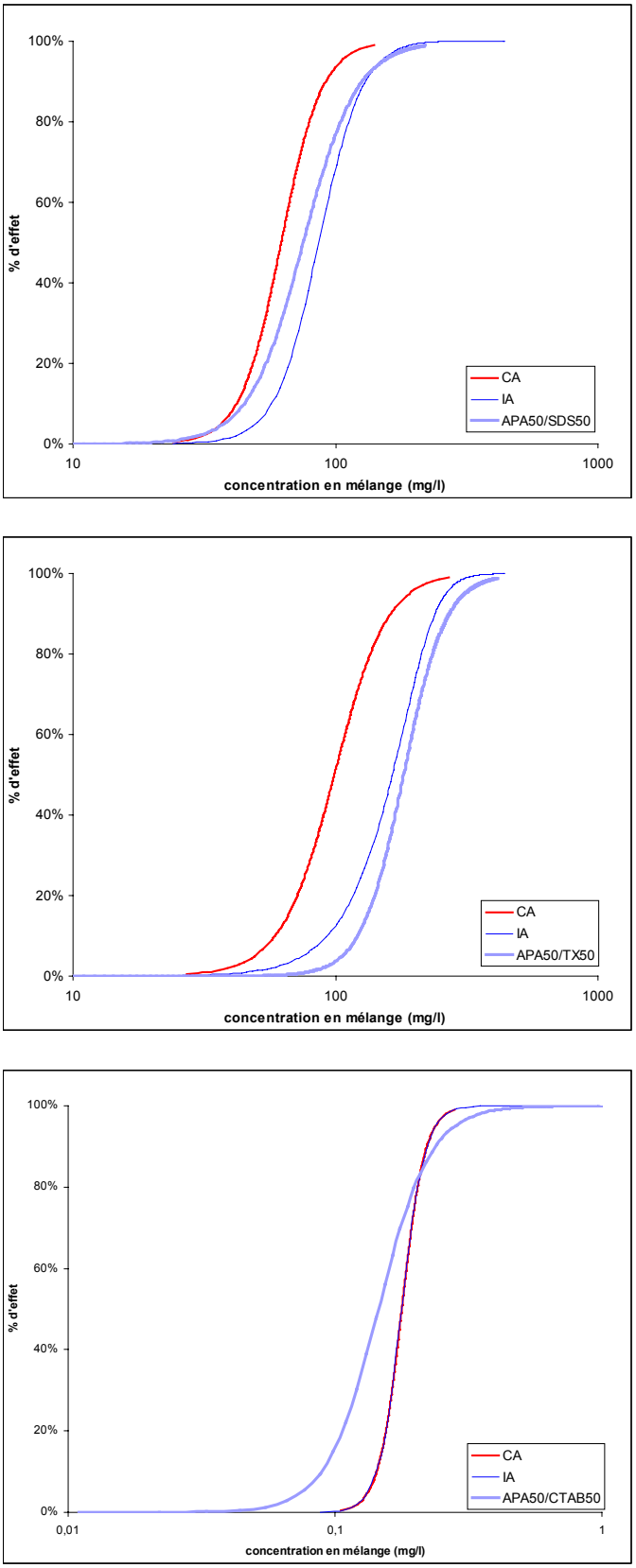


Figure 32 : Courbes concentrations-effets CA/IA des mélanges APA50-surfactants50

3.3 Les mélanges NaOCl-surfactants

L'allure des courbes concentrations-effets expérimentales et modélisées via l'IA et la CA est complètement différente d'un mélange à l'autre (Figure 33).

Dans le cas des mélanges NaOCl50-SDS50 et NaOCl50-TX50, les courbes concentrations-effets du mélange se positionnent à de plus fortes concentrations que l'IA et la CA. Les deux mélanges présentent donc, de manière globale, un antagonisme (des concentrations et des effets), quel que soit le pourcentage d'effet observé.

La courbe concentrations-effets du mélange NaOCl50-CTAB50 se situe à de plus fortes concentrations de mélange que les modèles IA et CA. Il y a donc un antagonisme (des concentrations et des effets) dans le cas de ce mélange, et cela quel que soit le pourcentage d'effet observé.

Intéressons-nous à l'emplacement des courbes concentrations-effets modélisées via l'IA et la CA, relativement aux concentrations des mélanges. Deux phénomènes sont observés ici. Dans le cas des mélanges NaOCl50-SDS50 et NaOCl50-TX50, les courbes d'IA et de CA se superposent et proposent donc la même estimation des réponses des mélanges qui est surestimée. Alors que dans le cas de NaOCl50-CTAB50, la courbe modélisée via la CA se positionne à de plus faibles concentrations de mélange (plus écotoxique) que la courbe du modèle IA. La modélisation des effets de ces mélanges par la CA surestime donc l'écotoxicité par rapport à l'IA, et est donc plus "protectrice".

Notons enfin que les courbes concentrations-effets paraissent relativement proches des courbes d'IA et de CA.

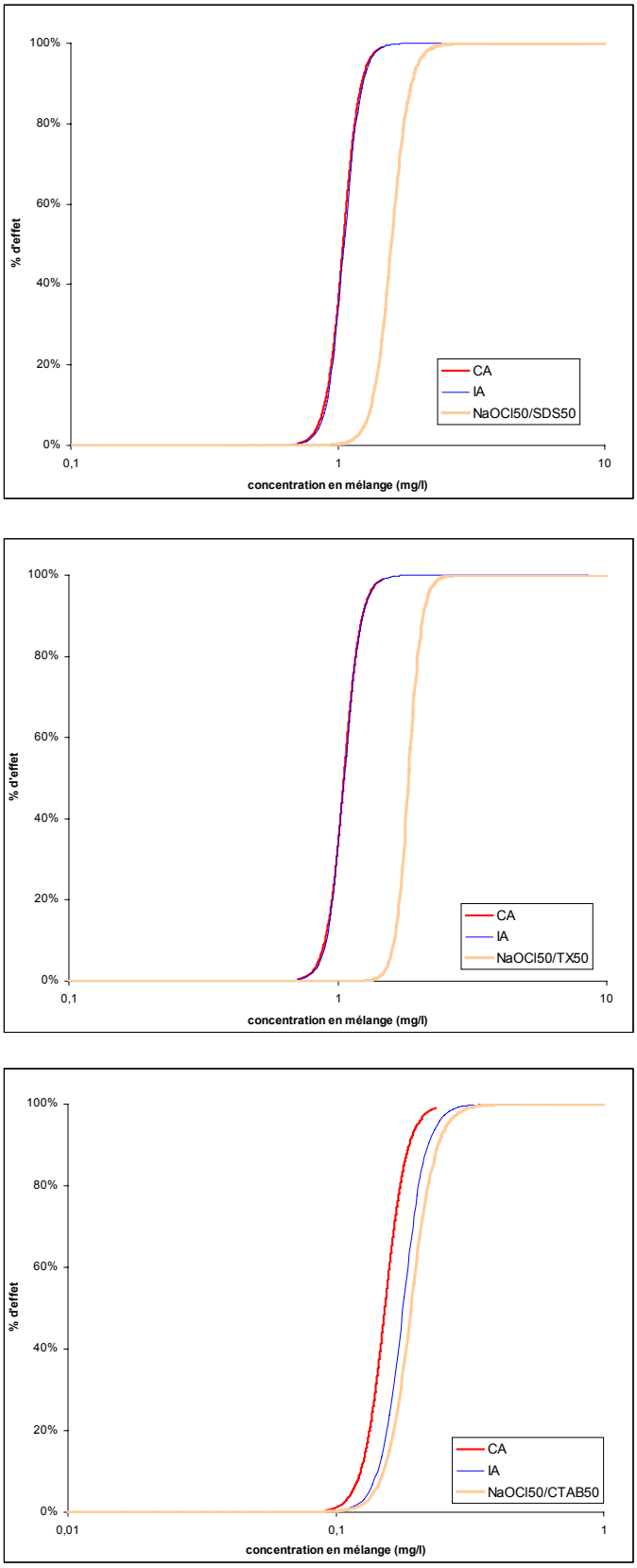


Figure 33 : Courbes concentrations-effets CA/IA des mélanges NaOCl50-surfactants50

3.4 Synthèse

Exception faite du mélange GA50-SDS50 qui se cale approximativement sur le modèle IA, l'ensemble des mélanges 50-50 étudiées ne s'ajuste ni au modèle CA, ni au model IA (Figure 34). Il n'est donc pas possible d'émettre d'hypothèses quant aux modes d'action, des substances en mélange (concentration ou effet) à l'aide des modèles (IA et CA).

Dans seulement trois cas sur neuf (GA50-CTAB50, APA50-SDS50 et APA50-CTAB50), les courbes concentrations-effets des mélanges coupent celles de IA et/ou de CA. Ces trois cas s'appliquent aux forts (supérieure à 80%) et faibles (inférieure à 20%) pourcentages d'effet, lorsque les valeurs des courbes concentrations-effets sont les moins fiables d'un point de vu statistiques.

Concernant le positionnent des courbes modélisées via l'IA et la CA relativement aux concentrations des mélanges (et donc du niveau de toxicité), dans cinq cas sur neuf CA se situe à de plus faibles concentrations de mélange. Tandis que dans les autres cas, les courbes d'IA et de CA se superposent. Le modèle CA s'avère donc être plus "protecteur" dans l'estimation de la réponse des mélanges. Notons tout de même qu'une partie des courbes concentrations-effets des mélanges GA50-CTAB50 et APA50-CTAB50, se situe à de plus faibles concentrations de mélange que la CA (plus écotoxique). Dans ces deux cas, le modèle CA sous-estime donc encore les réponses des mélanges.

Notons enfin que les courbes concentrations-effets des mélanges restent relativement proches des deux modèles CA et IA.

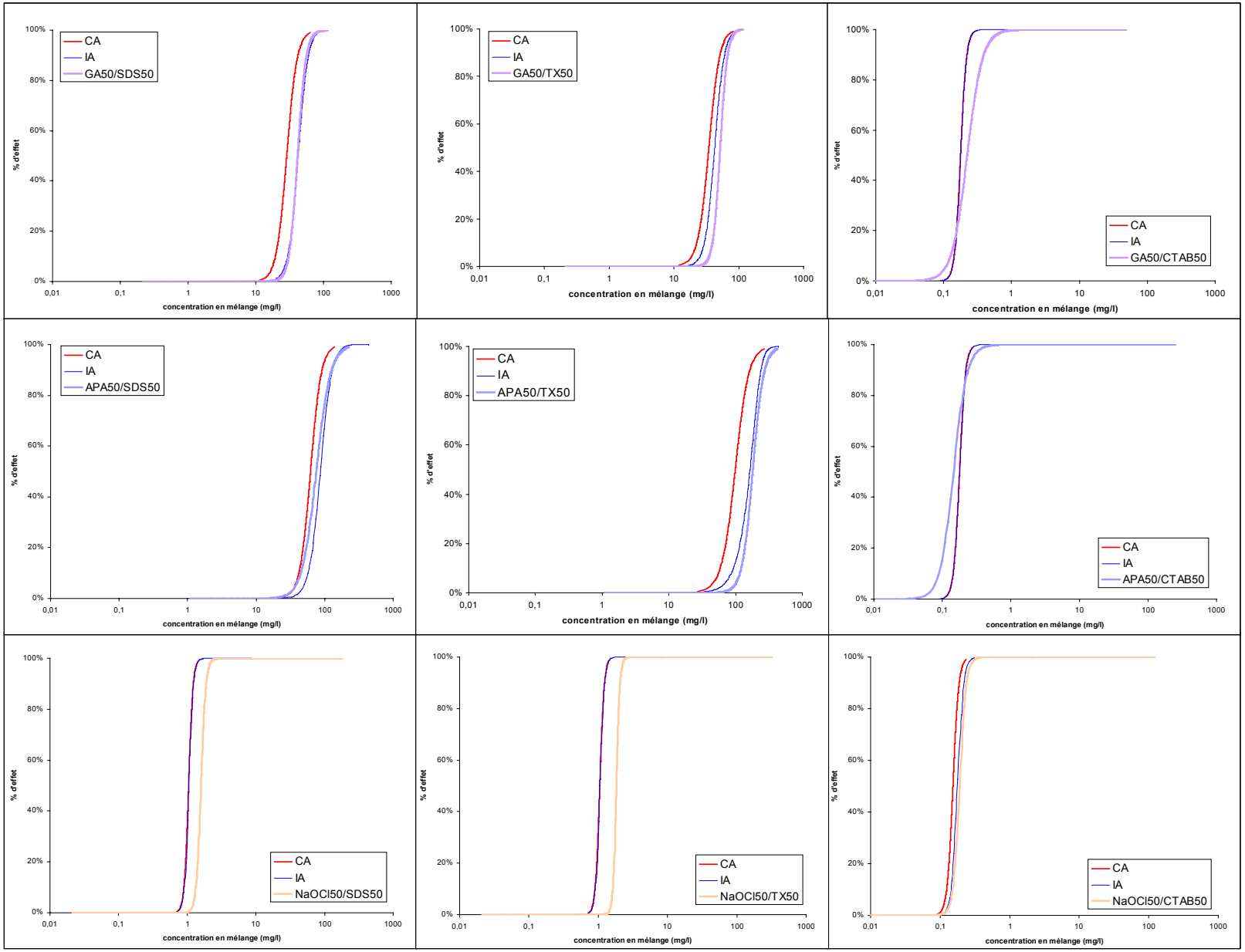


Figure 34 : Courbes concentrations-effets des mélanges en ratio 50-50, comparées aux courbes théoriques CA et IA

4. Étude des effets combinés des mélanges à la CE50 *via* le modèle des TI

Rappelons tout d'abord que les TI des mélanges sont calculés à partir de l'équation 7 (voir page 67) qui repose sur les CE50 des mélanges et des substances pures (Tableau 30) et les pourcentages de substances en mélanges. Ces TI sont ensuite présentés sous forme d'histogrammes (Figure 35, 36 et 37).

4.1 TI des mélanges GA-surfactants

En tenant compte de leurs intervalles de confiance, les TI des mélanges GA-surfactants sont compris entre 0,8 et 2,4 (Figure 35) et sont donc tous proches de 1. En fonction des mélanges, les TI varient globalement de la manière suivante (des plus importantes aux plus faibles) : GA-TX > GA-SDS > GA-CTAB. Les TI des mélanges GA-TX sont compris entre 1,5 et 1,8 (entre 1,3 et 2,4 en tenant compte des IC95), ceux des mélanges GA-SDS entre 1,1 et 1,5 (entre 1,0 et 1,8 en tenant compte des IC95) et ceux des mélanges GA-CTAB entre 0,9 et 1,3 (entre 0,8 et 1,5 en tenant compte des IC95).

La majorité des TI et de leurs intervalles de confiance sont donc supérieurs et proches de 1, ce qui dénoterait de légers effets d'antagonismes des concentrations. La valeur de 1 est même inclue dans les intervalles de confiance des TI des quatre mélanges suivants : GA80-SDS20, GA20-CTAB80, GA40-CTAB60 et GA80-CTAB20. Pour ces mélanges il y aurait donc additivité des concentrations.

Pour le reste, aucune relation logique n'existe entre les valeurs des TI et les proportions de substances en mélange. Il n'y aurait donc pas de corrélation entre ces deux données.

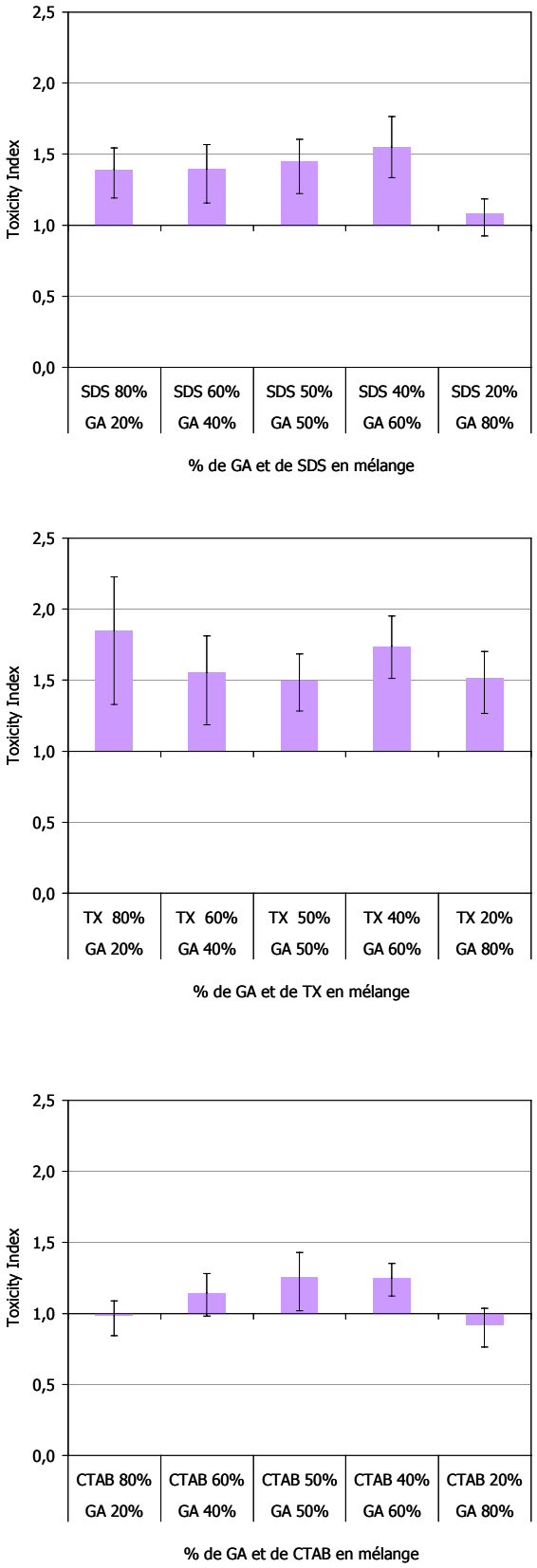


Figure 35 : TI et intervalles de confiance des mélanges GA-surfactants à la CE50

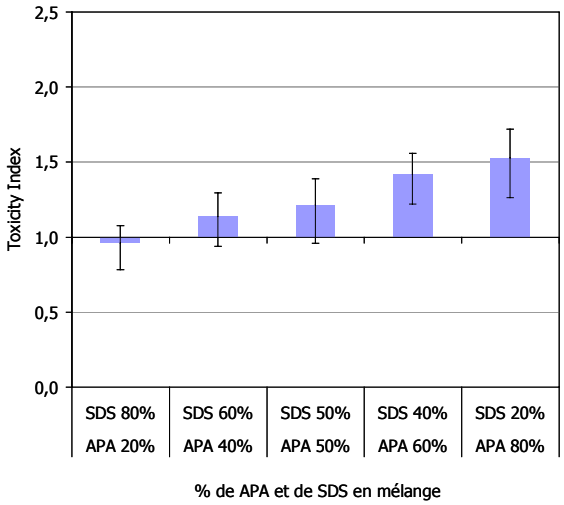
4.2 TI des mélanges APA-surfactants

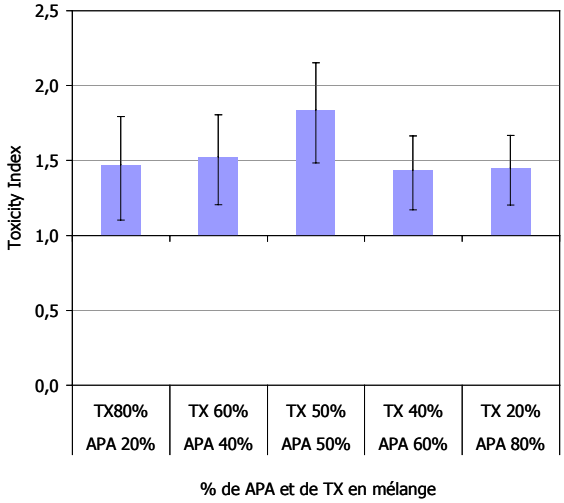
En tenant compte de leurs intervalles de confiance, les TI des mélanges APA-surfactants sont compris entre 0,6 et 2,2 (Figure 36) et sont donc touts proches de 1. En fonction des mélanges, les TI varient globalement de la manière suivante (des plus importantes aux plus faibles) : APA-TX > APA-SDS > APA-CTAB. Les TI des mélanges APA-TX sont compris entre 1,4 et 1,8 (entre 1,1 et 2,2 en tenant compte des IC95), ceux des mélanges APA-SDS entre 1,1 et 1,5 (entre 0,8 et 1,8 en tenant compte des IC95) et ceux des mélanges APA-CTAB entre 0,7 et 1,0 (entre 0,6 et 1,1 en tenant compte des IC95).

Près de la moitié des TI calculés (encadrés de leurs intervalles de confiance) sont supérieurs et proches de 1, ce qui montrerait de légers effets d'antagonismes des concentrations.

La valeur de 1 est même inclue dans les intervalles de confiance des TI calculés pour quatre des cinq mélanges étudiés : APA20-SDS80, APA40-SDS60, APA50-SDS50 et APA20-CTAB80. Pour ces mélanges il y aurait donc additivité des concentrations. Pour les quatre autres mélanges à bases de CTAB (c'est-à-dire 60%, 50%, 40% et 20%), les TI calculés encadrés de leurs intervalles de confiance sont inférieures et proches de 1, ce qui dénoterait de légers effets de synergie des concentrations.

Dans le cas des mélanges APA-SDS, les TI augmentent avec la proportion d'APA en mélange alors que pour les mélanges APA-TX, on retrouve la forme de cloche observées lors de l'analyse des résultats des CE50 des mélanges (Figure 28). Par contre, dans le cas des mélanges APA-CTAB, aucune relation logique n'existe entre les valeurs des TI et les proportions de substances en mélange.





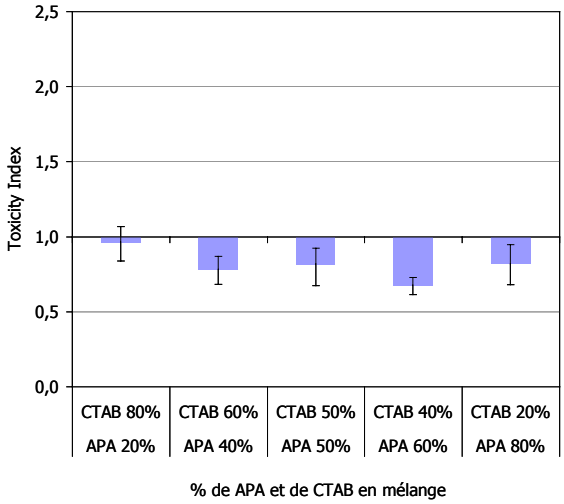


Figure 36 : TI et intervalles de confiance des mélanges APA-surfactants à la CE50

4.3 TI des mélanges NaOCl-surfactants

En tenant compte de leurs intervalles de confiance, les TI des mélanges NaOCl-surfactants sont compris entre 0,9 et 1,7 (Figure 37). Il est difficile d'établir une classification des valeurs des TI en fonction des surfactants comme il a été fait pour les autres mélanges. Les TI des mélanges NaOCl-SDS sont compris entre 0,9 et 1,5 (entre 0,9 et 1,7 en tenant compte des IC95), ceux des mélanges NaOCl-TX entre 1,1 et 1,7 (entre 0,9 et 2,0 en tenant compte des IC95) et ceux des mélanges NaOCl-CTAB entre 0,9 et 1,5 (entre 0,7 et 1,7 en tenant compte des IC95).

Un peu plus de la moitié des TI calculés, encadrés de leurs intervalles de confiance, sont supérieurs et proches de 1, ce qui dénoterait de légers effets d'antagonismes des concentrations. Pour six des quinze mélanges : NaOCl20-SDS80, NaOCl80-SDS20, NaOCl20-TX80, NaOCl40-TX60, NaOCl80-TX20 et NaOCl60-CTAB40, les intervalles de confiance des TI incluent la valeur de 1. Pour ces mélanges il y aurait donc additivité des concentrations. Concernant le mélange NaOCl40-CTAB60, son TI (encadrés de son intervalle de confiance) est inférieure et proche de 1, ce qui signalerait de légers effets de synergie des concentrations.

Pour le reste, dans le cas des mélanges APA-CTAB, aucune relation logique n'existe entre les valeurs des TI et les proportions de substances en mélange.

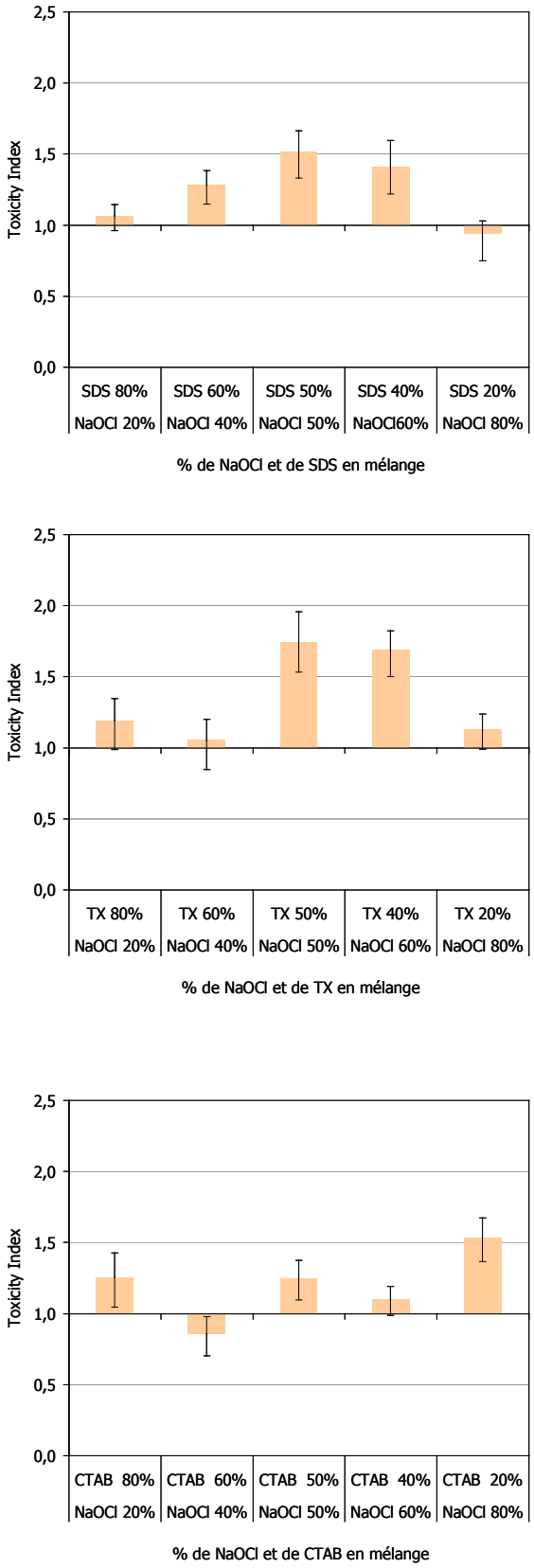


Figure 37 : TI et intervalles de confiance des mélanges NaOCl-surfactants à la CE50

4.4 Synthèse

Tous mélanges confondus, les valeurs de TI calculées sont comprises entre 0,7 et 1,8 (entre 0,6 et 2,4 lorsque l'on tient compte des intervalles de confiance).

Les TI sont donc relativement tous proches de 1. Sur l'ensemble des données traitées (45 mélanges), seulement deux valeurs sortent de l'intervalle [0,5-2,0]. Il s'agit des intervalles de confiance des mélanges APA50-TX50 et GA20-TX80.

Les effets combinés des mélanges à base de TX et de SDS présentent donc de légers effets d'antagonismes des concentrations, alors que dans le cas de CTAB, ils présentent plutôt une additivité des concentrations voir de légers effets de synergie des concentrations.

Notons enfin que même si les mélanges à base de NaOCl relativise ce résultat, les valeurs des TI peuvent être classifiées en fonction du type de surfactant (des plus importantes aux plus faibles) : TX > SDS > CTAB.

5. Synthèse générale : les effets combinés des mélanges désinfectants-surfactants

5.1 Validation des résultats

La précision des mesures a été évaluée par l'intermédiaire des coefficients de variation, pour la totalité des CE50 des substances pures et des mélanges. Les calculs ont montré que les données issues des essais d'inhibition de la mobilité de *D. magna* en 24 heures sont toutes de bonne qualité (CV<15%). Ce résultat permet donc de valider l'ensemble de nos résultats.

5.2 Effets combinés des mélanges désinfectants-surfactants

L'analyse des CE50 des différents mélanges a révélé que les CE50 des mélanges varient à peu près proportionnellement au pourcentage de substances en mélange et à leur écotoxicité. Cette observation nous a alors conduit à l'hypothèse suivante : Il n'y aurait *a priori* pas d'effet sensiblement important d'antagonisme ou de synergie entres substances et vis-à-vis de la mobilité de *Daphnia magna* en 24h.

La comparaison des courbes concentrations-effets des mélanges en ratio 50-50, avec les courbes théoriques obtenues à partir des modèles IA et CA a montré pour sa part, que les mélanges ne suivent ni l'un, ni l'autre des modèles mais en sont relativement proches. Nous observons que dans la majorité des cas la CA surestime l'écotoxicité des mélanges alors que l'IA sous-estime ou surestime l'écotoxicité des mélanges (dans six cas le mélange s'est révélé moins écotoxique que ne le prédit l'IA). En conséquence, l'estimation de l'écotoxicité de ces mélanges par le modèle CA assure une protection quant aux légers effets de synergie pouvant se produirent. Dans quelques cas, les courbes concentrations-effets des mélanges coupent celles des modèles aux forts et/ou faibles pourcentages d'effet, lorsque les valeurs des courbes concentrations-effets sont les moins fiables d'un point de vu statistique. Nous pouvons donc considérer que la réponse des mélanges par rapports aux modèles, est identique quelque soit le pourcentage d'effet considéré (CE50, CE20, etc.). Ce résultat renforce notre choix méthodologique de traitement des résultats *via* le modèle des TI, qui à uniquement été fait sur les CE50 des mélanges.

Pour les mélanges à base de GA et d'APA, l'importance des effets combinés en fonction du type de surfactant à pu être classée, par ordre décroissant : TX > SDS > CTAB. Elle correspond au classement des substances en fonction de leur écotoxicité. Il semble donc qu'en

cas de niveaux de toxicité très différents des substances en mélanges, la substance la plus toxique joue un rôle plus important dans la toxicité du mélange.

Les résultats obtenus à partir du modèle des TI confirment notre hypothèse : les effets combinés des mélanges étudiés vis-à-vis de *D. magna,* sont très faibles voir inexistants. Sur les 45 mélanges étudiés via ce modèle, seulement deux intervalles de confiance (ceux des mélanges APA50-TX50 et GA20-TX80) sont très légèrement supérieurs à 2,0.

En définitive, les différents résultats analysés permettent de conclure qu'il n'y aurait a priori pas d'effet sensiblement important d'antagonisme ou de synergie (des concentrations et des effets) dans les mélanges de désinfectants/surfactants étudiés vis-à-vis de la mobilité de Daphnia magna en 24h.

Le modèle CA apparaît être le plus approprié pour estimer la toxicité des mélanges étudiés vis-à-vis de ce bioessai.

Chapitre 2.

Effets d'un effluent hospitalier vis-à-vis de différents organismes aquatiques

Rappelons tout d'abord que ce chapitre vise à caractériser les effets d'un effluent hospitalier d'une grande ville du Sud-Est de la France vis-à-vis de différents organismes des écosystèmes aquatiques. Comme présenté dans la partie matériels et méthodes, cette caractérisation se base sur trois points qui forment les sections principales de ce chapitre.

Après la première section consacrée à l'analyse des résultats de la caractérisation physico-chimique et microbiologique de l'effluent, nous détaillerons les réponses des batteries de bioessais mono-spécifiques et du bioessai périphyton (pluri-spécifique).

Notons que les résultats de ce chapitre seront utilisés dans le chapitre suivant pour la caractérisation des effets par les différents types d'approches présentées dans la revue bibliographique (substances, substances avec effets combinés, batterie de bioessais mono-spécifiques et bioessai pluri-spécifique).

1. Caractérisation détaillée des échantillons (physico-chimie et microbiologie)

1.1 Mesures de terrain

1.1.1 Suivi des débits

La courbe d'évolution des débits au cours de la période de prélèvement est présentée sur la Figure 38. Le débit est caractéristique d'une journée normale d'activité de l'hôpital (données internes). Il augmente progressivement à partir de 5h-6h pour atteindre son maximum vers 10h (45,3 m^3/h), puis il diminue pour atteindre son minimum vers 3h (17,4 m^3/h) et reste relativement stable jusqu'à environ 7h-8h. Les débits moyens des différentes tranches horaires pour lesquels les échantillons périodiques ont été prélevés retracent cette évolution :

- 13h - 17h : 33,0 m^3/h
- 17h - 23h : 24,1 m^3/h
- 23h - 5h : 19,5 m^3/h
- 5h - 9h : 28,5 m^3/h
- 9h - 13h : 36,4 m^3/h

Le débit moyen d'effluent, au cours de la journée de prélèvement est de 27,3 m^3/h. Un volume total de 651,6 m^3 d'effluent a été enregistré sur les 24 heures.

Il est à noter que le débit des effluents n'a pas été affecté par les eaux pluviales puisque le temps a été sec pendant toute la durée du prélèvement et les jours précédents.

1.1.2 Suivi de la température

La Figure 38 associe le graphique des variations des débits à celui des températures. L'évolution de ces deux graphiques est proche. La température augmente progressivement à partir de 5-6h puis, plus brutalement à partir de 7h30, pour atteindre son maximum vers 10h (18,7°C), moment à partir duquel elle diminue progressivement pour atteindre son minimum vers 23h (13,3°C) et pour toute la nuit jusqu'à environ 5h.

La température moyenne des effluents est de 15,5°C au cours de la période totale de prélèvement.

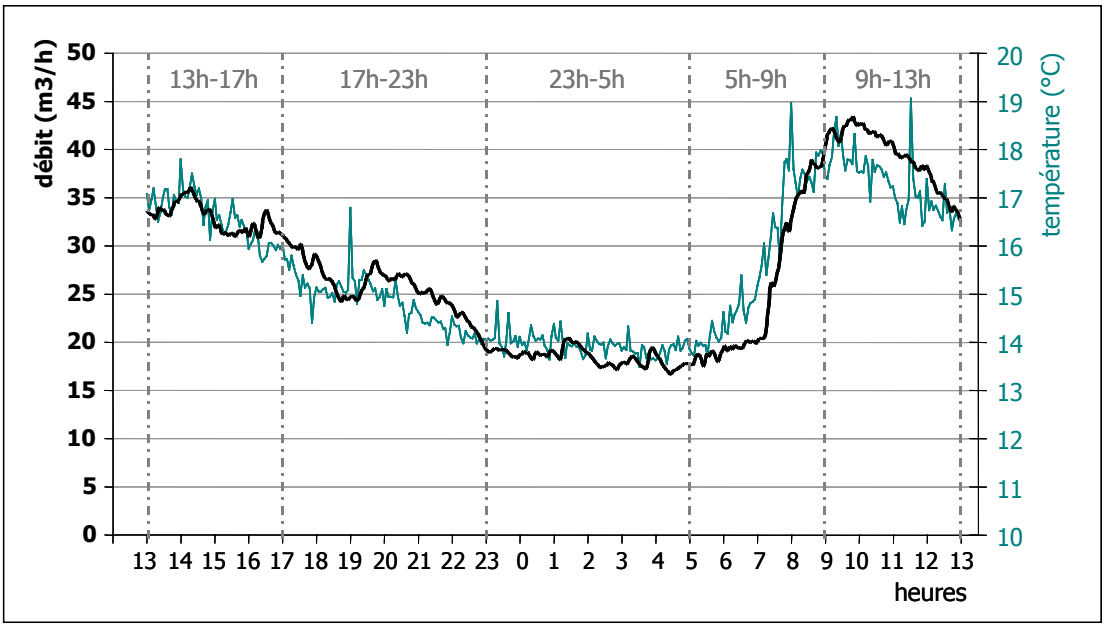


Figure 38 : Suivi des débits et des températures de l'effluent au cours de la période de prélèvement

1.1.3 Suivi du pH

L'évolution du pH au cours de la journée (Figure 39) ne suit pas sur celle des débits et de la température. Il reste stable (7,5 - 8) sur la période 23h-5h, fluctue un peu sur les périodes 5h-9h et 17h-23h et de manière beaucoup plus importante sur les périodes 9h-13h et 13h-17h. Le pic le plus important a été enregistré entre 11h30 et 12h. Le pH moyen est de 7,9. Celui-ci varie entre 6,9 et 9,1 au cours de l'ensemble du prélèvement.

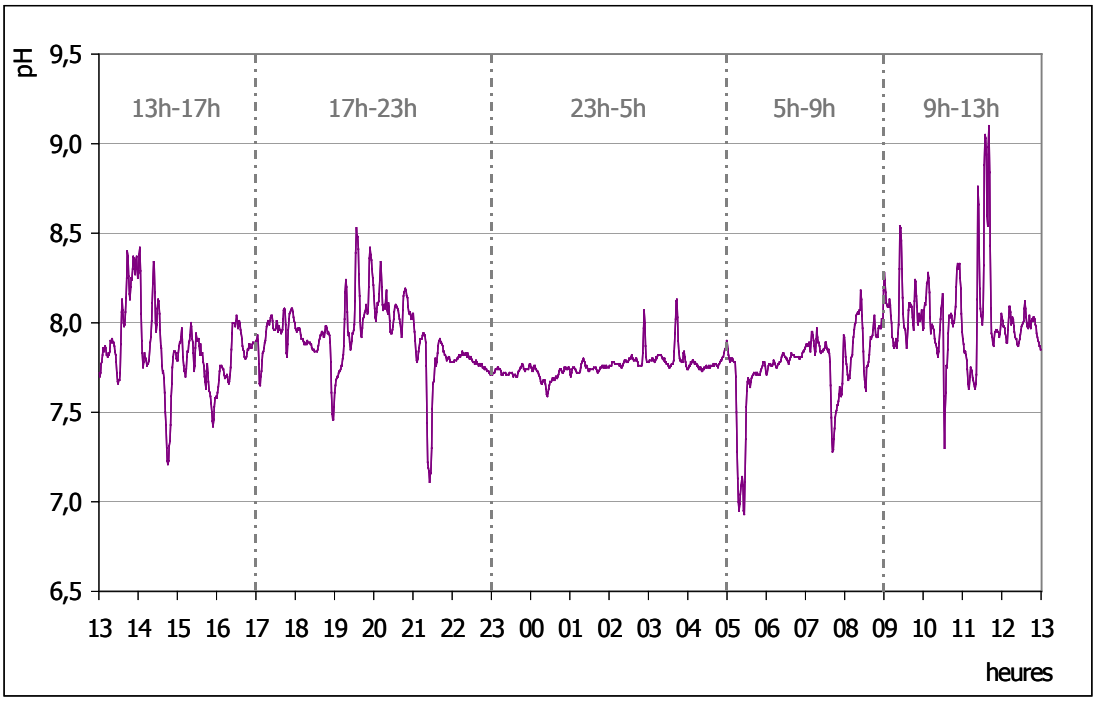


Figure 39 : Suivi du pH de l'effluent au cours de la période de prélèvement

1.1.4 Couleur des échantillons

La couleur des échantillons diffère suivant les périodes de la journée de prélèvement (Figure 40). Une couleur très légèrement ocre se décline en différentes nuances et permet de classer les échantillons (du plus foncé au plus clair) : 13h-17h ≈ 9h-13h > 5h-9h > 17h-23h > 23h-5h.

La couleur de l'échantillon moyen correspond quant à elle, relativement bien à la couleur moyenne des échantillons périodiques.

Ces différences de couleurs pourraient être attribuer à l'apport de matière organique qui est plus important au cours de la journée.

Figure 40 : Photos des échantillons périodiques et de l'échantillon moyen-24h

1.2 Caractérisation physico-chimique

Les résultats des analyses physico-chimiques sont présentés ci-après en deux étapes : (i) les paramètres analysés sur tous les échantillons (paramètres communs), et (ii) les paramètres analysés uniquement sur l'échantillon moyen.

1.2.1 Paramètres communs aux échantillons périodiques et à l'échantillon moyen

Le Tableau 31 présente les résultats des analyses communes aux échantillons périodiques et à l'échantillon moyen, comparés aux caractéristiques des effluents domestiques.

paramètres	unités	13-17h	17-23h	23-5h	5-9h	9-13h	moyen-24h	effluent domestique*
pH (mesure en laboratoire)	-	8,1	7,9	7,7	8,1	7,9	8,0	7,5 - 8,5
potentiel redox	mV	85	115	117	113	64	96	100
conductivité	µS/cm	990	830	670	1000	960	970	900 - 1300**
DCO	mg/l	270	130	43	200	250	200	300 - 1000
DBO5	mg/l	120	47	15	79	120	98	100 - 400
rapport DCO/DBO5	-	2,3	2,8	2,9	2,5	2,1	2,0	
COT	mg/l	82	36	16	50	82	70	100 - 300
MES	mg/l	80	40	50	50	60	60	150 - 500
ammonium	mg/l	54	34	19	36	32	48	20 - 80
chlorures	mg/l	70	61	48	120	87	80	-
chlore libre	mg/l	0,317	0,146	0,09	0,181	0,282	0,547	-
AOX	mg/l	0,48	0,25	0,18	0,82	0,18	0,55	-
détergents nonioniques	mg/l	3,6	<0,5	0,65	2,8	5,8	2,9	-
acétaldéhyde	µg/l	12	3,0	21	3,9	6,8	5,9	-
glutaraldéhyde	µg/l	3,9	<1	<1	<1	2,1	2,1	-

Tableau 31 : Résultats des analyses physico-chimiques communes aux échantillons périodiques et à l'échantillon moyen, comparés aux caractéristiques des effluents domestiques
[*[DEGREMONT, 1989] ; **[Rejsek, 2002]]

1.2.11 Le pH

Les pH mesurés au laboratoire correspondent relativement bien à ceux mesurés sur le terrain (paragraphe 1.1.3 page 153). Ceci montre que les échantillons ont peu évolué entre le terrain et le laboratoire. Ils sont compris dans l'intervalle 7,7 à 8,1 et correspondent donc à la moyenne des effluents domestiques [DEGREMONT, 1989].

1.2.12 Le potentiel redox

Les valeurs mesurées dans les échantillons sont comprises entre 85 et 117 mV. Notons que le potentiel redox des échantillons 17h-23h, 23-5h et 5h-9h (respectivement 115, 117 et 113 mV) sont supérieurs à celui mesuré habituellement dans les effluents domestiques (100 mV - Tableau 31). Le potentiel redox quantifie les réactions d'oxydation et de réduction qui correspondent au transfert d'électrons entre des composés chimiques présents dans un milieu. Les valeurs positives mesurées témoignent d'un milieu globalement oxydant.

Les mesures du potentiel redox et du pH nous ont également permis de calculer le pouvoir d'oxydoréduction (rH) de nos effluents [Rejsek, 2002].

$$rH \text{ (sans dimension)} = \text{potentiel redox (mV)} / 0{,}029 + 2\ pH \qquad \text{(eq. 24)}$$

Les valeurs calculées sont relativement similaires et toutes comprises entre 18 et 20,1 (Tableau 32). Selon Rejsek [2002], cela signifie que le milieu est aérobie et favorise l'oxydation des composés organiques et minéraux.

échantillons	13-17h	17-23h	23-5h	5-9h	9-13h	moyen-24h
rH	19,1	19,8	19,4	20,1	18,0	19,3

Tableau 32 : Calcul du pouvoir d'oxydoréduction des échantillons

1.2.13 La conductivité

Pour les échantillons prélevés, la conductivité varie entre 670 et 1000 µS/cm. Elle est relativement faible et inférieure aux valeurs moyennes des effluent urbains pour les échantillons 17h-23h (830 µS/cm) et 23h-5h (670 µS/cm). Elle est par contre, bien plus élevée, et dans la moyenne des effluents urbains, pour les autres périodes, ainsi que pour l'échantillon moyen (autour de 900-1000 µS/cm). Cela traduit que les échantillons 17h-23h et 23h-5h ont une charge ionique (minérale et/ou organique) moins importantes que les autres échantillons.

1.2.14 La DCO et la DBO5

Les valeurs de DCO mesurées dans les effluents (43 à 270 mg/l) sont faibles par rapport à un effluent urbain classique (entre 300 et 1000 mg/l - DEGREMONT, 1989; Metcalf et Eddy, 2003). Les échantillons 17h-23h et 23h-5h (respectivement 130 et 43 mg/l) correspondent aux plus faibles DCO et donc aux échantillons dont la concentration de substances organiques oxydables est la plus faible. La valeur de DCO la plus importante est de 270 mg/l pour l'échantillon 13h-17h.

Les concentrations en DBO5 mesurées dans les effluents (15 à 120 mg/l) sont relativement faibles par rapport à un effluent urbain classique (entre 100 et 400mg/l - DEGREMONT, 1989; Metcalf et Eddy, 2003). Les résultats varient dans le même sens que ceux de la DCO. Les échantillons 17h-23h et 23h-5h (respectivement 47 et 15 mg/l) correspondent aux plus faibles DBO5 et donc aux plus faibles concentrations en matière organique fermentescible par voie biologique. La valeur maximale est de 120 mg/l pour les échantillons 13h-17h et 17h-23h.

Le rapport DCO/DBO5 donne une première estimation de la biodégradabilité de la matière organique d'un effluent donné. Les calculs effectués à partir des valeurs du Tableau 31 donnent des rapports compris entre 2,0 et 2,9. On convient généralement que pour les rapports inclus dans l'intervalle [2-3], l'effluent est biodégradable [Rejsek, 2002] ce qui est le cas ici.

1.2.15 Le COT

Les teneurs en COT mesurées (16 à 82 mg/l) sont relativement faibles par rapport aux effluents domestiques (100 à 300 mg/l - DEGREMONT, 1989). Les concentrations mesurées dans les échantillons 17h-23h, 23h-5h et 5h-9h sont comprises entre 16 et 50 mg/l. Pour les autres

échantillons, elles sont plus importantes et se situent entre 70 et 82 mg/l. La charge organique (protéines, lipides, glucides, substances humiques, substances organiques carbonées élaborées ou utilisées par l'industrie chimique et pharmaceutique,...) est donc plus faible dans le cas des échantillons 17h-23h, 23h-5h et 5h-9h.

1.2.16 Les MES

Les concentrations en MES (entre 50 et 80 mg/l) sont faibles par rapport aux effluents urbains (150 à 500 mg/l - DEGREMONT, 1989). Ces concentrations permettent de répartir les différents échantillons de la même manière que dans le cas du "COT". Les échantillons 17h-23h, 23h-5h et 5h-9h sont ainsi moins concentrés en particules minérales et/ou organiques que les autres échantillons.

1.2.17 Les ions ammonium

Dans les effluents domestiques la concentration moyenne en ammonium est comprise entre 20 et 80 mg/l [DEGREMONT, 1989; Aubry, 2003; Metcalf et Eddy, 2003]. Les mesures effectuées sur nos effluents sont toutes comprises dans cette fourchette (à l'exception de l'échantillon représentant la période de nuit (23h-5h) qui diffère très légèrement avec 19 mg/l de NH_4^+).

1.2.18 Les chlorures

Les concentrations en chlorures varient du simple au double en fonction des échantillons. La plus faible concentration a été mesurée dans l'échantillon 23h-5h (48 mg/l) et la plus forte, dans l'échantillon 5h-9h (120 mg/l).

1.2.19 Le chlore libre

L'appellation chlore libre regroupe les molécules HClO et ClO^-. Ce sont des oxydants puissants, qui peuvent réagir avec les substances organiques par substitution, addition ou oxydation. Comme dans le cas du COT, deux niveaux de concentrations se distinguent pour le paramètre chlore libre et permettent de répartir les différents échantillons. Au cours des périodes comprises entre 17h et 9h, les concentrations enregistrées (entre 0,09 et 0,18 mg/l) sont faibles. Pour les deux autres échantillons (entre 9h et 17h) ainsi que l'échantillon moyen, les concentrations (entre 0,28 et 0,55 mg/l) sont plus importantes.

1.2.110 Les AOX

Les analyses effectuées révèlent la présence d'AOX (Composés Organohalogénés Absorbables sur charbon actif) dont les concentrations sont comprises entre 0,18 et 0,82 mg/l. Les concentrations minimales ont été analysées dans les échantillons 23h-5h et 9h-13h et la maximale dans l'échantillon 5h-9h. Il est à noter que les AOX sont persistants dans l'environnement et qu'ils s'accumulent dans les chaînes alimentaires. Certain d'entre eux sont toxiques pour l'homme et les organismes aquatiques [Kummerer *et al.*, 1998].

1.2.111 Les détergents non-ioniques

Les détergents non-ioniques sont en plus faibles concentrations dans les échantillons représentant les périodes de nuit 17h-23h et 23h-5h (respectivement < 0,5 et 0,65 mg/l) que dans les autres échantillons (entre 2,8 et 5,8 mg/l).

1.2.112 L'acétaldéhyde

La concentration en acétaldéhyde évolue différemment de la plupart des autres molécules analysées au cours de la journée. Les teneurs sont plus importantes dans l'échantillon 23h-5h (21 µg/l) puis l'échantillon 13h-17h (12 µg/l). Pour les autres périodes, les concentrations sont inférieures à 10 µg/l. Il est à noter que l'acétaldéhyde est un composé très réactif qui participe à de nombreuses réactions de condensation, d'addition et de polymérisation [Environnement Canada et Santé Canada, 2000].

1.2.113 Le glutaraldéhyde

Les concentrations en glutaraldéhyde suivent la même évolution que le COT. En effet, pour les trois échantillons de nuit (17h-23h, 23h-5h et 5h-9h), les concentrations en glutaraldéhyde (GA) ne sont pas quantifiables (<1 µg/l). En revanche, on enregistre une concentration maximale dans l'échantillon 13h-17h (3,9 µg/l), et une concentration légèrement plus faible (2,1 µg/l) dans l'échantillon 9h-13h ainsi que dans l'échantillon moyen.

1.2.114 Synthèse des résultats

Les fluctuations journalières des teneurs des différents paramètres recherchés, montrent une certaine homogénéité (Figure 41). L'échantillon représentant la période 23h-5h est celui qui correspond aux teneurs les plus faibles pour la conductivité, les ions ammonium, le chlore libre, les chlorures, le COT, la DBO, la DCO, le glutaraldéhyde, le pH et la conductivité. Ensuite, vient l'échantillon 17h-23h, puis l'échantillon 5h-9h. On retrouve les teneurs les plus importantes dans les échantillons représentant les périodes 13h-17h puis 9h-13h. Quelques polluants ne suivent toutefois pas ce classement, les concentrations en chlorures et en AOX sont les plus faibles dans l'échantillon 23h-5h et plus élevées dans l'échantillon 5h-9h. Concernant les concentrations en acétaldéhyde, on peut regrouper les périodes 9h-13h et 13h-17h comme étant les plus polluées, les périodes 17h-23h et 23h-5h comme étant les moins polluées, et la période 5h-9h comme transitoire mais plus proche du groupe "moins pollué". L'échantillon moyen correspond finalement relativement bien aux moyennes des échantillons périodiques (pour les différents paramètres analysés).

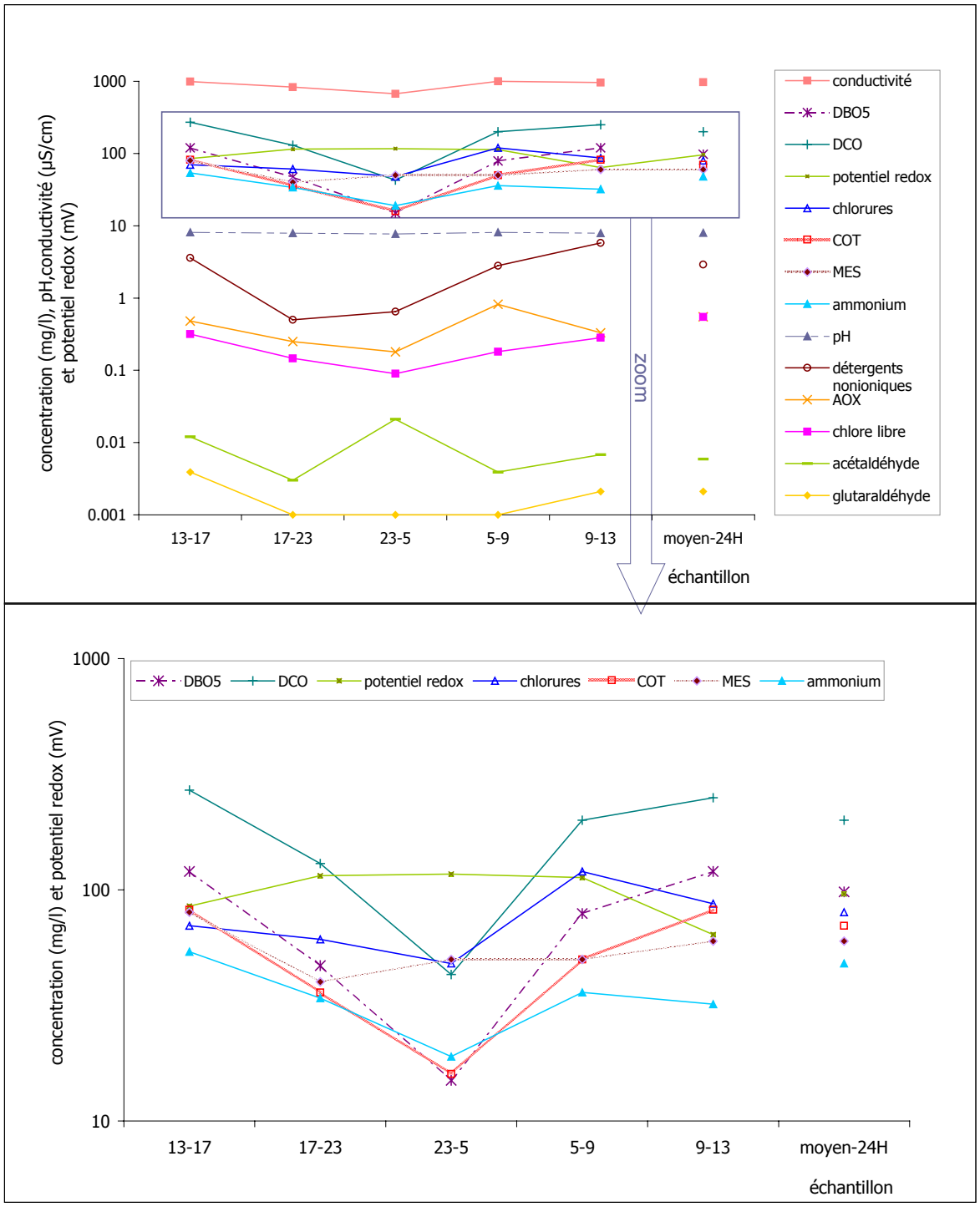


Figure 41 : Variations des principaux paramètres physico-chimiques dans les différents échantillons d'effluent (périodiques et moyen)

1.2.2 Paramètres spécifiques à l'échantillon moyen

L'échantillon moyen a bénéficié d'une analyse physico-chimique plus complète (Tableau 33).

paramètres	unités	échantillon moyen 24h
chlore total	mg/l	0,591
azote Kjeldahl	mg/l	44
ortho-phosphates	mg/l	3,4
formaldéhyde	mg/l	0,07
indice phénols	mg/l	0,24
détergents anioniques	mg/l	<0,01
détergents cationiques	mg/l	5
les COHV :	µg/l	≥ 6,3
chlorures de vinyle	µg/l	<0,5
dichlorométhane	µg/l	<0,5
chloroforme	µg/l	2,4
tetchlorométharane	µg/l	<0,5
1,1-dichloroéthane	µg/l	<0,5
1,1,1-trichloroéthane	µg/l	<0,5
1,1-dichloroéthène	µg/l	<0,5
trans-dichloroéthène	µg/l	<0,5
cis-dichloroéthène	µg/l	<0,5
trichloroéthène	µg/l	<0,5
tetrachloroéthène	µg/l	<0,5
1,2-dichloroéthane	µg/l	<0,5
1,1,2-trichloroéthane	µg/l	<0,5
fréon 11	µg/l	<0,5
fréon 113	µg/l	2,6
bromodichlorométhane	µg/l	<0,5
dibromodichlorométhane	µg/l	0,7
1,2-dibrométhane	µg/l	<0,5
tribrométhane	µg/l	0,6
1,2,3-trichloropropane	µg/l	<0,5
bromochlorométhane	µg/l	<0,5
les cétones : acétone	µg/l	7300

Paramètres	unités	échantillon moyen 24h
les alcools :		
méthanol	µg/l	760
éthanol	µg/l	1700
2-propanol	µg/l	3670
tertiobutanol	µg/l	<100
1-propanol	µg/l	<100
2-butanol	µg/l	<100
2-méthyl-1-propanol	µg/l	<100
2-(3)-pentanol	µg/l	<100
3-hexanol	µg/l	<100
1-hexanol	µg/l	<100
4-heptanol	µg/l	<100
1-octanol	µg/l	<100
les acétates :		<10
méthylacétate	µg/l	<10
ethylacétate	µg/l	<10
isobutylacétate	µg/l	<10
n-butylacétate	µg/l	<10
n-propylacétate	µg/l	<10
les métaux :		
Ag	mg/l	<0,002
As	mg/l	0,01
Cd	mg/l	<0,005
Cr	mg/l	<0,008
Cu	mg/l	0,162
Hg	mg/l	<0,002
Ni	mg/l	<0,002
Pb	mg/l	0,012
Zn	mg/l	0,147

Tableau 33 : Résultats des analyses physico-chimiques spécifiques à l'échantillon moyen

1.2.21 Le chlore total

La concentration en chlore total dans l'échantillon moyen est de 0,591 mg/l. La mesure du chlore total regroupe le chlore libre (celui qui est actif ou susceptible d'être actif en tant que désinfectant) et le chlore combiné qui a réagit avec d'autres substances pour former de nouvelles molécules (chloramines, chlorophénols, chlorobenzoquinones…). Associé à la mesure

de chlore libre (0,547 mg/l-Tableau 31), la mesure de chlore totale permet la détermination de la concentration en chlore combiné (0,04 mg/l). Ce résultat montre ainsi qu'il y a très peu de matière organique oxydable par le chlore (Figure 42).

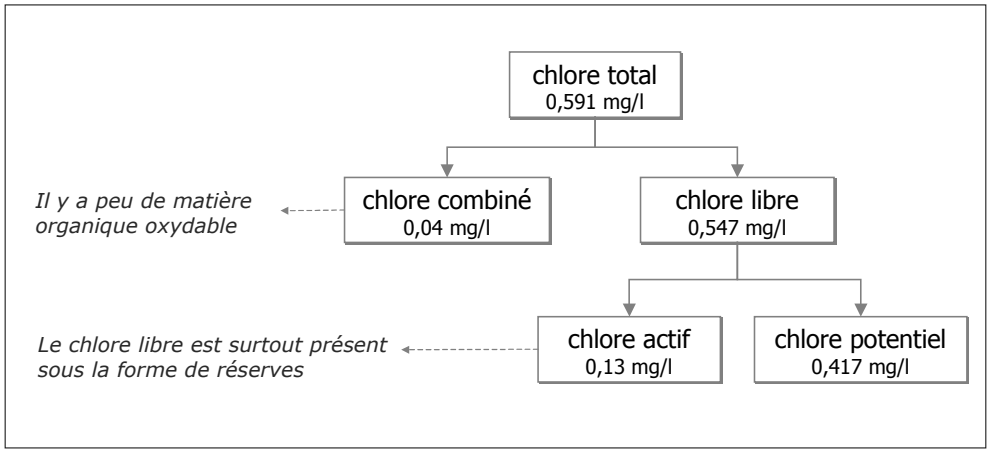


Figure 42 : Principales formes du chlore présentes dans l'échantillon moyen

1.2.22 L'azote kjeldahl

La concentration en azote kjeldahl est de 44 mg/l dans l'échantillon moyen. Elle est comparable aux concentrations habituellement mesurées dans les eaux usées urbaines (de 30 à 100 mg/l - Rejsek, 2002). Le paramètre azote kjeldahl regroupe l'azote organique et l'azote ammoniacale. La concentration en ammonium dans cet échantillon (48 mg/l, Tableau 31) nous permet donc de conclure a la quasi-absence d'azote organique.

1.2.23 Les orthophosphates

La concentration en orthophosphates (principalement $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} pour des pH compris entre 5 et 8) dans l'échantillon moyen est de 3,4 mg/l. Elle apparaît relativement faible pour une eau usée. Dans les eaux naturelles (non polluées), on retrouve des orthophosphates en teneur inférieure à 0,1 mg/l et on suspecte une pollution à partir de 0,5 mg/l [Rejsek, 2002].

1.2.24 Le formaldéhyde

La plus grande partie du formaldéhyde présent dans l'environnement est d'origine anthropique. Lorsque le formaldéhyde est rejeté dans l'eau, il s'hydrate rapidement en glycol ($CH_2(OH)_2$) [Environnement Canada et Santé Canada, 2001a]. la concentration mesurée est de 0,07 mg/l dans l'effluent moyen.

1.2.25 L'indice phénol

L'indice phénol mesuré dans l'échantillon moyen est de 0,24 mg/l, il représente la concentration minimale en composés phénoliques. Cette concentration est relativement proche de la valeur

limite (0,3 mg/l) fixée par l'arrêté du 2 février 1998 relatif au prélèvement et à la consommation d'eau ainsi qu'aux émissions de toutes natures des ICPE soumises à autorisation [MATE, 1998].

1.2.26 Les détergents anioniques et cationiques

Dans l'échantillon moyen, les détergents cationiques sont présents en plus forte concentration (5 mg/l) que les détergents nonionique (2,9 mg/l) et que les détergents anioniques qui sont, quant à eux, en concentration inférieure à la limite de détection (0,01 mg/l).

1.2.27 Les COHV

Quatre COHV (Composés OrganoHalogénés Volatils) ont été identifiés dans l'échantillon moyen, il s'agit du chloroforme (ou trichlorométhane), du fréon 113 (ou 1,1,2-trichloro-1,2,2-trifluoroéthane), du dibromodichlorométhane et du tribrométhane. La teneur total en COHV mesurée est supérieure ou égale à 6,3 µg/l. Parmi ceux-ci, le trichlorométhane (2,4 µg/l) et le fréon 113 (2,6 µg/l) sont les plus présents. Le Fréon 113 appartient à la famille des chlorofluorocarbones (CFC). Cette substance est visée par le protocole de Montréal et par le règlement (CE) n° 2037/2000 du parlement européen et du Conseil du 29 juin 2000 relatifs à des substances qui appauvrissent la couche d'ozone. Sauf dérogation contraire, la fabrication, la mise sur le marché, l'exportation et l'utilisation du fréon 113 sont interdites. Avant son interdiction, il était principalement utilisé comme solvant pour le nettoyage et le dégraissage, comme fluide caloporteur, comme agent gonflant (mousse de polymères) ou encore en laboratoire comme intermédiaire en synthèse organique [INRS, 2005].

1.2.28 Les cétones

On trouve de l'acétone à hauteur de 7,3 mg/l dans l'échantillon moyen. Cette molécule semble en concentration relativement importante par rapport à un effluent urbain classique, mais nous n'avons trouvé aucune valeur comparative dans la littérature.

1.2.29 Les alcools

Les concentrations en méthanol, éthanol et 2-propanol sont respectivement de 0,7 mg/l, 1,7 mg/l et 3,67 mg/l. Ces molécules semblent en concentration relativement importante par rapport à un effluent urbain classique. Cependant, nous n'avons trouvé aucune valeur comparative dans la littérature. Notons que les autres alcools dosés (tertiobutanol, 1-propanol, 2-butanol, 2-méthyl-1-propanol, 2-(3)-pentanol, 3-hexanol, 1-hexanol, 4-heptanol et 1-octanol) sont en concentration inférieure à la limite de détection de la méthode d'analyse.

1.2.210 Les métaux et l'arsenic

Lors de la campagne de prélèvement effectuée, le plomb, le zinc le cuivre et l'arsenic ont été détecté en quantités supérieures aux limites de détection de la méthode analytique utilisée. Les concentrations (Pb : 0,012 mg/l, Zn : 0,147 mg/l, Cu :0,162 mg/l et As :0,01 mg/l) sont

comparables aux teneurs mesurées dans les eaux pluviales [Bertrand-Krajewski *et al.*, 2000; Burton et Pitt, 2002; Ganaye, 2006].

1.2.211 Les acétates

Dans l'échantillon moyen, les acétates sont en concentration inférieure à la limite de détection de la méthodes analytique utilisé (10 µg/l).

1.2.3 Les résidus médicamenteux

1.2.31 Les bêtabloquants

Le Tableau 34 présente les résultats des analyses de bêtabloquants effectuée sur l'échantillon moyen-24h par le Cemagref de Lyon. nous remarquons surtout la présence d'acébutolol et d'aténolol qui sont en concentration supérieure à 1 µg/l. Viennent ensuite le sotalol dont la concentration est voisine de 1 µg/l, puis le métoprolol, le propranolol et le bisoprolol dont les teneurs sont proches de 100 ng/l et enfin, le timolol, le nadolol, le bétaxolol et l'oxprénolol dont les concentrations sont très faibles et comprises entre 1 et 40 ng/l. Nous reviendrons sur ces résultats au cours de la partie discussion (partie 4, 2.1.29)

bêtabloquants	concentration dans l'échantillon moyen-24h (ng/l)
acébutolol	5 390
aténolol	3 525
sotalol	780
métoprolol	107
propranolol	92
bisoprolol	90
timolol	33
nadolol	20
bétaxolol	8
oxprénolol	4

Tableau 34 : Teneur en bêtabloquants dans l'échantillon moyen-24h

1.2.32 Les anticancéreux : le cas du cyclophosphamide

Les concentrations théoriques ont été estimées sur la base des chiffres de consommation de l'année 2006, dans l'hôpital étudié, du taux de molécule extraite par l'organisme sous forme inchangée, et du volume d'effluent rejeté au cours de la journée de prélèvement (Tableau 36).

L'estimation aboutit à une concentration moyenne de 5,2 ng/l (comprises entre 3,7 ng/l en considérant un taux d'excrétion de 14% et 14,1 ng/l pour un taux de 54%). Cette concentration est inférieure aux concentrations mesurées par Steger-Hartmann [1997] dans les effluents d'un hôpital allemand (19 à 4 486 ng/l).

nature des données	valeurs	sources
quantité annuelle de cyclophosphamide administrée aux patients	621 959 mg/an	donnée interne de l'hôpital d'étude, 2006
taux d'excrétion du cyclophosphamide sous forme inchangé	20% (moyenne) 14% (minimum) 54% (maximum)	[Steger-Hartmann *et al.*, 1996]
volume d'effluent rejeté sur une journée	651,6 m3/jour	cette étude (voir page 152)
Estimation de la concentration en cyclophosphamide dans l'échantillon moyen-24h	5,2 ng/l (valeur moyenne) 3,7 ng/l (valeur minimale) 14,1 ng/l (valeur maximale)	

Tableau 35 : Estimation de la concentration en cyclophosphamide dans l'échantillon moyen-24h

1.3 Caractérisation microbiologique

Le Tableau 36 présente les résultats des analyses microbiologiques effectuées sur les différents échantillons d'effluent prélevés (moyen et périodiques).

paramètres	unités	13-17h	17-23h	23-5h	5-9h	9-13h	moyen-24h	effluent domestique
coliformes totaux	/100ml	0	0	0	0	0	14	10^6-10^{10} *
Coliformes thermotolérants	/100ml	0	0	0	0	0	0	10^4-5.10^7 **
entérocoques	/100ml	0	102	240	150	0	0	10^5-10^6 *
staphylocoques	/100ml	240	480	520	608	320	480	-
Staphylococcus Aureus	/100ml	-	-	-	-	-	0	-
Shigella	/100ml	-	-	-	-	-	0	-
Salmonelles	/l	-	-	-	-	-	négative	-

Tableau 36 : Caractéristiques microbiologiques des échantillons périodiques et moyen d'effluent hospitalier comparés aux caractéristiques des effluents domestiques

[*Rejsek [2002], **Hartemann et al. [2005]]

1.3.1 Paramètres communs aux échantillons périodiques et à l'échantillon moyen

Les coliformes totaux et thermotolérants sont absents des effluents à l'exception de l'échantillon moyen qui contient 14 coliformes/100 ml (Tableau 36). Contrairement aux coliformes, les entérocoques et les staphylocoques (non-aureus) sont présents dans les effluents, avec une présence légèrement plus marquée dans les échantillons représentant la période 17h et 9h.

Rappelons que les entérocoques sont des indicateurs de pollution fécale et qu'ils sont également présents de manière naturelle sur certains végétaux et dans divers produits fermentés. Ils sont

plus résistants que les coliformes aux agents désinfectants (résistance comparable à celle des entérovirus) ce qui permettrait d'expliquer leur présence [Rejsek, 2002].

Une comparaison de nos résultats à ceux rencontrés dans le cas d'effluents de type urbain (Tableau 36) montre que les effluents prélevés ont des teneurs très faibles en micro-organismes (pour les paramètres analysés). La présence de désinfectants, détergents et autres molécules toxiques pour les micro-organismes dans les effluents prélevés pourrait expliquer ces résultats.

1.3.2 Paramètres spécifiques à l'échantillon moyen

Aucune des trois bactéries spécifiques recherchées (*Staphylococcus aureus*, *Shigella* et *Salmonella*) n'a été détectée dans l'échantillon moyen.

2. Réponses (CE20) des batteries de bioessais mono-spécifiques exposées aux effluents

Comme il a été vu dans la partie matériels et méthodes, les réponses des bioessais sont présentés par l'intermédiaire de la CE20 (Figure 43, 44 et 45). La CE20 est la Concentration Efficace qui provoque 20% d'effet sur la population testée par rapport au témoin (ces concentrations sont exprimées en pourcentage volumique d'effluent). Plus cette valeur est élevée, moins l'échantillon est toxique. Notons également que nous avons pris le parti de présenter nos résultats sous la forme de graphiques. Dans un souci de précision, et pour que ces résultats soient exploitables et réutilisables, les valeurs numériques sont été présentées en annexe 6.

Les résultats d'un bioessais ne se limitent cependant pas à une valeur, ce sont les courbes concentrations-effets qui constituent la réponse globale d'un bioessai. C'est la raison pour laquelle nous avons fait le choix de présenter ces courbes en annexe 7.

2.1 Batterie de bioessais simplifiée exposée à la totalité des échantillons filtrés

La Figure 43 présente les résultats de la batterie de bioessais simplifiée effectuée sur la totalité des échantillons filtrés (périodiques et moyen-24h).

Nous nous intéresserons dans un premier temps à la spécificité des réponses des échantillons tous organismes d'essais confondus, puis nous analyserons de manière détaillée la sensibilité spécifique des différents bioessais.

2.1.1 Analyse générale des réponses

Ce graphique (Figure 43) révèle tout d'abord, que tous essais confondus, il existe d'importantes fluctuations de toxicité entre les différents échantillons prélevés.

Les CE20 de l'échantillon 9h-13h vis-à-vis de *Pseudokirchneriella subcapitata* et de *Daphnia magna* 48h sont respectivement de 3,9% et 4,9%. Ces résultats révèlent que l'effluent est très toxique vis-à-vis de ces organismes (selon la classification proposée par Santiago *et al.* [2002]) pour la classification de la qualité écotoxicologique des effluents de STEP).

L'échantillon 23h-5h se révèle quant à lui, peu toxique vis-à-vis de *Pseudokirchneriella subcapitata* (CE20 = 63,7%) et non toxique vis-à-vis de *Daphnia magna* (selon Santiago *et al.*, 2002).

Les échantillons peuvent ainsi être classés en fonction de leur écotoxicité (du plus au moins écotoxique) :

9h-13h > moyen-24h > 13h-17h > 5h-9h > 17h-23h > 23h-5h.

Notons que l'écotoxicité de l'échantillon moyen-24h se situe entre celles mesurées pour les échantillons représentant les périodes 9h-13h et 13h-17h. Elle se révèle être légèrement plus toxique que la médiane des échantillons.

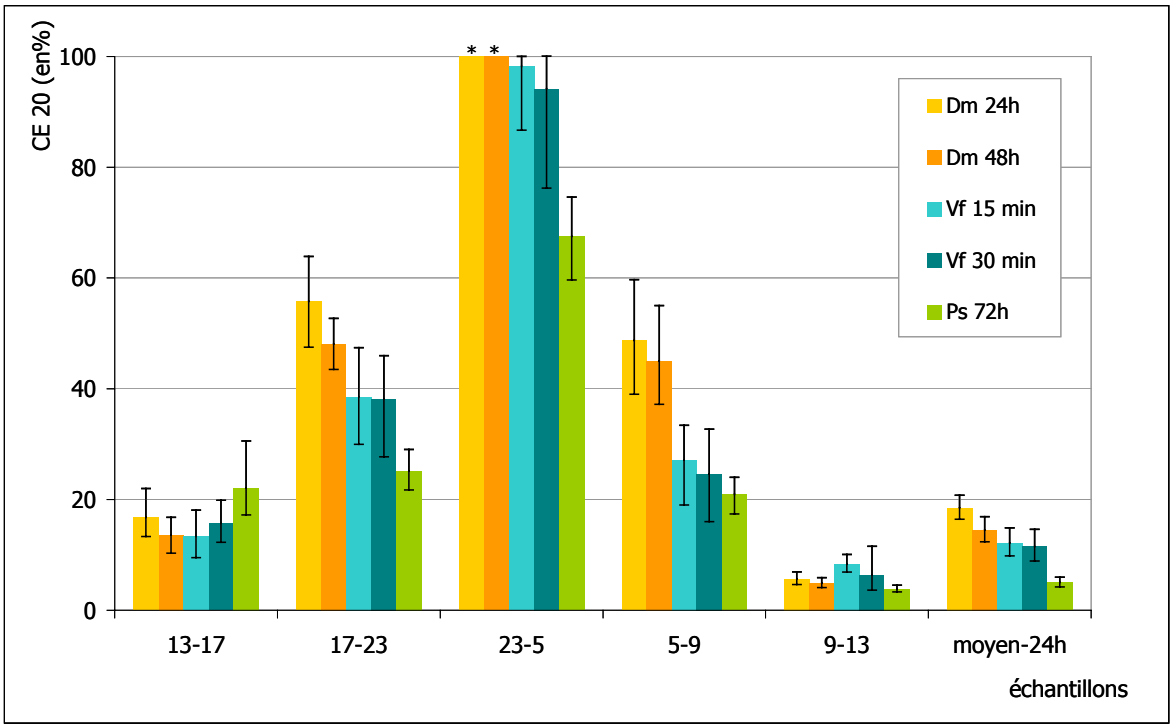


Figure 43 : Réponses de la batterie de bioessais simplifiée exposée aux échantillons périodiques et moyen filtrés [Dm 24h et 48h : essai d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* en 24 et 48 heures ; Vf 15 et 30 : essai d'inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri* en 15 et 30 minutes ; Ps : essai d'inhibition du taux de croissance de la population de *Pseudokirchneriella subcapitata*]

2.1.2 Sensibilité spécifique des différents bioessais

L'analyse détaillée de la variabilité des réponses des différents organismes aux échantillons d'effluent hospitalier révèle à la fois une homogénéité globale et certaines spécificités. En particulier notons que :

- L'essai chronique vis-à-vis de l'algue *Pseudokirchneriella subcapitata*, est le plus sensible des bioessais (de la batterie préalablement sélectionnée), sauf dans le cas de l'échantillon 13h-17h où il se révèle être le moins sensible.
- L'essai d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* est le moins sensible des bioessais sauf dans le cas de l'échantillon 9h-13h où l'essai vis-à-vis de *Vibrio fischeri* est moins sensible.
- L'essai d'inhibition de la luminescence de *Vibrio fischeri*, présente finalement des réponses intermédiaires entre l'essai *Daphnia magna* et l'essai *Pseudokirchneriella subcapitata*. Le cas de l'échantillon 9h-13h faisant exception, car dans ce cas, l'essai *Vibrio fischeri* se révèle être le moins sensible de la batterie de bioessais simplifiée.

On peut ainsi globalement classer les organismes en fonction de leur sensibilité vis-à-vis de des échantillons étudiés (du plus au moins sensible) :

Pseudokirchneriella subcapitata > *Vibrio fischeri* > *Daphnia magna*

L'analyse des résultats par échantillon et relativement aux intervalles de confiances des CE20 permet de mieux appréhender la sensibilité spécifique de chaque bioessai.

- Pour les échantillons 17h-23h, 23h-5h, 5h-9h, 9h-13h et moyen-24h une différence significative apparaît entre les résultats des essais vis-à-vis de *Daphnia magna* et de *Pseudokichneriella subcapitata*.
- Pour l'échantillon 13h-17h, les résultats des différents essais s'avèrent redondants au regard des intervalles de confiance qui se chevauchent.
- Pour l'échantillon 5h-9h, des différences significatives apparaissent entre les résultats des essais vis-à-vis de *Daphnia magna* et de *Vibrio fischeri*.
- Enfin, pour les échantillons 23h-5h et moyen-24h, les résultats des essais vis-à-vis de *Vibrio fischeri* et de *Pseudokichneriella subcapitata* montrent également des résultats significativement différents au regard des intervalles de confiances.

Chacun des bioessais se révélant être au moins une fois le plus sensible, tous s'avère nécessaires. Cette batterie de bioessais se révèle donc discriminante aux regards des différents échantillons d'effluents et donc appropriée à notre étude. Par ailleurs, ces essais prennent en compte différents niveaux trophiques, types de toxicité, et critères d'effets. Ils sont simples de mises en œuvre, ont un bon rapport coût/efficacité, sont standardisés et reproductibles. Ils répondent donc tout à fait aux exigences préétablies dans la partie matériels et méthodes.

2.2 Batterie de bioessais complète exposée à l'échantillon moyen filtré

La Figure 44 présente les résultats (CE20) de la batterie de bioessais complète réalisée sur l'échantillon moyen-24h filtré.

Pour cet échantillon moyen, on constate que les réponses de chacun des bioessais sont très différentes. Les CE20 mesurées sont comprises entre 0,7% (reproduction de *Brachionus calyciflorus*) soit très toxique (selon la classification proposée par Santiago *et al.* [2002] pour la classification de la qualité écotoxicologique des effluents de STEP) et supérieure à 100%, soit non toxique (croissance de la lentille d'eau *Lemna minor* relativement au nombre de frondes).

Les CE20 sont majoritairement inférieures à 20%. Un quart des essais conduisent à une CE20 inférieure à 10% et les 3/4 à une CE20 inférieure à 20%. L'effluent est donc toxique voir très toxique pour les organismes testés (en regard de la classification proposée par Santiago *et al.* [2002] pour la classification de la qualité écotoxicologique des effluents de STEP).

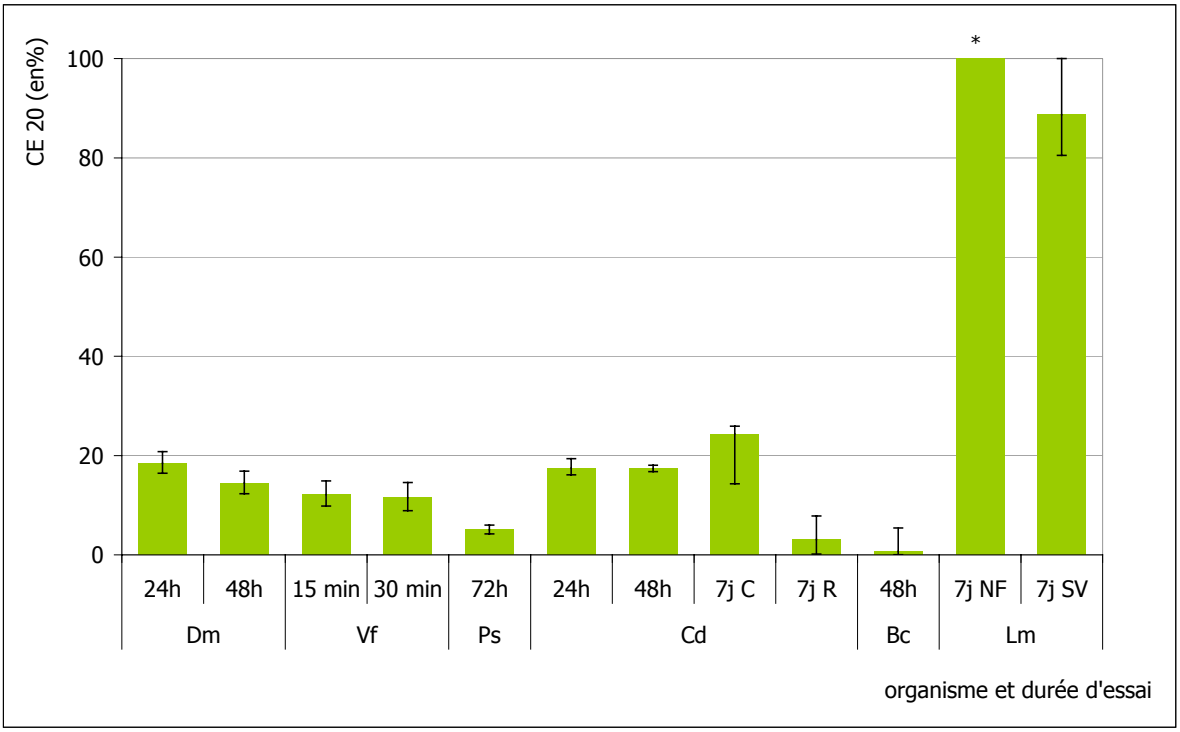


Figure 44 : Réponses (CE20) de la batterie de bioessais complète exposée à l'échantillon moyen filtré
[Dm : *Daphnia magna*, Vf : *Vibrio fischeri*, Ps : *Pseudokichneriella subcapitata,* Cd : *Ceriodaphnia dubia,* C : croissance, R : reproduction, BC : *Brachionus calyciflorus* ; Lm : *Lemna minor* ; NF : nombre de frondes ; SV : surface verte ; * : CE20 non-atteinte]

2.2.1 Analyse détaillée des résultats des essais de toxicité aiguë

Examinons en premier lieu les résultats des essais de toxicité aiguë : *Daphnia magna* en 24 et 48h, *Vibrio fischeri* en 15 et 30 min et *Ceriodaphnia dubia* en 24 et 48h. Chacun a été réalisé sur deux durées d'exposition différentes. La CE20 de l'essai vis-à-vis de *Daphnia magna* diminue légèrement entre 24 et 48 heures mais non significativement relativement à son intervalle de confiance à 95% ($CE20_{24h}$ = 18,5% [IC95 : 16,5-20,8] et $CE20_{48h}$ = 14,5% [IC95 : 12,4-16,9]). La CE20 de l'essai vis-à-vis de *Vibrio fischeri* diminue également mais de manière non significative entre 15 et 30 minutes ($CE20_{15min}$ = 12,1% [IC95 : 9,8-14,9] et $CE20_{30min}$ = 11,5% [IC95 : 8,9-14,6]). Concernant les CE20 de l'essai *Ceriodaphnia dubia* aigu, elles sont quasiment identiques entre 24 et 48h d'exposition ($CE20_{24h}$ = 17,5% [IC95 : 16,1-19,4] et $CE20_{48h}$ = 17,4% [IC95 : 16,8-18,1]). La toxicité aiguë engendrée par l'effluent étudié n'évolue donc pas de manière significative lorsque l'on double la durée d'exposition des organismes d'essai à l'échantillon d'effluent moyen.

L'analyse des intervalles de confiance des différentes CE20 (Tableau 37) montre que :

- La CE20 de l'essai vis-à-vis de *Daphnia magna* en 48h n'est pas significativement différente des CE20 des autres essais de toxicité aiguë.
- Les CE20 des essais vis-à-vis de *Daphnia magna* en 24h et de *Ceriodaphnia dubia* en 24 et 48h peuvent être regroupées car elles présentent la même sensibilité.
- Les CE20 de l'essai vis-à-vis de *Vibrio fischeri* en 15 et 30 min peuvent également être regroupées car elles présentent la même sensibilité. L'essai vis-à-vis de *Vibrio fischeri* se révèle être le plus sensible des essais de toxicité aiguë de la batterie de bioessais complète. Il présente des CE20 significativement plus faibles que celle des essais vis-à-vis de *Daphnia magna* en 24h et de *Ceriodaphnia dubia* en 24 et 48h.

	Dm24	Dm48	Vf15	Vf30	Cd24	Cd48
Dm24		=	≠	≠	=	=
Dm48	=		=	=	=	=
Vf15	≠	=		=	≠	≠
Vf30	≠	=	=		≠	≠
Cd24	=	=	≠	≠		=
Cd48	=	=	≠	≠	=	

Tableau 37 : Différences de sensibilité relative aux IC95 des CE20 des essais aigus pour l'échantillon moyen-24h [Dm : *Daphnia magna* ; Vf : *Vibrio fischeri ;* Cd : *Ceriodaphnia dubia ;* = : CE20 non significativement différentes ; ≠ : CE20 significativement différentes]

2.2.2 Analyse détaillée des résultats des essais de toxicité chronique

Intéressons-nous à présent aux résultats des essais d'écotoxicité chronique : *Pseudokichneriella subcapitata* en 72h, croissance et reproduction de *Ceriodaphnia dubia* en 7 jours, *Brachionus calyciflorus en* 48h et *Lemna minor* en 7 jours (croissance en fonction du nombre de frondes et croissance en fonction de la surface verte en fin d'essai).

Selon Santiago *et al.* [2002], les valeurs de CE20 pour les bioessais vis-à-vis de la croissance de l'algue *P. subcapitata* (CE20 = 5,1% [IC95 : 4,2-6,0]), de la croissance et de la reproduction de *Ceriodaphnia dubia* ($CE20_{croissance}$ = 24,4% [IC95 : 14,3-25,9] et $CE20_{reproduction}$ = 3,1% [IC95 : 0,2-7,8]) et de la reproduction de *Brachionus calyciflorus* (CE20 = 0,7% [IC95 : 0,02-5,4]) montrent l'importante toxicité de l'échantillon moyen-24h pour une exposition chronique.

En revanche, la lentille d'eau *Lemna minor* est peu sensible à l'effluent pour les critères d'effet mesurés : croissance de la population déterminée à partir du nombre de frondes (CE20 > 100%, i.e. : non toxique) et croissance de la population déterminée à partir de la surface verte (CE20 = 88,7% [IC95 : 80,5- >100]). Nous avons même constaté une croissance supérieure des lentilles (en nombre de frondes) pour des concentrations élevées en effluent. Cela se traduit mathématiquement par des pourcentages d'inhibition du taux de croissance négatifs (jusqu'à -20%) (Figure 45). Pour ces mêmes concentrations, nous avons également pu constater un phénomène de toxicité concrétisé par le blanchissement des frondes des lentilles (Figure 46). Ce phénomène est d'ailleurs pris en compte dans le critère d'effet « surface verte ». À noter que ce blanchiment est aussi observé lorsque l'on expose les lentilles à une solution d'eau de javel à 0,05% (volumique) [ISO 20079, 2005].

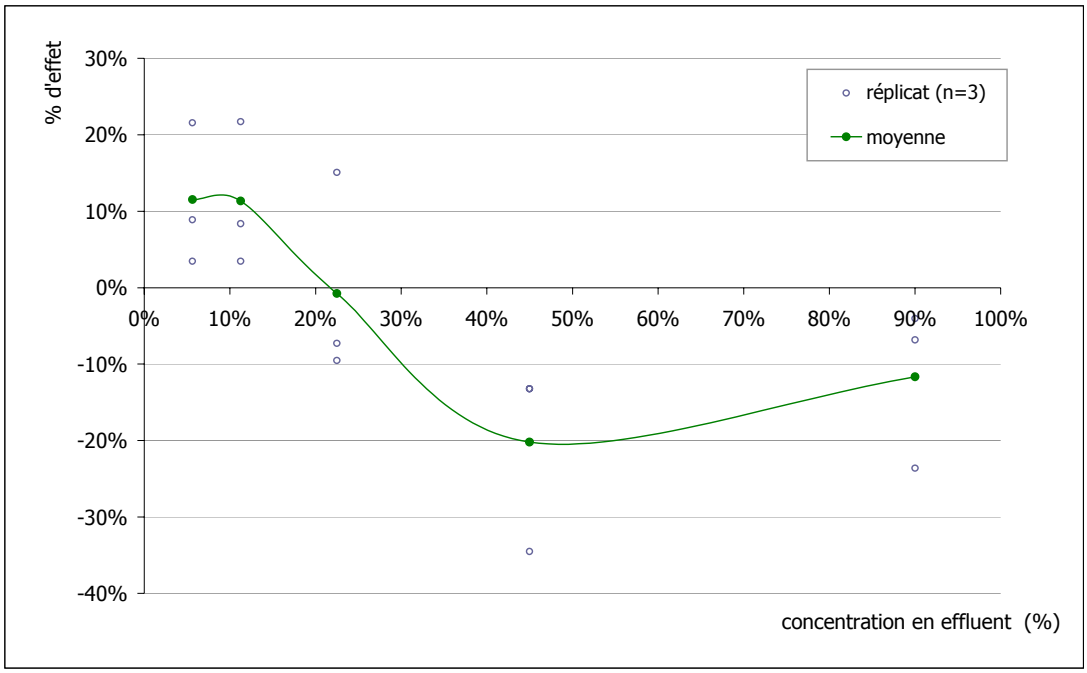


Figure 45 : Courbe concentrations-réponses de l'essai inhibition de la croissance de la population (nombre de frondes) de *Lemna minor* en 7 jours, sur l'effluent moyen filtré

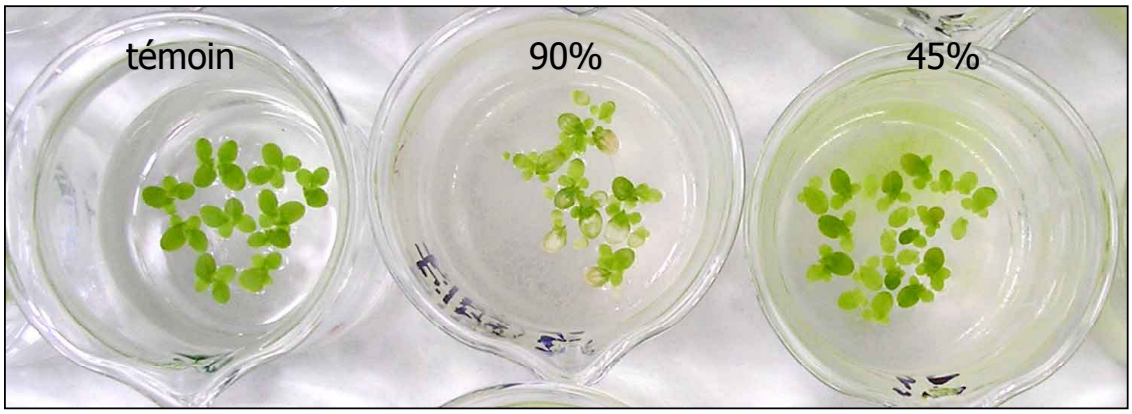


Figure 46 : Photo de l'essai *Lemna minor* à J+7 sur l'échantillon moyen-24h filtré. De gauche à droite : concentration témoin, 90% et 45% d'effluent

L'analyse des intervalles de confiance des différentes CE20 chroniques (Tableau 38) montre que :

- Les CE20 des essais vis-à-vis de *Lemna minor* en « nombre de frondes » et « surface verte » peuvent être regroupées car elles présentent la même sensibilité. Ce groupe d'essais présente la plus faible sensibilité à l'échantillon moyen-24h. Notons tout de même que l'essai « surface verte » est le plus sensible du groupe même s'il présente un intervalle de confiance assez important.
- Les CE20 des essais vis-à-vis de *Pseudokichneriella subcapitata*, de la reproduction de *Ceriodaphnia dubia* et de *Brachionus calyciflorus* peuvent être regroupées car elles présentent la même sensibilité. Ce groupe d'essai présente la plus forte sensibilité à l'échantillon moyen-24h. Notons tout de même que l'essai vis-à-vis de *Brachionus calyciflorus* est le plus sensible de ce groupe d'essais.
- Enfin, la CE20 de l'essai vis-à-vis de *Ceriodaphnia dubia* croissance est significativement différente des autres essais de toxicité chronique. Sa sensibilité à l'effluent se situe entre les deux groupes précédemment énoncés.

	Ps72	Cd7j-C	Cd7j-R	Bc48	Lm7j-NF	Lm7j-SV
Ps72		≠	=	=	≠	≠
Cd7j-C	≠		≠	≠	≠	≠
Cd7j-R	=	≠		=	≠	≠
Bc48	=	≠	=		≠	≠
Lm7j-NF	≠	≠	≠	≠		≠
Lm7j-SV	≠	≠	≠	≠	≠	

Tableau 38 : Différences de sensibilité entre les CE20 des essais chroniques pour l'échantillon moyen-24h
[Ps : *Pseudokichneriella subcapitata* ; Cd : *Ceriodaphnia dubia* ; C : croissance ; R : reproduction ; BC : *Brachionus calyciflorus* ; Lm : *Lemna minor* ; NF : nombre de frondes ; SV : surface verte ; = : CE20 non significativement différentes ; ≠ : CE20 significativement différentes]

2.3 Influence de la filtration sur les réponses de *Daphnia magna* et *Lemna minor*

Comme il a été énoncé dans la partie matériels et méthodes, les bioessais vis-à-vis de *Daphnia magna* et *Lemna minor* ont été effectués en parallèle sur les échantillons bruts et filtrés. La Figure 47 présente les résultats obtenus.

S'agissant des essais vis-à-vis de *Daphnia magna*, les différences de toxicité sont très importantes entre effluents filtrés et effluents bruts, pour les échantillons les plus toxiques (13h-17h, 9h-13h et moyen 24h). En effet, pour ces derniers, la toxicité des effluents bruts est multipliée par un facteur variant entre 6 et 10. La CE20 de l'échantillon 13h-17h est de 16,8% [IC95 : 13,3-22,0] sur l'échantillon filtré et de 2,0% [IC95 : 1,9-2,2] sur l'échantillon brut, soit une toxicité 8,4 fois plus importante. Celle de l'échantillon 9h-13h passe de 5,7% [IC95 : 4,7-6,9] sur l'échantillon filtré à 0,99% [IC95 : 0,95-1,03] sur l'échantillon brut et, enfin, celle de l'échantillon moyen passe de 18,5% [IC95 : 16,5-20,8] à 1,83% [IC95 : 1,62-2,08].

À l'inverse, pour les échantillons 17h-23h et 5h-9h, une plus forte toxicité est observée (facteur de l'ordre de 2) pour les échantillons filtrés. Quant à l'échantillon 23h-5h, il se révèle non toxique dans les deux cas.

Le calendrier expérimental des essais d'écotoxicité peut nous aider à expliquer ce phénomène. Les essais daphnies ont, dans un premier temps, été réalisés sur les échantillons filtrés puis, deux jours plus tard, sur échantillons bruts. Les échantillons ayant vieilli pendant ces deux jours, la toxicité de l'effluent non filtré peut diminuer (la CE20 est donc plus importante) en raison de la dégradation ou de la volatilisation partielle de certains composés toxiques. C'est ce phénomène que nous observons sur les échantillons correspondants aux périodes 17h-23h, 23h-5h et 5h-9h. En revanche, pour les trois échantillons correspondants aux périodes 13h-17h, 9h-13h et moyen 24h, c'est l'inverse qui est observé. Ces échantillons sont ceux qui sont les plus chargés en MES et il est probable que celles-ci contribuent fortement à l'écotoxicité des effluents, leur concentration masquant l'éventuelle diminution de toxicité engendrée par la dégradation des échantillons.

Concernant l'essai vis-à-vis de *Lemna minor* (croissance du nombre de frondes), les résultats montrent que l'échantillon moyen filtré ($CE20_{NF\ filtré}$ > 100%) est un peu moins écotoxique que l'échantillon brut ($CE20_{NF\ brut}$ = 83,7% [IC95 : 48,2-85,9]). La différence est bien moins importante que dans le cas de l'essai *Daphnia magna*. En revanche, la différence est bien plus importante avec le critère d'effet « surface verte », ($CE20_{SV\ filtré}$ = 88,7% [IC95 : 80,5- >100] et $CE20_{brut}$ = 42,9% [IC95 : 24,2-46,6]). Or, contrairement aux daphnies, cet organisme n'ingère pas les particules. Sur ces périodes, nous pouvons donc penser que la toxicité vient de la nature et de la quantité de MES dont les polluants pourraient passer en solution au cours du temps. Il est d'ailleurs reconnu qu'en interceptant les matières en suspension ou les colloïdes sur lesquels sont fixés des polluants, la filtration peut conduire à une sous estimations de la toxicité [Jauzein

et al., 1999]. De plus, selon Weltens *et al.* [2000], les matières en suspension ont clairement un pouvoir écotoxique, non seulement parce qu'elles sont une source continue de xénobiotiques dissous, mais également parce que la fraction adsorbée de polluants peut devenir biodisponible lors de son ingestion par les organismes aquatiques. Weltens *et al.* [2000], concluent leur étude sur le fait que les matières en suspension devraient être considérées comme un compartiment séparé dans l'évaluation de risque des produits chimiques, des effluents ou des eaux de surface. Malheureusement, aucune analyse n'a pu être réalisée dans le cadre de cette thèse, ni sur la composition et le comportement dans le temps des MES, ni sur la mise en solution, au cours du temps, des polluants qu'elles contiennent. Dans une étude prochaine, il sera important de caractériser ces MES pour mieux comprendre l'origine de cette importante différence de toxicité.

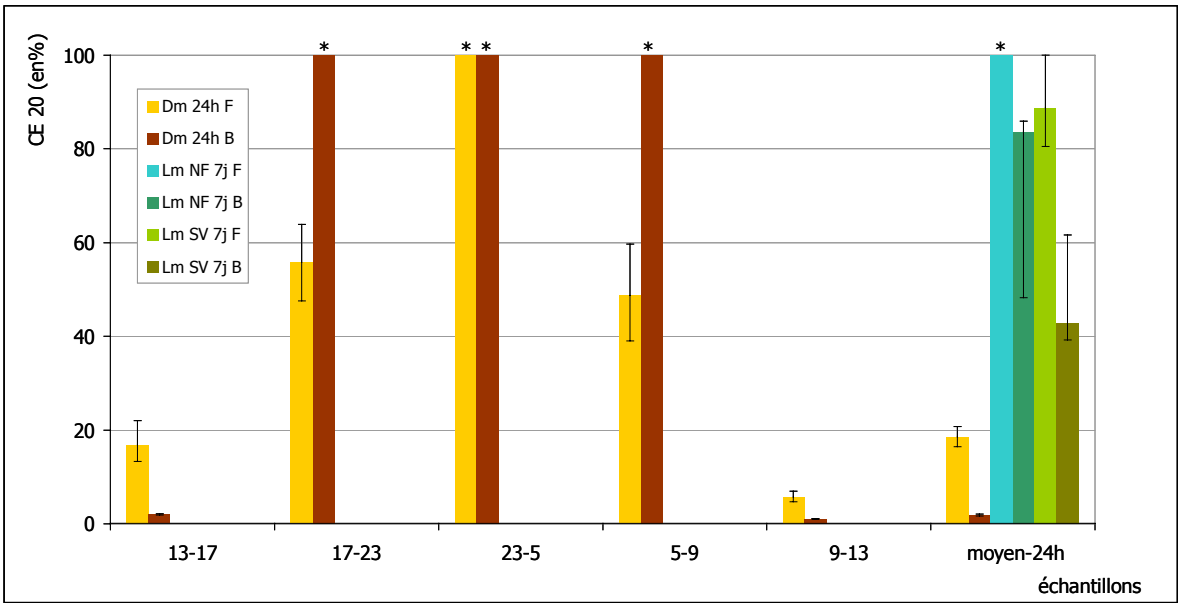


Figure 47 : Influence des MES sur l'écotoxicité des effluents

[Dm : *Daphnia magna* ; Lm : *Lemna minor* ; NF : nombre de frondes ; SV : surface verte ; F : échantillon filtré ; B : échantillon brut ; * : CE20 non-atteinte]

Remarque complémentaire

L'observation visuelle des lentilles effectuée à la fin de la période d'essai révèle une décoloration des frondes beaucoup plus importante dans le cas de l'échantillon brut (Figure 48). Cette observation met en avant le fait que le critère d'effet « croissance de la population estimée à partir du nombre de frondes » n'est pas adapté à cet effluent. Pour Wang [1990], le nombre de frondes n'apparaît pas comme un point final fiable pour cet essai car il n'intègre pas la surface (ou biomasse) des lentilles. Le même auteur conclue que cette estimation est peu précise et que ce nombre ne reflète pas le fait que la lentille soit morte, vivante ou stressée (chlorose, nécrose,...). Nous montrons ici que le critère d'effet « surface verte » est beaucoup plus sensible vis-à-vis de l'échantillon moyen et révèle un écart de toxicité beaucoup plus important entre les échantillons bruts et filtrés.

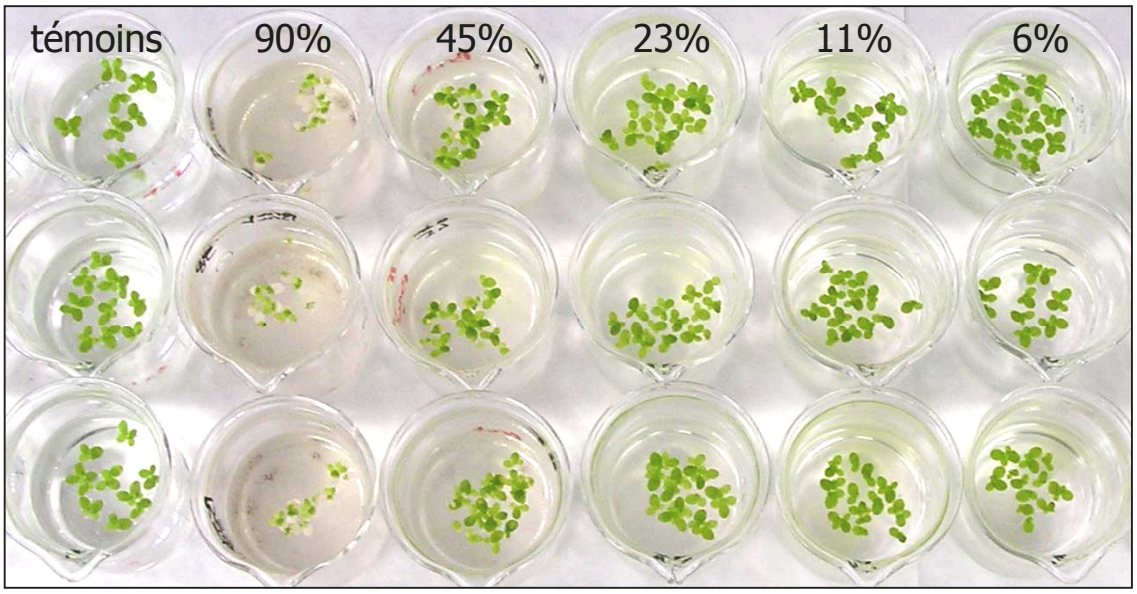


Figure 48 : Photo de l'essai *Lemna minor* à J+7 sur l'échantillon moyen-24h brut
[De gauche à droite : concentration témoin, 90, 45, 23, 11 et 6% d'effluent]

2.4 Synthèse : effets des effluents sur les batteries de bioessais mono-spécifiques

La batterie de bioessais simplifiée montre d'importantes fluctuations de toxicité (CE20 comprises entre 3,9% et non toxique) de l'effluent hospitalier prélevé vis-à-vis des bioessais sélectionnées et au cours d'une journée. Les réponses des bioessais réalisés montrent des différences de sensibilité à l'effluent en fonction des échantillons représentant les différentes périodes d'une journée d'activité. Cela prouve la complémentarité des bioessais et la nécessité de mette en œuvre une batterie de bioessais pour accéder aux caractéristiques écotoxicologiques d'un effluent.

La batterie de bioessais complète réalisée sur l'échantillon moyen confirme la toxicité de l'effluent pour des critères d'effets primordiaux tels que la reproduction. Le bioessai vis-à-vis du rotifère *Brachionus calyciflorus* s'est révélé le plus sensible à l'effluent (CE20 = 0,7%), alors que l'essai vis-à-vis de la lentille d'eau *Lemna minor* est le moins sensible (CE 20 > 100%, i.e. : non toxique).

Les essais menés sur échantillons bruts et filtrés révèlent finalement la forte toxicité liée à la phase particulaire des effluents étudiés. La toxicité des échantillons bruts est en effet, jusqu'à 10 fois supérieure à celles des échantillons filtrés.

Ces résultats doivent enfin être confirmés en répliquant les expérimentations à d'autres effluents hospitaliers.

3. Comparaison des résultats théoriques et expérimentaux (vis-à-vis de *Daphnia magna*)

Contribution à la validation du modèle CA pour l'évaluation de l'écotoxicité du mélange de l'ensemble des polluants dosés dans l'effluent moyen.

Le premier chapitre des résultats (page 123) a permis de conclure que les effets combinés de mélanges binaires désinfectant/surfactants sont de type additivité des concentrations (CA) vis-à-vis de la mobilité de *Daphnia magna* en 24 heures. Mais comme nous l'avons déjà précisé, l'étude s'est limitée à quelques mélanges binaires qui ne correspondent pas à la complexité physico-chimique réelle d'un effluent hospitalier.

Aussi, nous avons voulu vérifier ici, si le modèle CA peut s'appliquer à l'effluent étudié dans ce chapitre. Pour cela nous utilisons d'une part ; (i) les résultats de la caractérisation physico-chimique de l'échantillon moyen et d'autre part ; (ii) les valeurs d'écotoxicité (vis-à-vis de l'inhibition de la mobilité de *D. magna* en 24h) associées à chacun des paramètres et issues des bases de données d'écotoxicité internationales. Ces deux types de données nous permettent alors de calculer la CA, qui représente, dans ce cas, la CE50 daphnie-24h théorique lorsqu'il y a additivité (des concentrations) des effets combinés. Cette valeur peut alors être comparée à la valeur d'écotoxicité réelle de l'échantillon moyen-24h vis-à-vis de la mobilité de *Daphnia magna* en 24h.

Une recherche bibliographique des valeurs de « CE50 daphnie 24h » associées aux polluants dosés est donc préalablement effectuée. Les bases de données de l'INERIS [2006], de l'US EPA [2003], du PAN [Pesticide Action Network's, 2004] et du logiciel d'évaluation des risques Terrasys [Trépanier, 2005] sont utilisées à cet effet.
Il est ici nécessaire d'apporter quelques précisions sur la sélection des données d'écotoxicité issues des bases de données d'écotoxicité internationales. Notons que les résultats inter laboratoires d'un bioessai à l'égard d'une même espèce aquatique varient de 1 à 5 et même parfois 10 et que les données sont souvent imprécises et parfois incomplètes. Pour alimenter le modèle, il est donc essentiel d'établir des règles pertinentes de sélection des données :

1) Pour chaque polluant, nous choisissons la médiane des données collectées afin d'éliminer les valeurs aberrantes ;
2) Lorsqu'il n'existe pas de donnée sur l'essai en 24h, nous choisissons les données associées à l'essai en 48h qui sont plus discriminantes ;

3) Pour les polluants dont la toxicité a été testée dans cette thèse, nous choisissons cette valeur ;
4) Pour les métaux dont la toxicité dépend de la forme chimique concernée, nous choisissons la médiane « toutes formes chimiques confondues ». Il est en effet difficile de savoir qu'elles sont les formes chimiques qui prédominent dans l'effluent.(y compris les formes organométalliques).

Le Tableau 39 présente les valeurs de « CE50 daphnie 24h » médianes associées aux polluants dosées dans l'échantillon moyen-24h (les données brutes et les références bibliographiques associées aux valeurs de ce tableau sont présentées en annexe 8) ainsi que la CE50 théorique calculée à partir du modèle CA et la CE50-24h expérimentale de l'échantillon moyen brut. Notons que nous avons choisi la CE50-24h de l'échantillon brut car la majorité des analyses chimiques sont réalisées sur cet échantillon (voir partie 2, page 98).

polluant	concentration dans l'échantillon moyen (mg/l)	CE50 daphnie-24h issues de la littérature, valeurs médiane (mg/l)
ammonium	48	2.04
chlore libre	0,547	0,053*
acétaldéhyde	0,0059	24,5**
glutaraldéhyde	0,0021	10,7***
formaldéhyde	0,07	42
chloroforme	0,0024	186,9
acétone	7,3	100
méthanol	0,76	10 000
éthanol	1,7	10 000
2-propanol	3,67	9 700
As	0,01	11,8
Cu	0,162	0,1
Pb	0,012	3,115
Zn	0,147	1,17
fréon 113	0,0026	71
métoprolol	0,000107	63,9**
timolol	0,000033	9#
bisoprolol	0,000090	8#
bétaxolol	0,000008	1,5#
propranolol	0,000092	3,1
cyclophosphamide	0,0000052	1 795#
CE50-24h théorique		**2,8%**
CE50-24h expérimentale de l'échantillon moyen brut		**2,4% (IC95 : 2,2-2,6)**

Tableau 39 : Réponse de l'essai *Daphnia magna* 24h aux polluants contenus dans l'échantillon moyen (données issues de la littérature) et calcul de la CA (Concentration Adition) à partir des réponses et des concentrations
[* : valeur pour l'hypochlorite de sodium issue de cette étude (page 124, CE50 NaOCl à 10% = 0,53 mg/l) ; ** : CE50-48h ; *** : valeur issue de cette étude (page 124, CE50 GA à 50% = 21,4 mg/l) ; # : données de type eccosar]

Les résultats montrent une CE50-24h théorique de 2,8% d'effluent vis-à-vis de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna.* Cette valeur est très proche de la CE50 expérimentale (2,4%). Ceci montrerait que le modèle d'additivité des concentrations s'applique au mélange complexe formé par l'échantillon moyen d'effluent hospitalier (toujours vis-à-vis de la mobilité de *D. magna*).

L'importance des intervalles obtenus pour les CE50 des données brutes (voir annexe 8) montre cependant la fragilité du résultat et les limites de l'utilisation des bases de données d'écotoxicité internationales.

Notons de plus, que cette analyse est incomplète car elle se base sur une vingtaine de substances polluantes et ne considère pas :

- Les substances polluantes dosées en concentration inférieure à la limite de détection des techniques analytiques utilisées ;
- Les substances polluantes dosées sous la forme d'un indice ou d'un groupe. Ainsi nous n'avons malheureusement pas prendre en compte : les AOX, les surfactants, l'indice phénol, le chlore total et l'azote Kjeldahl ;
- Les substances polluantes pour lesquelles il n'existe pas de jeu de données d'écotoxicité exploitables : l'aténolol, l'acébutolol, le sotalol, le nadolol, l'oxprénolol et le dibromodichlorométhane.
- Les substances polluantes non analysées comme les antibiotiques et les agents de contrastes iodés.

Ajoutons à cela, la nécessité d'étudier la spéciation des métaux.

Le résultat obtenu va néanmoins dans le sens de l'additivité des effets combinés à une échelle de complexité supérieure aux résultats obtenus dans le chapitre 1 (page133).

4. Réponse d'une communauté périphytique naturelle exposée à l'effluent moyen brut

4.1 Résultats préliminaires : incidence de la congélation sur la toxicité de l'effluent

Rappelons que deux campagnes de bioessais sur communautés périphytiques ont été réalisées, afin d'étudier la réponse des communautés naturelles sur deux périodes climatiques extrêmes. La première campagne a été réalisée au cours de l'hiver 2007 et la seconde au cours de l'été 2007. Ces deux campagnes de bioessais ont été menées sur l'échantillon moyen d'effluent décongelé. Nous avons donc choisi de suivre certains paramètres afin de prendre en compte l'incidence potentielle de la décongélation sur la toxicité de l'échantillon.

Les résultats (Tableau 40) montrent, dans les deux cas de décongélation, (i) une légère augmentation du pH (0,9 unité pour « hiver » et 0,2 pour « été »), (ii) une diminution de la conductivité (310 µS/cm pour « hiver » et 272 µS/cm pour « hiver ») et (iii) une diminution de la toxicité de l'échantillon vis-à-vis de la mobilité de *D. magna* (4,9% pour la CE20-24h « hiver » et 1,6% pour la CE20-24h « été ») qui, compte tenu des intervalles de confiance, se révèle être significative.

Ces résultats sont classiques, l'augmentation du pH peut être liée à la diminution de la conductivité car un certain nombre de molécules précipitent lors du cycle congélation/décongélation [Jean, 1991; Plagellat, 2004].

	effluent "frais"	effluent décongelé	
		hiver 2007	été 2007
pH	8,0**	8,9*	8,2*
Conductivité (µS/cm)	970**	660*	698*
Inhibition de la mobilité de *D. magna*, CE20-24h (% volumique d'effluent)	1.8% (IC95 : 1,6-2,1)*	6.7% (IC95 : 5,2-10,6)*	3.4% (IC95 : 2,6-5,0)*

Tableau 40 : Incidence de la décongélation de l'échantillon moyen-24h sur quelques paramètres
[* mesures LSE, ** mesures wessling]

4.2 Analyses en composantes principales des résultats

4.2.1 Campagne d'essai « Hiver 2007 »

Le diagramme des valeurs propres associé aux composantes principales montre une forte décroissance entre la quatrième et la cinquième valeur (Figure 49). Cela justifie le fait de retenir les quatre premiers facteurs pour l'analyse en composantes principales. L'interprétation de l'analyse se limitera à l'étude du plan engendré par les deux premiers facteurs de l'analyse dont le pourcentage d'inertie cumulée permet d'expliquer 71,7% de la variance totale.

L'analyse des coordonnées des variables et de leur contribution à la définition des axes montrent que les variables respiration, matière organique, chlorophylle-*a* et production brute sont majoritairement représentées sur l'axe F1 (respectivement à hauteur de 42, 53, 89 et 47%). La typologie des variables révèle une opposition vis-à-vis de l'axe F1, entre les variables respiration d'une part et les variables matière organique, chlorophylle-*a* et production brute d'autre part. Les variables matière organique, chlorophylle-*a* et production brute sont corrélées positivement à l'axe F1, alors que la variable respiration y est corrélée négativement. Notons que cette opposition est bien plus conséquente dans le cas des variables respiration et production brute. Pour ce qui est de la variable phéopigments, elle est majoritairement représenté sur l'axe F2 (60%).

Une représentation en étoile a été choisie pour la projection des individus car elle fournit une représentation claire de la dispersion des réplicats. La dispersion apparaît relativement importante pour certains réplicats des concentrations 6, 31 et 90%. Cette dispersion peut *a priori* être attribuée à la variabilité naturelle des communautés testées. La littérature révèle en effet, que le travail sur communautés et substrats naturels engendre une variabilité importante des résultats [Lamberti et Resh, 1985; Pashkevich *et al.*, 1996]. Cela dit, la dispersion des résultats reste acceptable pour la majorité des réplicats et nous raisonnerons donc sur les barycentres pour la suite de cette analyse.

La typologie des individus montre une gradation des essais en présence de polluant, le long de l'axe F1, du moins concentré vers le plus concentré sauf pour l'essai contenant 31% d'effluent. Mais compte tenu de la dispersion sur ce point, le fait qu'il semble « mal placé » est discutable. L'analyse des coordonnées de ces individus montre qu'ils sont tous bien représentés dans le plan F1F2. Les réplicats des concentrations 6, 11 et 18% ont des coordonnées positives sur F1. À l'inverse, les essais contenant 53 et 90% d'effluent ont des coordonnées négatives. Cela signifie qu'au-delà de la gradation, il y a une opposition entre les individus 6, 11 et 18% d'une part et 53 et 90% d'autre part. L'analyse des coordonnées révèle également que l'essai témoin est principalement défini par F3 (53%) et que l'échantillon contenant 31% d'effluent est identiquement défini par F4 (31%) et F1 (29%) et légèrement moins par F2 (21%). Ces deux

points sont donc mal représentés sur le plan factoriel F1F2. Il est à ce titre justifié de les exclure de l'analyse.

L'étude simultanée de la projection des variables et des individus montre que les points représentant les essais contenant 53 et 90% d'effluent sont caractérisés par les valeurs de respiration les plus importantes et les valeurs de matière organique, de chlorophylle-*a* et de production brute les plus faibles. Le point représentant les essais contenant 6% d'effluent (bien représentés suivant F1) est caractérisé à l'inverse par les valeurs de respiration les plus faibles et les valeurs de matière organique, chlorophylle-*a* et production brute les plus élevées. Comme il a été vu précédemment, les essais 18% sont bien représentés suivant F2 et se caractérisent donc par de faibles teneurs en phéopigments. L'essai témoin est quant à lui, bien « au centre » et ne semble influencé par aucune des variables.

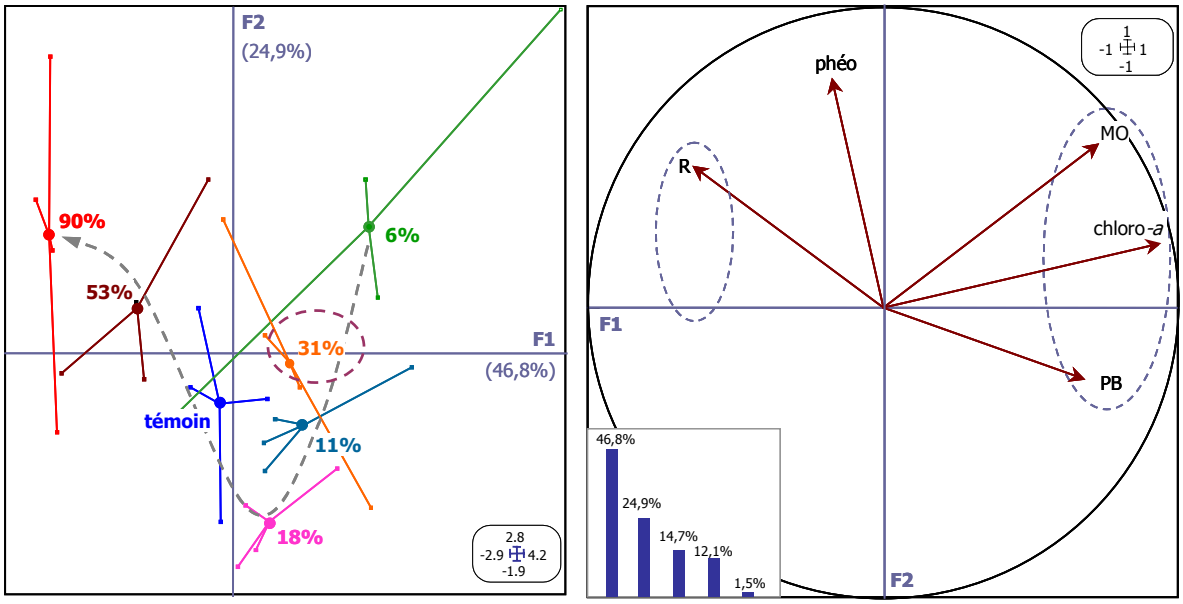


Figure 49 : Analyse en composantes principales des réponses du périphyton exposé à l'échantillon moyen-24h au cours de la campagne hiver 2007
[de gauche à droite : projection des individus sur F1F2, diagramme des valeurs propres et projection des variables sur F1F2. R : respiration ; phéo : phéopigments ; MO : matière organique ; chloro-*a* : chlorophylle-*a* ; PB : production brute]

Cette analyse montre que les biodescripteurs retenus *a priori*, permettent de différencier les essais contenants des effluents en fonction de la concentration en effluent, ce qui se traduit par une ordination des points selon F1. L'augmentation de la concentration conduit à une augmentation de la respiration d'une part, et à une diminution de l'activité photosynthétique, de la croissance algale et globale du biofilm (ou un décrochage du biofilm) d'autre part. L'évolution de la teneur en phéopigments montre quant à elle, une stimulation de la composante algale du biofilm en présence de 6 à 18% d'effluent.

4.2.2 Campagne d'essai « Été 2007 »

L'analyse en composantes principales se limitera à l'étude du plan engendré par les deux premiers facteurs de l'analyse dont le pourcentage d'inertie cumulée permet d'expliquer 64,2% de la variance totale (Figure 50).

L'analyse des coordonnées des variables et de leur contribution à la définition des axes montrent que les variables matière organique, chlorophylle-*a* et production brute sont majoritairement représentées sur l'axe F1 (respectivement à hauteur de 40, 61 et 43%). La variable respiration est majoritairement représentée sur l'axe F2 (82%). Quant à la variable phéopigments, elle est représentée de manière équivalente sur les deux axes F1 (26%) et F2 (28%).

La typologie des variables révèle que la matière organique, la chlorophylle-*a* et la production brute sont corrélées à l'axe F1 et que les coordonnées de ces variables sont positives. La variable respiration est quant à elle corrélée à l'axe F2 et est de coordonnée négative sur cet axe.

La dispersion des individus apparaît relativement importante pour certains réplicats des concentrations 31 et 53% mais reste acceptable pour la majorité des réplicats.

Cette analyse met en évidence un regroupement des individus selon la concentration en effluent. Le groupe constitué des essais contenant 31 et 53% d'effluent a des coordonnées négatives suivant F1 et positives suivant F2. Il s'oppose au groupe formé par les essais contenant 90% d'effluent qui a des coordonnées positives suivant F1 et négatives suivant F2. Le troisième groupe est constitué par le témoin et les essais contenant 6, 11 et 18% d'effluent et se situe au centre du plan F1F2.

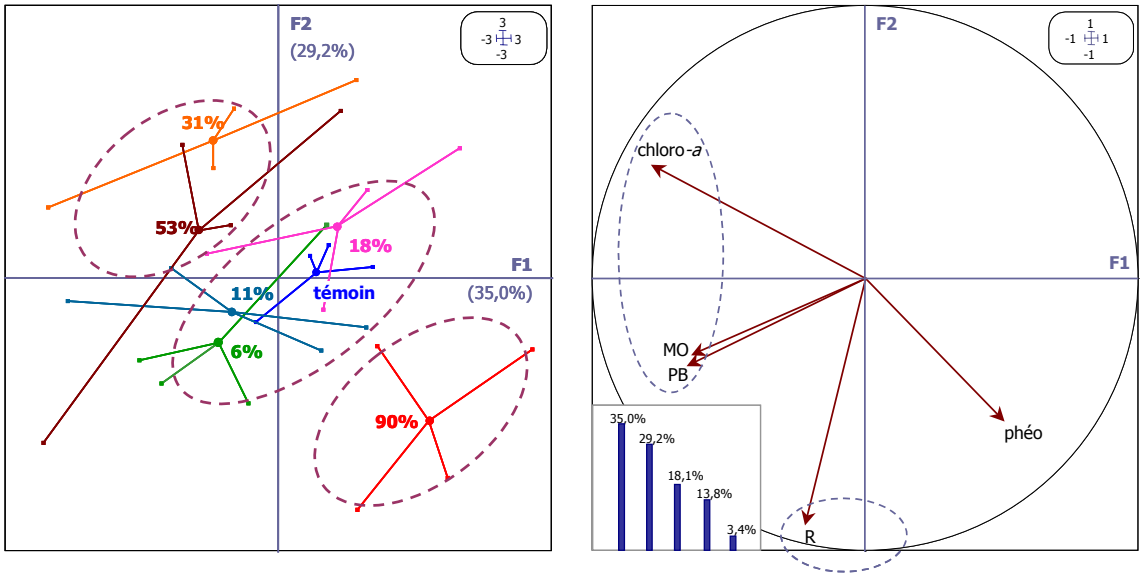


Figure 50 : Analyse en composantes principales des réponses du périphyton exposé à l'échantillon moyen-24h au cours de la campagne été 2007
[de gauche à droite : projection des individus sur F1F2, diagramme des valeurs propres et projection des variables sur les axes F1F2. R : respiration ; phéo : phéopigments ; MO : matière organique ; chloro-*a* : chlorophylle-*a* ; PB : production brute]

Les biodescripteurs retenus *a priori,* ne permettent pas de différencier les essais contenant des effluents en faibles concentrations (6, 11 et 18%) de l'essai témoin, ce qui se traduit par un effet de groupe au centre du plan F1F2 dans lequel est présent le témoin. Par contre, les biodescripteurs mettent en avant un effet que nous baptiserons de « stimulant » de l'effluent dans le cas des essais contenant 31 et 53% d'effluent avec d'une part, une augmentation de la croissance globale du biofilm et de l'activité photosynthétique (valeurs de matière organique et de production brute les plus importantes) et d'autre part une stimulation de croissance de la composante algale du biofilm (augmentation des teneurs en chlorophylle et diminution des teneurs en phéopigments). Les plus faibles valeurs de respiration associées aux plus fortes valeurs de production primaire sont observées pour ce même groupe. Notons que le suivi d'autres paramètres nous permettrait de mieux expliquer ce résultat. À l'opposé de ce groupe, les biodescripteurs mettent en avant un effet que nous baptiserons de « inhibiteur » de l'effluent sur les essais contenant 90% d'effluent (valeurs de chlorophylle-*a*, de matière organique et de production brute les plus faibles et valeurs de phéopigments et de respiration les plus élevées).

4.3 Analyse détaillée, variable par variable

4.3.1 Effet de la concentration sur la structure du biofilm

4.3.11 Croissance globale du biofilm

Au regard des valeurs moyennes, la masse organique des biofilms (Figure 51) est globalement plus faible en été (entre 2,4 et 3,6 g/m^2) qu'en hiver (entre 2,9 et 4,6 g/m^2).

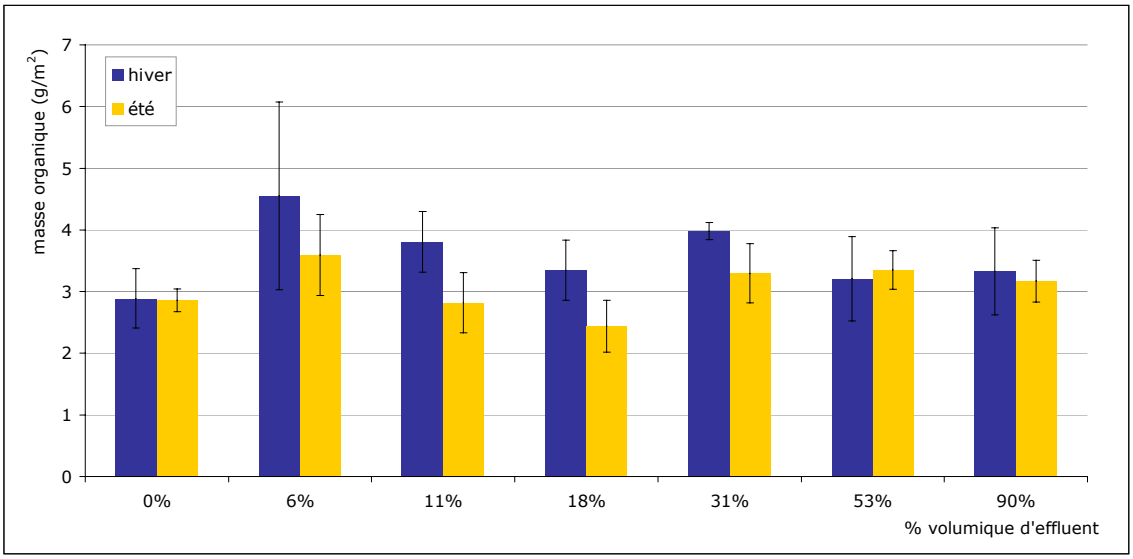


Figure 51 : Réponse du biofilm vis-à-vis de sa masse organique et en fonction de la concentration en effluent et des saisons [Comparaison au témoin par le test de Bonferroni : *< 0,05 ; ** < 0,001]

Les moyennes montrent que la croissance des biofilms en présence d'effluent est légèrement stimulée en hiver (témoin : 2,9 g/m^2 et test entre 3,2 et 4,6 g/m^2). L'analyse de la variance révèle pour sa part, que la croissance globale des essais « tests » n'est pas modifiée significativement par rapport aux essais « témoins », quelle que soit la concentration en effluent et la saison. Deux explications semblent répondre à ces résultats : la durée de l'essai, qui est peut être trop courte pour voir un effet sur la structure globale, et/ou le fait que ce type d'effluent n'interagisse pas sur ce biodescripteur.

4.3.12 Croissance algale du biofilm

La croissance de la communauté algale est estimée à partir des teneurs en chlorophylle-*a* (Figure 52). Les concentrations observées sont globalement plus faibles en été (entre 15,1 et 35,3 mg/m^2) qu'en hiver (entre 16,3 et 47,3 mg/m^2). Au regard des moyennes, quelle que soit la saison, on observe une légère stimulation des biofilm vis-à-vis de ce paramètre, ceci jusqu'à 31% d'effluent, suivie d'une inhibition surtout marquée en présence de 90% d'effluent. La comparaison des « tests » aux « témoins » par le test de Bonferroni, montre que la stimulation précédemment énoncée est significative ($p<0,05$) dans le cas de la campagne d'été, pour les biofilms exposés à 31 et 53% d'effluent.

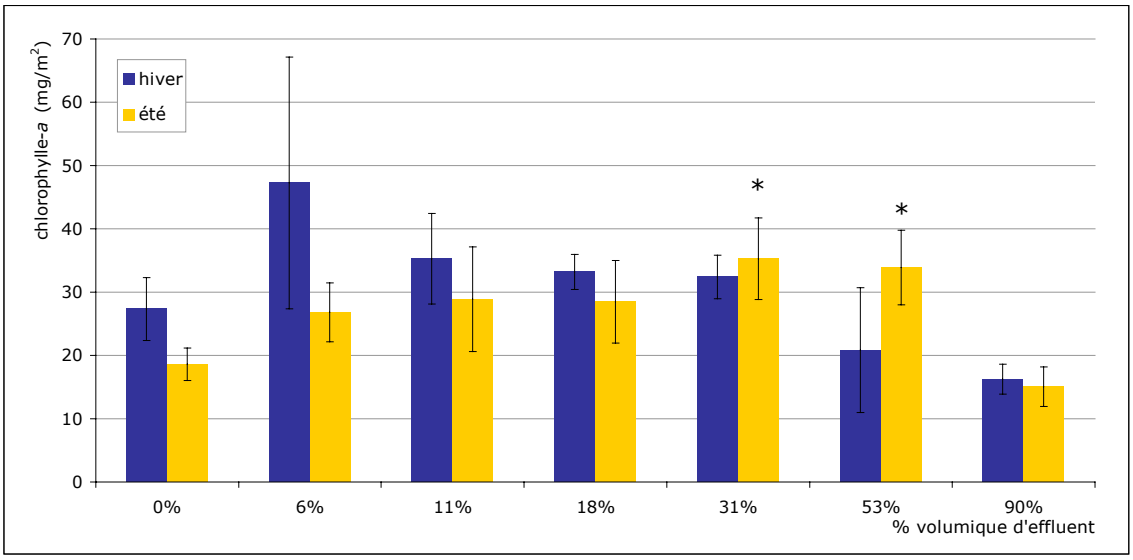


Figure 52 : Réponses du biofilm vis-à-vis de la teneur en chlorophylle-*a* en fonction de la concentration en effluent et des saisons [Comparaison au témoin par le test de Bonferroni : *< 0,05 ; ** < 0,001]

Les phéopigments

Le protocole expérimental d'analyse de la chlorophylle-*a* est associé au dosage d'un indice phéopigments (qui permet d'estimer l'état d'altération de la chlorophylle-*a*). Les coefficients de variation associés aux concentrations de phéopigments mesurées sont très importants (CV>50%) pour les deux campagnes d'essai. Nous avons donc choisi de ne pas exploiter ces résultats.

L'Indice Autotrophique

L'Indice Autotrophique (IA) est le rapport de la biomasse totale sur la chlorophylle-*a*. Il estime le ratio entre les organismes autotrophes et hétérotrophes [Matthews, 1980; APHA, 2000]. Quelle que soit la campagne d'essai, IA oscille entre 87 et 218 (données non présentées). Il reste très proche de 100 jusqu'à 31% d'effluent, ce qui indique que la communauté périphytique est très légèrement dominée par les autotrophes ; et est supérieur à 150 pour les tests contenant 53 et 90% d'effluent, ce qui indique qu'un équilibre des communautés autotrophe et hétérotrophe tend à s'établir [Fayolle, 1998].

L'augmentation de IA pour les fortes concentrations peut être due à plusieurs phénomènes :

- Un phénomène de dégénérescence de la communauté algale autotrophe
- et/ou un développement des communautés hétérotrophes ;
- et/ou un dépôt de matière organique provenant de l'effluent (plus abondante aux fortes concentrations).

4.3.2 Effet de la concentration sur le métabolisme du biofilm

4.3.21 Production primaire brute (activité photosynthétique)

Notons tout d'abord que la production primaire brute des biofilms est globalement légèrement plus faible en été qu'en hiver, le dernier jour d'essai (Figure 53). Les valeurs moyennes de production brute montrent une inhibition progressive de la production brute périphytique pour les essais contenant entre 6 et 90% d'effluent « en hiver » et entre 11 et 90% en été. Cette inhibition pourrait s'expliquer par la sénescence de la communauté algale des biofilms.

L'analyse de la variance ne révèle cependant aucune inhibition ou stimulation significative des essais « tests » par rapport aux essais « témoins ».

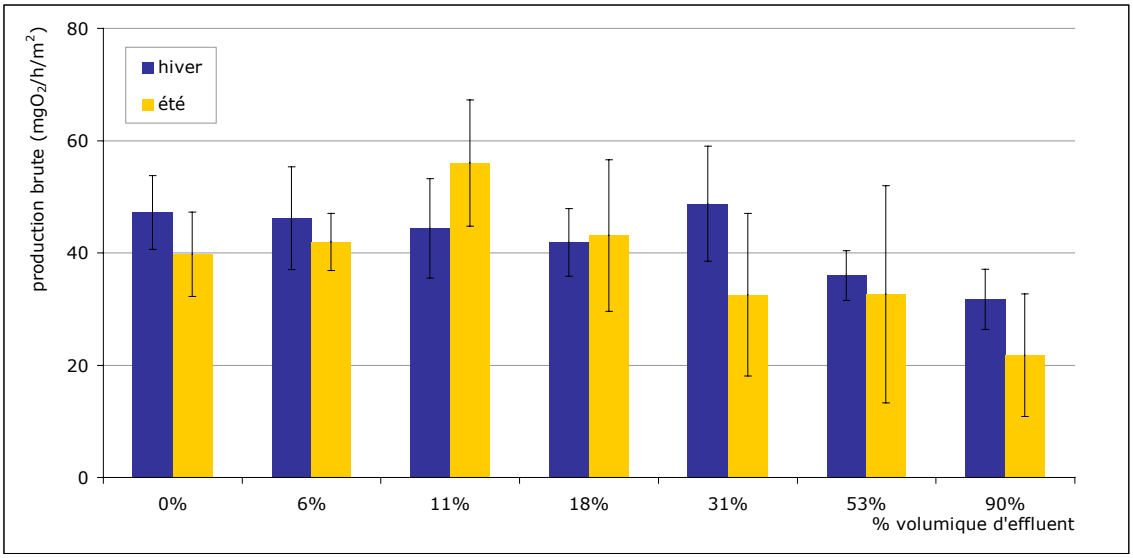


Figure 53 : Réponses du biofilm le dernier jour d'essai vis-à-vis de sa production brute en fonction de la concentration en effluent et des saisons [Comparaison au témoin par le test de Bonferroni : *< 0,05 ; ** < 0,001]

4.3.22 Activité respiratoire

L'activité respiratoire des biofilms est globalement plus importante dans le cas de la campagne d'été que dans le cas de celle d'hiver (Figure 54). Les valeurs moyennes de respiration associées au dernier jour d'essai, montrent que l'activité respiratoire est inhibée en présence de 11% d'effluent « en hiver » et de 31% d'effluent « en été ». Cette activité est en revanche, stimulée en présence de 31, 53 et 90% d'effluent « en hiver » et en présence de 53 et 90% d'effluent « en été ».

La comparaison des « tests » aux « témoins » par le test de Bonferroni, montre que l'inhibition précédemment énoncée est très significative ($p < 0,0001$) dans le cas de la campagne d'hiver, pour les biofilms exposés à 90% d'effluent.
Cette stimulation pour les fortes concentrations peut être due :

- à l'oxydation de la matière organique (qui augmente via la sénescence de la communauté algale et/ou l'apport de matière organique issue de l'effluent). Elle peut être chimique et/ou biologique (croissance de la population hétérotrophe et/ou stimulation de l'activité respiratoire de la population hétérotrophe) ;
- à la respiration des phototrophes.

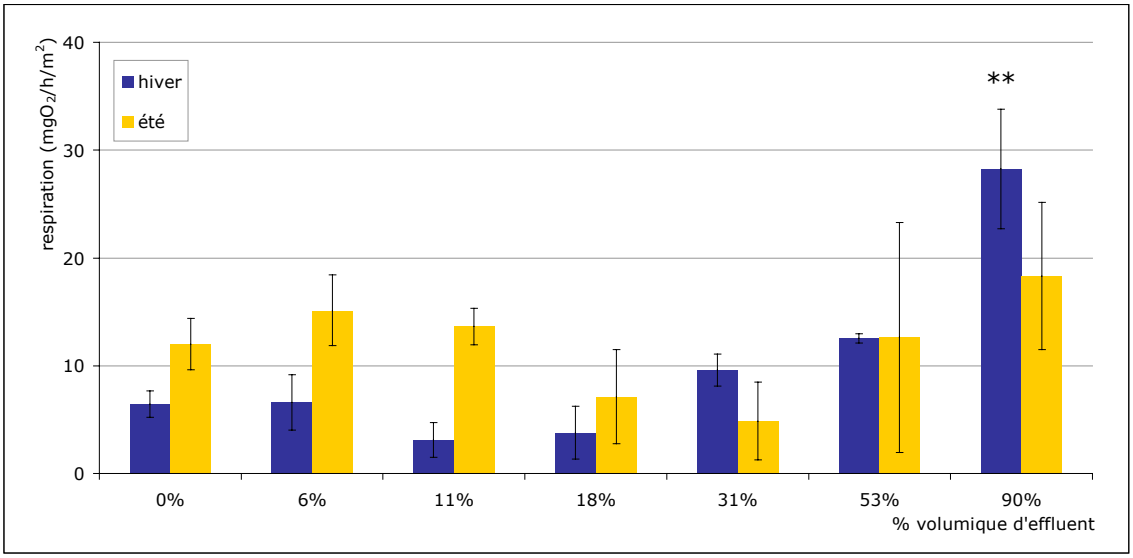


Figure 54 : Réponses du biofilm vis-à-vis de son activité respiratoire en fonction de la concentration en effluent et des saisons [Comparaison au témoin par le test de Bonferroni : *< 0,05 ; ** < 0,001]

Le ratio PB/R

Le ratio PB/R vise à évaluer le niveau d'autotrophie/hétérotrophie d'un biofilm [Odum, 1957]. Les ratios sont globalement compris entre 1,2 et 15,7. Ils sont plus faibles en été qu'en hiver (données non présentées). Cela confirme les tendances préétablies, à savoir une légère augmentation de la communauté hétérotrophe (et/ou diminution des autotrophes) jusqu'à 18% d'effluent « en hiver » et 31% « en été » puis une diminution de la communauté hétérotrophe (et/ou augmentation des autotrophes) pour les plus fortes concentrations.

4.4 Synthèse des effets observés

Le Tableau 41 résume les effets observés à partir de l'analyse détaillée des résultats en fonction de la concentration en effluent et de la saison. Ces résultats confirment les tendances préétablies par les ACP.

S'agissant de l'essai « hiver », une distinction des « tests » peut être faite selon le traitement (concentration en effluent) :

- Lorsque la concentration en effluent est inférieure ou égale à 31%, les communautés ne répondent pas à l'effluent (si ce n'est une légère diminution de l'activité respiratoire en présence de 18% d'effluent) vis-vis des paramètres biologiques étudiés.
- Lorsque la concentration en effluent est égale à 53 et 90%, les communautés présentent une diminution de la concentration en chlorophylle-*a,* une diminution de l'activité photosynthétique et une augmentation de l'activité respiratoire (qui se révèle très significative en présence de 90% d'effluent).

S'agissant de l'essai « été », une distinction des « tests » peut être faite selon le traitement (concentration en effluent) :

- Lorsque la concentration en effluent est égale à 6, 11, 18, 31 et 53 % les communautés présentent une augmentation de concentration en chlorophylle-*a* (significative en présence de 31et 53% d'effluent). Notons également la diminution de l'activité respiratoire en présence de 31% d'effluent et son augmentation en présence de 53% d'effluent.
- Lorsque la concentration en effluent est égale à 90%, les communautés présentent une diminution de la concentration en chlorophylle-*a,* une diminution de l'activité photosynthétique et une augmentation de l'activité respiratoire.

Les deux essais présentent donc le même type de réponse aux différences près que (*i*) dans le cas de l'essai « été », des effets « stimulants » sont observés pour les faibles concentrations en effluent (augmentation de la concentration en chlorophylle-*a*) et, que (*ii*) les effets « inhibiteurs » sont plus marqués pour l'essai « hiver » en présence de 53% d'effluent. La communauté prélevée en hiver est donc globalement la plus sensible des deux communautés étudiées. Ce résultat est accentué par le fait que le test d'écotoxicité effectué vis-à-vis de la mobilité de *Daphnia magna*, révèle une toxicité supérieure pour l'essai été (paragraphe 4.1, page 178). Notons enfin que dans les deux cas la croissance globale du périphyton n'est pas affectée par la présence d'effluent.

période	paramètre	concentration en effluent (en % volumique)					
		6%	11%	18%	31%	53%	90%
hiver	mo	o	o	o	o	o	o
	chloro-*a*	o	o	o	o	o	-
	PB	o	o	o	o	-	-
	R	o	o	-	o	+	+**
été	mo	o	o	o	o	o	o
	chloro-*a*	+	+	+	+*	+*	-
	PB	o	o	o	o	o	-
	R	o	o	o	-	+	+

Tableau 41 : Synthèse des effets observés par rapport aux témoins au cours des deux campagnes d'essais
[mo : matière organique ; chloro-*a* : chlorophylle-*a* ; PB : production brute ; R : respiration ; o : absence d'effet ; + : effet « stimulant » ; - : effet « inhibiteur » ; Comparaison au témoin par le test de Bonferroni : *< 0,05 ; ** < 0,001]

Dans les deux cas des effets sont avérés en présence de 90% d'effluent : diminution de la teneur en chlorophylle-*a* et de l'activité photosynthétique et augmentation de l'activité respiratoire. Ces différents effets semblent être cohérents. La diminution de la teneur en chlorophylle-*a* et donc de la biomasse algale peut être associée à la diminution de l'activité photosynthétique. L'augmentation de la respiration pourrait quant à elle être expliquée par l'oxydation de la matière organique qui augmente via la sénescence de la communauté algale et/ou l'apport de matière organique issue de l'effluent. Cette oxydation peut elle-même être d'origine chimique et/ou biologique (croissance de la population hétérotrophe et/ou stimulation de l'activité respiratoire de la population hétérotrophe), et/ou par la respiration des phototrophes. Les paramètres mesurés ne permettent cependant pas de valider ici ces hypothèses car d'une part, aucune information n'est disponible sur la structure et l'état physiologique de la communauté hétérotrophe et d'autre part, les informations sur la communauté algale ne se révèlent pas suffisamment précises.

Ce travail nécessite donc la mise en place d'expérimentations complémentaires. Il montre pourtant aucun effet de l'effluent les concentrations inférieures à 18% (avec les biodescripteurs utilisés et les conditions expérimentales présentées dans la partie matériels et méthodes). Notons donc que la concentration 18% d'effluent peut être retenu en tant que « % de la matrice sans effet ».

Chapitre 3.

EDREcotox liés aux rejets d'un effluent hospitalier dans un cours d'eau

En se basant sur les résultats des deux chapitres précédents, ce chapitre présente les résultats d'un cas concret d'EDREcotox liés aux rejets des effluents d'un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France dans le réseau d'eaux usées en direction de la STEP puis du cours d'eau récepteur.

Rappelons tout d'abord que cette thèse est consacrée essentiellement à l'amélioration de la phase « caractérisation des effets ». En conséquence, nous avons pris le partie d'une approche simplifiée de l'évaluation de l'exposition des organismes du cours d'eau à l'effluent.

Après le développement des phases de formulation du problème et de caractérisation des expositions de l'EDREcotox, le présent chapitre développe la caractérisation des effets par les quatre types d'approches présentés dans la revue bibliographique, et à partir des résultats issus des deux chapitres précédents.

Les résultats de la caractérisation du risque par ces différents types d'approches constituent la dernière partie de ce chapitre et permettront la critique des approches en vue de leur amélioration.

1. Caractérisations communes aux différentes EDREcotox

1.1 Formulation du problème

1.1.1 Contexte et scénario

Cette évaluation est menée dans le but d'évaluer les risques liés à un scénario particulier de gestion des effluents hospitaliers. Ce scénario se base sur la situation la plus observée en France, à savoir le rejet de l'effluent hospitalier dans le réseau d'assainissement de l'hôpital puis dans le réseau d'assainissement urbain. Le mélange « effluent urbain et effluent hospitalier » est ensuite traité dans une STEP biologique communale avant d'être rejeté dans le milieu naturel qui s'avère être un cours d'eau dans la majorité des cas (Figure 55).

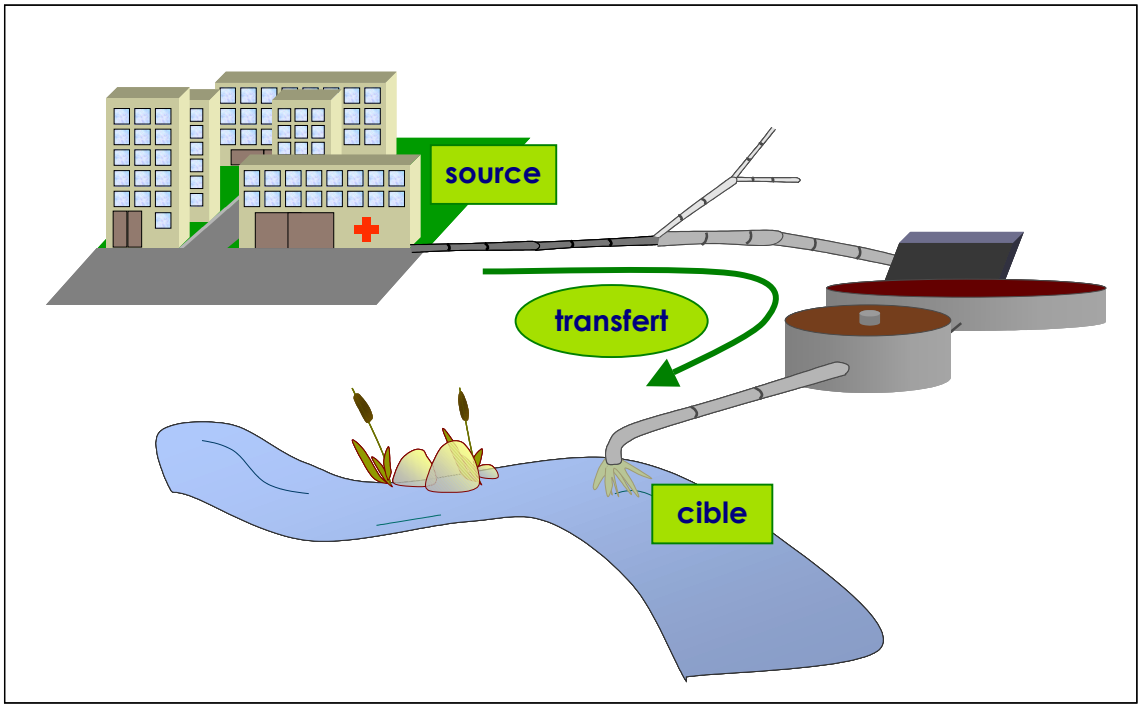


Figure 55 : Schéma simplifié du scénario de l'EDREcotox
[Source : collecteur de l'hôpital d'étude ; Voie de Transfert : dispositif d'assainissement (réseau d'assainissement de l'hôpital, réseau d'assainissement urbain et STEP) ; Cible environnementale : organismes du cours d'eau récepteur]

Dans le cadre de cette thèse consacrée essentiellement à l'amélioration de la phase « caractérisation des effets », nous avons pris le parti d'une approche simplifiée de l'évaluation de l'exposition des organismes du cours d'eau, à savoir simplement le calcul de la dilution dans le dispositif d'assainissement urbain (réseau d'assainissement de l'hôpital, réseau d'assainissement urbain, STEP), puis dans le cours d'eau récepteur. Ces simplification font l'objet d'une discussion (voir paragraphe 3.5.211, page 201)

Notons enfin que ce scénario est appliqué aux effluents d'un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France (présenté dans le chapitre 2 de la partie matériels et méthodes page 95) se déversant dans un cours d'eau après traitement par une STEP biologique.

Les limites géographiques du scénario sont constituées par l'hôpital étudié, le réseau d'assainissement de l'hôpital, le réseau d'assainissement urbain, la STEP et le cours d'eau récepteur.
Ce scénario se base sur une journée d'activité normale des hôpitaux, qui constitue la limite temporelle de l'évaluation.
Les stresseurs sont les effluents hospitaliers et les polluants qu'ils contiennent.
Les vecteurs sont constitués par le dispositif d'assainissement.
Les principales cibles environnementales concernées sont les organismes aquatiques de la colonne d'eau du cours d'eau.

1.1.2 Paramètres d'évaluation et modèle conceptuel

1.1.21 Sources d'émission et stresseurs

La source d'émission des stresseurs est le collecteur de l'hôpital d'étudié.

Les effets toxiques vis-à-vis des organismes cibles dépendent des stresseurs concernés. Les recherches bibliographiques menées sur les contaminants des effluents hospitaliers mais aussi et surtout la caractérisation physico-chimique de l'effluent étudié permettent la détermination des stresseurs et facilitent également l'interprétation des résultats des bioessais.

Notons que les phénomènes de transformation biologique et physico-chimique des polluants dans les réseaux ne seront pas pris en compte dans cette évaluation. En outre, dans cette première approche, nous considérerons que les polluants toxiques émis par l'hôpital résistent aux mécanismes d'épuration de la STEP.

1.1.22 Voies de transferts et méthodes d'évaluation des expositions

Dans ce scénario, nous considérons que la principale voie de transfert des contaminants toxiques contenus dans les effluents se fait par dilution dans les réseaux d'assainissement, la STEP et le milieu récepteur. La méthode la plus simple au calcul d'exposition des organismes, est le calcul des dilutions. Celle-ci nécessite la définition précise des débits mis en jeu dans le scénario :

- $\mathbf{Q_H}$: Débit moyen d'effluent rejeté par l'hôpital d'étude lors d'une journée normale d'activité ;
- $\mathbf{Q_{Cours\ d'eau}}$: Débit journalier du cours d'eau en aval de la ville étudiée et lors d'une journée normale.

1.1.23 Écosystème à protéger et méthodes d'évaluation des effets

Dans le cadre de cette évaluation, les organismes à protéger sont ceux classiquement présents dans la colonne d'eau des milieux aquatiques superficiels lotiques. Il s'agit de protéger les organismes aquatiques du cours d'eau, dont les décomposeurs : bactéries, champignons, … ; les producteurs primaires : phytoplancton, algues, macrophytes… ; les consommateurs primaires : protozoaires, crustacés ; et les consommateurs secondaires : les poissons, … .

Les quatre types d'approches développés dans la bibliographie sont utilisés parallèlement pour l'évaluation des effets :

- <u>L'approche « substances ».</u>

  Les effets sur les organismes cibles sont représentés par les valeurs de $PNEC_{eau\ douce}$ des bases de données internationales d'écotoxicologie (BDI). Les substances traceurs de risque sont ciblées à partir de la caractérisation physico-chimique de l'effluent.

- <u>L'approche « substances avec effets combinés ».</u>

  Les résultats des deux chapitres précédents ont montré d'une part, que les effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers peuvent être assimilés à l'additivité des concentrations (CA) vis-à-vis de l'inhibition de la mobilité du microcrustacé *Daphnia magna* en 24h (chapitre 1, page 133), d'autre part, que la réponse de ce bioessai représente relativement bien l'écotoxicité de l'effluent (chapitre 2, page 165), et finalement, que l'étude des effets combinés des polluants dosés dans l'effluent hospitalier va dans le sens d'une additivité des concentrations vis-à-vis de l'inhibition de la mobilité du microcrustacé *Daphnia magna* en 24h (chapitre 2, paragraphe 3, page 175).
  En conséquence, pour cette approche, les effets sur les organismes cibles sont représentés par l'addition des rapports $PEC/PNEC_{eau\ douce}$ [INERIS, 2003].

- L'approche « batterie de bioessais ».

Les organismes cibles sont représentés par la « batterie de bioessais complète » (voir partie 2, page 103), soit les organismes suivants : le microcrustacé *Daphnia magna* (inhibition de la mobilité en 24h et 48h), la bactérie *Vibrio* fischeri (inhibition de la luminescence en 15 et 30 min), l'algue *Pseudokichneriella subcapitata* (inhibition de la croissance en 72h), le microcrustacé *Ceriodaphnia dubia* (inhibition de la mobilité en 24 et 48h, inhibition de la croissance en 7j et inhibition de la reproduction en 7j), le rotifère *Brachionus calyciflorus* (inhibition de la reproduction en 48h) et la lentille d'eau *Lemna minor* (inhibition de la croissance en 7j).

- L'approche « bioessai pluri-spécifique ».

Les organismes cibles sont représentés par une communauté périphytique naturelle. L'évaluation des effets se base sur la biomasse totale, la biomasse algale et les activités photosynthétiques et respiratoires.

1.1.24 Modèle conceptuel

Le modèle conceptuel (Figure 56) résume les différents paramètres d'évaluation du scénario définis dans les paragraphes précédents. La Figure 57 présente quant à elle, les schémas conceptuels détaillés liés aux approches « batterie de bioessais » et « bioessai pluri-spécifique ».

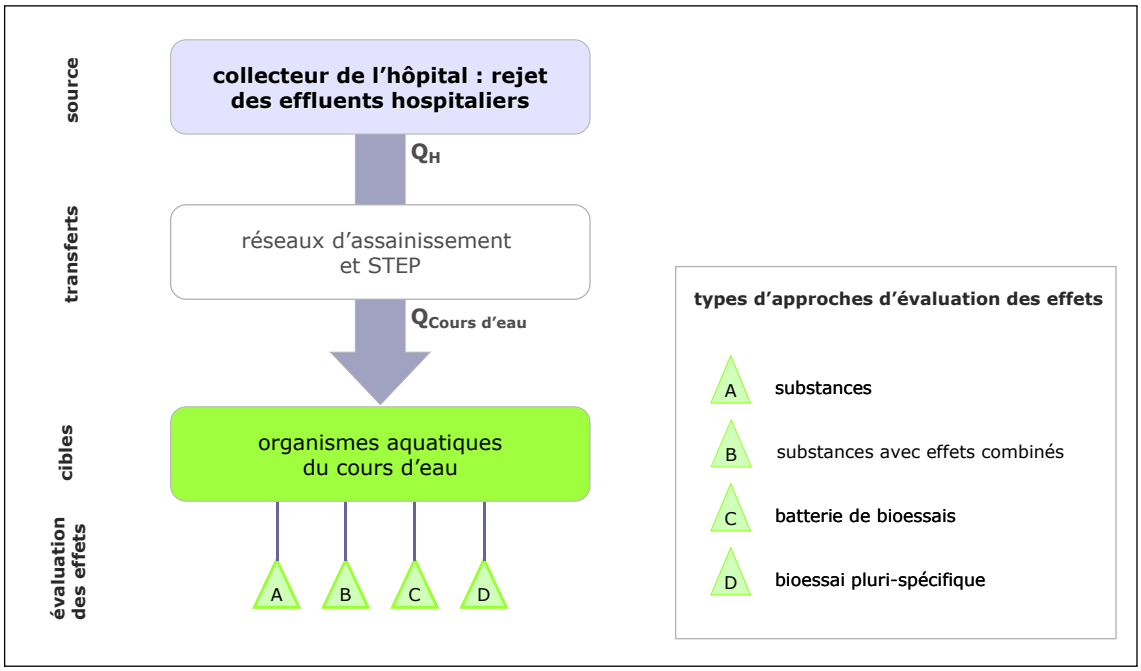


Figure 56 : Schéma conceptuel simplifié du scénario
[Q_H : Débit moyen d'effluent rejeté par l'hôpital d'étude lors d'une journée normale d'activité, $Q_{Cours\ d'eau}$: Débit journalier du cours d'eau au niveau de la ville étudiée et lors d'une journée normale]

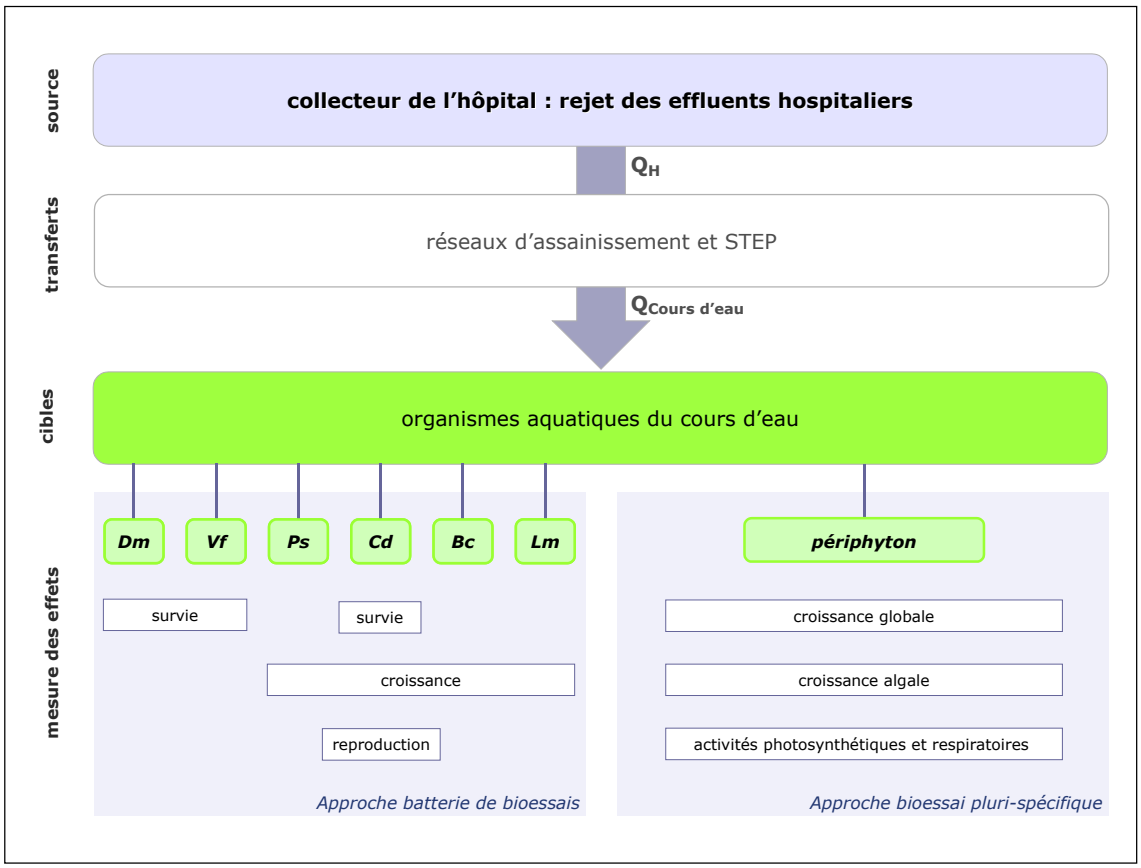


Figure 57 : Schéma conceptuel détaillé des approches « batterie de bioessais » et « bioessai pluri-spécifique »
[Dm : *D. magna* ; Vf : *V. fischeri* ; Ps : *P. subcapitata* ; Cd : *C. dubia* ; BC : *B. calyciflorus* ; Lm : *L. minor* ; Q_H : Débit moyen d'effluent rejeté par l'hôpital d'étude lors d'une journée normale d'activité ; $Q_{Cours\ d'eau}$: Débit journalier du cours d'eau au niveau de la ville étudiée et lors d'une journée normale]

1.1.3 Plan d'analyse

Le tableau ci-dessous détaille le plan d'analyse de l'EDREcotox liés aux rejets d'un effluent hospitalier dans un cours d'eau récepteur.

type d'approche	exposition	effet	risque
substances	- mesure du débit de l'effluent de l'hôpital d'étude et des concentrations en polluant - acquisition des données de débit du cours d'eau récepteur	- acquisition des $PNEC_{eau\ douce}$ à partir des bases de données internationales d'écotoxicologie - utilisation des règles d'extrapolation du TGD	$\frac{\text{exposition}}{\text{effet}}$
substances avec effets combinés		- acquisition des $PNEC_{eau\ douce}$ à partir des bases de données internationales d'écotoxicologie - utilisation des règles d'extrapolation du TGD - utilisation du modèle CA	
batterie de bioessais		- détermination des réponses (CE20) des batteries de bioessais - utilisation des règles d'extrapolation du TGD	
bioessais pluri-spécifiques		- détermination du % volumique d'effluent provoquant un effet significatif sur l'essai plurispécifique - utilisation des règles d'extrapolation du TGD	

Tableau 42 : Plan d'analyse de l'EDREcotox liés aux rejets d'un effluent hospitalier dans un cours d'eau récepteur

1.2 Caractérisation des expositions

1.2.1 Caractérisation des sources

La caractérisation physico-chimique de l'effluent (chapitre 2, page 154) constitue la liste et les concentrations des polluants à considérer dans l'EDREcotox. Cette liste comprend une vingtaine de polluants mais ne prend pas en compte :

- Les polluants dosés en concentration inférieure à la limite de détection des techniques analytiques utilisées ;
- Les polluants dosés sous la forme d'un indice ou d'un groupe. Ainsi nous ne pourrons malheureusement pas prendre en compte : les AOX, les surfactants, l'indice phénol, le chlore total, l'azote Kjeldahl, le pH, le potentiel redox, la conductivité, la DCO, la DBO5 et les MES ;
- Les polluants pour lesquels il n'existe pas de jeu de données d'écotoxicité exploitables pour le calcul de la $PNEC_{aquatique}$: le fréon 113, le dibromodichlorométhane et le tribrométhane ;

- Les polluants non recherchés (résidus médicamenteux, agents de contraste iodés, éléments radioactifs, …).

Notons enfin que ces simplifications feront l'objet d'une discussion (voir partie 4, page 236).

1.2.2 Caractérisation des transferts

Les données brutes de caractérisation des transferts sont les suivantes :

- Débit moyen d'effluent rejeté par l'hôpital d'étude lors d'une journée normale d'activité : $\mathbf{Q_H}$ = 651,6 m^3/j ;
- Débit journalier du cours d'eau au niveau de la ville considérée lors d'une journée normale : $\mathbf{Q_{Cours\ d'eau}}$ = 1000 m^3/s.

1.2.3 Détermination des valeurs de caractérisation des expositions

Les données détaillées dans le paragraphe précédent permettent de déterminer que l'effluent est dilué 132 597 fois dans le cours d'eau récepteur. Le pourcentage volumique d'effluent dans le cours d'eau récepteur est donc en moyenne de **0,0008%** ($\mathbf{Q_H}$ / $\mathbf{Q_{Cours\ d'eau}}$).

L'utilisation de cette donnée conduit aux valeurs des PEC « substances » (concentrations des polluants traceurs dans le milieu récepteur) présenté dans le Tableau 43.

traceur	PEC (mg/l)
ammonium	$3,8 .10^{-4}$
chlorures	$6,4 .10^{-4}$
chlore libre	$4,4 .10^{-6}$
acétaldéhyde	$4,7 .10^{-8}$
glutaraldéhyde	$1,7 .10^{-8}$
formaldéhyde	$5,6 .10^{-7}$
chloroforme	$1,9 .10^{-8}$
acétone	$5,8 .10^{-5}$
méthanol	$6,1\ 10^{-6}$
éthanol	$1,4 .10^{-5}$
2-propanol	$2,9 .10^{-5}$
As	$8,0 .10^{-8}$
Cu	$1,3\ 10^{-6}$
Pb	$9,6 .10^{-8}$
Zn	$1,2\ 10^{-6}$
aténolol	$2,8 .10^{-8}$
métoprolol	$8,6 .10^{-10}$
propranolol	$7,4 .10^{-10}$
cyclophosphamide	$4,2 .10^{-11}$

Tableau 43 : Valeurs des PEC (concentrations moyennes des traceurs dans le milieu récepteur)

2. Caractérisation des effets par les différents types d'approches

2.1 Approches « substances » et « substances avec effets combinés »

Une recherche bibliographique des valeurs de $PNEC_{eau\ douce}$ (Predictive No Effect Concentration) associées aux polluants traceurs sélectionnés est préalablement effectuée. Les bases de données et documents suivants sont utilisés :

- La base de données environnementales de l'INERIS [2006] ;
- Un document de l'US EPA [1999] ;
- La base de données ECOTOX de l'US EPA [2003] ;
- Un document de l'US department of Energy [Environmental Restoration Division, 1999] ;
- Les rapports d'évaluations de la liste des substances d'intérêt prioritaire de Environment Canada [Government of Canada *et al.*, 2004] ;
- La base de données du logiciel d'évaluation des risques Terrasys [Trépanier, 2005].

Notons que les PNEC associées aux médicaments n'apparaissant pas dans les bases de données. La recherche de ces valeurs de PNEC passe donc par une revue bibliographique.

La base de données de l'INERIS [2006] est utilisée de manière privilégiée pour cette recherche. Elle est en effet issue des démarches engagées par différents pays et organisations (Union Européenne, OCDE, France - INERIS, etc.), pour évaluer les risques environnementaux posés par certaines substances chimiques. Cette base est chargée de recueillir les données extraites de différents dossiers (rapports d'évaluation des risques des substances existantes sur le site de l'ECB, rapports SIDS de l'OCDE, etc.) de manière à les proposer en ligne.

Le Tableau 44 présente les valeurs de $PNEC_{eau\ douce}$ issues de nos recherches et associées aux traceurs sélectionnés préalablement.
Les valeurs de PNEC les plus faibles sont celles associées au chlore libre (0,00004 mg/l) et au bêtabloquant propranolol (0,00001 mg/l). Les valeurs associées au méthanol, à l'acétone et surtout aux chlorures sont à l'inverse les plus élevées (respectivement 15,4 mg/l, 21 mg/l et 230 mg/l).

traceur	PNEC (mg/l)	source
ammonium	1,37	[SADA]
chlorures	230	[Environmental Restoration Division, 1999]
chlore libre	0,00004*	[INERIS, 2006]
acétaldéhyde	0,308	[Government of Canada *et al.*, 2004]
glutaraldéhyde	0,009	[INERIS, 2006]
formaldéhyde	0,01	[Government of Canada *et al.*, 2004]
chloroforme	0,146	[INERIS, 2006]
acétone	21	[INERIS, 2006]
méthanol	15,4	Calculé à partir des données de l'INERIS [2006] et de l'OCDE [2004a]
éthanol	0,192	Calculé à partir des données de l'INERIS [2006] et de l'OCDE [2004b]
2-propanol	0,0075	[Environmental Restoration Division, 1999]
As	0,0044	[INERIS, 2006]
Cu	0,0016	[INERIS, 2006]
Pb	0,0016	[INERIS, 2006]
Zn	0,0078	[INERIS, 2006]
aténolol	0,0777	[Jones *et al.*, 2002]
métoprolol	0,0088	[Jones *et al.*, 2002]
propranolol	0,00001	[Ferrari *et al.*, 2004]
cyclophosphamide	0,984	[Carlsson *et al.*, 2006]

Tableau 44 : Valeurs de PNEC associées aux polluants traceurs sélectionnées
[* valeur proposée pour NaOCl]

2.2 Approche « batterie de bioessais mono-spécifiques »

La caractérisation des effets par l'approche « batterie de bioessais mono-spécifiques » utilise les résultats de la batterie de bioessais complète réalisée sur l'échantillon moyen filtré (Chapitre 2. 2.2, page 168).

Avec une CE20 de **0,7%**, l'essai d'inhibition de la reproduction du rotifère *Brachionus calyciflorus* est le plus sensible des bioessais de la batterie complète vis-à-vis de l'échantillon moyen-24h. Le résultat de ce bioessai est donc sélectionné pour estimer le risque associé au rejet de l'effluent hospitalier étudié dans le cours d'eau récepteur, via une approche de type « batterie de bioessais mono-spécifiques ».

La sélection du facteur d'extrapolation associé à cette valeur se fait sur la base des caractéristiques de la batterie de bioessais complète (tests de toxicité chronique/ aigu, niveaux trophiques des organismes d'essai et nombre d'essai) et des règles du TGD (annexe 2). La batterie de bioessais complète se compose de trois essais de toxicité aiguë et de quatre essais de toxicité chronique. Les organismes des essais de toxicité chronique sont issus de deux niveaux trophiques différents.

Le TGD propose un facteur d'extrapolation égal à :

- 10 ; dans le cas d'une batterie composée de trois essais chroniques pour au moins trois espèces représentant trois niveaux trophiques,
- 50 ; dans le cas d'une batterie composée de deux essais chronique pour au moins deux espèces représentant deux niveaux trophiques.

La batterie de bioessais complète mise en œuvre dans le cadre de cette thèse est intermédiaire aux deux situations du TGD. Nous avons donc sélectionné un facteur intermédiaire de **25**.

➔ Le pourcentage d'effluent créant un effet sur les organismes aquatiques d'eau douce est donc égal à 0,7% / 25, soit **0,028%**.

2.3 Approche « bioessai pluri-spécifique »

La caractérisation des effets par l'approche « bioessai pluri-spécifique » se base sur les résultats des essais « périphyton » réalisés sur l'échantillon moyen brut décongelé (Chapitre 2. 4, page 178).

Le test de Bonferroni et l'analyse de la variance (ANOVA-1) des résultats des bioessais sur communautés périphytiques montrent que l'effluent décongelé n'engendre aucun effet significatif jusqu'à la concentration de **18%** d'effluent. Cette concentration est donc sélectionnée pour estimer le risque associé au rejet de l'effluent hospitalier étudié dans le cours d'eau récepteur via une approche de type « bioessai pluri-spécifique ».

La sélection du facteur d'extrapolation associé à cette valeur se fait sur la base des règles du TGD (annexe 2), qui dans ce cas, énonce que le facteur est déterminé au cas par cas, en fonction de la pertinence des données.

Comme nous l'avons évoqué dans la revue biobibliographie, les communautés périphytiques regroupent des organismes appartenant à trois niveaux trophiques différents : les producteurs primaires (algues autotrophes), les décomposeurs (bactéries hétérotrophes) et les consommateurs (protozoaires brouteurs). La structure du périphyton en fait un acteur fondamental dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Même s'il s'agit de « batch », ces essais pluri-spécifiques se révèlent plus pertinents du point de vue écologique que les bioessais mono-spécifiques. Nous avons donc sélectionné un facteur d'extrapolation de **5**, inférieur à celui proposé par le TGD dans le cas d'une batterie composée de trois essais chronique pour au moins trois espèces représentant trois niveaux trophiques.

➔ Le pourcentage de la matrice créant un effet sur les organismes aquatiques d'eau douce est donc égal à 18% / 5, soit **3,6%**.

3. Caractérisation du risque par les différents types d'approches

Les différentes valeurs d'effet et d'exposition calculées précédemment vont maintenant nous permettre de calculer les indices de risques associés au scénario étudié pour chacune des quatre approches de caractérisation des effets.

3.1 Approche « substances »

Dans le cas de l'évaluation du risque par une approche de type « substances », les rapports PEC/PNEC des différentes substances traceurs de risques sont calculés (Tableau 45). Le plus élevé de ces rapports constitue l'indice de risque associé au scénario.

traceur	rapport PEC/PNEC
ammonium	$2,8 .10^{-4}$
chlorures	$2,8 .10^{-6}$
chlore libre	$1,1 .10^{-1}$
acétaldéhyde	$1,5 .10^{-7}$
glutaraldéhyde	$1,9 .10^{-6}$
formaldéhyde	$5,6 .10^{-5}$
chloroforme	$1,3 .10^{-7}$
acétone	$2,8 .10^{-6}$
méthanol	$3,9 .10^{-7}$
éthanol	$7,1 .10^{-5}$
2-propanol	$3,9 .10^{-3}$
As	$1,8 .10^{-5}$
Cu	$8,1 .10^{-4}$
Pb	$6,0 .10^{-5}$
Zn	$1,5 .10^{-4}$
aténolol	$3,6 .10^{-7}$
métoprolol	$9,7 .10^{-8}$
propranolol	$7,4 .10^{-5}$
cyclophosphamide	$4,2 .10^{-11}$

Tableau 45 : Calcul des rapports PEC/PNEC associées aux polluants traceurs dans le cas le l'approche « substances »

Le rapport PEC/PNEC associé au chlore libre est le plus élevé des rapports PEC/PNEC est constitue donc l'indice de risque associé au scénario étudié.

➔ **L'indice de risque obtenu dans ce cas, est donc égal à 0,109.**

Ce résultat montre que pour le scénario étudié, le risque évalué par une approche de type « substances » est faible pour les organismes de la colonne d'eau du milieu récepteur (IR < 1).

3.2 Approche « substances avec effets combinés »

Dans le cas d'une caractérisation des effets de type « substances avec effets combinés », les résultats associés aux chapitres 1 et 2 montrent que l'additivité des concentrations peut être utilisée pour le calcul de l'indice de risque. Aussi, comme on le rencontre dans la littérature [INERIS, 2003], nous avons choisi de sommer les ratios PEC/PNEC associés aux substances traceurs de risque et présentés dans le Tableau 45.

➔ **L'indice de risque obtenu dans ce cas, est donc égal à 0,115.**

Ce résultat montre que pour le scénario étudié, le risque évalué par une approche de type « substances avec effets combinés » est faible pour les organismes de la colonne d'eau du milieu récepteur (IR < 1).

3.3 Approche « batterie de bioessais mono-spécifiques »

Nous avons déterminé que le pourcentage le pourcentage volumique d'effluent dans le cours d'eau récepteur est de 0,0008% et que le pourcentage de l'effluent créant un effet dans le cas de l'approche « batterie de bioessais mono-spécifiques » est de 0,028%.

➔ **L'indice de risque obtenu dans ce cas, est donc égal à 0,029.**

Ce résultat montre que pour le scénario étudié, le risque évalué par une approche de type « batterie de bioessais mono-spécifiques » est faible pour les organismes de la colonne d'eau du milieu récepteur (IR < 1).

3.4 Approche « bioessai pluri-spécifique »

Nous avons déterminé que le pourcentage le pourcentage volumique d'effluent dans le cours d'eau récepteur est de 0,0008% et que le pourcentage de la matrice créant un effet dans le cas de l'approche « bioessai pluri-spécifique » est de 3,6%.

➔ **L'indice de risque obtenu dans ce cas, est donc égal à 0,00022.**

Ce résultat montre que pour le scénario étudié, le risque évalué par une approche de type « bioessai pluri-spécifique » est très faible pour les organismes de la colonne d'eau du milieu récepteur (IR << 1).

3.5 Synthèse, comparaison et analyse critiques des EDREcotox réalisées

3.5.1 Synthèse et comparaison des EDREcotox

Quelle soit l'approche de caractérisation des effets utilisée, les indices de risque calculés sont inférieurs à 1. Cela montre, dans le cas du scénario étudié, que le risque est faible pour les organismes de la colonne d'eau du milieu récepteur. Les approches « substances » et « substances avec effets combinés » engendrent approximativement le même indice de risque (respectivement 0,109 et 0,115) alors que les approches « batterie de bioessais mono-spécifiques » et « bioessai pluri-spécifique » engendrent des indices de risques plus faibles (respectivement 0,029 et 0,00022).

L'indice de risque associé à l'approche « substances avec effets combinés » est quasiment identique à celui associé à l'approche « substances » car il existe des écarts très importants entre le rapport PEC/PNEC du chlore libre ($1{,}1.10^{-1}$), qui est la substance la plus écotoxique dosées dans l'effluent, et ceux des autres polluants dont les rapports PEC/PNEC sont tous inférieurs à 10^{-3} ($3{,}9.10^{-3}$ pour le 2-propanol, $8{,}1.10^{-4}$ pour le cuivre, $2{,}8.10^{-4}$ pour l'ammonium, … voir Tableau 45). En d'autres termes, le chlore libre est le principal agent responsable de ces deux indices de risque.

L'indice de risque associé à l'approche « bioessai pluri-spécifique » se révèle beaucoup moins sévère que celui associé à l'approche « batterie de bioessais mono-spécifiques ».

3.5.2 Analyse critique des résultats des EDREcotox

Un certain nombre de considérations doivent être pris compte, et particulièrement :

i. Les incertitudes liées à l'approche simplifiée de l'évaluation de l'exposition effectuée dans le cadre de cette thèse, avec notamment la non prise en compte de l'évolution du débit d'effluent rejeté dans le cours d'eau récepteur au cours d'une journée ;
ii. Les incertitudes associées aux évaluations des effets ;
iii. Le fait que l'ensemble des rejets produits par les hôpitaux de la ville ne soit pas pris en compte.

3.5.21 Incertitudes associées à l'évaluation de l'exposition

3.5.211 Approche simpliste de l'évaluation de l'exposition

Comme nous l'avons déjà évoqué, cette évaluation considère que la principale voie de transfert des contaminants contenus dans les effluents se fait par dilution dans les réseaux d'assainissement, la STEP et le milieu récepteur. La méthode de détermination de l'exposition dans l'environnement est réalisée par simple calcul des dilutions.

Cette méthode ne considère pas un certain nombre d'éléments et notamment :

- Les fuites pouvant intervenir dans dispositif d'assainissement et engendrer le transfert des polluants vers les zones non-saturée et saturée du sol ;
- La dégradation (transformation biologique et physico-chimique) des polluants au travers du dispositif d'assainissement urbain ;
- L'évaporation des polluants dans l'atmosphère ;
- Les transferts de polluants pouvant intervenir entre la colonne d'eau et les sédiments du cours d'eau.
- Les transferts de polluants pouvant intervenir entre le milieu récepteur (le cours d'eau) et la nappe phréatique.

A noter que l'indice de risque associé à l'approche « substances » se base sur le plus élevé des rapports PEC/PNEC, qui se révèle être associé au chlore libre. Or, il apparaît que le chlore libre est un puissant oxydant qui, une fois dans le réseau va réagir et ne sera sans doute plus présent lors du déversement de l'effluent de la STEP dans le cour d'eau. En revanche, les composés de dégradation du chlore libre sont des composés organohalogénés (de type monochloramine, dichloramine…), qui peuvent aussi être dangereux pour les écosystèmes aquatiques.

L'évaluation de l'exposition se révèle donc être une étape primordiale qu'une simple estimation par dilution ne permet pas d'appréhender correctement. Elle devra être développé ultérieurement.

3.5.212 Prise en compte de l'évolution du débit d'effluent rejeté dans le cours d'eau récepteur au cours d'une journée

Les résultats du chapitre 2 ont montré l'importante variabilité du débit d'effluent rejeté au cours de la journée de prélèvement, que l'EDREcotox ne prend pas en compte. Selon les résultats obtenus (Chapitre 2.1.1.1, page 152), l'exposition et donc les indices de risque associés, sont multipliés par 1,6 par rapport au débit moyen d'effluent rejeté au cours de la période 9h-13h (pic de débit d'effluent rejeté).

Cette donnée nous permet de calculer de nouveaux indices de risques associés à l'exposition au cours de la période 9h-13h (Tableau 46). Quelle que soit l'approche de caractérisation des effets utilisée, les indices de risque calculés lors de l'exposition maximale restent tout de même tous inférieurs à 1. Cela montre, pour le scénario étudié, que le risque est faible pour les organismes de la colonne d'eau, même dans le cas de l'exposition maximale du cours d'eau récepteur.

Types d'approches de caractérisation des effets	IR
« substances »	0,178
« substances avec effets combinés »	0,187
« batterie de bioessais mono-spécifiques »	0,046
« bioessai pluri-spécifique »	0,00036

Tableau 46 : Indices de risque obtenus par les quatre types d'approches de caractérisation des effets lors de l'exposition maximale de l'effluent de l'hôpital étudié (période 9h-13h)

Rappelons que cette étude est réalisée pour une journée. Des fluctuations de débit peuvent également intervenir en fonction des jours (grave accident par exemple) et des saisons (exemple : épidémie de grippe ou mélange des eaux pluviales avec les eaux usées en hiver).

3.5.22 Incertitudes associées aux évaluations des effets

3.5.221 Approches « substances » et « substances avec effets combinés »

Rappelons que dans le cas des deux approches de type « substances », un certain nombre de polluants n'ont pas pu être pris en compte du fait (*i*) du manque de données dans les bases de données internationales d'écotoxicité ; (*ii*) que certains paramètres mesurés sont des groupes de polluants (ex : détergents nonioniques, AOX,..) et ; (*iii*) que les analyses physico-chimiques réalisées ne portent que sur les polluants sélectionnés pour les analyses. Il manque ainsi un certain nombre de polluants dont certains médicaments, les agents de contraste iodés, les éléments radioactifs et d'autres molécules et substances dont la présence n'est pas soupçonnée.

Pour ces approches « substances », il faut également prendre en compte le fait que les PNEC sélectionnées sont issues de différentes bases de données. Chacune de ces PNEC prend en compte un facteur d'extrapolation qui lui-même fait l'objet de débats controversés [INERIS, 1999; Forbes et Calow, 2002].

Dans le cas spécifique de l'approche « substances avec effets combinés », notons que nous avons vérifié l'additivité des effets combinés des substances en mélanges dans l'effluent par plusieurs méthodes :

- L'étude bibliographique (partie 1, chapitre 2, page 67) ;
- L'étude des effets combinés des principaux polluants contenus dans l'effluent hospitaliers vis-à-vis de la mobilité de *D. magna* (partie 3, chapitre 1, page 123) ;
- La comparaison de la toxicité théorique et expérimentale de l'échantillon moyen d'effluent vis-à-vis de la mobilité de *D. magna* (partie 3, chapitre 2.3, page 175).

Il reste toutefois à vérifier l'additivité des effets combinés pour d'autres bioessais que celui d'inhibition de la mobilité de *D. magna* en 24h.

3.5.222 Approches « batterie de bioessais mono-spécifiques »

La batterie de bioessais complète associée à cette approche a été réalisée sur l'échantillon moyen filtré. Nous avons mis en évidence que la toxicité associée à l'échantillon brut est beaucoup plus importante que celle de l'échantillon filtré (chapitre 2, 2.3, page 172). Nous pouvons ainsi penser que la valeur d'effet issue de l'effluent filtré engendre une diminution de l'indice de risque réel associé à cette approche.

3.5.223 Approches « bioessai pluri-spécifique »

L'indice de risque associé à l'approche « bioessai pluri-spécifique » présente quant à elle une erreur engendrée par la technique de conservation de l'échantillon. Il est important de rappeler que cet indice de risque se base sur une valeur sans effets obtenue à partir d'un effluent congelé.

La réalisation du bioessai d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* sur l'effluent moyen frais et décongelé a d'ailleurs montré une diminution de la toxicité de l'échantillon d'un facteur compris entre 2 à 4 (Chapitre 2. 4.1, page 178). Nous pouvons ainsi penser que la détermination de la valeur d'effet à partir de l'effluent décongelé engendre une diminution de l'indice de risque réel associé à cette approche.

3.5.23 Prise en compte des rejets produits par l'ensemble des hôpitaux de la ville étudiée

Le scénario associé à l'EDREcotox présenté considère les rejets d'un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France, mais cette ville comprend un certain nombre d'hôpitaux, ce qui accroît l'exposition des organismes de la colonne d'eau du cours d'eau récepteur. Si l'on considère que la nature des effluents rejetés est identique pour la totalité des hôpitaux de la ville, l'exposition et donc les indices de risque associés, sont multipliées par 5,1 (calcul à partir de données internes confidentielles provenant des hôpitaux de la grande ville étudiée).

Cette donnée nous permet de calculer des nouveaux indices de risques associés à l'exposition du cour d'eau à l'ensemble des hôpitaux de la grande ville du Sud-Est de la France étudiée. Les résultats (Tableau 47) montrent que quelle que soit l'approche de caractérisation des effets utilisée, les indices de risque calculés lors de l'exposition du cours d'eau récepteur à l'ensemble des effluents hospitaliers de la ville étudiée restent inférieurs à 1. les indices se rapprochent cependant sérieusement de cette valeur. Cela implique la nécessité d'affiner les résultats obtenus pour la caractérisation des effets et de réaliser une véritable étude des expositions.

types d'approches de caractérisation des effets	IR
« substances »	0,561
« substances avec effets combinés »	0,589
« batterie de bioessais mono-spécifiques »	0,146
« bioessai pluri-spécifique »	0,00114

Tableau 47 : Indices de risque obtenus par les quatre types d'approches de caractérisation des effets lors de l'exposition du cours d'eau récepteur à l'ensemble des hôpitaux de la grande ville du Sud-Est de la France étudiée

Partie 4.

Discussion

L'objectif de cette partie est d'analyser l'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse au regard des objectifs fixés au départ. Elle permet de replacer ces résultats dans le contexte plus général décrit dans la littérature, et de mettre en évidence les apports de la thèse en terme d'amélioration des connaissances et des outils.

Cette partie se termine enfin par des considérations générales résultant de nos résultats et relatives d'une part à l'utilisation de l'outil EDREcotox et, d'autre part, à la gestion des effluents hospitaliers.

1. Effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers (vis-à-vis de *D. magna*)

1.1 Choix des substances étudiées

L'étude des effets combinés s'est limitée aux principales substances responsables de l'écotoxicité des effluents hospitaliers. Ce choix a été effectué *a priori* sur la base de la littérature.

L'enquête réalisée au sein de l'hôpital étudié (présenté en annexe 3) montre *a posteriori*, que notre étude prend en compte la totalité des désinfectants utilisés. Les surfactants de l'hôpital se composent quant à eux de formulations complexes dont la composition est souvent peu détaillée. Le choix de travailler sur les trois grandes catégories de surfactants (anionique, cationique et nonionique), semble donc être un bon compromis.

L'annexe 3 révèle toutefois un certain nombre de polluants importants et non traités dans cette étude :

- Les détergents/désinfectants qui sont des formulations complexes et regroupent en majorité des surfactants, des alcools et des ammoniums quaternaires ;
- Les antiseptiques notamment ceux à base d'iode et de chlorhexidine.

Le bilan est difficile à faire car chacune des substances est en fait une formulation plus ou moins complexe et dont les concentrations en substances actives sont différentes.

1.2 Intérêt des modèles d'étude des effets combinés dans les EDREcotox

La revue bibliographique (partie 1, page 63), présente les différentes méthodes utilisées pour étudier les effets combinés de substances en mélanges. Dans ce travail de thèse, nous nous sommes limités à l'utilisation des méthodes suivantes :

- La comparaison des CE50 des substances pures et des mélanges en fonction du ratio de substance en mélange ;
- La représentation des courbes « concentration-effet » des modèles IA (Independant Action) /CA (Concentration Addition) pour les mélanges en ratios 50-50 ;
- Le modèle des TI (Toxicity Index) à la CE50 qui se base sur l'additivité des concentrations.

La représentation des courbes « concentration-effet » des modèles IA/CA nous paraît être la plus adaptée des méthodes pour travailler sur des mélanges binaires afin de permettre une bonne discrimination entre additivité des concentrations et additivité des effets. Ce type d'utilisation des modèles permet en effet une vision « globale » des effets combinés et est très répandue [Backhaus *et al.*, 2003; Fraysse et Garric, 2005; Junghans *et al.*, 2006; Scholze *et al.*, 2007].

Nous recommandons donc l'utilisation de ce modèle pour étudier les effets combinés de mélanges de substances dans les effluents hospitaliers.

1.3 Les effets combinés observés

1.3.1 Courbes concentrations-effets expérimentales et théoriques (modèles IA et CA) des mélanges étudiés en ratio 50-50

Comme il est établi dans la littérature, nos résultats montrent dans la majorité des cas, que la CA surestime l'écotoxicité des mélanges. Ils sont par contre plus nuancés sur le fait que l'IA sous-estime cette écotoxicité, puisque dans la majorité des cas, le mélange s'est révélé moins écotoxique que prédit par l'IA [Nirmalakhandan *et al.*, 1997; Olmstead et LeBlanc, 2005; Junghans *et al.*, 2006].

L'estimation de l'écotoxicité de ces mélanges par le modèle CA assure donc une protection quant aux légers effets de synergie pouvant se produirent.

1.3.2 Modèle des TI de tous les mélanges étudiés à la CE50

Nous avons vu que la grande majorité des mélanges étudiés (43/45) engendre des valeurs de TI inférieure à 2,0. Or, nous avons vu dans la partie bibliographique (partie1, chapitre 2, page 65), que pour Deneer [2000], l'additivé des concentrations à lieu pour des valeurs de TI comprises entre 0,5 et 2,0.

D'autres données de la littérature valident ces résultats en mettant en avant des synergies et des antagonismes des concentrations assez marquées : Rayburn *et al.* [1995] et Cedergreen *et al.* [2006], trouvent des valeurs de TI de l'ordre de 0,25 ; alors que sur des mélanges de métaux vis-à-vis de *Tympanotonus fuscatu,* Otitoloju [2002] conclue à de l'antagonisme avec des TU supérieures à 7,0 (rappelons que pour un mélange de *i* substances $TI = \sum_{i=1}^{n} TUi$).

1.3.3 Considérations générales

En accord avec la majorité de la littérature [Marking, 1977; EIFAC, 1980; Ross et Warne, 1997; Deneer, 2000; Mercier, 2002], les résultats obtenus montrent qu'il n'y aurait *a priori* pas d'effet sensiblement important d'antagonisme ou de synergie (des concentrations et des effets) dans les mélanges de désinfectants/surfactants étudiés vis-à-vis de *D. magna*.

Face à ces différents éléments, et comme il a encore été très récemment énoncé par Scholze *et al*. [2007], l'utilisation du modèle CA apparaît bien être le plus approprié pour estimer la toxicité des mélanges étudiés dans le cas de notre étude.

Notons enfin la nécessité de compléter cette étude avec :

- *D'autres substances telles que les antiseptiques à base d'iode et de chlorhexidine et des formulations complexes de détergents/désinfectants (qui contiennent des surfactants, des alcools et des ammoniums quaternaires) ;*
- *Des mélanges plus complexes. Cela permettrait de mettre en avant les effets combinés « multiples » qui peuvent intervenir au niveau d'un effluent ;*
- *Et enfin, d'autres bioessais. Même si Daphnia magna est très sensible aux mélanges désinfectant - détergent, travailler sur d'autres organismes (bactérie, algue, poisson…), compléterait utilement de nos résultats. Nous pouvons par exemple proposer l'essai d'inhibition de la reproduction de Brachionus calyciflorus en 48h. Cet essai, d'une part, s'est révélé le plus sensible des bioessais utilisés vis-à-vis de l'effluent étudié et, d'autre part, permet d'accéder à une toxicité de type chronique. Suter [2006] note ainsi que suivant la durée d'exposition, les substances mettent en jeu des mécanismes d'actions différents.*

2. Effets d'un effluent hospitalier vis-à-vis de différents organismes aquatiques

2.1 Caractérisation physico-chimique de l'effluent

2.1.1 Mesures de terrain

Les variations de débit enregistrées au cours de la journée de prélèvement correspondent relativement bien aux tranches horaires sélectionnées *a priori* pour la constitution des échantillons périodiques. Les débits maximums sont enregistrés au cours de la période 9h-13h correspondant au nettoyage désinfectant des unités techniques, aux activités de soins et au fonctionnement des laboratoires. La période 13h-17h coïncide avec l'entretien des blocs opératoires et donne également lieu à un débit important. Finalement, la période de nuit (activités minimales) correspond à un débit beaucoup plus faible et relativement stable. Dans une étude sur les variations journalières des consommations d'eau d'un hôpital mauricien, Mohee [2005], enregistre des résultats relativement similaires : un minimum des consommations diurne ; une augmentation rapide entre 6h et 8h30 ; une consommation relativement stable entre 10h30 et 16h ; un nouveau pic enregistré vers 17h30 avant une décroissance rapide pour atteindre les niveaux de consommation nocturne. Les prélèvements effectués correspondraient donc à une activité normale journalière de l'hôpital.

L'évolution de la température, du débit et de la couleur des échantillons sont proches. Comme pour les débits, l'importante augmentation de la température matinale peut être corrélée aux activités de l'hôpital. Les toilettes des patients et l'entretien désinfectant des locaux sont réalisés à l'eau chaude. Ces deux activités se déroulent le matin et pourraient être à l'origine des observations effectuées aux niveaux des débits et des températures. Mohee [2005] a d'ailleurs abouti à cette même hypothèse. Les autres activités de l'hôpital utilisent ensuite moins d'eau chaude jusqu'au niveau nocturne, stable.

Concernant les valeurs de pH, notons que les fluctuations apparaissent surtout au cours de la matinée, avec notamment un pic montant à 9,1 unités pH et quelques dépassements de la valeur de 8,5. Selon Robert [2006], entre 2003 et 2006, les valeurs ponctuelles extrêmes sur l'ensemble des établissements des Hospices Civils de Lyon étaient comprises entre 5,1 et 10,4 unités pH. Ce même auteur pense que ces fluctuations sont liées à l'entretien des sols et des surfaces qui utilisent de grands volumes de produits détergents/désinfectants.

2.1.2 Caractérisation physico-chimique en laboratoire

2.1.21 Considérations générales

La charge organique (DCO, DBO, COT, MES) mesurée sur les prélèvements est relativement faible en terme de concentration. L'analyse détaillée des résultats révèle, par contre, la présence de nombreux composés peu communs dans les effluents urbains (AOX, glutaraldéhyde, chlore libre, détergents, fréon 113 ou encore alcools, acétone, formaldéhyde, acétaldéhyde, ammoniums, phénols, ainsi que l'arsenic et quelques métaux (le cuivre, le plomb et le zinc)), mais classiquement retrouvés dans les effluents hospitaliers (voir Tableau 1, page 23).

L'étude d'un certain nombre de paramètres sur des échantillons représentant 5 différentes périodes de la journée a permis de mettre en avant les fluctuations des teneurs de certains polluants recherchés. Globalement, on peut regrouper les échantillons des périodes 13h-17h et 9h-13h comme étant les plus polluées, les échantillons des périodes 17h-23h et 23h-5h comme étant les moins polluées, et l'échantillon 5h-9h comme transitoire mais plus proche du groupe "moins pollué". Ceci est cohérent avec les observations de Leprat [1998], qui montre un pic d'inhibition d'une STEP lié à des effluents hospitaliers sur la période 6h-12h.

Il est difficile de comparer nos résultats à la bibliographie car aucune caractérisation d'effluent hospitalier aussi complète n'existe. Malgré les faibles concentrations en polluants analysées, l'effluent étudié représente un danger écotoxicologique relativement important. Les paragraphes ci-après discutent de l'origine de la présence des polluants dosés dans l'effluent.

2.1.22 Les AOX

La présence d'AOX dans les effluents hospitaliers en fortes concentrations a déjà été montrée [Gartiser *et al.*, 1996; Kummerer *et al.*, 1998; Leprat, 1998]. Elle est associée à la présence d'agents de contraste iodés utilisés en radiographie, à certains médicaments, à l'usage de désinfectants, de solvants chlorés, ou d'autres substances en provenance des laboratoires, ainsi qu'à leurs métabolites pouvant contenir des éléments organohalogénés [Kummerer *et al.*, 1998; Sprehe *et al.*, 2001; Emmanuel *et al.*, 2004].

2.1.23 Le chlore et les organochlorés

Les concentrations en chlore total et en chlore libre mesurées dans l'échantillon moyen sont respectivement de 0,59 mg/l et de 0,55 mg/l. Il en résulte une concentration en chlore combiné (chloramines et composés organochlorés divers) de 40 µg/l. D'après la société d'approvisionnement en eau potable de l'hôpital, la concentration en chlore libre dans le réseau d'alimentation en eau potable était de 0,1 mg/l le jour de prélèvement. Il y a donc un apport significatif de chlore libre par les activités de l'hôpital. Par ailleurs, le calcul des concentrations en chlore actif (chlore réellement libre sous forme Cl_2 ou HClO) et potentiel (chlore libre en

réserve sous forme ClO^-) à partir du pH de l'effluent et de la concentration en chlore libre conduit aux valeurs suivantes : 76% du chlore libre est sous la forme de chlore potentiel et 24 % sous la forme de chlore actif. Ces proportions de chlore actif et potentiel dans l'effluent peuvent paraître surprenantes dans une première approche compte-tenu de la présence de matières organique oxydables dans l'effluent ainsi que du maintien d'un certain nombre de bactéries résiduelles. Par ailleurs, le report du pH et du potentiel redox de l'effluent sur un diagramme de Pourbaix du chlore montre que le domaine de stabilité du chlore dans les conditions du prélèvement est celui des chlorures. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette apparente contradiction :

- Le chlore libre dosé dans l'effluent ne serait pas disponible, ni pour oxyder la matière organique et minérale, ni pour tuer totalement les bactéries présentes dans l'effluent en raison de son adsorption par les particules et dans les boues du réseau d'assainissement de l'hôpital. En effet, selon les agents techniques de l'hôpital, au moment du prélèvement, le réseau d'assainissement n'avait pas été curé depuis 7 ans et une couche de plusieurs centimètres de boues et de papier à usage unique, s'accumulait au sein du réseau. Il est de plus reconnus que les polluants se fixent sur les colloïdes et les matières en suspension [Jauzein *et al.*, 1999].
- La cinétique de réaction du chlore avec les matières organiques serait suffisamment lente pour conserver une fraction importante de chlore libre et de chlore actif dans l'effluent, à la sortie de l'hôpital. En effet, au niveau des concentrations en chlore mesurées, sa cinétique de réaction avec la matière organique devait être faible [Rejsek, 2002]. Par ailleurs, une température élevée ou la présence de lumière aurait pu accélérer la dégradation du chlore [Rejsek, 2002], mais dans le réseau d'assainissement de l'hôpital, la température était fraîche lors du prélèvement et la lumière est absente.

Cette faible réactivité du chlore n'est toutefois pas totale comme le montre la présence dans l'effluent d'un certain nombre d'organochlorés sous la forme de trace (6,3 µg/l détectés au total). Selon Rejsek [2002], le chlore peut réagir avec des molécules organiques pour former des composés organochlorés dont les plus connus et les plus fréquents sont les trihalométhanes comme le chloroforme, le bromodichlorométhane et le chlorodibromométhane. Ces molécules résultent de la réaction du chlore avec des polyphénols, des dicétones, des radicaux acétyl qui proviennent de la dégradation de la cellulose et se comportent comme des précurseurs. Or, on retrouve dans les effluents un certain nombre de ces trihalométhanes : le chloroforme, le bromodichlorométhane et le tribromométhane. La présence de ces molécules peut donc s'expliquer par la réaction du chlore avec des molécules organiques présentes dans les effluents telles que la cellulose, les alcools, l'acétone ou encore l'acétaldéhyde qui ont été dosés dans les effluents. Il est à noter que le chloroforme est également utilisé dans les laboratoires. Il en est de même pour l'acide phénique, l'éthanol et l'acétone. Ces molécules sont utilisées pour l'extraction de ADN, la séparation des protéines et des ADN, ou encore en microbiologie, mais font l'objet

d'une réglementation spécifique en matière de rejet et ne devraient théoriquement pas être rejetées dans le réseau d'assainissement de l'hôpital.

2.1.24 L'ammonium

Nous avons vu que les teneurs en ammonium sont comparables à celles dosées dans les effluents urbains [DEGREMONT, 1989]. Il semble donc que les concentrations dosées aient la même origine, à savoir la dégradation de la matière organique [Kosmala, 1998].

2.1.25 Le formaldéhyde

Ce composé détecté dans les effluents est utilisé au sein de l'hôpital, comme désinfectant et pour la cautérisation.

2.1.26 Le Fréon 113

Après vérification, le Fréon 113 analysé dans l'effluent ne proviendrait pas d'une fuite de l'un des 30 groupes froids se trouvant sur le site. Il pourrait provenir de vieux stocks encore utilisés dans les laboratoires, à des fins analytiques.

2.1.27 Les alcools, l'acétone et l'acétaldéhyde

Les alcools (méthanol, éthanol et isopropanol) et l'acétone qui ont été évoqués précédemment sont en concentrations importantes dans l'effluent. On retrouve également de l'acétaldéhyde. Or, il apparaît que l'acétaldéhyde est un produit intermédiaire de la fermentation alcoolique [Environnement Canada et Santé Canada, 2000]. Selon Rice *et al.* [1999], il s'agit même du principal produit de dégradation de l'éthanol. Sa concentration maximale a d'ailleurs été mesurée au cours de la nuit (à l'inverse des autres substances). En étudiant les principaux cycles de fermentations microbiennes (Figure 58), on s'aperçoit que l'éthanol, l'acétaldéhyde, l'isopropanol et l'acétone en font partie intégrante. Comme nous l'avons vu, plusieurs de ces molécules sont utilisées par les laboratoires. Par ailleurs, le réseau d'assainissement qui comporte des boues et de grandes quantités de papier à usage unique constitué de cellulose (qui sont rejetées dans le réseau), pourrait constituer un excellent réacteur de fermentation. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

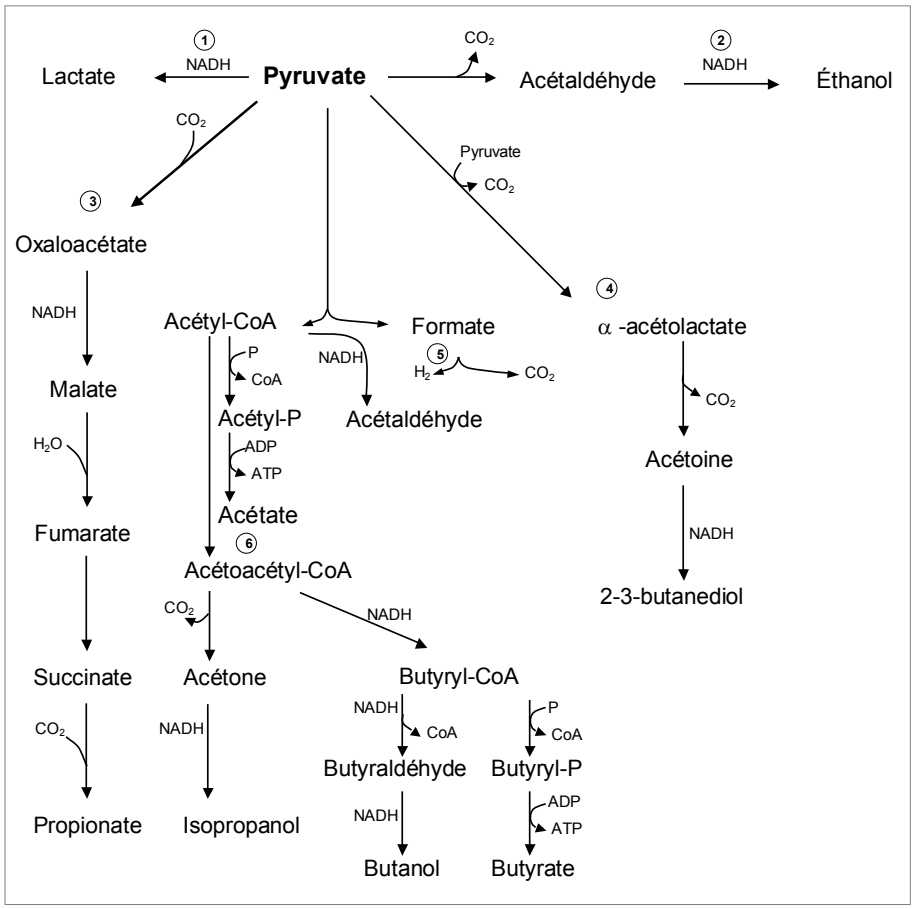


Figure 58 : Quelques exemples de fermentations microbiennes courantes [Prescott *et al.*, 1995]
[1 : bactéries lactiques (*Bacillus, Streptococcus, Lactobacillus*) ; 2 : Levures, *Zymomonas* ; 3 : Bactéries propioniques (*Propionibacterum*) ; 4 : *Enterobacter, Serratia, Bacillus* ; 5 : Entérobactéries (*Escherichia, Enterobacter, Salmonella*, Proteus) ; 6 : *Clostridium*]
[N.B. : La plupart de ces voies ont été simplifiées par omission d'une ou plusieurs étapes intermédiaires]

2.1.28 Les métaux

Les teneurs en métaux sont cohérentes avec celles retrouvées dans d'autres hôpitaux [Robert, 2006]. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer leur présence : l'usure des canalisations, le drainage des eaux pluviales (et/ou la remise en suspension aléatoire de leur particules dans le réseau). La présence de métaux pourrait aussi être liée à l'attaque des canalisations d'eau chaude sanitaire. En effet, d'après la société d'approvisionnement en eau potable de l'hôpital, l'eau potable concernée est à l'équilibre calcocarbonique et l'augmentation de température couplée à l'addition en quantité importante de chlore, pour la production d'eau chaude sanitaire (à 60°C et jusqu'à 70°C lors des chocs thermiques anti-légionelles) rend l'eau agressive. Dans ces conditions, il ne serait pas anormal de retrouver 0,5 mg/l de Cu dans de l'eau froide et 1 mg/l de Cu dans de l'eau chaude sanitaire, ce qui pourrait contribuer largement aux 0,162 mg/l de Cu que l'on trouve dans les effluents.

2.1.29 Les résidus médicamenteux

La comparaison des résultats des analyses de bêtabloquants effectuées sur l'échantillon moyen-24h (Tableau 34) avec des concentrations en entrée de STEP [Gabet *et al.*, 2007] révèle que l'acébutolol et l'aténolol sont en concentrations supérieures à celles habituellement mesurées en entrée de STEP dans l'échantillon moyen, et que les concentrations des autres bêtabloquants sont comparables à celles en entrée de STEP.

Notre deuxième point de référence est des plus intéressants. Il concerne la comparaison de nos données à l'estimation des quantités annuelles totales (hôpitaux et particuliers) rejetées dans les eaux usées [Besse et Garric, 2007]. La classification des bêtabloquants en fonction des quantités rejetées est identique dans les deux cas. Cela prouve qu'il n'existerait pas de spécificité des hôpitaux relative aux quantités de bêtabloquants utilisés (hypothèse qui reste à vérifier sur d'autres prélèvements).

bêtabloquants	concentration dans l'échantillon moyen (ng/l)	concentration en entrée de STEP française (ng/l)*	quantité rejetée dans les eaux usées sur le plan national (kg/an)**
acébutolol	5 390	1 000-3 000	-
aténolol	3 525	500-2 000	18 337
sotalol	780	200-2 000	-
métoprolol	107	25-350	4 393
propranolol	92	25-500	2 997
bisoprolol	90	25-350	-
timolol	33	< 37	-
nadolol	20	< 5-350	938
bétaxolol	8	< 37	-
oxprénolol	4	< 37	358

Tableau 48 : Comparaison de résultats d'analyses de bêtabloquants
[* variation des concentrations sur 6 STEP domestiques françaises [Gabet *et al.*, 2007] ; ** estimation basée sur les chiffres de consommation de l'année 2004 (officines et hôpitaux confondus) et le pourcentage de molécules excrété par l'organisme à partir des données présentées par Besse et Garric [2007]]

Nous avons présenté dans la partie résultats (partie 3, chapitre 2, page 163), l'estimation de la concentration en cyclophosphamide dans l'échantillon moyen-24h. Celle-ci (3,7 à 14,1 ng/l) se révèle inférieure aux concentrations mesurées par Steger-Hartmann [1997] dans les effluents d'un établissement de santé allemand (19 à 4 486 ng/l).

Notons enfin les limites de cette caractérisation physico-chimique. Il aurait en effet été souhaitable de prélever sur différentes journées et différents hôpitaux, de réaliser l'ensemble des analyses sur tous les échantillons et d'y ajouter d'autres analyses (résidus médicamenteux, agents de contraste iodés, éléments radioactifs). Dans le cadre de cette thèse, les moyens financiers et humains et temporels ont été un frein à ces analyses complémentaires. Ces travaux devront donc être réalisés ultérieurement.

2.1.3 Caractérisation microbiologique

Les résultats des analyses microbiologiques montrent une très faible quantité de microorganismes dans les effluents (pour les paramètres suivis). La présence de quelques entérocoques et staphylocoques (non-aureus) peut s'expliquer par le fait que ces bactéries sont beaucoup plus résistantes que les coliformes dans l'environnement [Rejsek, 2002]. L'évolution de la flore bactérienne au cours de la journée de prélèvement est peu significative car les concentrations sont faibles. Quantitativement, on retrouve beaucoup moins de microorganismes dans les rejets des hôpitaux que dans les rejets urbains. Cette constatation également faite par d'autres auteurs [Leprat, 1999; Emmanuel *et al.*, 2005b; Hartemann *et al.*, 2005] est cohérente avec nos observations. Les résultats trouvés sont même bien plus faibles que ceux présentés dans la littérature (Tableau 49).

source	coliformes (UFC/ml)	coliformes thermotolérants (UFC/ml)	entérocoques (UFC/ml)	staphylocoques (UFC/ml)
[Emmanuel, 2004a]	-	20 à 2.10^4	-	-
[Chitnis *et al.*, 2004]	-	-	$1,6.10^6$	$1,2.10^3$
[Hartemann *et al.*, 2005]	1.10^4 à 3.10^5	1.10^2 à 8.10^4	-	-
cette étude	0 à 0,14	0	0 à 2,4	2,4 à 6,08

Tableau 49 : Comparaison de résultats d'analyses microbiologiques effectuées sur différents effluents hospitaliers

Concernant les limites de l'étude et les compléments d'analyses à réaliser ultérieurement, les même commentaires que précédemment peuvent être faits.

2.2 Batteries de bioessais mono-spécifiques

2.2.1 Discussion des résultats

Les résultats des deux batteries de bioessais sont cohérents avec la littérature (Tableau 50) et avec les travaux réalisés en 1991 par la Société Française d'Hygiène Hospitalière (SFHH), qui ont été les premiers à mettre en avant la toxicité élevée des effluents hospitaliers [Leprat *et al.*, 1996; Villegas-Navarro *et al.*, 1997; Emmanuel *et al.*, 2005a].

source	hôpital	Dm 24h	Dm 48h	Vf 15mn	Vf 30mn	PS 72h
[Villegas-Navarro *et al.*, 1997]	hôpital n°1	50,3	33,2	-	-	-
	hôpital n°2	0,7	0,4	-	-	-
[SOCOTEC ENVIRONNEMENT, 1994]	Chambéry	48,74		7,9	-	-
	Édouard Herriot	2,05	-	2,1	-	-
	Grenoble	46,32	-	25	-	-
[Emmanuel *et al.*, 2005b]	hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France	0,8 à 10	1,4 à 1,9	23,8 à >77	21,7 à >77	1,8 à 11,9
cette étude		1,1 à NT	1,1 à NT	22,6 à NT	20,9 à NT	9,0 à NT

Tableau 50 : Comparaison de la toxicité (CE50 en % volumique d'effluent) des effluents provenant de divers hôpitaux [Dm 24 et 48h : essai d'inhibition de la mobilité de *D. magna* en 24 et 48 heures ; Vf 15 et 30 : essai d'inhibition de la luminescence de *V. fischeri* en 15 et 30 minutes ; Ps : essai d'inhibition du taux de croissance de la population de *P. subcapitata* en 72h ; NT : non toxique]

Concernant la toxicité liée aux MES, nos résultats montrent que la toxicité des effluents bruts est multipliée par un facteur variant entre 6 et 10 (voir partie 3, chapitre 2, 2.3) par rapport aux effluents filtrés, ce qui est en accord avec la littérature. Il est reconnu qu'en interceptant les matières en suspension ou les colloïdes sur lesquels sont fixés des polluants, la filtration des effluents peut conduire à une sous-estimation de leur toxicité [Jauzein *et al.*, 1999; Clément, 2006]. De plus, selon Weltens *et al.* [2000], les matières en suspension ont clairement un pouvoir écotoxique, non seulement parce qu'elles sont une source continue de xénobiotiques, mais également parce que la fraction adsorbée de polluants peut devenir biodisponible lors de son ingestion par les organismes aquatiques. Pour Clément [2006], cette toxicité peut également être due à l'action physique des particules lorsque les organismes cibles sont des filtreurs passifs. Il conclut sur l'importance de considérer l'effluent dans son intégrité, sans faire l'hypothèse simplificatrice que la toxicité est liée uniquement à la fraction soluble. Selon Weltens *et al.* [2000], les matières en suspension devraient être considérées comme un compartiment séparé dans l'évaluation des risques des produits chimiques, des effluents ou des eaux de surface.

Malheureusement, aucune analyse n'a été réalisée dans le cadre de ce travail de thèse, ni sur la composition et le comportement dans le temps des MES, ni sur la solubilisation, au cours du temps, des polluants qu'elles contiennent. Dans une prochaine étude, il serait important de caractériser ces MES pour mieux comprendre l'origine de cette importante différence de toxicité.

2.2.2 Sélection des batteries de bioessais

Comme nous l'avons vu dans l'analyse des résultats, chacun des bioessai de la batterie de bioessais simplifiée (inhibition de la mobilité de *D. magna*, Microtox® et inhibition de la croissance de la population de *P. subcapitata*) se révèle être au moins une fois le plus sensible aux échantillons d'effluents étudiés. Au regard de la méthode de sélection d'une batterie de bioessais pour le scénario de comparaison des niveaux de toxicité d'un effluent hospitaliers au cours des différentes périodes d'une journée, l'analyse des résultats (étape 3 de la démarche de d'élaboration d'une batterie de bioessais [Charissou *et al.*, 2006], page 70) permet de confirmer le choix de cette batterie de bioessais (étape 4 et 5). Par ailleurs, ces essais prennent en compte différents niveaux trophiques, types de toxicité, et critères d'effets. Ils sont simples de mises en œuvre, ont un bon rapport coût/efficacité, sont standardisés et reproductibles. Ils répondent donc tout à fait aux exigences préétablies dans la partie matériels et méthodes. Notons tout de même que l'analyse des résultats (partie 3, chapitre 2, page 165) n'a pas fait l'objet de tests statistiques de reproductibilité qui nécessitent un plus grand nombre de données.

La batterie de bioessais complète est composée de la batterie de bioessais simplifiée complétée par les essais d'inhibition de la mobilité et d'inhibition croissance de la population et de la reproduction de *C. dubia,* d'inhibition de la reproduction de *B. calyciflorus* et d'inhibition de la croissance de la population de *L. minor*. Il est plus difficile de conclure sur le choix de cette batterie de bioessais car elle n'a été mise en oeuvre que sur un échantillon unique d'effluent hospitalier (échantillon moyen). Nous pouvons toutefois proposer de conserver les essais constituants la batterie de bioessais simplifiée et l'essai d'inhibition de la reproduction de *B. calyciflorus* qui s'est révélé être le plus sensible des bioessais. Cet essai, disponible en « kit », est simple de mise en œuvre, rapide, peu coûteux et ne nécessite pas le maintien d'un élevage en laboratoire. Notons également l'intérêt des essais vis-à-vis de *D. magna* et *L. minor* qui permettent d'accéder à la toxicité de l'échantillon brut (non filtré). Concernant l'essai vis-à-vis de *L. minor*, le critère d'effet "surface verte" apparaît plus pertinent pour ce type d'effluent qui engendre chlorose et nécrose des lentilles d'eau. Enfin, l'ajout d'un bioessai chronique vis-à-vis d'un consommateur secondaire serait également pertinent. Ce niveau trophique primordial est en effet absent des batteries de bioessais mises en œuvre. Nous pouvons par exemple, proposer l'essai vis-à-vis des embryons et larves du poisson *Danio rerio* [FD ISO 12890, 2003].

L'obtention de résultats complémentaires sur d'autres effluents hospitaliers ainsi que sur la composition et le comportement dans le temps des MES sera nécessaire pour confirmer cette analyse, en conformité à la démarche "d'élaboration d'une batterie d'essais en fonction du scénario choisi d'utilisation des tests" élaborée par Charissou et al. [2006].

2.3 Bioessais sur une communauté périphytique naturelle

2.3.1 Effet de la saison

Nos résultats (en tenant compte des biodescripteurs utilisés, des températures et de la photopériode associée au jour de prélèvement des biofilms et des caractéristiques de l'effluent) ont montré une sensibilité des biofilms supérieure en été. Vis *et al.*. [1998],Griffith et Perry [1995] et Volatier [2004] notent que cette différence de sensibilité est probablement expliquée par l'évolution saisonnière de la composition spécifique des biofilms.

La matière organique, la biomasse algale et l'activité photosynthétique sont globalement plus importantes pour la campagne d'essai réalisée au cours de l'hiver. L'activité respiratoire est quant à elle plus faible au cours de cette campagne et ceci, quelle que soit la concentration testée (Tableau 41). Ces observations sont en accord avec Sheldon et Taylor [1982] et Volatier [2004], qui observent une augmentation de la température et de l'activité respiratoire périphytique à la fin de l'été. Acuna *et al.* [2004] constatent également une augmentation de l'activité respiratoire à la fin de l'été dans le cas de biofilms colonisés *in situ* sur substrats artificiels. Ces derniers attribuent ce résultat à la diminution de la croissance et de l'activité photosynthétique algale, due au développement intensif de la végétation des berges qui limite l'exposition des biofilms à la lumière. Nos résultats sont par contre en désaccord avec les résultats de Volatier [2004], qui trouve une activité photosynthétique supérieure au printemps et suppose que le biofilm collecté en été contient une accumulation de biomasse sénescente liée au déclin des cellules algales situées au niveau des couches inférieures du biofilm. Nos résultats sont également en désaccord avec Berard et Benninghoff [2001], qui notent que le périphyton développe une biomasse plus importante (masse sèche sans cendre, chlorophylle-a et densité bactérienne) au printemps.

paramètre	hiver 13°C	été 17°C
mo	+	-
chloro-*a*	+	-
PB	+	-
R	-	+

Tableau 51 : Comparaisons des réponses observées par rapport aux saisons (toutes concentrations confondues)
[mo : matière organique ; chloro-*a* : chlorophylle-*a* ; PB : production brute ; R : respiration ; + : réponse supérieure ; - : réponse inférieure]

Notons que la faible variation de température entre nos deux campagnes d'essais (4°C dans notre cas, 14°C dans le cas des expérimentations de Volatier [2004]) pourrait être à l'origine de ces contradictions. L'hiver 2006 s'est en effet révélé particulièrement doux et l'été 2006 particulièrement froid. Les statistiques 1971-2000 de la fiche climatologique de la station Lyon-

Bron, confirme ce fait. La température atmosphérique moyenne était en effet, de 4,7°C en février 2004 et de 17,1°C en septembre 2004 [Météo-France, 2004]. Parent-Raoult [2004] va également dans ce sens et note que la température de la Rize (cours d'eau de collecte du biofilm) été de 7°C au cours de l'hiver 2003.

2.3.2 Recommandation pour la conservation des échantillons

Les essais sur communautés naturelles périphytiques ont été effectués sur l'échantillon moyen décongelé. Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature [Jean, 1991; Plagellat, 2004], ils soulignent la modification de la nature physico-chimique et écotoxicologique de l'effluent.

Nous recommandons donc le travaille sur effluent « frais ». Cela permet de supprimer les erreurs associées à la congélation et la décongélation d'un effluent. Cela dit, pour les bioessais qui ne peuvent être réalisés rapidement, Naudin *et al.* [1995] précisent que la congélation reste la meilleure méthode de conservation. Nous réaffirmons alors avec Santiago *et al.* [2002], qu'il est indispensable de suivre quelques paramètres physico-chimiques et écotoxicologique sur effluent « frais » et « décongelé », afin d'évaluer l'influence de ce mode de conservation.

2.3.3 Variabilité des résultats

Le calcul des coefficients de variation (CV) moyens de chaque biodescripteur nous permet d'aborder les problèmes de variabilité associés aux bioessais sur communautés périphytiques (Figure 59).

Comme nous l'avons déjà évoqué (partie 3, chapitre 2), la variabilité associée au dosage des phéopigments est la plus importante parmi les réponses des biodescripteurs utilisés. Les coefficients de variations (CV) calculés atteignent 54% en « hiver » et 78% en « été ». Les CV associés à la mesure de la respiration et de la production brute au cours de la campagne « été » (respectivement 44 et 34%) sont également importants. Les autres CV sont inférieures à 30% et se révèlent donc relativement modérés [Volatier, 2004]. Dans ses travaux de thèses, Parent-Raoult [2004] a d'ailleurs choisi de ne pas traiter les résultats dont les coefficients de variations sont supérieurs à 50%.

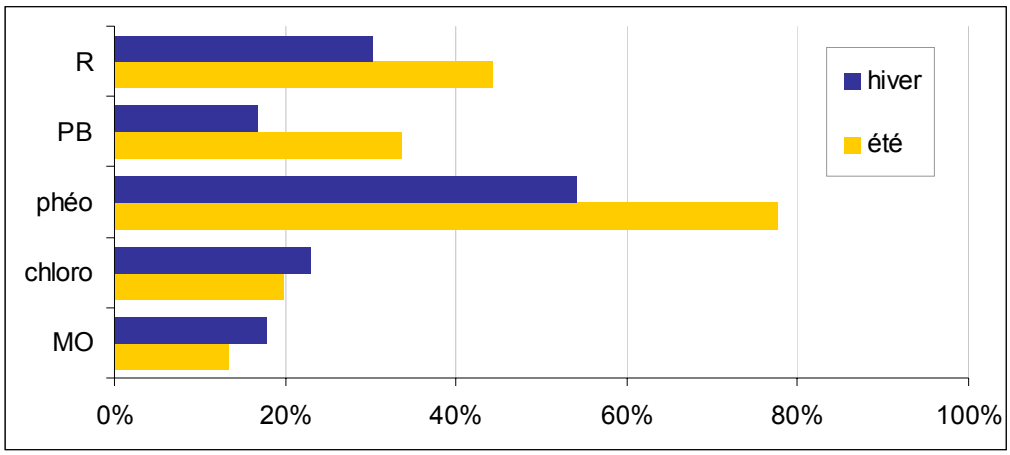


Figure 59 : Coefficients de variation moyens associés aux réponses des bioessais
[R : respiration ; PB : production brute ; phéo : phéopigments ; chloro : chlorophylle-*a* ; mo : matière organique]

Cette variabilité peut être liée à plusieurs phénomènes intervenant individuellement ou de façon cumulée :

- La variabilité des mesures (ce qui est probablement en partie le cas pour le dosage des phéopigments associé à celui de la chlorophylle-*a*) ;
- L'échantillonnage des biofilms. La littérature met en avant les problèmes de variabilité associés à l'utilisation de communautés périphytiques naturelles [Lamberti et Resh, 1985; Pashkevich *et al.*, 1996] ;
- L'évolution du périphyton dans le dispositif expérimental : décrochage du périphyton dû à sa manipulation, variabilité de l'exposition (intensité lumineuse non homogène dans le dispositif expérimental), maturité du biofilm et durée d'essai.

Ce bioessai nécessite donc d'être encore optimisé afin de diminuer la variabilité des réponses obtenues et d'améliorer la compréhension des effets observés. Pour cela, il y a tout un travail à faire sur les éléments précédemment énumérés. Par ailleurs, l'ajout de nouveaux biodescripteurs plus fins, tels que le suivi d'activités enzymatiques algales et bactérienne, est envisageable.

3. Relations entre les différents résultats

3.1 Relations entre les paramètres analysés et les activités de l'hôpital

Le Tableau 52 reprend de façon très synthétique les résultats des différents lots de données disponibles (activités de l'hôpital, débit, température, pH, analyses chimiques et microbiologiques et bioessais) en fonction des périodes de la journée.

	périodes de la journée				
	13h-17h	17h-23h	23h-5h	5h-9h	9h-13h
activités de l'hôpital	nettoyage des blocs	fin progressive des activités	nuit	prises de poste	activité de nettoyage et soins
débit	++	-	--	+	++
température	++	-	--	+	++
fluctuation du pH	++	++	-	+	++
chimie	++	+	-	+	++
écotoxicité	++	+	-	+	+++
microbiologie	-	+	+	+	-

Tableau 52 : Relations entre les paramètres analysés et les activités de l'hôpital en fonction des périodes de la journée [Pour le débit et la température : + signifie "débit et température plus importants ; Pour la fluctuation du pH: + signifie "fluctuations importantes" ; Pour la chimie : + signifie "plus pollué" ; Pour l'écotoxicité : + signifie "plus écotoxique" ; Pour la microbiologie : + signifie "présence de quelques bactéries"]

Il existe un lien entre les différents paramètres étudiés. Nous pouvons d'une part, regrouper les périodes 9h-13h et 13h-17h (périodes de jour) comme étant les plus écotoxiques, les plus « polluées », contenant le moins de microorganismes, correspondant aux débits et aux températures les plus importants, aux périodes avec le plus de fluctuation du pH et aux activités de nettoyage et de soins les plus développées (la période 9h-13h étant la plus prononcée). C'est donc au cours de ces périodes qu'il y aurait la plus forte utilisation de détergents, de désinfectants mais aussi de médicaments, ce qui expliquerait les caractéristiques physico-chimiques, microbiologiques et écotoxicologiques des effluents. A l'opposé, on peut regrouper les périodes 17h-23h et 23h-5h (périodes de nuit), qui correspondent en tout point à l'inverse des périodes de jour : faible toxicité, faibles concentrations en polluant, faibles débits, faibles températures, pH relativement stable et flore bactérienne légèrement plus importante. Pendant ces périodes, l'activité de l'hôpital est très fortement ralentie, ce qui expliquerait les caractéristiques des effluents. La période 5h-9h (période transitoire) fait l'intermédiaire en tout point entre les périodes de jour et de nuit. Cette période correspond aux prises de poste, ce qui traduit bien la reprise progressive de toutes les activités de l'hôpital.

Ajoutons que les variations de coloration des échantillons (associées à la matière organique colloïdale) évoluent dans le même sens. Les échantillons les plus foncés étant ceux des périodes 9h-13h et 13h-17h et le plus clair, étant celui correspondant à la période 23h-5h.

Cette analyse est descriptive et ne tient compte que des éléments disponibles à l'issue de cette campagne de prélèvements. Malgré tout, la présence d'une réelle dépendance entre les différents paramètres semble se vérifier.

Les paramètres globaux analysés varient dans le même sens que les résultats des bioessais (Tableau 52). Toutefois, au vu des résultats physico-chimiques globaux (valeurs inférieures aux effluents urbains), nous aurions pu nous attendre à une toxicité relativement faible des effluents. Nos résultats sont donc en accord avec Charissou *et al.* [2006], qui notent que les paramètres physico-chimiques globaux (pH, DCO, DBO, MES,...) ne renseignent pas, de façon systématique, sur l'écotoxicité d'un effluent et cela particulièrement dans le cadre de la caractérisation des effluents hospitaliers [Leprat *et al.*, 1996].

3.2 Substances théoriquement responsables de l'écotoxicité de l'échantillon moyen

Afin de mieux comprendre l'origine de l'écotoxicité des effluents, nous avons comparé les concentrations maximales mesurées dans l'effluent à :

- d'une part les valeurs de PNEC des principaux polluants (recherchés pour l'EDREcotox, partie 3, chapitre 3, page 196) ;
- et, d'autre part, les valeurs des CE50-24h daphnies (recherchés dans la partie 3, chapitre 2, page 175).

Le Tableau 53 présente ces deux méthodes. La méthode « concentration/PNEC » rend compte de l'influence des différents polluants sur la toxicité aquatique globale de l'effluent en considérant les facteurs d'extrapolation associés aux valeurs de PNEC. Quant à la méthode « concentration/CE50 daphnie », elle rend compte de l'influence de ces mêmes polluants sur l'inhibition de la mobilité de la daphnie en 24h.

La méthode « concentration/PNEC » révèle que 10 des 23 polluants sélectionnés pourraient être impliqués significativement dans l'écotoxicité des effluents hospitaliers. Le chlore libre apparaît comme un agent majeur, son ratio "concentration/PNEC" est en effet 28 fois plus important que celui du 2-propanol qui apparaît comme le second élément impliqué dans l'écotoxicité aquatique de l'effluent étudié. Suivent ensuite le cuivre, avec un ratio "concentration/PNEC" supérieur à 100, puis, de manière beaucoup moins importante, l'ammonium, le zinc, le propranolol, l'éthanol, le plomb, le formaldéhyde et le l'arsenic. Les chlorures, l'acétaldéhyde, le glutaraldéhyde, le chloroforme, l'acétone, le méthanol, l'aténolol, le métoprolol et le cyclophosphamide seraient peu ou pas impliqués dans l'écotoxicité de l'effluent.

La méthode « concentration/CE50 daphnie » révèle pour sa part, que 3 des 23 polluants sélectionnés pourraient être impliqués dans la toxicité de l'effluent vis-à-vis de la daphnie. L'ammonium se révèle être l'agent majeur avec un ratio "concentration/CE50" 2,6 fois plus important que celui du chlore libre et 16 fois plus important que celui du cuivre. Ces deux derniers polluants apparaissent donc être le second et le troisième éléments impliqués dans l'écotoxicité de l'effluent étudié vis-à-vis de la daphnie.

polluants	concentration max. / PNEC	concentration max. > PNEC	concentration max. / CE50 daphnie	concentration max. > CE50 daphnie
ammonium	39.42	oui	26,47	oui
chlorures	0,52	non	-	-
chlore libre	13 675	oui	10,32	oui
acétaldéhyde	0,02	non	0,000	non
glutaraldéhyde	0,43	non	0,000	non
formaldéhyde	7,00	oui	0,002	non
chloroforme	0,02	non	0,000	non
acétone	0,35	non	0,073	non
méthanol	0,05	non	0,000	non
éthanol	8,85	oui	0,000	non
2-propanol	489,3	oui	0,000	non
As	2,27	oui	0,001	non
Cu	101,3	oui	1,620	oui
Pb	7,50	oui	0,004	non
Zn	18,8	oui	0,126	non
fréon 113	0,0026	-	0,000	non
aténolol	0,05	non	-	-
métoprolol	0,01	non	0,000	non
timolol	0,000033	-	0,000	non
bisprolol	0,00009	-	0,000	non
bétaxolol	0,000008	-	0,000	non
propranolol	9,2	oui	0,000	non
cyclophosphamide	$0{,}01.10^{-3}$	non	0,000	non

Tableau 53 : Implication des principaux polluants dosés dans l'écotoxicité de l'effluent

Les deux méthodes mettent donc en avant la forte implication de l'**ammonium**, du **chlore libre** et du **cuivre** dans l'écotoxicité de l'effluent et montrent les différences de sensibilité en fonction du référentiel étudié (immobilité de la daphnie en 24h et toxicité aquatique globale).

Rappelons cependant qu'il existe de fortes suspicions quant à l'implication des surfactants, des AOX et des résidus médicamenteux dans l'écotoxicité de l'effluent. Ces polluants n'ont toutefois pas pu être pris en compte dans cette analyse. Il est donc nécessaire d'entreprendre des expérimentations complémentaires pour confirmer ces hypothèses.

4. La caractérisation des effets et les EDREcotox

4.1 Analyse critique des résultats

Dans les cinq paragraphes ci-après nous discutons sur les résultats de caractérisation des effets et des risques écotoxicologiques obtenus. Le premier paragraphe est consacré à la pertinence de l'évaluation écologique des différentes approches de caractérisation des effets. Les deuxième, troisième et quatrième paragraphes sont dédiés à une discussion des résultats obtenus via les approches « substances » d'une part et « bioessais » d'autre part. Le dernier paragraphe regroupe enfin les autres limites de cette étude.

4.1.1 Pertinence écologique et aptitude à identifier les polluants responsables de perturbations des différentes approches utilisées

Afin de clarifier nos résultats, nous avons procédé au classement des approches de caractérisation des effets en fonction de leur pertinence écologique et de leur aptitude à identifier les polluants responsables de perturbations (Figure 60). Notons que par « méthode écologiquement pertinente », nous attendons qu'elle rend compte d'une perturbation à un niveau élevé de l'organisation de l'écosystème.

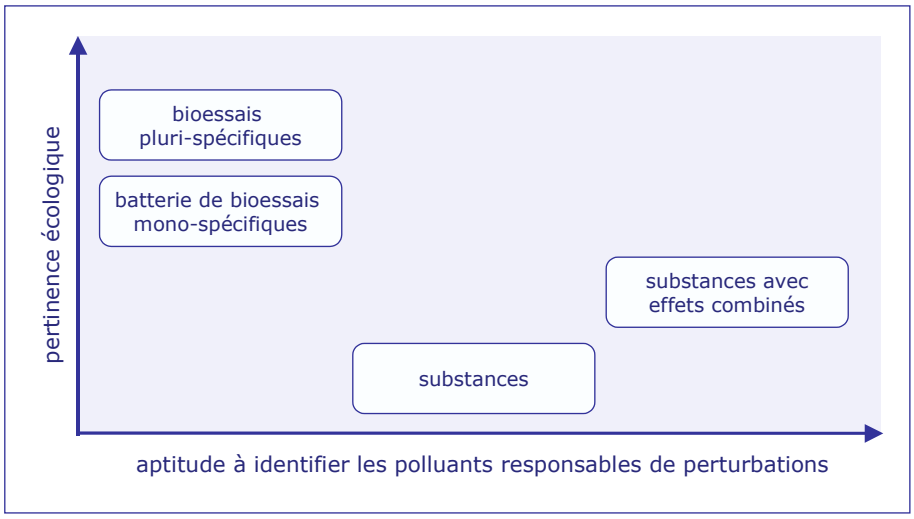


Figure 60 : Classement des approches de caractérisation des effets selon leur pertinence écologique et leur aptitude à identifier les polluants responsables de perturbations

Nos résultats sont en accord avec Kosmala [1998], qui indique que les approches à forte pertinence écologique ont une faible capacité à identifier les polluants responsables et réciproquement.

4.1.2 Approches « substances » *vs* « bioessais »

Les indices de risque obtenus dans les cas des approches « substances » sont plus importants que dans les cas des approches « bioessais ». Il est cependant difficile de conclure sur ce résultat car les deux types d'approches sont associés à des incertitudes de nature différentes :

- Les incertitudes liées aux approches « substances » sont principalement liées au fait que les valeurs de PNEC utilisées proviennent de sources multiples et que certains polluants ne sont pas pris en compte.
- Les incertitudes liées aux approches « bioessais » sont principalement liées au fait que les bioessais mis en œuvre sont en nombre limité et que certains effets importants peuvent être ignorés.

Ces incertitudes sont difficilement quantifiables et relèvent de travaux complémentaires. Dujet [1998] note que la gestion de l'incertitude est au cœur des problèmes d'analyse des systèmes complexes. L'appréciation de ces incertitudes n'a pas été développée dans cette thèse et nécessite la mise en place de travaux complémentaires.

4.1.3 Cas des approches « substances »

4.1.31 Considérations générales

Nous avons vu que les indices de risques associés aux approches « substances » et « substances avec effets combinés » sont presque identiques car il existe des écarts très importants entre le rapport PEC/PNEC du chlore libre ($1{,}1.10^{-1}$) qui est la substance la plus écotoxique de l'effluent et les autres polluants dont les rapports PEC/PNEC sont tous inférieurs à 10^{-3}. Dans le présent scénario, l'approche « substances avec effets combinés » n'apportent donc aucun éléments complémentaires à l'approche « substances ». Cependant, dans le cas où les rapports PEC/PNEC serait du même ordre de grandeur pour plusieurs polluants, l'approche « substances avec effets combinés » serait d'une importance capitale pour la détermination du calcul de risque.

4.1.32 Devenir des polluants

Le travail sur le devenir des substances aux cours de leur transfert depuis l'hôpital jusqu'au cours d'eau récepteur est primordial. Les substances à risques peuvent en effet générer des composés plus ou moins toxique que la molécule initiale dans le milieu récepteur.

Dans les paragraphes ci-après, nous discuterons du devenir des principaux polluants théoriquement responsables de l'écotoxicité de l'échantillon moyen et qui ont été identifié dans le paragraphe 3.2, page 222) : le chlore libre, l'ammonium, le cuivre, le 2-propanol et, à un autre niveau, les MES.

Le chlore libre

Nous avons déjà évoqué les effets de la dégradation du chlore libre (partie 3, chapitre 3, page 201). Une fois dans le cours d'eau récepteur, le chlore libre ne sera plus actif mais transformé en produits de dégradation halogénés (chloramines organiques et inorganiques, chloroalcanes, chloroalcènes, chloroaryles, …) dont le principale groupe s'avère être les chloramines inorganiques [Environnement Canada et Santé Canada, 1993]. Ces substances se révèlent potentiellement dangereuses pour les écosystèmes aquatiques.

Le devenir des chloramines dans l'environnement est déterminé en grande partie par des processus se déroulant en phase aqueuse et notamment : la dilution, le mélange, l'advection, la demande chimique (réactions avec des composés organiques et inorganiques), la photodégradation, la volatilisation, l'adsorption sur les sédiments et la réaction avec ces derniers ainsi que le transport, le dépôt, l'enfouissement et la remise en suspension des sédiments [Environnement Canada et Santé Canada, 2001b]. L'effluent étudié contient entre autres des composés azotés. L'association de chlore-azote est ainsi propice à la formation de chloramines. Des essais in situ et des relevés biologiques réalisés en aval d'une STEP ont montré que les eaux usées chlorées exercent une létalité aiguë chez les poissons et causent des modifications de la structure des communautés chez les invertébrés benthiques. Dans la plupart des études, les effets observés se révèlent être atténués ou supprimés lorsque les effluents sont déchlorés avant leur rejet ou lorsqu'ils ne sont pas chlorés [Environnement Canada et Santé Canada, 1993].

Ainsi, le chlore libre présent dans l'effluent étudié (responsable théorique de son écotoxicité), n'engendrerait pas d'effet direct sur le cours d'eau récepteur. Il est par contre probable (i) qu'il engendre des perturbations dans le fonctionnement des boues activées de la STEP et (ii) que ses sous-produits de dégradation participent à la toxicité globale des effluents de sortie de STEP dans le milieu récepteur.

L'ammonium

Avant son rejet dans le milieu naturel, l'effluent est traité par une STEP dont l'un des objectifs consiste à éliminer l'ammonium des effluents. La STEP d'accueil de l'effluent étudié est particulière car présente un très faible rendement d'élimination de l'ammonium, compris ente 16,4 et 18% [données internes, 2006]. Il est d'ailleurs reconnu que l'ammonium est parfois mal traité par les STEP [Kosmala *et al.*, 1999]. Une importante quantité (plus de 80%) de l'ammonium présent dans l'effluent est donc rejetée dans le cours d'eau récepteur étudié.

L'ammonium (ou ammoniac ionisé, NH_4^+) représente la forme ionisée de l'ammoniac total. Il est à ce titre en l'équilibre avec l'ammoniac non ionisé qui est régit en grande partie par le pH et la température. La forme non ionisée (NH_3) est particulièrement nocive pour les organismes aquatiques. La fluctuation de la température de l'eau peut donc engendrer la formation de quantités importantes de NH_3 dans une même journée [Environnement Canada et Santé Canada, 2001c]. Suivant les caractéristiques physico-chimiques des sols et des eaux, le rejet d'ammonium peut engendrer soit un enrichissement en azote, soit sur une acidification avec

disparition de la faune et de la flore dans les cas extrêmes [Rabiet, 2006]. Kosmala [1998], note pour sa part, que l'ammonium explique une grande partie de la toxicité des rejets de STEP.
Ainsi, l'ammonium présent dans l'effluent étudié et responsable théorique de l'écotoxicité de l'effluent, engendrerait des effets directs sur le cours d'eau récepteur. Il contribuerait donc à la toxicité globale des effluents de sortie de STEP dans le milieu récepteur.

Le cuivre

L'INERIS [2005b] note que les rejets de STEP contiennent encore du cuivre après traitement. Une étude sur six STEP de la région parisienne, révèle pourtant que l'élimination des métaux totaux (cuivre y compris) y est généralement élevée (>70%) (Seul le nickel est éliminé à moins de 50%) [Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2005]. La majorité du cuivre rejeté dans l'eau est sous forme particulaire et tend à se déposer, à précipiter ou à s'adsorber à la matière organique, aux oxydes de manganèse ou aux argiles. Dans l'eau, le cuivre particulaire représenterait de 40 à 90 % du cuivre [INERIS, 2005b]. Kosmala [1998] note qu'en sortie de STEP, les métaux se retrouvent principalement dans les sédiments et qu'ils contribuent à la toxicité des effluents de STEP dans le milieu récepteur.

Le cuivre rejeté par les hôpitaux serait donc éliminé en grande partie par la STEP. La faible part restante contribuerait alors à la toxicité globale des effluents de sortie de STEP.

Le 2-propanol

Le 2-propanol (ou isopropanol) présente un potentiel de biodégradation élevé dans les boues activées de STEP [INRS, 2003]. Il possède en effet les propriétés des alcools secondaires (réaction d'oxydation, de déshydrogénation, de déshydratation, d'estérification…). Son oxydation conduit à la formation d'acétone (produit principal de la réaction avec l'air et l'oxygène) puis à un mélange de dioxyde de carbone et d'acides (particulièrement acide acétique) particulièrement appréciés des bactéries contenues dans les boues activées de STEP [INRS, 2003]. L'OCDE [1997] ajoute que le 2-propanol est non persistant dans les milieux aquatiques.
Ainsi, malgré son implication théorique dans l'écotoxicité de l'effluent étudiée, le 2-propanol serait dégradé par la STEP et n'engendrerait pas d'effets sur le cours d'eau récepteur.

Les MES

Les résultats de la caractérisation écotoxicologique témoignent de la forte toxicité liée à la phase particulaire de l'effluent. Or, avant son rejet dans le milieu naturel, l'effluent est traité par une STEP dont l'un des objectifs principaux consiste à clarifier les effluents. La STEP d'accueil de l'effluent affiche un bon rendement d'élimination des MES, compris ente 78,1 à 79,2% [données internes, 2006]. Il semble donc important de considérer cette toxicité particulaire dans le cadre d'une EDREcotox liée « aux rejets d'effluent hospitalier directement dans le milieu récepteur » (situation normalement non rencontrée en France), mais secondaire dans le cadre du scénario étudié dans cette thèse.

- Synthèse -

Il apparaît donc que le cuivre et le 2- propanol sont relativement bien éliminés par les STEP. Le chlore libre est également dégradé rapidement, mais les sous-produits engendrés peuvent entraîner des perturbations dans le cours d'eau récepteur. L'ammonium est, par contre, mal pris en charge par la STEP.

Nous constatons ainsi que seul deux (ammonium et chlore libre) des quatre principaux polluants identifiées dans l'effluent moyen sont probablement responsables de l'impact sur les organismes du cours d'eau récepteur suite à leur traitement par la STEP. Les deux autres polluants (2-propanol et cuivre) contribueraient de manière moins importante à la toxicité globale des effluents de sortie de STEP. Notons enfin que les MES (qui contribuent à la toxicité de l'effluent) sont également bien traitées par les STEP et contribueraient de manière moins importante à la toxicité globale des effluents de sortie de STEP.

Comme nous l'avons déjà évoqué, un certain nombre de polluants n'ont pas pu être pris en compte dans la détermination des polluants théoriquement responsables de l'écotoxicité de l'effluent. Il s'agit notamment des surfactants et des résidus médicamenteux.

L'étude de Clara *et al.* [2007] révèle que la plupart des *surfactants* (linear alkylbenzene sulphonate, quaternary ammonia compounds, nonylphenol, octylphenol, nonylphenolmono- et -diethoxylates) sont éliminés à 90% par les STEP. Gonzalez *et al.* [2007] notent quant à eux, que la dégradation des surfactants engendre la formation de nouvelles substances qui peuvent être toxiques pour l'environnement. Les métabolites de type alkyphénols et alkyphénoxy carboxylates sont ainsi générés suite à la dégradation des alkyphénols ethoxylate qui possèdent la capacité d'imiter les hormones naturelles en agissant sur les récepteurs des œstrogènes [Jobling *et al.*, 1996; Ying, 2006]. Ces résultats impliquent donc que les surfactants contenus dans les effluents hospitaliers (et leurs produits de dégradation) engendrent probablement des effets sur les organismes aquatiques du cours d'eau récepteur.

Les *médicaments* sont inégalement traités par les STEP (dépendamment des molécules et du mode de fonctionnement des STEP). Le carbamazépine est en moyenne éliminé à 6% alors que l'ibuprofène est éliminé à 93% [Santos *et al.*, 2007]. Cela dit Santos *et al.* [2007] révèlent que sur cinq médicaments étudiés, seul l'ibuprofène est susceptible d'engendrer des risques pour les organismes aquatiques. Les auteurs ne sont cependant pas d'accord sur les chiffres. Quinn *et al.* [2008] suggèrent ainsi que les concentrations environnementales sont suffisamment importantes pour engendrer des risques chroniques à longs termes pour les écosystèmes aquatiques. Besse et Garric [2008] ont quant à eux développé une liste des 40 médicaments et 14 métabolites à surveiller dans l'environnement. Leprat *et al.* [2002] montrent que sur 800 échantillons d'eau usée provenant d'une unité de chimiothérapie, 15% ont une activité génotoxique et que 70% cette activité se retrouve en sortie de STEP. Tous ces auteurs s'accordent encore sur le manque de données de toxicité chronique. Notons également que les approches de caractérisations des effets utilisés ne prennent pas en compte les effets à « très long terme » (la durée d'exposition

maximale utilisée dans cette thèse est de 7 jours). Il apparaît donc impossible de conclure sur l'implication potentielle des ces molécules dans les risques pour les organismes aquatiques, associés au rejet de l'effluent hospitaliers dans le dispositif d'assainissement urbain et le cours d'eau récepteur.

Il est donc nécessaire d'entreprendre des expérimentations complémentaires pour lever ces interrogations : prélèvements sur différentes journées et hôpitaux, analyses complémentaires (résidus médicamenteux, agents de contraste iodés, surfactants, radioactivité), essais de dégradation en réacteur de laboratoire, caractérisation des effets écotoxicologiques à long terme.

4.1.4 Cas des approches « bioessais»

4.1.41 Considération générale

Le résultat de l'approche « batterie de bioessais mono-spécifiques » est le seul pour lequel nous possédons une valeur de comparaison. L'EDREcotox initié par Emmanuel [2004a] se base sur trois essais mono-spécifiques et le calcul de l'exposition par dilution. Les travaux réalisés par l'auteur conduisent au calcul d'un indice de risque égale à 0,021. dans cette thèse, l'indice de risque associé à l'approche « batterie de bioessais mono-spécifiques » (0,029) est donc cohérent avec les premiers travaux réalisés sur le sujet.

De manière plus générale, l'inconvénient majeur des approches « bioessais » est qu'à moins de mettre en place des expérimentations complémentaire assez lourdes, il n'est pas possible de d'intégrer la dégradation des polluants au cours du transfert de l'effluent, depuis la source jusqu'aux organismes cibles.

4.1.42 « pluri-spécifique » *VS* « mono-spécifiques »

L'indice de risque associé à l'approche « bioessai pluri-spécifique » se révèle beaucoup moins sévère que celui associé à l'approche « batterie de bioessais mono-spécifiques ». Ce résultat est en accord avec Girling *et al* [2000], qui notent que les essais mono-spécifiques sont généralement plus sévères que les essais pluri-spécifiques. Au vu des conditions expérimentales très dissemblables, il n'est toutefois pas rigoureux de comparer les résultats de ces deux approches. Nous avons d'ailleurs pu observer des résultats très variables entre les différents bioessais mono-spécifiques réalisés (CE20 comprises entre 0,7% et non toxique). Les essais pluri-spécifiques sont par définition plus complexes, ce qui engendre des variabilités plus importantes dans les réponses mesurées. Cette variabilité joue un rôle important sur la sensibilité de ces essais, puisqu'il sera de toute façon plus difficile de trouver un effet statistiquement significatif. Selon Cairns Jr. *et al.* [1996], la pertinence des biodescripteurs et de

l'échelle spatio-temporelle retenue, influencent la fiabilité des résultats des essais pluri-spécifiques. Carpenter [1996] ajoute que l'utilisation des résultats de microcosmes peut conduire à des erreurs d'appréciations importantes. Nous rejoignons ainsi Calow [1996], qui note que les résultats d'un essai pluri-spécifique ne sont pas forcément plus généralisables que ceux d'essais mono-spécifiques.

4.1.5 Autres limites de l'étude

Rappelons tout d'abord deux points essentiels au scénario associé à l'EDREcotox :

1. La limite temporelle est restreinte à « une journée d'activité de l'hôpital étudié ».

   Il faut rappeler que les activités hospitalières sont saisonnières (traitement des épidémies de grippe en hiver par exemple), ce qui engendre des variations de la nature physico-chimique, microbiologique et écotoxicologiques des effluents.
2. Les limites géographiques du scénario sont constituées par : l'hôpital d'étude, les dispositifs d'assainissement urbain et le cours d'eau récepteur.

Par ailleurs, cette ERE cotox reste une appréciation partielle du risque car elle ne tient pas compte de deux aspects : (i) les polluants déjà présents dans le milieu récepteur, (ii) l'accumulation quotidienne, mensuelle… des polluants dans le milieu récepteur.

Comme le mentionne Kosmala [1998] : « La prise en compte de la pollution existante en amont du rejet conditionne à la baisse l'appréciation du flux admissible ». Pour éviter ce biais, l'auteur recommande de travailler sur un secteur hydrographique homogène en additionnant les flux des rejets pour chaque polluant et de calculer la part relative de chaque rejet dans le flux total. Nous conseillons d'y ajouter l'accumulation quotidienne des flux de pollution engendrés par le scénario étudié.

Rappelons enfin l'impossibilité de généraliser nos résultats à l'ensemble des scénarios « rejet d'un effluent hospitalier dans un cours d'eau récepteur ». L'effluent se rejette dans un cours d'eau dont le débit est très important (1000 m^3/s). Le débit moyen de la Seine à hauteur de Paris en novembre 2007 est sept fois plus faible (152 m^3/s, [Direction régionale de l'environnement - Ile de France, 2007]). Plaçons-nous dans le contexte d'une ville de 19 600 habitants du Nord-Ouest de la France, qui possède un hôpital d'une capacité d'environ 500 lits (soit 2 fois moins que l'hôpital étudié) et qui est traversée par une rivière dont le débit moyen est d'environ 13 m^3/s (soit 77 fois plus faible que notre cours d'eau). Dans ce cas le risque pour les organismes de cours d'eau serait environ 39 fois plus élevé !

Nous pouvons donc dire que le fort débit du cours d'eau récepteur étudié dans cette thèse engendre une très importante dilution de l'effluent et conditionne les faibles indices de risque calculés.

4.2 Recommandations en vue de l'utilisation de l'outil de caractérisation des effets

Les résultats de cette étude nous permettent finalement d'émettre quelques recommandations pour l'utilisation de l'outil de caractérisation des effets proposé en vue de l'étude d'un nouveau scénario.

Pour chaque nouveau type de scénario, nous préconisons une première étape constituant une « approche intégrée » d'évaluation des effets (regroupant les quatre approches détaillée dans cette étude) qui doit être préalablement testée sur le terrain et sur plusieurs sites (Figure 61). Cela permet de classer les approches selon leur pertinence écologique et leur aptitude à identifier les polluants responsables de perturbation (Figure 60), et ainsi, de valider une méthodologie de routine applicable à ce type de scénario.

L'utilisation parallèle de plusieurs approches permet :

- La « compréhension du danger », c'est-à-dire l'identification des points problématiques en matière de danger (les substances impliquées, la pollution est-elle de type particulaire ou dissoute ?….).
- La sélection du type d'approche de caractérisation des effets la plus pertinente (écologiquement et financièrement) et utilisable en routine pour le type de scénario étudié. Ainsi, si seulement quelques substances sont responsables des effets écotoxicologiques et que leurs effets combinés sont connus, une approche de type « substances avec effets combinés » peut être préconisée. À l'inverse, si de nombreuses substances participent à l'écotoxicité de l'effluent et que les effets combinés de celles-ci sont mal connus, une approche de type « bioessais » peut être recommandée. Si on se place dans le contexte d'une milieu récepteur sensible, ou que l'on souhaite comprendre les effets ou approcher une meilleur pertinence écologique, l'approche « bioessais pluri-spécifiques » peut être préconisée.

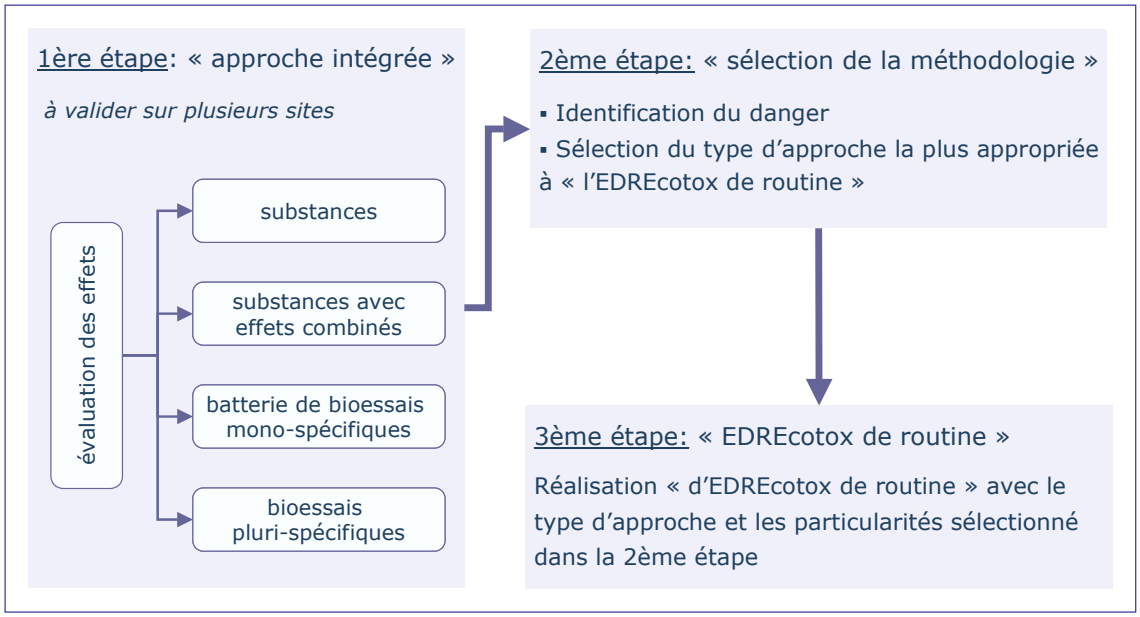


Figure 61 : Méthodologie de caractérisation des effets recommandée

Application aux effluents hospitaliers

Ainsi, si les résultats préliminaires obtenus (dans ce travail de thèse) sont validés à l'issue de la première étape de la méthodologie, nous pourrons préconiser l'approche « substances », comme une approche de caractérisation des effets de routine suffisante dans le cadre du scénario étudié (rejet d'un effluent hospitalier dans un cour d'eau après son transfert via un dispositif d'assainissement urbain). Les traceurs de risque les plus pertinents et les valeurs de PNEC associées sont : le chlore libre (0,00004 mg/l [INERIS, 2006]), l'ammonium (1,37 mg/l [SADA]), le cuivre (0,0016 mg/l [INERIS, 2006]) et le 2-propanol (0,0075 mg/l [Environmental Restoration Division, 1999]). La période de prélèvement de l'effluent la plus appropriée est la tranche horaire 9h-13h, qui donne lieu aux rejets les plus importants en volume et en toxicité.

Ce résultat nécessite naturellement une étape de validation sur d'autres effluents hospitaliers.

5. Recommandations pour la gestion des effluents hospitaliers

5.1 Gestion de la pollution à la source

5.1.1 Optimisation de la démarche qualité/traçabilité des substances utilisées dans l'hôpital

L'enquête menée auprès de l'hôpital étudié sur les substances détergentes et désinfectantes utilisées (annexe 3), a révélé que les acteurs hospitaliers se préoccupent encore assez peu de l'impact potentiel de ces substances sur l'environnement. Il existe néanmoins une prise en compte :

- du danger pour la santé des manipulateurs : par exemple le remplacement progressif du glutaraldéhyde par l'acide peracétique ;
- des importantes quantités de substances utilisées : par exemple le remplacement des bidons de surfactants par des doses pretes à l'emploi pour mieux maîtriser la consommation et le dosage.

Nous recommandons donc de poursuivre ces démarches en y ajoutant une meilleure gestion des substances utilisées et rejetées dans les hôpitaux en terme de :

- Qualité : Utilisation de produits peu toxiques quand cela est possible ;
- Quantité : Utilisation et rejets de quantités minimales ;
- Traçabilité : L'amélioration de la connaissance des formulations des substances et des quantités utilisées par service permettrait une meilleure gestion de ces substances ;
- Information et de sensibilisation de tout le personnel hospitalier.

5.1.2 Suppression ou diminution de l'usage de certaines substances toxiques pour les organismes aquatiques

La caractérisation physico-chimique et écotoxicologique détaillées des effluents hospitaliers étudiés à fait ressortir l'eau de javel, le cuivre, l'ammonium et le 2-propanol comme principales sources de toxicité de l'effluent.

Le chlore

L'eau de Javel est principalement utilisée pour diminuer la charge microbienne et virale. Ne pourrait-elle pas être remplacée par l'acide peracétique ?

L'utilisation de l'acide peracétique s'étend aujourd'hui à la désinfection d'eaux usées [Kitis, 2004; Koivunen et Heinonen-Tanski, 2005] et des recherches sont menées pour évaluer les risques quant à son utilisation à la place de produits chlorés dans le traitement de l'eau potable [Marabini *et al.*, 2006]. Les eaux potables désinfectées par les produits chlorés montrent des caractéristiques mutagènes et, de ce fait, sont potentiellement dangereuses pour les organismes aquatiques et pour la santé des manipulateurs [Guzzella *et al.*, 2004]. Nous avons déjà montré la forte dégradabilité et la plus faible toxicité de l'acide peracétique. Tout comme avec l'hypochlorite de sodium [Emmanuel *et al.*, 2004], la désinfection des eaux usées (contenant des molécules chlorées) par l'acide peracétique est accompagnée de la formation de sous-produits halogénés [Booth et Lester, 1995]. Mais ces sous-produits sont formés en plus faible quantité et ne présentent pas de caractère mutagène [Monarca *et al.*, 2002]. L'acide peracétique semble également plus efficace que l'hypochlorite de sodium pour la désinfection des eaux usées [Crebelli *et al.*, 2005]. Une étude de Elia *et al.* [2006], sur les défenses antioxydants de la carpe, met également en avant que l'acide peracétique serait responsable d'un plus faible stress oxydatif que l'hypochlorite de sodium. Il semble donc intéressant, à la fois pour l'homme et pour l'environnement, de remplacer l'hypochlorite de sodium par l'acide peracétique pour le traitement des eaux usées [Panouillères *et al.*, 2007]. Aussi, quand cela est possible, ne pourrait-il pas être utilisé dans les hopitaux en remplacement de l'eau de javel ?

Le cuivre

L'origine du cuivre dans l'effluent semble liée à la nature des canalisations d'alimentation en eau chaude sanitaire (paragraphe 2.1.28, page 213). Le remplacement de ces canalisations par de nouvelles en matériaux plus inertes permettrait de limiter les apports de cuivre dans les eaux usées.

le 2-propanol

Le 2-propanol provient (en partie au moins) de certaines substances détergentes et désinfectantes utilisées dans l'hôpital (voir annexe 3). Le remplacement de ces substances détergentes et désinfectantes par des substances moins écotoxiques permettrait de limiter les apports de 2-propanol dans les eaux usées.

L'ammonium

L'ammonium provient pour l'essentiel de la dégradation de la matière organique (paragraphe 2.1.24, page 212). Sa gestion « à la source » semble ainsi difficile.

Les résidus médicamenteux

La comparaison de nos résultats d'analyse de bêtabloquants à l'estimation des quantités totales (hôpitaux et particuliers) rejetées dans les eaux usées (paragraphe 2.1.29, page 214) montre que la pollution des eaux par les résidus médicamenteux n'est pas une problématique uniquement hospitalière.

La comparaison des volumes (en nombre d'unités standard par habitant et par rapport à l'Allemagne, l'Espagne, l'Italie et le Royaume-Unie) montre qu'en 2006, la France (hôpitaux et

officines) était au premier rang des consommations d'antibiotiques, d'hypocholestérolémiants, d'antidiabétiques oraux, d'antidépresseurs et de tranquillisants, au second rang pour les antiasthmatiques et les inhibiteurs de la pompe à protons et au troisième rang pour la consommation d'antihypertenseurs [Sabban et Courtois, 2007]. La politique française va aujourd'hui dans le sens d'une diminution des quantités prescrites inutilement. En cinq ans la consommation d'antibiotiques (hôpitaux et officines) a d'ailleurs baissé de 23,4% [Lefebvre, 2008]. Les hôpitaux doivent donc suivrent cette politique.

5.2 Amélioration du dispositif d'assainissement

En France, si certaines activités des hôpitaux sont soumises à déclaration ou autorisation (laverie, cuisines, médecine nucléaire, ateliers, production de froid et de chaud, stockages de produits dangereux) et sont donc contrôlées, les rejets liquides restent globalement soumis aux obligations définis par les gestionnaires des réseaux publics d'assainissement (partie 1, chapitre1). Il est cependant rare que les conditions de rejet des effluents dans le réseau soient très strictes.

Ce travail de thèse a permis d'identifier des caractéristiques spécifiques des effluents hospitaliers sur lesquelles nous pouvons nous appuyer pour faire des recommandations de gestion :

- écotoxicité probablement due essentiellement à l'ammonium, au chlore, au cuivre, au 2-propanol et aux particules ;
- existence de pics journaliers de débit et d'écotoxicité.

Pour diminuer l'impact des effluents hospitaliers sur les organismes aquatiques, nous proposons donc de décanter l'effluent et de mieux gérer les flux. La mise en place d'un bassin tampon réceptionnant l'effluent permettrait la décantation des particules et la régulation des débits et limiterait ainsi de manière importante l'impact engendré par l'effluent. Ce système peut encore être amélioré par une déchloration (par addition de bioxyde de soufre par exemple) et la mise en place d'un traitement spécifique de l'ammonium de l'effluent (nitrification/dénitrification, filtre nitrificateur, échangeur d'ions ou encore nitrification combinée à un lit filtrant).

Comme le recommande certains auteurs, on peut également envisager l'installation de véritables STEP adaptées à l'effluent. Gautam *et al.* [2007] et Chitnis *et al.* [2004] proposent une décantation associée ou non à une coagulation, suivie d'une chloration/déchloration ou d'une désinfection des effluents aux rayonnement ultraviolet.

L'installation de ces systèmes se révèlerait toutefois complexe et coûteuse. Aussi, compte-tenu de l'espace en général restreint et des moyens financiers limités des hôpitaux, il est probable que leur mise en place ne puisse être réalisée complètement que dans les nouveaux hôpitaux.

Conclusions et perspectives

Conclusions

Selon Hartemann *et al.* [2005] : « Les hôpitaux sont certainement l'un des plus gros producteurs d'effluents chargés chimiquement et non soumis à des règles strictes d'épuration ». En 1998, Leprat rapportait déjà que : « Les effluents générés par l'activité hospitalière peuvent présenter en l'état un danger potentiel pour l'homme et son environnement compte tenu de la nature et de l'importance des substances spécifiques (résidus médicamenteux, réactifs chimiques, antiseptiques, détergents, révélateurs et fixateurs de radiographies...) qu'ils contiennent et en raison de leur évacuation, au même titre que les rejets urbains classiques, vers le réseau d'assainissement communal sans traitement préalable ».

Pourtant, aucune étude n'est aujourd'hui parvenue à une caractérisation détaillée (physico-chimie, microbiologique et écotoxicologique) de ces effluents, ni à l'évaluation des risques écotoxicologiques liés à leur évacuation (au même titre que les rejets urbains classiques) dans le milieu naturel.

Ce mémoire de thèse s'inscrit dans la problématique de l'**évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets des effluents d'un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France dans le réseau d'assainissement en direction de la STEP, puis du cours d'eau récepteur**. Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes tout particulièrement interrogés sur la « caractérisation des effets » écotoxicologiques de ce type d'effluent. Les résultats obtenus nous permettent ainsi d'aboutir à trois catégories de conclusions : scientifiques, méthodologiques et d'amélioration de gestion.

Conclusions scientifiques

Le premier volet de ce travail était consacré à l'étude des effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers (partie 3, chapitre 1 et partie 4, paragraphe 1). Les mélanges binaires de désinfectants-surfactants suivants ont ainsi été étudiés en cinq ratios différents et vis-à-vis de l'inhibition de la mobilité de *D. magna* en 24h :

- désinfectants : glutaraldéhyde, puis acide peracétique et hypochlorite de sodium ;
- surfactants : dodécylsulfate de sodium (anionique), puis Triton-X 100 (non-ionique) et bromure d'hexadécyltriméthylammonium (cationique).

L'étude des effets combinés a ensuite été réalisée par les trois méthodes suivantes :

- la comparaison des CE50 des différents ratios testés pour chacun des mélanges ;
- la comparaison des courbes concentration-effets des mélanges en ratio 50-50 aux courbes modélisées à partir de la CA (C*oncentration Addition*) et de l'IA (*Independant Action*) ;
- le modèle des TI (*Toxicity Index*).

En accord avec la majorité des auteurs de la littérature [Marking, 1977; EIFAC, 1980; Ross et Warne, 1997; Deneer, 2000; Mercier, 2002], les résultats obtenus ont révélé qu'**il n'y aurait pas d'effet sensiblement important d'antagonisme ou de synergie (des concentrations et des effets) dans les mélanges de désinfectants/surfactants étudiés vis-à-vis de *D. magna.*** Aussi, le modèle CA semble être le plus approprié pour estimer la toxicité des mélanges étudiés.

De plus, la comparaison des résultats théoriques et expérimentaux de l'écotoxicité de l'effluent hospitalier étudié vis-à-vis de *D. magna* nous a permis de valider l'utilisation du modèle CA à une échelle de complexité supérieure : caractérisation de l'écotoxicité du mélange de l'ensemble des polluants dosés dans l'effluent étudié (voir partie 3, chapitre 2. 3, page 175).

Le deuxième volet de ce travail était consacré à l'étude des effets écotoxicologiques des effluents d'un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France vis-à-vis de différents organismes des écosystèmes aquatiques. Celle-ci a été réalisée via la caractérisation physico-chimique détaillée des effluents hospitaliers prélevés, la mise en place de batteries de bioessais mono-spécifiques et d'un bioessai plurispécifique sur une communauté périphytique naturelle. En plus, d'un échantillonnage moyen, nous avons caractérisé l'évolution des effets au cours d'une journée d'activité de l'hôpital.

Les résultats obtenus permettent de conclure sur la **toxicité des effluents de l'hôpital étudié**, ceci quelle que soit l'approche utilisée : « substances », « substances avec effets combinés », « bioessais mono-spécifiques » et « bioessai pluri-spécifique ». Nous avons également montré l'évolution de cette toxicité au cours d'une journée d'activité. L'échantillon correspondant à la période d'activité 9h-13h s'est révélé le plus écotoxique.

Le couplage des différentes méthodes de caractérisation des effets mises en œuvre nous a finalement permis de conclure sur l'origine de cette toxicité (relativement aux paramètres étudiés). Celle-ci semble être associée aux **activités spécifiques de l'hôpital** et plus particulièrement aux rejets de **matières en suspension**, d'**ammonium**, de **chlore libre** et de **cuivre** (et de façon moins importante, aux rejets de 2-propanol).

Le troisième volet de ce travail était consacré à la réalisation d'EDREcotox basées sur les différentes approches de caractérisation des effets étudiées préalablement. Il relativise les résultats obtenus au cours du second volet de cette thèse. Quelle que soit l'approche de caractérisation des effets utilisée, les indices de risque calculés révèlent en effet que **pour le scénario étudié, le risque est faible** pour les organismes du milieu récepteur (IR < 1).

Ce scénario est, cela dit, très particulier car le fort débit du cours d'eau récepteur (1000 m^3/s) permet une dilution de l'effluent suffisamment importante pour limiter le risque écotoxicologique. Notons également que les approches de caractérisations des effets utilisés **ne prennent pas en compte les effets à très long terme** (dans cette étude la période maximale d'exposition des organismes aux effluents est de 7 jours). Les effets de certains polluants

bioaccumulables et persistants (les anti-cancéreux, la radioactivité, les AOX…) ne sont ainsi pas considérés dans cette étude, bien qu'ils soient susceptibles d'engendrer des effets à longs termes.

Notons également les principaux éléments simplificateurs de la caractérisation de l'exposition de l'EDREcotox. Celle-ci ne prend pas en compte :

- l'évolution du débit d'effluent rejeté dans le cours d'eau récepteur, au cours d'une journée, d'une semaine et d'une saison ;
- les fuites pouvant intervenir dans le dispositif d'assainissement et susceptibles d'engendrer des transferts des polluants vers les zones non-saturées et saturées du sol ;
- la dégradation (transformation biologique et physico-chimique) des polluants au travers du dispositif d'assainissement urbain ;
- l'évaporation des polluants dans l'atmosphère ;
- les transferts de polluants pouvant intervenir entre la colonne d'eau et les sédiments du cours d'eau.
- les transferts de polluants pouvant intervenir entre le cours d'eau récepteur et la nappe phréatique.

Ces conclusions scientifiques contribuent ainsi à l'amélioration des connaissances sur les effets écotoxicologiques des effluents hospitaliers vis-à-vis des écosystèmes aquatiques

Conclusions méthodologiques

Si les résultats préliminaires obtenus dans le cadre de ce travail de thèse sont validés à l'issue de la première étape de la méthodologie élaborée, **l'approche « substances » pourra être préconisée comme une approche de caractérisation des effets de routine suffisante pour le scénario étudié** (rejet d'un effluent hospitalier dans un cours d'eau après son transfert via un dispositif d'assainissement urbain). Les traceurs de risque les plus pertinents et les valeurs de PNEC associées seraient alors : le chlore libre (0,00004 mg/l [INERIS, 2006]), l'ammonium (1,37 mg/l [SADA]), le cuivre (0,0016 mg/l [INERIS, 2006]) et le 2-propanol (0,0075 mg/l [Environmental Restoration Division, 1999]).

La période de prélèvement de l'effluent la plus appropriée est la tranche horaire 9h-13h, qui donne lieu aux rejets les plus importants en volume et toxicité.

D'un point de vue plus général, pour chaque nouveau type de scénario étudié, **nous préconisons une première étape constituée d'une approche intégrée de caractérisation des effets écotoxicologiques** (utilisation en parallèle des approches substances, substances avec effets combinés, batterie de bioessais mono-spécifiques et bioessai pluri-spécifique) devant être réalisée sur plusieurs sites identiques. Cette étape préliminaire permet de classer les approches

selon leur pertinence écologique et leur aptitude à identifier les polluants responsables de perturbations. Au final, une méthodologie de routine applicable à ce type de scénario peut être validée.

Ces conclusions méthodologiques contribuent ainsi à l'amélioration des méthodologies d'évaluation des risques écotoxicologiques et plus particulièrement de la phase "caractérisation des effets" ; ceci d'un point de vue général et pour le scénario spécifique étudié : « rejet des effluents d'un hôpital dans le réseau des eaux usées en direction de la STEP puis du cours d'eau récepteur ».

Conclusions d'amélioration de gestion

Le potentiel toxique des effluents hospitaliers révélé par ce travail de thèse, nous amène à formuler des propositions en vue de diminuer le danger lié au scénario étudié : la gestion de la pollution à la source et l'amélioration du dispositif d'assainissement.

Gestion de la pollution à la source

Les résultats obtenus nous incitent tout d'abord à recommander une amélioration de la gestion des substances utilisées et rejetées par les hôpitaux, en termes de :

- qualité : Utilisation de produits peu toxiques quand cela est possible ;
- quantité : Utilisation et rejets de quantités minimales ;
- traçabilité : La connaissance des formulations, des substances et des quantités utilisées par chaque service permettrait une meilleure gestion de ces substances ;
- information et de sensibilisation du personnel hospitalier.

Ces résultats nous permettent également de proposer :

- l'utilisation de l'acide peracétique en remplacement de l'eau de javel quand cela est possible, ce qui permettrait de limiter les rejets de chlore ;
- le remplacement, quand cela est possible, des canalisations de cuivre par de nouvelles en matériaux inertes. Cela permettrait de limiter les apports de cuivre dans les eaux usées ;
- le remplacement des substances détergentes et désinfectantes dont les formulations contiennent du 2-propanol par d'autres substances moins toxiques. Cela permettrait de limiter les rejets de cette substance dans les effluents.

La gestion des polluants à la source apparaît être une solution relativement facile à mettre en place et qui s'insère parfaitement dans le concept de développement durable recherché aujourd'hui.

Amélioration de l'assainissement

Nous proposons de **décanter les effluents et de gérer les flux**. La mise en place d'un bassin tampon réceptionnant l'effluent permettrait la décantation et la régulation des débits et limiterait ainsi de manière importante la pollution engendrée par l'effluent.

Ce système peut encore être amélioré par une **déchloration** et la mise en place d'un **traitement spécifique de l'ammonium** de l'effluent.

L'**installation de véritables STEP** peut également être envisagée. La mise en place de technologies spécifiques permettrait de traiter les micropolluants contenus dans les effluents tels que les résidus médicamenteux.

La mise en place de ces technologies est relativement coûteuse en terme d'espace et d'investissement. Dès lors que ces propositions risquent d'être difficiles à mettre en œuvre rapidement dans les établissements urbains préexistants.

Ces conclusions d'amélioration de gestion nous permettent ainsi de fournir des recommandations aux acteurs en charge de la gestion des effluents hospitaliers : responsables des hôpitaux, collectivités locales et services de l'État en charge du contrôle des effluents.

Rappelons que ces conclusions sont uniquement basées sur les expérimentations menées dans le cadre de cette thèse. Il s'agit d'une première étude détaillée de l'évaluation des risques écotoxicologiques des rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques et, plus particulièrement, de la caractérisation des effets écotoxicologiques de ce type d'effluent. **Nos conclusions sont valables pour le scénario étudié : le rejet d'un effluent hospitalier d'une grande ville du Sud-Est de la France dans un cours d'eau de fort débit.**

Les résultats obtenus nous ont ainsi conduis à un certain nombre d'interrogations qui donnent lieu aux perspectives de cette étude. Celles-ci sont développées dans les paragraphes suivants et devront être réalisées ultérieurement.

Perspectives

Étude des effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers

Afin de valider l'étude des effets combinés des principaux polluants contenus dans les effluents hospitaliers, nous recommandons la **mise en œuvre de nouvelles expérimentations** utilisant :

- d'autres substances contenues dans les effluents hospitaliers telles que les antiseptiques à base d'iode et de chlorhexidine et des formulations complexes de détergents/désinfectants (qui contiennent des surfactants, des alcools et des ammoniums quaternaires) ;
- des mélanges plus complexes que les mélanges binaires. Cela permettrait de mettre en avant les effets combinés « multiples » qui peuvent intervenir au niveau d'un effluent.
- et enfin, d'autres bioessais. Même si *Daphnia magna* est très sensible aux mélanges désinfectant-détergent, travailler avec d'autres organismes (bactérie, algue, poisson…) compléterait utilement nos résultats. Nous pouvons par exemple proposer l'essai d'inhibition de la reproduction de *Brachionus calyciflorus* en 48h. Cet essai, d'une part s'est révélé, être le plus sensible des bioessais utilisés vis-à-vis de l'effluent étudié et, d'autre part, permet d'accéder à une toxicité de type chronique.

Nous proposons également de **valider ces futurs résultats à l'échelle d'effluents réels**, comme nous l'avons fait dans ce document (partie 3, chapitre 2.3).

Caractérisation des effets des effluents hospitaliers vis-à-vis de différents organismes des écosystèmes aquatiques

Au cours de ce travail, la caractérisation des effets des effluents hospitaliers a uniquement été réalisée sur une journée d'activité d'un hôpital. Les résultats obtenus nécessitent donc d'être validés et complétés. Pour cela, il nous apparaît indispensable de **réaliser d'autres prélèvements d'effluents hospitaliers sur différentes journées et différents hôpitaux**. Il est également nécessaire de réaliser l'ensemble de la caractérisation détaillée (physico-chimique, microbiologique et écotoxicologique) sur tous les échantillons en y ajoutant d'autres analyses (résidus médicamenteux, agents de contraste iodés, surfactants spécifiques, germes multirésistants, caractérisation des MES ou encore radioactivité) et le bioessai vis-à-vis des embryons et larves du poisson *Danio rerio* [FD ISO 12890, 2003] et des essais à long terme.

Ces expérimentations permettraient ainsi de compléter et de conforter éventuellement nos conclusions scientifiques. Nous pourrions ainsi, entre autres, **valider le choix de la batterie de bioessais mono-spécifiques** optimale au scénario selon la méthode élaborée par Charissou *et al.* [2006].

Cette étude à enfin soulignée la nécessité d'**optimiser le bioessai « périphyton »** afin de diminuer la variabilité des réponses obtenues et d'améliorer la compréhension des effets observés. Pour cela, nous suggérons d'ajouter de nouveaux biodescripteurs plus fins tels que le suivi d'activités enzymatiques algales et bactériennes, ainsi que de mettre en œuvre de nouvelles expérimentations afin d'optimiser : la variabilité des mesures, l'échantillonnage des biofilms et l'évolution du périphyton dans le système.

La caractérisation des effets et les EDREcotox

Les résultats obtenus nous permettent enfin de proposer une méthodologie de caractérisation des effets écotoxicologiques pour un scénario donné. Celle-ci se base sur une étape préliminaire qui doit être réalisée sur plusieurs sites et consiste en une « approche intégrée » de caractérisation des effets (utilisation en parallèle des approches substances, substances avec effets combinés, batterie de bioessais mono-spécifiques et bioessai pluri-spécifique.

Dans le cadre du scénario étudié, nos résultats ont montré qu'une approche de type « substances » est suffisante pour caractériser en routine les effets écotoxicologiques des effluents hospitaliers. **Ce choix méthodologique requiert à présent d'être validé sur d'autres sites**. Pour ce faire, nous proposons de prélever des effluents hospitaliers sur différentes journées et différents établissements et de réaliser de nouvelles EDREcotox.

Il apparaît également important de **développer d'autres approches de caractérisation des effets** prenant mieux en compte (i) l'état écologique du milieu récepteur et, (ii) les effets à long terme des polluants, notamment ceux qui sont bioaccumulables et persistants. Pour cela, il faut envisager de travailler sur des organismes issus du milieu récepteur et sur des processus écologiques globaux et spécifiques tels que la photosynthèse, la respiration, la nitrification ou diverses activités enzymatiques (leucine-aminopeptidase, β-D-glucosidases, phosphatase alcaline…).

Rappelons enfin la nécessité d'entreprendre des études sur deux autres points primordiaux des EDREcotox :

- la **caractérisation de l'exposition**, en travaillant par exemple sur des essais de dégradation des effluents en réacteur de laboratoire, ou sur la modélisation des transferts de polluants dans les dispositifs d'assainissement urbains.
- l'**évaluation des incertitudes** associées au risque annoncé.

Références bibliographiques

Abrantes N et Goncalves F, 2003 The dynamics of *Ceriodaphnia pulchella* (Cladocera) in laboratory. Acta Oceanologica, Vol. 24, pp. 245-249

Acuna V, Giorgi A, Munoz I, Uehlinger U et Sabater S, 2004 Flow extremes and benthic organic matter shape the metabolism of a headwater Mediterranean stream. Freshwater Biol., Vol. 49, n° 7, pp. 960-971

Adam C, Debayle C, Carel D et Cavalié I, 2006 Les produits radiopharmaceutiques dans les effluents hospitaliers et domestiques. Environnement, Risques et Sante, Vol. 5, n° 4, pp. 254-260

ADEME, 2002 Évaluation de l'écocompatibilité des scénarios de stockage et de valorisation des déchets. Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie. Rapport n°4445. Angers: 148p.

ADEME, 2005 Développement d'une méthode de sélection des tests biologiques de toxicité et de génotoxicité adaptée à différents scénarii. Charissou AM, Jourdain MJ, Ferard JF, Pandard P, Poulsen V, Devillers J, Masfaraud JF et Cotelle S. Programme de recherche le l'Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Énergie. 262p.

Aherne GW, English J et Marks V, 1985 The role of immunoassay in the analysis of microcontaminants in water samples. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 9, n° 1, pp. 79-83

Altenburger R, Bodeker W, Faust M et Grimme LH, 1990 Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals. Combination effect studies with pesticides in algal biotests. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 20, n° 1, pp. 98-114

Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, Faust M, Scholze M et Grimme LH, 2000 Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 19, n° 9, pp. 2341-2347

Alzieu C, GEODRISK : Logiciel d'évaluation des risques liés à l'immersion des boues de dragage des ports maritimes. Plouzané: Editions IFREMER, 2001.

Ameziane T, Garabetian F, Dalger D, Sauvage S, Dauta A et Capblancq J, 2002 Epilithic biomass in a large gravel-bed river (the Garonne, France): a manifestation of eutrophication? River Res. App., Vol. 18, pp. 343-354

Andersen H, Siegrist H, Halling-Sørensen B et Ternes TA, 2003 Fate of estrogens in a municipal sewage treatment plant. Environ. Sci. Technol., Vol. 37, n° 18, pp. 4021-4026

Andrén C, Eklund B, Gravenfors E, Kukulska Z et Tarkpea M, 1998 A multivariate biological and chemical characterization of industrial effluents connected to municipal sewage treatment plants. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 17, n° 2, pp. 228-233

Angerville R, 2005 Étude des effets combinés de l'Hypochlorite de Sodium et des surfactants contenus dans les effluents hospitaliers vis-à-vis de *Daphnia magna*. Mémoire de master - Master Ecotoxicologie, Environnement et Gestion des Eaux de l'Université Quisqueya de Port-au-Prince, LSE de l'ENTPE. Vaulx en Velin: 52p.

APHA, 2000 Standard methods for the examination of water and waste-water. Eaton 21st ed. American Public Health Association. Washington DC: Clesceri C. et Greenberg A.E. *publischer*. 1268p.

Arimoro FO, 2006 Culture of the freshwater rotifer, *Brachionus calyciflorus*, and its application in fish larviculture technology. African Journal of Biotechnology, Vol. 5, n° 7, pp. 536-541

Ashton D, Hilton M et Thomas KV, 2004 Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. Sci. Total Environ., Vol. 333, n° 1-3, pp. 167-184

Aubry G, 2003 Enlèvement de l'azote des eaux usées par un procédé à culture fixée immergée. Mémoire de Maîtrise en génie civil. Laval: Université Laval - Département de Génie Civil - Faculté des Sciences et de Génie, 147p.

Babut M et Perrodin Y, 2001 Évaluation écotoxicologique de matériaux de dragage - (1) présentation et justification de la démarche [en ligne]. CETMEF, Cemagref, ENTPE, VNF, Centre d'Etudes Techniques Maritimes et Fluviales: 47p.

Backhaus T, Faust M, Junghans M, Meyer W, Scholze M, Horst Grimme L, Altenburger R, Grote M, Walter H, Arrhenius A, Blanck H, Porsbring T, Finizio A, Todeschini R, Vighi M, Gramatica P et Pavan M, 2003 The BEAM-project: Prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. Continental Shelf Research, Vol. 23, n° 17-19, pp. 1757-1769

Barata C, Baird DJ, Nogueira AJA, Soares AMVM et Riva MC, 2006 Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. Aquatic Toxicol., Vol. 78, n° 1, pp. 1-14

Barkay T, Kroer N, Rasmussen LD et Sorensen SJ, 1995 Conjugal transfer at natural population densities in a microcosm simulating an estuarine environment. FEMS Microbiology Ecology, Vol. 16, n° 1, pp. 43-53

Barrouillet MP, Ohayon-Courtes C, Dubus I, L'Azou B et Nguyen Ba C, 2001 Influence of cadmium speciation for the evaluation of in vitro cadmium toxicity on LLC-PK1 cells. Toxicol. in Vitro, Vol. 15, n° 4-5, pp. 525-529

Belanger SE, Lee DM, Bowling JW et LeBlanc EM, 2004 Responses of periphyton and invertebrates to a tetradecyl-pentadecyl sulfate mixture in stream mesocosms. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 23, n° 9, pp. 2202-2213

Belkhadir EM, 1979 Étude sur l'écotoxicologie des hydrocarbures aromatiques légers en milieu dulçaquicole. Mémoire de thèse. Metz: Université de Metz, 204p.

Bendz D, Paxeus NA, Ginn TR et Loge FJ, 2005 Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Hoje River in Sweden. J. Hazard. Mater., Vol. 122, n° 3, pp. 195-204

Berard A et Benninghoff C, 2001 Pollution-induced community tolerance (PICT) and seasonal variations in the sensitivity of phytoplankton to atrazine in nanocosms. Chemosphere, Vol. 45, n° 4-5, pp. 427-437

Bermond M, 2002 Évaluation des risques écotoxicologiques : fondements théoriques et mise en application en France. Synthèse technique. École Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts, Office International de l'Eau. Montpellier: 16p.

Bertrand-Krajewski JL, Laplace D, Joannis C et Chebbo G, 2000 Mesures en hydrologie urbaine et assainissement. Tec & Doc, Lavoisier. Paris. 793p.

Besse JP et Garric J, 2007 Médicaments à usage humain: risque d'exposition sur les milieux récepteurs - Proposition d'une liste de médicaments à usage humain à surveiller dans les eaux de surface continentales. CEMAGREF, Agence de l'Eau RMC. Lyon: 241p.

Besse JP et Garric J, 2008 Human pharmaceuticals in surface waters: Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation. Toxicol. Lett., Vol. 176, n° 2, pp. 104-123

Biggs BJF et Close ME, 1989 Periphyton biomass dynamics in gravel bed rivers: the relative effects of flows and nutrients. Freshwater Biol., Vol. 22, n° 2, pp. 209-231

Blanck H, 1985 A simple, community level, ecotoxicological test system using samples of periphyton. Hydrobiologia, Vol. 124, pp. 251-261

Blanck H et Dahl B, 1998 Recovery of marine periphyton communities around a swedish marina after the ban of TBT use in antifouling paint. Marine Pollution Bulletin, Vol. 6, pp. 437-442

Bliefert C et Perraud R, 2001 Chimie de l'Environnement: Air, Eau, Sols, Déchets. Editions De Boeck Université. Vol. 1ère Ed. 496p.

Bliss CI, 1939 The toxicity of poisons applied jointly. Ann. Appl. Biol., Vol. 26, pp. 585-615

Boillot C, 2004 Évaluation de l'écotoxicité de détergents/désinfectants - Modélisation mathématique prédictive - Évaluation du risque écotoxicologique. Mémoire de DEA - Mention Sciences et Techniques du Déchet. Villeurbanne: POLDEN, INSA de Lyon, 49p.

Bonin DJ et Travers M, 1993 A critical examination of present methods fos estimating biomass and activity of micoorganisms in aquatic environnments. Mar. Life, Vol. 2, n° 1, pp. 1-29

Bonnard N, Brondeau MT, Jargot D et Lafon L, 2001 Fiche toxicologique n° 239 - L'acide peracétique. INRS. Paris: 5p.

Booth RA et Lester JN, 1995 The potential formation of halogenated by-products during peracetic acid treatment of final sewage effluent. Water Res., Vol. 29, n° 7, pp. 1793-1801

Brondeau M-T, Falcy M, Jargot S, Miraval S, Protois J-C et Reynier M, 2000 Eaux et Extraits de Javel. Fiche Toxicologique N° 157. INRS. Paris: 8p.

Brooks MA, 1999 Breakpoint chlorination as an alternate means of ammonia-nitrogen removal at a water reclamation plant. Master of Science in Environmental Sciences and Engineering. Falls Church, Virginia: Faculty of the Virginia Polytechnic Institute, 111p.

Brosché S, Blanck H et Backhaus T, Joint action of five antibiotics on Limnic Plankton Communities. In: Poster - SETAC Europe. 7-11.05.06, Den Haag (Bays-bas), 2006

Brown KD, 2004 Pharmaceutically Active Compounds in Residential and Hospital Effluent, Municipal Wastewater, and the Rio Grande in Albuquerque, New Mexico. Master of Water Resources degree - The University of New Mexico. New Mexico: 56p.

Brown SE et Goulder R, 1999 Change in riverine epilithic extracellular enzyme activity in response to fish farm effluent. Lett. Appl. Microbiol., Vol. 29, pp. 385-388

Brown VM, 1968 The calculation of the acute toxicity of mixtures of poisons to rainbow trout. Water Res., Vol. 2, n° 10, pp. 723-733

Bruijn JHM et Van Leeuwangh CJ, 1996 Chapitre 1: No-effect concentration in environmental policy. In: The analyse of aquatic toxicity data. Kooijman SALM et Bedaux JMM. Amsterdam: VU University Press. pp. 1-7

Brunet C, 2000 Effets interactifs d'une forte charge en éléments nutritifs et de la vitesse du courant sur la communauté périphytique : étude en canaux artificiels. Mémoire de Thèse - Université Claude Bernard, Lyon 1 ENTPE, LSE - Spécialité Analyse et modélisation des systèmes biologiques. Vaux-en-Velin: 186p.

Burton GA et Pitt RE, 2002 Stormwater effects handbook. A tool for Wathershed Managers Scientist and Engineers. Lewis Publishers, CRC Press Compagny. Boca Raton, Fla. 98p.

C. CLIN Paris-Nord, 1999 Élimination des effluents liquides des établissements hospitaliers - Recommandations. Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Interrégion Paris - Nord, Institut Biomédical des Cordelier : Ile de France, Picardie, Haute-Normandie, Nord Pas-de-Calais, Paris: 74p.

C. CLIN Paris-Nord, 2000 Antiseptiques et désinfectants. Centre de Coordination de la Lutte contre les Infections Nosocomiales de l'Interrégion Paris - Nord, Institut Biomédical des Cordelier : Ile de France, Picardie, Haute-Normandie, Nord Pas-de-Calais, Paris: 87p.

C. CLIN Sud-Est, 2005 Acide peracétique : activité et usages en établissement de santé. Centre Hospitalier Lyon-Sud. Pierre Bénite: 72p.

Cairns Jr. J, 1983 Are single species toxicity tests alone adequate for estimating environmental hazard? Hydrobiologia, Vol. 100, pp. 47-57

Cairns Jr. J, 1986 The myth of the most sensitive species. BioScience, Vol. 36, pp. 670-671

Cairns Jr. J, Mc Cormick PV et Belanger SE, 1992 Ecotoxicological testing : small is reliable. J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol., Vol. 11, pp. 247-263

Cairns Jr. J et Cherry DS, 1993 7: Freshwater multi-species test systems. In: Handbook of ecotoxicology. Calow P. Oxford: Blackwell Scientific Publications, Vol. 1. pp. 101-116

Cairns Jr. J, Mc Cormic PV et Niederlehner BR, 1993 A proposed framework for developing indicators of ecosystem health. Hydrobiologia, Vol. 263, pp. 1-44

Cairns Jr. J et Pratt JR, 1993 Trends in ecotoxicology. Sci. Total Environ. - Proceedings of the 2nd European Conference on Ecotoxicology, Vol. 134, n° Supplement 1, pp. 7-22

Cairns Jr. J, Bidwell JR et Arnegard ME, 1996 Toxicity testing with communities: microcosms, mesocosms, and whole-system manipulations. Rev. Environ. Contam. Toxicol., Vol. 147, pp. 45-69

Calamari D et Alabaster JS, 1980 An approach to theoretical models in evaluating the effects of mixtures of toxicants in the aquatic environment. Chemosphere, Vol. 9, pp. 533-538

Calow P, 1992 Can ecosystems be healthy? critical consideration of concepts. J. Aquat. Ecosyst. Health, Vol. 1, pp. 1-5

Calow P, 1993 1: General Principles and overviews. In: Handbook of ecotoxicology. Calow P. Oxford: Blackwell Scientific Publications, Vol. Vol. 1. pp. 1-5

Calow P, 1996 Variability: Noise or information in ecotoxicology? Environ. Toxicol. Pharmacol., Vol. 2, n° 2-3, pp. 121-123

Caquet T, Lagadic L, Jonot O, Baturo W, Kilanda M, Simon P, Le Bras S, Echaubard M et Ramade F, 1996 Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 34, pp. 25-133

Caquet T, Lagadic L et Sheffield SR, 2000 Mesocosms in Ecotoxicology (1): Outdoor aquatic systems environment. Rev Environ Contam Toxicol, Vol. 165, pp. 1-38

Caquet T, Lagadic L, Monod G, Lacaze J-C et Couté A, 2001 Variability of Physicochemical and Biological Parameters between Replicated Outdoor Freshwater Lentic Mesocosms. Ecotoxicology, Vol. 10, n° 1, pp. 51-66

Carey J, Cook P, Giesy J, Hodson P, Murir D, Owens W et Solomon K, Ecotoxicological risk assessment of the chlorinated organic chemical. In: SETAC Pellston Workshop on Environmental Risk Assessment for Organochlorine Compounds. 07/1994, Aliston, Ontario, Canada. Society of Environ. Toxicol. and Chem. (SETAC), 1998 pp. 397

Carlsson C, Johansson A-K, Alvan G, Bergman K et Kuhler T, 2006 Are pharmaceuticals potent environmental pollutants?: Part I: Environmental risk assessments of selected active pharmaceutical ingredients. Sci. Total Environ., Vol. 364, n° 1-3, pp. 67-87

Carpenter SR, 1996 Microcosm experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology. Ecology, Vol. 77, n° 3, pp. 677-680

Cauzzi N, 2007 Évaluation de l'éco-compatibilité de sédiments contaminés, traités et non traités par un procédé physico-chimique, dans le cadre d'un scénario de dépôt en gravière - Étude en microcosmes aquatiques. Thèse INSA de Lyon - Spécialité Sciences et Techniques du Déchet au LSE de l'ENTPE. Villeurbanne: INSA de Lyon, 341p.

Cavalié P, Coignard F, Leclerc S, Maugendre P et Rozet K, 2003 Analyse des ventes de médicaments aux officines et hôpitaux en France 1991-2001. Afssaps (Agence française de sécurité sanitaires des produits de santé) - Direction des Etudes Médico-Economiques et de l'Information Sientifique. 3ème édition: 94p.

Cavalié P, De Calan C, Gourlay M-L et Comby V, 2005 Analyse des ventes de médicaments aux officines et hopitaux en France 1993-2003. Afssaps (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) - Direction des Etudes Médico-Economiques et de l'Information Sientifique. 5ème édition. Saint-Denis: 116p.

CCPCT, 2000 Green seal standard and environmental evaluation for general-purpose, bathroom and glass cleaners used for industrial and institutional purposes. Center for Clean Products and Clean Technologies. University of Tennessee. Knoxville, TN: 83p.

CCR, 1990 Influence of Piror 850 on the Reproduction of *Daphnia magna.* Cytotest Cell Research (CCR). Project No 164002. Rossdorf, Germany:

CEAEQ, 1998 Procédure d'évaluation des risques écotoxicologiques pour la réhabilitation des terrains contaminés. Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Québec. Québec: 139p.

Cedergreen N, Kamper A et Streibig JC, 2006 Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. Aquatic Toxicol., Vol. 78, n° 3, pp. 243-252

CETMEF, 2001 Évaluation écotoxicologique de sédiments contaminés ou de matériaux de dragage. Direction de la Recherche et des Affaires Scientifiques et Techniques du Ministère de l'Equipement des Transports et du Logement et par Voies navigables de France, Centre d'Etudes Techniques Maritimes et Fluviales: 12p.

Chapman PM, Cardwell RS et Chapman PF, 1996 A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 15, n° 77-79,

Chapman PM, 2000 Whole effluent toxicity testing - Usefulness, level of protection, and risk assessment. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 19, n° 1, pp. 3-13

Chapman PM, 2006 Emerging substances - Emerging problems? Environ. Toxicol. Chem., Vol. 25, n° 6, pp. 1445-1447

Charissou AM, Jourdain MJ, Pandard P, Poulsen V, Devillers J, Férard JF et Bispo A, 2006 Démarche optimale de sélection de batterie de bioessais pour l'évaluation écotoxicologique des milieux complexes. Synthèse bibliographique. Tech. Sci. & Meth., Vol. 5, pp. 101-110

Chèvre N, 2000 Étude et modélisation des effets écotoxiques d'un micropolluant organique sur *Daphnia magna* et *Pseudokirchneriella subcapitata*. Thèse - École Polytechnique Fédérale - Département de Génie rural. Lausanne: 127p.

Chitnis V, Chitnis S, Vaidya K, Ravikant S, Patil S et Chitnis DS, 2004 Bacterial population changes in hospital effluent treatment plant in central India. Water Res., Vol. 38, n° 2, pp. 441-447

Clara M, Scharf S, Scheffknecht C et Gans O, 2007 Occurrence of selected surfactants in untreated and treated sewage. Water Res., Vol. 41, n° 19, pp. 4339-4348

Clément B, 1994 La toxicité aiguë des lixiviats de décharge. Apports respectifs et complémentarité des approches biologique et physico-chimique. Thèse de Biologie et Biochimie Appliquées à l'Unniversité de Savoie et au LSE de l'ENTPE. Vaulx-en-Velin et Chambéry: Université de Savoie - ENTPE, 323p.

Clément B, Persoone G, Colin J et Du-Delepierre A, 1996 Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. I. Determination of leachate toxicity with a battery of acute tests. Chemosphere, Vol. 33, n° 11, pp. 2303-2320

Clément B et Cadier C, 1998 Development of a New Laboratory Freshwater/sediment Microcosm Test. Ecotoxicology, Vol. 7, n° 5,

Clément B, Triffault-Bouchet G, Lottmann A et Carbonel J, 2005 Are percolates released from solid wastes incineration bottom ashes safe for lentic ecosystems ? A laboratory ecotoxicological approach based on 100 litre indoor microcosms. Aquatic Ecosyst. Health Manag., Vol. 8, pp. 427-439

Clément B, 2006 Apports des essais en microcosmes aquatiques lentiques de laboratoire à l'évaluation écotoxicologique des polluants. Mémoire d'HDR - INSA de Lyon et Université Lyon1, Spécialité Biologie et Biochimie Appliquées au LSE de l'ENTPE. Vaulx-en-Velin: 277p.

Cleuvers M, 2003 Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. Toxicol. Lett., Vol. 142, n° 3, pp. 185-194

Coquery M, Miège C, Choubert JM, Ribeiro L et Eusebe M, Occurence and removal efficency of pharmaceuticals and personal care products in watewater treatment plants - Conception of a database and firts results (Poster). In: SETAC, Potro, 2007

Cox MF, 1994 Surfactants - Detergents and Cleaners: A handbook for formulators. In. Munich: Hanser Gardner Publications Inc. pp. 43-89

Crebelli R, Conti L, Monarca S, Feretti D, Zerbini I, Zani C, Veschetti E, Cutilli D et Ottaviani M, 2005 Genotoxicity of the disinfection by-products resulting from peracetic acid- or hypochlorite-disinfected sewage wastewater. Water Res., Vol. 39, n° 6, pp. 1105-1113

Crossland NO et La Point TW, 1992 The design of mesocosm experiment. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 11, pp. 1-4

Cserháti T, Forgács E et Oros G, 2002 Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. Environ. Int., Vol. 28, n° 5, pp. 337-348

Cullinan P, Hayes J, Cannon J, Madan I, Heap I et Newman-Taylor A, 1994 Occupational athma in radiographers. Lancet. Vol. 340. 1477p.

Davoren M et Fogarty AM, 2004 A test battery for the ecotoxicological evaluation of the agri-chemical Environ. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 59, n° 1, pp. 116-122

Davoren M, Ni Shúilleabháin S, O'Halloran J, Hartl MGJ, Sheehan D, O'Brien NM, Van Pelt FNAM et Mothersill C, 2005 A test battery approach for the ecotoxicological evaluation of estuarine sediments. Ecotoxicology, Vol. 14, n° 7, pp. 741-755

DEGREMONT, 1989 Mémento technique de l'eau. Lavoisier, Tec. & Doc. 9ème ed. 1459p.

Deloffre-Bonnamour N, 1995 Les rejets des établissements de santé : des effluents liquides aux déchets solides. Mémoire de maîtrise - IUP Génie de l'Environnement - Ecodéveloppement - Université Claude Bernard - Lyon 1. Lyon: 75p.

Deneer JW, 2000 Toxicity of mixtures of pesticides in aquatic systems. Pest Manag. Sci., Vol. 56, n° 6, pp. 516-520

Devez A, 2004 Caractérisation des risques induits par les activités agricoles sur les écosystèmes aquatiques. Mémoire de thèse - Spécialité Sciences de l'Eau. Montpellier: École Nationale du Génie Rural, des Eaux et des Forêts - Département Sciences de l'Environnement et Santé Publique, 239p.

Devillers J, 2000 Limites et perspectives des modèles en écotoxicologie. In: Club CRIN environnement et société, MATE. Modélisation en écotoxicologie. ECRIN ed. Paris. pp. 181-197

Direction régionale de l'environnement - Ile de France, 2007 Bulletin de situation hydrologique - novembre 2007. 7p.

Dirilgen N et Ince N, 1995 Inhibition effect of the anionic surfactant SDS on duckweed, with considerations of growth and accumulation. Chemosphere, Vol. 31, n° 9, pp. 4185-4196

Donguy G et Perrodin Y, 2006 Guide méthodologique d'évaluation des risques écologiques liés aux aménagements urbains et aux infrastructures de transport. LSE-ENTPE. Vaulx en Velin: 65p.

Donguy G et Perrodin Y, 2007 Évaluation des risques écologiques dans le domaine des sites pollués. Définitions, concepts et usages des outils existants. ADEME, ENTPE-LSE. version 1.0: 52p.

Dremont C et Hadjali R, 1997 La gestion des effluents liquides en milieu hospitalier. mémoire de DESS Technologies Médicales Hospitalières. Compiègne: Université de Technologie de Compiègne, 30p.

Dujet C, 1998 Contribution à la logique floue : des fondements aux applications. HDR. Villeurbanne: LGCI, INSA de Lyon, 132p.

Durand F, Rauwel G et Criquelion J, 2002 Désinfection - L'acide peracétique et les dispositifs médicaux. Plateaux Techniques Infos mars-avril 2002, pp. 4

Dyer SD, Peng C, Mc Avoy DC, Fendinger NJ, Messcheleyn P, Castillo LV et Lim JMU, 2003 The influence of untreated wastewater to aquatic communities in the Balatuin River, The Philippines. Chemosphere, Vol. 52, pp. 43-53

ECB, 2000a IUCLID (International Uniform ChemicaL Information Database) Chemical Data Sheet - Sodium hypochlorite. European Commission - ECB - ESIS (European chemical Substances Information System). 123p.

ECB, 2000b IUCLID (International Uniform ChemicaL Information Database) Chemical Data Sheet - Peracetic Acid. European Commission - ECB - ESIS (European chemical Substances Information System). 63p.

ECB, 2003 Technical Guidance Document (TGD) in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for existing substances and Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. European Chemical Bureau. part I, II, III et IV. Ispra (Italy): 1044p.

ECETOC, 2001 Peracetic Acid (CAS No. 79-21-0) and its Equilibrium Solutions. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. JACC 040. Brussels:

EIFAC, 1980 Report on combined effects on freshwater fish and other aquatic life of mixtures of toxicants in water. Food and Agriculture organisation of the Unated Nations. Rome. 49p.

Elia AC, Anastasi V et Dorr AJM, 2006 Hepatic antioxidant enzymes and total glutathione of Cyprinus carpio exposed to three disinfectants, chlorine dioxide, sodium hypochlorite and peracetic acid, for superficial water potabilization. Chemosphere, Vol. 64, n° 10, pp. 1633-1641

Emmanuel E, 2004a Évaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers. Thèse INSA de Lyon - Spécialité Sciences et Techniques du Déchet. Lyon: 259p.

Emmanuel E, 2004b Évaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques liés aux effluents hospitaliers. Thèse Spécialité Sciences et Techniques du Déchet. Villeurbanne et Vaulx en Velin: INSA de Lyon et LSE-ENTPE, 259p.

Emmanuel E, Keck G, Blanchard JM, Vermande P et Perrodin Y, 2004 Toxicological effects of disinfections using sodium hypochlorite on aquatic organisms and its contribution to AOX formation in hospital wastewater. Environ. Int., Vol. 30, n° 7, pp. 891-900

Emmanuel E, Hanna K, Bazin C, Keck G, Clement B et Perrodin Y, 2005a Fate of glutaraldehyde in hospital wastewater and combined effects of glutaraldehyde and surfactants on aquatic organisms. Environ. Int., Vol. 31, n° 3, pp. 399-406

Emmanuel E, Perrodin Y, Keck G, Blanchard JM et Vermande P, 2005b Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. J. Hazard. Mater., Vol. 117, n° 1, pp. 1-11

Environment Agency of United Kingdoms, 2003 Ecological Risk Assessment, A public consultation on a frame work and methods for assessing harm to ecosystems from contaminants soil. Environment Agency of United Kingdoms. Bristol (UK): 104p.

Environmental Restoration Division, 1999 Aquatic Toxicity Reference Values (P 7.6) - Module 7: Ecological risk ; SRS (Savannah River Site). US Department of energy. Manual: ERD-AG-003. US: 10p.

Environnement Canada et Santé Canada, 1993 Eaux usées chlorées - Rapport d'évaluation - Évaluation des substances de la première Liste des substances d'intérêt prioritaire (LSIP1). Gouvernement du Canada. Canada: 34p.

Environnement Canada, 1999 Guide des essais écotoxicologiques employant une seule espèce et de l'interprétation des résultats. Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, centre de technologie environnementale. Rapport SPE 1/RM/34: 209p.

Environnement Canada et Santé Canada, 2000 Acétaldéhyde - Rapport d'évaluation - Évaluation des substances de la première Liste des substances d'intérêt prioritaire (LSIP1). Gouvernement du Canada. Canada: 66p.

Environnement Canada et Santé Canada, 2001a Formaldéhyde - Rapport d'évaluation - Évaluation des substances de la première Liste des substances d'intérêt prioritaire (LSIP1). Gouvernement du Canada, Environnement Canada, Santé Canada. Canada: 102p.

Environnement Canada et Santé Canada, 2001b Chloramines inorganiques - Rapport d'évaluation - Évaluation des substances de la première Liste des substances d'intérêt prioritaire (LSIP1). Gouvernement du Canada. Canada: 76p.

Environnement Canada et Santé Canada, 2001c Ammoniac dans le milieu aquatique- Rapport d'évaluation - Évaluation des substances de la première Liste des substances d'intérêt prioritaire. Gouvernement du Canada. Canada: 110p.

Faust M, Altenburger R, Backhaus T, Blanck H, Boedeker W, Gramatica P, Hamer V, Scholze M, Vighi M et Grimme LH, 2001 Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. Aquatic Toxicol., Vol. 56, n° 1, pp. 13-32

Fayolle S, 1998 Réponse des communautés végétales aquatiques (algues et macrophytes) aux perturbations hydrodynamiques (débits réservés, restitution) en Durance aménagée. Thèse de Doctorat. Marseille: Université Aix-Marseille III, 227p.

FD ISO 12890, 2003 Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité vis-à-vis des embryons et larves de poissons d'eau douce - Méthode semi-statique. 21p.

Fent K, Weston AA et Caminada D, 2006 Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicol., Vol. 76, n° 2, pp. 122-159

Feron VJ, Groten JP et Tonker D, 1995 Toxicological of chemical mixtures : challenges for today and the future. Toxicology, Vol. 105, pp. 415-427

Feron VJ et Groten JP, 2002 Toxicological evaluation of chemical mixtures. Food Chem. Toxicol., Vol. 40, pp. 825-839

Ferrari B, Garric J, Paxeus N et Pollio A, Ecotoxicity of 6 pharmaceuticals found in effluent of sewage treatment plants and surface water in Europe : Overview and interest for the current european draft guideline. In: Envipharma, Cemagref, Lyon, 2003a

Ferrari B, Paxeus N, Giudice RL, Pollio A et Garric J, 2003b Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 55, n° 3, pp. 359-370

Ferrari B, Mons R, Vollat B, Fraysse B, Paxeus N, Lo Giudice R, Pollio A et Garric J, 2004 Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? Environ. Toxicol. Chem., Vol. 23, n° 5, pp. 1344-1354

Flemming HC, 1995 Sorption sites in biofilms. Wat. Sci. Technol., Vol. 32, pp. 27-33

Flynn NJ, Snook DL, Wade AJA et Jarvie HP, 2002 Macrophyte and periphyton dynamics in a UK Cretaceous chalk stream: the River Kennet, a tributary of the Thames. Sci. Total Environ., Vol. 282-283, pp. 143-157

Fontan B, Gombert S, Ribeyre F et Sennes V, 2007 Prérequis d'écologie. Institut EGID, Université Bordeaux. Bordeaux: Cours Rentrée en L3 IEGR. 16p.

Forbes VE et Calow P, 2002 Extrapolation in ecological risk assessment: Balancing pragmatism and precaution in chemical controls legislation. BioScience, Vol. 52, n° 3, pp. 249-257

Foussereau J, 1985 L'eczéma allergique au glutaraldéhyde. In: Doc Médecin Travail. Médecin Travail. Vol. 23. pp. 13-14

Francoeur SN et Biggs BJF, 2006 Short-term effects of elevated velocity and sediment abrasion on benthic algal communities. Hydrobiologia, Vol. 561, pp. 59-69

Fraysse B et Garric J, 2005 Prediction and experimental validation of acute toxicity of beta-blockers in *Ceriodaphnia dubia.* Environ. Toxicol. Chem., Vol. 24, n° 10, pp. 2470-2476

Fremery L et Rigaud S, 2001 Que deviennent les effluents radioactifs hospitaliers? Sciences et Technologie de l'Eau. Montpellier: 9p.

Gabet V, Miège C, Choubert J-M, Martin S et Coquery M, Occurence des hormones estrogenique et des bêtablioquants dans les eaux usées et traitées de 6 stations d'épuration domestiques. In: 7ème Congrès International GRUTEE (Groupement de Recherche Universitaire sur les Techniques de Traitement et d'Epuration des Eaux) Suivi et Devenir des Contaminants dans l'Environnement. 29-37/10/2007, Pau (france), 2007 pp. 5

Ganaye A, 2006 Impact d'un bassin d'infiltration d'eaux pluviales sur sa zone non saturée. Relation entre la rétention des métaux (Pb, Zn, Cu) et les lithofaciès inhérents à la formation fluvioglacière de l'Est Lyonnais. Mémoire de TFE. Vaulx en Velin: Laboratoire des Siences de l'Environnement - ENTPE, 125p.

Garric J, Vindimian E et Férard J-F, 1993 Essais biologiques pour l'évaluation de la toxicité chronique des rejets. Agence de l'eau et et Ministère de l'Environnement: 112p.

Garric J et Coquery M, Caractéristiques des substances médicamentauses et contamination des milieux récepteurs. In: Eau et santé. Eau pluviales et Assainissement:nouvelles préoccupations sanitaires, GRAIE. 10.09.2006, Lyon-Villeurbanne, 2006 pp. 75-85

Gartiser S, Willmund R, Brinker L, Erbe T et Kümmerer K, 1996 Contamination of hospital wastewater with hazardous compounds as defined by § 7a WHG. Acta Hydroch. Hydrobiol., Vol. 24, n° 2, pp. 90-97

Gaudin E, Mauvy F, Salmon R et Vignoles G, Chimie des éléments *p* - Le chlore. Available on: www.uel-pcsm.education.fr (09.08.06)

Gautam AK, Kumar S et Sabumon PC, 2007 Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. J. Environ. Manage., Vol. 83, n° 3, pp. 298-306

Gessner MO et Chavet E, 2002 A case for using litter breakdown to assess functional stream integrity. Ecol. Appl., Vol. 12, pp. 498-510

Gilbin R, 2001 Caractérisation de l'exposition des écosystèmes aquatiques à des produits phytosanitaires : spéciation, biodisponibilité et toxicité. Exemple du cuivre dans les eaux de ruissellement de parcelles viticoles (Roujan, Hérault, France). Thèse - Spécialité biologie des populations et écologie. Montpellier et Genève: Université Montpellier 1 et Faculté des sciences de l'Université de Genève, 192p.

Girling AE, Pascoe D, Janssen CR, Peither A, Wenzel A, Schafer H, Neumeier B, Mitchell GC, Taylor EJ, Maund SJ, Lay JP, Juttner I, Crossland NO, Stephenson RR et Persoone G, 2000 Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 45, n° 2, pp. 148-176

Gonzalez S, Barcelo D et Petrovic M, 2007 Advanced liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) methods applied to wastewater removal and the fate of surfactants in the environment. TrAC Trends in Analytical Chemistry, Vol. 26, n° 2, pp. 116-124

Government of Canada, Health and Welfare Canada et Environment Canada, Canadian Environmental Protection Act. Rapport d'évaluation des substances d'intérêt prioritaire. Available on: http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/contaminants/index_e.html (11/09/2006)

Greco WR, Bravo G et Parsons JC, 1995 The search for synergy: A critical review from a response surface perspective. Pharmacol. Rev., Vol. 47, n° 2, pp. 331-385

Griffith B et Perry SA, 1995 Between-year variation of periphyton community structure in two Appalachian headwater streams. Hydrobiologia, Vol. 302, pp. 1-9

Groten JP, Feron VJ et Sühnel J, 2001 Toxicology of simple and complex mixtures. Trends in pharmacological sciences, Vol. 22, n° 6, pp. 316-322

Guckert JB, 1996 Toxicity assessment by community analysis. J. Microbiol Meth., Vol. 25, n° 2, pp. 101-112

Guzzella L, Monarca S, Zani C, Feretti D, Zerbini I, Buschini A, Poli P, Rossi C et Richardson SD, 2004 In vitro potential genotoxic effects of surface drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, Vol. 564, n° 2, pp. 179-193

Haiß A et Kümmerer K, 2006 Biodegradability of the X-ray contrast compound diatrizoic acid, identification of aerobic degradation products and effects against sewage sludge micro-organisms. Chemosphere, Vol. 62, n° 2, pp. 294-302

Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC et Jørgensen SE, 1998 Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. Chemosphere, Vol. 36, n° 2, pp. 357-393

Halling-Sørensen B, Holten Lutzhoft H-C, Andersen HR et Ingerslev F, 2000 Environmental risk assessment of antibiotics: Comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. J. Antimicrobial Chemotherapy, Vol. 46, n° SUPPL. 1, pp. 53-58

Han GH, Hur HG et Kim SD, 2006 Ecotoxicological risk of pharmaceuticals from wastewater treatment plants in Korea: occurrence and toxicity to *Daphnia magna.* Environ. Toxicol. Chem., Vol. 25, n° 1, pp. 265-271

Hansson LA, 1989 The influence of periphytic biolayer on phosphorus exchange between substrate and water. Arch. Hydrobiol., Vol. 15, n° 1, pp. 21-26

Hartemann P, Hautemaniere A et Joyeux M, 2005 La problématique des effluents hospitaliers. Hygiène, Vol. 13, n° 5, pp. 369-374

Hartmann A, Alder AC, Koller T et Widmer RM, 1998 Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotixicity in native hospital wastewater. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 17, n° 3, pp. 377-382

Havens KE, East T, Rodusky AJ et Sharfstein B, 1999 Littoral periphyton responses to nitrogen and phosphorus: an experimental study in a subtropical lake. Aquatic Botany, Vol. 63, pp. 267-290

Hayet A, 2006 Variabilité des méthodologies d'évaluation des risques écologiques : conséquences et perspectives d'améliorations. Mémoire de master recherche en ingénierie de la santé. Mention Santé - Environnement. Institut Lillois d'Ingénierie de la Santé, Université de Lille 2 95p.

Heberer T, Schmidt-Bäumler K et Stan H-J, 1998 Occurrence and distribution of organic contaminants in the aquatic system in Berlin. Part I: Drug residues and other polar contaminants in Berlin surface and groundwater. Acta Hydroch. Hydrobiol., Vol. 26, n° 5, pp. 272-278

Heberer T, 2002 Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. Toxicol. Lett., Vol. 131, n° 1-2, pp. 5-17

Herbes SE et Beauchamps JJ, 1977 Toxic interaction of mixture of two coal conversesion effluent component (Resorcinol and 6-Methylquinoline) to *Daphnia magna.* Bull. Environ. Contam. Toxicol., Vol. 17, n° 1, pp. 25-32

Hermens J, Canton H, Janssen P et De Jong R, 1984 Quantitative structure-activity relationships and toxicity studies of mixtures of chemicals with anaesthetic potency: Acute lethal and sublethal toxicity to *Daphnia magna.* Aquatic Toxicol., Vol. 5, n° 2, pp. 143-154

Hermens JLM et Leeuwangh P, 1982 Joint toxicity of chemicals to Guppy (Poecilia reticulata). Ecotox. Environ. Safe., Vol. 6, pp. 302-310

Hignite C et Azarnoff DL, 1977 Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent. Life Sciences, Vol. 20, n° 2, pp. 337-341

Hill A, 1910 The possible effects of aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. J. of Physiology, Vol. 40, n° IV-VII,

Hill BH, Herlihy AT, P.R. K, J. DS et Vander Borgh MA, 2003 Assessment of streams of the eastern United States using a periphyton index of biotic integrity. Ecological Indic., Vol. 2, pp. 325-338

Hirsch R, Ternes T, Haberer K et Kratz KL, 1999 Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. Sci. Total Environ., Vol. 225, n° 1-2, pp. 109-118

Huss HH, Assurance of seafood quality, in FAO Fisheries Technical Paper. pp. 186

INERIS, 1999 Catalogue des concentrations prévisibles sans effet dans l'environnement aquatique (PNEC aqua) des substances chimiques existantes ayant fait l'objet d'une évaluation dans le cadre du règlement CEE n°793/93 et du programme OCDE. INERIS. Verneuil-en-Halatte. 17p.

INERIS, 2002 Cahier des charges techniques des opérations de prélèvement et d'analyse des rejets de substances dangereuses dans l'eau. INERIS. version 1.4. Verneuil-en-Halatte: 66p.

INERIS, 2003 Évaluation de l'impact des rejets de substances toxiques sur le milieu aquatique : utilisation du rapport PEC/PNEC. Action Nationale de Recherche et de Réduction des Rejets de Substances Dangereuses dans les Eaux. INERIS. Verneuil-en-Halatte. 3p.

INERIS, Base de données environnementales - Sodium Dodecyl Sulfate. Available on: http://chimie.ineris.fr/ (22.06.2006)

INERIS, Base de données environnementales - Sodium Hypochlorite. Available on: http://chimie.ineris.fr (30.11.2005)

INERIS, 2005b Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques - le Cuivre. INERIS. Verneuil-en-Halatte: 66p.

INERIS, Portail Substances Chimiques - Base de données environnementales. Available on: http://chimie.ineris.fr/fr/lien/basededonnees/environnementale/presentation.php (11.09.2006)

INRS, 1992 Fiche toxicologique n°123 - Peroxyde d'hydrogène et solutions aqueuses. INRS. Paris: 5p.

INRS, 1997 Fiche toxicologique n°24 - Acide acétique. INRS. Paris: 4p.

INRS, 2003 Fiche toxicologique n°66 - Propan-2-ol. INRS. Paris: 5p.

INRS, 2005 Fiche toxicologique n°65 - Le 1,1,1-trichloro-1,2,2-trifluoroéthane. INRS. Paris: 6p.

Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A et Parrella A, 2003 Toxicity identification evaluation of leachates from municipal solid waste landfills: A multispecies approach. Chemosphere, Vol. 52, n° 1, pp. 85-94

Isnard P, Flammarion P, Roman G, Babut M, Bastien P, Bintein S, Esserméant L, Férard JF, Gallotti-Schmitt S, Saouter E, Saroli M, Thiébaud H, Tomassone R et Vindimian E, 2001 Statistical analysis of regulatory ecotoxicity tests. Chemosphere, Vol. 45, n° 4-5, pp. 659-669

ISO 5667-10, 1992 Qualité de l'eau -- Échantillonnage -- Partie 10 : Guide pour l'échantillonnage des eaux résiduaires. 11p.

ISO 11348-3, 1998 Qualité de l'eau - Détermination de l'effet inhibiteur d'échantillons d'eau sur la luminescence de *Vibrio fischeri* (Essai de bactéries luminescentes) - Partie 3 : méthode utilisant des bactéries lyophilisées. Norme internationale. 21p.

ISO 20079, 2005 Qualité de l'eau - Détermination de l'effet toxique des constituants de l'eau et des eaux résiduaires vis-à-vis des lentilles d'eau (*Lemna minor*) - Essai d'inhibition de la croissance des lentilles d'eau. Norme internationale. 24p.

ISO/DIS 17616, 2006 Qualité du sol - Lignes directrices pour l'évaluation des essais appliqués dans le domaine de la caractérisation écotoxicologique des sols et des matériaux du sol. Projet de norme. 11p.

Jauzein M, Jourdain M-J, Bispo A et Savanne D, 1999 Écotoxicité des sols et des déchets : extractions des polluants. ADEME Edition. Paris. 138p.

Jean G, 1991 Évaluation de la toxicité aigüe de solutions synthétiques et d'effluents à partir d'un à partir d'un muti-test macroinvertébrés : le MTM. Comparaison des réponses des macroinvertébrés avec celles de *P. phosphoreum*, *Daphnia magna* et *Brachydanio rerio*. Thèse. Villeurbanne: INSA de Lyon - LAEPSI, 213p.

Jehannin P, 1999 Caractérisation et gestion des rejets liquides hospitaliers - étude particulière de la station du centre hospitalier de Hyères (Var). Mémoire de fin d'étude - Spécialité Génie Sanitaire. Rennes: Ecole Nationale de la Santé Publique, 71p.

Jensen J, Lokke H, Holmstrup M, Krogh PH et Elsgaard L, 2001 Effects and risk assessment of linear alkylbenzenz sulfonates in agricultural soil. 5. Probabilistic risk assessment of linear alkylbenzenz sulfonates in sludge-amended soils. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 20, n° 8, pp. 1690-1697

Jensen J et Sverdrup LE, 2002 Joint Toxicity of Linear Alkylbenzene Sulfonates and Pyrene on Folsomia fimetaria. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 52, n° 1, pp. 75-81

Jobling S, Sheahan D, Osborne JA, Matthiessen P et Sumpter JP, 1996 Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 15, n° 2, pp. 194-202

Jolibois B, Guerbet M et Vassal S, 2002 Glutaraldehyde in hospital wastewater. Arch. Environ. Contam. Toxicol., Vol. 42, pp. 137-144

Jones OAH, Voulvoulis N et Lester JN, 2002 Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. Water Res., Vol. 36, n° 20, pp. 5013-5022

Junghans M, Backhaus T, Faust M, Scholze M et Grimme LH, 2006 Application and validation of approaches for the predictive hazard assessment of realistic pesticide mixtures. Aquatic Toxicol., Vol. 76, n° 2, pp. 93-110

Juvonen R, Martikainen E, Schultz E, Joutti A, Ahtiainen J et Lehtokari M, 2000 A battery of toxicity tests as indicators of decontamination in composting oily waste. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 47, n° 2, pp. 156-166

Keddy CJ, Greene JC et Bonnell MA, 1995 Review of whole-organism bioassays: Soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 30, n° 3, pp. 221-251

Kim Y, Choi K, Jung J, Park S, Kim P-G et Park J, 2007 Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea. Environ. Int., Vol. 33, n° 3, pp. 370-375

Kirere M, Cours d'assainissement destiné aux étudiants de 1er graduat - section santé communautaire. Available on: http://www.nyankunde.org/Assainissement.htm (12.10.2006)

Kitis M, 2004 Disinfection of wastewater with peracetic acid: a review. Environ. Int., Vol. 30, n° 1, pp. 47-55

Klaine SJ, Cobb GP, Dickerson RL, Dixon KR, Kendall RJ, Smith EE et Solomon KR, 1996 An ecological risk assessment for the use of the biocide, dibromonitrilopropionamide (DBNPA), in industrial cooling systems. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 15, n° 1, pp. 21-30

Koivunen J et Heinonen-Tanski H, 2005 Peracetic acid (PAA) disinfection of primary, secondary and tertiary treated municipal wastewaters. Water Res., Vol. 39, n° 18, pp. 4445-4453

Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB et Buxton HT, 2002 Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: a national reconnaissance. Environ. Sci. Technol., Vol. 36, pp. 1202-1211.

Kortenkamp A et Altenburger R, 1998 Synergisms with mixtures of xenoestrogens: A reevaluation using the method of isoboles. Sci. Total Environ., Vol. 221, n° 1, pp. 59-73

Kosmala A, 1998 Évaluation écotoxicologique de l'impact des effluents de stations d'épuration sur les cours d'eau : intérêt d'une approche intégrée. Thèse - Spécialité Toxicologie de l'Environnement. Metz: Université de Metz - UFR Sciences Fondamentales et appliquées, 189p.

Kosmala A, Charvet S, Roger M-C et Faessel B, 1999 Impact assessment of a wastewater treatment plant effluent using instream invertebrates and the *Ceriodaphnia dubia* chronictoxicity test. Water Res., Vol. 33, n° 1, pp. 266-278

Kostel JA, Wang H, ST. Amand AL et Gray KA, 1999 Use of a novel laboratory stream system to study the ecological impact of PCB exposure in a periphytic biolayer. Water Res., Vol. 33, n° 18, pp. 3735-3748

Kreutzweiser DP, Capell SS et Sousa BC, 1995 Hexazinone effects on stream periphyton and invertebrate communities. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 14, n° 9, pp. 1521-1527

Kummerer K, Erbe T, Gartiser S et Brinker L, 1998 AOX -- Emissions from hospitals into municipal waste water. Chemosphere, Vol. 36, n° 11, pp. 2437-2445

Kümmerer K, Steger-Hartmann T et Meyer M, 1997 Biodegradability of the anti-tumour agent ifosfamide and its occurrence in hospital effluents and communal sewage. Water Res., Vol. 31, n° 11, pp. 2705-2710

Kümmerer K, Erbe T, Gartiser S et Brinker L, 1998 AOX - Emissions from hospitals into municipal waste water. Chemosphere, Vol. 36, n° 11, pp. 2437-2445

Kümmerer K et Helmers E, 2000 Hospital effluents as a source of gadolinium in the aquatic environment. Environ. Sci. Technol., Vol. 34, n° 4 - Washington, DC, United States, pp. 573-577

Kümmerer K, 2001 Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. Chemosphere, Vol. 45, n° 6-7, pp. 957-969

Lal H, Misra V, Viswanathan PN et Murti CRK, 1983 Comparative studies on ecotoxicology of synthetic detergents. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 7, n° 6, pp. 538-545

Lamberti GA et Resh VH, 1985 Compatibility of introduced tiles and natural substrates for sampling lotic bacteria, algae and macroinvertebrates. Freshwater Biol., Vol. 15, pp. 21-30

Lavoué J, Bégin D et Gérin M, 2002 La substitution des solvants par les nettoyants aqueux - Le dégraissage des métaux. IRSST; Université de Montréal. Bilans de connaissances / Rapport B-064. Montréal: 138p.

Le Perchec P et Richard M, 1994 Les molécules de la beauté, de l'hygiène et de la protection - Une introduction à la science cosmétologique. Editions C. Paris: Nathan. 144p.

Lefebvre E, 2008 En France, les bactéries résistent mieux que les antibiotiques. Les Echos, n° 11/01/08, pp. 17

Leffler JW, 1981 Aquatic microcosms and stress criteria forassessing environmental impact of organic chemicals. US EPA, Office of pesticides and Toxic substances. Washington: 50p.

Leprat P, Chedevergne E, Camus A, Pacheco A et Mounier M, 1996 Diagnostic physico-chimique et microbiologique des rejets hospitaliers. État des lieux à l'hôpital Dupuytren CHU de Limoges. Techniques hospitalières, Vol. 612, pp. 35-38

Leprat P, Les rejets liquides hospitaliers, quels agents et quelles solutions techniques? In: Santé et environnement hospitalier, les Assises Nationales QUALIBO 1998, Caen, 1998 pp. 10-13

Leprat P, 1999 Caractéristiques et impacts des rejets liquides hospitaliers. Techniques hospitalières, Vol. 634, pp. 56-57

Leprat P, Maftah C et Dagot C, Genotoxic activity of hospital wastewater : Behaviour of antineoplastic drugs in WWTP. In: New life for waste. 19-20.09.2002, Mons - Belgique. Province de Hainault, InNISMa, RECYWALL, FPMs, 2002 pp. 122-126

Leung HW, 2001 Ecotoxicology of glutaraldehyde: Review of environmental fate and effects studies. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 49, n° 1, pp. 26-39

Lewis MA et Suprenant D, 1983 Comparative acute toxicities of surfactants to aquatic invertebrates. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 7, n° 3, pp. 313-322

Lewis MA, 1992 The effects of mixtures and other environmental modifying factors on the toxicities of surfactants to freshwater and marine life. Water Res., Vol. 26, n° 8, pp. 1013-1023

Lewis MA, Pittinger CA, Davidson DH et Ritchie CJ, 1993 In situ response of natural periphyton to an anionic surfactant and environmental risk assessment ror phytotoxic effects. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 12, pp. 1803-1812

Lewis MA, Goodman LR, Macauley JM et Moore JC, 2004 Sediment Toxicity and Community Composition of Benthos and Colonized Periphyton in the Everglades–Florida Bay Transitional Zone. Ecotoxicology, Vol. 13, n° 3, pp. 231-244

Lin Z, Du J et Yin K, 2004 Mechanism of concentration addition toxicity : they are different for nonpolar narcotic chemicals, polar narcotic chemicals and reactive chemicals. Chemosphere, Vol. 54, pp. 1691 -1701

Lindberg R, Jarnheimer P-A, Olsen B, Johansson M et Tysklind M, 2004 Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. Chemosphere, Vol. 57, n° 10, pp. 1479-1488

Lindstrom EA, 1996 The humic lake acidification experiment (HUMEX): impacts of acid treatment on periphyton growth and nutrient availability in lake Skervatjern, Norway. Environ. Int., Vol. 22, n° 5, pp. 629-642

Loewe S et Muischnek H, 1926 Über Kombinationswirkungen. 1. Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. Naunyn Schmiedebergs. Arch. Exp. Pathol. Pharmakol., Vol. 114, pp. 313–326

Maltby L, 1999 Studying stress: the importance of organism-level responses. Ecol. Appl., Vol. 9, n° 2, pp. 431-440

Maltby L, 2006 Environmental Risk Assessment. In: Chemicals in the Environment : Assessing and Managing Risk (Issues in Environmental Science & Technology). Hester RE et Harrison RM. Royal Society of Chemistry. pp. 84-101

Mansotte F, 2000 Les rejets des établissements de santé. DDAS Seine-Maritime - Synthèse réalisé et complété sur la base du travail de F. Lebrun - Chargé d'études Environnement - Cetre hospitalier du havre - CLIN - Club Environnement: 68p.

Mansotte F et Jestin E, 2000 Les rejets liquides des établissements de santé : Caractérisation à la source et impact sur l'environnement marin côtier. AESN, DDASS SEINE MARITIME. 24425 RM. Le Havre: 31p.

Manusadzianas L, Balkelyte L, Sadauskas K, Blinova I, Pollumaa L et Kahru A, 2003 Ecotoxicological study of Lithuanian and Estonian wastewaters: Selection of the biotests, and correspondence between toxicity and chemical-based indices. Aquatic Toxicol., n° 1, pp. 27-41

Marabini L, Frigerio S, Chiesara E et Radice S, 2006 Toxicity evaluation of surface water treated with different disinfectants in HepG2 cells. Water Res., Vol. 40, n° 2, pp. 267-272

Marking LL, 1977 Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. Aquatic Tox. Hazard Eval., Vol. 634, pp. 99-108

Massi L, Géribaldi S et Guittard F, Propriétés Antibactériennes et Antifongiques de Tensioactifs Ammoniums Quaternaires en Série F-Alkylée. Available on: www.unice.fr/cdiec/congres/sfc_paca/resumes/massi.pdf

MATE, 1997 Biologie et écologie des espèces végétales proliférant en France - Synthèse bibliographique n°68. Les études des Agences de l'Eau. Paris: 202p.

MATE, 1998 Arrêté du 2 février 1998 relatif au prélèvement et à la consommation ainsi qu'aux émissions de touts nature des installations classés pour la protection de l'environnement soumises à autorisation. Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement. Paris: Paris, 3247p.

MATE, 2000 Évaluation détaillée des risques pour les écosystèmes. Gestion des sites et sols pollués, Partie 7. Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement. ed. BRGM. France: 7p.

Matthews RA, 1980 A field verification of the use of the autotrophic index in monitoring stress effects. Bull. Environ. Contam. Toxicol., Vol. 25, n° 1, pp. 226-233

Mayfield CI, 1993 2: Microbial Systems. In: Calow P. Handbook of ecotoxicology. London: Blackwell scientific publications, Vol. 1. pp. 9-27

Mc Bain AJ, Allison DG et Gilbert P, 2000 Population dynamics in mirobial biofilms. In: Allison, D.G. Gilbert, P. Lappin-Scott, H. *et al.* Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 309-329

Merchat M, 2005 Guide de formation à la gestion du risque de prolifération des légionelles dans les installations de refroidissement par dispersion d'eau dans un flux d'air. Climespace pour le Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable: 129p.

Mercier T, 2002 Avis de la Commission d'Étude de la Toxicité concernant les mélanges de produits phytopharmaceutiques. Réponses aux questions faisant l'objet d'une saisine de la Commission par la Direction Générale de l'Alimentation. INRA. projet v10. Versailles: 29p.

Metcalf et Eddy, 1991 Wastewater Engineering : Treatment, Disposal, Reuse. New York: McGraw-Hill Book Company. 3rd ed. 303p.

Metcalf et Eddy, 2003 Wastewater Engineering : Treatment, Disposal, Reuse. McGraw-Hill Inc. 4rd ed. New York: G. Tchobanoglous, F.L. Burton, H.D. Stensel *publisher*. 969p.

Météo-France, 2004 Fiche climatologique station Lyon-Bron, Statistiques 1971-2000 et records. Lyon: 2p.

Meugnier C et Morel T, 2005 Hospices Civils de Lyon - Etablissement Edouard Herriot. Quantification de la pollution rejetée à l'égout - Rapport de mesures. IRH Environnement. CM/CM/05-1418. Sérézin-du-Rhône: 19p.

Miege C, Favier M, Brosse C, Canler J-P et Coquery M, 2006 Occurrence of betablockers in effluents of wastewater treatment plants from the Lyon area (France) and risk assessment for the downstream rivers. Talanta, A collection of Papers Presented at the 1st Workshop of the European Union: Analysis and Removal of Contaminants from Wastewaters for the Implementation of the Water Framework Directive - 1st EMCO 2005, Vol. 70, n° 4, pp. 739-744

Mohee R, 2005 Medical wastes characterization in healthcare institutions in Mauritius. Waste Management, Vol. 25, n° 6 SPEC. ISS., pp. 575-581

Monarca S, Richardson SD, Feretti D, Grottolo M, Thruston A, Zani C, Navazio G, Ragazzo P, Zerbini I et Alberti A, 2002 Mutagenicity and disinfection by-products in surface drinking water disinfected with peracetic acid. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 21, n° 2, pp. 309-318

Nalecz-Jawecki G, Grabinska-Sota E et Narkiewicz P, 2003 The toxicity of cationic surfactants in four bioassays. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 54, pp. 87-91

Naudin S, Garric J, Vindimian E, Bray M, Migeon B, Vollat B et Lenon G, 1995 Influence of the sample preservation mode to assess the chronic toxicity of an industrial effluent. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 30, n° 1, pp. 54-62

NEPC, 1999 Guideline on Ecological Assessment. National Environmental Protection Council. Adelaide (Australia): 45p.

NF EN ISO 6341 (T90-301), 1996 Qualité de l'eau : Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Essai de toxicité aiguë. 9p.

NF EN ISO 8662 (T90-304), 2005 Qualité de l'eau - Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires. 15p.

NF T72-101, 1981 Antiseptiques et désinfectants - vocabulaire. Norme AFNOR. 3p.

NF T 90-117, 1999 Qualité de l'eau : Dosage de la chlorophylle-*a* et d'un indice phéopigments. 11p.

NICNAS, 1994 Priority Existing Chemical Assessment Reports n°3 : glutaraldehyde. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme. Australian Government Publishing service. Camberra: 176p.

Nirmalakhandan N, Xu S, Trevizo C, Brennan R et Peace J, 1997 Additivity in Microbial Toxicity of Nonuniform Mixtures of Organic Chemicals. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 37, n° 1, pp. 97-102

Nygaard G, Komarek J, Kristiansen J et Skulberg OL, 1986 Taxonomic designations of the bioassay algal NIVA-CHL1 (Selenastrum capricornutum) and some related strains. Opera Botanica, Vol. 90, pp. 1-46

Nystrom B, Bjornsater B et Blanck H, 1999 Effects of sulfonylurea herbicides on non-target aquatic micro-organisms. Growth inhibition of micro-algae and short-term inhibition of adenine and thymidine incorporation in periphyton communities. Aquatic Toxicol., Vol. 47, pp. 9-22

OCDE, 1997 SIDS Initial Assessment Report (SIAM) - 2-propanol. UNEP publications. Berlin: 87p.

OCDE, 2004a SIDS INITIAL ASSESSMENT PROFILE (SIAM) - methanol. 4p.

OCDE, 2004b SIDS Initial Assessment Report (SIAM) - ethanol. UNEP PUBLICATIONS. Berlin: 341p.

Odokuma LO et Okpokwasili GC, 1997 Seasonal influences of the organic pollution monitoring of the New Calabar River, Nigeria. Environ. Monit. Asses., Vol. 45, n° 1, pp. 43-56

Odum HT, 1957 Trophic structure and productivity of silver springs. Ecol. Monogr., Vol. 27, pp. 55-112

Olmstead AW et LeBlanc GA, 2005 Joint action of polycyclic aromatic hydrocarbons: Predictive modeling of sublethal toxicity. Aquatic Toxicol., Vol. 75, n° 3, pp. 253-262

Otitoloju AA, 2002 Evaluation of the joint-action toxicity of binary mixtures of heavy metals against the mangrove periwinkle Tympanotonus fuscatus var radula (L.). Ecotox. Environ. Safe., Vol. 53, n° 3, pp. 404-415

Paffoni C, Welte B, Gousailles M et Montiel A, 2006 Nouvelles molécules mises en cause par les directives Européennes : de la station d'épuration à l'usine de traitement d'eau potable. J. Européen d'Hydrologie, Vol. 37, n° 1, pp. 21-38

Pandard P, Poulsen V, Magaud H, Lhenry MC et Thybaud E, Ecotoxicological caracterisation of Wates (Poster). In: 3rd SETAC World Congress. 21-25 mai, Bringhton, 2000

Pandard P, Devillers J, Charissou A-M, Poulsen V, Jourdain M-J, Ferard J-F, Grand C et Bispo A, 2006 Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. Sci. Total Environ., Vol. 363, n° 1-3, pp. 114-125

Panouillères M, 2006 Étude de la toxicité aiguë vis-à-vis de *Daphnia magna* d'un désinfectant à base d'acide peracétique utilisé en milieu hospitalier en mélange binaire avec des détergents. Mémoire de master 1 - Sciences Technologies et santé - Mention : Biologie Moléculaire et Cellulaire, Oncologie - Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire, LSE-ENTPE. Vaulx en Velin: ENS Lyon, 31p.

Panouillères M, Boillot C et Perrodin Y, 2007 Study of the combined effects of a peracetic acid-based disinfectant and surfactants contained in hospital effluents on *Daphnia magna*. Ecotoxicology, Vol. 16, n° 3, pp. 327-340

Parados M, 1996 Tests écotoxicologiques avec la monoculture algale *Raphidocelis subcapitata*, le nanoplancton indigène du Léman et la bactérie *Vibrio fischeri* : développements et exemples d'applications pour la gestion des milieux aquatiques. Thèse - Spécialité Sciences de la Terre. Genève: Université de Genève, 139p.

Parent-Raoult C, 2004 Étude en systèmes artificiels de laboratoire des effets de Rejets Urbains de Temps de Pluie sur les communautés périphytiques : influence de facteurs d'exposition. Thèse Université Claude Bernard, Lyon 1 - Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques, Spécialité : Ecosystèmes, Evolution, Modélisation, Microbiologie 240p.

Park SK et Bielefeldt AR, 2003 Equilibrium partitioning of a non-ionic surfactant and pentachlorophenol between water and a non-aqueous phase liquid. Water Res., Vol. 37, n° 14, pp. 3412-3420

Pashkevich A, Pavluk T et Bij De Vaate A, 1996 Efficiency of standardized artificial substrates for biological monitoring of river quality. Environ. Monit. Asses., Vol. 40, pp. 143-156

Pearson N et Crossland NO, 1996 Measurement of community photosynthesis and respiration in outdoor artificial channels. Chemosphere, Vol. 32, n° 5, pp. 913-919

Pelletier J, 1983 Mesure de la production primaire en milieu aquatique, problèmes méthodologiques et éléments d'interprétation. Rev. Sci. Eau, Vol. 2, pp. 339-366

Perrodin Y, Babut M, Bedell J-P, Bray M, Clément B, Delolme C, Devaux A, Durrieu C, Garric J et Montuelle B, 2004 Approche méthodologique de l'évaluation des risques écotoxicologiques liés à la mise en dépôt sur sol de sédiments de dragage. Déchets, Sciences et Techniques, Vol. 34, pp. 4-14

Pesticide Action Network's, PAN Pesticide Database. Available on: www.pesticideinfo.org

Petersen JE, Cornwell JC et Kemp WM, 1999 Implicit scaling in the design of experimentl aquatic ecosystems. OIKOS, Vol. 85, n° 1, pp. 3-18

Plackett RL et Hewlett PS, 1952 Quantal reponses to mixtures of poisons. J. Royal Stat Soc, Vol. 14, pp. 141

Plagellat C, 2004 Origine et flux de biocides et de filtres UV dans les stations d'épuration des eaux usées. Thèse - Section sciences et technologie de l'environnement. Lausanne: École Polytechnique de Lausanne - Faculté Environnement Naturel, Architectural et Construit - Institut des sciences et technologie de l'environnement, 222p.

PR NF ISO 20665, 2007 Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité chronique vis-à-vis de *Ceriodaphnia dubia* - Essai d'inhibition de la croissance de la population et de la reproduction. 23p.

PR NF ISO 20666, 2007 Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité chronique vis-à-vis de *Brachionus calyciflorus* en 48 h. 15p.

Pratt JR, Niederlehner BR, Bowers N et Cairns Jr. J, 1987 Prediction of permissible concentrations of copper from microcosm toxicity tests. Toxicity Assessment : An International Quaterly, Vol. 2, pp. 417-436

Prescott L, Harley J et Klein DA, 1995 Microbiologie. 2nd. ed. 1014p.

PROLABO, 1997 Acide éthanoïque. Fiche de données de sécurité. 5p.

Quinn B, Gagne F et Blaise C, 2008 An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, Hydra attenuata. Sci. Total Environ., Vol. 389, n° 2-3, pp. 306-314

Rabiet M, 2006 Contamination de la resource en eau par les eaux usée dans un bassin versant méditerranéen - Apport des éléments majeurs, traces et terres rares. Thèse Université de Montpellier II. Spécialité Terre solide (géodynamique des enveloppes supérieures, paléobiosphère), Sciences de l'Eau dans l'Environnement Continental 368p.

Radix P, Léonard M, Papantoniou C, Roman G, Saouter E, Gallotti-Schmitt S, Thiébaud H et Vasseur P, 2000 Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 47, n° 2, pp. 186-194

Ramade F, 2002 Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement. 2ème ed. Paris: EdiScience international. 1075p.

Rayburn JR, Friedman M et Bantle JA, 1995 Synergistic interaction of glycoalkaloids [alpha]-chaconine and [alpha]-solanine on developmental toxicity in xenopus embryos. Food & Chemical Toxicol., Vol. 33, n° 12, pp. 1013-1019

RECORD, 2005 Méthodes d'évaluation des risques environnmentaux et risques acceptables : état des lieux, étude comparative. Réseau COopératif de Recherche sur les Déchets (RECORD), Institut Lillois d'Ingénierie de la Santé (ILIS). 04-0810/1A. Loos: 753p.

RECORD, 2006 Évaluation et acceptabilité des risques environnementaux. Méthodes d'évaluation, analyse comparative ; Etude sociologiques des représentations des risques, synthèse bibliographique. 04-0810//0811/1A: 227p.

Reddersen K, Heberer T et Dünnbier U, 2002 Identification and significance of phenazone drugs and their metabolites in ground- and drinking water. Chemosphere, Vol. 49, n° 6, pp. 539-544

Rejsek F, 2002 Analyse des eaux. Aspects réglementaires et techniques. SCEREN - CRDP Aquitaine. Biologie technique - environnement. Bordeaux. 360p.

Ren S et Frymier PD, 2003 Use of multidimensional scaling in the selection of wastewater toxicity test battery components. Water Res., Vol. 37, n° 7, pp. 1655-1661

Rice DW, Powers SE et Alvarez PJJ, 1999 Chap.1: Potential Scenarios for Ethanol containing Gasoline Released into Surface and Subsurface Waters. In: Cannon G., Health & Environmental Assessment of the Use of Ethanol as a Fuel Oxygenate. Vol.4: Potential Ground and Surface Water Impacts. University of California, Lawrence Livermore National Laboratory, Environmental Restoration Division. pp. 1-24

Richards SM et Cole ÆSE, 2006 A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to Xenopus laevis larvae. Ecotoxicology, Vol. 15, n° 647-656,

Richardson ML et Bowron JM, 1985 The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. J. Pharm. Pharmacol., Vol. 37, n° 1, pp. 1-12

Rideout K, Teschke K, Dimich-Ward H et Kennedy SM, 2005 Considering risks to healthcare workers from glutaraldehyde alternatives in high-level disinfection. J. Hospital Infection, Vol. 59, n° 1, pp. 4-11

Rier ST et Stevenson RJ, 2006 Response of periphytic algae to gradients in nitrogen and phosphorus in streamside mesocosms. Hydrobiologia, Vol. 561, pp. 131-147

Rihn BH, Hdou T et Le Faou A, 2001 Virus, produits antiseptiques et désinfectants La norme et ses limites. Dossier médico-technique (DMT), Vol. 86, pp. 143-149

Ritter, 1990 Acute Toxicity of Piror 850 to Scenedesmus subspicatus. RCC Umweltchemie. Project No 245340:

Rivière JL, 1998 Évaluation du risque écologique des sols pollués. Tec & Doc Lavoisier. Paris. 228p.

Robert E, 2006 Étude des résultats disponibles sur les effluents des Hospices Civils de Lyon. Mémoire de Licence professionnelle - Protection de l'environnement - Mention Traitement des Eaux et des Déchets - Université de Bourgogne. Lyon: 28p.

Rodier J, Bazin C, Broutin J-P, Chambon P, Champsaur H et Rodi L, 1996 L'analyse de l'eau : eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. DUNOD. 8ème ed. Paris. 1384p.

Rojícková-Padrtová R, MarIsálek B et Holoubek I, 1998 Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: Selection of an optimal test battery. Chemosphere, Vol. 37, n° 3, pp. 495-507

Ross H et Warne M, Most chemical mixtures have additive aquatic toxicity. In: Proceedings of the Third Annual Conference of the Australasian Society for Ecotoxicology. 17-19.07.1997, Brisbane, 1997 pp. 21

Rouse JD, Sabatini DA, Suflita JM et Harwell JH, 1994 Influence of surfactants on microbial degradation of organic. Crit. Rev. Environ. Sci. Technol., Vol. 24, pp. 325-70

Russell AD et Hugo WB, 2004 Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. 4 ed. Ayliffe GA. Oxford: Blackwell Science. 688p.

Sabban C et Courtois J, 2007 Comparaisons européennes sur huit classes de médicaments. Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés. Point de repère, Vol. 12, pp. 1-8

SADA, Ecological Risk Appendix B: ecological benchmarks, SADA (Spatial Analysis and Decision Assistance). Available on: http://www.tiem.utk.edu/~sada/eco_appendix_b.pdf

Sano LL, Moll RA, Krueger AM et Landrum PF, 2003 Assessing the Potential Efficacy of Glutaraldehyde for Biocide Treatment of Un-ballasted Transoceanic Vessels. J. Great Lakes Res., Vol. 29, n° 4, pp. 545-557

Sano LL, Mapili MA, Krueger A, Garcia E, Gossiaux D, Phillips K et Landrum PF, 2004 Comparative efficacy of potential chemical disinfectants for treating unballasted vessels. J. Great Lakes Res., Vol. 30, n° 1, pp. 201-216

Sano LL, Krueger AM et Landrum PF, 2005 Chronic toxicity of glutaraldehyde: Differential sensitivity of three freshwater organisms. Aquatic Toxicol., Vol. 71, n° 3, pp. 283-296

Santiago S, Becker van Slooten K, Chèvre N, Pardos M, Benninghoff C, Thybaud E et Garrivier F, 2002 Guide pour l'utilisation des tests écotoxicologiques, avec les daphnies, les bactéries luminescentes et les algues vertes, appliqués aux échantillons de l'environnement. Soluval Institut Forel, Université de Genève, École Polytechnique Fédérale de Lausanne. Suisse. 55p.

Santos JL, Aparicio I et Alonso E, 2007 Occurrence and risk assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater treatment plants. A case study: Seville city (Spain). Environment International, Vol. 33, n° 4, pp. 596-601

Schaefer M, 2004 Assessing 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)-contaminated soil using three different earthworm test methods. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 57, n° 1, pp. 74-80

Schmitt-Jansen M et Altenburger R, 2005 Predicting and observing responses of algal communities to photosystem II-herbicide exposure using pollution-induced community tolerance and species-sensitivity distributions. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 24, n° 2, pp. 304-312

Scholz O et Boon PI, 1993 Biofilm development and extracellular enzyme activities on wood in billabongs of south-eastern Australia. Freshwater Biol., Vol. 30, n° 3, pp. 359-368

Scholze M, Silva E, Gomes R et Kortenkamp A, Ten years of mixing cocktails:combination effects of endocrine disrupters. In: 17ème SETAC Europe Annual Meeting 2007, SETAC. mai 2007, Porto, 2007 pp. 22

Schwartz T, Kohnen W, Jansen B et Obst U, 2003 Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiology Ecology, Vol. 43, n° 3, pp. 325-335

Seed J, Brown RP, Olin SS et Foran JA, 1995 Chemical mixtures: Current risk assessment methodologies and future directions. Regulatory Toxicol. Pharmacol., Vol. 22, n° 1, pp. 76-94

SFHH, 1993 Bilan et recommandations sur les conditions de rejets des effluents liquides des établissements de santé - Rapport aux Ministères de la santé et de l'environnement. Société Française d'Hygiène Hospitalière. Paris: 32p.

Sheldon SP et Taylor MK, 1982 Community photosynthesis and respiration in experimental streams. Hydrobiologia, Vol. 87, pp. 3-10

Simon D, Helliwell S et Robards K, 1998 Pesticide toxicity endpoints in aquatic ecosytems. J. Aquatic Ecosyst. Stress Recov., Vol. 6, pp. 159-177

Sirisattha S, Momose Y, Kitagawa E et Iwahashi H, 2004 Toxicity of anionic detergents determined by Saccharomyces cerevisiae microarray analysis. Water Res., Vol. 38, n° 1, pp. 61-70

SOCOTEC ENVIRONNEMENT, 1994 Étude diagnostic des flux de pollution rejetés par les hôpitaux : Édouard Herriot de Lyon, Nord de Grenoble, de Chambéry - Compte rendu des visites préliminaires des 19 et 20 mai 1994. Société française d'hygiène hospitalière de l'hôpital de la Croix-rousse. 1885. Lyon: 42p.

Solomon KR, Baker DB, Richards RP, Dixon KR, Klaine SJ, La Point TW, Kendall RJ, Weisskopf CP, Giddings JM, Giesy JP, Hall Jr. LW et Williams WM, 1996 Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. Vol. 15, n° 1, pp. 31-76

Sourisseau S, Caractéristiques des modèles d'écosystèmes aquatiques et conséquences pour l'évaluation des risques écotoxicologiques. In: 3ème Séminaire d'Ecotoxicologie de l'INRA. 17 -19.09.2006, Dinard, 2006 pp. 14

Sprague JB, 1970 Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. Water Res., Vol. 4, n° 1, pp. 3-32

Sprehe M, Geißen S-U et Vogelpohl A, 2001 Photochemical oxidation of iodized X-ray contrast media (XRC) in hospital wastewater. Wat. Sci. Technol., Vol. 44, n° 5, pp. 317-323

SSM-INRA 2004 Évaluation du risque environnemental des produits phytopharmaceutiques. Commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole et des produits assimilés des matières fertilisantes et des supports de culture. Versailles (France): 145p.

Stan HJ et Heberer T, 1997 Pharmaceuticals in the aquatic environment. Analusis, Vol. 25, n° 7,

Steger-Hartmann T, Kummerer K et Schecker J, 1996 Trace analysis of the antineoplastics ifosfamide and cyclophosphamide in sewage water by two step solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromato. A., Vol. 726, n° 1-2, pp. 179-184

Steger-Hartmann T, Kummerer K et Hartmann A, 1997 Biological degradation of cyclophosphamide and its occurrence in sewage water. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 36, n° 2, pp. 174-179

Steger-Hartmann T, Lange R et Schweinfurth H, 1999 Environmental Risk Assessment for the Widely Used Iodinated X-Ray Contrast Agent Iopromide (Ultravist). Ecotox. Environ. Safe., Vol. 42, n° 3, pp. 274-281

Stevenson RJ, Bothwell ML et Lower RL, 1996 Algal ecology: freshwater benthic ecosystems. Academic Press. 753p.

Suter GW, 1993 Environmental Risk Assessment. Chelsea: Lewis Publishers. 538p.

Suter II GW, 2006 Ecological risk assessment. 2nd ed. CRC Press. Boca Raton. 643p.

Swisher SC, 1991 Surfactant biodegradation. 2nd ed. Decker M. New York: Marcel Decker.

Szabo C, 1984 Toxicité aiguë et interactions de certains pesticides (lindane - pentachlorophénol) utilisé dans le traitement du bois. Étude sur *Brachydanio rerio*. Mémoire de DEA en Écologie Fondamentale et appliquée des Eaux Continentales. Lyon: Université Claude Bernard Lyon I / École nationale vétérinaire de Lyon, 53p.

Taub FB, 1989 Standardized Aquatic Microcosm. Development and Testing. In: Boudou A., Rybeyre F., Aquatic Ecotoxicology: Fundamentals, Concepts and Methodologies. Boca Raton, Florida: CRC Press, Vol. 2. pp. 47-91

Taub FB, 1997 Unique information contributed by multispecies systems : examples from the Standardized Aquatic Microcosm. Ecol. Appl., Vol. 7, pp. 1103-1110

Ternes TA, 1998 Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Water Res., Vol. 32, n° 11, pp. 3245-3260

Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S et Olivier J-M, 1997 ADE-4: a multivariate analysis and graphical display software. Statistics and Computing, Vol. 7, pp. 75-83

Thioulouse J, Chessel D, Dolédec S et Olivier J-M, ADE 4 (Analyses de Données Ecologiques : méthodes Exploratoires et Euclidiennes en sciences de l'Environnement). Copyright CNRS 1995-2000, 2001. http://pbil.univ-lyon1.fr/ADE-4/ADE-4F.html

Thomas KV, Langford K, Grung M, Schlabach M et Dye C, 2007 Occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluents from hospitals (Ullevål and Rikshospitalet) and VEAS wastewater treatment works. The Norwegian Pollution Control Authority - Norsk institutt for vannforskning - Norsk institutt for luftforskning. TA-2246/2007. Oslo: 36p.

Thorpe KL, Gross-Sorokin M, Johnson I, Brighty G et Tyler CR, 2006 An Assessment of the Model of Concentration Addition for Predicting the Estrogenic Activity of Chemical Mixtures in Wastewater Treatment works Effluents. Environ. Health Persp., Vol. 114, n° 1,

Thoumelin G, 1995 Les tensio-actifs (LAS, APE) dans les eaux douces et marines: Analyse, comportement et écotoxicologie. IFREMER, Repères océan n°9. Plouzané: 113p.

Trépanier JP, Terrasys. Varennes (Quebec): SANEXEN, 2005. www.sanexen.com/fr/terrasys/index.htm

Triffault-Bouchet G, 2004 Effets sur les écosystèmes aquatiques lentiques des émissions de polluants provenant de différents modes de valorisation/élimination de déchets - application à des mâchefers d'UIOM et à des boues de dragage de canaux. Thèse - Spécialité : Biologie et Biochimie Appliquées au LSE de l'ENTPE. Chambéry, Vaux en Velin: Université de Savoie, 309p.

Tusseau-Vuillemin MH, Buzier R et Keirsbulck M, 2005 Rejets ponctuels de métaux et spéciation dans le bassin de la Seine. Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement (PIREN) de la Seine, Axe thématique 3 : Mécanismes des émissions et transfert de micropolluants. Rapport annuel: 12p.

UCES, 1977 The Acute Toxicity of 25% Aqueous Glutaraldehyde to the Water Flea, *Daphnia magna* Straus. Union Carbide Environmental Services (UCES). Project No 11506-61-03:

US EPA, 1989a Preliminary data summary for the hospitals point source category. Washington: United States Environmental Protection Agency, Office of water regulation and standards office of water. 76p.

US EPA, 1989b Drinking water criteria document for chlorine, hypochlorous acid and hypochlorite ion. United States Environmental Protection Agency - Envionnemental Criteria and Assessment Office. EPA 749-F-94-010a. Cincinnati (OH):

US EPA, 1994a Cleaner technologies substitutes assessment : screen reclamation (Draft). United States Environmental Protection Agency: 680p.

US EPA, 1994b Chemical summary for chlorine. United States Environmental Protection Agency - Office of Pollution prevention and toxics. EPA 749-F-94-010a. Cincinnati (OH):

US EPA, 1998 Guidelines for Ecological Risk Assessment. United States Environmental Protection Agency. Washington: 188p.

US EPA, 1999 Screening Level Ecological Risk Assessment Protocol for Hazardous Waste Combustion Facilities, Volume 3, Appendix E : Toxicity Reference Values. United States Environmental Protection Agency region 6: 96p.

US EPA, ECOTOXicology Database System - version 4.0. Available on: http://cfpub.epa.gov/ecotox/ (11/09/2006)

Van Beelen P et Fleuren-Kemilä AK, 1999 A comparison between toxicity tests using single species aand microbial process. Chemosphere, Vol. 38, n° 14, pp. 3277-3290

Van Beelen P, Fleuren-Kemilä AK et Aldenberg T, 2001 The relation between extrapolated risk, expressed as potentially affected fraction, and community effects, expressed as pollution-induced community tolerance. Environ. Toxicol. Chem., Vol. 20, n° 5, pp. 1133-1140

Van den Brink PJ, Hartgers EM, Gylstra R, Bransen F et Brock TCM, 2002 Effects of a mixture of two insecticides in freshwater microcosms : II. Responses of plankton and ecological risk assessment,. Ecotoxicology, Vol. 11, n° 181-197,

Vasseur P, 2000 Modèles d'effets. In: Modélisation en écotoxicologie. MATE. Paris. pp. 95-98

Vesseron P, 2000 Gestion et traitement des sites pollués - annexe 9 : les tests d'écotoxicité. In: Gestion des sites pollués. BRGM. Paris. pp. 3 -10

Vighi M, Finizio A, Altenburger R, Walter H, Arrhenius A, Blanck H, Grönvall F, Backhaus T, Bödeker W, Faust M, Froehner K, Grimme LH, Hamer V, Scholze M, Consolaro F et Gramatica P, 2003 Water quality objectives for mixtures of toxic chemicals: Problems and perspectives. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 54, n° 2, pp. 139-150

Vigorox, 2000 Proposed regulatory Decision Document. Pest Management Regulatory Agency - Agence de réglementation de la lutte parasitaire. Ottawa: 23p.

Vilkas, 1978a The Acute Toxicity of 50% Glutaraldehyde to the Water Flea, *Daphnia magna* Straus. Union Carbide Environmental Services. Project No 11506-61-04:

Vilkas, 1978b The Acute Toxicity of 50% Glutaraldehyde to Bluegill Sunfish, *Lepomis macrochirus* Rafinesque. Union Carbide Environmental Services. Project No 11506-61-06:

Villegas-Navarro A, Santiago MR, Perez FR, Torres RR, Abularach TD et Reyes JL, 1997 Determination of LC50 from *Daphnia magna* in treated industrial waste waters and non-treated hospital effluents. Environ. Int., Vol. 23, n° 4, pp. 535-540

Vindimian E, Robaut C et Fillion G, 1983 A method for co-operative and non co-operative binding studies using non-linear regression analysis on a microcomputer. J. App. Biochem., Vol. 5, pp. 261-268

Vindimian E, Problématique des substances à risque. In: Conférence Eau et Santé. Eaux pluviales et assainissement : nouvelles préoccupations sanitaires, GRAIE, Grand-Lyon et ASTEE. 10.10.2006, Lyon-Villeurbanne, 2006 pp. 55-73

Vis C, Hudon C, Cattanéo A et Pinel-Allol B, 1998 Periphyton as an indicator of water quality in the St Lawrence River (Québec, Canada). Environmental Pollution, Vol. 101, pp. 13-24

Volatier L, 2004 Réponse d'une communauté périphytique à un effluent complexe : études en bio-essais et canaux artificiels. Thèse - Spécialité Sciences et Techniques du Déchet au LSE de l'ENTPE. Vaux en Velin: INSA de Lyon, 303p.

Waggott A, 1981 Trace organic substances in the River Lee (Great Britain). In: Chemistry in Water Reuse. Cooper WJ. Ann Arbor Sci., Ann Arbor, MI, Vol. 2. pp. 55-99

Walter H, Consolaro F et Gramatica P, 2002 Mixture toxicity of priority pollutants at No Observed Effect Concentration (NOECs). Ecotoxicology, Vol. 11, n° 5, pp. 299-310

Wang W, 1990 Literature review on duckweed toxicity testing. Environ. Res., Vol. 52, n° 1, pp. 7-22

Warne MSJ et Hawker DW, 1995 The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate: The funnel hypothesis. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 31, n° 1, pp. 23-28

Warne MSJ et Schifko AD, 1999 Toxicity of laundry detergent components to a freshwater cladoceran and their contribution to detergent toxicity. Ecotox. Environ. Safe., Vol. 44, n° 2, pp. 196-206

Warne MSJ, A review of the ecotoxicity of mixtures, approaches to, and recommendation for, their management. In: Fifth national workshop on the assessment of site contamination, Langley A, Gilbey M et Kennedy B, Adelaide. EPHC - NEPC - en Health, 2003 pp. 253-276

Watts CD, Crathorne B, Fielding M et Steel CP, Identification of non-volatile organics in water using field desorption mass spectrometry and high performance liquid chromatography. In: 3rd European Symposium on Organic Micropollutants in water, Angeletti G et Bjørseth A. September 19-21, Oslo (Norway). DD Reidel Publishing Co., Dordrecht., 1983 pp. 120-131

Weltens R, Goossens R et Van Puymbroeck S, 2000 Ecotoxicity of contaminated suspended solids for filter feeders (*Daphnia magna*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., Vol. 39, n° 3, pp. 315-323

Wetzel RG, Attached algal-substrata interactions : fact or myth, and when and how ? In: Proceedings of the first international workshop on periphyton of freshwater ecosystems, Wetzel RG. 14-17 September 1982, Växjö, Suède. Dr W. Junk Publishers, 1983 pp. 207-215

Wiegel S, Aulinger A, Brockmeyer R, Harms H, Löffler J, Reincke H, Schmidt R, Stachel B, Von Tümpling W et Wanke A, 2004 Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries. Chemosphere, Vol. 57, n° 2, pp. 107-126

Wimpenny J, 1996 Ecological determinants of biofilm formation. Biofouling, Vol. 10, n° 1-3, pp. 43-63

Wimpenny J, 2000 An overview of biofilms as functional comunities. In: Allison D., Gilbert P., Lappin-Scott, H., La Point T.W., Community structure and co-operation in biofilms. Cambridge University Press. Cambridge. pp. 1-24

Woodiwiss FS et Fretwell G, 1974 The toxicities of sewage effluents, industrial discharges and some chemical substances to brown trout (Salmo trutta) in the Trent River Authority area. Water Pol. Control., Vol. 73, n° 4, pp. 396-405

Xu FL, Jorgensen SE et Tao S, 1999 Ecological indicators for assessing freshwater ecosystem health. Ecological Model., Vol. 116, pp. 77-106

Yang R, 1994 Toxicology of chemical mixtures - Case studies, Mechanisms, and novel Approaches. Academic Press. San Diego. 720p.

Ying GG, 2006 Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. Environ. Int., Vol. 32, n° 3, pp. 417-431

Zounkovà R, Hilscherovà K, Blàha L et Houloubek I, Evaluation of ecotoxicity and genotoxixity of special (hospital) wastewaters (Poster). In: SETAC Europe. 7-11.05.06, Den Haag, 2006

Annexes

Annexe 1. 268
Principales bases de données internationales sur la toxicité des substances

Annexe 2. 269
Notes relatives à l'utilisation des facteurs d'extrapolation du TGD

Annexe 3. 270
Détergents et désinfectants utilisés dans l'hôpital étudié et chiffres de consommation 2006

Annexe 4. 274
Services de l'hôpital d'étude reliés aux ovoïdes du prélèvement

Annexe 5. 275
Le "double effet" des mélanges NaOCl-SDS

Annexe 6. 281
CE20 des bioessais réalisés sur les échantillons d'effluent hospitalier prélevés

Annexe 7. 282
Courbes concentrations-effets des bioessais mono-spécifiques réalisés sur les effluents hospitaliers prélevés

Annexe 8. 286
Écotoxicité des polluants contenus dans l'échantillon moyen (vis-à-vis de *D. magna*)

Annexe 1. Principales bases de données internationales sur la toxicité des substances

D'après l'ADEME [2005]

Contenu dominant	Nom de la base de données	Informations complémentaires	Adresses Internet
E	AGRITOX	Pesticides	www.inra.fr/agritox
T	ATSDR toxicological profiles		www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html
P	CERIJ	Centre d'évaluation des risques japonais	www.cerij.or.jp
P	Chemindex		ccinfoweb.ccohs.ca/chemindex/search.html
P, T, E	Chemfact		www.epa.gov/chemfact
P	Chemfinder		www.chemfinder.com/
PBD	CHEMWEB		www.chemweb.com/
P, T, E	ECB	Évaluations des risques sur les substances existantes / Classification environnementale	ecb.jrc.it/
PBD	Environmental Fate Database		
P	DATALOG	Devenir dans l'environnement	
P, E	BIOLOG	Toxicité microbienne et biodégradation	http://esc.syrres.com/efdb.htm
P	CHEMFATE	Devenir dans l'environnement	
P	BIODEG	Biodégradation	
PBD	ECOTOX	Ecotoxicology database (US EPA)	www.epa.gov/ecotox
	AQUIRE	Effets sur les organismes aquatiques	
	PHYTOTOX	Effets sur les plantes terrestres	
	TERRETOX	Effets sur les animaux	
P, T, E	EXTOXNET	Pesticides	http://ace.orst.edu/info/extoxnet/
T	IARC monographs	Cancérogénicité	http://monographs.iarc.fr/
T	INRS		www.inrs.fr/
P, T, E	IPCS INCHEM	Programme de l'OMS	www.inchem.org/
P, T, E	IUCLID		http://ecb.jrc.it/
T	MEDLINE		www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi
P, E	NSDB	Nordic Substance DataBase	www.norden.org/miljoe/sk/nsdp.asp
P, T, E	NICNAS	Evaluation et notification des substances chimiques industrielles (Australie)	www.nicnas.gov.au
T	NIOSH	Valeurs limites d'exposition au travail	www.cdc.gov/niosh/npg/pgdstart.htm
P, T, E	OCDE	Integrated HPV Database (recueil des SIDS)	http://cs3-hq.oecd.org/scripts/hpv/
P, T, E	OSPAR	Substances potentiellement préoccupantes	www.ospar.org/fr/html/welcome.html
P, T, E	Portail Substances Chimiques	PBD toxicologiques et environnementales sur les substances chimiques	http://chimie.ineris.fr
P	PPD	Phytosanitaires (site américain)	www.arsusda.gov/ppdb.html
PBD	TOXNET		www.toxnet.nlm.nih.gov/
P, T, E	HSDB	Hazardous Substances DataBank	
T	IRIS	Integrated Risk Information System	
T	CCRIS	Chemical Carcinogenesis Research Information System	
T	GENE-TOX	Mutagénicité	
T	TOXLINE		
P, T, E	TSCATS	Toxic Substance Control Act Test Submission	http://esc.syrres.com/efdb/TSCATS.htm

Avec : E : Écotoxicologie ; T : Toxicologie ; P : Identification des substances, propriétés physico-chimiques ; PBD : Portail vers Bases de Données

Annexe 2. Notes relatives à l'utilisation des facteurs d'extrapolation du TGD

D'après l'INERIS [1999]

données écotoxicologiques disponibles	facteurs d'extrapolation
au moins une C(E)L50 d'un essai court terme pour chacun des trois niveaux trophiques (poissons, invertébrés et algues)	1000[a]
une NOEC d'un essai long terme (poisson ou invertébrés)	100[b]
deux NOEC d'essais long terme avec deux espèces représentatives de deux niveaux trophiques (poissons et/ou invertébrés et/ou algues)	50[c]
trois NOEC d'essais long terme pour au moins trois espèces représentant trois niveaux trophiques (poissons, invertébrés, algues)	10[d]
données de terrain ou écosystème modèle	évalué au cas par cas[e]

[a] L'utilisation d'un facteur d'extrapolation de 1000 permet de protéger l'écosystème de l'ensemble des variations et incertitudes en considérant qu'elles contribuent toutes de façon significative à l'incertitude totale. Pour certaines substances, il est possible qu'une des composantes de l'incertitude soit plus importante ou négligeable par rapport aux autres. Dans ce cas, on peut faire varier le facteur en fonction de ces données.

[b] Un facteur de 100 s'applique à la NOEC générée par un essai long terme. Il faut que la NOEC corresponde au niveau trophique ayant la CL50 la plus basse dans les essais court terme. Dans le cas contraire, on ne peut considérer la NOEC comme protectrice d'autres espèces plus sensibles. On utilise alors la CL50 la plus faible avec un facteur d'incertitude de 1000 pour déterminer la PNEC aquatique, sauf si cette PNEC est plus élevée que la PNEC calculée d'après la NOEC.

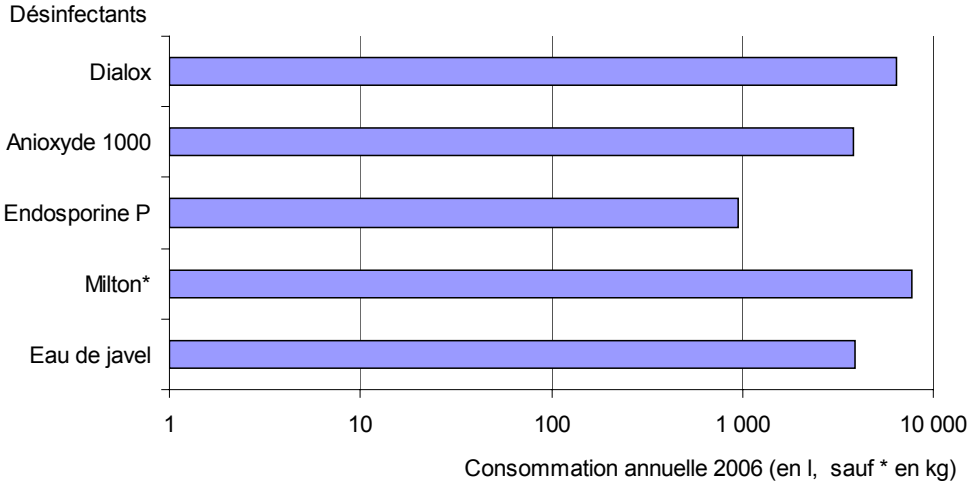
[c] Un facteur de 50 s'applique à la plus basse des deux NOEC si celle-ci couvre le niveau trophique possédant la plus basse CL50 dans les essais court terme. Dans le cas contraire, c'est-à-dire si la NOEC ne correspond pas à l'espèce la plus sensible, la PNEC est calculée à partir de la NOEC la plus faible, en utilisant un facteur d'incertitude de 100 et non de 50.

[d] Un facteur de 10 s'applique lorsque des NOEC issues d'essais à long terme sont disponibles pour au moins trois niveaux trophiques différents. La NOEC la plus basse sert à dériver la PNEC aquatique. Cependant, le facteur 10 n'est appliqué que si la NOEC la plus faible correspond à une espèce pouvant être considérée comme représentative du maillon le plus sensible de l'écosystème. Dans le cas où la plus basse NOEC n'a pas été générée avec l'espèce la plus sensible en essai court terme, un facteur de 50 au lieu de 10 lui est appliqué pour déterminer la PNEC.

[e] À la suite d'études en mésocosmes ou de terrain, un facteur d'incertitude peut être déterminé au cas par cas en fonction de la pertinence des données recueillies.

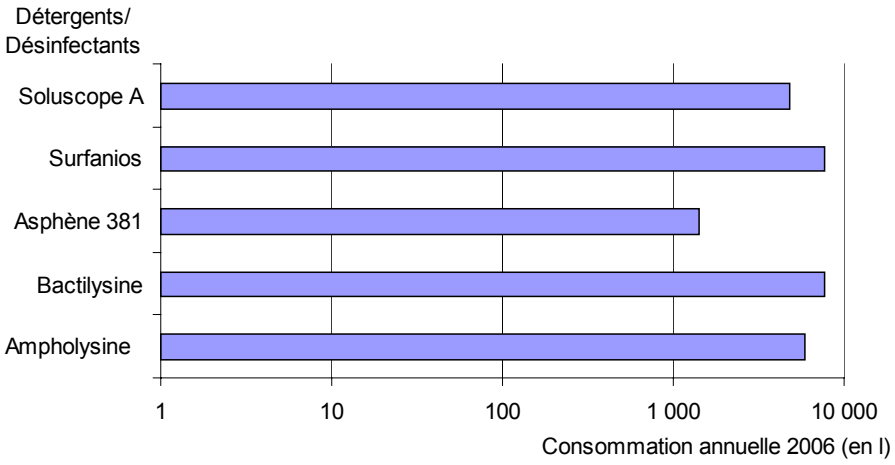
Annexe 3. Détergents et désinfectants utilisés dans l'hôpital étudié et chiffres de consommation 2006

1. Désinfectants



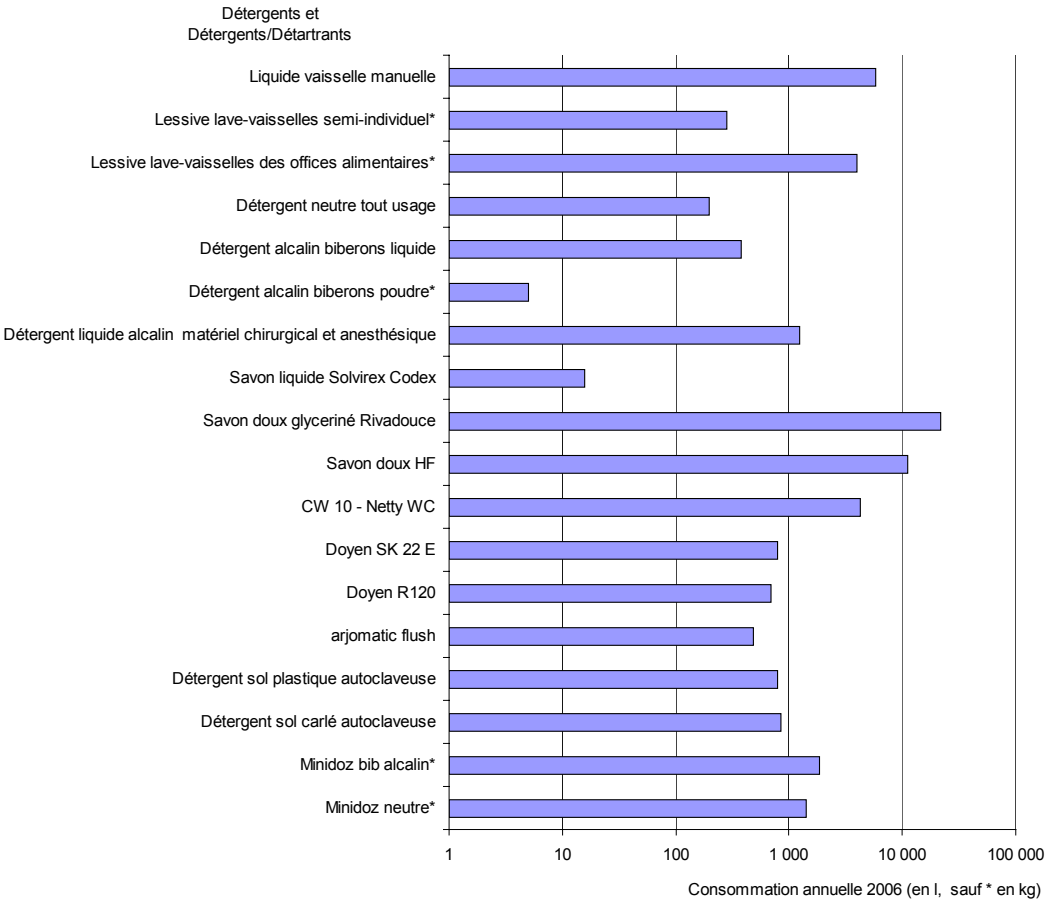
désinfectants	fournisseur	composition	domaine d'utilisation	protocole d'utilisation
Eau de javel	-	hypochlorite de sodium	blanchiment des surfaces, sanitaires, diminuer la charge microbienne et virale	pour détacher et blanchir (vaisselle, bassins, urinaux, mobilier) solution à 0,24% ; pour détacher et blanchir (cuvette des WC) un verre à 2,4% ; pour diminuer la charge virale et microbienne solution à 0,8% ; pour limiter la prolifération bactérienne une cuillère à soupe à 2,4%
Milton*	Rivascope	800 mg de dichloro S tria-zinetrione sodique ; bicarbonate et carbonate de sodium ; acide succinique ; (l'acide hypochloreux est le stérilisant)	comprimé effervescent pour stérilisation à froid des biberons	Pour 6 biberons : remplir le bac avec 5 litres d'eau du robinet et ajouter 1 comprimé. La stérilisation est obtenue en 30 minutes. Le bain restant efficace pendant 24 heures
Endosporine P	Steridrine	glutaraldéhyde 2% ; pentamédiol ; tensioactif non-ionique ; inhibiteur de corrosion	désinfection des dispositifs médicaux thermo-sensibles	laisser tremper de 10min à 1h dans le bac de désinfection (suivant le niveau de désinfection désiré)
Anioxyde 1000	Anios	activateur : isopropanol, dérivées glycoliques, catalyseurs d'agents oxydants, tensioactif nonionique, colorant ; acétyl-caprolactame (<60%) ; générateur : inhibiteur de corrosion, agents stabilisants ; peroxyde d'hydrogène (<5%)	désinfection des dispositifs médicaux thermo-sensibles	transvaser 50ml d'activateur dans le bidon de générateur puis verser la préparation dans le bac de désinfection et attendre 30 min ; vérifier le taux d'acide peracétique avec une bandelette ; immerger le matériel à désinfecter de 10 à 30 min suivant le niveau de désinfection désiré
Dialox	Air liquide santé	peroxyde d'hydrogène ; acide acétique et peracétique	désinfection des appareils de dialyse	produit prêt à l'emploi

2. Détergents/Désinfectants



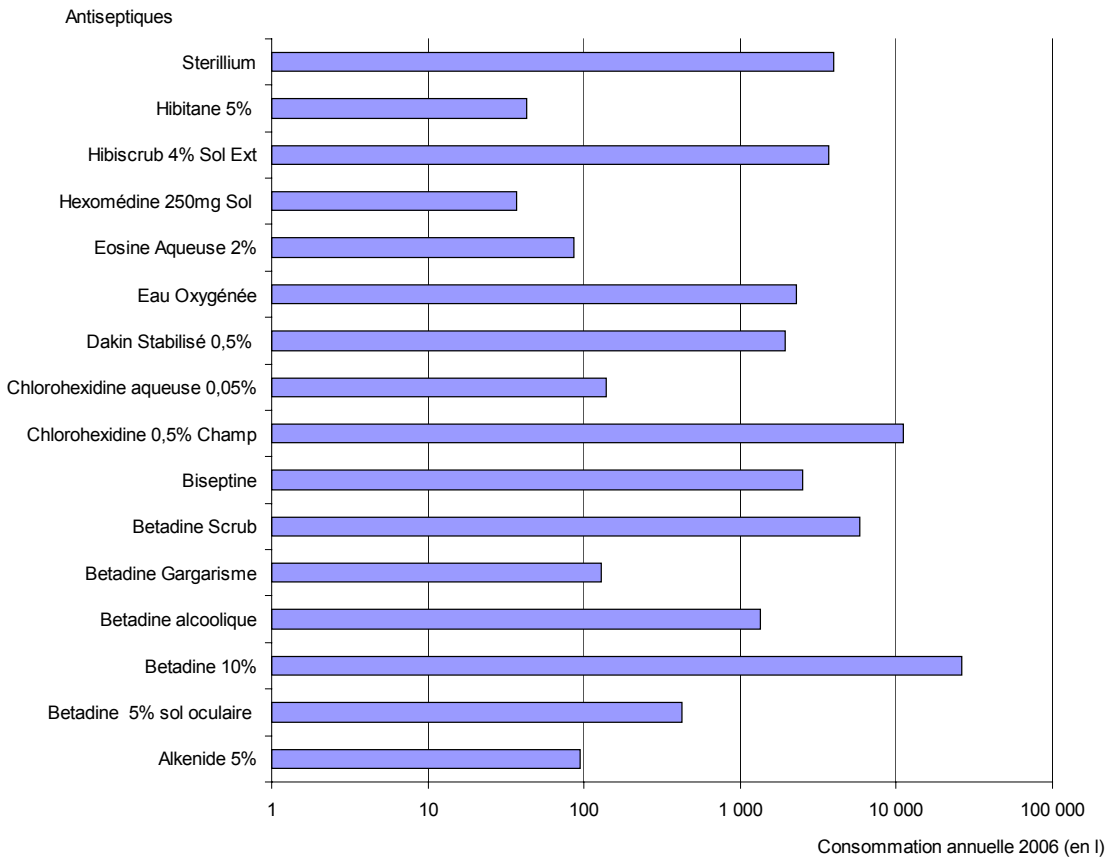
détergent / désinfectants	fournisseur	composition	domaine d'utilisation	protocole d'utilisation / remarques
Ampholysine	Steridrine	tensioactif nonionique ; inhibiteur de corrosion ; biguanide ; ammonium quaternaire	pré-désinfection des dispositifs médicaux	-
Bactilysine	Steridrine	chlorure de N,N, didecyl-N,N-diméthylammonium (2,5 à 10%) ; N-(3-aminopropyl)-N-dodécyl-propane-1,3-Diamine (0 à 2,5%) ; propane-2-ol (2,5 à 10%) ; acide ethylenediaminetetra-cetique, sel trisodique (0 à 2,5%) et ethoxylat d'isotridecanol (2,5 à 10%)	nettoyage et désinfection des surfaces (et dispositifs médicaux) et des sols	0,25 % densité<1 base forte
Asphène 381	Rivadis	ammonium quaternaire et alkylamine (9%) ; tensioactif (< 5%) ; agents séquestrant ; tampon (<15%) ; parfum pin	nettoyage et désinfection des surfaces de l'office alimentaire	0,25% pH à 20°C = 9
Surfanios	Anios	chlorure de N,N, didecyl-N,N-diméthylammonium (2,5 à 10%) ; ethoxylat d'isotridecanol (3 à 10%) ; propane-2-ol (0 à 2,5%) ; N-3-aminopropyl-N-dodé-cylpropane-1,3-Diamine (2,5 à 10%) ; acide ethyle-nediaminetetracetique, sel trisodique (2,5 à 10%)	nettoyage et désinfection des surfaces (et dispositifs médicaux) et des sols	densité environ 1,03 base forte
Soluscope A	Anios	propane-2-ol (25 à 50%) ; 1,2,3-benzotriazole (2,5 à 10%) ; N-alkylcoprahdi (pentadecahydro-xyethyl) methylammonium methosulfate (0 à 2,5%)	désinfection des endoscopes	-

3. Détergents et Détergents/Détartrants



détergent et détergent/ détartrant	fournisseur	composition	domaine d'utilisation	remarques
Minidoz neutre*	TopSol voussert	tensioactif nonionique (5 à 10%) ; laurylsulfate de sodium (1 à 5%)	détergent sols	pH 14g/8L = 7,5 +/-0,5 d : 0,65
Minidoz bib alcalin*	TopSol voussert	carbonate de sodium (70 à 80%) ; seque-strants et alkylbenzène sulfonate de sodium (1 à 5%) ; tensioactif nonionique (15 à 20%)	détergent sols	pH 14g/8L = 10 d : 0,64
Détergent sol carrelé et sol plastique autoclaveuse		(aucune donée disponible)	détergent sols	
Arjomatic flush	Chemische Fabrik Arjo	acide nitrotriacetique (1 à 5%) ; 15-30% polycarboxilates ; agents de conservation	détartrant lave bassin	d = 1,18 g/cm3 pH (0,5 - 1,5 ml/l) = 10,3
Doyen R120	Etol-werk	Tensioactif ; détergents spéciaux	lave bassin	pH 13,0 d=1,14 g/ml
Doyen SK 22 E	Etol-werk	tensioactif non ionique ; détergents spéciaux	détartrant lave bassin	pH 3,1 ; d=1,03 g/ml
CW 10 - Netty WC	Coldis McBride	acide chlorhydrique 4,75% ; tensioactif non ionique 1% (amine oeyl ethoxyle) ; désinfectant ; colorant ; parfum	produit WC	d à 20°C = 1 g/ml pH <2,0
Savon doux HF	Anios	glycerin Cocoamidopropyl Betain ; Sodium C14-17 sec-Alkyl Sulfonate ; PEG-200 Hydrogenated Glyceryl Palmate ; PEG-7 Glyceryl Cocoate ; Phenoxyethanol ; Sodium Propylparaben	lavage mains	pH : 6,5
Savon doux glyceriné Rivadouce	Rivadis	1,2,3-Propanetriol ; Glycerine ; agent surgraissant ; tensioactif amphotère et anioique	lavage mains	pH : 6,8 - 7,3
Savon liquide Solvirex Codex	Solvirex	glycérine (0,6%)	lavage mains	
Détergent liquide alcalin matériel chirurgical et anesthésique		(aucune donée disponible)		
Détergent alcalin biberons poudre et liquide		(aucune donée disponible)		
Détergent neutre tout usage		(aucune donée disponible)		
Lessive lave-vaisselle des offices alimentaires et semi-individuel		(aucune donée disponible)		
Liquide vaisselle manuelle		(aucune donée disponible)		

4. Antiseptiques



Antiseptiques	Fournisseur	Composition
Alkenide 5%	Zambon France	principe actif : Poloxamère
Betadine 5% oculaire	Meda Pharma	povidone iodée 5g/100ml ; glycérol, nonoxinol 9, phosphate disodique anhydre, acide citrique, sodium chlorure et hydroxyde
Betadine 10%	Leda Pharma	povidone iodée 100g/l
Betadine alcoolique	Meda Pharma	povidone iodée 50g/l; éthanol 720 ml/l
Betadine Gargarisme	Meda Pharma	povidone iodée 1g/10ml
Betadine Scrub	Meda Pharma	povidone iodée 4g/100ml
Biseptine	Bayer Santé Familiale	Substances actives : alcool benzylique (40 ml/l), benzalkonium chlorure (0,25 g/l), chlorhexidine gluconate (2,5 g/l).
Chlorohexidine 0,5%	Gilbert	chlorhexidine digluconate (500mg/100ml)
Chlorohexidine 0,05%	Gilbert	chlorhexidine digluconate (50mg/100ml)
Dakin Stabilisé 0,5%	Coop. Pharma. Française	sodium hypochlorite solution concentré (500 mg Cl2 actif/100ml)
Eau Oxygénée	Coop. Pharma. Française	eau oxygénée
Eosine Aqueuse 2%	Coop. Pharma. Française	éosine disodique (2g/100ml)
Hexomédine 250mg	Theraplix	hexamidine di-isétionate
Hibiscrub 4% Sol Ext	Regent medical overseas	chlorhexidine gluconate (4g/100ml)
Hibitane 5%	Regent medical overseas	chlorhexidine gluconate (5g/100ml)
Sterillium	Rivadis	mécétronium étilsulfate (200mg/1100g) ;alcool isopropylique (45g/100g) ; alcool propylique (30g/100g)

Annexe 4. Services de l'hôpital d'étude reliés aux ovoïdes du prélèvement

Services et Unités	
Service de radiologie	Service de traitement des brûlés
Service d'ophtalmologie	Service médical d'accueil des urgences
Service d'hématologie	Service des urgences et réanimation médicale
Service de rhumatologie et des pathologies osseuses	Service psychiatrie des urgences
Service d'endocrinologie	Service Chirurgie d'urgence orthopédique
Service de spectrographie	Service urgence chirurgical et viscéral
Service de réanimation	Service chirurgie vasculaire et orthopédique
Service des greffes	Service de médecine légale
Service de dialyse	Service médical d'accueille
Service de stérilisation	Service de réanimation
Service de suite de soins	exploration fonctionnelle vasculaire et cardiaque
Médecine du sport	Service scénologie
Services de consultations	Service gynécologie
Hépatogastroentérologie	Service gynécologie obstétrique
Service de consultations digestives	Service néonatologie et réanimation néonatale
Médecine générale	Unité de préparation des chimiothérapies
Médecine interne	Unité de médecine de la transplantation et immunologie clinique
Service de Gériatrie	Unité de chirurgie viscérale
Service de substituts cutanés	Unité de nutrition artificielle
Laboratoires	
Laboratoire d'hématologie	Laboratoire d'histologie
Laboratoire de génétique moléculaire	Laboratoire de biochimie et recherche
Laboratoire de cytogénétique	Laboratoire central de microbiologie (pas entièrement relié au point de prélèvement)
Laboratoire de galénique	Laboratoire central d'anatomie et de cytologie pathologique (pas entièrement relié au point de prélèvement)
Laboratoire d'endocrinologie	Laboratoire de substituts cutanés
Laboratoire d'hygiène hospitalière	Laboratoire biologie de la reproduction
Laboratoire d'hémostase	Laboratoire INSERM unité 403
Laboratoire de l'Établissement Français du Sang	Laboratoire INSERM U281
Laboratoire biologie Sécurité Environnement	Laboratoire INSERM (contient une animalerie)
Fédérations et centres	
Fédérations des spécialités digestives	Centre d'information et de dépistage anonyme et gratuit (CIDAG)
Fédérations de biochimie et biologie spécialisée	Centre anti-poison
centre d'ostéodensitométrie	Établissement Français du Sang
Locaux médicaux	
Pharmacie	Banque de cornées
Laveurs d'endoscope (utilisation de glutaraldéhyde acide peracétique)	Blocs opératoires (dont blocs 24h/24h avec une très grosse activité)
Locaux techniques	
Urgence technique	Garage
Service incendie	Autres locaux techniques divers
Héli-station (équipée d'un bac séparateur kérosène)	
Locaux administratifs	
Direction	Administration (pas entièrement relié au point de prélèvement)
Bureau des entrées	Autres bureaux
Direction des services	
Logements	
Chambres	Internat

Annexe 5. Le "double effet" des mélanges NaOCl-SDS

Le phénomène de "double effet" décrit dans la Partie 3 (chapitre 1.2, page 130), a été observé pour un certain nombre de mélanges contenant du NaOCl. Dans la plus part des cas, le phénomène s'est révélé de faible amplitude (NaOCl60-SDS40 et NaOCl50-SDS50), ne nuisant pas au calcul de la CE50. Il s'est par contre révélé relativement important dans le cas du mélange NaOCl80-SDS20.

Nous nous sommes basés sur ce mélange pour mener des investigations expérimentales complémentaires à ce sujet. Quatre hypothèses ont été avancées pour expliquer le phénomène :

- Il s'agit d'une erreur de manipulation ;
- Le double effet provient du NaOCl seul ;
- Le SDS réagit avec le NaOCl pour former d'autres molécules plus toxiques vis-à-vis de la daphnie ;
- Les conditions du milieu et la réactivité du NaOCl interviennent dans le phénomène.

Nous avons donc investi ces quatre hypothèses.

a) Il s'agit d'une erreur de manipulation

L'essai NaOCl80-SDS20 a été mené en quatre réplicats. Ceux-ci ont été réalisés sur différentes périodes de temps et avec des lots de daphnies différents et dont la sensibilité au dichromate (substance de référence) a régulièrement été contrôlée. La Figure 62 présente les courbes doses effets de ces réplicats.

Par deux fois un double effet c'est avéré (essai #1 et #2 - Figure 62). Entre 0 et 0,9 mg/l (de mélange) les courbes concentrations-effets sont normales, le pourcentage d'effet augmente de 0% à 100%. Puis, entre 0,9 et 1,9 mg/l, le pourcentage d'effet diminue brusquement pour atteindre environ 40% d'effet et augmenter ensuite jusqu'à 100% d'effet.

Les courbes concentrations-effets des troisième et quatrième essai (essai #3 et #4 - Figure 62), ont une allure plus classique. Il faut noter que les courbes se basent sur un nombre de point limité. En conséquence, les courbes auraient pu se révéler différentes par l'ajout ou la suppression de concentrations testées.

Ces résultats laissent à penser qu'il est peu probable qu'une erreur de manipulation soit la cause du « double effet » puisque le phénomène s'est répété.

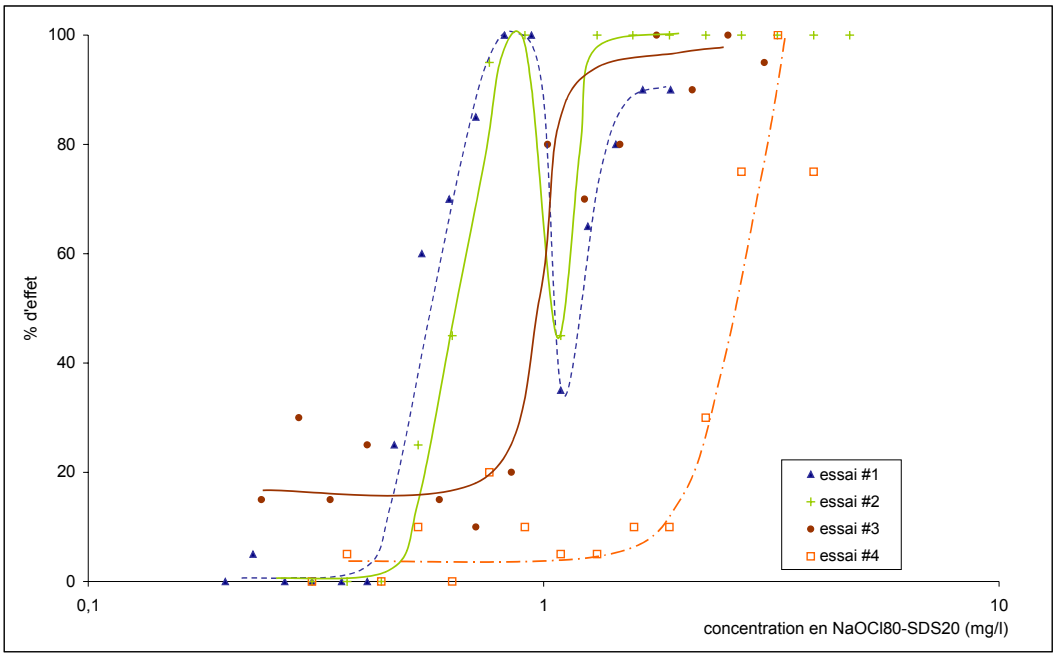


Figure 62 : Courbes dose/effet du mélange NaOCl80-SDS20 vis-à-vis de Daphnia magna en 24h

b) Le double effet provient du NaOCl seul

Trois essais ont été menés sur le NaOCl seul, dans les mêmes gammes de concentration (résultats non présentés). Aucun phénomène de double effet ne s'est avéré.

Le phénomène ne provient donc pas du NaOCl seul.

c) Le SDS réagit avec le NaOCl pour former d'autres molécules plus toxiques vis-à-vis de la daphnie

Rappelons tout d'abord quelques notions théoriques sur les propriétés du chlore en mélange (notions qui ont notamment été développées dans le cadre de l'utilisation du chlore pour la désinfection des eaux). Dans le cas d'une eau qui ne contient ni ion oxydable, ni matière oxydable, le chlore total est égal au chlore ajouté (Figure 63). Par contre, dans le cas contraire, la matière organique et certaines espèces minérales sont oxydées par une injection de chlore, lorsque l'on ajoute des doses croissantes de chlore à une eau [Brooks, 1999; Kirere, 2000; Merchat, 2005].

La Figure 63 révèle ainsi quatre différentes zones :

- Zone A : La concentration en chlore résiduel reste nulle. Le chlore introduit est consommé par les matières minérales (oxydes de fer par exemple) (A - Figure 63) ;
- Zone B : La concentration en chlore résiduel augmente proportionnellement à la dose de chlore ajoutée jusqu'à un point d'inflexion. Le chlore introduit est consommé par les matières organiques pour former du chlore combiné (monochloramines) (B - Figure 63) ;

- Zone C : La concentration en chlore résiduel diminue jusqu'à un second point d'inflexion appelé « break-point ». Le chlore introduit réagit avec les monochloramines pour former des di et trichloramines (C - Figure 63) ;
- Zone D : La concentration en chlore résiduel augmente à nouveau proportionnellement à la dose de chlore ajoutée. Le chlore ajouté possède les propriétés désinfectantes recherchées et constitue le chlore libre résiduel (acide hypochloreux, hypochlorite) (D - Figure 63).

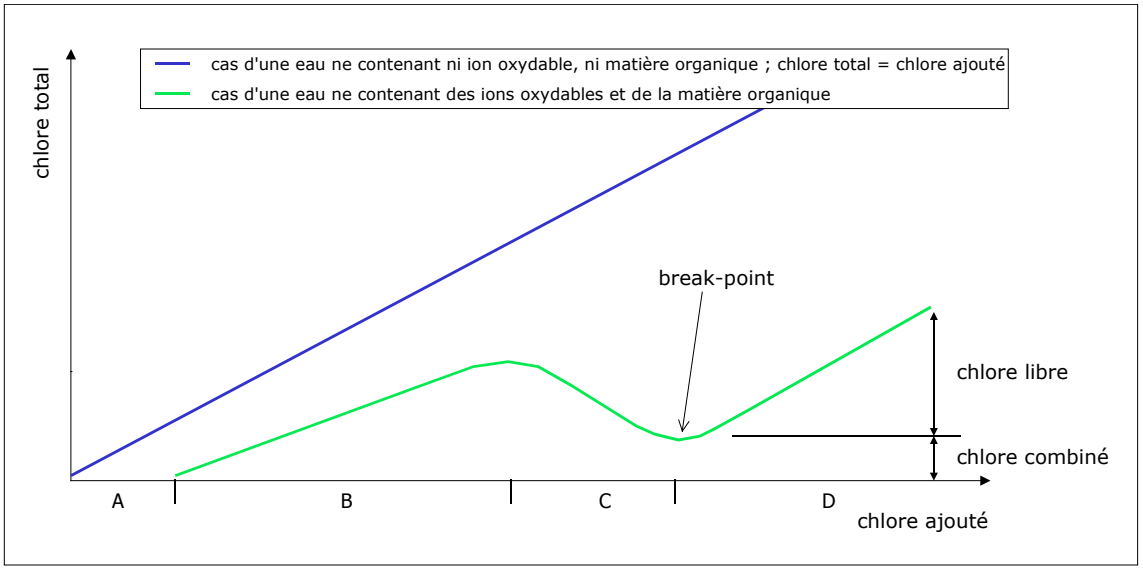


Figure 63 : Courbe théorique de breakpoint [Rodier *et al.*, 1996]
[A : oxydation des matières minérales ; B : formation des monochloramines ; C : formation des di et trichloramines à partir des monochloramines ; D : zone à pouvoir désinfectant]

Le phénomène de double effet ressemble à l'allure d'une courbe de break-point. Nous avons donc mené une première série d'essais de manière à situer le double effet du mélange NaOCl80-SDS20 par rapport à la courbe de breakpoint des mélanges NaOCl/SDS. Les mélanges ont été préparés sur la base de 10 mg/l de mélanges avec des concentrations croissantes en chlore. Le chlore total a ensuite été dosé sur ces mélanges par méthode colorimétrique à la DPD (N,N-diéthylphénylène-1,4-diamine).

La Figure 64 présente les résultats obtenus, les concentrations théoriques en chlore dans les mélanges sont confrontées aux concentrations dosées sur ces même mélanges. La ligne en pointillée correspond quant à elle, au cas d'une solution qui ne contient ni ion oxydable, ni matière organique, soit : "chlore théorique = chlore total".

L'allure de la courbe (Figure 64) s'apparente à une courbe de breakpoint. Un point d'inflexion correspondant au breakpoint apparaît sur la courbe pour une concentration en chlore théorique de 0,46 mg/l. Le breakpoint n'est toutefois pas très marqué. L'origine de la courbe se confond avec le point (0 ; 0), ce qui signifie qu'il n'y a pas de matière minérale oxydable dans les mélanges. Comme il a été évoqué ci-dessus, la courbe expérimentale se divise ainsi en trois

zones : de 0 à 0,40 mg/l de chlore théorique (Zone B), de 0,40 à 0,46 mg/l (Zone C) et de 0,46 à 1,15 mg/l (Zone D).

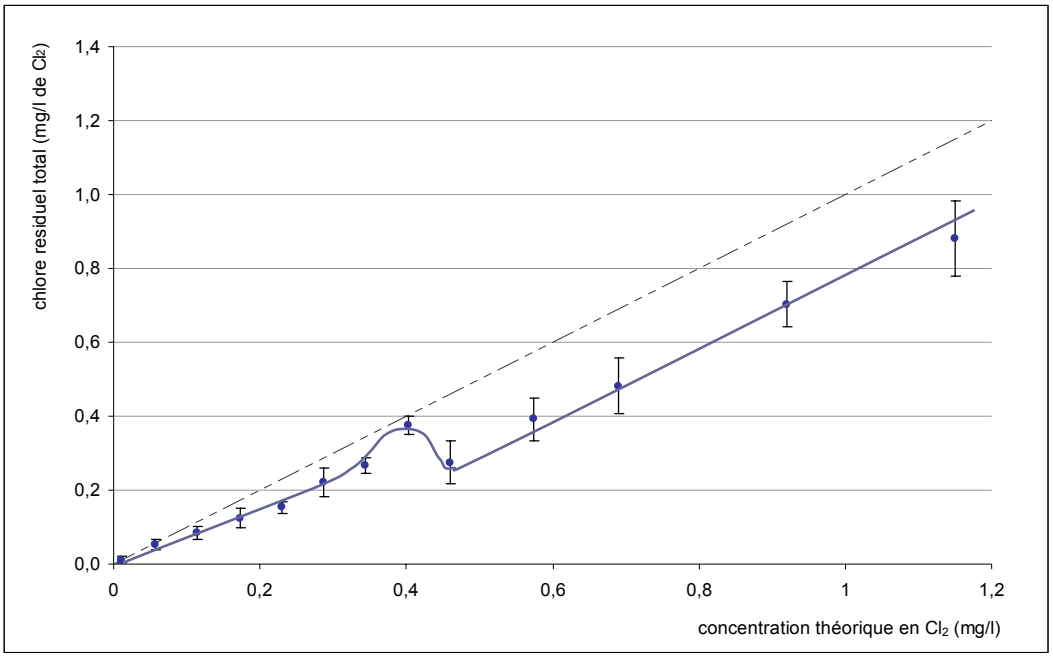


Figure 64 : Courbe expérimentale de dosage du chlore total dans les mélanges NaOCl/SDS

Le « double effet » observé lors de l'étude des effets combinés (Figure 62), se produit pour une concentration de 0,09 mg de Cl_2/l. Ce point se situe dans la zone B. Cela signifie qu'à cette concentration, le chlore oxyde la matière organique pour former d'autres molécules. S'il y avait des composées azotés, les molécules formées seraient des chloramines. Ici, il n'y a pas de composés azotés, mais du SDS. Il y aurait donc formation de sous-produits issus de la réaction chlore/SDS.

Une recherche bibliographique poussée n'a pas permis l'acquisition de données sur la cinétique et les sous-produits de dégradation du SDS. La forme moléculaire du SDS (Figure 65) permet de supposer qu'il se décompose en un acide linéaire à 12 carbones qui pourrait réagir avec le chlore pour former d'autres molécules. Cela est cohérent avec l'US EPA [1994a] qui précise que le SDS s'hydrolyse rapidement en présence d'agents oxydants forts.

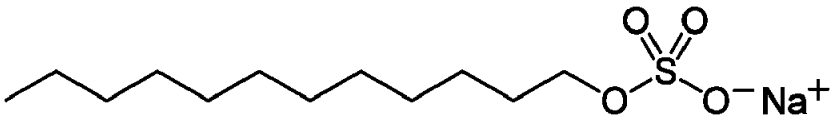


Figure 65 : Structure chimique du SDS

Les résultats permettent d'avancer l'hypothèse qu'à la concentration du « double effet », un (ou plusieurs) sous-produit(s) se forme(nt) et sont alors, à cette concentration, plus toxique pour la daphnie que le chlore. La toxicité augmente avec la dose au début, la daphnie réagit alors par

rapport à un premier sous-produit (que l'on appellera X) qui se forme en même temps que l'on augmente la dose de chlore. Puis, à partir d'une certaine dose de chlore, X serrait consommé pour former un nouveau sous-produit Y), ayant une toxicité moins importante vis-à-vis de la daphnie. On aurait alors, une diminution de la concentration en X (et donc diminution de la toxicité) combinée la formation de Y et une augmentation progressive de sa concentration (et donc une nouvelle augmentation de la toxicité).

d) Les conditions du milieu et la réactivité du NaOCl interviennent dans le phénomène.

Comme il a été évoqué, le NaOCl est très réactif. Il possède trois domaines de stabilité (en fonction des formes chimiques) qui sont délimitées sur le diagramme de Pourbaix par le potentiel redox et le pH (voir partie 1, chapitre 1, page 39).

Afin de vérifier les conditions du milieu, nous avons fait des mesures de potentiel redox et de pH des mélanges NaOCl/SDS à 10 mg/l (Figure 66) et sur la gamme du "double effet" avant et après essai (Figure 67).

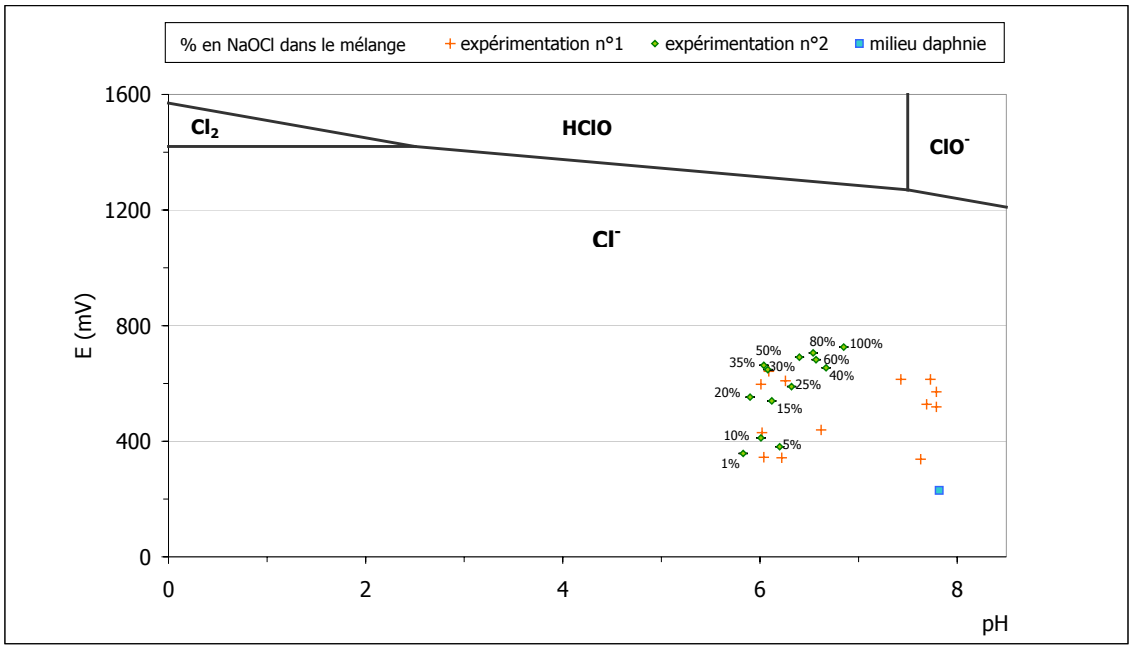


Figure 66 : Potentiel redox des mélanges NaOCl/SDS à 10 mg/l placés sur le diagramme de Pourbaix [epxérimentaion n° 1 : conditions (températures, durée) aléatoires ; manip 2 : conditions contrôlées]

Les essais sur les mélanges à 10mg/l (Figure 66) montrent : (i) que les mélanges sont dans le domaine de stabilité des chlorures ; (ii) l'influence des conditions de manipulation par rapport au potentiel et au pH. La série « epxérimentaion n°2 » a été réalisée dans des conditions contrôlées alors que pour la série « epxérimentaion n°1 », les conditions expérimentales sont aléatoires. et ; (iii) que le milieu pour essai (ou milieu daphnie) à un potentiel plus faible et un pH plus fort que les mélanges.

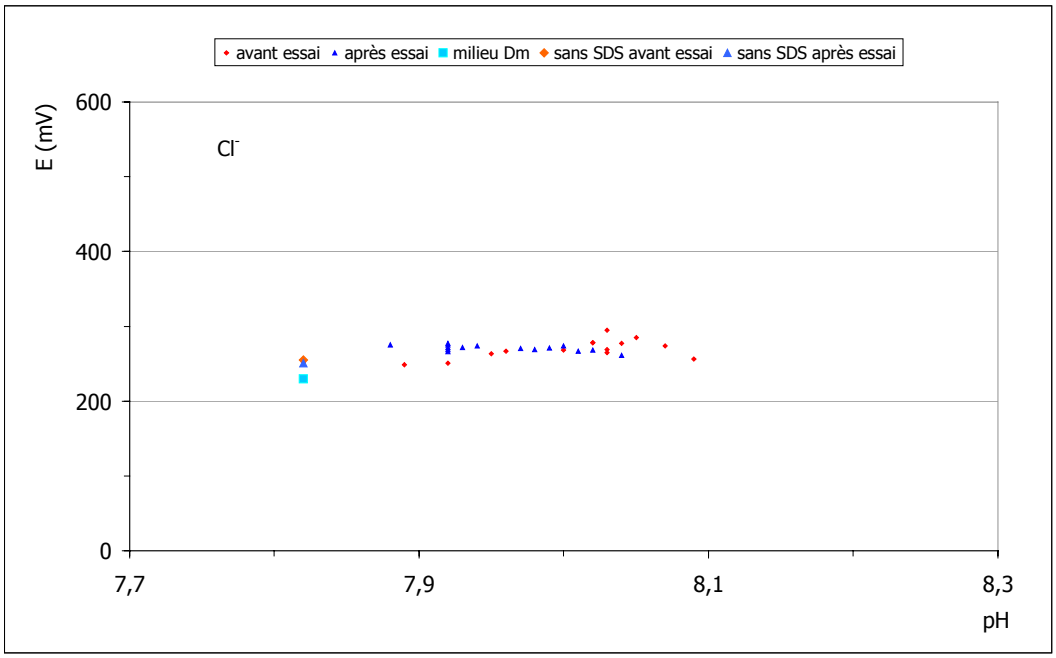


Figure 67 : Potentiel redox des mélanges NaOCl80-SDS20 sur la gamme d'essai daphnie, avant et après essai

Les expérimentations « avant et après essais », sur la gamme de concentration de l'essai NaOCl80-SDS20 (Figure 67) révèlent tout d'abord que le potentiel redox et le pH ne sont pas influencés par les daphnies et que les concentrations sont dans le domaine de stabilité des chlorures ; et ensuite que la présence de SDS augment légèrement sur le potentiel redox et le pH du milieu daphnie. Finalement le « double effet » ne se retrouve pas au niveau de ce diagramme, ni avant ni après essai.

Ces expérimentations permettent donc d'avancer que :

1. Les mélanges sont dans le domaine de stabilité des chlorures ;
2. Des conditions expérimentales contrôlées sont importantes pour manipuler le chlore ;
3. Le double effet ne se retrouve pas au niveau du diagramme de Pourbaix.

Pour conclure

Parmi les quatre hypothèses avancées pour expliquer le phénomène de « double effet », les hypothèses a : « il s'agit d'une erreur de manipulation », b : « le double effet provient du NaOCl seul » et d : « les conditions du milieu et la réactivité du NaOCl interviennent dans le phénomène » ont été réfutées. L'hypothèse c : « le SDS réagit avec le NaOCl pour former d'autres molécules plus toxiques vis-à-vis de la daphnie » a par contre été vérifié en partie puisque les expérimentations effectuées ont révélé que le SDS réagit avec NaOCl pour former d'autres molécules. Il serait intéressant dans le futur de caractériser les sous-produits de réaction et d'étudier leur écotoxicité vis-à-vis de la mobilité de la daphnie en 24h.

Annexe 6. CE20 des bioessais réalisés sur les échantillons d'effluent hospitalier prélevés

1. Batterie de bioessais simplifiée : CE20 (IC 95%) des échantillons périodiques filtrés

organisme	durée d'exposition	CE20 (IC95) des échantillons périodiques filtrés (en % volumique d'effluent)				
		13-17h	17-23h	23-5h	5-9h	9-13h
Daphnia magna	24h	16,8 (13,3-22,0)	55,8 (47,5-63,9)	NT	48,7 (39,0-59,7)	5,7 (4,7-6,9)
	48h	13,6 (10,3-16,8)	48,0 (43,5-52,7)	NT	45,0 (37,2-55,0)	4,9 (4,1-5,9)
Vibrio fischeri	15min	13,3 (9,5-18,1)	38,5 (30,0-47,4)	98,2 (86,7->100)	27,1 (19,0-33,4)	8,3 (6,9-10,1)
	30min	15,7 (12,3-19,9)	38,2 (27,7-46)	94,2 (76,2->100)	24,6 (16,0-32,7)	6,4 (3,6-11,6)
Pseudokirchneriella subcapitata	72h	22,1 (17,2-30,6)	25,2 (21,7-29,0)	67,5 (59,7-74,6)	20,9 (17,4-24,0)	3,9 (3,3-4,5)

2. Batterie de bioessais complète : CE20 (IC 95%) de l'échantillon moyen-24h filtré

organisme	durée d'exposition	CE20 (IC95) de l'échantillon moyen-24h (en % volumique d'effluent)
Daphnia magna	24h	18,5 (16,5-20,8)
	48h	14,5 (12,4-16,9)
Vibrio fischeri	15 min	12,1 (9,8-14,9)
	30 min	11,5 (8,9-14,6)
Pseudokirchneriella subcapitata	72h	5,1 (4,2-6,0)
Ceriodaphnia dubia	24h	17,5 (16,1-19,4)
	48h	17,4 (16,8-18,1)
	7j-C	24,4 (14,3-25,9)
	7j-R	3,1 (0,2-7,8)
Brachionus calyciflorus	48h	0,7 (0,02-5,4)
Lemna minor	7j-NF	NT
	7j-SV	88,7 (80,5->100)

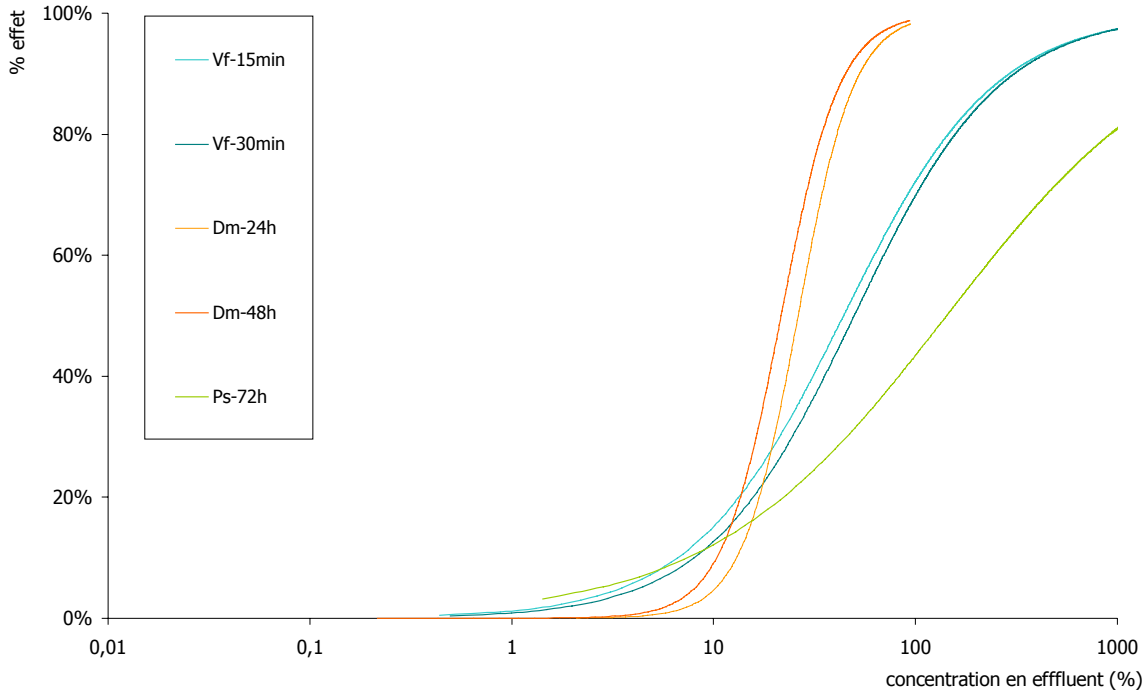
3. CE20 (IC 95%) des échantillons bruts (périodiques et moyen)

organisme	durée d'exposition	CE20 (IC95) des échantillons bruts périodiques et moyen-24h (en % volumique d'effluent)					
		13-17	17-23	23-5	5-9	9-13	moyen-24h
Daphnia magna	24h	2,0 (1,9-2,2)	NT	NT	NT	0,99 (0,95-1,03)	1,83 (1,62-2,08)
Lemna minor	7j-NF	-	-	-	-	-	83,7 (48,2-85,9)
	7j-SV	-	-	-	-	-	42,9 (24,2-46,6)

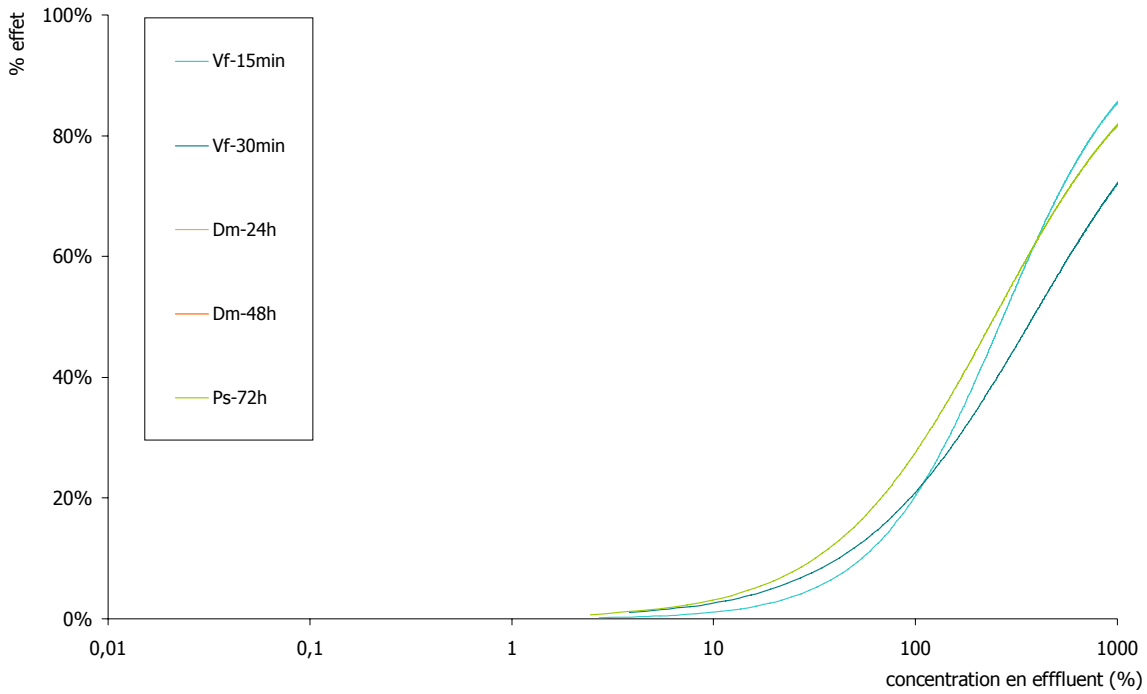
Légende des tableaux : IC95 : Intervalle de confiance à 95% ; NT : non toxique ; NF : nombre de fronde ; SV : surface verte ; NT : non toxique ; C : croissance ; R : reproduction.

Annexe 7. Courbes concentrations-effets des bioessais mono-spécifiques réalisés sur les effluents hospitaliers prélevés

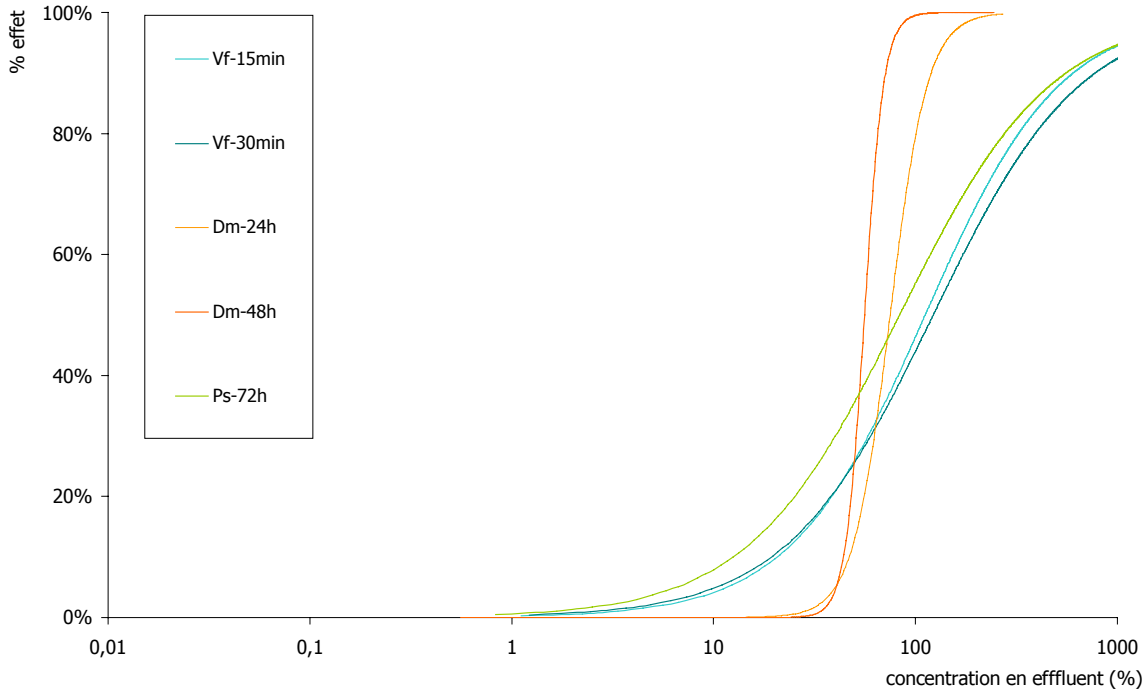
1. Échantillon 13h-17h filtré



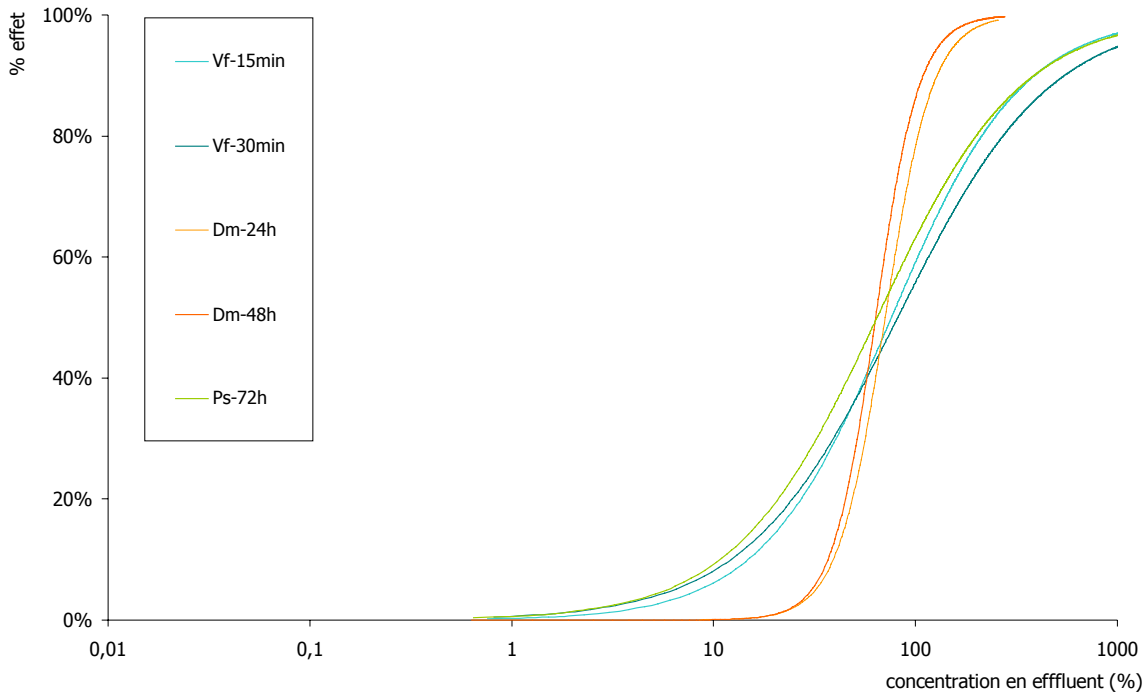
2. Échantillon 17h-23h filtré



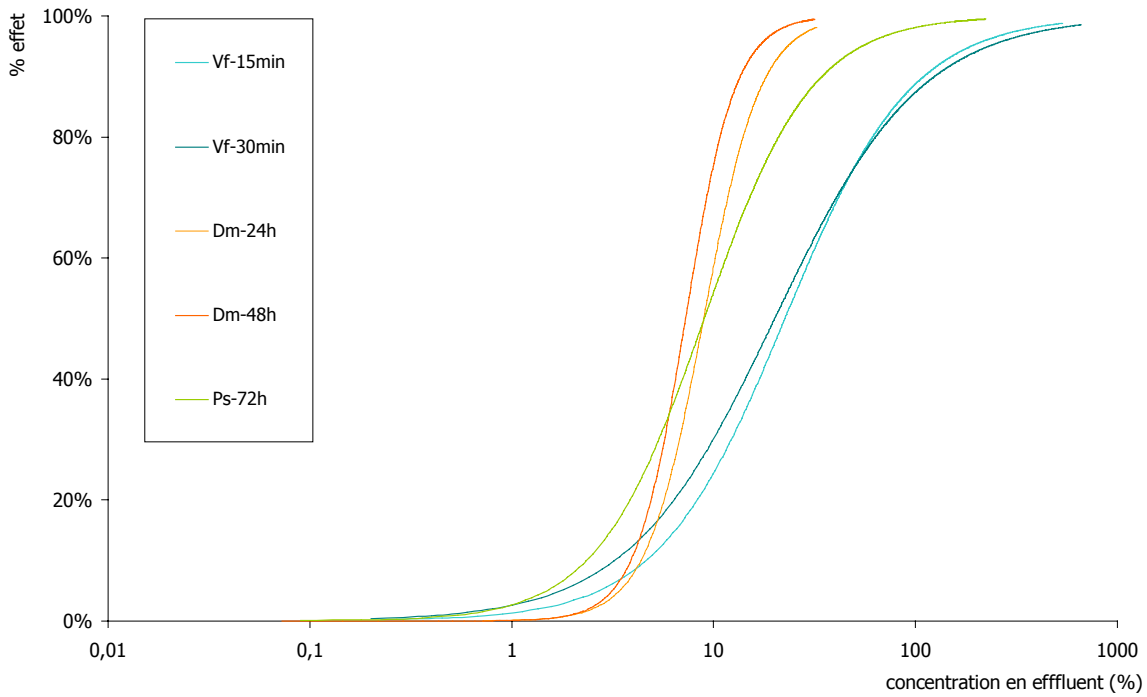
3. Échantillon 23h-5h filtré



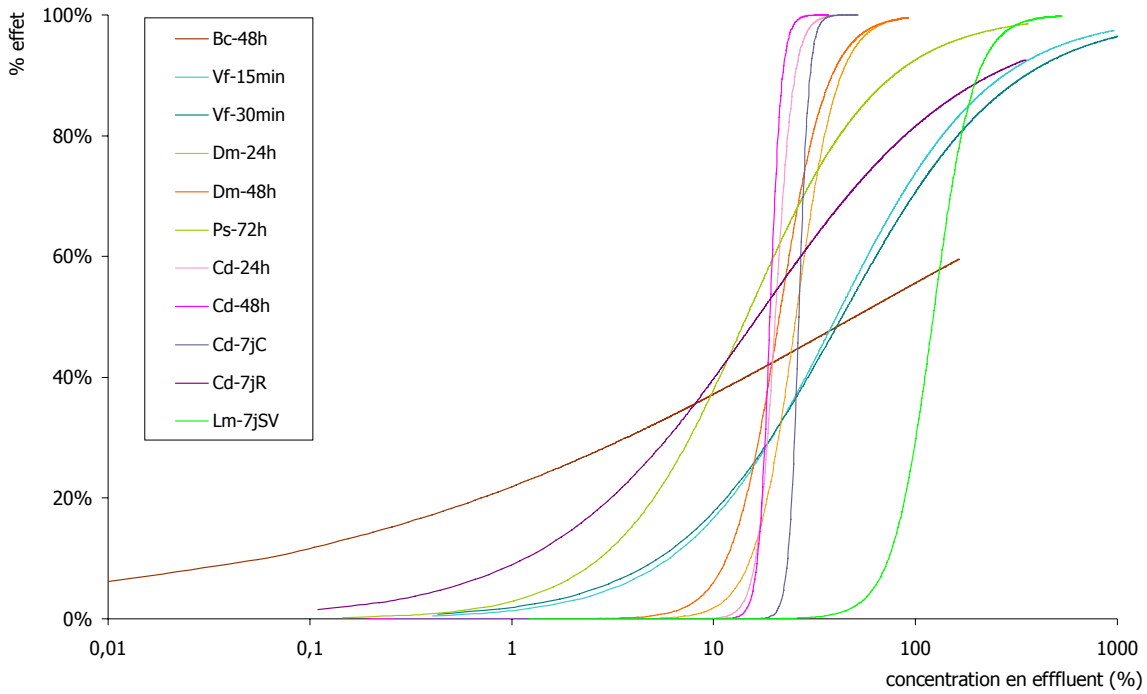
4. Échantillon 5h-9h filtré



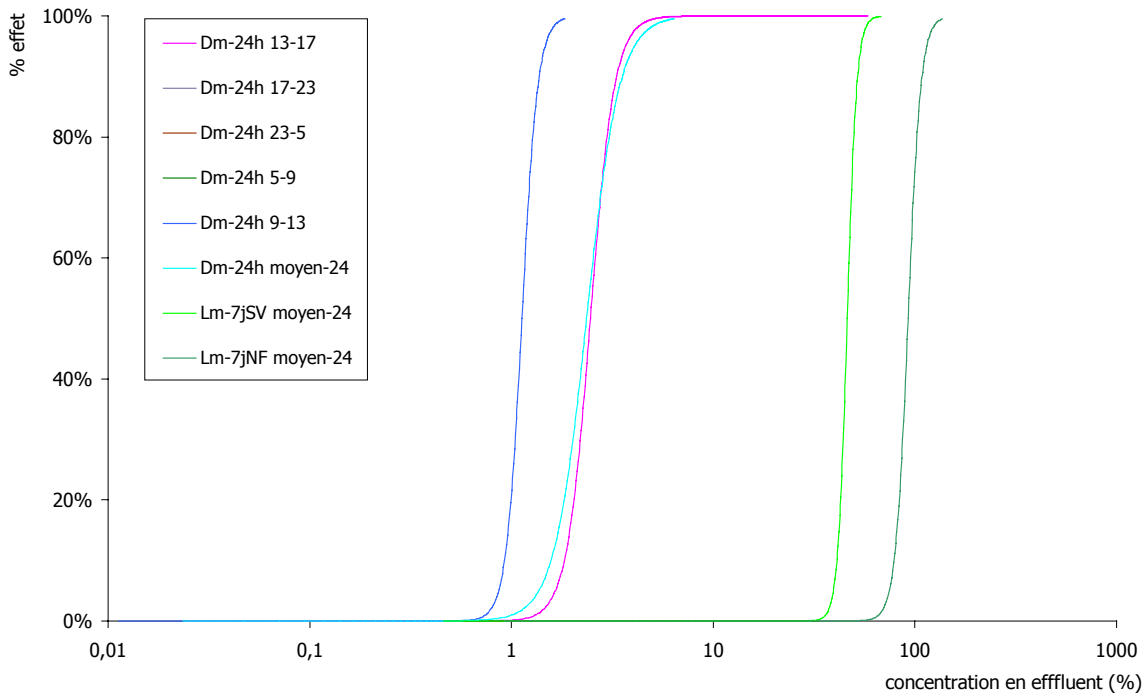
5. Échantillon 9h-13h filtré



6. Échantillon moyen-24h filtré



7. Échantillons bruts



Légende des figures : Dm : *Daphnia magna*, Vf : *Vibrio fischeri*, Ps : *Pseudokichneriella subcapitata,* Cd : *Ceriodaphnia dubia,* C : croissance, R : reproduction, BC : *Brachionus calyciflorus* ; Lm : *Lemna minor* ; NF : nombre de fronde ; SV : surface verte

Annexe 8. Écotoxicité des polluants contenus dans l'échantillon moyen (vis-à-vis de *Daphnia magna*)

1. Ammonium

année de publication	auteur	CE50-24h « daphnie » (mg/l)	Base de donnée
1982	Kaniewska-Prus M	1,74	PAN
1982	Kaniewska-Prus M	4,18	PAN
1982	Kaniewska-Prus M	2,1	EPA ECOTOX
1982	Kaniewska-Prus M	1,98	EPA ECOTOX

2. Acétaldéhyde

année de publication	auteur	CE50-48h « daphnie » (mg/l)	Base de donnée
1980	Randall TL et Knopp PV	48,25	PAN
2000	Office of Pesticide Programs	7	PAN
2000	Office of Pesticide Programs	4,7	PAN
1991	Von Burg R et Stout T	42	Environnement Canada

3. Formaldéhyde

année de publication	auteur	CE50-24h « daphnie » (mg/l)	Base de donnée
1993	Janssen CR et Persoone G	57	PAN
1977	Bringmann G et Kuhn R	52	PAN
1982	Bringmann G et Kuhn R	42	UCLID
1982	Bringmann G et Kuhn R	14,7	OECD
1977	Bringmann G et Kuhn R	18,2	OECD

4. Chloroforme

année de publication	auteur	CE50-24h « daphnie » (mg/l)	Base de donnée
1994	Calleja MC et al.	317	PAN
1989	Kuhn R et al.	79	PAN
1987	Bazin C et al.	602	PAN
1994	Lilius H et al.	573	PAN
1991	Cowgill UM and Milazzo DP	29	PAN
1986	Gersich FM et al.	758	PAN
1986	Gersich FM et al.	353	PAN
1986	Gersich FM et al.	83,8	PAN
1986	Gersich FM et al.	77,1	PAN
1986	Gersich FM et al.	64,9	PAN
1983	Knie et al .	290	UCLID
1980	LeBlanc GA	29	TERRASYS

5. Acétone

année de publication	auteur	CE50-24h « daphnie » (mg/l)	Base de donnée
1985	Devillers J. et al.	100	PAN
1985	Devillers J. et al.	100	PAN
1983	Barera Y et Adams WJ	27600	EPA ECOTOX
1983	LeBlanc, G.A., and D.C. Surprenant	44000	EPA ECOTOX
1965	Dowden, B.F., and H.J. Bennett	10	EPA ECOTOX

6. Méthanol

année de publication	auteur	CE50-24h « daphnie » (mg/l)	Base de donnée
1994	Calleja MC et al.	21402	PAN
1989	Kuhn RM et al.	10000	PAN
1994	Lilius H et al.T	20804	PAN
1982	Bringmann, G., and R. Kuehn	10000	EPA ECOTOX
2000	Guilhermino, L., et al.	4816	EPA ECOTOX

7. éthanol

année de publication	auteur	CE50-24h « daphnie » (mg/l)	Base de donnée
1994	Calleja MC et al.	10734	PAN
1989	Kuhn RM et al.	10000	PAN
1994	Lilius H et al.	13715	PAN
1985	Devillers J. et al.	100	PAN
1993	Calleja MC et al,	10800	UCLID
	databank INFUCHS des Umweltbundesamtes	10000	UCLID
2000	Guilhermino, L., et al.	9788	EPA ECOTOX
2000	Guilhermino, L., et al.	4816	EPA ECOTOX

8. 2-propanol

année de publication	auteur	CE50-24h « daphnie » (mg/l)	Base de donnée
1994	Calleja MC et al.	9556	PAN
1994	Lilius H et al.	6851	PAN
1977	Bringmann G et Kuhn R	10000	PAN
1982	Bringmann G et Kuhn R	9714	UCLID
1988	Huel-Bericht DL	9700	UCLID

9. Arsenic

année de publication	auteur	forme	CE50-24h « daphnie » (mg/l)	Base de donnée
1977	Bringmann, G., and R. Kuhn	Arsenic acid, Sodium salt	5,6	EPA ECOTOX
1977	Bringmann, G., and R. Kuhn	Arsenic acid, Sodium salt	45	EPA ECOTOX
1977	Bringmann, G., and R. Kuhn	Arsenic acid, Sodium salt	17	EPA ECOTOX
	Roczn.Zakl.Hig.Warsaw	Arsenic acid, Trisodium salt	4,9	EPA ECOTOX
1972	Biesinger, K.E., and G.M. Christensen	Acide arsénique, sel disodique	2,85	TERRASYS
1987	Burton, G.A.J., et al.	Acide arsénique, sel disodique	6,6	TERRASYS
1994	Fargasova, A.	Acide arsénique, sel disodique	51,88	TERRASYS
1994	Fargasova, A.	Acide arsénique, sel disodique	44,66	TERRASYS

10. Cuivre

année de publication	auteur	forme	CE50-24h « daphnie » (mg/l)	Base de donnée
1981	Bellavere, C., and J. Gorbi	nitrate ce cuivre	0,05	EPA ECOTOX
1981	Bellavere, C., and J. Gorbi	nitrate ce cuivre	0,07	EPA ECOTOX
1995	Tomasik, P., et al.	nitrate ce cuivre	0,27	EPA ECOTOX
1995	Tomasik, P., C et al.	nitrate ce cuivre	0,05	EPA ECOTOX
1994	Calleja, M.C., et al.	sulfate de cuivre	0,0012	EPA ECOTOX
1997	Guilhermino, L et al.	sulfate de cuivre	0,1014	EPA ECOTOX
1997	Guilhermino, L et al.	sulfate de cuivre	0,1665	EPA ECOTOX
1997	Guilhermino, L et al.	sulfate de cuivre	0,0348	EPA ECOTOX
1985	Devillers, J., et al.	sulfate de cuivre	1	EPA ECOTOX
1994	Lilius, H., et al.	sulfate de cuivre	0,00000116	EPA ECOTOX
1984	Dave, G.	sulfate de cuivre	0,0126	EPA ECOTOX
1993	Janssen, C.R., and G. Persoone	sulfate de cuivre	0,28	EPA ECOTOX
1989	Khangarot, B.S., and P.K. Ray	sulfate de cuivre	0,536	EPA ECOTOX
1994	Belabed, W., et al.	sulfate de cuivre	0,105	EPA ECOTOX
1994	Belabed, W., et al.	sulfate de cuivre	0,105	EPA ECOTOX
1994	Belabed, W., et al.	sulfate de cuivre	0,02	EPA ECOTOX
1994	Belabed, W., et al.	sulfate de cuivre	0,034	EPA ECOTOX
1977	Bringmann, G., and R. Kuhn	sulfate de cuivre	0,08	EPA ECOTOX
2000	Guilhermino, L., et al.	sulfate de cuivre	0,399	EPA ECOTOX
1978	Braginskiy, L.P et al.	sulfate de cuivre	0,125	EPA ECOTOX
1978	Cairns, J., et al.	sulfate de cuivre	0,01	EPA ECOTOX
1978	Cairns, J., et al.	sulfate de cuivre	0,01	EPA ECOTOX
1978	Cairns, J., et al.	sulfate de cuivre	0,1	EPA ECOTOX
1978	Cairns, J., et al.	sulfate de cuivre	0,05	EPA ECOTOX
1987	Khangarot, B.S., et al.	sulfate de cuivre	0,536	EPA ECOTOX
1987	Khangarot, B.S., et al.	sulfate de cuivre	0,58	EPA ECOTOX
1978	Cairns, J., et al.	sulfate de cuivre	0,09	EPA ECOTOX
1979	Braginskij, L.P., et al.	sulfate de cuivre	0,125	EPA ECOTOX
1960	Cabejszek, I., and M. Stasiak	sulfate de cuivre	0,5	EPA ECOTOX
1978	Braginskiy, L.P., et al.	sulfate de cuivre	0,025	EPA ECOTOX
1978	Braginskiy, L.P., et al.	sulfate de cuivre	0,25	EPA ECOTOX

11. Plomb

année de publication	auteur	forme	CE50-24h « daphnie » (mg/l)	Base de donnée
1995	Arambasic, M.B., et al.	Nitrate de plomb	88,943	TERRASYS
1980	Chapman, G.A et al.	Nitrate de plomb	0,517	TERRASYS
1980	Chapman, G.A., et al.	Nitrate de plomb	0,843	TERRASYS
1980	Chapman, G.A., et al.	Nitrate de plomb	1,58	TERRASYS
1982	LeBlanc, G.A.	Nitrate de plomb	0,15	TERRASYS
1994	Fargasova, A.	Acétate de plomb	3,73	TERRASYS
1977	Bringmann, G., and R. Kuhn	Acétate de plomb	1,2	TERRASYS
1987	Khangarot, B.S., et al.	Acétate de plomb	5	TERRASYS
1989	Khangarot, B.S., and P.K. Ray	Acétate de plomb	4,89	EPA ECOTOX
1977	Bringmann, G., and R. Kuhn	Acétate de plomb	2,5	EPA ECOTOX
1994	Fargasova, A.	Acétate de plomb	8,317	EPA ECOTOX
1987	Khangarot, B.S., et al.	Acétate de plomb	5	EPA ECOTOX
1960	Cabejszek, I., and M. Stasiak	Chlorure de plomb	0,33	TERRASYS
1960	Cabejszek, I., and M. Stasiak	Chlorure de plomb	16,4	TERRASYS
1960	Cabejszek, I., and M. Stasiak	Chlorure de plomb	9,5	TERRASYSf
1960	Cabejszek, I., and M. Stasiak	Chlorure de plomb	6,3	TERRASYS
1960	Cabejszek, I., and M. Stasiak	Chlorure de plomb	4,2	TERRASYS
1960	Cabejszek, I., and M. Stasiak	Chlorure de plomb	16,4	EPA ECOTOX
1992	Gale, N.L.,. et al.	Chlorure de plomb	167	TERRASYS
1992	Gale, N.L., et al.	Chlorure de plomb	0,168	TERRASYS
1992	Gale, N.L et al.	Oxyde de plomb	388	TERRASYS
1992	Gale, N.L., et al.	Oxyde de plomb	0,132	TERRASYS
1992	Gale, N.L., et al.	Sulfate de plomb	3166	TERRASYS
1992	Gale, N.L., et al.	Sulfate de plomb	0,395	TERRASYS
1994	Belabed, W., et al.	Sulfate de plomb	0,2	EPA ECOTOX
1994	Belabed, W et al.	Sulfate de plomb	0,65	EPA ECOTOX
1994	Belabed, W., et al.	Sulfate de plomb	0,8	EPA ECOTOX
1994	Belabed, W., et al.	Sulfate de plomb	0,9	EPA ECOTOX

12. Zinc

année de publication	auteur	forme	CE50-24h « daphnie » (mg/l)	Base de donnée
1982	Attar, E.N., and E.J. Maly	Chlorure de zinc	0,861	TERRASYS
1982	Attar, E.N., and E.J. Maly	Chlorure de zinc	0,799	TERRASYS
1982	Attar, E.N., and E.J. Maly	Chlorure de zinc	0,42	TERRASYS
1982	Attar, E.N., and E.J. Maly	Chlorure de zinc	0,126	TERRASYS
1982	Attar, E.N., and E.J. Maly	Chlorure de zinc	0.068	TERRASYS
1977	Bringmann, G., and R. Kuhn	Chlorure de zinc	6,713	TERRASYS
1980	Chapman, G.A., et al.	Chlorure de zinc	0,334	TERRASYS
1980	Chapman, G.A., et al.	Chlorure de zinc	0,525	TERRASYS
1980	Chapman, G.A., et al.	Chlorure de zinc	0,655	TERRASYS
1992	Gale, N.L., et al.	Chlorure de zinc	47,7	TERRASYS
1992	Gale, N.L et al.	Chlorure de zinc	0,21	TERRASYS
1996	Sorvari, J., and M. Sillanpaa	Chlorure de zinc	5,5	EPA ECOTOX
1977	Bringmann, G., and R. Kuhn	Chlorure de zinc	14	EPA ECOTOX
1960	Cabejszek, I., and M. Stasiak	Chlorure de zinc	11,6	EPA ECOTOX
1980	Qureshi, S.A et al.	Chlorure de zinc	4,5	TERRASYS

1980	Qureshi, S.A et al.	Chlorure de zinc	3,2	TERRASYS
1996	Sorvari, J., and M. Sillanpaa	Chlorure de zinc	5,5	TERRASYS
1978	Braginskiy, L.P., and E.P. Shcherban	Sulfate de zinc	0,005	TERRASYS
1978	Braginskiy, L.P et al.	Sulfate de zinc	0,014	TERRASYS
1998	Brata, C., et al.	Sulfate de zinc	0,259	TERRASYS
1998	Brata, C., et al.	Sulfate de zinc	0,131	TERRASYS
1998	Brata, C., et al.	Sulfate de zinc	1,06	TERRASYS
1998	Brata, C., et al.	Sulfate de zinc	0,457	TERRASYS
1998	Brata, C., et al.	Sulfate de zinc	0,962	TERRASYS
1998	Brata, C., et al.	Sulfate de zinc	0,601	TERRASYS
1978	Cairns, J., et al.	Sulfate de zinc	2,8	TERRASYS
1978	Cairns, J et al.	Sulfate de zinc	2,3	TERRASYS
1978	Cairns, J., et al.	Sulfate de zinc	1,8	TERRASYS
1978	Cairns, J., et al.	Sulfate de zinc	1	TERRASYS
1978	Cairns, J., et al.	Sulfate de zinc	0,79	TERRASYS
1978	Cairns, J., et al.	Sulfate de zinc	2,3	TERRASYS
1978	Cairns, J., et al.	Sulfate de zinc	1,7	TERRASYS
1978	Cairns, J., et al.	Sulfate de zinc	1,1	TERRASYS
1978	Cairns, J., et al.	Sulfate de zinc	0,28	TERRASYS
1978	Cairns, J., et al.	Sulfate de zinc	0,56	TERRASYS
1992	Gale, N.L., et al.	Sulfate de zinc	29,4	TERRASYS
1992	Gale, N.L., et al.	Sulfate de zinc	0,62	TERRASYS
1992	Gale, N.L et al.	Sulfure de zinc	0,97	TERRASYS
1989	Hatakeyama, S., and Y. Sugaya	Sulfate de zinc	0,115	TERRASYS
1989	Hatakeyama, S., and Y. Sugaya	Sulfate de zinc	0,124	TERRASYS
1982	LeBlanc, G.A.	Sulfate de zinc	0,24	TERRASYS
1994	Crisinel, A., L et al.	Sulfate de zinc	7,63	EPA ECOTOX
1997	Guilhermino, L., et al.	Sulfate de zinc	3,665	EPA ECOTOX
1997	Guilhermino, L., et al.	Sulfate de zinc	7,325	EPA ECOTOX
1997	Guilhermino, L., et al.	Sulfate de zinc	8,048	EPA ECOTOX
1989	Khangarot, B.S., and P.K. Ray	Sulfate de zinc	1	EPA ECOTOX
1984	Berglind, R., and G. Dave	Sulfate de zinc	3	EPA ECOTOX
1984	Berglind, R., and G. Dave	Sulfate de zinc	5,3	EPA ECOTOX
1993	Janssen, C.R., and G. Persoone	Sulfate de zinc	7,6	EPA ECOTOX
1994	Belabed, W., et al.	Sulfate de zinc	12,5	EPA ECOTOX
1994	Belabed, W., et al.	Sulfate de zinc	1,4	EPA ECOTOX
1994	Belabed, W., et al.	Sulfate de zinc	4,8	EPA ECOTOX
1994	Belabed, W., et al.	Sulfate de zinc	9	EPA ECOTOX
1960	Cabejszek, I., and M. Stasiak	Sulfate de zinc	14,9	EPA ECOTOX
2000	Guilhermino, L., et al.	Sulfate de zinc	35,403	EPA ECOTOX
1987	Khangarot, B.S et al.	Sulfate de zinc	1,17	EPA ECOTOX
1995	Tomasik, P et al.	nitrate de Zinc	2	EPA ECOTOX
1995	Tomasik, P., et al.	nitrate de Zinc	0,75	EPA ECOTOX
1992	Gale, N.L., et al.	Carbonate de zinc	30000	TERRASYS
1992	Gale, N.L et al.	Oxyde de zinc	0,098	TERRASYS

13. Fréon 113

année de publication	auteur	CE50-48h « daphnie » (mg/l)	source
1984	Hoechst A.G	71	Verchueren K, 2000

14. Timolol

année de publication	auteur	CE50-24h « daphnie » (mg/l)
2003	Saderson et al	9

15. Métoprolol

année de publication	auteur	CE50-24h « daphnie » (mg/l)	source
2002	Huggett et al	63,9	carlsson et al 2006
2003	Cleuvers	100	
2003	Sanderson et al	8	

16. Bisprolol

année de publication	auteur	CE50-24h « daphnie » (mg/l)
2003	Saderson et al	8

17. Propranolol

année de publication	auteur	CE50-24h « daphnie » (mg/l)	source
2002	huggett et al,	1,6	Fent et al, 2007
1995	lilius et al	17,7	halling-sorensen et al 1998
1993	Calleja et al	3,1	halling-sorensen et al 1998
2003	cleuvers	7,5	
2003	Sanderson et al	2,3	

18. Betaxolol

année de publication	auteur	CE50-24h « daphnie » (mg/l)
2003	Saderson et al	1,5

19. Cyclophosphamide

année de publication	auteur	CE50-24h « daphnie » (mg/l)/l)
2003	Sanderson et al	1795

20. Synthèse

polluant	CE50 daphnie-24h (mg/l)		
	valeurs médiane	valeurs min	valeurs max
ammonium	2.04	1,98	4,18
acétaldéhyde	24,5**	4,7	48,25
formaldéhyde	42	14,7	57
chloroforme	186,9	29	758
acétone	100	10	44 000
méthanol	10 000	4 816	21 402
éthanol	10 000	100	13 715
2-propanol	9 700	6 851	10 000
As	11,8	2,85	51,88
Cu	0,1	0,00000116	1
Pb	3,115	0,132	3 166
Zn	1,17	0,005	30 000
fréon 113	71	-	-
métoprolol	63,9	8	63,9
timolol	9	-	-
bisprolol	8	-	-
betaxolol	1,5	-	-
propranolol	3,1	1,6	17,7
cyclophosphamide	1 795	-	-

FOLIO ADMINISTRATIF

THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

NOM : Boillot DATE de SOUTENANCE : 28 avril 2008

Prénoms : Clotilde

TITRE :

Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Contribution à l'amélioration de la phase « caractérisation des effets »

NATURE : Doctorat Numéro d'ordre : 2008 ISAL 0021

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

Spécialité : Sciences de l'Environnement Industriel et Urbain

Cote B.I.U. – Lyon : T 50/210/19 / et bis CLASSE :

RESUME :

Ce mémoire de thèse s'inscrit dans la problématique de l'Evaluation Des Risques Ecotoxicologiques (EDREcotox) liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Le premier objectif vise à améliorer la connaissance des effets écotoxicologiques des effluents hospitaliers. Pour cela, nous avons étudié d'une part, les effets combinés des principaux polluants contenus dans ces effluents vis-à-vis de Daphnia magna et, d'autre part, les effluents provenant d'un hôpital d'une grande ville française, en intégrant leur caractérisation physico-chimique et écotoxicologique approfondie. Nous avons alors mis en œuvre des EDREcotox basées sur les différentes approches préalablement étudiées (substances, substances avec effets combinés, bioessais mono-spécifiques et pluri-spécifiques). Le second objectif de ce travail vise à contribuer à l'amélioration des méthodologies de caractérisation des effets écotoxicologiques, à la fois d'un point de vue général et pour le scénario spécifique étudié : « rejets des effluents d'un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France dans le réseau d'eaux usées en direction de la station d'épuration puis du cours d'eau ». Les résultats obtenus montrent que les effets combinés des mélanges de désinfectants/surfactants étudiés sont additifs vis-à-vis de D. magna. Quelle que soit l'approche utilisée, nos résultats révèlent la toxicité des effluents étudiés. Les EDREcotox montrent cependant que, dans le cas de notre scénario, le risque écotoxicologique est faible pour les organismes du milieu récepteur. Nos recherches ont également permis de proposer une méthodologie de caractérisation des effets écotoxicologiques basée sur une première étape constituée d'une approche intégrée. Enfin, ce travail permet d'aboutir à des recommandations pour une meilleure gestion des effluents hospitaliers.

MOTS-CLES :

effluent hospitalier, risque écotoxicologique, désinfectants, surfactants, bioessais, périphyton

Laboratoire de recherche : Laboratoire des Sciences de l'Environnement de l'ENTPE à Vaulx-en-Velin

Directeur de thèse : Yves Perrodin

Président de jury : Rémy Gourdon

Composition du jury : Christophe Dagot, Valeria. Mezzanotte, Yves Perrodin, Rémy Gourdon, Louis Martel, Françoise Tissot-Guerraz et Christine Bazin

Évaluation des risques écotoxicologiques liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques.

Contribution à l'amélioration de la phase « caractérisation des effets »

Résumé

Ce mémoire de thèse s'inscrit dans la problématique de l'Evaluation Des Risques Ecotoxicologiques (EDREcotox) liés aux rejets d'effluents hospitaliers dans les milieux aquatiques. Le premier objectif vise à améliorer la connaissance des effets écotoxicologiques des effluents hospitaliers. Pour cela, nous avons étudié d'une part, les effets combinés des principaux polluants contenus dans ces effluents vis-à-vis de *Daphnia magna* et, d'autre part, les effluents provenant d'un hôpital d'une grande ville française, en intégrant leur caractérisation physico-chimique et écotoxicologique approfondie. Nous avons alors mis en œuvre des EDREcotox basées sur les différentes approches préalablement étudiées (substances, substances avec effets combinés, bioessais mono-spécifiques et pluri-spécifiques). Le second objectif de ce travail vise à contribuer à l'amélioration des méthodologies de caractérisation des effets écotoxicologiques, à la fois d'un point de vue général et pour le scénario spécifique étudié : « rejets des effluents d'un hôpital d'une grande ville du Sud-Est de la France dans le réseau d'eaux usées en direction de la station d'épuration puis du cours d'eau ». Les résultats obtenus montrent que les effets combinés des mélanges de désinfectants/surfactants étudiés sont additifs vis-à-vis de *D. magna*. Quelle que soit l'approche utilisée, nos résultats révèlent la toxicité des effluents étudiés. Les EDREcotox montrent cependant que, dans le cas de notre scénario, le risque écotoxicologique est faible pour les organismes du milieu récepteur. Nos recherches ont également permis de proposer une méthodologie de caractérisation des effets écotoxicologiques basée sur une première étape constituée d'une approche intégrée. Enfin, ce travail permet d'aboutir à des recommandations pour une meilleure gestion des effluents hospitaliers.

Mots-clés : effluent hospitalier, risque écotoxicologique, désinfectants, surfactants, bioessais, périphyton

Ecotoxicological risk assessment related to hospital wastewater discharge into aquatic environments.

Contribution to the improvement of the "characterization of effects" phase

Abstract

This study deals with the ecotoxicological risk assessment (EDREcotox) related to hospital wastewater discharging into aquatic environments. The first objective was to improve the knowledge of the ecotoxicological effects of hospital wastewater. Firstly, the combined effects of the main pollutants contained in these effluents were characterized on *Daphnia magna*. Then, the effluents of a hospital coming from a French large city were studied by integrating their in-depth physicochemical and ecotoxicological characterizations. EDREcotox based on various approaches, substances, substances with combined effects, mono-specific and pluri-specific bioassays, was then carried out. The second objective of this work was to contribute to the improvement of "characterization of ecotoxicological effects" methodologies from a general point of view and for a specific scenario studied: "discharging of hospital effluents from a large city of the South-east of France in the urban sewer network towards the wastewater treatment plant and then towards the river". Results lead to the conclusion that the combined effects of the studied disinfectants/surfactants mixtures on the mobility of *D. magna* are additive. Whatever the approach used, our findings reveal the toxicity of the studied effluents. However EDREcotox show that in the case of our scenario, the ecotoxicological risk is weak for the river aquatic organisms. Our results also lead to propose a methodology of characterization of ecotoxicological effects starting with an integrated approach. Finally, this work contributes to establish recommendations for an improved management of hospital effluents.

Keywords : hospital wastewater, ecotoxicological risk, disinfectants, surfactants, bioassays, periphyton