

**PRECODD 2010 :**  
**Rapport semestriel d'activité n°1**  
**du projet ECHIBIOTEB**

## **A. Identification**

---

Programme – édition	ECOTECH 2010
Projet (acronyme)	<b>ECHIBIOTEB</b>
Titre complet du projet	Outils innovants d'Echantillonnage, d'analyses <b>CHI</b> miques et <b>BIO</b> logiques pour le suivi de <b>Traitements</b> avancés des <b>Eaux</b> usées et des <b>Boues</b>
Projet labellisé par le pôle de compétitivité :	Oui
Site Internet du projet	En cours de construction
Coordinateur du projet (rédacteur du rapport) : <ul style="list-style-type: none"><li>• société/organisme</li><li>• nom, prénom</li><li>• téléphone</li><li>• adresse électronique</li></ul>	Cemagref Cécile Miège Tel : +33 (0)4 72 20 87 44 cecile.miege@cemagref.fr
Date début – date fin du projet	17 mars 2011 – 16 mars 2014
Période faisant l'objet du rapport d'activité (date début – date fin)	Janvier à août 2011
Date de rédaction	Septembre 2011

## **B. Rappel des tâches et livrables du projet. Etat d'avancement**

---

### **Réunions du projet :**

- 1<sup>ère</sup> réunion plénière le 15 septembre 2010 à Paris (compte-rendu en **annexe 1**).
- 2<sup>ème</sup> réunion plénière le 28 septembre 2011 à Paris (compte-rendu en **annexe 2**).

Tâches et livrables	2011		2012		2013		Degré d'avancement / Commentaires
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	%
<b>Tâche 1. Coordination du projet et harmonisation des méthodes</b>							
<b>Livrable 1</b> : Planning définitif des campagnes du projet.	▲						50% : 6 campagnes réalisées, 3 déjà planifiées fin 2011 et début 2012, 4 restant à planifier en 2012 Il est finalement difficile d'acter sur un planning définitif sur 2 ans (aléas dus à l'implication de nombreux partenaires, i.e. ceux du projet et les gestionnaires des stations d'épuration). Le planning sera donc calé au fur et à mesure de l'avancée du projet.
<b>Livrable 2</b> : Cahier des charges pour l'organisation des campagnes <i>in situ</i> , la préparation et la distribution des échantillons et des extraits.	▲ P						100 % La version actuelle est cependant susceptible d'être mise à jour.
<b>Livrable 3</b> : Accord de consortium pour fixer la stratégie de valorisation et le mode de protection et d'exploitation des résultats.	▲						30% : en préparation. Diffusion pour relecture et signature prévue d'ici la fin de l'année.
<b>Tâche 2 : Caractérisation chimique ciblée des eaux et boues avant et après traitement</b>							
<b>Livrable 4</b> : Choix définitif des sites et traitements optimisés pour la mise en œuvre des outils innovants chimiques et biologiques	▲						50% : Idem Livrable 1.
<b>Livrable 5</b> : Résultats des analyses chimiques ciblées sur les différentes campagnes pour les traitements avancés				▲			20% Traitement et interprétation des résultats à suivre.
<b>Livrable 6</b> : Résultats des analyses chimiques ciblées sur les différentes campagnes pour les procédés de traitement des boues				▲			20% Traitement et interprétation des résultats à suivre.
<b>Tâche 3 : Méthodologies innovantes pour le screening chimique et l'identification de molécules nouvelles dans les eaux et boues avant et après traitement</b>							

Tâches et livrables	2011		2012		2013		Degré d'avancement / Commentaires
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	%
<b>Livrable 7</b> : Liste non exhaustive de molécules non cibles identifiées et de produits de dégradation dans les eaux usées traitées et dans les boues				△			10% SE-CIRSEE : Les conditions d'analyse de la méthode de screening par GC-2D ont été arrêtées et testées sur des molécules modèles (HAP lourds, PCB lourds, pesticides). EPOC-LPTC : Le screening sera mis en oeuvre sur des échantillons qui seront sélectionnés dans un 2 <sup>ème</sup> temps.
<b>Livrable 8</b> Analyse quantitative d'une sélection de nouveaux composés pertinents : comportement dans les filières de traitement (eaux et boues)						△	0%
<b>Tâche 4 : Bioanalyse - Recherche de composés biologiquement actifs dans les eaux et boues avant et après traitement à l'aide de bioessais <i>in vitro</i></b>							
<b>Livrable 9</b> : Identification ou pistes d'identification de nouveaux polluants biologiquement actifs.				△			10%  * Des tests préliminaires sur matrices réelles ont été discutés et organisés pour décider d'un protocole commun d'extraction des eaux. Il reste à le faire pour les boues.  * Réalisation des analyses : Pour tout le monde : les échantillons des campagnes ASE3-Boue et ASE5-Boue sont en attente d'établissement d'un protocole commun d'extraction. Les échantillons de la campagne ASE1-PA4 ont été réceptionnés dans les laboratoires ; les analyses sont réalisées pour l'INERIS et en cours pour EPOC-LPTC et UMR8079. Les échantillons des campagnes ASE3-PA2 et ASE3-PA3 ont été réceptionnés dans les laboratoires de l'INERIS, EPOC-LPTC et UMR8079.
<b>Livrable 10</b> : Synthèse sur les performances et les modes opératoires des traitements vis-à-vis des activités biologiques mesurées.					△		0%

Tâches et livrables	2011		2012		2013		Degré d'avancement / Commentaires
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	
<b>Livable 11</b> : Synthèse sur les profils de toxicité/d'activités dans les différents compartiments (eaux, boues) et en fonction du type de traitement.					Δ		0%
<b>Tâche 5 : Amélioration de la détection des fractions toxiques par la méthode EDA</b>							
<b>Livable 12</b> : Protocole de l'approche EDA appliquée aux eaux et aux boues avant et après traitement avancé.		Δ					10% L'organisation générale (modalités d'échantillonnage, de transport et de stockage) est définie. Il reste à : *organiser des tests préliminaires pour tester la compatibilité du Nalgène avec les bioessais <i>in vitro</i> (pour stockage des échantillons d'eaux issus de sites avec pilote). *détailler le protocole de laboratoire qui sera mis en œuvre pour les eaux et les boues.
<b>Livable 13</b> : Synthèse sur l'apport de l'approche EDA dans la démarche de caractérisation des effets <i>in vitro</i> .					Δ		0%
<b>Livable 14</b> : Liste des molécules ayant été identifiées en lien avec leur activité.					Δ		0%
<b>Tâche 6 : Application des échantillonneurs intégratifs pour analyses chimiques et biologiques des eaux avant et après traitement</b>							
<b>Livable 15</b> : Rapport technique pour la bonne exploitation des échantillonneurs intégratifs couplés aux analyses chimiques et aux bioessais <i>in vitro</i> , et appliqués aux traitements avancés. Bilan sur leurs avantages par rapport à un échantillonnage ponctuel.			Δ				10% La préparation et l'installation du matériel est finalisée pour Bernières sur mer (nécessité d'échantillonner dans un système "dérivé" inspiré du système pour les bioessais <i>in vivo</i> ). Première campagne longue réalisée.
<b>Livable 16</b> : Bilans qualitatif et quantitatif des molécules retrouvées dans les filières de traitements avancés.					Δ		0%
<b>Livable 17</b> : Bilan des activités retrouvées dans les filières de traitements avancés.					Δ		0%

Tâches et livrables	2011		2012		2013		Degré d'avancement / Commentaires
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	
<b>Livrable 18</b> : Comparaison des TEQ chimie et des TEQ biologie mesurées dans les filières de traitements avancés.						▲	0%
<b>Tâche 7 : Evaluation de la toxicité des eaux et boues avant et après traitement à l'aide de bioessais <i>in vivo</i></b>							
<b>Livrable 19</b> : Caractérisation écotoxicologique de la toxicité des effluents et de l'efficacité des traitements tertiaires testés.				▲			20%  * La préparation et l'installation du matériel pour les campagnes longues est finalisée (système "dérivé", hors canal)  * Réalisation des bioessais en laboratoire: INERIS : Les essais sur éluats ont été réalisés sur les boues des campagnes ASE-3 et ASE 5. Les essais n'ont pas pu être réalisés sur les eaux ASE1-PA4 (problème logistique). EPOC-LPTC : Échantillons non encore analysés. En attente de la définition d'un protocole d'analyse (tests préliminaires réalisés pour définir les protocoles d'analyse des eaux et des boues). Les échantillons des campagnes ASE3-PA2 et ASE3-PA3 ont été réceptionnés dans les laboratoires de l'INERIS, EPOC-LPTC .
<b>Livrable 20</b> : Comparaison de la sensibilité des différents tests déployés et conclusions sur la complémentarité des approches mises en œuvre.					▲		10% Analyse des résultats de la première campagne en cours.
<b>Tâche 8 : Caractérisation <i>in situ</i> des interactions entre matière organique et micropolluants dans les eaux avant et après traitement</b>							

Tâches et livrables	2011		2012		2013		Degré d'avancement / Commentaires
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	%
<b>Livrable 21</b> : Choix des molécules cibles pour adaptation du test.	△						80% (la décision a été prise de se laisser la possibilité d'étudier de nouvelles molécules fluorescentes, à sélectionner en fonction de leur intérêt mis en évidence tout au long du projet). Choix du pérylène et de la carbamazépine pour le développement du test.
<b>Livrable 22</b> : Protocole du test de mesure rapide pour quantifier les interactions entre les micropolluants organiques ciblés et les MOD d'échantillons d'eaux naturelles.		△					75% Le protocole a été mis au point en utilisant le pérylène comme micropolluant de référence. Le quenching de fluorescence du pérylène par la matière organique dissoute est au point au laboratoire et a été validé sur des échantillons réels (eau de sortie de STEP). La mise au format microplaque est en cours (d'ici fin septembre 2011) et la validation du protocole sur un autre micropolluant (carbamazépine) et sur plusieurs échantillons réels (campagne de septembre) est en cours jusqu'à fin 2011.
<b>Livrable 23</b> : Bilan sur les interactions mesurées.				△			0%
<b>Livrable 24</b> : Eléments d'interprétation des résultats de toxicité mesurée dans la tâche 7 en prenant pleinement en considération le rôle des MOD.						△	0%
<b>Tâche 9 : Synthèse, exploitation concertée des résultats et valorisation</b>							
<b>Livrable 25</b> : Liste (non exhaustive) de nouveaux composés indésirables, couramment présents dans les eaux résiduaires brutes et traitées, ceci afin d'anticiper les législations futures.						△	0%
<b>Livrable 26</b> : Guides de bonne exploitation des outils mis en œuvre dans le projet pour la caractérisation des procédés de traitement des eaux et des boues.						△	0%

Tâches et livrables	2011		2012		2013		Degré d'avancement / Commentaires	
	S1	S2	S1	S2	S1	S2	%	
<b>Livrable 27</b> : Comparaison de l'efficacité des procédés optimisés selon les outils innovants testés.						▲	0%	
<b>Livrable 28</b> : Méthodologies de diagnostic des performances des procédés de traitement des eaux usées et des boues vis à vis des micropolluants ; et stratégies de déploiement des outils et d'interprétation des données issues de ces technologies innovantes pour faciliter les schémas de gestion et la prise de décision par les industriels et les collectivités territoriales vis à vis de l'implémentation de la DCE.						▲	0%	
<b>Livrable 29</b> : Colloque public final.						▲	0%	
	▲	Prévu	▲	Reprévu		✘	Abandonné	☞ Réalisé

## C. Description des travaux effectués pour la période concernée et conformité de l'avancement aux prévisions

---

\* Le consortium s'est réuni le 15 septembre 2010 à Paris pour un premier contact entre tous les partenaires et une remise en mémoire du contenu du projet (compte-rendu en **annexe 1**). Une deuxième réunion plénière a été organisée le 28 septembre 2011 à Paris (compte-rendu en **annexe 2**) (**tâche 1**).

Un site internet est en cours de construction pour décrire et communiquer sur le projet ECHIBIOTEB (**tâches 1 et 9**).

\* Le cahier des charges (tâche 1, livrable 2) présentant les essais préliminaires à réaliser, l'organisation des campagnes *in situ*, la préparation et la distribution aux différents partenaires des échantillons et des extraits à analyser, a été rédigé et diffusé. Ce cahier des charges met aussi en évidence et recense un certain nombre de questions encore en suspens auxquelles nous devons répondre. La version actuelle est cependant susceptible d'être mise à jour.

\* Des essais préliminaires destinés à caler les outils ECHIBIOTEB sur les matrices du projet, et notamment les protocoles d'échantillonnage et de mesure, ont été discutés, et, certains ont été organisés. Ces essais concernent les tâches suivantes :

### 1/ Les bioessais *in vitro* (**tâche 4**) :

Afin de décider d'un protocole commun d'extraction des eaux, des tests ont été organisés pour comparer les réponses des bioessais *in vitro* pour deux échantillons d'eau (i.e. entrée et sortie de traitement tertiaire, 2 sites différents) après a) extraction liquide/liquide (dichlorométhane) selon le protocole mis en œuvre par l'INERIS et l'EPOC-LPTC ; et b) après extraction sur phase solide (OASIS HLB, élution au méthanol) selon le protocole mis en œuvre par l'UMR8079. Les extraits d'échantillons ont été soumis à un panel d'essais : ER, TR, AR/GR, AhR, SOS Chromotest, MicroTox, susceptibles de prendre en compte une large diversité de molécules chimiques actives. De plus, pour savoir si la filtration prévue des échantillons liquides modifie la réponse des bioessais *in vitro*, ces tests préliminaires ont été réalisés sur des eaux filtrées et aussi sur des eaux brutes, quand cela était possible.

Pour compléter ces essais, des blancs de bioessais *in vitro* ont été réalisés sur une eau de référence (eau d'Evian en bouteille verre).

Il reste à définir un protocole d'extraction des boues et des échantillonneurs intégratifs. En attendant, les échantillons de boue et d'échantillonneurs intégratifs prélevés sont conservés congelés.

### 2/ Pour les bioessais *in vivo* (**tâche 7**) :

- Des essais pour roder le système d'exposition *ex situ* sont en cours. Pour les expérimentations *ex situ*, il a été décidé que le niveau de toxicité et donc la ou les dilution(s) des eaux étudiées, sera(ont) définie(s) juste avant le début de chaque campagne (la semaine précédant le démarrage des campagnes).

- Le test Microtox appliqué aux boues : il est opérationnel à l'EPOC-LPTC, mais pas encore mis en œuvre sur des boues (pas de connaissance des niveaux de toxicité). Des tests préliminaires ont été organisés pour décider des dilutions à faire et du protocole à suivre (test en boue contact, en flash ou en éluatriat). Des résultats positifs ont été obtenus sur les trois boues analysées en appliquant le protocole dit en « phase solide » (Environnement Canada, rapport SPE1/RM/24, 1992).

- Les tests en laboratoire sur effluents (ceriodaphnies, algues et Microtox) : des essais préliminaires ont été prévus pour évaluer l'effet de la filtration, et éventuellement de la centrifugation des effluents étudiés.

- Pour le test Microtox, des essais préliminaires ont aussi été réalisés, en parallèle aux biotests *in vitro* (cf 1/), pour comparer les résultats obtenus sur effluents avec deux protocoles d'extraction, sur phase solide ou liquide/liquide. Les échantillons d'eaux ont aussi été analysés sous leur forme brute (non extraite). La norme NF EN ISO 11348-3 a été utilisée pour les tests Microtox sur les extraits.

### 3/ Pour la démarche EDA (**tâche 5**) :

Des tests préliminaires positifs et négatifs (par rapport aux activités *in vitro* testées) devront être réalisés pour vérifier que les extractions successives ne modifient pas les réponses des différents bioessais *in vitro*. Ces tests seront prévus dans un deuxième temps, après obtention des résultats suite aux premières campagnes et identification d'échantillons positifs et négatifs.

La sélection des échantillons sur lesquels il faudra réaliser la démarche EDA ne pourra finalement se faire qu'à posteriori (cela concerne les échantillons d'eaux, boues et extraits d'échantillonneurs pour lesquels une activité biologique aura été détectée lors des premières campagnes). Il a été décidé de conserver, dans des flacons en Nalgène (polyéthylène HDPE, high density polyethylene), les échantillons des campagnes ECHIBIOTEB mettant en jeu des pilotes. Pour les autres campagnes (hors pilote), nous organiserons de nouvelles campagnes d'échantillonnage après sélection des sites présentant un intérêt. Des tests préliminaires sont actuellement en discussion pour vérifier la non influence du Nalgène (HDPE) sur les réponses des bioessais *in vitro*.

\* Concernant les campagnes d'échantillonnage (**livrables 1 et 4, tâches 1 et 2**) , à ce jour,

5 campagnes courtes ont été réalisées : 2 sur procédés "boue" dans les stations de Bellecombe et Moulin sous Touvent (4 échantillons de boue, 2 avant et 2 après traitement), 3 sur procédé "eau" dans la station de Bernières sur mer (7 échantillons d'eau, 3 avant traitement, 3 après traitement et 1 intermédiaire).

2 campagnes courtes sur procédé "eau" sont planifiées pour fin 2011 (Ollainville en Essonne).

1 campagne longue réalisée et 1 planifiée à Bernières sur mer.

Il reste à préciser le planning à partir de 2012 (2 campagnes courtes et 2 campagnes longues à programmer).

\* L'état d'avancement des analyses des échantillons issus des 5 campagnes courtes réalisées est donné dans le tableau suivant :

	ASE3-Boue 2 échantillons	ASE5-Boue 2 échantillons	ASE1-PA4 Eau 3 échantillons	ASE3-PA2 Eau 2 échantillons	ASE3-PA3 Eau 2 échantillons
<b>Tâche 2</b>	Cemagref / métaux : 2 éch. analysés Cemagref / organique, EPOC-LPTC, SE-CIRSEE : non encore réalisées.	Ech. stockés au SE- CIRSEE Préparation, diffusion et analyse à organiser	Cemagref / métaux et organique: 3 éch. analysés EPOC-LPTC : en cours SE-CIRSEE: non encore réalisées	Cemagref / métaux et organique, EPOC-LPTC : en cours SE-CIRSEE: non encore réalisées	Cemagref / métaux et organique, EPOC-LPTC, SE-CIRSEE: non encore réalisées
<b>Tâche 4</b>	Éch. non encore analysés. En attente d'une définition de protocole d'extraction des boues.	Éch. non encore analysés. En attente d'une définition de protocole d'extraction des boues.	INERIS : analyses réalisées. EPOC-LPTC et UMR8079 : analyses en cours.	INERIS, EPOC-LPTC et UMR8079 : analyses en cours.	INERIS, EPOC-LPTC et UMR8079 : analyses en cours.
<b>Tâche 7 (en laboratoire)</b>	INERIS : Essais sur éluat réalisés sur les boues en entrée et sortie de sécheur. EPOC-LPTC : Éch. non encore analysés. En attente de la définition d'un protocole d'analyse.	INERIS : Essais sur éluat réalisés sur les boues en entrée de compostage. EPOC-LPTC : Éch. non encore analysés. En attente de la définition d'un protocole d'analyse.	INERIS : Essais d'écotoxicité terrestre et aquatique non testés sur cet éch. EPOC-LPTC : Éch. non encore analysés. En attente de la définition d'un protocole d'analyse.	INERIS et EPOC-LPTC : Éch. non encore analysés.	INERIS et EPOC-LPTC : Éch. non encore analysés.

\* Enfin, le premier semestre 2011 a permis de préparer les premières campagnes longues (sur 1 mois) faisant intervenir tous les partenaires ECHIBIOTEB dont ceux mettant en œuvre les échantillonneurs intégratifs (**tâche 6**) et les bioessais *in vivo* (**tâche 7**). Le site finalement choisi pour ces premières campagnes longues est Bernières sur mer, avec étude du pilote de charbon actif de mi septembre à mi octobre, et étude de l'unité d'ozonation de mi octobre à mi novembre. La principale difficulté a été le dimensionnement et la mise en place du système d'exposition ex-situ pour les échantillonneurs intégratifs (tâche 6) et les bioessais *in vivo* (tâche 7).

Pour les bioessais *in vivo*, la configuration mise en place est la suivante : Les différents organismes (gammare, potamos, chironomes et larves de médakas) ont été exposés dans des « récipients obturés par un grillage », eux-même placés dans des seaux thermostatés (13°C pour le gammare et 22°C pour les autres organismes). Ces seaux ont été alimentés en continu soit par l'eau provenant de l'amont du traitement tertiaire, soit par l'eau provenant de l'aval, soit par de l'eau de FOS (eau témoin pour les gammare) ou de l'eau de ville (eau témoin pour les autres organismes). Etant donné la conductivité élevée des effluents, il est nécessaire de diluer l'eau arrivant dans les seaux. Pour ce projet, plusieurs dilutions ont ainsi été réalisées à l'aide de pompes péristaltiques (24 canaux). Afin d'assurer un bon mélange et une bonne oxygénation à l'intérieur des seaux, un

système de bullage a été mis en place. Enfin, des néons commandés par minuterie ont été utilisés pour assurer un cycle jour/nuit adapté aux organismes.

Pour les échantillonneurs intégratifs, la configuration mise en place est la suivante : POCIS et SPMD ont été exposés dans deux aquariums de 100 L, le premier étant alimenté par l'eau provenant de l'amont du traitement tertiaire, le second par l'eau provenant de l'aval. Afin d'obtenir des conditions d'exposition semblables, les deux aquariums ont été installés dans des bains-marie dont la température a été régulée en continu. De plus, afin d'assurer un débit identique dans les deux aquariums, ceux-ci ont été alimentés par une même pompe péristaltique (équipée de deux têtes de pompe).

## **D. Résultats obtenus pour la période concernée**

---

\* Le **livrable 2** (rédaction du cahier des charges présentant les tests préliminaires à prévoir, l'organisation des campagnes *in situ*, la préparation et la distribution aux différents partenaires des échantillons et des extraits à analyser) est réalisé. La version actuelle est cependant susceptible d'être mise à jour.

\* Le **livrable 21** (liste et critère de choix des molécules cibles pour adaptation du test "Matière organique") est réalisé. Le protocole du test rapide d'interactions entre MOD et micropolluants a été développé sur le pérylène, HAP très fluorescent et particulièrement adapté à cette mesure. Le protocole est aujourd'hui opérationnel et il est en cours de mise en œuvre à l'échelle microplaque. Il sera développé avec de nouveaux micropolluants, comme la carbamazépine en premier lieu.

\* Concernant les tests préliminaires pour les bioessais *in vitro* (**tâche 4**):

- Comparaison des extractions sur phase solide (SPE) et liquide/liquide (L/L) pour les échantillons d'eau : Les échantillons testés étaient globalement assez peu actifs, ce qui a limité la comparaison des performances des deux protocoles. Nous concluons cependant à des protocoles équivalents pour ce type d'échantillons assez peu chargés. La méthode SPE est finalement préconisée car elle a permis d'obtenir des blancs négatifs, elle est moins demandeuse en solvants et globalement moins fastidieuse que la méthode L/L.

- Comparaison des échantillons d'eau filtrés ou non : l'influence de la filtration préalable sur la réponse des tests a été évaluée sur l'échantillon de Bernière-sur-mer. Globalement, hormis une faible toxicité mesurée dans le test Microtox pour l'extrait brut, aucune incidence sur les effets mesurés n'a été observée, suggérant une faible contribution des matières en suspension.

\* Concernant les tests préliminaires pour les bioessais *in vivo* (**tâche 7**) :

- Le test Microtox appliqué aux boues : Les tests préliminaires réalisés ont permis de valider un protocole pour l'analyse des boues de STEP avec le test Microtox. Ce protocole dit «en phase solide » sera mis en œuvre pour la suite de l'étude.

- Les tests en laboratoire sur effluents (ceriodaphnies, algues et Microtox) : Les essais réalisés sur l'effluent tertiaire n'ont pas mis en évidence d'effets inhibiteurs significatifs sur les ceriodaphnies et algues, et n'ont donc pas permis de conclure sur le prétraitement à mettre en place. Idem avec le test Microtox : aucun résultat positif n'a été obtenu.

- Extraction sur phase solide vs liquide/liquide pour le Microtox : Des résultats positifs ont été obtenus pour un des échantillons testés (extrait liquide-liquide d'une eau de sortie de traitement IIIaire filtrée). Pour les eaux brutes, le protocole dit « 100%-

protocole » a été appliqué mais aucune toxicité n'a pu être mise en évidence. Pour les quelques échantillons testés, l'extraction liquide-liquide semble donc plus intéressante pour le test Microtox. Cependant, si le choix est finalement fait d'avoir des extraits communs entre Microtox et biotests *in vitro*, l'extraction sur phase solide pourrait être notre protocole de référence (encore à décider).

## **E. Difficultés rencontrées et solutions de remplacement envisagées**

- Nous pensions pouvoir exposer les échantillonneurs intégratifs (**tâche 6**) directement dans les influents et effluents des procédés étudiés. Nous n'avions pas prévu que les conditions en entrée et sortie de ces procédés étaient différentes et donc non comparables (les débits notamment). Nous avons dû repenser notre organisation et prévoir une exposition *ex situ* comme réalisé pour les bioessais *in vivo*. Ce contretemps n'a finalement pas induit de retard dans notre calendrier.

- Lors de la première campagne à Bernière sur mer, nous avons rencontré des problèmes de disjonctage liés à l'installation électrique. Afin d'éviter que ces problèmes ne se reproduisent lors de la deuxième campagne sur ce site (en mars 2012), plusieurs solutions à l'étude sont envisagées : faire venir un spécialiste pour vérifier le système électrique (à organiser avec l'exploitant et le responsable de l'électricité sur la région), ou prévoir un groupe électrogène en relais, ou demander un apport électrique à EDF.

- A propos des livrables 1 (planning définitif des campagnes) et 4 (choix définitif des sites et traitements optimisés à étudier) : Il est finalement difficile d'acter sur un planning définitif dès le démarrage du projet pour les 2 ans à venir (aléas dus à l'implication de nombreux partenaires, i.e. ceux du projet et les gestionnaires des stations d'épuration). Le planning et le choix des sites seront donc calés au fur et à mesure de l'avancée du projet (à ce jour : 6 campagnes réalisées, 3 déjà planifiées fin 2011 et début 2012, 4 restant à planifier en 2012).

## **F. Faits marquants et, le moment venu, livrables externes réalisés**

- Le consortium s'est réuni le 15 septembre 2010 à Paris pour un premier contact entre tous les partenaires et une remise en mémoire du contenu du projet. Une deuxième réunion plénière a été organisée le 28 septembre 2011 à Paris.

- L'équipe Envulure a mis au point une première version d'un prototype de test au format microplaque pour la détection rapide et sur site des interactions entre MOD et micropolluants. Envulure envisage la possibilité d'un dépôt de brevet sur ce test.

\* Liste des communications prévues :

- C Miège, F Serveto, R Jacquet, O Geffard, J-M Choubert, A Bruchet, M Esperanza, S Besnault, S Martin, H Budzinski, J Cachot, M-H Devier, S Aït-Aïssa, P Pandard, Y Levi, L Oziol, S Karolak, Y Dudal, N Pautremat, M Coquery, Outils innovants d'Echantillonnage, d'analyses CHImiques et BIOlogiques pour le suivi de Traitements avancés des Eaux usées et des Boues (ECHIBIOTEB) (**poster**), 6èmes journées Ecotechnologies 2011, 8-10 novembre 2011, Paris

## G. Cadre réservé au coordinateur

Les échanges au sein du consortium sont nombreux et fructueux ; ils ont permis la mise en place (i) de tests préliminaires pour le calage des outils et (ii) des premières campagnes in situ pour l'application de ces outils. Aucun retard à signaler pour ce début de projet.

Accord du coordinateur pour la poursuite du financement de chaque partenaire.

## H. CDD recrutés

*Pour les projets concernés, fournir la liste des CDD recrutés par les établissements publics dans le cadre du projet.*

Partenaire concerné	Nom	Prénom	Qualifications	Date de recrutement	Durée du contrat (en mois)
Cemagref	Serveto	Fabienne	Ingénieur d'Etude	Décembre 2010	24 mois
EPOC-LPTC	Landi	Laure	Assistant Ingénieur	Septembre 2011	6 mois

## I. Pôles de compétitivité

Le projet ECHIBIOTEB a été labellisé par le pôle de compétitivité Axelera (abondement de 12 000 €). Le complément de financement sera utilisé notamment pour l'organisation d'un colloque de restitution final.

## J. Accord de consortium <sup>1</sup>

La rédaction d'un accord de consortium est en cours au Cemagref de Lyon (concertation organisée avec les partenaires par email). La diffusion pour relecture de cet accord de consortium par tous les partenaires du projet ECHIBIOTEB est prévue d'ici la fin de l'année 2011. La signature de l'accord de consortium par tous les partenaires sera donc finalisée dans les délais imposés, i.e. pour le 17 mars 2012.

<sup>1</sup> Rappel : règlement financier de l'ANR (Ert. 2.4) : « Dans le cas des projets menés en partenariat avec au moins un bénéficiaire de droit privé, un accord de consortium précisant les droits et obligations de chaque partenaire, au regard notamment de la valorisation des résultats obtenus au terme des recherches et de leur propriété intellectuelle, devra être fourni dans le délai maximum d'un an après le démarrage du projet.

La non fourniture de ce document pourra conduire à la cessation du financement du projet.

Dans le cas des projets menés en collaboration uniquement entre des établissements publics, les bénéficiaires sont invités à fournir un tel accord.

Dans tous les cas, l'élaboration d'un accord de consortium n'est pas nécessaire s'il existe déjà un dispositif intégré faisant l'objet d'un contrat ou d'un contrat-cadre liant les bénéficiaires dans le domaine du projet. »

### Annexe 1 : Compte rendu de la réunion ECHIBIOTEB, 15 sept 2010, Paris

#### Présents :

Jérôme Cachot, Marie-Hélène Devier (LPTC, univ. Bordeaux 1)  
Mar Esperanza, Auguste Bruchet (Suez-Environnement)  
Yves Dudal (Envolure)  
Selim Ait-Aïssa (INERIS)  
Cécile Miège, Fabienne Serveto, Romain Jacquet, Jean-Marc Choubert, Marina Coquery (Cemagref)  
Lucie Oziol (matin), Yves Levi (après-midi) (Univ. Paris Sud)  
Stéphane Garnaud, Pierre-Francois Staub (Onema)

#### Ordre du jour :

- \* 9h30-9h45 : Rappel concis du contenu du projet (objectifs, outils, tâches, responsables, livrables,...) et aspects administratifs (budget, convention de partenariat, ...) - C Miège
- \* 9h45-11h00 : Présentation de chaque partenaire du projet (présentations concises des activités/domaines de compétence, rôle/outils mis en œuvre dans le projet, questions sur le projet), 15 min de présentation + 5 min de question :
  - SE-CIRSEE (A Bruchet)
  - EPOC-LPTC (MH Devier et J Cachot)
  - INERIS (S Aït-Aïssa)
- \* 11h00-11h15 : Pause café
- \* 11h15-12h30 : Suite de la présentation des partenaires du projet
  - UMR 8079 (L Oziol)
  - ENVOLURE (Y Dudal)
  - Cemagref (C Miège et JM Choubert)
- \* 12h30-14h00 : Pause repas
- \* 14h00-14h30 : Présentation du projet ARMISTIQ (= suite du projet AMPERES, lié au projet ECHIBIOTEB) – M Coquery et JM Choubert
- \* 14h30-16h30 : Préparation du cahier des charges pour l'organisation des campagnes de terrain (dates, paramètres/outils mesurés, lieux des campagnes, nombre et types d'échantillons, répartition des tâches, personnes mobilisables sur site, ...).

#### Relevé de décisions :

- C Miège doit faire circuler le premier projet de convention de partenariat scientifique à tous les partenaires pour validation, d'ici mi octobre.
- M Coquery doit faire circuler les informations concernant les rapports d'avancement à rendre à l'ANR (périodicité, format, ...), dès que possible. Ces rapports, très concis, seront finalisés et transmis à l'ANR par C Miège.

- Chaque fin d'année, chaque partenaire devra faire son bilan financier et le transmettre directement l'ANR.
- M Coquery (resp. tâche 2) doit faire une première proposition des procédés / sites / planning / conditions optimisées d'ici le 15 octobre. Il faudrait que les campagnes ne commencent pas avant le deuxième trimestre 2011 afin de laisser le temps de mener les expérimentations préliminaires.
- M Coquery (resp. tâche 2) doit vérifier la liste des molécules / type d'échantillon / partenaires impliqués, donnée en annexe 1 du cahier des charges, d'ici fin octobre.
- Chaque partenaire et responsable de tâche doit relire le cahier des charge et renseigner les éléments le concernant (éléments surlignés en bleu), d'ici fin octobre.
- Chaque partenaire et responsable de tâche doit réfléchir si besoin de prévoir d'autres tests préliminaires que ceux identifiés dans le paragraphe III du cahier des charges, d'ici fin octobre.
- C Miège propose, d'ici le 15 octobre, une liste de molécules cibles à tester dans la tâche 8 (interaction avec matière organique) en essayant de garder des représentants pour chaque famille de molécules.

**Annexe 2 : Compte rendu de la réunion ECHIBIOTEB, 15 sept 2010, Paris**  
**- projet ECHIBIOTEB (ANR ECOTECH 2010)**  
**Paris La défense – 28 septembre 2011**

**Présents :**

Cemagref : M. Coquery, O Geffard, C. Miège, F. Serveto  
Envolure : Y. Dudal  
EPOC-LPTC : H. Budzinski, J. Cachot  
INERIS : S. Ait-Aissa, E. Maillot-Maréchal, P. Pandard  
ONEMA : S Garnaud, O Perceval  
Suez Environnement : S. Besnault, A. Bruchet, S. Martin, N. Noyon  
Univ Paris Sud : M Bimbot, Y Lévi, L Oziol

**Compte rendu de la réunion et relevé de décision :**

- [Cécile Miège doit diffuser à tous les partenaires le « rapport à 6 mois »](#) du projet début octobre.

- Accord de consortium : La préparation de ce document est en cours au Cemagref de Lyon. La diffusion pour relecture de cet accord de consortium par tous les partenaires du projet ECHIBIOTEB est prévue d'ici la fin de l'année 2011. La signature de l'accord de consortium par tous les partenaires sera donc finalisée dans les délais imposés, i.e. pour le 17 mars 2012. La juriste qui gère cet accord de consortium au Cemagref est Patricia Noël-Chemali.

- Afin de mettre à disposition les diaporamas de la journée, [tout le monde doit envoyer sa présentation à Cécile Miège](#). L'ensemble de ces présentations sera diffusée avec le CR de la réunion, et sera déposé sur le site web en construction (accessible au consortium).

- Discussions sur la représentativité de l'échantillonnage moyenné 2h :

La question de cette représentativité est posée pour les campagnes longues de 1 mois. Les variations journalières des concentrations en micropolluants ne sont pas prises en compte actuellement. Cela peut poser problème pour la comparaison avec les biotests *in vivo*. L'échantillonnage intégratif permet de répondre, en partie, à cet aspect de représentativité. Mais, il serait quand même utile (notamment pour l'interprétation des résultats issus des échantillonneurs intégratifs) de faire des analyses supplémentaires chimiques ciblées sur des échantillons moyennés 24h. Idem pour les biotests *in vitro* et le lien avec les biotests *in vivo*.

Autre alternative à l'échantillonnage 24h : Tester 4 échantillons moyennés 2h à répartir dans la journée.

C Miège et F Serveto (aidées de JM Choubert) réfléchissent à la faisabilité du prélèvement moyen 24h et à [une manipe sur le sujet de la représentativité des échantillons 2h](#) ; elles échangent avec les partenaires avant de décider de la marche à suivre. Cette manipe doit être organisée pour la prochaine campagne longue à Bernières sur mer.

- Pour la prochaine campagne longue à Bernière sur mer, et en fonction des résultats de la première campagne, prévoir [un système d'agitation dans les aquarium des échantillonneurs intégratifs](#). Voir si possible de transposer l'agitation du système de calibration des POCIS en laboratoire + modifier la disposition des POCIS. A réfléchir / murir par Cécile Miège, Romain Jacquet, Hélène Budzinski.

Attention à garder en plus la configuration de la campagne 1, pour rester comparable entre la campagne 1 et 2 sur Bernières sur mer.

- Avant la prochaine campagne longue à Bernière sur mer, prévoir de **faire venir un spécialiste pour vérifier le système électrique**. A organiser par F Serveto avec l'exploitant et le responsable de l'électricité sur la région (Mr Legrand). Voir si intéressant de prévoir un groupe électrogène en relais pour la prochaine expérimentation. Ou encore, demander un apport électrique à EDF (suggestion d'O Geffard hors réunion).

- C Miège et F Serveto doivent voir si possible de faire des **échantillonnages supplémentaires pour les biotests *in vitro* lors des prochaines campagnes longues** (à J14 et J28 en plus de J0). Ceci ne représente pas de contraintes lourdes pour les laboratoires mettant en œuvre ces biotests, mais la contrainte est plus lourde pour le Cemagref qui prépare les extraits communs.

- Consignes générales à suivre lors des prochaines campagnes :

- Attention aux personnes sur le terrain à **bien coder les POCIS et SPMD avec PRC et sans PRC**, de façon à éviter les « mauvaises surprises » sur les résultats des biotests *in vitro* et des analyses chimiques ciblées.
- Compte tenu du faible volume d'extrait d'échantillonneur intégratif prévu pour les biotests *in vitro* (contrainte de place sur le terrain), il faudra **pré-cibler le type de biotest *in vitro* à réaliser sur les extraits d'échantillonneurs intégratifs**, en fonction des résultats préalables sur les échantillons d'eau.
- Pour les **biotests *in vitro***, il faudrait (quand c'est possible) faire **des triplicats d'échantillonneurs intégratifs** lors des prochaines campagnes (au moins quand il y a la place disponible, par exemple dans le cas d'exposition directement dans le canal de la station).
- Attention à bien **mesurer le débit dans les aquarium** des échantillonneurs intégratifs.
- Attention à **réaliser les biotests *in vivo* en laboratoire sur les boues non tamisées et non débarrassées des copeaux**. On choisit de ne pas modifier le produit reçu, on garde les copeaux (même si effet de dilution) car c'est le produit épandu.
- Attention à **réaliser les biotests *in vivo* en laboratoire sur les eaux filtrées** (GFF Whatman 0,7 µm calciné).

- **D'ici la fin de l'année** et pour préparer la prochaine campagne longue de Bernières sur mer (repoussée à mars 2012), **chacun doit faire** le point sur ses premiers résultats, sous la forme d'**un mini rapport à envoyer, via les responsables de tâche, à C Miège**. Il s'agit, en particulier, des résultats :

- de mesure d'accumulation de micropolluants dans les POCIS (Hélène Budzinski),
- de biologie *in vivo* et *in vitro*, sur eaux et sur extraits POCIS et SPMD (Selim Ait-Aissa, Jérôme Cachot, Olivier Geffard, Y Levi, Pascal Pandard).

Dans ce mini rapport, faire ressortir dans les conclusions : les questions en suspend et donner un avis sur « prêts ou non pour réaliser la prochaine campagne », et si non pourquoi.

- A propos des tests préliminaires pour biotests *in vitro* (Sélim Aït-Aissa) :

- Il reste à **finaliser l'interprétation des résultats sur un aspect plus quantitatif**. Il faudra donner une valeur d'équivalent toxique dans l'échantillon de départ. L'extraction liquide/liquide donne des faux positif (pour les blancs).
- **Décider si utile ou non de tester/comparer un protocole SPE méthanol et SPE méthanol/dichlorométhane**, pour la prochaine campagne de Bernières sur mer.

- [Manipes test NALGENE](#) en cours pour la démarche EDA (planifiée entre EPOC-LPTC et l'INERIS, réalisée fin 2011, début 2012).
- A propos des tests préliminaires pour le Microtox appliqué aux boues (J Cachot) :
- De façon à pouvoir comparer le test Microtox avec les biotests *in vitro*, il faudrait [tester le Microtox sur des extraits organiques préparés pour les biotest in vitro](#).
  - Par ailleurs, il est décidé en séance de [réaliser le test Microtox sur boues fraîches](#) (selon préconisation d'utilisation du test). Pour information, Hélène Budzinski mentionne un projet qui a permis de montrer que les résultats sur boues lyophilisées sont plus homogènes que sur boues fraîches.
  - [Tester le Microtox sur les éluutriats de boue de P Pandard](#) (pour comparaison). A organiser par J Cachot et P Pandard.
- F Serveto doit re-[préciser à P Pandard et J Cachot le planning d'arrivée des échantillons frais](#) dans leurs laboratoires.
- Screening par [GC-2D-MS\(TOF\)](#) : Prévoir que [des screening devront être réalisés lors de la démarche EDA](#), dans un 2<sup>ème</sup> temps.
- Rappel de ce qui a été décidé sur la [démarche EDA](#) : La sélection des échantillons sur lesquels il faudra réaliser la démarche EDA ne peut se faire qu'à posteriori. Cela concerne les échantillons d'eaux, boues et extraits d'échantillonneurs pour lesquels une bioactivité aura été détectée dans un premier temps. Donc, dans un premier temps, nous avons prévu le stockage (au LPTC, dans du nalgène) des échantillons des campagnes ECHIBIOTEB mettant en jeu des pilotes. Pour les autres campagnes (hors pilote), on pourra organiser de nouvelles campagnes d'échantillonnage après sélection des sites présentant un intérêt.
- Les [boues](#) prélevées lors des précédentes campagnes sont actuellement [stockées congelées au SE-Cirsee](#). Cécile Miège doit décider, en concertation avec les personnes concernées de ce qu'on en fait (où les stocker, comment les préparer –broyage, séchage - et puis les répartir ?).
- Les [questions restées en suspend](#) : Il faut organiser les échanges pour que des décisions soient prises sur :
- Le choix de protocoles pour l'extraction des échantillonneurs (POCIS et SPMD pour les analyses chimiques ciblées réalisées au SE-CIRSEE, SPMD pour les screening chimiques réalisés au SE-CIRSEE, SPMD pour les biotests *in vitro*, SPMD pour la démarche EDA). [C Miège organise les échanges pour décider sur les SPMD, et H Budzinski sur les POCIS](#).
  - Choix de protocoles pour l'extraction des boues pour les biotests *in vitro*, [S Aït Aïssa organise les échanges pour décider](#).
  - Organisation des tests MOD *in situ* [Yves Dudal organise les échanges nécessaires](#).
- Les [tests MOD](#), compte-rendu de la discussion téléphonique entre Cécile Miège et Yves Dudal (du 3 octobre) :
- Les tests pourront être réalisés [sur le Cu](#),
  - Envulure est intéressé à [développer le test sur différentes molécules fluorescentes du projet ECHIBIOTEB](#) (représentatives des grandes familles de composés). Ce développement sera réalisé tout au long du projet, et pas uniquement la première année. Pour ne pas perdre les bénéfices des premières campagnes, et tester sur toutes les molécules pour tous les échantillons, ceux-ci seront conservés congelés.

- Initialement le test n'était prévu que sur les échantillons des campagnes longues. Pour peaufiner le développement du test, le Cemagref doit envoyer [aussi les échantillons des campagnes courtes](#).
- Les informations sur les [concentrations en carbone organique dissous](#) sont primordiales pour interpréter le test.
- Envoleure envisage la possibilité d'[un dépôt de brevet](#) sur ce test.

- [Prochaine réunion](#) avec tout le consortium : à planifier pour [fin mai](#) 2012. Cécile Miège propose un « doodle » pour fixer la date début janvier 2012.