



Etude de la contamination des estuaires de la Seine, de la Gironde et de l'Adour par les substances pharmaceutiques : Présence, Devenir et Impact Toxicologique

Study of the contamination of Seine, Gironde and Adour estuary by pharmaceuticals : Presence, Fate and toxic impact.

**APPEL A PROPOSITIONS DE RECHERCHE
sur le Littoral (LITEAU 2)**

**APPEL DU 10 JUIN 2003
RAPPORT DE FIN DE CONTRAT**

Responsable scientifique :

Dr. Hélène Budzinski, Directeur de Recherches CNRS
Institut des Sciences Moléculaires (ISM) – UMR 5255 CNRS
Laboratoire de Physico- et Toxico-Chimie de l'Environnement (LPTC)
Université Bordeaux I
351 crs de la Libération, 33405 Talence
Tél : 05 40 00 69 98 ; Fax : 05 40 00 22 67
e-mail : h.budzinski@ism.u-bordeaux.fr

Date : 10/03/2008

N° de contrat : 19-G/2003 réf ACCORD N° CV4000015
Date du contrat : Avril 2004-Octobre 2007

Synthèse

Etude de la contamination des estuaires de la Seine, de la Gironde et de l'Adour par les substances pharmaceutiques : Présence, Devenir et Impact Toxicologique

Study of the contamination of Seine, Gironde and Adour estuary by pharmaceuticals : Presence, Fate and toxic impact.

**APPEL A PROPOSITIONS DE RECHERCHE
sur le Littoral (LITEAU 2)**

**APPEL DU 10 JUIN 2003
RAPPORT DE FIN DE CONTRAT**

Responsable scientifique :

Dr. Hélène Budzinski, Directeur de Recherches CNRS
Institut des Sciences Moléculaires (ISM) – UMR 5255 CNRS
Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'Environnement (LPTC)
Université Bordeaux I
351 crs de la Libération, 33405 Talence
Tél : 05 40 00 69 98 ; Fax : 05 40 00 22 67
e-mail : h.budzinski@ism.u-bordeaux.fr

Partenaires **Dr. Joëlle Forget-Leray, MC Université du Havre**
Laboratoire d'Ecotoxicologie - Milieux Aquatiques (LEMA)
UPRES-EA 3222 ; IFR 23 - Université du Havre
25 rue Philippe Lebon, BP 540, 76058 Le Havre CEDEX
Tél : 02 32 74 43 79 ; Fax : 02 32 74 43 14

Etude de la contamination des estuaires de la Seine, de la Gironde et de l'Adour par les substances pharmaceutiques : Présence, Devenir et Impact Toxicologique

I- CONTEXTE GENERAL

Les substances pharmaceutiques sont des composés synthétiques d'usage très répandu (http://afssaps.sante.fr/pdf/5/rapport_vente_medicament_chiffre_2006.pdf), créés pour avoir un effet biologique thérapeutique. A côté des principaux contaminants chimiques de l'environnement, on trouve des substances telles que des stéroïdes synthétiques (œstradiol, testostérone) utilisés dans de nombreux traitements hormonaux. On trouve également divers médicaments de type anti-dépresseur (diazépam, amitriptyline), analgésique (ibuprofène, paracétamol, diclofénac), antibiotique (Hirsch et al., 1999) (néomycine, chloramphénicol, tétracyclines...), hypolipémiant (Metcalf et al., 2003) (acide clofibrrique, gemfibrozil). Ces différentes molécules actives sont consommées en quantités très importantes dans notre société occidentale, comme le rappelle le Tableau 1, indiquant une estimation des consommations en France, Royaume-Uni, Allemagne, Danemark pour certains composés (Beausse, 2004). Ces produits sont rejetés *in fine* dans le milieu aquatique *via* les stations d'épuration (Halling-Sorensen et al., 1998) (destruction incomplète). Actuellement peu étudiés, ils peuvent présenter un risque environnemental non négligeable si l'on considère d'une part les quantités potentiellement apportées au milieu aquatique et d'autre part le fait qu'ils ont été fabriqués pour être biologiquement actifs.

Ces composés sont retrouvés dans l'ensemble des compartiments aquatiques de l'environnement, que ce soit dans les rejets de station d'épuration (Farré et al., 2001 ; Herberer, 2002), dans les eaux de surface (Ollers et al., 2001), ou encore pour certains composés, dans les eaux de boisson (Tauxe-Wuersch et al., 2005). Cette présence de plus en plus fréquente a amené les chercheurs à s'intéresser d'une part aux effets que ces composés pourraient avoir sur des espèces non cibles (Cleuvers, 2003 ; Laville et al., 2004) ainsi qu'aux risques encourus pour une exposition chronique, que ce soit pour les organismes du milieu aquatique (Sanderson et al., 2004) ou pour les hommes (Jones et al., 2002 ; Schulman et al., 2002).

Classe thérapeutique	Composés	Royaume-Uni	France	Danemark	Allemagne
Anti-inflammatoires, Analgésiques	Paracétamol	390	2294	248	
	Aspirine	18	880	213	
	Ibuprofène	162	166	34	105
	Diclofénac	26			75
Hypolipémiant	Gemfibrozil				6
Antidépresseurs	Fluoxétine	2			
	Carbamazépine	40	38		38

Tableau 1 : Consommation en substances pharmaceutiques (données en tonnes par an, selon Beausse (2004)).

Ces composés sont susceptibles d'avoir des effets toxiques importants (Ferrari et al., 2003), mais s'il existe à l'heure actuelle des données dans différents pays concernant la contamination effective des milieux aquatiques par ces molécules, elles sont plus rares en ce qui concerne la situation française (et l'était encore plus en 2003). De plus à notre connaissance aucune étude ne s'était au moment de l'appel d'offre intéressée au milieu estuarien ou marin côtier.

C'est dans ce contexte général que le projet «Etude de la contamination des estuaires de la Seine, de la Gironde et de l'Adour par les substances pharmaceutiques : Présence, Devenir et Impact Toxicologique» a été présenté au programme LITEAU 2.

II- OBJECTIFS GENERAUX DU PROJET

L'objectif général de ce travail concernait donc l'étude des substances pharmaceutiques (hormones synthétiques, analgésiques, antidépresseurs et hypolipémiants) dans différents environnements estuariens et côtiers. L'étude a couplé des approches terrain et des travaux en laboratoire. L'étude couplait des travaux de chimie analytique environnementale et de toxicochimie. La partie « Chimie analytique environnementale » a été assurée par l'Université Bordeaux I et la partie « Toxicochimie » a été assurée par l'Université du Havre.

Les travaux effectués durant la première phase devaient permettre de développer des outils méthodologiques analytiques et de les appliquer à un inventaire de la pollution des estuaires de la Seine, de l'Adour et de la Gironde par les substances pharmaceutiques ainsi qu'à une étude du devenir de ces composés dans l'environnement et plus particulièrement du rôle des particules et de la matière organique dans le transfert et/ou le devenir de ces composés dans l'environnement aquatique. La possibilité d'utiliser des capteurs passifs pour caractériser la contamination de la phase dissoute devait également être testée.

Dans une seconde phase, il s'agissait de mettre en œuvre des études d'impact sur des organismes en microcosmes pour élucider les mécanismes de toxicité liés à ces composés. Dans l'optique de développer des outils de surveillance de la qualité de l'eau, nous avons choisi *Eurytemora affinis*, comme l'espèce idéale pour se lancer dans une approche intégrée utile au diagnostic environnemental dans les zones estuariennes. Cette approche est essentielle pour comprendre à différents niveaux d'organisation biologique, les effets des contaminants organiques sur le copépode *Eurytemora affinis*, depuis la réponse protéique par l'analyse du protéome ou la mesure d'activité enzymatique, jusqu'à la réponse des individus *via* des expériences de reproduction.

Ce rapport présente donc un bilan des travaux de la première phase concernant les développements méthodologiques ainsi que les résultats des « screenings » environnementaux et un bilan de ceux de la seconde phase concernant l'étude écotoxicologique.

III- QUELQUES ELEMENTS DE METHODOLOGIE (ET EVENTUELLES DIFFICULTES RENCONTREES)

Les travaux développés ont couplé plusieurs types d'approche. Des expérimentations ont été conduites en laboratoire (notamment en ce qui concerne l'étude de la contamination d'*E. Affinis* choisi comme organisme modèle). Des expérimentations ont également été conduites en laboratoire pour développer les méthodologies analytiques pour les différents types de matrices ciblées : phase dissoute, phase particulaire, sédiment, organismes. Une grande partie du travail a aussi consisté à développer en laboratoire les échantillonneurs passifs.

Ensuite l'ensemble des développements analytiques ont été appliqués au suivi dans le milieu naturel de la contamination des milieux aquatiques estuariens et marins. Les échantillonneurs intégratifs ont été testés en estuaire de Seine mais également en milieu marin en Méditerranée.

Parmi tous les objectifs annoncés un seul n'a pu être accompli : celui consistant à étudier l'interaction Matière Organique Dissoute et Contaminants. En effet du fait de la

présence de sel et de la faible quantité de matière organique présente dans les milieux étudiés il ne nous a pas été possible de mener à bien ce volet. Néanmoins des travaux ont été menés dans le cadre de la thèse d'Université d'A. Huguet soutenue en décembre 2007 sur de nouveaux procédés de concentration et de dessalement pour l'étude de la matière organique dissoute. Ces travaux ouvrent des pistes intéressantes qu'il nous reste à explorer pour l'étude des interactions. Cela est d'ores et déjà prévu et initié au travers des travaux de doctorat de C. De Perre (démarré en octobre 2006). Nous testons également une méthode basée sur la SPME/GC/MS pour approcher ces interactions dans le cadre de cette thèse.

Remarque sur l'articulation avec d'autres programmes et sur les différents financements :

Ce projet a été conduit en conjonction avec d'autres projets de recherche dans d'autres programmes de recherche (Seine Aval, Projet Européen SWIFT et Projet Région ORQUE (Observatoire Régional de la Qualité de l'Environnement)).

Le programme Seine Aval a financé les études concernant l'estuaire de Seine (étude environnementale). Le financement LITEAU a permis d'étudier d'autres systèmes : estuaire de la Gironde, de l'Adour, l'Hérault, Cortiou. Ainsi les développements analytiques initiés par Seine Aval ont pu être complétés dans le cadre de LITEAU et valorisés au cours de ce projet LITEAU. LITEAU a permis de financer les développements concernant les échantillonneurs intégratifs qui n'étaient pris en charge par aucun autre programme. Le projet ORQUE a financé exclusivement la bourse de thèse de Anne Togola ainsi qu'une partie de l'équipement nécessaire au projet (GC/MS/MS ; un LC/MS/MS a été acquis par la suite mais du fait du calendrier n'a malheureusement pas pu être utilisé dans le cadre de LITEAU). Dans le cadre du projet SWIFT nous avons pu tester les échantillonneurs développés dans le cadre de LITEAU sur des sites intéressants (mais en eau douce) car bien documentés en termes de contamination et de débit : le Rhin, la Meuse, le Tevere. SWIFT et LITEAU apparaissent donc complémentaires. Enfin LITEAU a permis de financer l'approche écotoxicologie sur *E. Affinis*, Seine Aval finançant la même approche mais sur des contaminants plus classiques (HAP, PCB, nonylphénol).

IV- RESULTATS OBTENUS

La première phase des travaux a abouti au développement des différentes méthodologies analytiques nécessaires à l'étude de la contamination des différents compartiments par les substances pharmaceutiques. Ces travaux ont été conduits en partie dans le cadre de ce projet mais également en conjonction avec d'autres projets de recherche dans d'autres programmes de recherche (Seine Aval, Projet Européen SWIFT et Projet Région ORQUE (Observatoire Régional de la Qualité de l'Environnement))

Deux nouveaux outils ont été étudiés : La SPME (Solid Phase Micro-Extraction) et le système d'échantillonnage passif intégrateur POCIS (Polar Organic Compound Integrative Sampler). La SPME a donné des résultats prometteurs mais la technique associée à la GC/MS est apparue limitée en terme de sensibilité (limite de détection de l'ordre du $\mu\text{g/L}$). De nouveaux développements sont à envisager associant l'utilisation de la GC/MS/MS et la SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction)

L'outil d'échantillonnage POCIS (échantillonnage intégratif) est prometteur et présente de nombreux avantages face à l'échantillonnage par prélèvements ponctuels. Il permet la détection de composés présents à un niveau de concentration proche ou inférieur aux limites de détection des techniques analytiques et donc difficilement identifiables par échantillonnage classique. Cependant, l'application au milieu environnemental a soulevé

plusieurs questions quant à l'utilisation de cet échantillonneur en tant qu'outil quantitatif. Il est notamment apparu que sur une longue période d'exposition (30 jours), l'échantillonneur paraît difficilement utilisable dans l'optique de réaliser une étude quantitative de la contamination d'un milieu. En effet, les problèmes liés au débit donc aux flux de composés demandent des études préliminaires en laboratoire très importantes en termes de matériel et d'installation d'un système mimant le milieu naturel. De plus, sur une période d'exposition prolongée, les phénomènes d'encrassement des membranes peuvent considérablement influencer l'accumulation des composés et donc biaiser les résultats. Enfin, la probable dégradation des composés une fois séquestrés dans la phase peut fausser l'interprétation des résultats. En tant qu'outil qualitatif sur du long terme, cet outil paraît néanmoins applicable aux composés dont la rémanence est importante. Sur une courte période d'exposition, de l'ordre de quelques jours à environ deux semaines, ces phénomènes seront limités et ce type d'échantillonneur peut se révéler très intéressant en tant qu'outil de « screening » notamment dans le cadre d'études de rejets de STEP, où les concentrations sont élevées et où le temps nécessaire à l'accumulation est donc faible. Du fait d'un effet matriciel très limité cet outil permet également la mise en évidence de produits non ciblés.

Le screening environnemental a permis de qualifier la contamination de différents estuaires ou environnements côtiers (Bassin d'Arcachon, Calanque marseillaise). Les protocoles développés ont été appliqués aux suivis de différents milieux aquatiques permettant d'effectuer une première estimation du niveau global de contamination des milieux aquatiques français, comme les estuaires atlantiques (Seine, Gironde, Adour). Nos travaux ont permis de montrer une réelle, bien que souvent assez faible, contamination des milieux littoraux par les substances pharmaceutiques. Des études plus focalisées ont permis de documenter le comportement de ces substances émergentes de leur point d'introduction à leur dissémination dans le milieu (cas de la Jalle d'Eysines et de la Calanque de Cortiou).

L'étude ciblée sur l'estuaire de la Seine a permis de mettre en évidence les phénomènes de dégradation dans un écosystème complexe, ainsi que d'identifier qualitativement et quantitativement les principales sources d'apports. La présence de composés pharmaceutiques dans la Baie de Seine a été montrée, même si les niveaux de contamination restent très faibles. De grandes fluctuations ont été mises en évidence, à la fois dues aux composés, aux conditions saisonnières et aux niveaux fluctuants de consommation.

Actuellement, diverses études essaient de modéliser l'introduction et le devenir de ces composés dans l'environnement. Les données environnementales produites dans ce projet, obtenues sur différents milieux, dans différentes conditions saisonnières sont un important apport à ce type de recherche. La validation de différents modèles (SIMUSA, GREAT-ER, <http://www.great-er.org>) nécessite la comparaison des « PEC » (Predicted Environmental Concentration) et des « MEC » (Measured Environmental Concentration). Ces concentrations « prédites », utilisées dans toutes les définitions de normes et législations nécessitent un ajustement permanent afin d'être les plus réalistes possibles.

L'étude des variations saisonnières a mis en évidence des fluctuations importantes et des phénomènes de dégradation qui devront à l'avenir être pris en considération. L'étude des produits de dégradation tant par dégradation bactérienne que par photooxydation apparaît une priorité pour le futur.

Le rôle de la phase particulaire est à ce jour encore négligé dans la problématique des substances pharmaceutiques. Néanmoins ce travail a mis en évidence le rôle que ce compartiment pouvait jouer, notamment dans la dissémination de la charge contaminante. Les niveaux élevés mesurés peuvent ainsi jouer un rôle dans la contamination des organismes aquatiques, exposés à la fois par la voie cutanée et respiratoire (phase dissoute) et par la voie trophique (alimentation). Les capacités de bioaccumulation de certains composés

pharmaceutiques ont été mises en évidence lors des études en laboratoire, montrant des différences de comportement selon le type d'exposition (conditions immergées ou tidales).

La deuxième phase des travaux a concerné l'étude du transfert des composés et l'étude des phénomènes toxiques en microcosmes sur *Eurytemora affinis*.

Dans l'optique de développer des outils de surveillance de la qualité de l'eau, nous avons choisi *Eurytemora affinis*, comme l'espèce idéale pour se lancer dans une approche intégrée utile au diagnostic environnemental en Estuaire de Seine. Cette approche est essentielle pour comprendre à différents niveaux d'organisation biologique, les effets des contaminants organiques sur le copépode *Eurytemora affinis*, depuis la réponse protéique par l'analyse du protéome ou la mesure d'activité enzymatique, jusqu'à la réponse des individus *via* des expériences de reproduction.

Cette action menée dans le cadre du programme LITEAU 2003 s'est articulée en trois parties. Le premier objectif était d'évaluer les transferts de médicaments présents en estuaire de Seine (carbamazépine et éthynyloestradiol) ; ils ont été analysés expérimentalement par des expositions en flux continu depuis la phase dissoute vers le copépode *Eurytemora affinis*. Les capacités de ces copépodes à éliminer ces contaminants accumulés ont également été suivies en parallèle. Il est ainsi apparu, après exposition à un flux continu, que le copépode *Eurytemora affinis* était capable d'accumuler l'éthynyloestradiol, et qu'en parallèle on observait une induction de la synthèse d'un précurseur hormonal la pregnenolone, ce qui laisse supposer des perturbations endocrines. Par ailleurs, suite à une période de décontamination de une semaine, cette espèce est également capable d'éliminer le EE2, préalablement accumulé *in situ* notamment.

Dans un deuxième temps des travaux ont été consacrés aux effets de ces contaminants sur ce copépode à différents niveaux d'organisation biologique (physiologique et biochimique). Cette recherche s'est concentrée sur la recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition chez le copépode *Eurytemora affinis*. Des techniques d'électrophorèse bidimensionnelle couplées à des techniques de chimie analytique ont été utilisées pour analyser les effets d'exposition des copépodes en flux continu à deux familles de médicaments sur l'expression de leur protéome. L'utilisation de ces techniques permet en effet d'avoir une vision générale des processus physiologiques et des cascades de réactions biochimiques mis en jeu par un organisme soumis à différents types de stress. L'étude du protéome de ce copépode après exposition à ces médicaments a par ailleurs montré que de nombreuses protéines étaient différentiellement exprimées. Des réponses spécifiques ont pu être notées pour chaque contaminant. Ainsi, pour la carbamazépine et l'éthynyloestradiol, ces protéines sont majoritairement surexprimées. L'identification de ces protéines d'intérêt par séquençage nous a permis de mettre en évidence essentiellement dans le métabolisme énergétique, mais également des protéines intervenant dans la gestion de stress aussi bien physiologique que chimique (63 KDa chaperonin, HSP 60...), des protéines intervenant dans la régulation du cycle cellulaire (HSCO qui inhibe la régulation de l'apoptose par la P53), des protéines intervenant dans la détoxification cellulaire (20 S proteasome intervenant dans la lutte contre le stress oxydatif) et enfin des protéines intervenant dans la protection de l'intégrité cellulaire (aconitase qui joue un rôle dans le métabolisme mitochondrial mais qui permet également la suppression des mutations de l'ADN mitochondrial).

Enfin des indices d'éventuelles perturbations endocriniennes dues aux médicaments, notamment l'éthynyloestradiol et la carbamazépine qui pourraient affecter le potentiel reproducteur de cet invertébré, ont été recherchées. Des études expérimentales *in vivo* ont été menées pour affiner les connaissances sur les mécanismes d'action de ces médicaments à travers des expositions simples sur un ou deux cycles de reproduction. Ces travaux montrent que ces médicaments tels que la carbamazépine et l'EE2 peuvent perturber ou annihiler les

transformations et mues à des doses sans effets observables. De plus ces composés, à ces mêmes concentrations, sont susceptibles de déséquilibrer le sexe-ratio des individus issus de générations exposées en faveur des femelles.

Ces travaux de recherche ont montré l'intérêt d'une approche intégrée en écotoxicologie. Le couplage d'analyses chimiques, biologiques et écologiques est essentiel dans le but de prévoir et de définir le devenir et les effets toxiques de ces contaminants à différentes échelles d'organisation biologique. L'étude des effets ciblés des contaminants à l'échelle de la protéine, de la cellule ou de l'individu devrait permettre d'extrapoler ces effets à l'échelle de la population et les impacts sur l'écosystème par l'utilisation de modèles mathématiques, domaine qu'il nous reste encore à explorer dans les années à venir. Ainsi, les résultats de ces expériences ont permis de mettre en évidence les transferts des médicaments présents vers un organisme modèle, le copépode *Eurytemora affinis*, ainsi que les capacités de métabolisation de cet organisme. Par ailleurs, les expériences ont montré une diminution des protéines intervenant dans la régulation du métabolisme énergétique et une induction de protéines intervenant dans la réponse aux stress, suite aux expositions. Enfin, les effets observés sur la reproduction mettent en exergue un retard de phase dans le développement de cette espèce et un sexe ratio dès la deuxième génération en faveur des femelles.

V- PERSPECTIVES

En termes de perspectives majeures il nous apparaît important suite à ce travail de mettre l'accent sur quelques points :

- 1- Du fait de la variabilité temporelle des concentrations rencontrée il est important de développer des méthodologies d'échantillonnage plus adaptées permettant d'intégrer cette variabilité,
- 2- Du fait de la variabilité spatiale il est important de simplifier ou d'automatiser les méthodes d'analyse pour pouvoir multiplier le nombre d'analyses (GC ou LC /MS/MS avec un mode d'extraction de type SPME ou SBSE),
- 3- Le rôle de la phase particulaire est à approfondir,
- 4- Le transfert vers les organismes reste encore mal connu ainsi que le risque sanitaire *via* la consommation des organismes aquatiques vers l'homme et nécessite de nouvelles études,
- 5- Les produits de transformation (biodégradation, photodégradation) demandent à être plus particulièrement étudiés,
- 6- Etudier (notamment sur le modèle *E. Affinis*) les phénomènes de biotransformation,
- 7- Etudier les effets « mélange »,
- 8- Compléter les études protéomiques pour éventuellement pouvoir proposer de nouveaux biomarqueurs d'exposition comme l'expression de l'aconitase mitochondriale.

VI- IMPLICATIONS PRATIQUES, RECOMMANDATIONS, REALISATIONS PRATIQUES, VALORISATION

- Implications pratiques :

Ce travail a permis de générer une banque de données de concentrations environnementales qui peut permettre une meilleure évaluation du risque environnemental

représenté par ces composés. Ce travail a donné les premiers chiffres concrets de contamination par les médicaments des écosystèmes littoraux Français.

Ce travail a permis également de développer des protocoles analytiques qui peuvent être maintenant appliqués à d'autres cas d'études. Il a aussi permis l'évaluation d'un nouveau type d'échantillonnage : l'utilisation d'échantillonneurs intégratifs qui ont démontré leur pertinence comme outils a minima qualitatifs.

- Recommandations et limites éventuelles :

Il apparaît important de continuer les études dans ce domaine d'une part en considérant de nouveaux composés non étudiés ici du fait de l'absence de moyens analytiques adaptés au moment du projet (LC/MS/MS) que sont les anticancéreux, les antibiotiques et les anti-viraux. Ces composés sont très consommés et présentent des toxicités avérées.

Il est important aussi de s'intéresser aux produits de dégradation et aux phénomènes de transfert vers les organismes (sujet juste abordé dans ce projet) et *in fine* vers l'homme.

Au vu de la variabilité mise en évidence par nos résultats il devient important d'encourager le développement de nouvelles méthodes d'échantillonnage soient intégratrices, soit automatiques soit les deux, de façon à pouvoir générer des résultats significatifs quant à la pression de contamination des systèmes aquatiques. Les données ponctuelles ont peu de « valeur » absolue.

- Réalisations pratiques et valorisation :

Le travail a été valorisé au travers de la soutenance de deux thèses d'Université ainsi qu'au travers de plusieurs stages de Master et de Licence. Il a donné lieu à 11 publications dans des journaux de rang A, à 4 articles de vulgarisation, à 5 conférences invitées, à 23 communications dans des colloques, 9 séminaires, à de nombreuses communications vers la presse écrite ou la radio ou la télévision ainsi qu'à des participations à des manifestations lors de la fête de la Science (CapScience) ou encore à des débats publics (Café de la Science). 6 publications sont en cours de soumission ou de rédaction et 3 communications sont d'ors et déjà prévues pour 2008. La connaissance acquise au cours de ces travaux a également été valorisée par l'introduction de ces problématiques environnementales dans plusieurs cours de niveau Bac+5 (Université de Bordeaux, ENSCPB)

VII- PARTENARIATS MIS EN PLACE, PROJETS, ENVISAGES

Ce projet nous a permis de renforcer la collaboration entre l'Université de Bordeaux et celle du Havre et a également occupé une place importante au sein du GDR IMOPHYS (GDR IFREMER-INRA coordonné par T. Burgeot et H. Budzinski). Les travaux développés au sein de ce projet ont trouvé un prolongement dans plusieurs autres collaborations (notamment avec l'équipe du Dr. Casellas et celle du Dr. Elbaz, Université Montpellier ; ou encore avec IFREMER, D. Sauzade et A. Romana).

Ce projet nous a permis d'initier une collaboration avec le Dr. Vrana (Slovaquie) qui va se concrétiser par sa venue à Bordeaux pour 1 mois en avril 2008 pour développer un système plus robuste pour étudier les échantillonneurs passifs en laboratoire et développer en collaboration avec nous de nouveaux échantillonneurs passifs.

Ce projet nous a permis également de rencontrer de nombreuses équipes intéressées par cette problématique et de nouer des relations avec l'INRA, l'IFREMER, le CEMAGREF,

l'INERIS et de nombreuses équipes universitaires (Université de Clermont-Ferrand, Université de Nice, ...). Ainsi nous avons pu participer par la suite à une ANR coordonnée par M. Coquery (CEMAGREF) permettant de mieux caractériser les rejets de station d'épuration selon les traitements mis en oeuvre (ANR AMPERES : Analyse de Micropolluants Prioritaires et Emergents dans les Rejets et les Eaux Superficielles)

Nous sommes également engagés dans une ANR pilotée par l'INRA pour étudier le rejet vers le milieu naturel des antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire suite à l'épandage de lisiers porcins et bovins (ANR DIPERPHA : Dynamique et Impact des Perturbateurs endocriniens et des composés pharmaceutiques issus des élevages agricoles)

VIII- POUR EN SAVOIR PLUS (QUELQUES REFERENCES)

AFSSAPS (2007) Les ventes de médicaments aux officines et aux hopitaux en France – Chiffres-clés 2006; 3^e édition, septembre 2007.

http://afssaps.sante.fr/pdf/5/rapport_vente_medicament_chiffre_2006.pdf (consulté en janvier 2008)

K. Bester (2007) Personal Care Compounds in the Environment – Pathways, Fate and Methods for Determination. Wiley-VCH, 244pp.

C. Daughton, T. Jones-Lepp (Eds) (2001) Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment – Scientific and Regulatory Issues. ACS Symposium Series 791,396pp.

SK. Khetan, T.J. Collins (2007) Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. Chem. Rev., 107, 2319-2364.

Projet Européen Knappe (2008)

<http://www.knappe-eu.org/>

Vrana B., Mills G.A., Allan I.J., Dominiak E., Svensson K., Knutsson J., Morrison G., Greenwood R. (2005a) Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. Trends in Analytical Chemistry, 24, 845-868.

Vrana B., Mills G.A., Greenwood R., Knutsson J., Svensson K., Morrison G. (2005b) Performance optimisation of a passive sampler for monitoring hydrophobic organic pollutants in water. Journal of Environmental Monitoring, 7, 612-620.

Vrana B., Greenwood R., Mills G. (2007) Comprehensive Analytical Chemistry (Vol 38), Passive Sampling Techniques in Environmental Monitoring. Elsevier, 486 pp.

R.T. Williams (Ed) (2005) Human pharmaceuticals – assessing the impact on aquatic ecosystems. SETAC Press, 368pp.

LISTE DES OPERATIONS DE VALORISATION ISSUES DU CONTRAT (ARTICLES DE VALORISATION, PARTICIPATIONS A DES COLLOQUES, ENSEIGNEMENT ET FORMATION, COMMUNICATION, EXPERTISES...)

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Publications scientifiques parues

- A. Rouzes, K. Berthoin, F. Xuereb, S. Djabarouti, I. Pellegrin, J.L Pellegrin, A.C. Coupet, S. Augagneur, H. Budzinski, M.C. Saux, D. Breilh (2004) Simultaneous determination of the antiretroviral agents : amprenavir, lopinavir, ritonavir, saquinavir and efavirenz in human peripheral blood mononuclear cells by high-performance liquid chromatography -mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, 813, 209-216.
- P. Labadie, H. Budzinski (2005) Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environ. Sci. Technol.*, 39, 5113-5120.
- P. Labadie, H. Budzinski (2005) Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, 381, 1199-1025.
- H. Budzinski, M.H. Devier P. Labadie A. Toole. (2006). Analysis of hormonal steroids in fish plasma and bile by coupling solid-phase extraction to GC/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 1429-1439.
- K. Cailleaud, H. Budzinski, S. Souissi, G. Maillet, B. Rocher, J.Forget-Leray (2006) Proteomic responses of a calanoid copepod *Eurytemora affinis* to organic contaminants exposure : a microcosm study. *Mar. Environ. Res.* 62S: 185-186.
- G.Maillet, K.Cailleaud, H.Budzinski, J.Forget-Leray (2006) Use of acetylcholinesterase in *Eurytemora affinis* (Copepoda) as a biomarker in Seine estuary, France. Comparison of two methods: enzymatic histochemistry and enzymatic activity assay. *Mar. Environ. Res.* 62S: 386-387.
- M.Rabiet, A.Togola, F Brissaud, J.L. Seidel, F. Elbaz-Poulichet (2006) Consequences of treated water recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium-sized Mediterranean catchment. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 5282-5288.
- A.Togola, H.Budzinski (2007) Development of Polar Organic Integrative Samplers for Analysis of Pharmaceuticals in Aquatic Systems. *Anal. Chem.* 79, 6734-6741.

	<p>A.Togola, H.Budzinski (2007) Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS. <i>Anal. Bioanal. Chem.</i> 388, 627-635.</p> <p>K.Cailleaud, G.Maillet, H.Budzinski, S. Souissi, J. Forget-Leray. (2007) effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in <i>Eurytemora affinis</i>. <i>Comp. Biochem. Phys. A</i>, 147, 841-849.</p> <p>A.Togola, H.Budzinski (2008) Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. <i>J. of Chromatogr. A</i>, 1177, 150–158.</p>
Publications scientifiques à paraître	<p>K.Cailleaud, H.Budzinski, K Le Menach, S.Souissi, J.Forget-Leray. Uptake and elimination of hydrophobic organic contaminants in estuarine copepods : an experimental study – accepté dans <i>Env. Tox. Chem</i></p>
Publications scientifiques prévues	<p>K. Cailleaud, P. Cosette, H. Budzinski, S. Souissi, J. Forget-Leray. Proteomic investigation of biomarkers in disease caused by organic contaminant exposures on an estuarine copepod species. Soumise à <i>Molecular and Cellular Proteomics</i></p> <p>A. Togola et H. Budzinski. Analytical developments for the determination of pharmaceuticals in solid matrices: sediments, particles and sludge. Soumise à <i>Analytica Chimica Acta</i>.</p> <p>A. Togola, S. Augagneur, K. LeMenach, H. Budzinski. Behaviour of pharmaceuticals after their introduction in surface waters: Case of Jalle d'Eysines river (FRANCE). Soumise à <i>Water Research</i></p> <p>K. Cailleaud, H. Budzinski, K. Le Menach, S. Souissi, J. Forget-Leray. Uptake and elimination of hydrophobic organic contaminants in estuarine copepods: an experimental study – en preparation pour <i>Env. Tox. Chem</i>.</p> <p>S. Lardy-Fontan, A. Togola, H. Budzinski. POCIS as a new monitoring tool : What can really be expected? A first approach with pharmaceuticals and alkylphenol-polyethoxylates – en preparation pour <i>J. of Env. Monitor</i>.</p>

COLLOQUES (CO : ORAL ; CA : POSTER)

Conférences Invitées

2004

Les substances pharmaceutiques : Nouveaux contaminants organiques des systèmes aquatiques ?

H. Budzinski, A. Togola

Forum Labo, Paris, France, 23-26 Mars (CO)

2005

Pharmaceutical substances: emergent contaminants of the aquatic media.

H. Budzinski, A. Togola, J. Legrand

Société Française de Chimie (SFC) Eurochem, Nancy, France, 28 Août - 1er Septembre (CO)

2006

Pharmaceutical substances: emergent contaminants in marine systems.

H. Budzinski

CIESM Workshop on Marine Sciences and Public Health. Genève, Suisse, 27-30 septembre 2006 (CO)

2007

Pharmaceutical substances: emergent contaminants in marine and estuarine systems.

H. Budzinski, A. Togola

ECOBIM 2007, 30 mai-1 Juin 2007, Rimouski, Canada (CO)

Participations passées à des colloques

2004

Steroid hormone profiles along the river "Jalle d'Eysines" (nearby Bordeaux, France).

P. Labadie, H. Budzinski

14th Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)-Europe Annual Meeting, Prague, République Tchèque, 18-22 Avril (CA)

Determination of hormonal steroids in water samples: optimisation and validation of an analytical procedure.

P. Labadie, H. Budzinski 9th Federation of European Chemical Societies (FECS) Conference and 2nd Société Française de Chimie (SFC)

Meeting on Chemistry and the Environment, Bordeaux, France, 29 Août-1 Septembre (CO)

Pharmaceuticals in the environment: comparative study of various French estuaries.

A. Togola, H. Budzinski

38th Symposium on Estuarine Coastal and Shelf Association (ECSA), Rouen, France, 13-17

Septembre (CA)

2005

Study of pharmaceuticals in aquatic environment: application to a marine coastal system (Cortiou Rocky inlet, Mediterranean coast, France).

H. Budzinski, A. Togola

15th Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)-Europe Annual Meeting, Lille, France, 22-26 Mai (CA)

Input of pharmaceuticals to a natural aquatic system: study of the Blanquefort river (nearby Bordeaux, France).

H. Budzinski, A. Togola

15th Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)-Europe Annual Meeting, Lille, France, 22-26 Mai (CA)

Study of pharmaceutical substances in the case of a Mediterranean watershed.

A. Togola, H. Budzinski, M. Rabiet, F. Elbaz-Poulichet

15th Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)-Europe Annual Meeting, Lille, France, 22-26 Mai (CA)

Impact of a wastewater in a medium-sized Mediterranean watershed.

M. Rabiet, A. Togola, F. Elbaz-Poulichet, F. Brissaud, J.L. Seidel, H. Budzinski

15th Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)-Europe Annual Meeting, Lille, France, 22-26 Mai (CA)

Proteomic response of a calanoid copepod *Eurytemora affinis* to organic contaminants exposure: a microcosm study.

K. Cailleaud, H. Budzinski, S. Souissi, G. Maillet, B. Rocher, J. Forget-Leray

13th International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 13), Alessandrie, Italie, 19-22 Juin (CA)

Use of acetylcholinesterase in *Eurytemora affinis* (Copepoda) as a biomarker in Seine estuary, France. Comparison of two methods: enzymatic histochemistry and enzymatic activity assay.

G.Maillet, K.Cailleaud, H.Budzinski, J.Forget-Leray - PRIMO 13, Alessandria, Italy, 19-22 juin 2005.

(CA)

Comparison between the swimming behavioural response of male and female *Eurytemora affinis* consecutive to injection of endocrine disruptor compounds.

K. Cailleaud, H. Budzinski, S. Souissi, J. Forget-Leray

9th International Conference On Copepoda (ICOC), Hammamet, Tunisie, 11-15 Juillet (CA)

2006

Development of Polar Organic Compounds Integrative Sampler (POCIS) for study of pharmaceuticals.

A.Togola, H.Budzinski

2nd International Passive Sampling Workshop and Symposium (IPSW 2006), Bratislava, Slovaquie, 3-6 Mai 2006 (CO)

Development of Polar Organic Compounds Integrative Sampler for study of pharmaceuticals.

A.Togola, H.Budzinski

16th Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)-Europe Annual Meeting, La Haye, Pays-Bas, 7-11 Mai 2006 (CA)

Study of pharmaceuticals in the Seine estuary: Sources, behaviour and fate in aquatic environments.

A.Togola, H.Budzinski

16th Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)-Europe Annual Meeting, La Haye, Pays-Bas, 7-11 Mai 2006 (CA)

Study of Pharmaceuticals on aquatic compartments: sources, behaviour and fate.

A.Togola, H.Budzinski

1st European Chemistry Congress, Budapest, Hongrie 27-31 Août 2006 (CO).

Pharmaceutical Substances: Emergent Contaminants of the Aquatic Systems

H.Budzinski

1st thematic workshop of the EU project NORMAN - Chemical Analysis Of Emerging Pollutants ; 27-28 Novembre 2006, Maó, Menorca (Balearic island) Espagne (CO)

Mise en oeuvre des POCIS (Polar Organic Compounds Integrative Sampler) pour l'étude des

substances pharmaceutiques
A.Togola, H.Budzinski
Forum Labo, Paris, France 28-31 mars 2006 (CO)

Recherche de nouveaux biomarqueurs
biochimiques en écotoxicologie par l'analyse du
protéome d'*Eurytemora affinis* - Identification des
protéines par CPL SM/SM et par
Western Blot

K. Cailleaud, S. Souissi, H. Budzinski, J. Forget
Leray.
Colloque Seine Aval, Rouen, Septembre 2006 (CA)

2007

POCIS as a new water monitoring tool A first
approach for pharmaceuticals and detergents.
H.Budzinski, A.Togola, S.Lardy-Fontan
Workshop SWIFT, Lille, Avril 2007 (CA)

Pharmaceutical substances : emergent contaminants
of the aquatic systems
H.Budzinski, A.Togola, S.Lardy, K. Le Menach
CIESM 38th congress, Istanbul, Turquie, 8-12 avril
2007 (CO)

Experimental study of the transfer and the effects of
potentially endocrine disrupting substances using
Eurytemora affinis as test organism
K. Cailleaud, S.Souissi, S.Augagneur, S.Lardy,
H.Budzinski, J.Forget-Leray.
PRIMO14, 6-9 May 2007, Florianopolis, Brésil (CA)

Les contaminants émergents dans les systèmes
aquatiques. Présence, devenir et transferts aux
organismes biologiques. Le cas des substances
pharmaceutiques et des détergents.
S.Lardy-Fontan, H.Budzinski, S.Augagneur.
Congrès ARET, Paris, France Mai 2007 (CO)

Développement d'une méthode couplant UPLC et
spectrométrie de masse en tandem pour le dosage
d'antibiotiques présents à l'état de trace dans les
systèmes aquatiques.
M.J.Capdeville, P.Pardon, S.Augagneur, H.Budzinski
SMAP, 24èmes journées françaises de spectrométrie
de masse, Pau, France du 17 au 20 Septembre 2007
(CA)

2008

Couplage capteurs passifs et biotests de toxicité pour

	<p>la mise en évidence de composés présents en phase dissoute H. Budzinski, S. Lardy, K. LeMenach, A.Togola, S. Augagneur. Séminaire « échantillonneurs passifs et méthodes alternatives de prélèvement », CEMAGREF Cestas, Février 2008.</p>
Participations futures à des colloques	<p>2008 Substances pharmaceutiques nouveaux contaminants des systèmes aquatiques. (Conférence invitée) H. Budzinski, S. Lardy, K. Le Menach, MJ. Capdeville, P. Pardon. 2ème Congrès des Sciences Analytiques (CSA2008) Octobre 2008, Casablanca (Maroc).</p> <p>La Spectrométrie de masse couplée à la GC ou la LC pour l'analyse des contaminants dits émergents dans les systèmes aquatiques (Conférence invitée) H. Budzinski SFSM, Grenoble, Septembre 2008.</p> <p>Laboratory and Field Validation of POCIS for the Monitoring of Pharmaceuticals and Detergents in French River Basin S. Lardy, H. Budzinski SETAC 2008, Varsovie, Pologne, Mai 2008 (CO)</p> <p>Solid-phase extraction (SPE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry development for the analysis of multi-classes pharmaceuticals MJ. Capdeville, P. Pardon, H. Budzinski SETAC 2008, Varsovie, Pologne, Mai 2008 (CA)</p> <p>Ecodynamics and effects of organic contaminants on an estuarine copepod (<i>Eurytemora affinis</i>) : a multidisciplinary approach. K.Cailleaud, J.Forget-Leray, S.Souissi, H.Budzinski SETAC 2008, Varsovie, Pologne, Mai 2008 (CO)</p>
	THESES
Thèses passées	<p>A.Togola Etude de la contamination des milieux aquatiques par les substances pharmaceutiques : application aux estuaires de la Gironde, de l'Adour et de la Seine. Direction : H. Budzinski Date de soutenance : décembre 2006</p>

Thèses en cours

K.Cailleaud
Bioaccumulation et effets de contaminants présents
en estuaire de Seine sur le
comportement natatoire et le potentiel reproducteur
d'Eurytemora affinis
(Copépode Crustacé).
Direction : H. Budzinski, J. Forget (LEMA,
Université du Havre), S. Souissi
(UMR 8013 ELICO, Université de Lille)
Date de soutenance : novembre 2006

LARDY SOPHIE
Etude des perturbateurs endocriniens dans les
systèmes aquatiques
Direction : H. Budzinski
Début de la thèse : octobre 2005

CAPDEVILLE MARION
Etude des substances pharmaceutiques.
Direction : H. Budzinski
Début de la thèse : Octobre 2006

DE PERRE CHLOE
Étude des interactions Matière Organique Colloïdale /
Contaminants Organiques dans l'environnement
aquatique.
Direction : E. Parlanti/H. Budzinski
Début de la thèse : Octobre 2006

ARTICLES DE VALORISATION-VULGARISATION

Articles de valorisation parus

H. Budzinski, A. Togola (2004)
Développement de la SPE associée à la GC/MS pour
l'analyse des substances pharmaceutiques dans
l'environnement aquatique.
Spectra analyse, 33, 18-22.

H. Budzinski, A. Togola (2006)
Présence des résidus de médicaments dans les
différents compartiments du milieu aquatique
Environnement, risques et santé, 5, 4, 248-253.

H. Budzinski, A. Togola (2007)
Pharmaceutical substances : emergent contaminants
in marine and estuarine systems. CIESM 2007,
CIESM Workshop Monograph n°31, 29-35.

H. Budzinski (2007)
Cote d'alerte sur la pollution des eaux ; parole
d'expert, Journal du CNRS, Novembre 2007

Articles de valorisation à paraître	Dans le Dossier Focus-Eau piloté par le CNRS : La contamination des systèmes aquatiques par les médicaments
Articles de valorisation prévus	
AUTRES ACTIONS VERS LES MEDIAS	
Actions vers les médias (interviews...) effectuées	De nombreuses interviews, échanges ont été effectués sur ce thème tant vers la presse écrite que la télévision ou la radio (France Info, TV7, i-télé, M6, Le Point, Libération, Le Nouvel Observateur, Le Parisien, Femme Actuelle, Santé Magazine, ...)
Actions vers les médias prévues	Café des Sciences, Talence, Novembre-Décembre 2008 : Thème : pollution des eaux, contaminants émergents
ET ENSEIGNEMENT - FORMATION	
Enseignements/formations dispensés	<p><u>STAGES</u></p> <p>J.Legrand (2005) Master 2 ST Systèmes Ecologiques, Université Bordeaux 1. « Etude de la contamination des systèmes aquatiques par les substances pharmaceutiques »</p> <p>E. Wood (2005) Licence ST Chimie, Université Bordeaux 1 « Utilisation de systèmes d'échantillonnage passif pour l'étude de la contamination des systèmes aquatiques par les substances pharmaceutiques »</p> <p>MJ. Capdeville (2006) Etude des perturbateurs endocriniens dans les systèmes aquatiques. Master 2 Recherche « Sciences Et Technologies » Mention « Systèmes Ecologiques » - Université Bordeaux 1</p> <p>N. Creusot (2007) Mise au point d'un bioessai et caractérisation des effets de la carbamazépine et de l'éthynyloestradiol sur le développement, la reproduction et le système nerveux du copépode <i>Eurytemora affinis</i>. Master 2 mention sciences de l'Univers, Environnement et Ecologie (Université Paris 6)</p> <p>F. Murcia (2007) Etude des phénomènes de transfert sol/plante des contaminants organiques tels que les substances pharmaceutiques et les détergents non ioniques. Master Sciences et Technologies Mention Chimie - Université Bordeaux 1</p> <p><u>ENSEIGNEMENT : H. BUDZINSKI</u></p> <p>- "Analyse des contaminants organiques de l'environnement": Cours de MASTER Sciences</p>

	Chimiques, Université BORDEAUX I -"Pollutions aquatiques" : ENSCPB, option QSE 3° année
Enseignements/formations prévus	
	EXPERTISES
Expertises menées Expertises en cours	Participation à la rédaction des fiches produits chimiques –contaminants environnementaux menée par le GIP Seine Aval
Expertises prévues	
	METHODOLOGIES (GUIDES...)
méthodologies produites méthodologies en cours d'élaboration méthodologies prévues	
	AUTRES
Précisez...	<u>SEMINAIRES</u> H. Budzinski, P. Labadie (2004) Détermination des stéroïdes hormonaux dans l'environnement : développements analytiques et applications. Séminaire du GDR IMOPHYS, Paris, France, 27-28 Janvier M. Rabiet, F. Elbaz-Poulichet, A. Togola, F. Brissaud, J.L. Seidel, H. Budzinski (2005) Caractérisation de l'anomalie de Gadolinium (Gd) dans les effluents de station d'épuration et de l'environnement aquatique. EFFEMER, Risques sanitaires et écologiques des résidus de médicaments dans les eaux, Montpellier, France, 16-17 Juin H. Budzinski, A. Togola (2005) Présence des résidus de médicaments dans les différents compartiments du milieu aquatique. EFFEMER, Risques sanitaires et écologiques des résidus de médicaments dans les eaux, Montpellier, France, 16-17 Juin A. Togola, H. Budzinski (2005) Présence de résidus de médicaments dans les milieux aquatiques : cas de la calanque de Cortiou, Marseille Séminaire MEDICIS, décembre 2005, Montpellier H.Budzinski, A.Togola, S.Lardy, K. Le Menach, S. Augagneur, L. L. Peluhet (2006) Substances pharmaceutiques : nouveaux contaminants

Des systèmes aquatiques ?
Journée du CRCM, Bordeaux, France, Janvier 2006.

H.Budzinski, A.Togola, Murcia F. (2007)
Les contaminants émergents des systèmes aquatiques
: cas des substances pharmaceutiques
Journée ECOBAG « Normes et Risques », Toulouse,
Février 2007

H.Budzinski, A.Togola (2007)
Présence des résidus de médicaments dans les
différents compartiments du milieu aquatique.
Journée de l'école doctorale des sciences chimiques
de l'Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand II),
mai 2007

E.Parlanti, H.Budzinski, C. De Perre (2007)
Etude des interactions MOD – Micro-polluants
organiques.
Ecole- chercheurs : « interactions matières organiques
et micropolluants ; méthodes de caractérisation et de
modélisation », 01 au 04 octobre 2007, La Grande
Motte, France

H.Budzinski (2007)
Les substances pharmaceutiques : nouveaux
contaminants des écosystèmes aquatiques.
Journée Thématique OASU "L'observation de la
Planète et de l'Univers"
11 Octobre 2007, Bordeaux France

POST-DOC

Géraldine Maillet, PostDoc Université du Havre, 18
mois (2005-2006) Développement méthodologique
pour l'expression et l'activité de GST chez
Eurytemora affinis, mais également pour la
localisation par histochimie de l'ACHÉ.

RESUMES

En français

RESUME

1/2 A 1 PAGE

L'objectif général de ce travail concernait l'étude des substances pharmaceutiques (hormones synthétiques, analgésiques, antidépresseurs et hypolipémiants) dans différents environnements estuariens et côtiers. L'étude a couplé des approches terrain et des travaux en laboratoire et des travaux de chimie analytique environnementale et de toxicochimie. La partie « Chimie analytique environnementale » a été assurée par l'Université Bordeaux I et la partie « Toxicochimie » a été assurée par l'Université du Havre.

Les travaux effectués durant la première phase ont permis de développer des outils méthodologiques analytiques et de les appliquer à un inventaire de la pollution des estuaires de la Seine, de l'Adour et de la Gironde par les substances pharmaceutiques ainsi qu'à une étude du devenir de ces composés dans l'environnement et plus particulièrement du rôle des particules et de la matière organique dans le transfert et/ou le devenir de ces composés dans l'environnement aquatique. L'étude des variations saisonnière a mis en évidence des fluctuations importantes et des phénomènes de dégradation qui devront à l'avenir être pris en considération. L'étude des produits de dégradation tant par dégradation bactérienne que par photooxydation apparaît une priorité pour le futur. Le rôle de la phase particulaire est à ce jour encore négligé dans la problématique des substances pharmaceutiques. Néanmoins ce travail a mis en évidence le rôle que ce compartiment pouvait jouer, notamment dans la dissémination de la charge contaminante. La possibilité d'utiliser des capteurs passifs pour caractériser la contamination de la phase dissoute a été également testée.

Dans une seconde phase, il s'est agit de mettre en œuvre des études d'impact sur des organismes en microcosmes pour élucider les mécanismes de toxicité liés à ces composés. Dans l'optique de développer des outils de surveillance de la qualité de l'eau, nous avons choisi *Eurytemora affinis*, comme l'espèce idéale pour se lancer dans une approche intégrée utile au diagnostic environnemental dans les zones estuariennes. Cette approche est essentielle pour comprendre à différents niveaux d'organisation biologique, les effets des contaminants organiques sur le copépode *Eurytemora affinis*, depuis la réponse protéique par l'analyse du protéome ou la mesure d'activité enzymatique, jusqu'à la réponse des individus via des expériences de reproduction. Ainsi, les résultats de ces expériences ont permis de mettre en évidence les transferts des médicaments présents en estuaire de Seine vers un organisme modèle, le copépode *Eurytemora affinis*, ainsi que les capacités de métabolisation de cet organisme. Par ailleurs, les expériences ont montré une diminution des protéines intervenant dans la régulation du métabolisme énergétique et une induction de protéines intervenant dans la réponse aux stress, suite aux expositions. Enfin, les effets observés sur la reproduction mettent en exergue un retard de phase dans le développement de cette espèce et un sexe ratio dés la deuxième génération en faveur des femelles.

MOTS CLES

Médicaments, Estuaires, Echantillonneurs Intégratifs, Dosages Ultra-Traces, *E. Affinis*, Protéome, Partition Dissous/Particulaire

ABSTRACT

1/2-1 PAGE

The general objective of this work was related to the study of pharmaceutical substances (synthetic hormones, analgesics, antidepressants and lipid-lowering substances) in various marine and estuarine environments. The study coupled field approaches and laboratory experiments and environmental analytical chemistry and toxicology approaches. The part “Environmental Analytical Chemistry” was ensured by the University Bordeaux I and the part “Toxicology” was ensured by the University of Le Havre.

The work carried out during the first phase made it possible to develop analytical methodological tools and to apply them to an inventory of the pollution of the estuaries of the Seine, Adour and the Gironde by the pharmaceutical substances and to a study on the fate of these compounds in the environment and more particularly on the role of the particles and the organic matter in the transfer and/or fate of these compounds in the aquatic environment. The seasonal study of the variations highlighted important fluctuations and phenomena of degradation which will have in the future to be taken into account. The study of the breakdown products as well by bacterial degradation as by photo-oxidation appears a priority for the future. The role of the particulate phase is to date still neglected in the case of the pharmaceutical substances. Nevertheless this work highlighted the role that this compartment could play, in particular in the dissemination of the contaminant load. The possibility of using passive sensors to characterize the contamination of the dissolved phase was also tested.

In one second phase, it was undertaken to implement impact studies on organisms in microcosms to elucidate the mechanisms of toxicity related to these compounds. In view to develop tools for monitoring the quality of water, we chose *Eurytemora affinis*, like the ideal species to launch out in an integrated approach useful for the environmental diagnosis in the estuarine zones. This approach is essential to understand at various levels of biological organization, the effects of the organic contaminants on the copepod *Eurytemora affinis*, since the protein response by the analysis of the proteome or enzymatic activity measurements, until the answer of the individuals via experiments of reproduction. Thus, the results of these experiments made it possible to highlight the transfers of the drugs present in estuary of the Seine towards a model organism, the copepod *Eurytemora affinis*, as well as the capacities of metabolization of this organism. In addition, the experiments showed a reduction in proteins involved in the regulation of the energy metabolism and an induction of proteins involved in the response to the stresses, following the exposures. Lastly, the effects observed on the reproduction put forward a delay of phase in the development of this species and a sex ratio from the second generation in favor of the females.

KEY WORDS

Pharmaceutical substances, Estuaries, Integrative samplers, Ultra-traces, *Eurytemora affinis*, Proteom, Speciation dissolved/particulate phases

Rapport scientifique Final

Etude de la contamination des estuaires de la Seine, de la Gironde et de l'Adour par les substances pharmaceutiques : Présence, Devenir et Impact Toxicologique

APPEL A PROPOSITIONS DE RECHERCHE sur le Littoral (LITEAU 2)

APPEL DU 10 JUIN 2003

Responsable scientifique :

Dr. Hélène Budzinski, Directeur de Recherches CNRS
Institut des Sciences Moléculaires (ISM) – UMR 5255 CNRS
Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'Environnement (LPTC)
Université Bordeaux I
351 crs de la Libération, 33405 Talence
Tél : 05 40 00 69 98 ; Fax : 05 40 00 22 67
e-mail : h.budzinski@ism.u-bordeaux.fr

Partenaires **Dr. Joëlle Forget-Leray, MC Université du Havre**
Laboratoire d'Ecotoxicologie - Milieux Aquatiques (LEMA)
UPRES-EA 3222 ; IFR 23 - Université du Havre
25 rue Philippe Lebon, BP 540, 76058 Le Havre CEDEX
Tél : 02 32 74 43 79 ; Fax : 02 32 74 43 14

Equipe ayant participé au projet :

Coordination : H. BUDZINSKI

(1) Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'environnement (LPTC) - Université Bordeaux I

Hélène Budzinski (DR CNRS)
Edith Parlanti (CR CNRS)
Philippe Garrigues (DR CNRS)
Sylvie Augagneur (IE CNRS)
Karyn LeMenach (AI CNRS)
Anne Togola (doctorante)

(2) Laboratoire d'Ecotoxicologie - Milieux Aquatiques (LEMA) - Université du Havre

Joelle Forget-Leray (MC)
François Leboulenger (Pr)
Béatrice Rocher-Prieur (MC)
Stéphanie Lacroix (IE)
Kevin Cailleaud (doctorant)

Remarque sur l'articulation avec d'autres programmes et sur les différents financements :

Ce projet a été conduit en conjonction avec d'autres projets de recherche dans d'autres programmes de recherche (Seine Aval, Projet Européen SWIFT et Projet Région ORQUE (Observatoire Régional de la Qualité de l'Environnement)).

Le programme Seine Aval a financé les études concernant l'estuaire de Seine (étude environnementale). Le financement LITEAU a permis d'étudier d'autres systèmes : estuaire de la Gironde, de l'Adour, l'Hérault, Cortiou. Ainsi les développements analytiques initiés par Seine Aval ont pu être complétés dans le cadre de LITEAU et valorisés au cours de ce projet LITEAU. LITEAU a permis de financer les développements concernant les échantillonneurs intégratifs qui n'étaient pris en charge par aucun autre programme. Le projet ORQUE a financé exclusivement la bourse de thèse de Anne Togola ainsi qu'une partie de l'équipement nécessaire au projet (GC/MS/MS ; un LC/MS/MS a été acquis par la suite mais du fait du calendrier n'a malheureusement pas pu être utilisé dans le cadre de LITEAU). Dans le cadre du projet SWIFT nous avons pu tester les échantillonneurs développés dans le cadre de LITEAU sur des sites intéressants (mais en eau douce) car bien documentés en termes de contamination et de débit : le Rhin, la Meuse, le Tevere. SWIFT et LITEAU apparaissent donc complémentaires. Enfin LITEAU a permis de financer l'approche écotoxicologie sur *E. Affinis*, Seine Aval finançant la même approche mais sur des contaminants plus classiques (HAP, PCB, nonylphénol).

I- INTRODUCTION

Les substances pharmaceutiques sont des composés synthétiques d'usage très répandu, créés pour avoir un effet biologique thérapeutique. A côté des principaux contaminants chimiques de l'environnement, on trouve des substances telles que des stéroïdes synthétiques (œstradiol, testostérone) utilisés dans de nombreux traitements hormonaux. On trouve également divers médicaments de type anti-dépresseur (diazépam, amitriptyline), analgésique (ibuprofène, paracétamol, diclofénac), antibiotique (Hirsch et al., 1999) (néomycine, chloramphénicol, tétracyclines...), hypolipémiant (Metcalf et al., 2003) (acide clofibrigue, gemfibrozil). Ces différentes molécules actives sont consommées en quantités très importantes dans notre société occidentale, comme le rappelle le Tableau 1, indiquant une estimation des consommations en France, Royaume-Uni, Allemagne, Danemark pour certains composés (Beausse, 2004). Ces produits sont rejetés *in fine* dans le milieu aquatique *via* les stations d'épuration (Halling-Sorensen et al., 1998) (destruction incomplète). Actuellement peu étudiés, ils peuvent présenter un risque environnemental non négligeable si l'on considère d'une part les quantités potentiellement apportées au milieu aquatique et d'autre part le fait qu'ils ont été fabriqués pour être biologiquement actifs.

Ces composés sont retrouvés dans l'ensemble des compartiments aquatiques de l'environnement, que ce soit dans les rejets de station d'épuration (Farré et al., 2001 ; Herberer, 2002), dans les eaux de surface (Ollers et al., 2001), ou encore pour certains composés, dans les eaux de boisson (Tauxe-Wuersch et al., 2005). Cette présence de plus en plus fréquente a amené les chercheurs à s'intéresser d'une part aux effets que ces composés pourraient avoir sur des espèces non cibles (Cleuvers, 2003 ; Laville et al., 2004) ainsi qu'aux risques encourus pour une exposition chronique, que ce soit pour les organismes du milieu aquatique (Sanderson et al., 2004) ou pour les hommes (Jones et al., 2002 ; Schulman et al., 2002).

Classe thérapeutique	Composés	Royaume-Uni	France	Danemark	Allemagne
Anti-inflammatoires, Analgésiques	Paracétamol	390	2294	248	
	Aspirine	18	880	213	
	Ibuprofène	162	166	34	105
	Diclofénac	26			75
Hypolipémiant	Gemfibrozil				6
Antidépresseurs	Fluoxétine	2			
	Carbamazépine	40	38		38

Tableau 1 : Consommation en substances pharmaceutiques (données en tonnes par an, selon Beausse (2004).

Ces composés sont susceptibles d'avoir des effets toxiques importants (Ferrari et al., 2003), mais s'il existe à l'heure actuelle des données dans différents pays concernant la contamination effective des milieux aquatiques par ces molécules, elles sont plus rares en ce qui concerne la situation française (et l'était encore plus en 2003). De plus à notre connaissance aucune étude ne s'était au moment de l'appel d'offre intéressée au milieu estuarien ou marin côtier.

C'est dans ce contexte général que le projet «Etude de la contamination des estuaires de la Seine, de la Gironde et de l'Adour par les substances pharmaceutiques : Présence, Devenir et Impact Toxicologique» a été présenté au programme LITEAU 2.

II- OBJECTIFS DU TRAVAIL PROPOSE

L'objectif général de ce travail concerne donc l'étude des substances pharmaceutiques (hormones synthétiques, analgésiques, antidépresseurs et hypolipémiants) dans différents environnements estuariens et côtiers. L'étude couple des approches terrain et des travaux en laboratoire. L'étude couple des travaux de chimie analytique environnementale et de toxicochimie. La partie « Chimie analytique environnementale » est assurée par l'Université Bordeaux I et la partie « Toxicochimie » est assurée par l'Université du Havre.

III- TRAVAUX EFFECTUES

Les travaux effectués durant la première phase ont permis de développer des outils méthodologiques et de les appliquer à un inventaire de la pollution des estuaires de la Seine, de l'Adour et de la Gironde par les substances pharmaceutiques. La possibilité d'utiliser des capteurs passifs pour caractériser la contamination de la phase dissoute a été également testée. Des études concernant le devenir de ces composés dans l'environnement et plus particulièrement le rôle des particules et de la matière organique dans le transfert et/ou le devenir de ces composés dans l'environnement aquatique ont été effectuées.

Dans une seconde phase, nous avons mis en œuvre des études d'impact sur des organismes en microcosmes pour élucider les mécanismes de toxicité liés à ces composés.

Ce rapport présente donc un bilan des travaux de la première phase concernant les développements méthodologiques ainsi que les résultats des « screenings » environnementaux et de la seconde phase concernant l'étude écotoxicologique.

IV- RESULTATS : PHASE 1 Chimie Environnementale

a) Composés choisis (Annexe 1)

21 composés ont été plus particulièrement étudiés appartenant à différentes classes pharmaceutiques (anti-dépresseur, anti-inflammatoire, bronchodilatateur, analgésique, hypolipémiant) : acide clofibrigue (ACLO), clofibrate (CLO), acide acétylsalicylique (ASP), caféine (CAF), carbamazépine (CBZ), doxépine (DOX), diclofénac (DICLO), gemfibrozil (GEMF), ibuprofène (IBU), kétoprofène (KETO), imipramine (IMIP), naproxène (NAP), paracétamol (PARA), salbutamol (SALB), clenbutérol (CLEN), terbutaline (TERB), diazépam (DZP), nordiazépam (NDZP), amitryptiline (AMI), bromazépam (BMZP), fluoxétine (FLUOX)).

A ces composés sont rajoutées les hormones stéroïdiennes (oestradiol (E2), éthynyl-oestradiol (EE2), oestrone (E1), oestriol (E3)) qui ont été également étudiées mais de façon moins systématique en appliquant un protocole développé auparavant dans le cadre du Programme Seine-Aval).

b) Développements analytiques

Eaux : phase dissoute et particulaire

L'extraction des eaux prélevées se fait en deux étapes. Les échantillons d'eau sont dans un premier temps filtrés sur filtres en fibres de verre (diamètre de pores 0,7 µm) préalablement calcinés (450°C, 10h).

La phase dissoute est acidifiée à pH 2. Les étalons deutérés (diazépam d5, nordiazépam d5 et amitriptyline d6) sont ajoutés avant le passage sur cartouche Oasis MCX (Waters). Après

conditionnement de la cartouche (acétate d'éthyle puis eau osmosée à pH 2), l'échantillon est déposé par aspiration à un débit compris entre 12 et 18 mL par min. Le séchage s'effectue sous vide pendant 1h afin d'éliminer toute trace d'eau sur la cartouche.

L'éluion des composés d'intérêt se fait par trois éluions successives (acétate d'éthyle, mélange acétate d'éthyle:acétone (50:50; v:v), puis mélange acétate d'éthyle:acétone:NH₄OH (49:49:2; v:v:v). L'éluât est évaporé à sec et repris dans de l'acétate d'éthyle pour injection.

La phase particulaire est dans un premier temps lyophilisée avant de subir une extraction assistée par micro-ondes (10 min, 15 W) dans 30 mL d'un mélange d'eau à pH 2 et d'acétonitrile (30:70; v:v), après ajout des étalons deutérés. L'extrait est ensuite filtré sur coton de verre, avant évaporation du solvant par utilisation d'un système d'évaporation sous vide par chauffage (Rapidvap®, 45 min, 80°C, 650 mbars). L'extrait est ensuite repris dans 50 mL d'eau acidifiée à pH 2 et subit le protocole d'extraction sur phase solide précédemment décrit pour la phase dissoute.

Les extraits sont analysés par GC/MS (cf ci-dessous). Les limites de détection pour l'ensemble des composés varient de 1 à 4 ng/L pour la phase dissoute et de 1 à 5 ng/g pour la phase particulaire.

Sédiments

Les sédiments sont tamisés à 2 mm puis lyophilisés. L'extraction des sédiments lyophilisés se met en œuvre selon le protocole développé pour les particules. Les limites de détection sont du même ordre de grandeur que pour les particules.

Echantillons biologiques : tissus et bile

Les tissus sont lyophilisés et broyés. L'extraction des échantillons se met en œuvre selon le protocole développé pour les particules à l'exception des tissus trop riches en lipides comme le foie qui nécessite des développements complémentaires (en cours).

Pour l'analyse de la bile, au protocole précédent développé pour la phase dissoute aqueuse est rajoutée une étape de purification sur silice greffée NH₂ de façon à éliminer de nombreux composés endogènes interférents qui rendent l'analyse des composés impossible. Ce protocole a été validé sur une bile supplémentée en composés pharmaceutiques. La quantification des composés s'est révélée correcte avec des rendements >70% pour la quasi totalité des composés neutres. En ce qui concerne les composés acides, les résultats sont moins probants. Certains composés sont bien dosés comme le paracétamol ou le clenbutérol. En revanche l'aspirine, le diclofénac, le naproxène, l'ibuprofène et le kétoprofène sont perdus lors de l'étape de purification. Une méthode de purification utilisant des cartouches silice greffée PSA a été développée et a donné des résultats satisfaisants (Figure 1).

Les limites de détection sont de l'ordre du ng/mL pour la bile de l'ordre de la dizaine de ng/g pour les tissus.

Analyse GC-MS

Les analyses sont effectuées avec un chromatographe en phase gazeuse 6890 Agilent Technologies (injecteur : 270°C; programmation du four de 90°C (2min.) à 250°C (2min.) à 5°C /min) couplé à un détecteur de masse 5973 Agilent Technologies (70 eV ; mode d'analyse en sélection d'ion) en utilisant une colonne capillaire HP5-MS (Agilent Technologies ; 5% phényle-95% méthyl-polysiloxane ; 30 m x 0,25 I.D. mm x 0,25µm d'épaisseur de film).

L'échantillon est injecté une première fois pour l'analyse des composés pharmaceutiques neutres (cf. Annexe 1) puis dérivé (30 µl de MSTFA, 65 °C, 35 min.) avant d'être réinjecté pour l'analyse des composés acides.

Avant chaque analyse, un composé étalon est ajouté à l'échantillon pour valider les taux d'extraction et la qualité de l'analyse : le pyrène pour la première injection et le 1-hydroxy-pyrène pour la deuxième. Les ions (rapport m/z) retenus pour chacun des composés pour la quantification par GC-MS sont présentés Annexe 1.

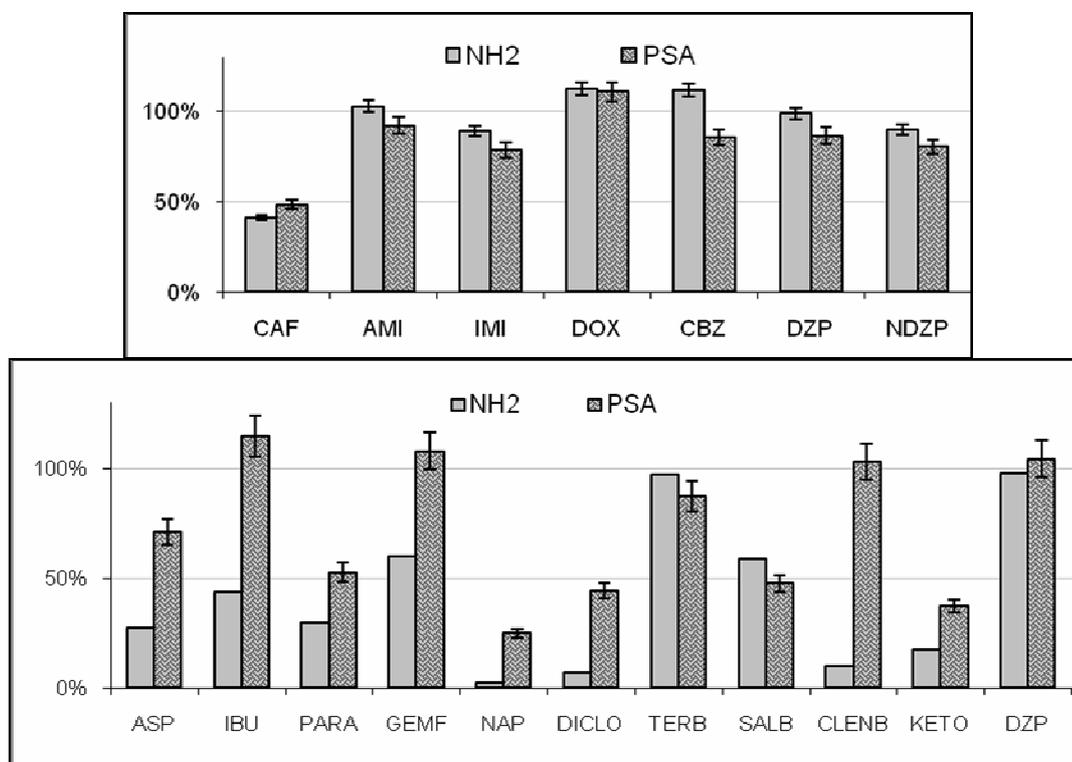


Figure 1 : Rendements pour les différents composés lors de la phase de purification sur cartouche NH₂ et sur cartouche PSA.

Développement de la SPME (Solid Phase Micro-Extraction)

L'analyse de substances organiques en phase dissoute demande en particulier une étape de concentration importante qui lorsque l'on utilise des méthodes conventionnelles (extraction liquide-liquide) peut prendre beaucoup de temps et consommer beaucoup de solvant. Dans l'optique de disposer de méthodologies analytiques compatibles avec les exigences de rapidité, de nombre et de fiabilité de l'analyse environnementale moderne de « screening », nous avons testé la micro-extraction en phase solide (SPME : Solid Phase Micro Extraction) pour l'analyse des substances pharmaceutiques dans l'eau en association avec la technique d'analyse par GC/MS.

Différents types de fibres ont été testés : Polyacrylate 85µm, PDMS 100 µm, PDMS-DVB 100 µm. L'effet du temps d'incubation (15, 30 et 45 min) a été également testé ainsi que l'effet du pH et de la salinité. Aucun effet du pH ni de la salinité n'a été mis en évidence.

optimisé : 45 min. Les conditions optimales sont les suivantes : Fibre PDMS-DVB 100 µm ; température d'incubation 30°C ; durée d'incubation : 45 min. Les limites de détection pour ces composés testés sont comprises entre 1ng/mL et 4 ng/mL pour un échantillon de 10 mL soit une concentration dans l'échantillon entre 1 et 4 µg par litre. La linéarité est correcte sur une large gamme de concentration (1 à 700 ng/mL). Les tests de quantification ont été effectués en introduisant dans l'échantillon un composé étalon deutéré le diazépam d5. Les rendements d'extraction et de quantification sont proches de 100% et présentent de faibles écart-types inférieurs à 20%.

La SPME est une méthode intéressante et rapide de quantification des composés neutres mais les limites de détection obtenues ne permettent pas de l'utiliser en tant qu'outil de screening des eaux naturelles. Des développements supplémentaires sont nécessaires pour tenter d'abaisser les seuils de détection en couplant la SPME avec une méthode d'analyse par GC/MS/MS ou encore utilisant non plus la SPME mais la SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction). Cela pourrait être une perspective de ce travail.

c) Echantillonneurs passifs

Un système d'échantillonnage passif a été testé tant en laboratoire que dans le milieu naturel pour les substances pharmaceutiques : le système POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler). Les tests en laboratoire ont concerné l'étude de l'influence de plusieurs paramètres physico-chimiques sur l'accumulation. L'outil a été par la suite testé sur le terrain. Ce volet a été développé suite aux premiers screenings environnementaux qui ont montré la grande variabilité de la contamination de la phase dissoute des différents systèmes étudiés (variabilité tant spatiale que temporelle). Ainsi un échantillonneur intégratif apparaît comme très intéressant pour tenter d'approcher de façon plus significative une concentration environnementale d'exposition (Kolpin et al., 2004 ; Vrana et al., 2005).

Effet de la concentration sur l'accumulation

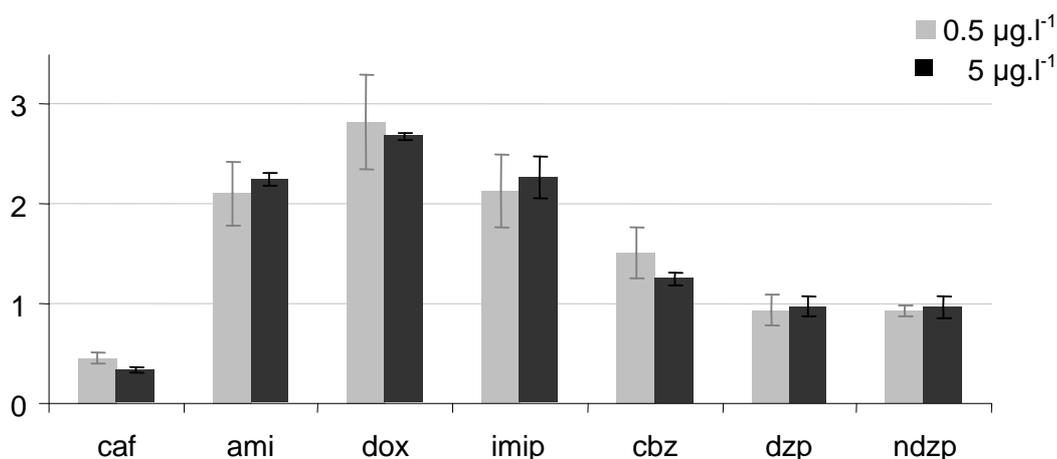


Figure 2 : Rs (ng.g⁻¹) en fonction de la concentration pour différents composés.

L'influence de la concentration a été testée sur les capacités d'accumulation (Figure 2). On trouve une accumulation proportionnelle à la concentration d'exposition dans la gamme de concentration testée ce qui se traduit par des valeurs de Rs (taux d'échantillonnage) indépendantes de la concentration. De plus, l'accumulation n'est pas similaire pour chaque composé. Une accumulation plus importante est observée pour les composés ayant les plus forts log de K_{ow} (coefficient octanol/eau) comme la doxépine, l'imipramine ou l'amitryptiline présentant des log K_{ow} de 4,3, 4,8 et 4,9. La quantité de diazepam et de nordiazepam accumulée est plus faible, or ces composés présentent des log K_{ow} respectivement de 2,8 et 2,9. Le coefficient de partage octanol/eau semble largement influencer sur l'accumulation des composés. Il est intéressant de noter que les composés dont les log K_{ow} sont proches présentent un même ordre de grandeur de quantités accumulées.

Effet de la température sur l'accumulation

L'effet de la température sur l'accumulation est représenté Figure 3. Au vu des résultats obtenus à 15 et 27°C, il apparaît que la température influe les capacités de la phase absorbante à séquestrer les composés. Cependant, l'augmentation est différente selon les composés. En effet, on constate pour la caféine une augmentation de 50% entre 15°C et 27°C alors qu'elle est de 150% pour la carbamazépine. Cette tendance s'explique en partie par le fait que l'augmentation de la température peut faciliter le passage des analytes du milieu échantillonné vers la phase absorbante, en jouant d'une part sur la solubilité des composés mais aussi sur le coefficient de partage octanol/eau.

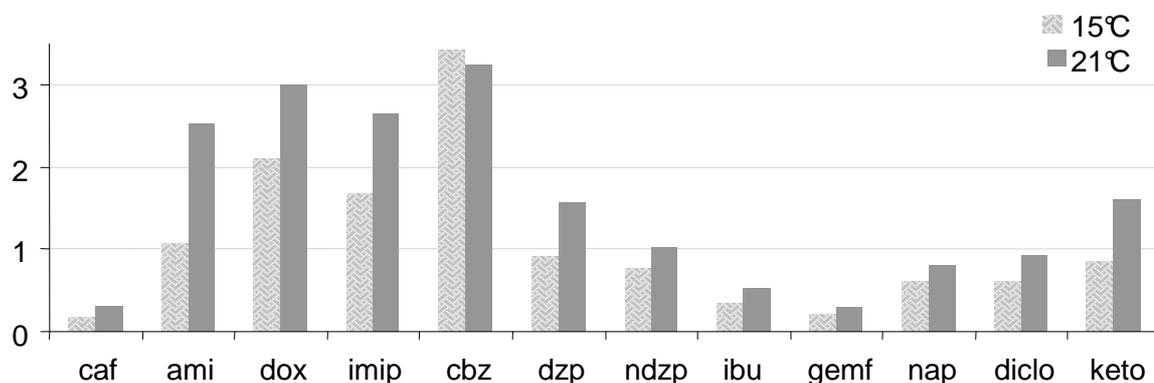


Figure 3 : Effet de la température sur le Rs.(ng.g⁻¹)

Influence de la salinité sur l'accumulation

La figure 4 présente l'accumulation des composés en fonction de la salinité. Pour les composés acides aucune différence notable d'accumulation n'est observée. Par contre, pour certains composés neutres tels que l'amytriptiline, la doxépine ou l'imipramine, une nette diminution de l'accumulation est observée. Ce phénomène peut être expliqué par des changements de propriétés physico-chimiques des composés en milieu salin.

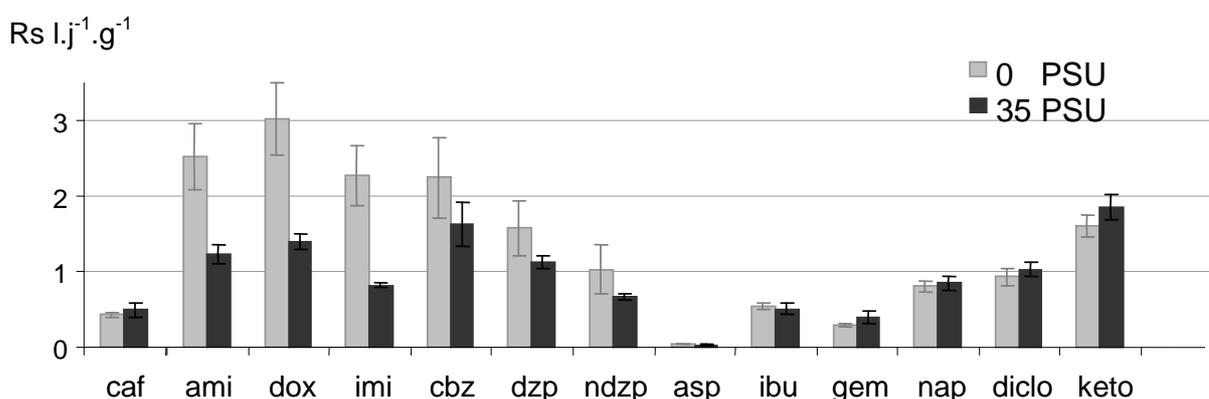


Figure 4 : Influence de la salinité sur l'accumulation.

Influence de la durée d'exposition sur l'accumulation et variabilité de l'outil

Quelque soit la durée on obtient le même facteur d'accumulation. Le Rs ne dépend pas du temps d'exposition ce qui est essentiel en vu d'utiliser ces systèmes pour échantillonner les composés dans le milieu naturel.

Sur l'ensemble des expérimentations en laboratoire, il est important de noter la bonne

reproductibilité obtenue : sur des triplicats, exposés dans des conditions similaires, la variation de la mesure de composé dans la phase n'excède jamais 20% (valeur maximale pour la carbamazépine).

Les différentes expérimentations en laboratoire ont montré que l'outil pouvait être applicable en milieu naturel. L'effet pH n'est pas encore bien compris et des expérimentations supplémentaires sont nécessaires. Les données laboratoire ont néanmoins permis de calculer pour différents composés les Rs qui pourront être ensuite utilisés pour calculer les concentrations des milieux naturels. Les différentes valeurs de Rs sont données Tableau 2.

<u>Composé</u>	<u>Rs (L/jour)</u>
Caféine	0,27 ± 0,062
Amitriptyline	0,45 ± 0,005
Doxépine	0,46 ± 0,009
Imipramine	0,48 ± 0,004
Carbamazépine	0,41 ± 0,019
Diazepam	0,36 ± 0,018
Nordiazepam	0,35 ± 0,020

Tableau 2 : Moyenne ± écart type des Rs exprimés en litre par jour calculés à partir des différences de concentrations entre 0 et 48 heures d'exposition (n=3).

Application de l'échantillonneur intégratif au milieu naturel

Différents systèmes ont été mis en place au niveau du barrage de Pose dans l'estuaire de la Seine pendant respectivement 3 jours et 34 jours. En Figure 5 sont rassemblées les concentrations (ng de composé par g de phase) obtenues sur 3 jours pour 4 composés. On peut noter une bonne reproductibilité d'accumulation pour les 4 composés avec une variabilité inférieure à 20%.

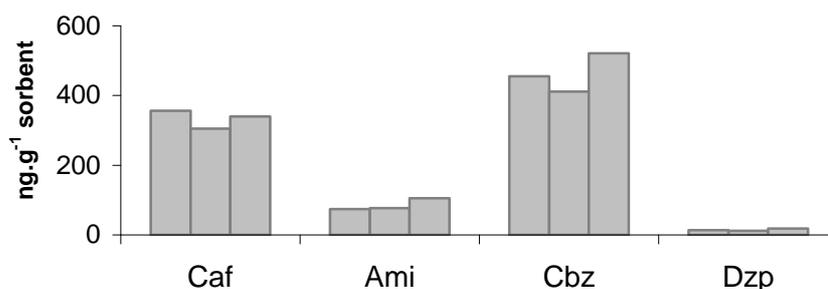


Figure 5 : Concentrations (ng/g de phase) en composés dans les POCIS après 3 jours d'exposition dans le milieu naturel (Pose).

En utilisant les Rs déterminés en laboratoire, la concentration calculée en carbamazépine dans l'eau, déterminée à partir des quantités accumulées dans la phase, est de 39 ng/L pour les POCIS disposées pendant 3 jours. La valeur de concentration dans la phase dissoute déterminée à partir des quantités accumulées dans la phase se trouve dans le même ordre de grandeur que celle déterminée par l'échantillonnage ponctuel (35 ± 3 ng/L : déterminé selon un prélèvement par jour sur 3 jours). Sur une période relativement courte ce type d'échantillonnage donne donc des résultats satisfaisants pour le composé étudié.

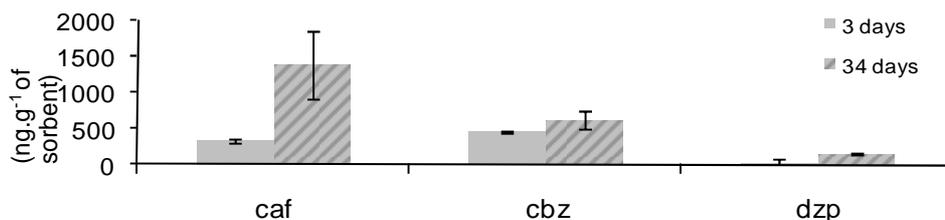


Figure 6 : Concentrations (ng/g de phase) en composés dans les POCIS après 3 et 34 jours d'exposition dans le milieu naturel (Pose)

Lorsqu'on considère la période la plus longue d'accumulation (34 jours), les résultats ne sont pas aussi satisfaisants. Ainsi les POCIS exposées pendant 3 jours dans le milieu ont accumulé 40 ± 12 ng ($n=3$) pour la carbamazépine. Pour les POCIS exposées pendant 34 jours, les quantités sont de 69 ± 10 ng ($n=3$). En considérant les différences de quantités accumulées sur 3 et 34 jours dans le milieu naturel, l'accumulation n'apparaît pas proportionnelle à la durée d'exposition. Ceci est également vérifié pour les autres composés (Figure 6).

Plusieurs explications sont possibles pour expliquer d'une part les différences entre 3 et 34 jours et d'autre part entre la valeur à 34 jours et la concentration réelle dans l'eau. Tout d'abord, les Rs ont été déterminés pour une agitation précise, or dans le milieu naturel il s'agit plus d'un flux d'eau que d'une agitation. Ensuite, les phénomènes de dégradation des composés sont à prendre en compte lorsque ceux-ci sont séquestrés dans la phase. Enfin les phénomènes de « biofouling » sur les membranes, observés dans le cadre de l'application sur le terrain, sont importants puisque ceux-ci vont limiter le passage des analytes de la phase dissoute vers la phase absorbante.

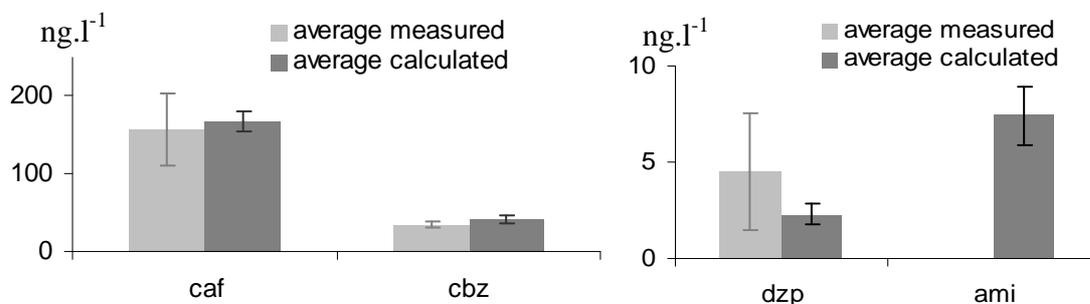


Figure 7 : Mise en évidence de l'amitriptyline par l'échantillonnage intégratif.

Si l'intérêt quantitatif des POCIS reste encore à démontrer, du moins sur des longues périodes, leur intérêt qualitatif est important comme le démontre la Figure 7 et 8. La Figure 7 met en évidence les différences d'abondance d'amitriptyline entre un échantillon effectué par prélèvement d'eau et un échantillonnage passif. Pour le premier type d'échantillonnage, le composé n'est pas détecté ; pour le second échantillonnage, le composé est parfaitement quantifiable. Ces chromatogrammes montrent l'intérêt d'utiliser l'échantillonnage passif pour la détection de composés présents à faibles concentrations. En augmentant la quantité de composés analysés, on détecte des composés difficilement détectables par l'échantillonnage ponctuel.

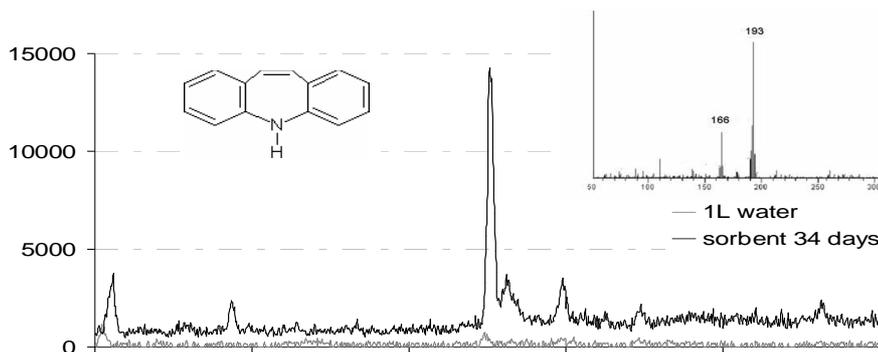


Figure 8 : Mise en évidence d'un produit de dégradation de la carbamazépine par utilisation des POCIS.

La figure 8 montre la détection d'un produit qui n'était pas recherché *a priori* dans l'étude mais qui a été détecté de par sa forte concentration dans la phase des POCIS. Ce composé est l'iminostilbène qui est un produit de dégradation de la carbamazépine. On voit donc avec cet exemple un avantage des POCIS comme outil de « screening » non dirigé. De par leur capacité de piégeage de certains composés ils peuvent aider à mettre en évidence des composés que l'on ne détecterait pas autrement.

d) Screenings environnementaux

Comparaison de différents systèmes estuariens

L'estuaire de la Seine, en tant que zone fortement anthropisée a fait l'objet de plusieurs campagnes, concernant à la fois des points de rivière et des stations d'épuration (STEP).

Les estuaires de la Gironde, de la Loire et de l'Adour ont aussi fait l'objet de campagnes d'échantillonnage. Plusieurs STEP ont également été échantillonnées en Gironde.

La calanque de Cortiou est une zone de la mer Méditerranée dans laquelle se déverse l'effluent de la station d'épuration de Marseille (1,3 Millions équivalents-habitants). Une campagne de prélèvements a été effectuée au niveau du rejet et dans la zone d'influence de celui-ci.

Le Bassin d'Arcachon a fait l'objet d'une campagne préliminaire qui n'a pas mis en évidence de contamination flagrante des différents sites étudiés (ports et tributaires).

	GIRONDE	LOIRE	ADOUR	SEINE
Aspirine	ld – 4	ld – 27	8 – 28	ld – 196
Caféine	ld – 31	ld – 73	ld – 16	40 – 860
Diclofénac	ld – 4	ld – 6	8 – 23	8 – 380
Gemfibrozil	ld – 4	ld – 5	1 – 9	3 – 126
Ibuprofène	ld – 3	ld – 9	14 – 37	5 – 610
Kétoprofène	ld – 24	ld – 9	ld – 3	3 – 78
Naproxène	ld – 7	ld – 8	1 – 6	3 – 185
Carbamazépine	ld - 13	ld - 228	ld - 8	3 - 164

Tableau 3 : Concentrations extrêmes (ng/L) mesurées dans les différents estuaires en phase dissoute. Ld : limite détection

Le Tableau 3 présente les gammes de concentrations des quatre estuaires étudiés en phase dissoute. La Gironde est l'estuaire le moins impacté. Bien qu'il y ait deux villes importantes sur la Garonne, Bordeaux et Toulouse, le débit important du fleuve limite sans doute l'impact des

stations d'épuration qui peuvent s'y déverser. Le même phénomène est visible sur la Loire pour laquelle les concentrations restent faibles, sauf en un point, situé à proximité d'un effluent de station d'épuration.

L'Adour est un petit estuaire sur lequel se trouvent des villes dont la population fluctue de manière importante en fonction des saisons (stations balnéaires). Les concentrations qui y sont mesurées sont globalement peu élevées.

L'estuaire de Seine est de loin le plus impacté avec des concentrations de plusieurs centaines de ng/L selon les composés.

Sur le suivi pluriannuel de l'estuaire de Seine, divers phénomènes ont pu être mis en évidence. Concernant la répartition longitudinale de la contamination, la majeure partie des apports provient de l'amont de l'estuaire (amont barrage de Poses) avec l'impact très significatif de l'agglomération parisienne. Les niveaux de concentration varient selon les composés, leur mode de consommation et leur dégradabilité, que ce soit au niveau des stations d'épuration ou dans le milieu naturel.

La caféine est un composé provenant principalement de la consommation de café. Même si sa dégradabilité est importante (généralement supérieure à 85% (Joss et al., 2005), l'importance des quantités apportées fait que ce composé est très présent dans les systèmes fortement anthropisés comme celui de la Seine, avec des concentrations mesurées jusqu'à 900 ng/L. L'importante dégradabilité dans le milieu entraîne néanmoins une diminution le long de l'estuaire, pour atteindre des concentrations de l'ordre de la dizaine de ng/L en sortie d'estuaire.

La carbamazépine suit un processus différent. Son utilisation comme antidépresseur léger et dans le traitement de l'épilepsie amène une faible consommation. Néanmoins, sa faible dégradabilité, avec des taux d'élimination communément constatés comme inférieurs à 7 % (Ternes, 1998), entraîne sa présence dans la Seine, avec des concentrations de l'ordre de 100 ng/L, avec une stabilité tout au long de l'estuaire, due à sa persistance dans le milieu.

Les anti-inflammatoires (naproxène, ibuprofène, kétoprofène, diclofénac...) sont relativement présents dans l'estuaire de la Seine avec des concentrations de l'ordre de la dizaine de ng/L. Consommés en quantités importantes, souvent sans prescription médicale, ils sont plus ou moins bien dégradés (entre 30 et 80%) dans les stations d'épuration (Tauxe-Wuersch et al., 2005 ; Joss et al., 2005 ; Buser et al., 1999 ; Quintana et al., 2005), selon les modes de traitement.

Etude de différents effluents de station d'épuration

Différentes stations d'épuration ont été étudiées dans l'estuaire de la Seine, celui de la Gironde, dans le bassin versant de l'Hérault ainsi que celle de Marseille. Il en ressort une très grande variabilité en termes d'effluents d'un point de vue qualitatif. C'est le procédé qui est le facteur déterminant. Ainsi l'effluent de la STEP de Marseille est dominé par le paracétamol qui est un composé *a contrario* quasi-absent dès lors que la station est équipée d'un traitement biologique. Les apports vers le milieu aquatique et les eaux de surface sont majoritairement d'un point de vue quantitatif conditionnés par le volume d'eau rejeté par la station car les concentrations sont dans les mêmes ordres de grandeur à traitement et mode de fonctionnement équivalents. Les rejets semblent en moyenne plus concentrés en hiver qu'en été ce qui pourrait être dû à une consommation de médicaments hivernales plus importante et à des temps de résidence plus faibles. Enfin les composés très stables comme la carbamazépine montrent des concentrations très stables (quelques centaines de ng/L) au cours du temps tandis que les composés les plus dégradables comme l'aspirine voient leur concentration varier énormément (du ng/L au µg/L).

Cas de la Calanque de Cortiou

La station d'épuration de Marseille, créée en 1987 est l'unique station drainant toute la communauté urbaine de Marseille, assurant actuellement le traitement de 1 300 000 équivalents habitants. Cette installation, qui ne possédait pas de traitement biologique au moment de notre étude, avait, compte tenu des avancées technologiques depuis sa construction, un mode de fonctionnement dépassé. Le rejet de cette station se fait par l'intermédiaire d'un émissaire ouvert sur la mer Méditerranée dans la Calanque de Cortiou. Différentes campagnes ont eu lieu en 2004 et 2005 en collaboration avec IFREMER. Des prélèvements d'eau de surface ont été effectués autour de la zone de rejet.

Les concentrations mesurées dans la calanque de Cortiou sont globalement très élevées, avec cependant une gamme de variation très importante selon les composés.

Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (Aspirine, diclofénac, naproxène, ibuprofène et kétoprofène), le paracétamol et la caféine sont présents à de très fortes concentrations, de l'ordre du µg/L (Figure 9). Pour le paracétamol, ces concentrations vont jusqu'à 250 µg/L.

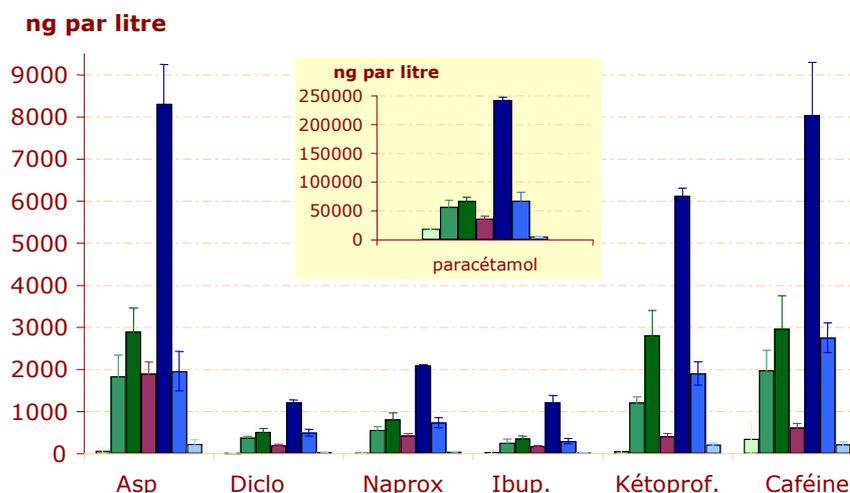


Figure 9 : Concentrations en anti-inflammatoires dans la calanque de Cortiou.

Pour les antidépresseurs (amitriptiline, diazépam, nordiazépam, carbamazépine) et l'hypolipémiant, le gemfibrozil, les concentrations sont plus faibles, de l'ordre de la dizaine de ng/L, mais ces niveaux sont plus élevés que ceux présentés dans les publications, même pour des rejets de stations d'épuration, hormis pour la carbamazépine, parfois mesurées jusqu'à 6 µg/L (Terns, 1998) (Figure 10). Ces niveaux de concentrations sont représentatifs de la consommation de chaque composé : la caféine provient majoritairement de la consommation de boissons, les anti-inflammatoires et autres antipyrétiques sont des composés fortement utilisés, sans prescription médicale et avec des prises journalières comprises entre 100 et 6000 mg. Par opposition, les antidépresseurs et les hypolipémiants sont des composés moins consommés quantitativement, car d'usage moins répandu, avec prescription médicale et avec des prises beaucoup moins importantes (de l'ordre de 10 à 1000 mg par jour). Les concentrations de ces composés sont relativement faibles, mais ces types de composés présentent une toxicité avérée sur les organismes aquatiques (Clevers, 2003). La présence de ces classes thérapeutiques à des concentrations non négligeables montre le fort impact de la station d'épuration dans une zone assez large autour du rejet.

La contamination de la Calanque de Cortiou ne semble pas affectée par la dégradation des composés dans la station d'épuration. Les composés les plus dégradables dans les stations (aspirine, ibuprofène, caféine) sont aussi présents que les composés beaucoup plus persistents (diclofénac, kétoprofène...). Le paracétamol par exemple est un composé très sensible aux

traitements des stations d'épuration, montrant un abattement généralement supérieur à 95 % en présence d'un traitement secondaire biologique (Joss et al., 2005).

L'absence de ce type de traitement sur la station d'épuration de Marseille ainsi que sa capacité de traitement très importante explique les fortes teneurs mesurées.

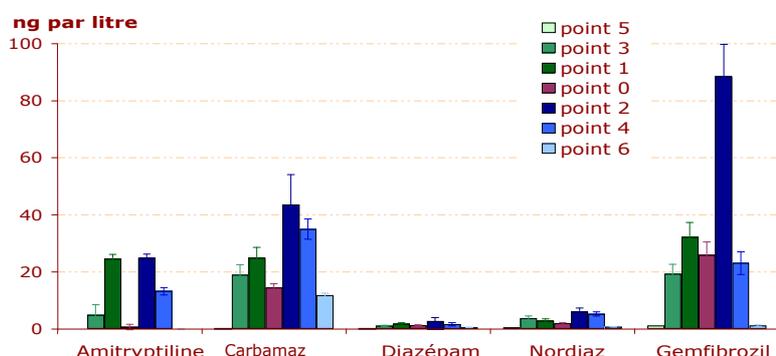


Figure 10 : Concentrations en antidépresseurs et hypolipémiant dans la calanque de Cortiou.

Si on s'intéresse à l'apport particulaire il varie entre 7 et 500 ng/g selon les composés ce qui met en évidence le rôle potentiel de source et de vecteur que peuvent représenter ces particules. Néanmoins, compte tenu de la très faible concentration en matières en suspension des eaux de mer (ici 7 mg/L), la phase particulaire est très nettement minoritaire par rapport à la phase dissoute (environ 0,1 ng/L) dans la contamination globale de la colonne d'eau.

e) Variations saisonnières

Pour étudier les variations saisonnières nous avons choisi un site d'étude dans l'estuaire de Gironde et un dans l'estuaire de la Seine. Les travaux de l'estuaire de Seine ont dans ce cas précis été entrepris dans le cadre du programme Seine –Aval. Ceux de la Jalle d'Eysines dans le cadre de ce projet.

Cette étude a mis en évidence, en plus de la réelle contamination de l'effluent par les substances pharmaceutiques le devenir de ces composés après leur introduction, en corrélant aux analyses classiques la mesure du bore apporté par l'effluent. Cela a permis de mesurer le phénomène de dilution du rejet dans le cours d'eau et donc d'isoler la part réelle de la dégradation dans la diminution de la teneur en composés des eaux de surface.

Les concentrations des formes libres et conjuguées de 8 stéroïdes hormonaux (œstrone, 17β-œstradiol, œstriol, mestranol, 17α-éthynylœstradiol, progestérone, noréthindrone et D-norgestrel) ont été déterminées dans l'effluent de la station d'épuration d'Eysines (près de Bordeaux), et dans la rivière recevant les effluents de cette station, la Jalle d'Eysines. Trois campagnes d'échantillonnage ont été menées (deux en conditions estivales, une en conditions hivernales), afin d'étudier les distributions spatiales et temporelles des stéroïdes hormonaux dans ce cours d'eau.

Seuls les œstrogènes naturels ont pu être détectés dans l'effluent de la station d'épuration d'Eysines, uniquement sous forme libre et dans la phase dissoute. L'œstrone, stéroïde majoritaire dans l'effluent, a été détecté dans les trois échantillons analysés (17 – 71 ng.L⁻¹), tandis que le 17β-œstradiol et l'œstriol n'ont été détectés qu'une seule fois, à des niveaux nettement plus faibles (< 5 ng.L⁻¹). En aval du rejet, les niveaux de stéroïdes étaient ainsi très nettement supérieurs aux limites de détection.

Des variations saisonnières de la vitesse de dégradation de l'œstrone ont pu être mises en évidence. Ainsi, en conditions estivales, la diminution apparente de la concentration en œstrone

ne peut être expliquée par la seule dilution (estimée à partir des concentrations en bore dissous); on observe une chute de 50 % de la concentration initiale en œstrone en moins de 1.6 km en aval du rejet. Un effet saisonnier a été observé puisqu'en conditions hivernales aucune diminution significative de la concentration en œstrone n'a pu être mise en évidence dans la Jalle d'Eysines. Il apparaît que les phénomènes d'adsorption jouent un rôle mineur dans le processus observé, puisque l'œstrone n'a pu être détectée dans la phase particulière des échantillons prélevés dans la Jalle d'Eysines. Par conséquent, il est plausible que la biodégradation des œstrogènes naturels soit le processus central dans le phénomène observé, et les différences observées entre les différentes campagnes d'échantillonnage sont probablement liées à des différences d'activité bactérienne dans la Jalle d'Eysines.

La Figure 11 présente les résultats obtenus pour 4 composés aux propriétés différentes. Pour la campagne hivernale (février 2005), on note une absence de dégradation de l'ensemble des composés : les concentrations mesurées sont très proches des concentrations calculées en utilisant la concentration en bore comme facteur de dilution de l'effluent. L'augmentation du débit de la rivière limitant de plus le temps de résidence des eaux polluées, l'eau contaminée par l'émissaire est introduite sans abattement de cette pollution dans la Garonne au km 10.

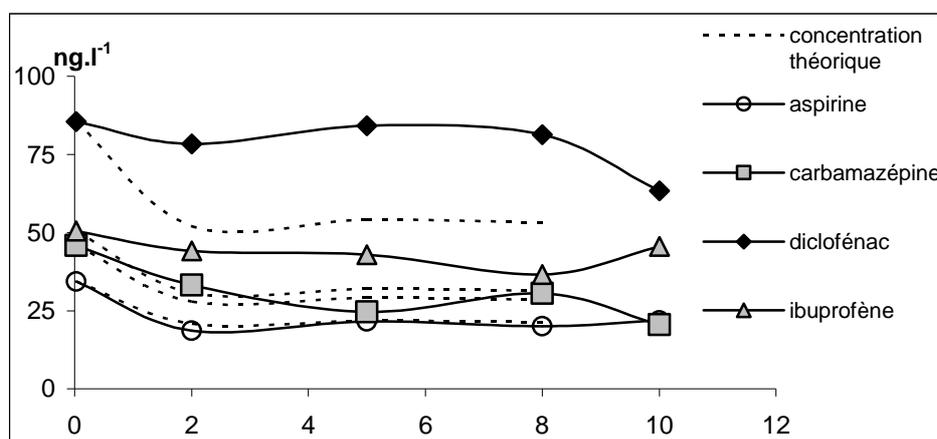


Figure 11: Suivi des substances pharmaceutiques dans la Jalle d'Eysines (km en abscisses), février 2005.

A l'opposé, pour la même campagne d'étude réalisée en condition estivale (juillet 2004), le comportement des composés varie considérablement (Figure 12). La carbamazépine et le diclofénac mesurés suivent les concentrations « prédites », c'est-à-dire que la diminution de concentration dans la rivière est uniquement le fait de la dilution. A l'inverse, les concentrations de l'ibuprofène et de l'aspirine mesurées dévient considérablement des concentrations calculées : des phénomènes de dégradation entrent en jeu, entraînant la disparition de toute contamination par l'aspirine moins de 2 kilomètres après le rejet et celle de l'ibuprofène au point de confluence (km 10).

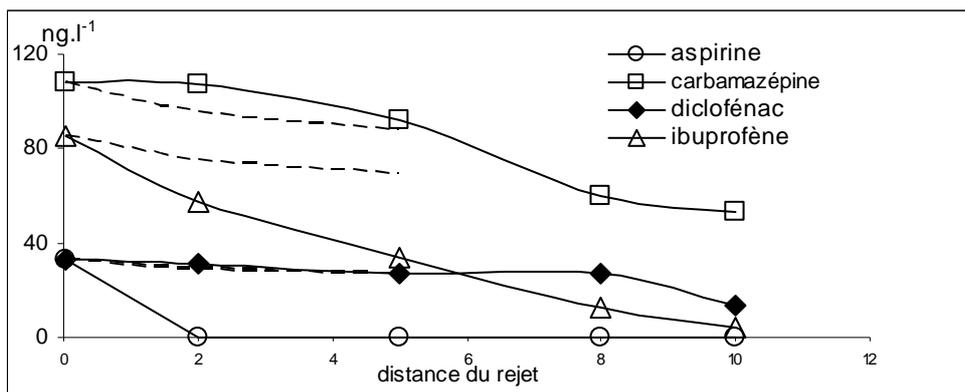


Figure 12: Suivi des substances pharmaceutiques dans la Jalles d'Eysines (distance en km), juillet 2004.

La teneur particulière en substances pharmaceutiques a été mesurée sur l'ensemble des prélèvements effectués sur la Jalle d'Eysines, pendant les différentes campagnes saisonnières. Ses résultats quantitatifs, parmi les premiers actuellement publiés montrent une réelle contamination de la phase particulaire (Figure 13), avec des concentrations en moyenne de plusieurs centaines de ng.g^{-1} , allant jusqu'à 1600 ng.g^{-1} pour le gemfibrozil (juillet 2003). Ces concentrations décroissent progressivement tout au long de la rivière, pour atteindre des niveaux inférieurs à 10 ng.g^{-1} à la confluence avec la Garonne. En plus des phénomènes de dégradation, déjà observés sur la phase dissoute, un phénomène de dilution intervient. En effet, l'entrée d'eau de la Garonne, qui entre dans la rivière à marée montante, apporte une quantité de particules importantes, jusqu'à 45 mg.l^{-1} .

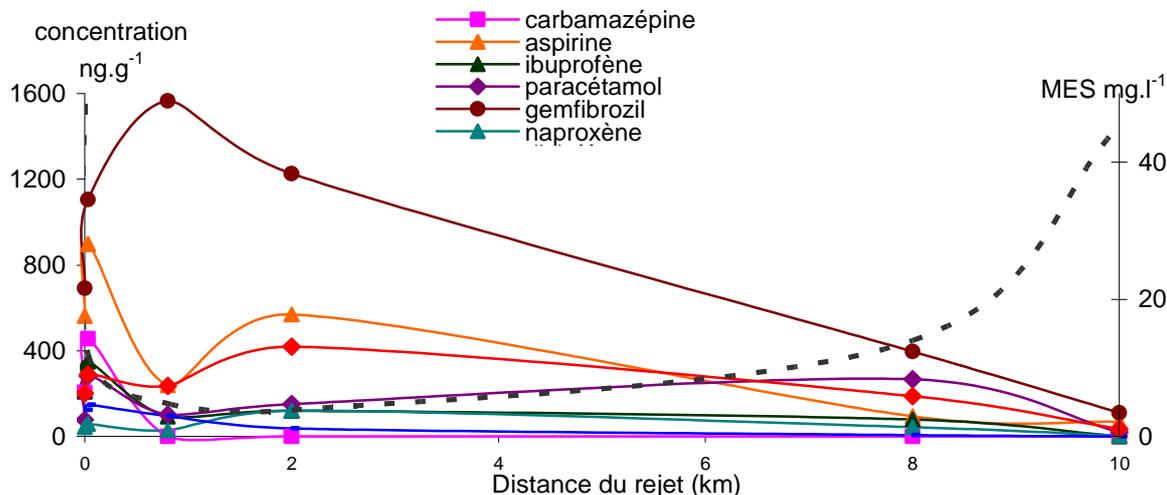


Figure 13 : Concentrations mesurées dans la Jalle d'Eysines, juillet 2003, exprimées en ng.g^{-1} .

Les concentrations mesurées en septembre 2003 et en février 2004, si elles sont moins élevées (entre 13 et 1330 ng.g^{-1} (aspirine, kétoprofène) en septembre et entre 0 et 380 ng.g^{-1} (kétoprofène) en février) montrent les mêmes tendances. Parmi les composés les plus fréquemment et abondamment retrouvés, on note le kétoprofène, le diclofénac, l'aspirine et la caféine et exceptionnellement en juillet, le gemfibrozil.

Si le kétoprofène le diclofénac et le gemfibrozil comptent parmi les composés pharmaceutiques les moins polaires (log Kow respectivement de 3,12, 4,51 et 4,77) ce qui peut justifier leur présence dans les particules, il n'en n'est pas de même pour la caféine et l'aspirine. En effet avec des log Kow de respectivement 0 et 1,19, ces deux composés, fortement polaires,

ne devraient pas être retrouvés dans les phases solides. D'autres résultats antérieurs ont déjà montré ce phénomène, en notant la présence de paracétamol ($\log K_{ow}$ 0,46) dans des boues de stations d'épuration (Khan et Ongerth, 2002). L'intervention d'autres phénomènes, comme des interactions électrostatiques (Tolls, 2001) semblent entrer en jeu, même si l'on manque encore de recul et de données sur ce point.

Les phénomènes de répartition entre la phase dissoute et la phase particulaire sont encore difficiles à élucider. Si on observe les teneurs respectives dans les deux phases tout au long de la Jalle d'Eysines, il s'avère que le comportement est très variable selon les composés.

La figure 14 présente cette répartition sur 4 composés : le diclofénac, l'ibuprofène, le naproxène et la carbamazépine. La discrimination des phénomènes de dégradation et de transferts entre les deux phases n'est pas facile à mettre en évidence. Pour le diclofénac, les concentrations dans la phase dissoute restent constantes tandis que la concentration dans les particules décroît rapidement. Pour l'ibuprofène, les deux concentrations diminuent dans les deux phases. Pour le naproxène, la concentration particulaire, bien que faible, reste relativement constante dans les échantillons. La carbamazépine, non soumise aux phénomènes de dégradation, voit sa concentration décroître très rapidement dans les particules tandis qu'elle reste stable dans la phase dissoute. Dans ce cas, le transfert de la phase dissoute vers la phase particulaire semble être mis en évidence.

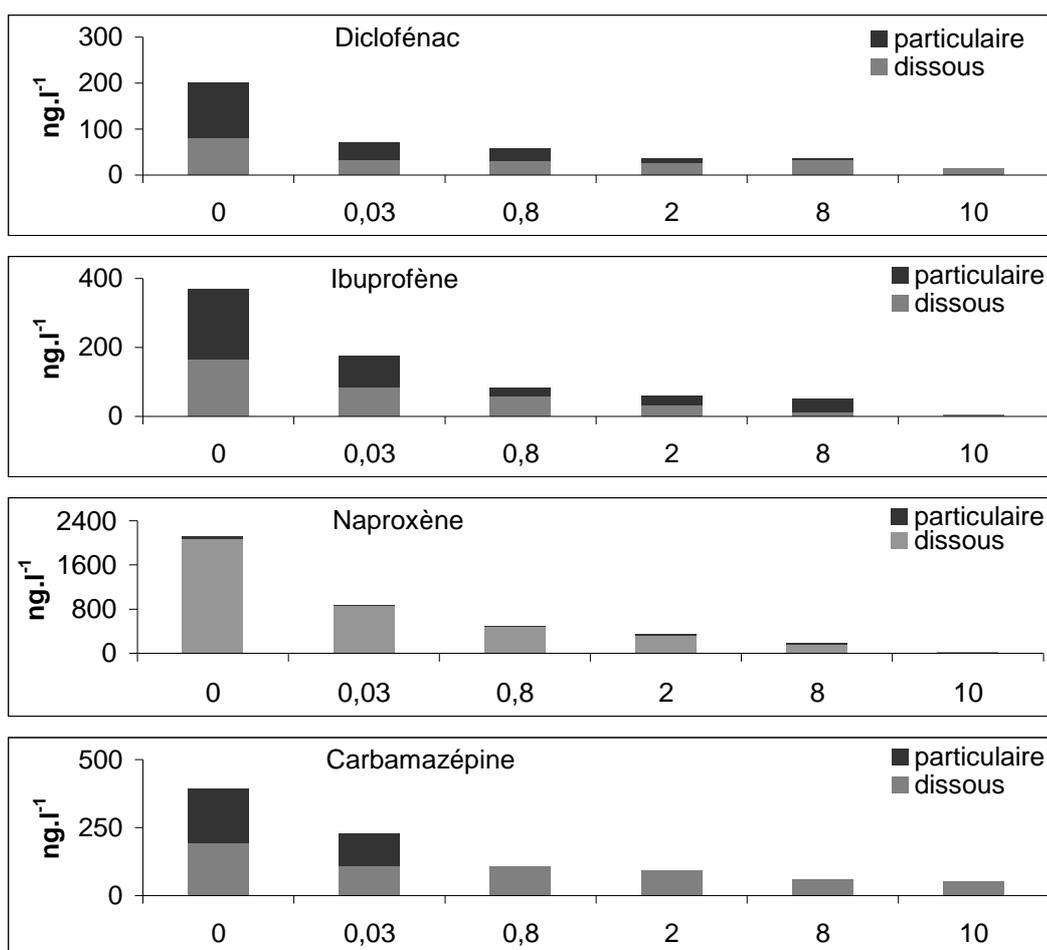


Figure 14 : Répartition entre les deux phases dans la Jalle d'Eysines, concentrations exprimées en $ng.l^{-1}$, campagne de juillet 2003 (km en abscisses).

Les phénomènes qui se déroulent entre ces deux phases sont autant plus difficiles à appréhender que la phase particulaire émise par les stations d'épuration a des caractéristiques physico-chimiques très particulières, avec une teneur très élevée en carbone organique (entre 15 et 18 mg.l⁻¹ selon les campagnes) et la présence d'une phase colloïdale plus ou moins importante qui peut modifier fortement les phénomènes d'interaction.

f) Transfert vers les organismes et contamination sédimentaire

L'accumulation des substances pharmaceutiques a été mesurée sur une espèce sentinelle, la moule *Mytilus edulis*, en prenant la carbamazépine comme composé modèle. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 15. On note une accumulation de ce composé au cours de l'exposition, beaucoup plus marquée pour les moules immergées sur toute la durée de l'exposition (14 jours). Pour ces moules, le niveau en fin d'exposition atteint 9 µg.g⁻¹, contre 5 µg.g⁻¹ pour les organismes qui alternent les cycles d'immersion et d'émersion.

Ces données d'accumulation figurent parmi les premières obtenues sur des organismes bivalves en ce qui concerne les substances pharmaceutiques. Auparavant, une étude avait montré l'accumulation de diclofénac dans des truites (Schwaiger *et al.*, 2004) exposées à des concentrations dans la phase dissoute de 1 à 500 µg.l⁻¹. Les concentrations mesurées dans les différents organes montraient une accumulation préférentielle dans le foie (jusqu'à 6000 ng.g⁻¹ pour une exposition à 500 µg.l⁻¹).

Les résultats obtenus ici montrent une différence entre les moules exposées en permanence (immergées) et celles subissant l'alternance tidale. Les moules immergées accumulent quasiment deux fois plus de carbamazépine que celles subissant l'alternance, pour un niveau d'exposition équivalent (30-40 µg.l⁻¹).

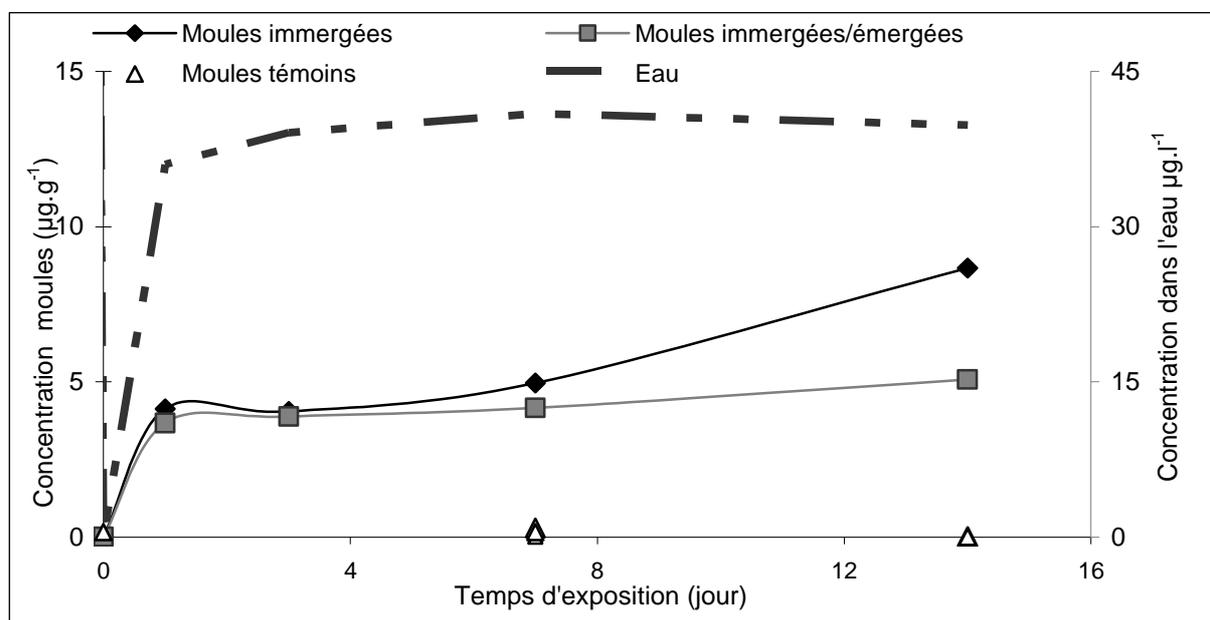


Figure 15: Accumulation de la carbamazépine chez la moule *Mytilus edulis*, exposition en laboratoire.

V- RESULTATS : PHASE 2 Toxic-Chimie

En dépit de la place prépondérante du plancton à la base des réseaux trophiques et malgré l'implication suspectée de ces organismes dans les transferts de contaminants de la colonne d'eau vers les organismes supérieurs, peu d'études écotoxicologiques leur ont été consacrées. Dans de

nombreux estuaires atlantiques, l'espèce prédominante du microzooplancton, *Eurytemora affinis* (Calanoïde, Copépode) semble être un bon candidat pour ce type d'étude, par son abondance, ses cycles biologiques courts et son rôle clé à la base du réseau trophique. De plus, cette espèce vit au contact du bouchon vaseux où les niveaux de contaminants organiques sont particulièrement élevés.

Notre approche s'est focalisée sur différents niveaux d'organisation biologique, pour cibler les effets des médicaments sur le copépode *Eurytemora affinis*, depuis la réponse protéique par l'analyse du protéome ou la mesure d'activité enzymatique, jusqu'à la réponse des individus *via* des expériences de reproduction. Les copépodes sont caractérisés par un cycle de développement très court (de la reproduction jusqu'au stade adulte). Ce sont donc des organismes intéressants pour tester rapidement les effets des contaminants sur différents stades de développement et sur plusieurs générations.

a) L'organisme modèle : *Eurytemora affinis*

Généralités

Le copépode calanoïde, *Eurytemora affinis*, est l'une des espèces les plus abondantes de copépodes sur des aires de distribution disjointes au sein de l'hémisphère nord. Cette espèce est présente en milieu lacustre et essentiellement estuarien, dans plusieurs régions tempérées froides d'Europe (des côtes atlantiques françaises jusqu'en mer de Barents) (Roddie et al, 1984, Peitsch et al, 2000, Mouny et Dauvin, 2002), aux niveaux des côtes du continent nord américain (Laprise et Dobson, 1994, Morgan et al, 1997) mais également dans certaines régions asiatiques (Ban et al, 1989, Lee, 2000). Les individus de cette espèce traversent trois stades de développement (nauplius, copépodite et adulte) décrits dans les travaux de Katona (1970). *Eurytemora affinis* est l'espèce prédominante du mésozooplancton de la plupart des estuaires européens et nord-américains. Ce copépode est une espèce libre en suspension dans la colonne d'eau présentant des migrations journalières vers les eaux de surface ou vers le fond (Hough et Naylor, 1992; Morgan et al, 1997). En Seine, ce copépode domine la communauté mésozooplanctonique de l'estuaire toute l'année (entre 52 et 99.9% dans la zone mésohaline et entre 73 et 99.9 % dans la zone oligohaline) avec un maximum d'abondance à la fin de l'hiver et au début du printemps (190 000 individus par m³) supérieur à ceux observés dans les autres estuaires européens pour la même espèce (Mouny et Dauvin, 2002). En estuaire de Seine, *Eurytemora affinis* est essentiellement consommé par la crevette *Palaemon longiristris* et les gobiidés du genre *Pomatoschistus*, qui sont à leur tour consommés par des espèces commerciales tel que le bar (Mouny, 1998). Il est évident que la forte production de ce copépode dans l'estuaire de la Seine se trouve transformée par les niveaux trophiques supérieurs qui constituent des ressources halieutiques. *Eurytemora affinis* se localise en marge du bouchon vaseux dans l'estuaire de Seine ; cette zone est fortement contaminée et il est important de connaître les modes d'action et les cibles moléculaires des contaminants sur cette espèce-clé du réseau trophique de l'estuaire de la Seine et d'identifier les contaminants présents.

Cycle de reproduction d'*Eurytemora affinis*

Quelques heures après la fécondation, un sac ovigère est formé contenant des œufs (de 20 à 60). Après quelques jours, les œufs éclosent et le sac ovigère est ouvert. Le cycle de développement de ce copépode comprend 3 phases successives présentant des métamorphoses : la phase nauplius (6 stades et 5 mues), la phase copépodite (5 stades et 5 mues) avant d'atteindre la maturité sexuelle et le stade adulte (arrêt des mues) caractérisés par un dimorphisme sexuel (Figure 16). D'une manière générale, la durée totale du cycle de développement du copépode *E. affinis* est dépendante de la température de l'eau. Toutefois, en conditions optimales celle-ci varie entre 18 et 20 jours.

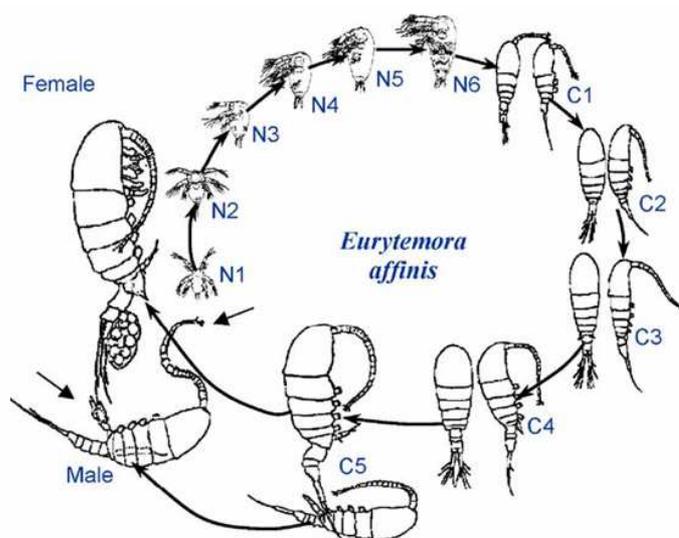


Figure 16 : Stades de développement du copépode *Eurytemora affinis* adapté de Katona (1970a, b) par Souissi. N : stade nauplius, C : stade copépodite.

Au stade adulte, les femelles, comme chez la plupart des calanoïdes, présentent des caractéristiques biométriques différentes de celles des mâles (taille : 920-1100 μm et 800-960 μm et poids sec; 12.8 μg et 8.0 μg respectivement chez les femelles et les mâles) (Mouny, 1998).

b) Matériel et Méthodes

Pour notre étude, un site de prélèvement a été retenu, l'aire géographique du pont de Tancarville (Figure 17), dans la zone oligohaline de l'estuaire de Seine. Le choix de cette zone restreinte s'explique par la faible biodiversité zooplanctonique qu'elle présente, caractérisée par une prépondérance du copépode *E. affinis*. Les copépodes ont été prélevés à l'aide d'un filet WP2 de maille 200 μm et triés au laboratoire.

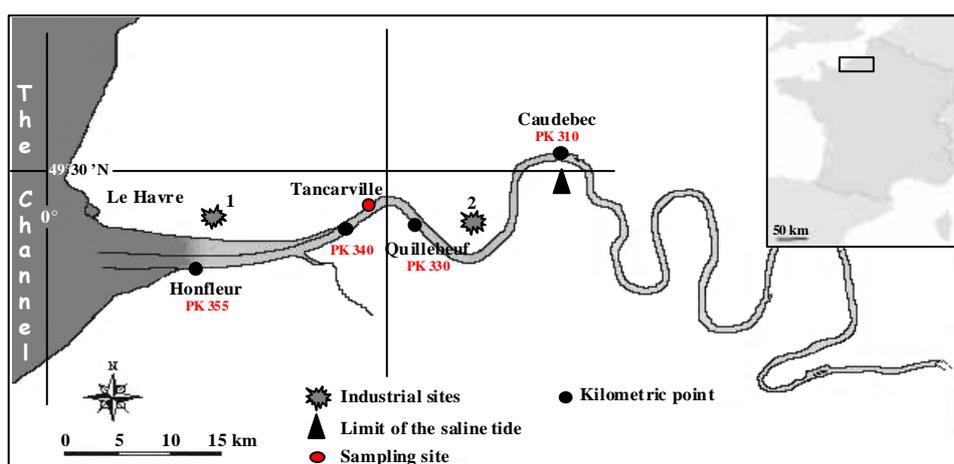


Figure 17 : L'estuaire de Seine et le site de prélèvement

Pour les expositions au laboratoire, les copépodes ont été directement triés sur le bateau. Pour cela, l'eau est filtrée sur plusieurs tamis de mailles différentes dans le but de séparer les

copépodes des autres organismes (essentiellement des prédateurs). Par une suite de dilutions successives, les copépodes sont isolés des particules qui ont décantées. L'échantillon pur ne contenant plus que des copépodes est ensuite filtré, puis, les copépodes sont remis dans de l'eau de l'estuaire filtrée. Les échantillons ainsi préparés ont par la suite été transférés en voiture jusqu'à la station marine de Wimereux où les copépodes ont été introduits dans un canal de 300 L d'eau à 15‰ (eau de mer filtrée à 0,1 µm et eau ultra pure) dans une pièce climatisée à 10°C pour une décontamination de 3,5 jours. Pendant cette période, les copépodes sont nourris avec un mélange de 3 types d'algues.

Par la suite, pour toute analyse chimique, les échantillons d'*E. affinis* sont lyophilisés. Pour les mesures biochimiques, les copépodes ont été conservés au congélateur à -80°C.

Exposition au laboratoire (Figure 18)

Ce paragraphe est dédié à la description du matériel utilisé pour les expositions au laboratoire des copépodes, à un flux continu de contaminants sélectionnés d'une part, mais également au plan d'expérimentation.

Avant de commencer les expériences d'exposition, des tests ont été réalisés sur l'eau des mésocosmes, pour évaluer le débit de l'eau et le temps nécessaire pour atteindre une saturation des aquariums en contaminants afin d'être assuré de réaliser les expositions aux concentrations souhaitées, mais également pour avoir une exposition constante sur toute la durée de l'expérience. Une fois ces paramètres établis, avant chaque exposition, les aquariums sont conditionnés sans organisme, selon les critères de débit et de durée de saturation relatifs à chaque classe de contaminants.

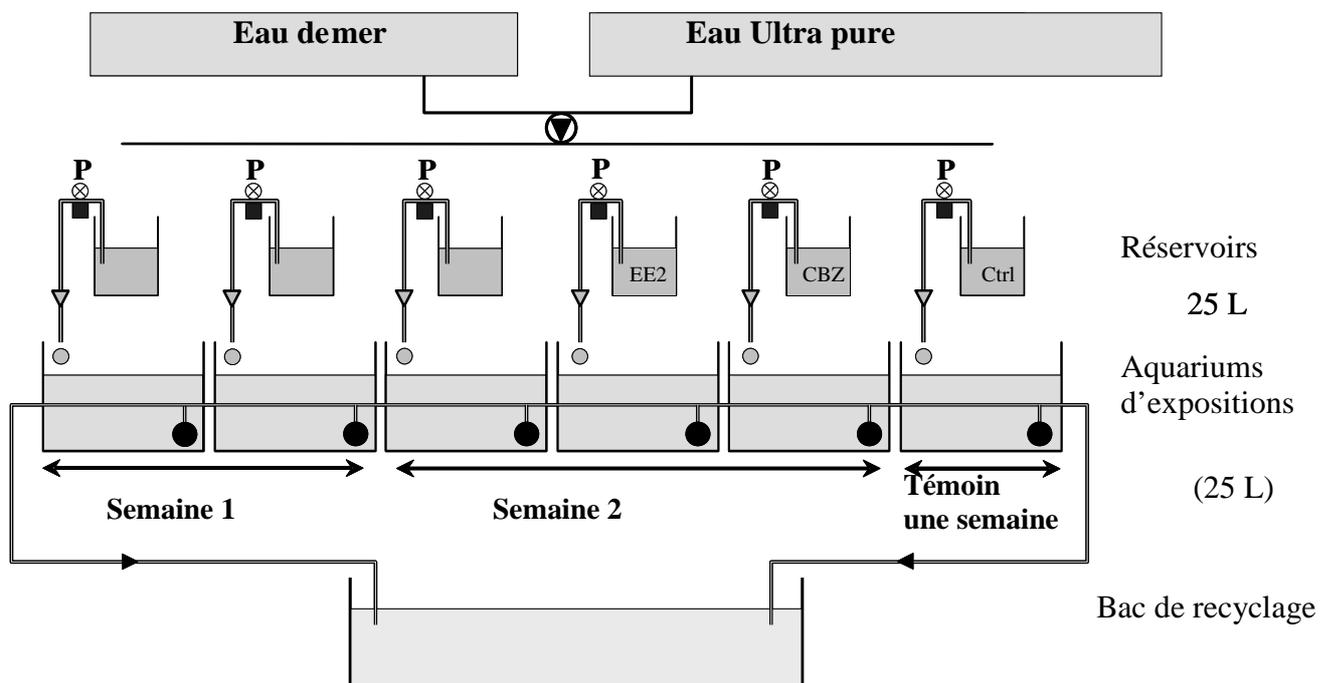


Figure 18 : Schéma du dispositif expérimental (P : pompe péristaltique).

Puis, après trois jours et demi de décontamination des copépodes dans le canal de 300L, ceux-ci sont transférés pour une durée de 86 heures dans les milieux d'exposition conditionnés. Pendant les expositions, les copépodes sont soumis à éclairage 12/24 heures avec un faible bullage et subissent un jeûne total.

Lors de chaque série d'expériences, un « contrôle » contenant des copépodes non exposés a été réalisé en parallèle.

Les concentrations appliquées ont été choisies volontairement proches de celles mesurées dans la colonne d'eau (somme de la concentration de la phase dissoute et de la phase particulaire exprimée en ng.L^{-1}). L'exposition pour la carbamazépine s'est effectuée à 500 ng/L et pour EE2 10 ng/L. Enfin, pour chaque expérience, une aliquote a été congelée dans l'azote liquide lors du prélèvement *in situ* (bioaccumulation/protéome/activités enzymatiques) qui correspond au contrôle, puis un prélèvement après trois jours et demi de décontamination (bioaccumulation/protéome/activités enzymatiques) qui constitue le témoin décontamination et enfin, un prélèvement en fin d'exposition dans les bacs non contaminés et ceux exposés (bioaccumulation/protéome/activités enzymatiques).

Bioessais sur la reproduction

Des femelles ovigères ont été isolées après deux jours de décontamination dans une eau propre, afin de recueillir les larves nauplii (le premier stade de développement) pour lancer les bioessais. Les nauplii seront mises en contact avec les médicaments, le milieu sera renouvelé tous les jours et les animaux seront également nourris au même moment. Au bout du 10^{ème} jour ou plus les femelles seront séparées des mâles, chaque femelle isolée sera placée dans un cristalliseur calciné et l'exposition semi-statique se poursuivra jusqu'au 21^{ème} jour. Les femelles isolées au bout du 10^{ème} jour sont capables dans des conditions normales de produire 1 à trois sacs ovigères. Les effets sur la reproduction seront évalués par le nombre de sacs ovigères produits (taux de fécondation), le nombre de nauplii par sac, le pourcentage de nauplii viables et le sex-ratio obtenus après la ponte. En parallèle les différents stades de développement ont été observés et identifiés, afin de mettre en évidence d'éventuels retards dans les phases de développement. Les observations sont réalisées à l'aide d'une loupe binoculaire LEICA MZ-6 permettant un grossissement x 40. L'étude des différents stades de développement de *E. affinis* a été réalisée à partir des planches réalisées par Katona (1971).

Techniques biochimiques

L'acétylcholine est un médiateur chimique libéré par la terminaison nerveuse, au niveau des jonctions neuromusculaires et inter-neuronales, pour permettre la transmission de l'influx nerveux. L'activité acétylcholinestérase (AChE) est mesurée par la méthode d'Ellman (1961), consistant à doser le produit de l'hydrolyse de l'acétylthiocholine en thiocholine. Le réactif dithiobisnitrobenzoate (DTNB) en se fixant sur la thiocholine provoque l'apparition d'une coloration jaune. L'intensité de cette coloration dépend de l'activité AChE et est mesurée pendant 2 minutes à l'aide d'un spectrophotomètre à 412 nm.

L'activité enzymatique glutathion-S-transférase est mesurée à partir de l'extrait protéique cytosolique de copépodes par la méthode colorimétrique de Habig et al (1974). Cette méthode est basée sur la mesure du produit de la conjugaison de deux substrats, le glutathion réduit (GSH) et le CDNB catalysée par une enzyme, la glutathion S-transférase. Cette réaction conduit à la formation d'un thioéther qui absorbe à 340nm.

Expression protéique chez *Eurytemora affinis*

Les techniques d'extraction protéiques chez *Eurytemora affinis* ont été développées au laboratoire du Havre en collaboration avec B. Rocher. Celles-ci consistent à extraire les protéines exprimées chez cette espèce par plusieurs séquences Ultra-Turrax/sonication successives dans un

tampon d'extraction. Ensuite, afin de purifier et de concentrer l'extrait, celui-ci subit une série de centrifugations et une ultracentrifugation à 24 000 rpm. La dernière étape consiste à incuber les protéines avec une solution de TCA (TriChloroacetic Acid) afin de précipiter les protéines puis de les concentrer par une ultime centrifugation. Les protéines de l'extrait ainsi obtenu sont ensuite séparées par électrophorèse bidimensionnelle. Cette technique classique dans le milieu médical consiste à séparer les protéines d'une solution biologique par deux migrations successives. La première électrophorèse (IEF : électrophorèse à focalisation isoélectrique) permet de séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique ($\text{pH} = \text{pI}$: point isoélectrique). Lors de la seconde électrophorèse, les protéines sont séparées suivant leur taille par tamisage moléculaire sur gel SDS PAGE. Ensuite, les protéines peuvent être révélées par différentes techniques de coloration (mise en évidence de spots représentatifs des protéines à analyser). Dans notre étude deux techniques ont été choisies pour révéler les protéines sur les gels, en vue d'applications différentes mais complémentaires pour les analyses ultérieures. Les gels ont d'abord été colorés par une solution au nitrate d'argent (méthode la plus sensible et très reproductible) pour l'analyse bio statistique. Cette analyse s'effectue à l'aide d'un logiciel de traitement d'images commercialisé par Amersham Biosciences, permettant de comparer les différences d'expression significatives des protéines d'une condition à l'autre. Cette technique a permis de mettre en évidence les protéines présentant une expression significativement différente entre les témoins et les animaux exposés, y compris pour les protéines les plus faiblement exprimées. Puis une deuxième série de gels a été colorée au bleu colloïdal avec pour objectif une identification/séquençage des protéines d'intérêts (sélectionnées à la suite de l'analyse des gels colorés au nitrate d'argent) par analyse chimique.

Pour l'identification des protéines, plusieurs méthodes ont été utilisées. La première et la plus classique consiste en l'extraction des listes de pics de masse à partir des spectres de fragmentation qui sont comparées à des données théoriques provenant de la digestion *in silico* de banques de séquences protéiques à l'aide de l'outil MASCOT disponible sur le web. Cet outil est utilisable lorsque les séquences sont parfaitement conservées. Dès qu'il y a une substitution dans la chaîne peptidique, le logiciel n'est plus en mesure de retrouver la protéine candidate. Dans ces cas où la divergence de séquence est assez marquée, il faut recourir à l'utilisation de méthodes de séquençage dites « de novo ». Il est nécessaire d'établir les séquences de façon plus ou moins automatisée et de faire une requête sur des outils de type MSBLAST. Cet outil basé sur la comparaison de séquence peut être tolérant aux substitutions selon les critères de recherche que l'on va fixer. Dans le cas présent avec un organisme dont le génome ne figure dans les bases de données, cette seconde possibilité a été beaucoup plus fructueuse.

d) Résultats et discussion

Bioaccumulation

Les résultats concernant les expositions à la carbamazépine (anti-épileptique très présent en Seine) ont montré que ce copépode n'accumule pas cette molécule. En effet, aucune trace n'a pu être détectée ni chez les organismes *in situ* ni à la fin de l'exposition. Il est possible que la Carbamazépine soit métabolisée.



Figure 19 : Accumulation et élimination de l'éthinylestradiol respectivement chez les copépodes exposés et chez les non exposés depuis leur prélèvement dans le milieu jusqu'à la fin des expériences (moyenne \pm écart-type, n=3).

Par contre ces expériences d'exposition ont montré une accumulation de l'éthinylestradiol chez les copépodes exposés à ce composé (Figure 19). Une étude similaire a montré une accumulation rapide d'oestrone chez des daphnies exposées à des eaux contaminées par ce composé (Gomes et al., 2004). Labadie et Budzinski (2006) ont également rapportés des niveaux croissant d'éthinylestradiol chez des turbots (mâles et femelles) après 15 jours d'exposition à des eaux contaminées par ce composé. Ces auteurs ont par ailleurs mis en évidence des perturbations hormonales chez les mâles qui présentaient une diminution de la synthèse d'androgènes suite à ces expositions. Enfin, une accumulation importante d'EE2 a également été observée chez *Lumbricus variegatus* exposé à des sédiments artificiellement contaminés par ce composé (Liebig et al., 2005).

Chez les copépodes non exposés, une rapide élimination de l'EE2 accumulé *in situ* a été observée. Ainsi, après 3 jours de décontamination, la totalité de l'EE2 initialement présent dans ces copépodes a été éliminée ce qui suggère un temps de demie vie pour ce composé inférieur à 36 heures chez *E. affinis*. Chez l'homme, l'éthinylestradiol peut être dééthylé pour former de l'oestradiol ou être éliminé sans transformation sous forme conjuguée (Bolt, 1979). Dans notre étude, l'oestradiol n'a jamais été détecté ce qui suggère plutôt une élimination de l'EE2 sous forme conjuguée. Des études ont ainsi montré que les mécanismes d'élimination de l'EE2 chez des poissons et des algues impliquaient une induction de l'activité GST (Larsson et al., 1999; Lai et al., 2002). Toutefois, les expériences réalisées sur *E. affinis* n'ont pas permis d'identifier des formes conjuguées de l'EE2, ce qui peut cependant être liée à la méthode de déconjugaison utilisée qui n'a peut être pas été efficace.

Les expériences présentées dans ce paragraphe ont permis de mettre en évidence une rapide accumulation d'EE2 contrairement à la carbamazépine chez *E. affinis*. De plus, la capacité importante de ce copépode à éliminer rapidement ces composés a également été démontrée.

De plus, les taux de prégnénolone après exposition à l'EE2, à la Carbamazépine présentaient une surexpression significative par rapport au contrôle (d'un facteur 4) (Figure 20), ce qui laisse supposer des perturbations endocrines engendrées par ces contaminants, même si le rôle des stéroïdes chez les microcrustacés est à ce jour inconnu.

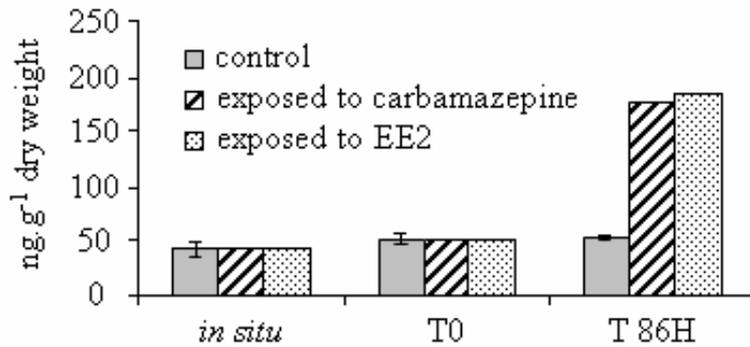


Figure 20 : Effets des contaminants sur la synthèse de prégnenolone chez *Eurytemora affinis* lors des expositions en flux continu (86h).

Biomarqueurs

Après les expositions à la carbamazépine et à l'éthynyloestradiol, l'activité acétylcholinestérase était significativement plus élevée que dans les témoins (Figure 21). De même, les expositions à la carbamazépine induisent une inhibition de l'activité GST (Figure 22). Le pas de temps choisi ne permet pas de démontrer un effet de ces contaminants lors des expositions en mésocosme sur les activités enzymatiques AChE et GST.

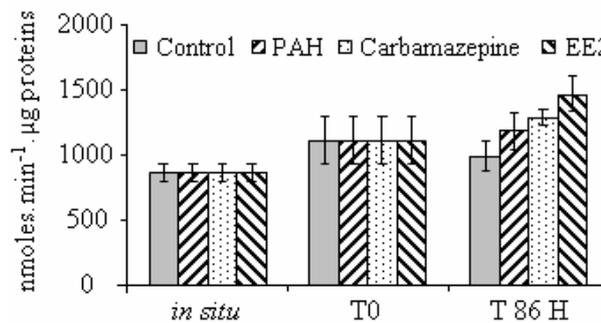


Figure 21 : Effets des contaminants sur l'activité AChE chez *Eurytemora affinis* lors des expositions en flux continu (86h).

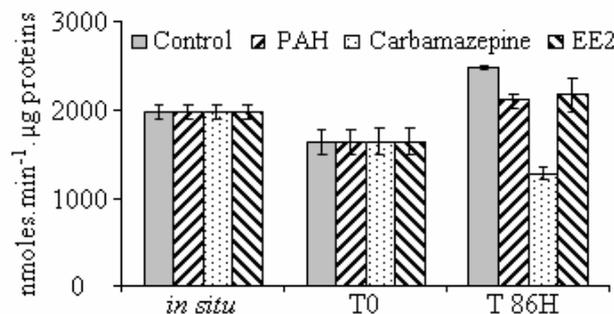


Figure 22 : Effets des contaminants sur l'activité GST chez *Eurytemora affinis* lors des expositions en flux continu (86h).

Modifications des empreintes protéiques

Pour observer les stress physiologiques induits par les transferts de contaminants décrits dans le paragraphe précédent, lors des expositions en flux continu, les protéomes des copépodes exposés ont été analysés et comparés à celui des copépodes non exposés. Cette étude a permis

d'identifier des processus physiologiques altérés ou activés chez *E. affinis* en réponse à la présence de contaminants. Les protéines mises en jeu dans ces réactions biochimiques ont été identifiées par homologie de séquence avec les protéines des banques de données dans le but de proposer de nouveaux biomarqueurs d'exposition à des stress chimiques chez une espèce estuarienne.

Les profils typiques de distribution des protéines obtenus après électrophorèse bidimensionnelle (2-DE), pour des copépodes exposés et non exposés, sont présentés Figure 23. L'utilisation d'un logiciel d'analyse d'image a permis de comparer les gels obtenus à partir des pools de copépodes exposés aux différents contaminants avec les gels obtenus à partir des copépodes non exposés. Cette analyse a montré que tous les contaminants auxquels *E. affinis* avait été exposé induisaient des modifications significatives de son protéome. Une diminution des niveaux d'expression d'une majorité de protéines a été relevée chez les copépodes exposés à l'EE2 et à la carbamazépine (Tableau 4).

Contaminants	Nombre total de spots	Protéines exprimées différemment	Sur ou sous exprimées	Ratio moyen (1.2-4)	Ration moyen (4<)	Vs EE2	VS CBZ
EE2	761 ± 26	118	↑18	17	1		0
			↓100	99	1		8
CBZ	352 ± 32	86	↑1	1	0	0	
			↓85	79	6	8	

Tableau 4 : Nombre de protéines différentiellement exprimées (sur ou sous exprimées) pour chaque condition d'exposition. Deux groupes de protéines sont définis en fonction de leur niveau de sur ou sous expression chez les copépodes exposés par rapport à celui des copépodes non exposés : celles présentant un ratio de sur ou sous expression compris entre 1.2 et 4 et celles présentant un ratio de sur ou sous expression supérieur à 4. Les protéines communes à deux conditions d'exposition et qui présentent des niveaux d'expression différentiels par rapport aux témoins sont également présentées.

Parmi toutes les protéines qui présentaient des niveaux d'expression différents chez les copépodes exposés en comparaison avec les copépodes non exposés, 87 ont été soumises à une identification par homologie de séquence avec les séquences protéiques des banques de données. Sur ces 87 protéines, 14 ont été identifiées avec une bonne homologie de séquence (Tableau 5). Ces protéines pour lesquelles une identification a pu être obtenue interviennent essentiellement dans trois processus cellulaires : le métabolisme énergétique, la régulation des concentrations cellulaires en Ca^{2+} et les réponses cellulaires à différents stress.

Cinq protéines impliquées à différents niveaux dans la production d'ATP, l'aconitase (cycle de Krebs), la créatine kinase (stockage de l'ATP cellulaire), l'arginine kinase (stockage de l'ATP cellulaire), la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (glycolyse) et l'éthanol déshydrogénase (glycolyse), ont notamment été identifiées. Ces protéines ont essentiellement été sous-exprimées après expositions à l'EE2. Par exemple, la sous-expression de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et de l'éthanol déshydrogénase, deux enzymes impliquées dans la seconde phase de la glycolyse, ainsi que la sous-expression de l'aconitase impliquée dans le cycle de Krebs, peuvent indiquer un basculement des flux de carbone vers la voie des pentoses phosphate qui permet la régénération du NADPH. En effet, parmi les mécanismes cellulaires de défense contre le stress oxydant, la glutathion réductase utilise le NADPH pour convertir le glutathion oxydé en glutathion réduit. Par ailleurs, d'autres

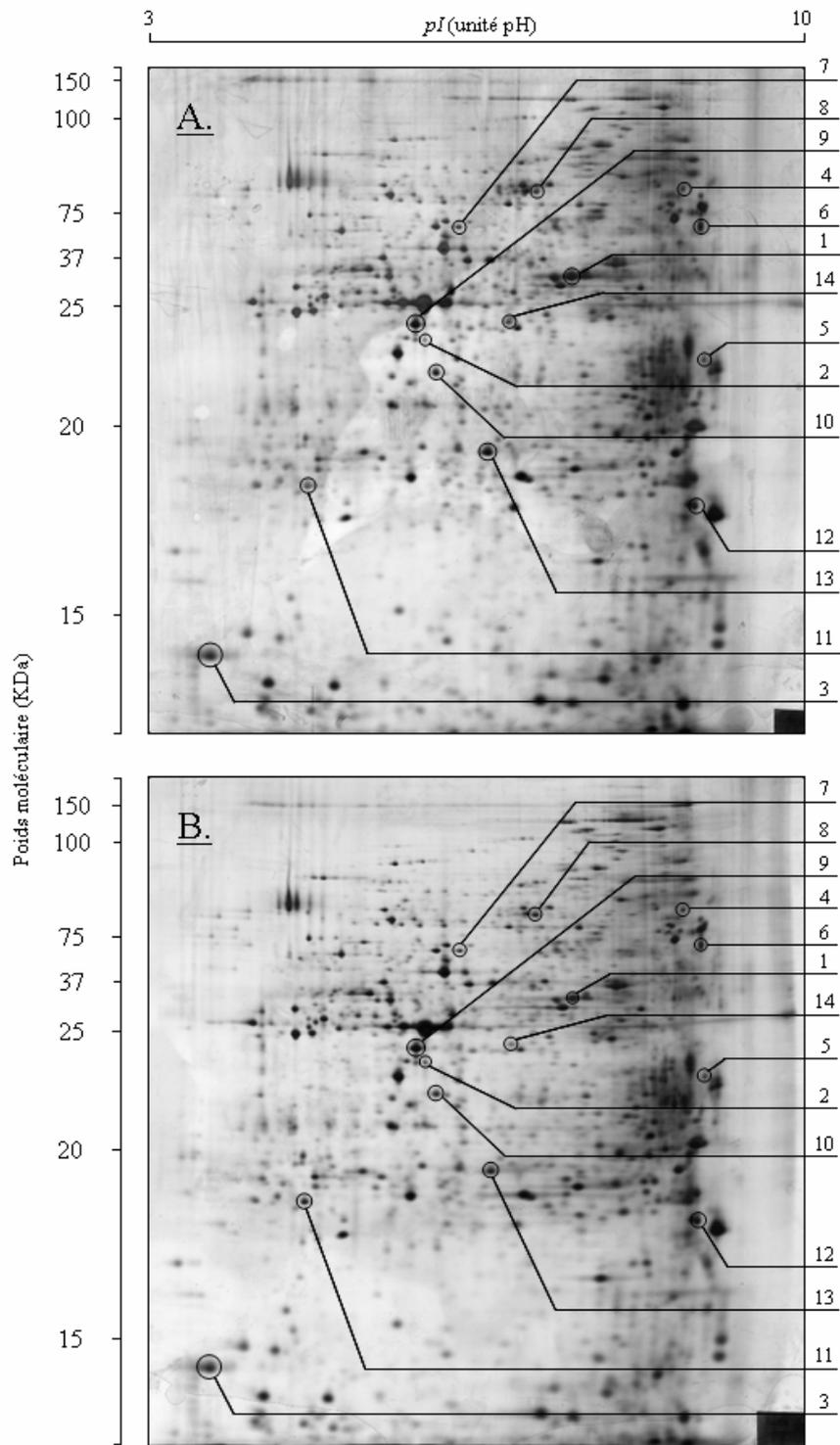


Figure 23 : Profils d'expression protéique typiques sur gels 2-DE obtenus à partir de pools d'*E. affinis* exposés à différents contaminants organiques en flux continu. Le premier gel (A) et le second gel (B) présentent (à titre d'exemple) les profils d'expression protéique respectivement des copépodes exposés à la Carbamazépine et des copépodes non exposés (les numéros des protéines entourées font référence à ceux mentionnés dans le Tableau 5).

Les protéines intervenant dans le métabolisme énergétique, l'arginine kinase et la créatine kinase ont présenté des niveaux d'expression plus faibles suite à l'exposition à l'EE2. La sous expression de ces deux enzymes impliquées dans les mécanismes de stockage de l'ATP dans les cellules en relation avec les transferts d'énergie peut suggérer une augmentation de la demande cellulaire en énergie en réponse à un stress physiologique. Les variations d'expression de ces cinq protéines impliquées dans le métabolisme énergétique représentent donc des preuves de l'état physiologique général de ces copépodes après expositions à de faibles concentrations en contaminants.

Tableau 5 : Résultats de l'identification des protéines (nanoLC MSMS) différenciellement exprimées chez les copépodes exposés aux différents contaminants par homologie de séquence avec des protéines répertoriées dans les bases de données.

Numéro du spot Nom de la protéine	Contaminants						Fragments peptidiques	Homologie avec les séquences des banques de données	Score	Recouvrement de la séquence protéique totale (%)	Identité (%)	Substitution positive	Espèce	Rôle physiologique	Localisation cellulaire										
	PCBs	PAHs	Diuron	EE2	CBZ	APs																			
(1) Creatine kinase (l=180)	-	-	-	0.5	-	-	RLGFSEVELVQ RVISMQKGGNMK SGFTL	BLGYSEVELVZ BLLSMZEGGDVK SGFTL	63 47 33	20	72% 41% 100%	100% 75% 100%	<i>Chicken</i>	Métabolisme énergétique	cytoplasme										
	(2) Creatine kinase (length 409)	-	2.1	-	0.7	-	LVWVNEDHTR WEFMW AALYY	LLWVNEDZTR WEFLW AASLYY	69 43 37		15	81% 80% 83%				81% 80% 83%	<i>Chaetopterus variopeatus</i>	Métabolisme énergétique	mitochondrie						
		(3) Peptidylpropyl isomerase F	-	-	1.5	-	-	0.5	KVFFDLTAGGNPVGR GGDFTNHNGTGGK KHVVFQVVE KKVEGFGSSSGK FFICTA KIIADCG TSWLDGK GSQFFI NAGPNTNGSQ KHTGAGC YGYK RVIPGF		BVFFDVTADGAPVGR GDNFTNHDTGGK BHVVFQZVVE BZVESFGSZSGK FFLCTA ZLVVADCG TZWLDGK GSZFFL NAGPNTNGSZ BHGGAGC YGYK BVLPGY	79 72 69 57 46 43 41 39 39 36 33 33				55				73% 76% 80% 66% 83% 50% 85% 66% 70% 71% 100% 50%	80% 92% 100% 83% 100% 100% 85% 100% 80% 85% 100% 100%	<i>Danio rerio</i>	Maintient de la structure des protéines	noyau/ cytoplasme	
(4) Cyclophilin-like protein	2.1		-	-	-	-	-	RVFFDVTDDAPLG RHHVFGNVVEG NKFEDENFTLK TNGSQFFIT GSQFFITVK	BVFFDVTADGAPVG BHVVFQZVVEG NNFEDENFALK TNGSZFFLT GSZFLLCTAK	79 77 75 55 36	28	71% 81% 81% 77% 60%	78% 90% 81% 100% 80%	<i>Bombyx mori</i>	Maintient de la structure des protéines		noyau/ cytoplasme								
	(5) Arginine kinase		-	-	-	0.8	-	-	RIISMQRGGDLK YDISNK	BLLSMZZGGDVK YDLSNK		67 44	5					50% 83%	91% 100%	<i>Artemia franciscana</i>	Métabolisme énergétique				mitochondrie
			(6) Calreticulin	-	-	-	0.7	-	-	ITDDPAAAK GLDLWQVK KHEQDIDCGGYLK FYALS		LTDDPAAAK GLDLWZVK BHEZNLNFAGGYVK FYALS	61 55 49 36					9	88% 87% 42% 100%						
	(7) HSP 60			-	1.9	-	0.8	-	-	KIGGSSEVEVNEK RVTDALNATR EEAGDGTITATVLAR RAAVEEGIVP KVEYQDCLVLLCQK KITLNDEMEVI VGEVSIHK KAPFGDNR KDDTLFLRQK VAVILGPK		BLGGSSEVEVNEK BVTDALNATR EEATAGTITTSVLAR BGALEEGLVP BVEYNDALVLFSEK BTLDNDEMIEL VGEVVLTK BAPGFANR BDDSZFLNGK VAVSPGPK	87 67 65 51 48 47 41 41 35 33						18	84% 90% 73% 60% 57% 40% 75% 66% 60% 75%	100% 100% 73% 80% 71% 90% 87% 77% 70% 75%				<i>Anemonia viridis</i>

Tableau 5 (suite) : Résultats de l'identification des protéines (nano LC/MSMS) présentant des variations d'expression entre les copépodes exposés aux différents contaminants et les copépodes non exposés par homologie de séquence avec des protéines répertoriées dans les bases de données.

Numéro du spot Nom de la protéine	Contaminants						fragments peptidiques	Homologie avec les séquences des banques de données	Score	recouvrement de la séquence protéique totale (%)	Identité (%)	Substitution positive	Espèce	Rôle physiologique	Localisation cellulaire
	PCBs	PAHs	Diuron	EE2	CBZ	APs									
(8) Aconitase	0.4	3.4	2.7	-	-	-	YSHLDDPSNQEIVR KEVYNFLSTSGAK DYLVATER	YSHLDDPAGZDLVR BEVYDFLATAGAK DYLAATER	77 72 50	4	64% 69% 87%	85% 84% 87%	<i>Daphnia pulex</i>	métabolisme énergétique, protection de l'intégrité de l'ADN mitochondrial	mitochondrie/ cytoplasme
(9) Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase	0.78	-	1.3	-	-	-	ASCTTNCLAPLAK RVPVHDVSVVDLTCR YVVESTGVFT VVSTDFIGDN WYDNEFG KLVVNGHHIQVFSER IGINGFGR VHATTATQK GVFTTLDK LDYVMVYMFK KEASYDEI TTVHA PELNGK AQNIIP TVHAI DGGAK	ASCTTNCLAPLAK BVPTPDVSVVDLPCR YVVESTGVFT VVSTDFLGDD WYDNEFG BLVLDGHALDVFGER LGLNGFGR VHATTATZK GVFTTLEK LDYFVYFFK BEPSYDNL TTVHA PELDGK AZNLLP TVHAL DGGAK	91 75 74 65 62 60 53 51 50 48 38 36 36 36 34 33	42	100% 73% 100% 80% 100% 53% 75% 77% 87% 77% 50% 100% 83% 50% 80% 100%	100% 80% 100% 100% 73% 100% 88% 100% 77% 75% 100% 100% 100% 100%	<i>Daphnia pulex</i>	métabolisme énergétique	cytoplasme
(10) Elongation factor 2	1.67	-	-	-	-	-	KEGVLCDENMR RRGHVFEEGM	BEGVLCDENLR BZGHAEEESM	73 34	8	81% 50%	90% 60%	<i>Aurelia aurita</i>	métabolisme des protéines	cytoplasme
(11) 20S proteasome subunit	-	-	-	-	-	0.78	RYSFSLTTFSPSGK KASNGIVLATEKK ESIEGE EKRWNE TPDIGM	BYSFSLTTFSPSGK BAGNGVVLATEZK EALEGE EMZWNE TPALGM	97 69 35 34 34	18	92% 69% 66% 66% 66%	100% 92% 83% 66% 83%	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	dégradation des protéines intracellulaires	noyau/ cytoplasme
(12) Sarcoplasmic calcium-binding protein (beta chain)	-	-	2.1	0.8	0.5	0.8	RYMYDIIDNGFLDK KNDFECLAV KDGEVTVDEF VKEIDDAYDK	BYFYDLDLGVLDK BTDFECLAV BNGEVDSEDF VZELDAAFSK	62 56 42 40	22	64% 77% 60% 50%	78% 88% 80% 80%	<i>Penaeus sp.</i>	homéostasie du calcium	Sarcoplasme (fibres musculaire striées)
(13) Ethylmalonic encephalopathy 1 (ETHE1)	-	-	-	0.8	-	-	KEAILDPVLEK MNNLNLPKPK	BEALLDPVLEK MGDLNLPYPK	77 42	10	72% 85%	90% 100%	<i>Xenopus tropicalis</i>	inactive l'apoptose induite par des agents dénaturant l'ADN	noyau/ cytoplasme
(14) Alcool deshydrogenase zinc-containing	0.6	-	-	0.7	-	-	SGAAGAVGSIVGQIAK CGAISQYNNK EIAGWL RMEGFVV	SGAAGAVGHPVZLAK CGALSTYTNK ELAGWL BLEGFVV	70 51 43 42	12	75% 70% 83% 71%	87% 80% 100% 85%	<i>Pseudomonas putida</i>	oxydation de l'éthanol en acétaldéhyde	cytoplasme

Deux protéines impliquées dans l'homéostasie du calcium, une protéine de liaison du calcium sarcoplasmique et la calréticuline, ont également été identifiées. Des diminutions d'expression de ces protéines ont été détectées après les expositions à l'EE2 et à la carbamazépine. Les diminutions d'expression de ces protéines peuvent induire une augmentation de la concentration cellulaire en Ca^{2+} libre, ce qui active des protéases qui vont hydrolyser les filaments d'actine et l'ancrage membranaire des protéines. Les analyses des effets des contaminants sur les protéines contrôlant l'homéostasie du Ca^{2+} permettent d'obtenir des informations complémentaires sur l'état physiologique des copépodes.

Enfin, des protéines impliquées dans les mécanismes de défense cellulaire ont également été induites par les expositions aux différents contaminants. Des niveaux d'expression croissants en HSP 60, qui ont pour rôle de maintenir une conformation fonctionnelle des protéines et d'éviter leur agrégation, ont ainsi été détectés chez les copépodes exposés. Plusieurs auteurs ont rapportés des inductions de ces protéines suite à des stress environnementaux (Gonzalez et Bradley, 1994) ou à des stress chimiques (Steiner et Pickwell, 1993). Les HSP 60, comme toutes les HSP en général sont considérées comme des marqueurs généraux à des stress multiples.

L'aconitase peut être associée à ces protéines intervenant dans les mécanismes de défense cellulaire. En effet, une étude récente a mentionné une nouvelle fonction pour cette protéine. Selon, Chen et al. (2005) l'aconitase tient un rôle important dans le maintien de l'intégrité de l'ADN mitochondrial. Ces auteurs ont montré qu'en présence de bromure d'éthidium, un puissant mutagène, l'instabilité cellulaire pouvait être supprimée par une surexpression de l'aconitase. Toutefois, cette activité fonctionnelle est indépendante de l'activité catalytique de cette protéine intervenant dans le cycle de Krebs.

L'étude des variations d'expression protéique chez *E. affinis* après les expositions aux différents contaminants organiques a permis d'observer les effets de ces contaminants sur différents processus physiologiques vitaux pour ces organismes. De plus, la mise en évidence des effets des contaminants sur les niveaux d'expression de certaines protéines (sous expression, surexpression) associée à l'identification de ces protéines peuvent permettre de proposer des biomarqueurs d'exposition sensibles et efficaces pour des études de la qualité de des eaux estuariennes. En effet, parmi les protéines identifiées, certaines pourraient être facilement étudiées par des techniques classiquement utilisées en écotoxicologie (mesures enzymatiques, western blot).

Effets reprotoxiques

En parallèle, des indices d'éventuelles perturbations endocriniennes dues aux contaminants qui pourraient affecter le potentiel reproducteur de cet invertébré, ont été recherchés. Des études expérimentales *in vivo* ont été menées pour affiner les connaissances sur les mécanismes d'action des différents xénobiotiques étudiés à travers des expositions simples sur deux cycles de reproduction.

Ainsi, ces études *in vivo* montrent que CBZ et EE2 peuvent perturber les transformations et les mues à des doses sans effets observables calculées d'après des études de toxicité sub-aiguë (Figure 24), comme l'ont montrés différents Auteurs, chez d'autres crustacés (Andersen et al, 1999, 2001 ; Billinghamurst et al, 2001 ; Brown et al, 1999; Marcial et al, 2003 ; Zou et Fingerman, 1997). De plus l'éthynyloestradiol et la carbamazépine, à ces mêmes concentrations, sont susceptibles de déséquilibrer le sex-ratio des individus issus de générations exposées en faveur des femelles (Tableau 6).

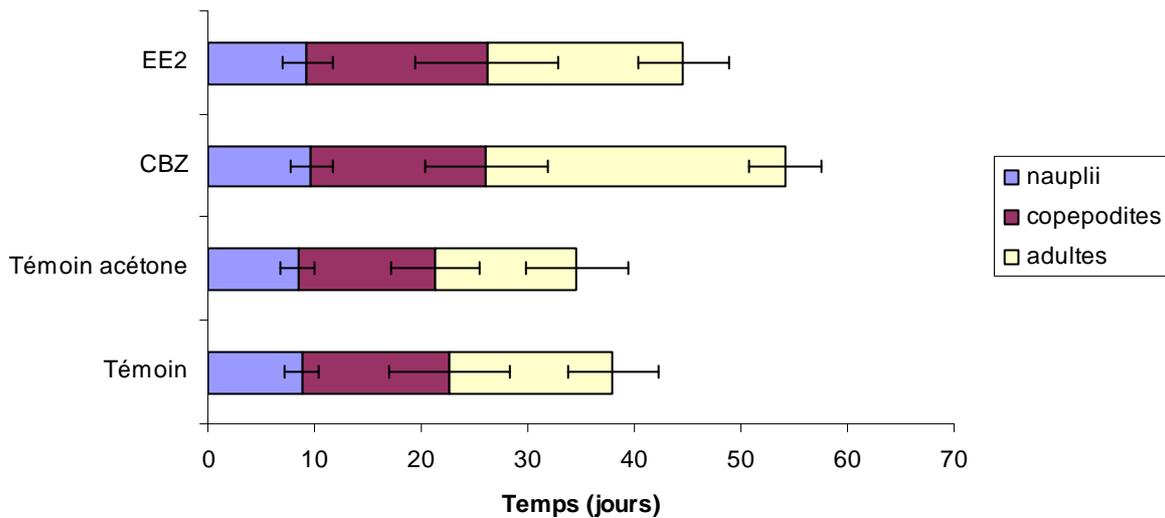


Figure 24 : Durée des différents stades de développement chez *Eurytemora affinis* lors des différents bioessais.

	Témoïn	Témoïn acétone	CBZ	EE2
Taux de fécondation	3	3	2	2
Nombre de nauplii par sac	25-30	25-30	25-30	25-30
% de nauplii viables	60%	60%	45%	40%
Sex-ratio obtenu après ponte (F/M)	1	1	1, 2	1, 3

Taux de fécondation : nombre de sacs ovigères produits

Tableau 6: Effets de CBZ et EE2 sur la reproduction d'*Eurytemora affinis* (Bioessais au laboratoire) testés au niveau des NOEC.

Des perturbations endocrines (réduction/augmentation de la fertilité, augmentation de l'incidence des cas d'hermaphrodisme, perturbations du métabolisme stéroïdien) ont été également observées chez différentes espèces de crustacés (*Daphnia magna*, *Corophium volutator*, *Elminius modestus*, *Balanus amphitrite*) et de mollusques (*Crassostrea gigas*) suite à des expositions au nonylphénol à des concentrations allant de 0.1 à 100 µg.L⁻¹ (Vazquez et al, 2005).

Une inhibition de l'activité de la chitobiase des cellules épidermiques par des EDC chez les crustacés est une des voies possibles d'explication du phénomène d'allongement des phases de développement, ou de blocage en phase copépodite ou nauplius suggérant que ces EDC interféreraient avec l'organe Y (glande sécrétrice de l'hormone de mue, ecdysone entre autres) puisque la production de chitobiase est elle-même sous contrôle de l'ecdysone (Zou & Fingerman, 1999).

Les calanoïdes jouent un rôle fondamental dans le réseau trophique en estuaire de Seine. Les perturbations endocrines observées lors de ces expositions au laboratoire montrent que les premiers stades de développement d'*Eurytemora affinis* sont sensibles à ces

contaminants, et que les bioessais couvrant l'ensemble du cycle de développement se révèlent des outils intéressants et rapides pour identifier les dérégulateurs endocriniens présents dans l'environnement aquatique. Cependant des études sont nécessaires pour confirmer la capacité de ces composés à se fixer sur les récepteurs à l'ecdysone pour élucider les mécanismes impliqués dans le développement observé.

Il est avéré que de nombreux contaminants sont susceptibles de perturber le système endocrinien des organismes vivants, altérant ainsi leur santé et entraînant l'apparition de cancers, de troubles du comportement et d'anomalies de la reproduction. De tels composés sont qualifiés de "perturbateurs endocriniens" (EDC). L'introduction dans les écosystèmes aquatiques de ces EDC a attiré l'attention de la communauté scientifique internationale et fait partie des priorités de l'Union Européenne dans le domaine de l'amélioration de la qualité des eaux. Les données concernant les perturbations endocriniennes chez les invertébrés sont encore peu nombreuses bien qu'elles ouvrent un très large domaine d'étude et offrent de nouvelles perspectives de recherche (Depledge et Billingham, 1999). Dans ce contexte, nos travaux pourraient nous permettre de développer des outils de surveillance environnementale pour des effets reprotoxiques.

VI- CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

La première phase des travaux a abouti au développement des différentes méthodologies analytiques nécessaires à l'étude de la contamination des différents compartiments par les substances pharmaceutiques. Ces travaux ont été conduits en partie dans le cadre de ce projet mais également en conjonction avec d'autres projets de recherche dans d'autres programmes de recherche (Seine Aval)

Deux nouveaux outils ont été étudiés : La SPME et le système d'échantillonnage passif POCIS. La SPME a donné des résultats prometteurs mais la technique associée à la GC/MS est apparue limitée en terme de sensibilité. De nouveaux développements sont à envisager associant l'utilisation de la GC/MS/MS et la SBSE.

L'outil d'échantillonnage POCIS est prometteur et présente de nombreux avantages face à l'échantillonnage par prélèvements ponctuels. Il permet la détection de composés présents à un niveau de concentration proche ou inférieur aux limites de détection des techniques analytiques et donc difficilement identifiables par échantillonnage classique. Cependant, l'application au milieu environnemental a soulevé plusieurs questions quant à l'utilisation de cet échantillonneur en tant qu'outil quantitatif. Il est notamment apparu que sur une longue période d'exposition (30 jours), l'échantillonneur paraît difficilement utilisable dans l'optique de réaliser une étude quantitative de la contamination d'un milieu. En effet, les problèmes liés au débit donc aux flux de composés demandent des études préliminaires en laboratoire très importantes en termes de matériel et d'installation d'un système mimant le milieu naturel. De plus, sur une période d'exposition prolongée, les phénomènes d'encrassement des membranes peuvent considérablement influencer l'accumulation des composés et donc biaiser les résultats. Enfin, la probable dégradation des composés une fois séquestrés dans la phase peut fausser l'interprétation des résultats. En tant qu'outil qualitatif sur du long terme, cet outil paraît néanmoins applicable aux composés dont la rémanence est importante. Sur une courte période d'exposition, de l'ordre de quelques jours à environ deux semaines, ces phénomènes seront limités et ce type d'échantillonneur peut se révéler très intéressant en tant qu'outil de « screening » notamment dans le cadre d'étude de rejets de STEP, où les concentrations sont élevées et où le temps nécessaire à l'accumulation est donc faible. Du fait d'un effet matriciel très limité cet outil permet également la mise en évidence

de produits non ciblés.

Le screening environnemental a permis de qualifier la contamination de différents estuaires ou environnements côtiers (Bassin d'Arcachon, Calanque marseillaise). Les protocoles développés ont été appliqués aux suivis de différents milieux aquatiques permettant d'effectuer une première estimation du niveau global de contamination des milieux aquatiques français, comme les estuaires atlantiques (Seine, Gironde, Adour). Des études plus focalisées ont permis de documenter le comportement de ces substances émergentes de leur point d'introduction à leur dissémination dans le milieu (cas de la Jalle d'Eysines et de la Calanque de Cortiou).

L'étude ciblée sur l'estuaire de la Seine a permis de mettre en évidence les phénomènes de dégradation dans un écosystème complexe, ainsi que d'identifier qualitativement et quantitativement les principales sources d'apport. La présence de composés pharmaceutiques dans la Baie de Seine a été montrée, même si les niveaux de contamination restent très faibles. De grandes fluctuations ont été mises en évidence, à la fois dues aux composés, aux conditions saisonnières et aux niveaux fluctuants de consommation.

Actuellement, diverses études essaient de modéliser l'introduction et le devenir de ces composés dans l'environnement. Les données environnementales produites dans ce projet, obtenues sur différents milieux, dans différentes conditions saisonnières sont un important apport à ce type de recherche. La validation de différents modèles (SIMUSA, GREAT-ER, <http://www.great-er.org>) nécessite la comparaison des « PEC » (Predicted Environmental Concentration) et des « MEC » (Measured Environmental Concentration). Ces concentrations « prédites », utilisées dans toutes les définitions de normes et législations nécessitent un ajustement permanent afin d'être les plus réalistes possibles.

L'étude des variations saisonnières a mis en évidence des fluctuations importantes et des phénomènes de dégradation qui devront à l'avenir être pris en considération. L'étude des produits de dégradation tant par dégradation bactérienne que par photooxydation apparaît une priorité pour le futur.

Le rôle de la phase particulaire est à ce jour encore négligé dans la problématique des substances pharmaceutiques. Néanmoins ce travail a mis en évidence le rôle que ce compartiment pouvait jouer, notamment dans la dissémination de la charge contaminante. Les niveaux élevés mesurés peuvent ainsi jouer un rôle dans la contamination des organismes aquatiques, exposés à la fois par la voie cutanée et respiratoire (phase dissoute) et par la voie trophique (alimentation). Les capacités de bioaccumulation de certains composés pharmaceutiques ont été mises en évidence lors des études en laboratoire, montrant des différences de comportement selon le type d'exposition (conditions immergées ou tidales).

La deuxième phase des travaux a concerné l'étude du transfert des composés et l'étude des phénomènes toxiques en microcosmes sur *Eurytemora affinis*.

Dans l'optique de développer des outils de surveillance de la qualité de l'eau, nous avons choisi *Eurytemora affinis*, comme l'espèce idéale pour se lancer dans une approche intégrée utile au diagnostic environnemental en estuaire de Seine. Cette approche est essentielle pour comprendre à différents niveaux d'organisation biologique, les effets des contaminants organiques sur le copépode *Eurytemora affinis*, depuis la réponse protéique par

l'analyse du protéome ou la mesure d'activité enzymatique, jusqu'à la réponse des individus *via* des expériences de reproduction et de comportement.

Cette action menée dans le cadre du programme LITEAU 2003 s'est articulée en trois parties. Le premier objectif était d'évaluer les transferts de médicaments présents en estuaire de Seine (carbamazépine et éthynyloestradiol) ; ils ont été analysés expérimentalement par des expositions en flux continu depuis la phase dissoute vers le copépode *Eurytemora affinis*. Les capacités de ces copépodes à éliminer ces contaminants accumulés ont également été suivies en parallèle. Il est ainsi apparu, après exposition à un flux continu, que le copépode *Eurytemora affinis* était capable d'accumuler l'éthynyloestradiol, et qu'en parallèle on observait une induction de la synthèse d'un précurseur hormonal la pregnenolone, ce qui laisse supposer des perturbations endocrines. Par ailleurs, suite à une période de décontamination de une semaine, cette espèce est également capable d'éliminer le EE2, préalablement accumulé *in situ* notamment.

Dans un deuxième temps des travaux ont été consacrés aux effets de ces contaminants sur ce copépode à différents niveaux d'organisation biologique (physiologique et biochimique). Cette recherche s'est concentrée sur la recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition chez le copépode *Eurytemora affinis*. Des techniques d'électrophorèse bidimensionnelle couplée à des techniques de chimie analytique ont été utilisées pour analyser les effets d'exposition des copépodes en flux continu à deux familles de médicaments sur l'expression de leur protéome. L'utilisation de ces techniques permet en effet d'avoir une vision générale des processus physiologiques et des cascades de réactions biochimiques mis en jeu par un organisme soumis à différents types de stress. L'étude du protéome de ce copépode après exposition à ces médicaments a par ailleurs montré que de nombreuses protéines étaient différentiellement exprimées. Des réponses spécifiques ont pu être notées pour chaque contaminant. Ainsi, pour la carbamazépine et l'éthynyloestradiol, ces protéines sont majoritairement surexprimées. L'identification de ces protéines d'intérêt par séquençage nous a permis de mettre en évidence essentiellement dans le métabolisme énergétique, mais également des protéines intervenant dans la gestion de stress aussi bien physiologique que chimique (63 KDa chaperonin, HSP 60...), des protéines intervenant dans la régulation du cycle cellulaire (HSCO qui inhibe la régulation de l'apoptose par la P53), des protéines intervenant dans la détoxification cellulaire (20 S protéasome intervenant dans la lutte contre le stress oxydatif) et enfin des protéines intervenant dans la protection de l'intégrité cellulaire (aconitase qui joue un rôle dans le métabolisme mitochondrial mais qui permet également la suppression des mutations de l'ADN mitochondrial).

Enfin des indices d'éventuelles perturbations endocriniennes dues aux médicaments, notamment l'éthynyloestradiol et la carbamazépine qui pourraient affecter le potentiel reproducteur de cet invertébré, ont été recherchés. Des études expérimentales *in vivo* ont été menées pour affiner les connaissances sur les mécanismes d'action de ces médicaments à travers des expositions simples sur un ou deux cycles de reproduction. Ces travaux montrent que ces médicaments tels que la carbamazépine et l'EE2 peuvent perturber ou annihiler les transformations et mues à des doses sans effets observables. De plus ces composés, à ces mêmes concentrations, sont susceptibles de déséquilibrer le sex-ratio des individus issus de générations exposées en faveur des femelles.

Ces travaux de recherche montrent l'intérêt d'une approche intégrée en écotoxicologie. Le couplage d'analyses chimiques, biologiques et écologiques est essentiel dans le but de prévoir et de définir le devenir et les effets toxiques de ces contaminants à différentes échelles d'organisation biologique. L'étude des effets ciblés des contaminants à l'échelle de la protéine, de la cellule ou de l'individu devrait permettre d'extrapoler ces effets à l'échelle de la population et les impacts sur l'écosystème par l'utilisation de modèles mathématiques,

domaine qu'il nous reste encore à explorer dans les années à venir. Ainsi, les résultats de ces expériences ont permis de mettre en évidence les transferts des médicaments présents vers un organisme modèle, le copépode *Eurytemora affinis*, ainsi que les capacités de métabolisation de cet organisme. Par ailleurs, les expériences ont montré une diminution des protéines intervenant dans la régulation du métabolisme énergétique et une induction de protéines intervenant dans la réponse aux stress, suite aux expositions. Enfin, les effets observés sur la reproduction mettent en exergue un retard de phase dans le développement de cette espèce et un sexe ratio dès la deuxième génération en faveur des femelles.

En termes de perspectives majeures il nous apparaît important suite à ce travail de mettre l'accent sur quelques points :

- 1- Du fait de la variabilité temporelle des concentrations rencontrées il est important de développer des méthodologies d'échantillonnage plus adaptées permettant d'intégrer cette variabilité,
- 2- Du fait de la variabilité spatiale il est important de simplifier ou d'automatiser les méthodes d'analyse pour pouvoir multiplier le nombre d'analyses (GC ou LC /MS/MS avec un mode d'extraction de type SPME ou SBSE),
- 3- Le rôle de la phase particulaire est à approfondir,
- 4- Le transfert vers les organismes reste encore mal connu ainsi que le risque sanitaire *via* la consommation des organismes aquatiques vers l'homme et nécessite de nouvelles études,
- 5- Les produits de transformation (biodégradation, photodégradation) demandent à être plus particulièrement étudiés,
- 6- Etudier (notamment sur le modèle *E.Affinis*) les phénomènes de biotransformation,
- 7- Etudier les effets mélange,
- 8- Compléter les études protéomiques pour éventuellement pouvoir proposer de nouveaux biomarqueurs d'exposition comme l'expression de l'aconitase mitochondriale.

VII- BIBLIOGRAPHIE

- H.R Andersen, L. Wollenberger, B. Halling-Sorensen, K.O. Kusk, 2001 - Development of copepod nauplii to copepodites - a parameter for chronic toxicity including endocrine disruption. *Environ. Toxicol. Chem*, 20, 2821-2829
- H.R Andersen, B. Halling-Sorensen, K.O. Kusk, 1999 - A Parameter for Detecting Estrogenic Exposure in the Copepod *Acartia tonsa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 44, 56-61.
- S. Ban, T. Minoda, 1989 - Seasonal distribution of *Eurytemora affinis* (Poppe, 1888) (Copepoda, Calanoïda) in freshwater lake Ohnuma, Hokkaido. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 40, 147-153.
- J. Beausse, 2004 - Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23, 753-761
- Z. Billinghamurst, A.S Clare, M.H Depledge, 2001 - Effects of 4-n-nonylphenol and 17 beta oestradiol on early development of the barnacle *Elminius modestus*. *J. Exp. Mar. Biol.Ecol.*, 257, 255-268.
- H.M Bolt, 1979 - Metabolism of estrogens: natural and synthetic. *Pharmacol. Therapeut.* 4, 155-181.
- H.R Buser, T. Poiger, M.D. Müller, 1999 - Occurrence and environmental behaviour of chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater *Environmental science and technology*. 33, 2529-2535.
- X.J. Chen, X. Wang, B.A.Kaufman, R.A. Butow, 2005 - Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance. *Science* 307, 714-717.
- M. Cleuvers, 2003 - Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects *Toxicology Letters*. 142, 185-194.
- M.H. Depledge, Z. Billinghamurst, 1999 - Ecological significance of endocrine disruption in marine invertebrates. *Mar!. Pollut. Bull.*? 39, 32-38.
- G. Ellman, K. Courtney, V. Andres, R.M. Featherstone, 1961- A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.
- M. Farré, I. Ferrer, A. Ginebreda, M. Figueras, L. Olivella, L. Tirapu, M. Vilanova, D. Barcelo, 2001 - Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry : methods and preliminary results including toxicity studies with *vibrio fischeri* *Journal of Chromatography A*. 938, 187-197.
- B. Ferrari, N. Paxeus, R.L. Giudice, A. Pollio, J. Garric, 2003 - Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibrac acid, and diclofenac *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55, 359-370.
- R.L. Gomes, H.E. Deacon, K.M. Lai, J.W. Birkett, M.D. Scrimshaw, J.N. Lester, 2004 - An assessment of the bioaccumulation of estrone in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 105-108.
- B. Halling-Sorensen, S.N. Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützhof, S.E Jorgensen, 1998 - Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment : a review *Chemosphere*. 36, 357-393.
- T. Heberer, 2002 - Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology*. 266, 175-189.
- R. Hirsch, T.A. Ternes, K. Haberer, K.L. Kratz, 1999 - Occurrence of antibiotics in the aquatic environment *The Science of the Total environment*. 225, 109-118.

- A.R. Hough, E. Naylor, 1992 - Endogenous rhythms of circatidal swimming activity in the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 161, 27-32.
- O.A.H. Jones, N. Voulvoulis, J.N. Lester, 2002 - Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals *Water Research*. 36, 5013-5022.
- A. Joss, E. Keller, A.C. Alder, A. Gobel, C.S. McArdell, T. Ternes, H. Siegrist, 2005 - Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment *Water Research*. 39, 3139-3152.
- S.K. Katona, 1970a - The developmental stages of *Eurytemora affinis* (Poppe, 1880) (Copepoda, Calanoida) raised in laboratory cultures, including a comparison with the larvae of *Eurytemora Americana* Williams, 1906, and *Eurytemora herdmani* Thompson and Scott, 1897. *Crustaceana*, 21, 5-20.
- S.K. Katona, 1970b - The developmental stages of *Eurytemora affinis* (Poppe, 1880) (Copepoda, Calanoida) raised in laboratory cultures, including a comparison with the larvae of *Eurytemora Americana* Williams, 1906, and *Eurytemora herdmani* Thompson and Scott, 1897. *Crustaceana* 21, 5-20.
- D.W. Kolpin, E.T. Furlong, M.T. Meyer, E.M. Thurman, S.D. Zaugg, L.B. Barber, J.D. Petty, J.N. Huckins, D. Alvarez, 2004 - A hostilic passive integrative sampling approach for assessing the presence and potential impact of waterborne environmental contaminants. *Chemosphere*, 54, 695-705.
- P. Labadie, H. Budzinski, 2006 - Alteration of steroid hormone profile in juvenile turbot (*Psetta maxima*) as a consequence of short-term exposure to 17 α -ethynylestradiol. *Chemosphere* 64, 1274-1286.
- L. Lagadic, 2001 – Variables biologiques en évotoxicologie – Changements d'échelle et signification biologique. Séminaire modélisation, cemagref Lyon , 20 juin.
- K.M. Lai, M.D. Scrimshaw, J.N. Lester, 2002 - Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*. *App. Environ. Microbiol.* 68, 859-864.
- R. Laprise, J.J. Dodson, 1994 - Environmental variability as a factor controlling spatial patterns in distribution and species diversity of zooplankton in the St. Lawrence Estuary. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 107, 67-81.
- D.G.J. Larsson, M. Adolfsson-Erici, J. Parkkone, M. Petterson, A.H. Berg, P.E. Olsson, L. Förlin, 1999 - Ethinylestradiol — an undesired fish contraceptive? *Aquat. Toxicol.* 45, 91-97.
- N. Laville, S. Ait-Aissa, E. Gomez, C. Casellas, J.M. Porcher, 2004 - Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes *Toxicology*. 196, 41-55.
- C.E. Lee, 2000 - Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate "population"., *Evolution*, 54, 2014-2027
- P.H. Lenz, J. Yen, 1993 - Distal setal mechanoreceptors of the first antennae of marine copepods. *Bl. Mar. Sci.* 53,170-179.
- M. Liebig, P. Egeler, J. Oehlmann, T. Knacker, 2005 - Bioaccumulation of 14C-17 α -ethinylestradiol by the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* in spiked artificial sediment. *Chemosphere*. 59, 271-280.
- H.S. Marcial, A. Hagiwara, T.W. Snell, 2003 - Estrogenic compounds affect development of harpacticoid copepod *Tigriopus japonicus*. *Ecotox. Environ. Saf.*, 22, 3025-3030.
- J. Mauchline, 1998 - The Biology of Calanoid Copepods. *Advances in Marine Biology*, 33, 1-710.
- C.D. Metcalfe, B.G. Koenig, D.T. Bennie, M. Servos, T.A. Ternes, R. Hirsch, 2003 - Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluent of canadian sewage treatment plants. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 22, 2872-2880.
- C.A. Morgan, J.R. Cordell, C.A. Simenstad, 1997 - Sink or swim? Copepod population maintenance in the Columbia River estuarine turbidity-maxima region. *Mar. Biol.*, 129, 309-317.

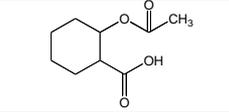
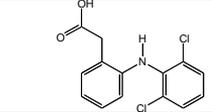
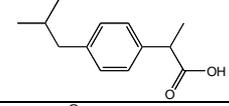
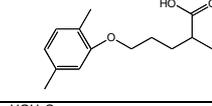
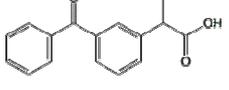
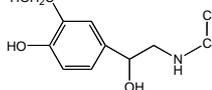
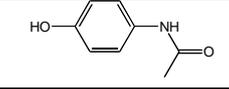
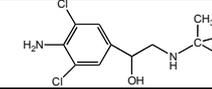
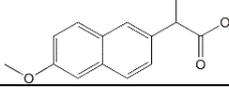
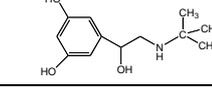
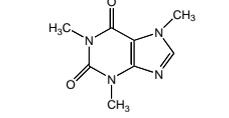
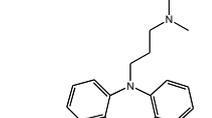
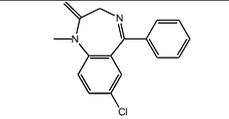
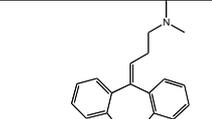
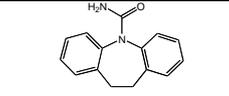
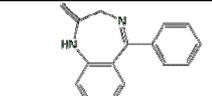
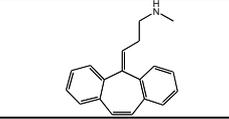
- P. Mouny, 1998 - Structure spatio-temporelle du zooplancton et du suprabenthos de l'estuaire de la Seine. Dynamique et rôle des principales espèces dans la chaîne trophique pélagique. Thèse de Doctorat au Muséum National d'Histoire Naturelle, 256 pp + annexes.
- P. Mouny, J.C Dauvin, 2002 - Environmental control of mesozooplankton community structure in the Seine estuary (English Channel). *Oceanol. Acta*, 25, 13-22.
- S. Öllers, H.P. Singer, P. Fässler, S. Müller, 2001 - Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water *Journal of Chromatography A*. 911, 225-234.
- J.B Quintana, S. Weiss, T. Reemtsma, 2005 - Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor *Water Research*. 39, 2654-2664.
- B.D Roddie , R.J.G. Leakey, A.J. Berry, 1984 - Salinity-temperature tolerance and osmoregulation in *Eurytemora affinis* (Poppe) (Copepoda: Calanoida) in relation to its distribution in the zooplankton of the upper reaches of the forth estuary. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 79, 191-211.
- H. Sanderson, D.J. Johnson, T. Reitsma, R.A. Brain, C.J. Wilson, K.R. Solomon, 2004 - Ranking and prioritization of environmental risks of pharmaceuticals in surface waters *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 39, 158-183.
- L.J. Schulman, E.V. Sargent, B.D. Naumann, E.C. Faria, D.G. Dolan, J.P. Wargo, 2002 - A Human Health Risk Assessment of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment *Human and Ecological Risk Assessment*. 8, 657-680.
- M.J. Snyder, E. Girvetz, E.P. Mulder, 2001 - Induction of marine mollusc stress proteins by chemical or physical stress. *Arch. Environ. Cont. Tox.* 41, 22-29.
- S. Souissi, S. Ban, 2001 - The consequences of individual variability in moulting probability and the aggregation of stages for modelling copepod population dynamics. *J. Plankton Res.* 23, 1279-1296.
- S.A. Steiner, G.V. Pickwell, 1988 - Expression of heat shock proteins and metallothionein in mussels exposed to heat stress and metal ion challenge. *Mar. Environ. Res.* 24, 211-214.
- A. Tauxe-Wuersch, L.F. De Alencastro, D. Grandjean, J. Tarradellas, 2005 - Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment *Water Research*. 39, 1761-1772.
- T.A Ternes, 1998 - Occurrence of drugs in german sewage treatment plants and rivers. *Water Research*. 32, 3245-3260.
- R. Vazquez-Duhalt, F. Marquez-Rocha, E. Ponce, A.F Licea, M.T. Viana, 2005 - Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Scientific review. Applied Ecology and Environmental Research*, 4, 1-25.
- B. Vrana, G.A Mills, I.J. Allan, E. Dominiak, K. Svensson, J. Knutsson, G. Morrison, R. Greenwood, 2005 - Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *Trends in Analytical Chemistry*, 24, 845-868.
- B. Vrana, R. Greenwood, G. Mills, 2007 - *Comprehensive Analytical Chemistry (Vol 38): Passive Sampling Techniques in Environmental Monitoring*. Elsevier, 486 pp.
- W.G. Wallace, A. Estephan, 2004 - Differential susceptibility of horizontal and vertical swimming activity to cadmium exposure in a gammaridean amphipod (*Gammarus lawrencianus*). *Aquat. Toxicol.* 69, 289-297.
- E. Zou, R. Fingerman, 1997 - Effects of Estrogenic Xenobiotics on Molting of the Water Flea, *Daphnia magna*, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 38, 281-285.

Etude de la contamination des estuaires de la Seine, de la Gironde et de l'Adour par les substances pharmaceutiques : Présence, Devenir et Impact Toxicologique

E. Zou, R. Fingerman, 1999 - Effects of Estrogenic Agents on Chitobiase Activity in the Epidermis and Hepatopancreas of the Fiddler Crab, *Uca pugnator* Ecotoxicol. Environ. Saf, 42 185-190.

Composés	Structure	MM	m/z	Composés	Structure	MM	m/z
<u>Composés acides</u>							

Annexe 1 : Substances pharmaceutiques étudiées: classe thérapeutiques, masse molaire et ion de quantification pour l'analyse par GC-MS

Aspirine		180	<u>195</u>	Diclofénac		295	<u>214</u>
Ibuprofène		206	<u>160</u>	Gemfibrozil		250	<u>201</u>
Ketoprofène		254	<u>282</u>	Salbutamol		239	<u>369</u>
Naproxène		230	<u>185</u>	Clenbutérol		276	<u>335</u>
Paracétamol		151	<u>206</u>	Terbutaline		225	<u>356</u>
<u>Composés neutres</u>							
Caféine		194	<u>194</u>	Imipramine		317	<u>234</u>
Diazépam		285	<u>256</u>	Doxépine		280	<u>58</u>
Carbamazépine		236	<u>193</u>	Nordiazepam		271	<u>242</u>
Amitryptiline		281	<u>58</u>				
ÉTALONS DEUTERES				ÉTALONS DE VALIDATION ANALYTIQUE			
Diazépam d ₅		286	<u>261</u>	Hydroxy-pyrène		218	<u>290</u>
Amitryptiline d ₆		287	<u>64</u>	Pyrène		202	<u>202</u>
Nordiazépam d ₅		276	<u>247</u>				

Annexe : Textes des publications

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PARUES

A. Rouzes, K. Berthoin, F. Xuereb, S. Djabarouti, I. Pellegrin, J.L. Pellegrin, A.C. Coupet, S. Augagneur, H. Budzinski, M.C. Saux, D. Breilh (2004) - Simultaneous determination of the antiretroviral agents : amprenavir, lopinavir, ritonavir, saquinavir and efavirenz in human peripheral blood mononuclear cells by high-performance liquid chromatography -mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.*, 813, 209-216.

P. Labadie, H. Budzinski (2005) - Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environ. Sci. Technol.*, 39, 5113-5120.

P. Labadie, H. Budzinski (2005) - Development of an analytical procedure for determination of selected estrogens and progestagens in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, 381, 1199-1025.

K. Cailleaud, H. Budzinski, S. Souissi, G. Maillet, B. Rocher, J. Forget Leray (2006) - Proteomic responses of a calanoid copepod *Eurytemora affinis* to organic contaminants exposure : a microcosm study. *Mar. Environ. Res.* 62S: 185-186.

G. Maillet, K. Cailleaud, H. Budzinski, J. Forget-Leray (2006) - Use of acetylcholinesterase in *Eurytemora affinis* (Copepoda) as a biomarker in Seine estuary, France. Comparison of two methods: enzymatic histochemistry and enzymatic activity assay. *Mar. Environ. Res.* 62S: 386-387.

M. Rabiet, A. Togola, F. Brissaud, J.L. Seidel, H. Budzinski, F. Elbaz-Poulichet (2006) - Consequences of treated water recycling as regards pharmaceuticals and drugs in surface and ground waters of a medium-sized Mediterranean catchment. *Environ. Sci. Technol.*, 40, 5282-5288.

A. Togola, H. Budzinski (2007) - Development of Polar Organic Integrative Samplers for Analysis of Pharmaceuticals in Aquatic Systems. *Anal. Chem.* 79, 6734-6741.

A. Togola, H. Budzinski (2007) - Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 388, 627-635.

K. Cailleaud, G. Maillet, H. Budzinski, S. Souissi, J. Forget-Leray (2007) - Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis*. *Comp. Biochem. Phys. A*, 147, 841-849.

A. Togola, H. Budzinski (2008) - Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *J. of Chromatogr. A*, 1177, 150-158.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES À PARAÎTRE

K. Cailleaud, H. Budzinski, K. Lemenach, S. Souissi, J. Forget-Leray. Uptake and elimination of hydrophobic organic contaminants in estuarine copepods : an experimental study – accepté dans *Env. Tox. Chem*

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES PREVUES

K. Cailleaud, P. Cosette, H. Budzinski, S. Souissi, J. Forget-Leray. Proteomic investigation of biomarkers in disease caused by organic contaminant exposures on an estuarine copepod species. Soumise à *Molecular and Cellular Proteomics*

A. Togola, H. Budzinski. Analytical developments for the determination of pharmaceuticals in solid matrices: sediments, particles and sludge. Soumise à *Analytica Chimica Acta*.

A. Togola, S. Augagneur, K. LeMenach, H. Budzinski. Behaviour of pharmaceuticals after their introduction in surface waters: Case of Jalle d'Eysines river (FRANCE). Soumise à *Water Research*

K. Cailleaud, H. Budzinski, J. Forget-Leray, L.C. Tzeng, J.S. Hwang, F.G. Schmitt S. Souissi. Swimming behavioural response of *Eurytemora affinis* to the injection of potentially endocrine disrupting compounds - En préparation pour *Water Research*

S. Lardy-Fontan, A. Togola, H. Budzinski. POCIS as a new monitoring tool : What can really be expected? A first approach with pharmaceuticals and alkylphenol-polyethoxylates – en préparation pour *J. of Env. Monitor*