



Rapport d'activité – projet MEDEAU N°310 81 0002 – juillet 2012

Financement agence de l'eau Adour-Garonne

Responsable du projet : Florence GERET – laboratoire GEODE – UMR 5602 – Université de Toulouse

Titre : Effets de rejets hospitaliers sur l'Isle au niveau de Périgueux.



Remerciements

Dans un premier temps, tous les partenaires du projet remercient l'ANSES pour avoir très largement contribué au financement de l'étude. Leurs remerciements vont également à l'Agence de l'Eau Adour-Garonne pour son concours financier.

Ce travail n'aurait pu débuter sans l'aide de tout le personnel de l'hôpital spécialisé de Vauclaire (Monpon-Ménestérol, Dordogne). Tous les membres du projet tiennent à remercier madame Célérier, directrice de l'hôpital pour avoir pris connaissance en profondeur du projet, nous avoir écoutés et avoir approuvé le projet afin de permettre à l'ensemble du personnel de collaborer avec nous.

Nos remerciements vont également à madame Bonneau, pharmacienne de l'hôpital qui nous a fourni la liste des médicaments utilisés et les quantités utilisées pour les principaux d'entre eux.

Enfin, nous tenons à remercier tout particulièrement le personnel en lien direct avec la station d'épuration de l'hôpital et notamment monsieur Desmoulin, directeur des travaux et des services techniques et monsieur Wac, technicien de la station d'épuration. Grâce à eux nous avons pu obtenir les plans de la station, les analyses des eaux et notamment des effluents de la station effectuées par le laboratoire départemental.

SOMMAIRE

I.	Avant-propos	5
II.	Contexte et état de l'art	5
III.	Rappel des différentes tâches du projet	7
	A. Tâche 1: Analyse des résidus de médicaments dans l'Isle en amont et en aval du rejet hospitalier. ...	7
	B. Tâche 2: Impact des rejets hospitaliers sur les communautés de macroinvertébrés.....	8
	C. Tâche 3: Application de bioessais et de biomarqueurs d'effets, pour évaluer la réponse d'organismes aquatiques exposés à l'effluent de la STEP de l'hôpital.	8
	D. Tâche 4: Evaluation des effets de l'effluent de la STEP sur des organismes clés des réseaux trophiques par l'utilisation de biotests.	8
	E. Tâche 5 : Comment la société prend en compte la problématique des rejets de résidus médicamenteux en milieu aquatique ?	9
IV.	Présentation du site d'étude	9
	A. Présentation de l'hôpital	9
	B. La station d'épuration	10
	C. Caractérisation physico-chimique des effluents	13
V.	Mise en œuvre du projet – Matériels et méthodes communs	13
	A. Les campagnes d'échantillonnage d'effluents/macroinvertébrés	13
	B. Le choix des psychotropes à étudier	14
VI.	Protocoles, Résultats et Discussion relatifs à chaque tâche	15
	A. Tâche 1 : Analyse des résidus de médicaments dans l'Isle en amont et en aval du rejet hospitalier.	15
	B. Tâche 2 : Impact des rejets hospitaliers sur les communautés de macroinvertébrés.....	17
	1. Matériels et méthodes	17
	2. Résultats et discussion	19
	C. Tâche 3 : Application de bioessais et de biomarqueurs d'effets, pour évaluer la réponse d'organismes aquatiques exposés à l'effluent de la STEP de l'hôpital.....	22
	1. Exposition en laboratoire avec un renouvellement d'eau tous les 2 jours	22
	2. Préparation des échantillons afin de réaliser toutes les analyses sur les mêmes échantillons	23
	3. Les biomarqueurs utilisés	23
	4. résultats	25
	D. Tâche 4 : Evaluation des effets de l'effluent de la STEP sur des organismes clés des réseaux trophiques par l'utilisation de biotests.	30
	1. Les tests normalisés.....	30
	2. Les tests non normalisés	35

E.	Tâche 5 : Comment la société prend en compte la problématique des rejets de résidus médicamenteux en milieu aquatique ?	41
1.	La pollution, une problématique relationnelle ?.....	41
2.	Un diagnostic scientifique pour favoriser le changement de pratiques et les relations sociétés/écosystèmes aquatiques ?	44
VII.	Bibliographie.....	50
VIII.	Bilan financier	53
IX.	Annexes	54
A.	Annexe1 : Identification des psychotropes analysés	54
B.	Annexe 2 : Protocole de préparation des échantillons pour le dosage des biomarqueurs et l'analyse protéomique des tissus de corbicule.....	58
X.	Suppléments au rapport : données concernant les effets de mélanges de molécules pures	59
A.	Les Tests normalisés	59
1.	Le test daphnies.....	59
2.	Le test algues	60
3.	Le test microtox.....	60
B.	Les tests non normalisés sur planaires : <i>Schmidtea polychroa</i>	60
1.	La reproduction	60
2.	Le déplacement	61
3.	La régénération.....	61
XI.	Suppléments au rapport : données concernant les molécules pures de psychotropes utilisées isolément.....	62
A.	Les tests normalisés.....	62
1.	Test daphnies.....	63
2.	Test algues	63
3.	Test microtox.....	64
B.	Tests non normalisés sur planaire <i>Schmidtea polychroa</i>	64
1.	Le déplacement	64
2.	La régénération.....	65

I. Avant-propos

L'étude initiale était prévue sur une très petite masse d'eau du bassin Adour-Garonne, le Maine Brégou, affluent de l'Isle. Après un test utilisant de la fluorescéine, il est apparu que les effluents se jettent directement dans l'Isle et non dans le Maine Brégou (cf page 11). L'étude a donc été réalisée sur le cours d'eau récepteur des effluents de la STEP. Bien que ce cours d'eau soit de dimension importante, les résultats présentés montrent clairement un impact des rejets de cette station sur le milieu récepteur.

Ce projet a été partiellement financé par l'Agence de l'eau Adour-Garonne pour la tâche 2, la tâche 3 « mollusques, et la tâche 4. Ce projet a bénéficié du concours financier de l'ANSES et du Centre universitaire Jean-François Champollion.

II. Contexte et état de l'art

Les molécules médicamenteuses apparaissent comme polluants émergents. Elles commencent à préoccuper les scientifiques (Jorgensen et Halling-Sorensen, 2000; Zuccato *et al.*, 2000; Heberer, 2002 et Jones *et al.*, 2005) et le monde politique. La production et donc l'utilisation de médicaments est en constante augmentation au niveau mondial (IMS Health, 2008). L'Europe ne déroge pas à la règle (IMS Health, 2008). Au sein de la communauté européenne, la France est l'un des pays où la consommation de médicaments par habitant est la plus importante (Chambaretaud, 2000). Cette augmentation est liée à l'amélioration des connaissances pour soigner de nombreuses maladies nécessitant des traitements médicamenteux souvent lourds et longs mais également à l'amélioration de la qualité de vie notamment pour les personnes âgées engendrant la prise de médicaments de « confort » en quantité importante. Après administration, ces molécules actives et leurs produits de dégradation sont excrétés par voies naturelles et se retrouvent sous forme initiale ou métabolisée dans les eaux usées. Or les traitements physiques, chimiques et biologiques actuels des stations d'épuration (STEP) dégradent de manière très inégale ces médicaments. Le pourcentage de dégradation varie en moyenne entre 0 et 90% (Beausse, 2004). Zorita *et al.*, (2010) décrivent la dégradation de 13 molécules dans une station d'épuration suédoise utilisant une étape de sédimentation, puis une étape de dégradation bactérienne par l'utilisation de boues activées en conditions anoxiques et aérobies suivie d'une sédimentation, puis une étape de floculation avant une filtration sur filtres à sable. Malgré toutes ces étapes, les effluents rejetés présentent encore de nombreux médicaments sous leur forme initiale (non métabolisée). Le diclofénac n'est quasiment pas dégradé, l'ibuprofène et le naproxène sont largement retrouvés. De la même manière, Bartelt-Hunt *et al.*, (2009) ont montré la persistance de nombreux composés médicamenteux dans les effluents de STEP après différents traitements physiques et biologiques. Cette même tendance a été observée en France par Togola et Budzinsky (2007). Comme pour l'étude de Zorita *et al.*, (2010), ces auteurs mettent en évidence la très mauvaise dégradation du diclofenac, quel que soit le traitement utilisé. Par contre, le paracétamol n'est absolument pas sensible au traitement uniquement physique alors qu'il est quasiment intégralement dégradé en présence d'un traitement biologique. Il en est de même pour l'aspirine. On voit bien, à travers ces différentes études, que quel que soit le traitement utilisé, certaines molécules sont toujours présentes dans les effluents. D'autres seront plus ou moins présentes selon le traitement choisi pour l'épuration des eaux usées mais dans tous les cas, le milieu naturel apparaît comme le réceptacle d'effluents contenant des médicaments non dégradés.

Face à l'émergence de ces nouveaux polluants et des risques qu'ils représentent pour l'homme et l'environnement, un programme national « Santé et Environnement » (PNSE) a été mis en place en France depuis 2004. Ce plan ouvert à de nombreux polluants aquatiques intègre depuis 2008 les substances médicamenteuses. Il a pour objectif de limiter les pollutions des eaux. Au cours de ce PNSE, de nombreuses analyses chimiques ont été réalisées afin de cartographier la présence de médicaments dans les eaux françaises, de surface et souterraines. Il ressort de cette étude une pollution générale par de nombreuses molécules médicamenteuses dont les plus représentées sont l'aspirine, l'ibuprofène, le diclofénac, la carbamazépine, le paracétamol, la metformine, l'oxazépan et l'aténolol (Billetorte et Saubesty, 2008). Le Plan National Santé et Environnement qui intègre les substances médicamenteuses depuis 2008 le préconise à travers l'action 49. En effet, l'action 49 de ce PNSE exige de réduire les risques liés aux rejets de médicaments dans l'environnement. Mais quels sont ces risques ? Suite à ce PNSE, le Plan National sur les Résidus de Médicaments dans les eaux (PNRM) a été mis en place sur une période 2010-2015. Les objectifs de ce plan sont notamment d'intensifier le partage des connaissances et des savoirs faire entre les acteurs des domaines de la santé et de l'environnement, de développer l'acquisition de connaissances sur l'écotoxicité de ces molécules et de réfléchir à des mesures de gestion pertinentes afin d'éviter autant que possible que ces molécules circulent à travers le cycle de l'eau. Ce projet de recherche répond donc aux exigences de ce PNRM à travers l'évaluation des risques environnementaux mais également l'étude sociologique permettant d'identifier des moyens de réduire la présence de médicaments dans l'environnement aquatique. Cette étude, réalisée sur un cours d'eau du bassin Adour-Garonne répond également aux orientations du SDAGE 2010-2015 et tout particulièrement à la disposition D4 qui consiste à protéger les ressources superficielles et souterraines pour les besoins futurs en surveillant dans les eaux brutes et distribuées la présence de substances cancérigènes, mutagènes et neurotoxiques.

On voit bien, à travers toutes ces directives, qu'il est important d'estimer le risque non pas associé à un médicament mais le risque associé à un ensemble de substances retrouvées dans les cours d'eau. L'étude proposée proposera d'identifier les molécules issues d'une station d'épuration rattachée à un hôpital psychiatrique et d'évaluer leurs effets sur les milieux aquatiques. Très peu d'étude ont été réalisées sur les psychotropes. Gonzalès Alonso et al., (2010) ont mis en évidence la présence molécules psychoactives dans la quasi-totalité des rivières espagnoles échantillonnées.

Si les médicaments ne provoquent pas de mortalités directes, ils font craindre des effets délétères chroniques pour les écosystèmes aquatiques. Ils sont alors susceptibles d'en perturber la structure et le fonctionnement écologique. En effet, dans de nombreux cas, les médicaments font preuve de persistance dans l'environnement et tout particulièrement dans les milieux aquatiques. La demi-vie de nombreuses molécules médicamenteuses dépasse un mois en eau douce (USEPA, 2000 ; Ashton *et al.*, 2004) et c'est bien pire dans les sédiments où la demie-vie dépasse quatre mois (USEPA). De nombreuses études montrent la persistance de ces résidus médicamenteux dans les eaux de surface (Halling-Sorensen *et al.*, 1998, Kümmerer, 2004).

Une étude pour évaluer la contamination d'un cours d'eau ne peut donc se cantonner à l'analyse chimique des molécules présentes dans le milieu mais elle doit combiner l'analyse chimique et l'étude biologique. Mais aujourd'hui, peu d'études écotoxicologiques sur les effets potentiels des médicaments sur des organismes aquatiques sont disponibles. Un certain nombre de données concernant des tests de toxicité aiguë standards a été reporté pour les médicaments les plus fréquemment utilisés (Fent *et al.*, 2006 ; Flaherty et Dodson, 2005 ; Clevers, 2004 ; Kim *et al.*, 2007) mais la plupart du temps, ces tests ne concernent que des molécules prises isolément. Les effets de mélanges de médicaments sont très peu abordés. Clevers (2003, 2004) a présenté l'effet des mélanges acide clofibrinique/carbamazépine et

ibuprofène/diclofénac sur la mobilité des daphnies (*Daphnia magna*) et la croissance des algues vertes (*Selenastrum capricornutum*) en comparaison avec l'effet de ces mêmes molécules prises isolément. Il ressort de cette étude que dans les deux cas, le mélange présente une toxicité très nettement supérieure aux prédictions faites correspondant à un effet additionnel de la toxicité des molécules seules. Flaherty et Dodson (2005) ont également travaillé sur les effets de mélanges de médicaments appartenant uniquement à la classe des antibiotiques sur la survie, la croissance et la reproduction des daphnies. Les résultats mettent en évidence une perturbation du développement et de la reproduction des daphnies lorsque les antibiotiques sont en mélange ou pris séparément. L'étude des mélanges de médicaments est donc primordiale pour évaluer l'impact sur le milieu naturel. Les résultats sont souvent complexes à interpréter (Flaherty et Dodson, 2005) mais ces études sont incontournables pour comprendre les mécanismes régissant les perturbations du fonctionnement des écosystèmes aquatiques. En termes de fonctionnement d'écosystèmes aquatiques, les études de terrain permettent une meilleure prise en compte de l'effet chronique des rejets d'effluents contaminés. Mais de la même manière que pour les études avec les mélanges complexes, les études de terrain sont également très rares. Ginebreda *et al.*, (2010) et Munoz *et al.*, (2009) ont étudié l'impact d'effluents urbains contenant des composés pharmaceutiques sur les communautés de macroinvertébrés benthiques d'une rivière espagnole. Ces études indiquent clairement une modification de la communauté d'invertébrés dans les zones de rejets.

Toutes ces constatations nous ont amenés à proposer un projet à l'ANSES intitulé « Les médicaments psychotropes en milieu aquatique. Quels effets sur les écosystèmes aquatiques ? Quelles implications au niveau sociétal ? » Ce projet a débuté en 2011 et se poursuit jusqu'en 2014, sous la responsabilité de F. Geret en lien avec les équipes du LPTC de l'Université de Bordeaux (H. Budzinski et J. Cachot), de l'IRSTEA de Lyon (O. Geffard) et de l'Université de Toulouse (P. Marty et F. Blot).

L'objectif global de cette étude est de permettre une vision étendue des effets des rejets d'effluents d'un hôpital psychiatrique sur le milieu naturel en associant des études sur les individus appartenant à différents niveaux trophiques et des études directement sur les communautés de macroinvertébrés benthiques de ces cours d'eau. Elle améliorerait de façon significative la connaissance des risques liés à la présence de substances médicamenteuses dans les cours d'eau français dans le but d'optimiser la gestion des rejets à travers l'amélioration des traitements des eaux usées. Afin d'évaluer la perception de la société (gestionnaires et population) vis-à-vis de cette nouvelle préoccupation et des contraintes engendrées par la DCE quant à l'atteinte du bon état écologique des cours d'eau d'ici 2015, cette étude à dominante chimie et écotoxicologie présente la particularité de mettre en œuvre un volet sociétal qui prendra une place des plus importantes au fur et à mesure de l'avancement du projet. Le projet MEDEAU financé par l'Agence de l'Eau est une étude qui vient en soutien du projet PSYCHEAU sur le volet écotoxicologie principalement et tout particulièrement sur le volet impact sur les mollusques et les organismes du cours d'eau l'Isle.

III. Rappel des différentes tâches du projet

A. Tâche 1: Analyse des résidus de médicaments dans l'Isle en amont et en aval du rejet hospitalier.

Chercheur Responsable : Hélène Budzinski (ISM/LPTC, Université Bordeaux 1)

Objectifs : Identifier les résidus médicamenteux présents les milieux aquatiques. Etablir un gradient de concentration par rapport aux points de rejets des stations d'épuration.

Cette tâche réalisée dans le cadre du projet PSYCHEAU est insérée dans ce projet pour faire le lien avec les études écotoxicologiques.

B. Tâche 2: Impact des rejets hospitaliers sur les communautés de macroinvertébrés.

Chercheurs Responsables : Florence Geret (GEODE, Université de Toulouse-UTM) et Pierre Marty (GEODE, Université de Toulouse-UTM)

Objectif : Etudier la dynamique de la biodiversité au sein d'écosystèmes, en relation avec la variabilité naturelle et les perturbations.

Le projet MEDEAU ne permet que de se consacrer à l'analyse d'une campagne d'échantillonnage (printemps). Les trois autres campagnes seront développées dans le rapport PSYCHEAU.

C. Tâche 3: Application de bioessais et de biomarqueurs d'effets, pour évaluer la réponse d'organismes aquatiques exposés à l'effluent de la STEP de l'hôpital.

Chercheur Responsable : Florence Geret (GEODE, Université de Toulouse-UTM)

Objectif : Evaluer le potentiel écotoxique d'effluents hospitaliers bruts.

Afin d'évaluer le potentiel toxique de cocktails médicamenteux issus d'effluents hospitaliers, des expérimentations en laboratoire ont été réalisées pour caractériser le spectre d'effets de ces composés sur la corbicule (mollusque).

Le projet MEDEAU participe à l'étude écotoxicologique sur mollusques.

Dans le projet financé par l'ANSES, des études complémentaires ont été réalisées sur le gammare (IRSTEA de Lyon) et sur le poisson Médaka (LPTC, Université de Bordeaux) concernant les effluents bruts. Le projet PSYCHEAU s'est également consacré à l'étude des effets de mélanges de médicaments psychotropes de l'effluent sur les différents organismes sélectionnés.

D. Tâche 4: Evaluation des effets de l'effluent de la STEP sur des organismes clés des réseaux trophiques par l'utilisation de biotests.

Chercheur Responsable : Florence Geret (GEODE, Université de Toulouse-UTM)

Parallèlement à la tâche 3 et avec le même objectif d'évaluation du potentiel toxique de cocktails médicamenteux issus d'effluents hospitaliers, cette tâche ne s'est consacrée qu'à l'utilisation de tests normalisés utilisant des organismes appartenant aux premiers niveaux des réseaux trophiques. Ces tests normalisés font office de référence au niveau des différentes instances, ils sont en général rapides à mettre en œuvre et permettent le calcul d'indices d'écotoxicité rendant compte de la toxicité d'effluents et de leur impact sur le milieu naturel. Ces indices sont alors utilisés, notamment en France par les Agences de l'eau, comme outil d'aide à la décision afin d'orienter la gestion des rejets.

De la même manière que précédemment, le projet MEDEAU participe à cette étude de toxicité. Le projet PSYCHEAU apporte des éléments supplémentaires de toxicité de mélanges de médicaments psychotropes utilisant les molécules pures.

E. Tâche 5 : Comment la société prend en compte la problématique des rejets de résidus médicamenteux en milieu aquatique ?

Chercheurs Responsables : Frédérique Blot (GEODE, Université de Toulouse-UTM)

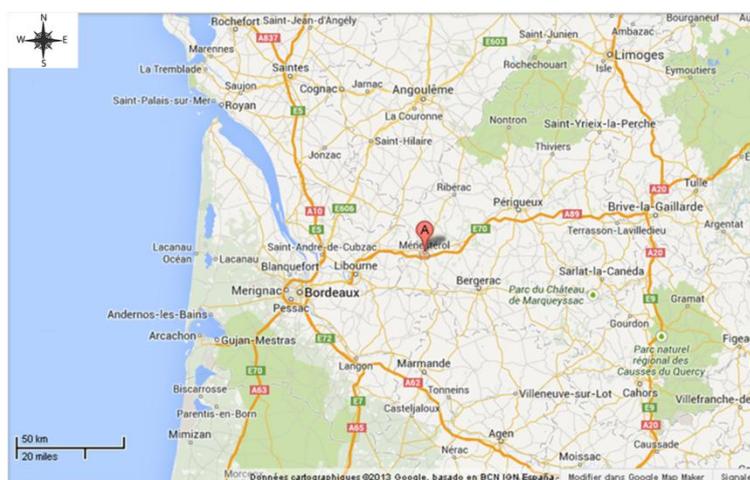
La DCE, comme nous l'avons vu précédemment, conduit à recentrer les relations des sociétés au regard de critères qualitatifs des écosystèmes aquatiques (objectif central de « bon état écologique »). Or, la mise en évidence de la présence et de l'impact de substances médicamenteuses sur les écosystèmes aquatiques par la communauté scientifique peut contribuer à relativiser la notion de « bon état écologique » au regard de nouveaux indicateurs.

L'objectif est d'étudier dans quelle mesure la mise en évidence de la présence de substances médicamenteuses interpelle les habitants, usagers et gestionnaires de l'eau et pourrait les conduire à modifier leurs pratiques. Pensez-ils que le diagnostic proposé au regard d'un nouvel indicateur (présence de substances médicamenteuses et impact sur les écosystèmes aquatiques) puisse modifier un diagnostic de « bon état écologique » ? Quel lien établissent-ils avec la DCE ? Avec leurs pratiques (gestion de l'eau, usage de l'eau), des choix de traitements à mettre en œuvre au paiement de leur facture d'eau ?

Cette tâche, partie intégrante du projet PSYCHEAU est intégrée dans ce rapport comme élément d'information aux gestionnaires de l'eau.

IV. Présentation du site d'étude

Cette étude est réalisée sur la commune de Montpon-Ménéstérol en Dordogne (carte 1).



Carte 1 : Localisation de Montpon-Ménéstérol.

A. Présentation de l'hôpital

L'hôpital spécialisé de Vauclaire possède 250 lits en psychiatrie et 120 places de jour. Les activités principales concernent la psychiatrie et l'addictologie avec un pôle de pédo-psychiatrie et un pôle intersectoriel de prise en charge au long cours.



Photo 1 : l'hôpital psychiatrique de Vauclaire (Montpon-Ménéstérol, Dordogne)

Cette prise en charge psychiatrique nécessite l'utilisation de médicaments spécifiques. Parmi les psychotropes utilisés, les neuroleptiques représentent la quantité administrée la plus importante suivis des antidépresseurs. Les anxiolytiques sont classés en troisième position en termes de quantité de médicaments consommés. Tout autre type de médicament peut être utilisé en fonction des traitements suivis par les patients avant leur hospitalisation en centre psychiatrique. Ces médicaments sont toutefois utilisés en faible quantité.

B. La station d'épuration

Les eaux usées de l'hôpital sont toutes redirigées vers la station d'épuration de l'hôpital. La station a une capacité d'épuration de 600m³/jour. Elle est constituée d'un poste de relevage qui se situe dans l'enceinte de l'hôpital (figure 1) avec une zone de dégrillage et de dégraissage et une zone de traitement physique et biologique qui est localisée à l'extérieur de l'hôpital (figures 1 et 2).

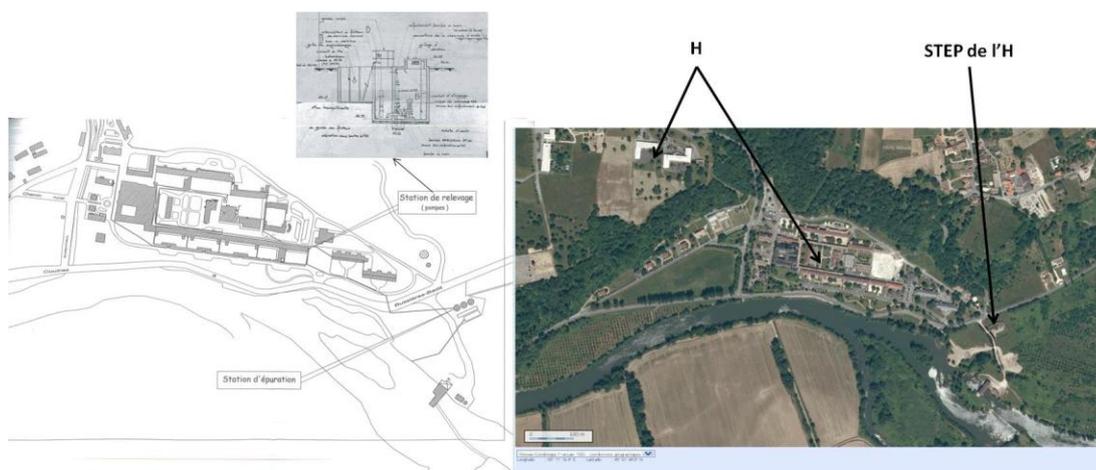


Figure 1 : Localisation de la station de relevage et de la station d'épuration par rapport au centre hospitalier de Vauclaire.

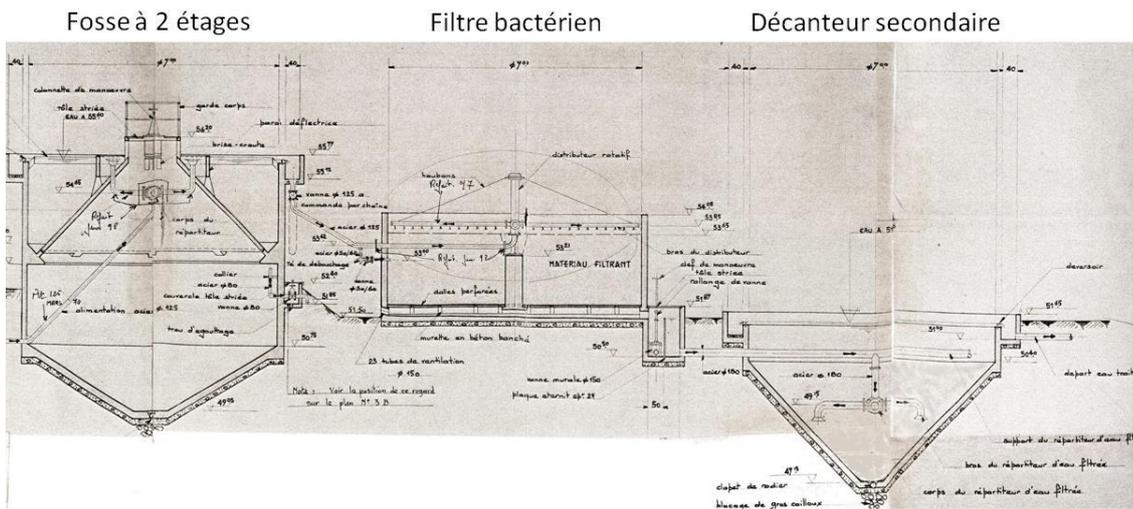


Figure 2 : Fonctionnement de la station d'épuration de l'hôpital de Vauclaire.

Cette station ne fonctionne pas en continu. Lorsque le volume dans la zone de relevage a atteint son niveau maximum, les eaux basculent par déverse vers le décanteur primaire (fosse à 2 étages) puis vers le lit bactérien pour atteindre le décanteur secondaire où les eaux sont éliminées vers le cours d'eau « l'Isle » également par déverse (photo 2). Les caractéristiques de la station sont fournies dans le tableau 1 d'après le bilan de pollution 24h fourni par le laboratoire Départemental d'Analyse et de Recherche (2010).



Photo 2 : La STEP (partie extérieure). Fonctionnement en alternance. 16h30 : en haut à gauche, pas de sortie d'effluents. 17h15 en bas, sortie d'effluents. 17h30, arrêt de la sortie d'effluents.

Tableau 1 : Caractéristiques de la station d'épuration de l'hôpital spécialisé de Vauclaire.

Capacité	Volume journalier : 600 m ³
Décanteur primaire	Surface décanteur primaire : 38,5 m ² Volume de décantation : 62 m ³
Lit bactérien	Volume de matériaux : 70 m ³ Hauteur utile de remplissage : 1.8m Surface du lit : 38,5 m ²
Décanteur secondaire	Surface décanteur secondaire : 38,5 m ² Volume décanteur secondaire : 83 m ³
Digesteur anaérobie	Volume de la partie cylindrique : 109 m ³ Volume de la partie conique : 38,5 m ³
Lit de séchage	Surface : 90 m ²

Les rejets d'effluents s'effectuent tous les jours approximativement à la même heure : 9h50, 10h35, 11h10, 11h45, 12h30, 13h10, 13h45, 14h20, 15h40. Les rejets sont en corrélation avec les volumes horaires entrant en station (figure 3). C'est au cours de la matinée que les volumes en entrée de station sont les plus importants et donc que les rejets d'effluents en sortie de STEP sont également les plus importants.

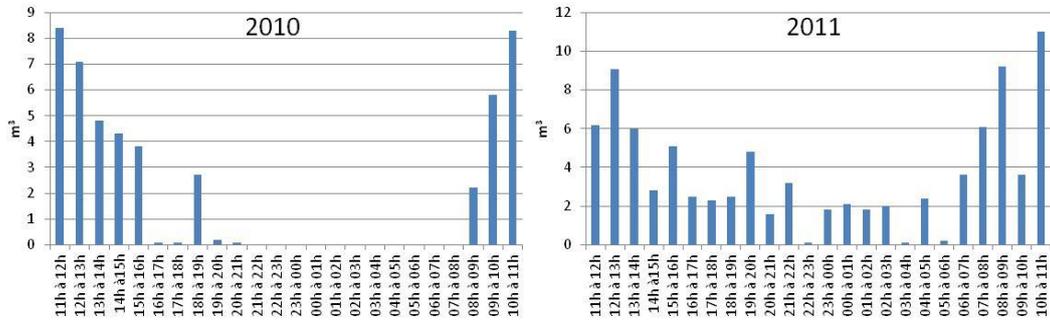


Figure 3 : Débits horaires entrants dans la station en 2010 et en 2011.

Initialement, l'équipe de recherche pensait que le Maine Brégou était le cours-d'eau récepteur des effluents de la station. Après un test utilisant de la fluorescéine, il apparaît que les effluents se jettent directement dans l'Isle (photos 3 et 4), ce que confirme les rapports du SATSE.



Photo 3 : En haut à gauche, regard en sortie de STEP permettant les prélèvements. En haut à gauche, bras du Maine Brégou ne recevant pas les effluents de la STEP. En bas à gauche, sortie des effluents en 2 points de l'Isle (cf photos suivantes).

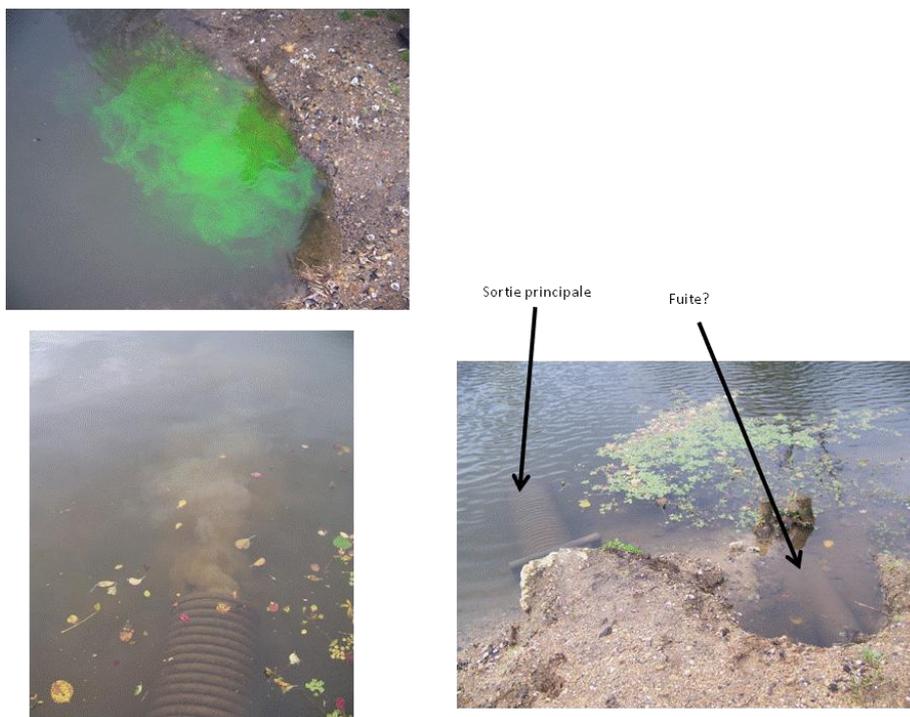


Photo 4 : En haut à gauche, sortie de fluorescéine au niveau de la fuite. En bas à gauche, sortie principale.

C. Caractérisation physico-chimique des effluents

Les données fournies par le laboratoire Départemental d'Analyse et de Recherche à partir de prélèvements effectués en septembre 2010 et en octobre 2011 moyennés sur 24h sont sensiblement équivalentes (tableau 2) en ce qui concerne la demande biologique en oxygène sur 5 jours (DBO₅), la demande chimique en oxygène, la teneur en matières en suspension, la teneur en azote et la teneur en phosphore.

Tableau 2 : Demande biologique en oxygène sur 5 jours (DBO₅), la demande chimique en oxygène, teneur en matières en suspension, teneur en azote et teneur en phosphore dans les eaux d'entrée et de sortie de STEP de l'hôpital de Vauclaire.

	2010			2011		
	entrée station	sortie station	rendement %	entrée station	sortie station	rendement %
	concentration (mg/l)	concentration (mg/l)		concentration (mg/l)	concentration (mg/l)	
DBO ₅	160	5	97	150	11	93
DCO	460	57	88	370	44	87
MES	97	19	80	180	13	92
NTK	26	7,6	71	31	9,4	70
P	6,4	7		5,5	6	

Le pouvoir épurateur de la STEP est donc correct en regard aux paramètres mesurés.

V. Mise en œuvre du projet – Matériels et méthodes communs

A. Les campagnes d'échantillonnage d'effluents/macroinvertébrés

Les campagnes d'échantillonnages ont été effectuées avec l'ensemble des partenaires du projet afin que toutes les équipes travaillent avec les mêmes effluents. Le volet chimique permet de caractériser les effluents utilisés pour l'ensemble des biotests écotoxicologiques. Les campagnes de prélèvements des

macro-invertébrés benthiques de la rivière l'Isle ont été effectuées également sur les mêmes jours d'échantillonnage.

B. Le choix des psychotropes à étudier

Afin de choisir les psychotropes à analyser dans les effluents puis à utiliser pour les études écotoxicologiques en laboratoire (projet PSYCHEAU), nous nous sommes basés, dans un premier temps, sur les psychotropes les plus utilisés dans l'hôpital de Montpon et dans un second temps sur le rapport de Besse et Garric de 2007. Le détail du choix est détaillé en annexe 1.

A partir de l'ensemble des données, la liste des molécules psychotropes retenues comme prioritaires pour l'étude est la suivante :

- Acide valproïque
- Carbamazépine
- Cyamémazine
- Fluoxétine
- Oxazepam
- Sertraline
- Norfluoxétine
- Lorazepam
- Hydroxyzine
- Citalopram

Les caractéristiques et la structure des 10 molécules sélectionnées sont présentées dans le tableau 3 et la figure 4.

Tableau 3 : caractéristiques des psychotropes sélectionnés dans le milieu et dans l'effluent

Composé	Famille	Formule brute	Poids moléculaire
Acide valproïque	Antiépileptique	C ₈ H ₁₆ O ₂	144,22 g/mol
Carbamazépine	Antiépileptique	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	236,27 g/mol
Fluoxétine	Antidépresseur	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	345,79 g/mol
Norfluoxétine	Antidépresseur	C ₁₆ H ₁₆ F ₃ NO	331,76 g/mol
Cyamémazine	Neuroleptique	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ S	323,45 g/mol
Oxazepam	Anxiolytique	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	286,71 g/mol
Sertraline	Antidépresseur	C ₁₇ H ₁₇ ClN ₂	306,23 g/mol
Citalopram	Antidépresseur	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O	324,39 g/mol
Lorazepam	Anxiolytique	C ₁₅ H ₁₀ ClN ₂ O ₂	321,16 g/mol
Hydroxyzine	Anxiolytique	C ₂₁ H ₂₇ ClN ₂ O ₂	374,90 g/mol

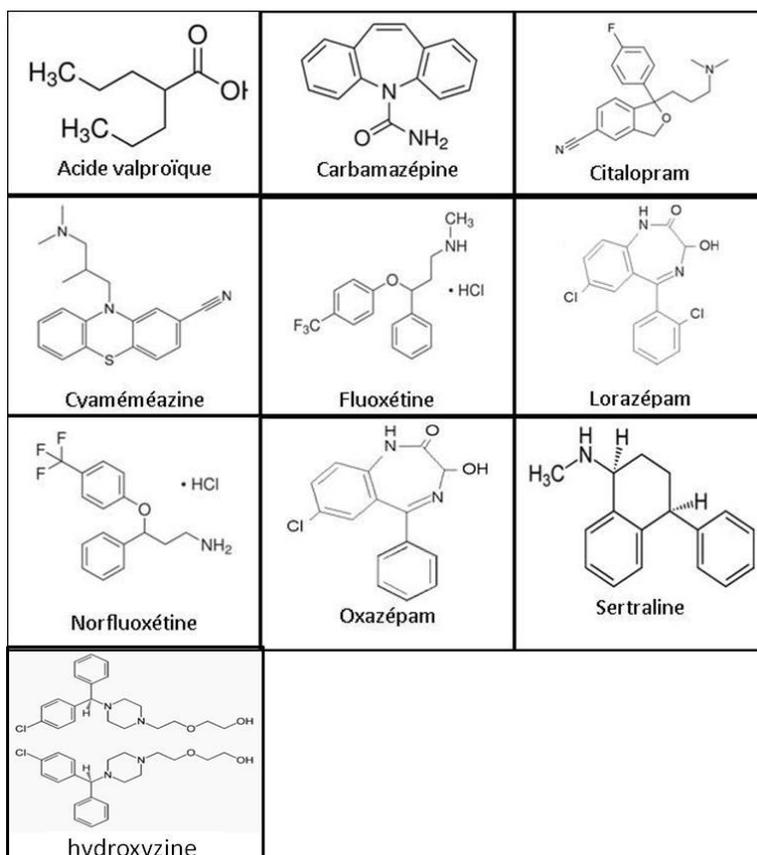


Figure 4 : Structure des molécules

VI. Protocoles, Résultats et Discussion relatifs à chaque tâche

A. Tâche 1 : Analyse des résidus de médicaments dans l'Isle en amont et en aval du rejet hospitalier.

Plusieurs prélèvements ont été effectués afin de caractériser le site (photo 5). Un point en amont du rejet de la STEP dans l'Isle, le point de rejet, un point en aval du rejet, un point en amont de l'entrée de la STEP et les effluents de sortie de STEP.

5 prélèvements ont été effectués sur la campagne d'échantillonnage entre le 19 septembre et le 10 octobre à des moments où les autres partenaires du projet effectuaient également des prélèvements.

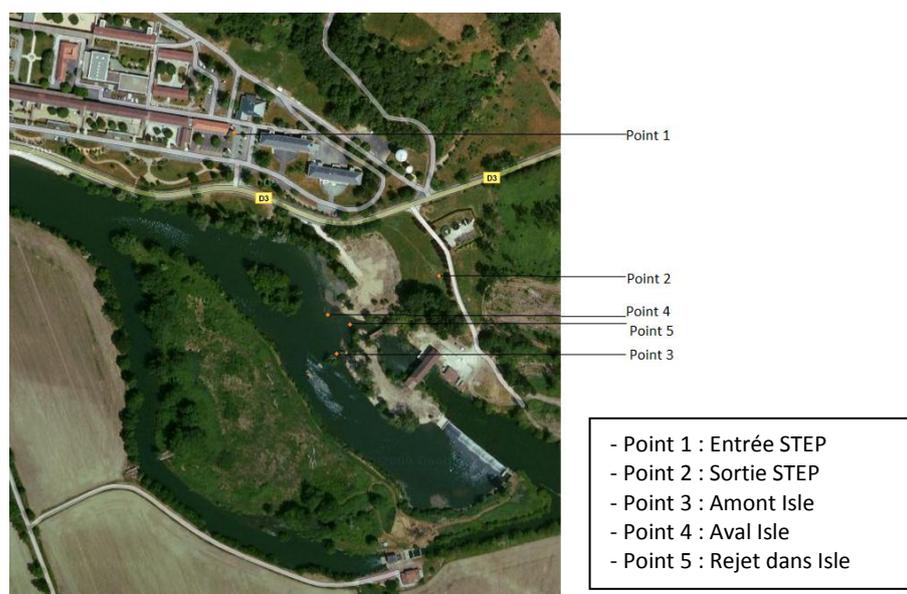


Photo 5 : Sites d'échantillonnage de Montpon de la campagne du 23.05.11 au 17.10.11.

Les résultats de 5 prélèvements ont été moyennés et présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Concentration moyenne en médicaments retrouvés sur tous les points de prélèvement (- : non détecté)

molécules	Point 1 : entrée STEP Moyenne ng/L	Point 2 : Sortie STEP (moyenne) ng/L	Point 3 : Amont Isle (moyenne) ng/L	Point 4 : Aval Isle (moyenne) ng/L	Point 5 : Rejet (moyenne) ng/L	Point 1 entrée STEP moyennée 24h ng/L	Point 2 : sortie STEP moyennée 24h ng/L
Carbamazépine	2189.78	2013.21	42.79	42.68	165.34	1698.38	2213.53
Diazepam	99.45	129.34	0.69	0.21	4.75	35.01	101.04
Oxazepam	3893.38	7043.58	154.1	155.21	816.02	2685.19	7434.19
Fluoxétine	74	15.99	-	-	-	82.95	33.95
Norfluoxétine	47.72	2.89	-	-	-	50.73	-
Sertraline	115.22	14.55	-	-	0.66	230.41	10.03
Lorazepam	908.88	430.75	-	-	-	1271.56	384.41
Cyamemazine	2902.1	322.89	1.11	2.42	10.37	2490.59	140.66
Citalopram	487.8	150.69	1.17	1.67	7.33	313.06	55.96
Hydroxyzine	105.02	21.11	0.04	0.14	0.36	71.21	18.15
Paracétamol	123858	37547	6552.3	3564.6	9797.4		
caféine	7643.9	4894.9	926	681.6	713		

D'après ces résultats, pour plusieurs molécules et notamment la caféine, le paracétamol et le diazepam, les concentrations des substances pharmaceutiques en amont du rejet d'effluents de la STEP sont plus élevées qu'en aval de celui-ci. Il semble donc que l'hôpital spécialisé de Vauclaire ne soit pas la seule source d'apport de molécules pharmaceutique dans l'Isle. En amont du rejet se trouve Périgueux (carte 1), commune de 30000 habitants susceptible de rejeter des médicaments dans l'Isle via sa station d'épuration. Concernant plus particulièrement les psychotropes, ces premiers résultats mettent en avant l'accumulation d'oxazepam dans le système d'épuration. Si nous le comparons avec la carbamazépine, la quantité utilisée d'oxazepam est environ deux fois moindre que celle de carbamazépine (tableau 5) et pourtant, cette molécule est beaucoup plus concentrée dans les eaux d'entrée et surtout de sortie de STEP.

Tableau 5 : Quantité de médicaments utilisés au sein de l'hôpital spécialisé de Vauclaire au cours de l'année 2010

molécule	Nom commercial	Quantité prescrite (mg)
Acide valproïque	Dépakine, micropakine 500	11913500
cyamémazine	Tercian 25 ; 100	1979600
Carbamazépine	Tegretol 200 ; LP 200,400	1900000
Oxazepam	Seresta 10 ; 50	915200
Hydroxyzine	Atarax 25,100	800300
Citalopram	Seropram 20 ; Seroplex 10,20	178870
Phenobarbital	Gardenal 10,50,100	173950
Sertraline	Zoloft 25	159000
Fluoxétine	Prozac 20	70240
Lorazepam	Temesta 1 ; 2,5	20335

Comme pour l'oxazepam, dans le cas du diazepam, du nordiazepam et du propranolol, nous pouvons remarquer que les concentrations en entrée de STEP sont plus faibles qu'en sortie de STEP. Plusieurs explications peuvent être avancées à cette observation :

- les eaux en entrée de STEP sont très chargées. Cette charge organique provoque un effet matriciel provoquant une extinction du signal.

- L'autre possibilité peut résulter du fait que ces eaux chargées en matière organique provoquent une conjugaison entre ces composés et des éléments matriciels. Ces molécules ne sont donc plus à l'état libre mais conjuguées et donc ne sont plus détectables.

A part la carbamazépine et l'oxazepam qui sont très peu dégradés par les traitements physiques et biologiques de cette STEP, les autres molécules subissent un abattement compris entre 59% (Fluoxétine) et 96% (sertraline, cyamémazine). Zhang et al. (2008) mettent également en évidence une très faible dégradation de la carbamazépine dans de nombreuses STEP mondiales. La concentration de carbamazépine retrouvée dans les effluents de cette STEP est élevée par rapport à de nombreux effluents de STEP mais du même ordre de grandeur que quelques effluents (Santos et al., 2010). Les concentrations de citalopram, lorazepam, sertraline, fluoxetine, norfluoxetine dans les effluents de la STEP de l'hôpital de Vauclaire sont dans la moyenne des valeurs reportées par plusieurs auteurs (Brooks et al., 2003 ; Santos et al., 2010 ; Gonzales-Alonso et al., 2010 ; Sousa et al., 2011).

Lorsque les effluents sont rejetés dans l'Isle, D'un point de vue général, la dilution est très importante (module 27,3 m³/s ; débit d'étiage de l'Isle :QMNA(1/5) 4,7 m³/s) et les molécules ne sont plus détectées qu'à des concentrations relativement faibles. Les concentrations en carbamazépine, sertraline, fluoxetine, norfluoxétine, citalopram, lorazepam retrouvées dans l'Isle sont en accord avec celles reportées par de nombreux auteurs dans diverses rivières européennes voire mondiales (Brooks et al., 2003 ; Santos et al., 2010 ; Gonzales-Alonso et al., 2010 ; Sousa et al., 2011). Par contre, l'oxazepam est retrouvé dans l'Isle à des concentrations très supérieures à celles en général reportées dans les cours d'eau espagnols (Gonzales-Alonso et al., 2010).

B. Tâche 2 : Impact des rejets hospitaliers sur les communautés de macroinvertébrés.

1. Matériels et méthodes

La première période d'échantillonnage correspondant à l'échantillonnage de printemps a été réalisée le 23 mai 2011 (les résultats des trois autres échantillonnages correspondant aux trois autres saisons seront présentés dans le rapport final de PSYCHEAU).

4 stations ont été étudiées (photo 6). La station notée « Amont » est située à 47,06 mètres en amont du rejet ; elle constitue la station de référence pour évaluer l'impact de l'effluent hospitalier. La station « Rejet » se trouve à 2 mètres en aval du rejet, elle permet d'évaluer l'impact direct de l'effluent. Les stations « Aval+ » et « Aval ++ » se situent respectivement à 38,29 mètres et 87,10 mètres du rejet ; elles permettent d'évaluer un effet de dilution de l'effluent par la rivière.

Tous les échantillonnages ont été réalisés à bord d'une barque. Les échantillonnages sont aléatoires sur des substrats équivalents entre chaque station. Les prélèvements ont été effectués dans les habitats les plus représentés sur le site d'étude à savoir les sédiments et les macrophytes. Dans les sédiments ont été analysés tous les macroinvertébrés benthiques et dans les macrophytes, tous les macroinvertébrés de la colonne d'eau et associés aux végétaux.



Photo 6 : Le site d'étude : L'hôpital de Vauclaire, sa station d'épuration et les différentes stations de prélèvements Amont, Rejet, Aval+ et Aval++. Source : google earth.

Au niveau des sédiments, les profondeurs d'eau ne permettant pas de prélever directement à l'aide d'un carottier, une benne Eckman a été utilisée dans laquelle les carottages ont été effectués à l'aide d'un carottier. Les carottes ont un diamètre intérieur de 45 mm, ce qui correspond à une surface de prélèvement de $1,59 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$ pour une carotte. Etant donné que 90 % des macroinvertébrés benthiques se trouvent dans les dix premiers centimètres de sédiment (Sherfy et al, 2000, Kajak et al, 1971), les carottages ont été effectués à une profondeur avoisinant les 15 centimètres. Au niveau des macrophytes, l'échantillonnage a été effectué à l'aide d'un filet troubleau. Ce filet dont le manche mesure 170 cm, est constitué d'un cadre rectangulaire (14 cm * 10 cm) et d'un filet ayant un vide de maille de 300 microns. C'est par des mouvements de va et vient que les invertébrés ont été récoltés.

Afin de comparer les la structuration compositionnelle des différentes communautés présentes sur chacune des stations, nous utiliserons la richesse taxonomique ainsi que l'indice de Shannon H' (Barbault, 1981). Cet indice tient compte non seulement de la richesse taxonomique mais aussi de l'abondance relative des divers taxons. Il sera calculé pour chaque station à partir de 5 carottes pour les communautés benthiques et 4 prélèvements par filet troubleau pour les communautés inféodées aux macrophytes. La formule est la suivante :

$$H' = - \sum_i^S (p_i * (\frac{\ln(p_i)}{\ln(2)}))$$

Avec $p_i = \frac{n_i}{N}$

n_i : nombre d'individus dans l'espèce i , i allant de 1 à S (nombre total de taxons).

N : nombre total d'individus de l'échantillon

Le test de la différence entre les indices H' de chaque station s'effectue à l'aide de la formule issue du rapport *Forestry Research Support Programme for Asia and the Pacific*(1999) :

$$Var(H'i) = \frac{\sum_{i=1}^S (\ln(p_i)) / \ln(2))^2 - (\sum_{i=1}^S p_i * (\ln(p_i) / \ln(2)))^2}{N} + \frac{S-1}{2N^2}$$

$$t = \frac{|H'1 - H'2|}{\sqrt{Var(H'1) + Var(H'2)}}$$

$$ddl = \frac{(Var(H'1) + Var(H'2))^2}{(Var(H'1))^2 / N1 + (Var(H'2))^2 / N2}$$

Afin d'évaluer la similitude de la richesse taxonomique entre les différentes communautés, nous avons utilisé l'indice de diversité β de Jaccard. Sa formule est la suivante :

$$J = \frac{j}{a + b - j}$$

Avec j le nombre de taxons en communs entre les deux communautés A et B, a le nombre de taxons de la communauté A et b le nombre de taxons de la communauté B.

2. Résultats et discussion

Si on s'intéresse à la composition de la communauté benthique, la richesse taxonomique maximale au niveau de la station amont avec 24 taxons déterminés. Cette richesse chute à 15 taxons à proximité immédiate du rejet, et à 18 taxons à 38,29 mètres en aval du rejet (station Aval+). Lorsqu'on s'éloigne de 87,10 mètres en aval du rejet (station Aval ++), la richesse remonte à 24 taxons soit égale à la valeur mesurée en amont du rejet (figure 5).

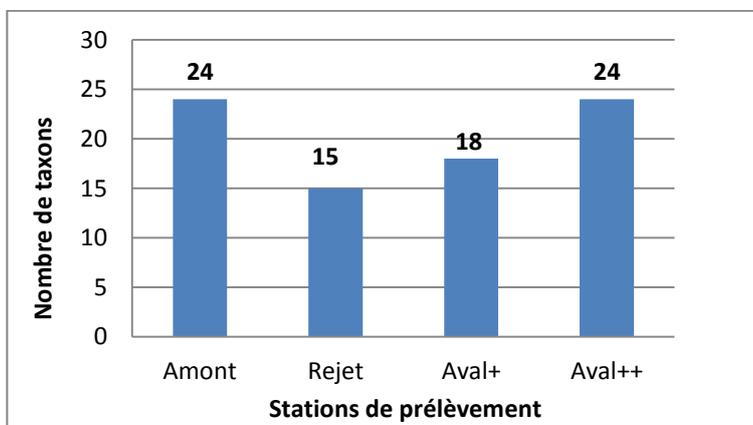


Figure 5 : Richesse taxonomique concernant les stations Amont, Rejet, Aval+ et Aval++. Echantillonnage par carottage.

L'indice de Jaccard montre des taux de similitude entre stations allant de 34% à 45%. C'est entre la station aval+ et aval++ que la similitude est la plus forte. La station amont et aval++ sont semblables à 41%. Par

contre, on perd des taxons communs, donc de la similitude entre l'amont et le rejet et entre l'amont et l'aval+ (Tableau 6).

Tableau 6 : Valeurs de l'indice de similitude de Jaccard entre les communautés des stations Amont, Rejet, Aval+ et Aval++. Echantillonnage par carottage

	Amont	Rejet	Aval+
Rejet	0,34	-	-
Aval+	0,35	0,37	-
Aval++	0,41	0,341	0,45

L'indice H' de Shannon corrobore ces résultats (Figure 6). Cet indice a pour but d'indiquer la diversité taxonomique d'une station et comparer à H' max (indice d'équitabilité qui donne la valeur maximale que peut atteindre H' si tous les taxons y étaient également représentés). L'amont et l'aval++ présentent des valeurs d'indice les plus élevées indiquant une diversité plus importante dans ces stations qu'au niveau du rejet ou de l'aval+. De plus, en amont et en aval++ H' atteint respectivement 78% et 63% de la valeur maximale possible. Les taxons présents sur ces stations sont donc répartis relativement équitablement. Nous n'observons pas la dominance d'un taxon particulier. Au niveau du rejet et de l'aval+, cet indice ne représente plus que 56% de la valeur maximale possible. Ces stations sont donc marquées par un déséquilibre en termes d'abondance de taxons.

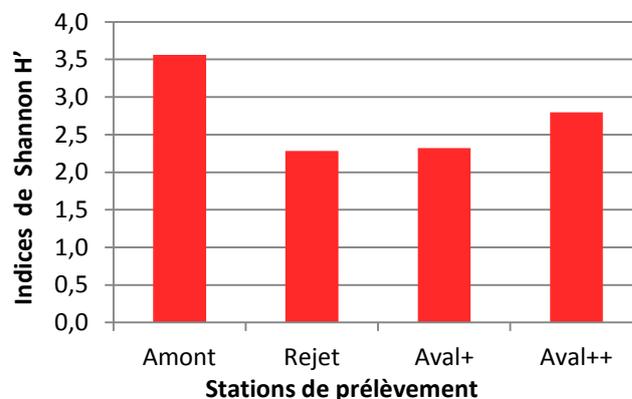


Figure 6 : Abondance relative (indice de Shannon) des communautés de macro-invertébrés des stations Amont, Rejet, Aval+ et Aval++. Echantillonnage par carottage.

La répartition des taxons semble se faire selon une relative sensibilité à la pollution. Les taxons que l'on a recensés appartiennent à des groupes indicateurs globalement polluo-résistants d'après la Norme AFNOR NF T90350 de Mars 2004. Par contre, certains taxons sont surtout dans la station Amont comme *Physa sp*, *Nais pseudoptusa*, *Ucinais uncinata*, *Aulophorus furcatus*, *Tubifex ignotus*, *Asellidae* et *Gammarus sp*. Ils se pourraient qu'ils soient plus sensibles à l'effluent et auraient donc disparu au niveau du rejet.

On peut donc supposer un impact du rejet sur la richesse taxonomique ainsi que sur la structure des communautés benthiques. Cet impact est important à proximité du rejet (station Rejet et Aval+) et a tendance à se dissiper à plusieurs dizaines de mètres (Aval ++). Ce phénomène de résilience est probablement dû à un effet de dilution ce qui paraît normal pour un cours ayant un débit moyen d'environ $10\text{m}^3.\text{s}^{-1}$.

En ce qui concerne les communautés inféodées aux macrophytes, il apparaît que la richesse taxonomique est moindre en aval direct du rejet (figure 7).

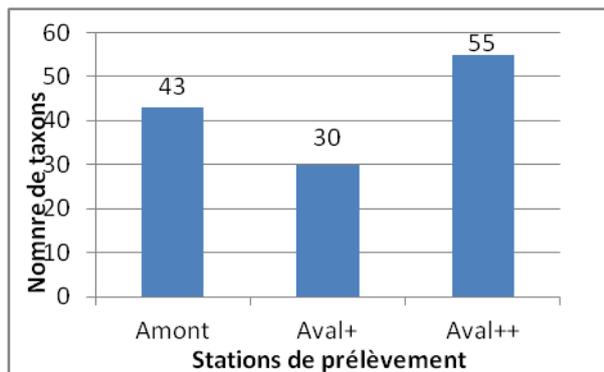


Figure 7 : Richesse taxonomique concernant les stations Amont, Rejet, Aval+ et Aval++. Echantillonnage à l'aide du filet Troubleau.

De plus, l'indice de Jaccard montre que les stations Amont et Aval++ possèdent beaucoup d'espèces communes (Tableau 7).

Tableau 7 : Valeurs de l'indice de similitude de Jaccard entre les communautés des stations Amont, Rejet, Aval+ et Aval++. Echantillonnage à l'aide d'un filet troubleau.

	Amont	Aval+
Aval+	0,46	-
Aval++	0,53	0,49

Cependant, l'indice de Shannon indique que la répartition des individus par taxons est plus homogène dans la station Aval + (figure 8). Au niveau des stations amont et aval++, l'indice de shannon H' ne représente que 48% de la valeur maximale de l'indice alors qu'au niveau de l'aval+, cet indice est égal à 71% de la valeur maximale. Donc, bien que la richesse taxonomique soit moindre en aval+, les taxons sont présents relativement équitablement contrairement aux deux autres stations où certains taxons sont dominants.

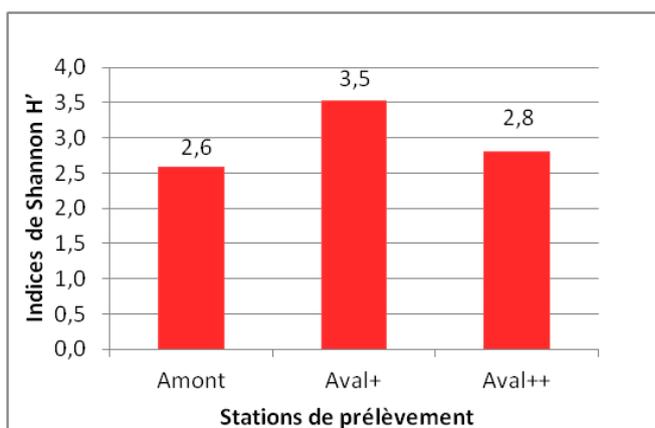


Figure 8 : Abondance relative (indice de Shannon) des communautés de macro-invertébrés des stations Amont, Rejet, Aval+ et Aval++. Echantillonnage à l'aide d'un filet troubleau.

Les effluents hospitaliers pourraient donc également avoir un impact au niveau des communautés épiphytiques. Tout comme pour le benthos, il affecte la richesse taxonomique et un effet de dilution

semble s'opérer lorsqu'on s'éloigne du rejet. Néanmoins la structure des communautés ne semble pas affectée de la même manière puisqu'il semble que la présence de taxons dominants ne soit pas marquée à proximité du rejet de l'effluent.

Il est toutefois important de rappeler que ces premiers résultats sont issus de données provenant d'une seule session de prélèvements (campagne 1). L'analyse des autres campagnes saisonnières devrait nous permettre de vérifier ces premières tendances (cf rapport final du projet PSYCHEAU). Il serait également intéressant de corrélérer ces premiers résultats avec des analyses chimiques des sédiments (échantillons prélevés mais analyses non programmées).

C. Tâche 3 : Application de bioessais et de biomarqueurs d'effets, pour évaluer la réponse d'organismes aquatiques exposés à l'effluent de la STEP de l'hôpital.

Pour le modèle mollusque, les expérimentations ont été réalisées à partir d'effluents prélevés le 8 septembre, le 12 septembre, le 15 septembre, le 19 septembre, le 22 septembre et le 26 septembre 2011. A chacune de ces dates, 40 litres d'effluents étaient prélevés à chaque « lâcher » de la STEP (9h50, 10h35, 11h10, 11h45, 12h30, 13h10, 13h45, 14h20, 15h40) (figure 3) et mélanger entre eux afin d'obtenir un mélange correspondant à la quasi-totalité des eaux sortant de la STEP.

Afin de réaliser cette partie, une bourse de stage post-doctoral a été financée par la Région Midi-Pyrénées et le Centre Universitaire Jean-François Champollion.

La première année de ce projet a fait l'objet de la mise au point des différents protocoles afin d'analyser plusieurs biomarqueurs (EROD, GST, catalase, MXR, MDA) sur la corbicule *Corbicula fluminea* et de la mise au point de la technique de protéomique.

Au cours de cette première année, une expérimentation utilisant des corbicules exposées aux effluents de la STEP de Montpon a été réalisée.

Les biomarqueurs ciblés permettent d'appréhender deux catégories de mécanismes :

- la métabolisation des contaminants (activités EROD et GST, MXR)
- le stress oxydant engendré par l'exposition aux contaminants (MDA) et la prise en charge des radicaux libres par le système anti-oxydant (Catalase, GST)

1. Exposition en laboratoire avec un renouvellement d'eau tous les 2 jours

Avant cette exposition, des corbicules ont été prélevées dans le lac de la retenue de la Roucarié près de Carmaux (Tarn). Les organismes sont placés dans des aquariums contenant 2 cm d'épaisseur de sable ainsi que 40 L d'eau potable préalablement aérée et déchlorée. L'eau est renouvelée tous les deux jours en partie ou entièrement selon le degré de turbidité de l'eau. Les organismes sont ainsi maintenus durant 1 semaine avec un nourrissage journalier par un aliment liquide. Les individus morts sont retirés quotidiennement. La stabulation ainsi que la phase d'exposition ont lieu dans une chambre froide à 17°C, la photopériode appliquée est dite naturelle. A l'issue des 7 jours de stabulation, les organismes sont comptés afin de procéder à l'exposition aux effluents de la STEP.

Le lot témoin et le lot exposé est constitué de 3 aquariums contenant chacun 115 individus (photo 7), un lit de sable de 2 cm et 40 L d'eau. Pour le lot témoin, l'eau potable produite à Montpon a été retenue, elle subi une oxygénation ainsi qu'une déchloration avant d'être placée dans les aquariums.



Photo 7 : Exposition des corbicules aux effluents (photo centrale) et lot témoin (dernière photo).

Le milieu a été renouvelé de moitié tous les deux jours, ce qui peut être qualifié d'exposition en condition semi statique et limiter la dégradation du milieu d'exposition. Les organismes ont été nourris durant toute l'expérience afin de réduire le stress lié au manque de nutriments. Cette expérience a nécessité un échantillonnage d'effluent et d'eau potable de l'établissement hospitalier deux fois par semaine.

Un suivi dans le temps a été réalisé et un lot de 24 individus (soit 8 par aquarium) a été retiré à différents intervalles de temps : T0, 1jour, 3, 7, 14 jours jusqu'à 21 jours d'exposition.

Parallèlement, la mortalité a pu être évaluée lors des changements d'eau.

Les individus ont été placés dans des sacs plastique puis congelés à -80°C.

2. Préparation des échantillons afin de réaliser toutes les analyses sur les mêmes échantillons

Les organismes sont disséqués en prenant soin de différencier les tissus : branchies et glandes digestives.

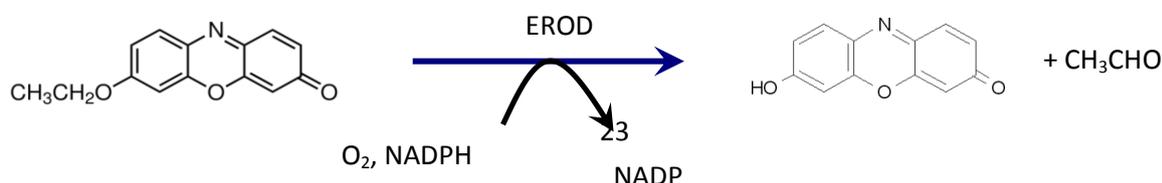
Des pools de 3 organismes ont été broyés afin de constituer un échantillon. Ainsi, 8 échantillons par paramètre ont été préparés pour l'analyse des biomarqueurs et 4 pools pour la technique de 2D SDS PAGE. Le protocole est décrit dans l'annexe 2.

Un total de 176 échantillons a été préparé pour les biomarqueurs et 88 pour la protéomique. Ils ont été stockés à -80°C jusqu'à analyse.

3. Les biomarqueurs utilisés

➤ Activité EROD ou 7 éthoxyrésorufine-O-dééthylase :

Cette enzyme possède une activité monooxygénase à cytochrome P450. Elle ajoute une fonction chimique au composé à éliminer, ce processus est appelé fonctionnalisation et appartient au métabolisme de phase 1. Cette enzyme utilise un co-facteur : le NADPH. Ainsi, pour mesurer son activité, il faut mettre en présence du NADPH et un substrat fluorescent la 7 éthoxyresorufine. Ce substrat est transformé en résorufine, un produit plus fluorescent.

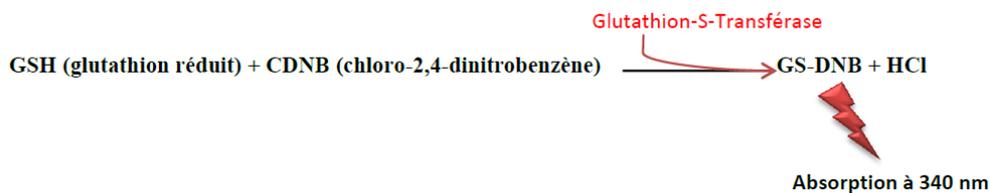


L'activité de l'enzyme est suivie en fluorimétrie avec comme longueur d'onde d'excitation 530nm et longueur d'onde d'émission 585nm. Après 2 minutes d'incubation, la fluorescence est mesurée toute les 2 minutes pendant 2h.

➤ Activité des glutathion-S-transférases

Cette catégorie d'enzyme est composée de plusieurs isoformes. Elles ont pour fonctionnement l'ajout d'une molécule de glutathion à la molécule à éliminer afin d'en faciliter son excréation. Il s'agit d'une réaction de conjugaison appartenant au mécanisme de métabolisation de phase 2. L'activité des GST permet également de réduire le potentiel oxydant d'un composé.

Le principe du dosage de l'activité des GST consiste à mettre en présence de l'enzyme du glutathion réduit (GSH) et du 1,2,4 chlorodinitrobenzène (CDNB).



L'activité enzymatique est suivie à 340nm pendant 1 minute avec une mesure toute les secondes.

➤ Catalase

La Catalase est une enzyme appartenant au système antioxydant, qui a pour fonction d'éliminer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) formé lors d'un stress (figure 9). Ainsi, l'activité de la Catalase se mesure grâce à la vitesse de disparition H₂O₂, par suivi cinétique à une longueur d'onde de 240 nm.



Le principe de dosage est simple, il consiste à suivre la dégradation de l'H₂O₂ à 240nm pendant 30s.

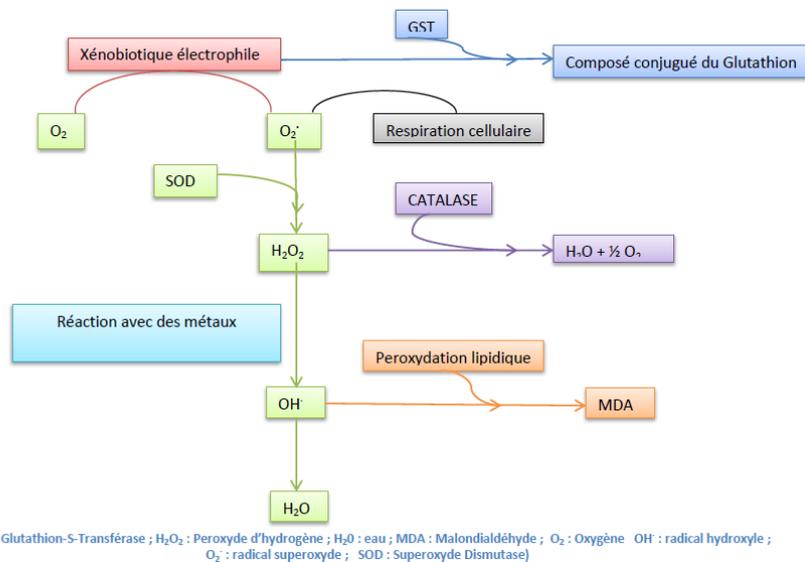


Figure 9 : Interaction entre les enzymes du système anti-oxydant.

➤ MDA : Malondialdéhyde

Il s'agit du produit terminal de la peroxydation des lipides insaturés membranaires causée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Il existe un niveau de base de MDA qui peut augmenter lorsque les systèmes de défenses antitoxiques sont dépassés par le stress oxydant. La quantification des teneurs en MDA dans les organismes permet de définir un état de stress des individus. Le MDA est qualifié de biomarqueur d'effet toxique.

La quantification du MDA est réalisée via le protocole proposé par Gerrard-Monnier *et al.*, 1998 utilisant le méthylphénylindole qui réagit spécifiquement avec le MDA. En condition acide et à chaud, une coloration bleu se développe proportionnellement à la quantité de MDA présente dans l'échantillon. L'absorbance des essais est lu à 586nm et la teneur est déterminée grâce à une droite d'étalonnage.



4. résultats

Le suivi de la mortalité des corbicules au cours de l'exposition donne un premier aperçu de la toxicité de l'effluent (figure 10).

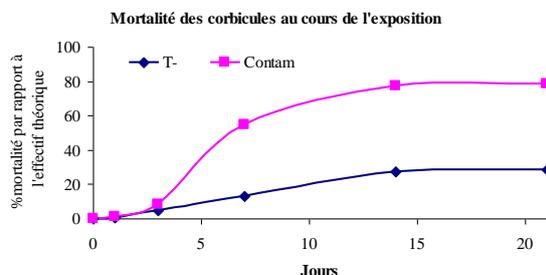


Figure 10 : Evolution du taux de mortalité en fonction du temps (% cumulé) de corbicules exposées aux effluents de sortie de STEP de l'hôpital spécialisé de Montpon.

Une forte mortalité est visible pour les lots exposés avec un taux de près de 80% de mortalité au bout de 15 jours. La mortalité dans le lot témoin ne dépasse pas les 25% pour la même période.

On observe une très forte augmentation de la mortalité entre 3 jours et 7 jours d'exposition suggérant la présence d'individus plus tolérants que d'autres au stress.

Ce résultat de mortalité peut être mis en relation avec les résultats obtenus concernant la teneur en protéines des organismes (figure 11).

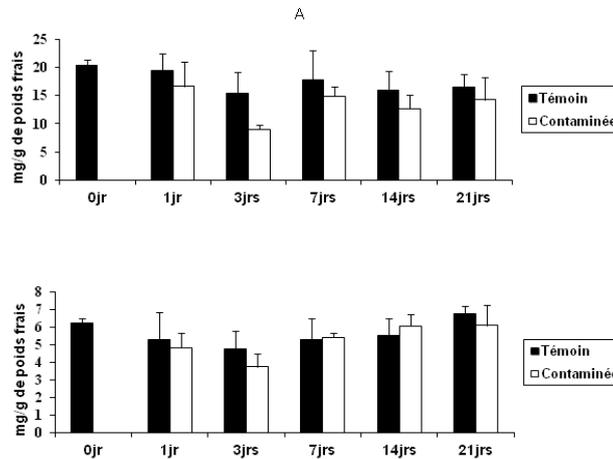


Figure 11 : Teneurs en protéines (mg/ g poids frais) dans les glandes digestives (A) et dans les branchies (B) de corbicules exposées aux effluents de la STEP de l'hôpital de Montpon.

La figure 11 présente la teneur en protéines en mg de protéines par g de poids frais de branchies ou de glandes digestives mesurées au début de l'exposition, après 1, 3, 7, 14 et 21 jours sur des lots témoin et contaminés.

Après 3 jours d'exposition, la teneur en protéines est diminuée de 50% dans la glande digestive et de près de 30% dans les branchies par rapport à T0.

Les résultats de mortalité mis en relation avec les résultats des teneurs en protéines nous montrent que le temps à 3 jours est un pallier critique pour les organismes, décisif pour leur survie. Avant 3 jours d'exposition, nous avons donc une population de corbicules avec un mélange d'organismes sensibles et tolérants et plus nous avançons dans le temps et plus les organismes sensibles disparaissent pour ne laisser place qu'à des organismes tolérants (figure 12).

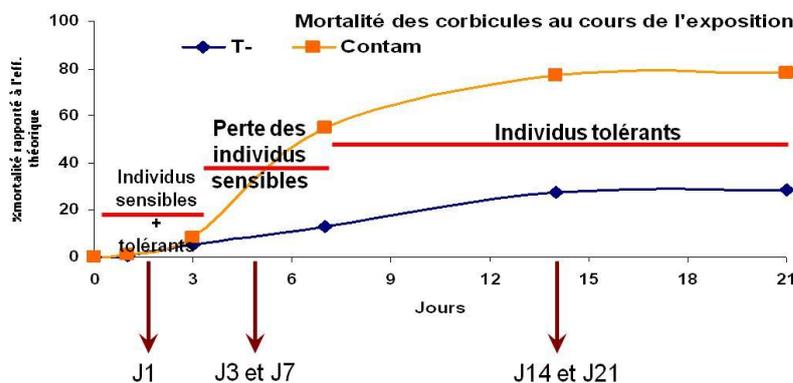


Figure 12 : Evolution de la population de corbicules au cours du temps d'exposition aux effluents de STEP.

Nous espérons ainsi, grâce à la protéomique, mettre en évidence des mécanismes de tolérance et des biomarqueurs pertinents dans ce contexte d'exposition à un effluent de station d'épuration de centre hospitalier.

Concernant les biomarqueurs, L'activité EROD a été mesurée dans les glandes digestives de corbicules non exposées et exposées aux effluents de sortie de STEP (figure 13).

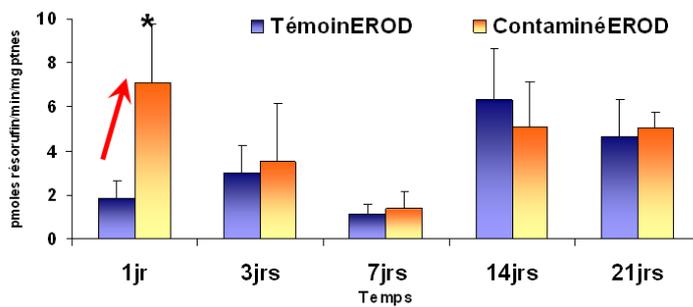


Figure 13 : Activité EROD (nmoles/min/mg prot) dans les glandes digestives de corbicules témoins et exposées aux effluents de l'hôpital de Montpon.

L'activité EROD est significativement plus importante dans les glandes digestives de corbicules exposées un jour aux effluents que chez les témoins. Il existe donc, dans cet effluent, des substances qui induisent une métabolisation de phase I au début de l'exposition. Ce système n'est plus activé différemment chez les corbicules exposées et chez les témoins à partir de 3 jours d'exposition.

L'activité catalase dans les branchies et glandes digestives des corbicules mettant en évidence une prise en charge des radicaux libres par le système anti-oxydant est présentée sur la figure 14.

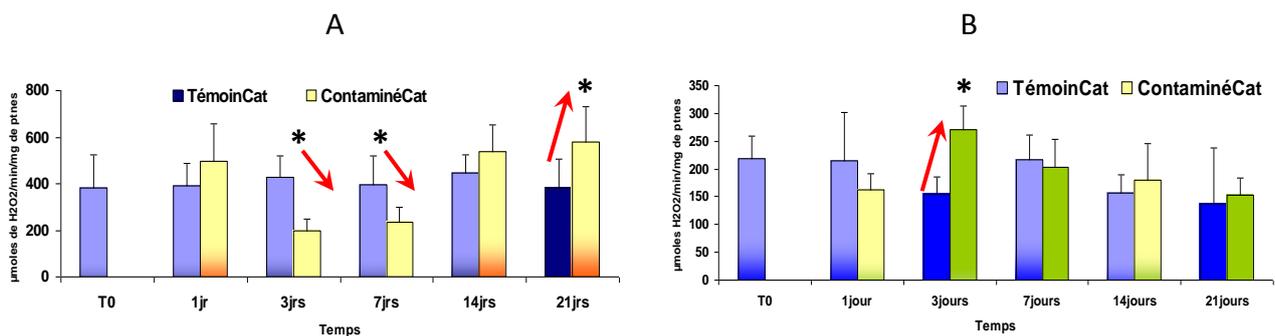


Figure 14 : Activité catalase dans la glande digestive (A) et dans les branchies (B) de corbicules exposées aux effluents de STEP de l'hôpital psychiatrique de Montpon (22).

La figure 15 présente l'évolution de l'activité des GST dans les branchies et glandes digestives des corbicules.

Les activités catalase et GST évoluent de la même manière au cours du temps. En effet, après 3 et 7 jours d'exposition aux effluents de STEP, une diminution significative de l'activité des deux enzymes (54% et 61% respectivement) est observée dans les glandes digestives. Par contre, après 21 jours d'exposition, dans les glandes digestives, l'activité enzymatique augmente significativement (52% et 77% respectivement) pour les Corbicules exposées à l'effluent. En ce qui concerne l'activité de ces deux enzymes dans les branchies, une différence significative est observée entre les corbicules témoins et exposées 3 jours à l'effluent de STEP.

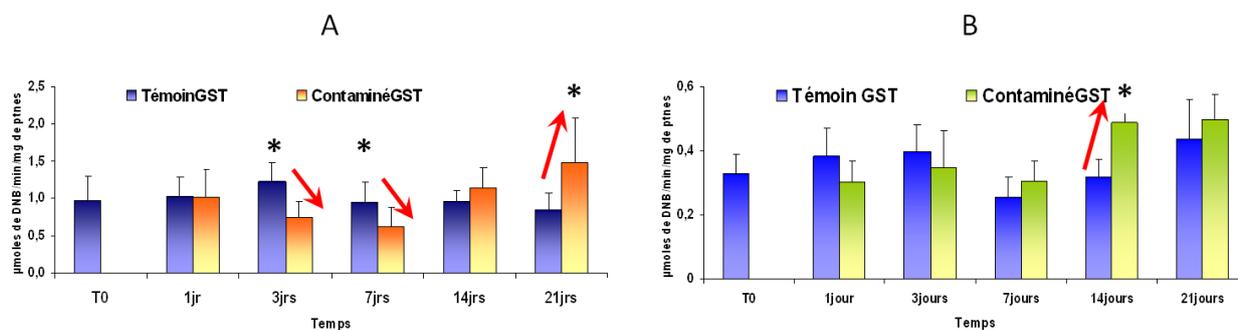


Figure 15 : Activité GST dans la glande digestive (A) et dans les branchies (B) de corbicules exposées aux effluents de STEP de l'hôpital psychiatrique de Montpon (22).

Enfin, la figure 16 présente les teneurs en MDA dans les branchies de corbicules exposées à l'effluent de la STEP de l'hôpital psychiatrique. Les résultats présentant les teneurs en MDA dans les glandes digestives n'ont pas permis de mettre en évidence l'existence d'une peroxydation lipidique dans cet organe. Le graphe n'a donc pas été présenté.

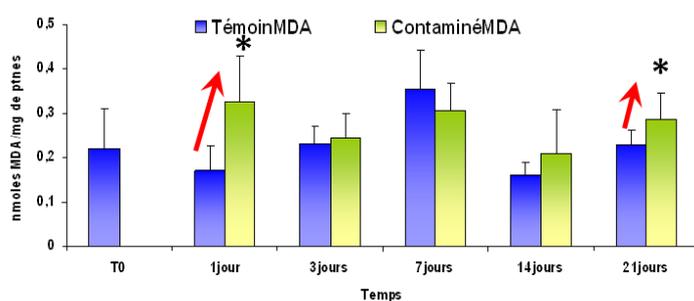


Figure 16 : Teneurs en MDA dans les branchies de corbicules exposées aux effluents de STEP de l'hôpital psychiatrique de Montpon (22).

Dans les branchies, l'effluent de la STEP de l'hôpital psychiatrique a provoqué la production de MDA après 1 jour d'exposition et après 21 jours d'exposition. Après 1 jour d'exposition, cette production met en évidence la présence d'un stress oxydant très rapide. Le mélange de population de corbicules sensibles et résistantes au début de l'expérience est peut-être à l'origine de cette observation. Les corbicules sensibles sont probablement très rapidement affectées par la toxicité de l'effluent et génèrent des radicaux libres provoquant la peroxydation lipidique. Après 21 jours, c'est une accumulation de radicaux libres au cours du temps qui ne sont plus pris en charge par le système antioxydant qui provoque le phénomène de peroxydation lipidique.

Le tableau 8 permet de synthétiser les résultats obtenus sur les corbicules.

Tableau 8 : récapitulatif des résultats de biomarqueurs dans les branchies et glandes digestives de corbicules exposées aux effluents de STEP de l'hôpital psychiatrique de Montpon (22).

Glandes Digestives					
Paramètres	J1	J3	J7	J14	J21
EROD	++	=	=	=	=
MDA	=	=	=	=	=
Catalase	=	--	--	=	++
GST	=	--	--	=	++
Branchies					
Paramètres	J1	J3	J7	J14	J21
MDA	++	=	=	=	+
Catalase	=	++	=	=	=
GST	=	=	=	+	=

L'ensemble des biomarqueurs utilisés permet de mettre en évidence une modification des activités métaboliques des mollusques exposée aux effluents de la STEP raccordée à l'hôpital psychiatrique de Montpon-Ménéstérol (Dordogne). Les activités EROD, GST et catalase permettent de montrer une activation ou une inhibition des systèmes enzymatiques de métabolisation ou de prise en charge des radicaux libres à un instant donné de l'exposition. Ponctuellement, les effluents impactent les différents systèmes enzymatiques. Cependant, ces systèmes enzymatiques répondent alternativement à l'entrée de xénobiotiques en fonction de la nature des xénobiotiques et de leur concentration. Dans notre étude, seul le MDA est un marqueur d'effet permettant de rendre compte de l'altération des membranes cellulaires par peroxydation lipidique. Or une augmentation de la présence de MDA après 21 jours d'exposition met en évidence un effet oxydatif et destructurant des membranes cellulaires provoqué par les composés de l'effluent de sortie de STEP. Un effet prolongé de stress oxydant et donc de destruction des membranes cellulaires peut provoquer, à terme, la mort de l'organisme.

Afin de cibler des effets potentiels des effluents sur ces mollusques, des analyses du protéome des corbicules ont été réalisées à des temps d'exposition correspondant à ceux utilisés pour les analyses de biomarqueurs. Ces analyses protéomiques ont été réalisées sur les branchies et sur les glandes digestives de corbicules témoins et exposées aux effluents. La figure 17 représente un profil protéomique des glandes digestives de corbicules correspondant à des migrations des protéines selon deux dimensions : en fonction du point isoélectrique et en fonction du poids moléculaire. Les différentes étiquettes apparaissant sur le gel représentent des protéines induites ou inhibées (avec un ratio significativement supérieur à 2) en présence de l'effluent (en comparaison avec les témoins). Les différentes couleurs d'étiquettes correspondent aux différents temps d'exposition. Globalement, aucune protéine, dans les glandes digestives, n'est activée ou inhibée par l'effluent à tous les temps d'exposition. Autrement dit, les différents systèmes enzymatiques sont tour à tour mobilisés sans que nous puissions cibler une protéine dont l'activité serait modifiée dès le début de l'exposition et sur toute la durée de celle-ci.

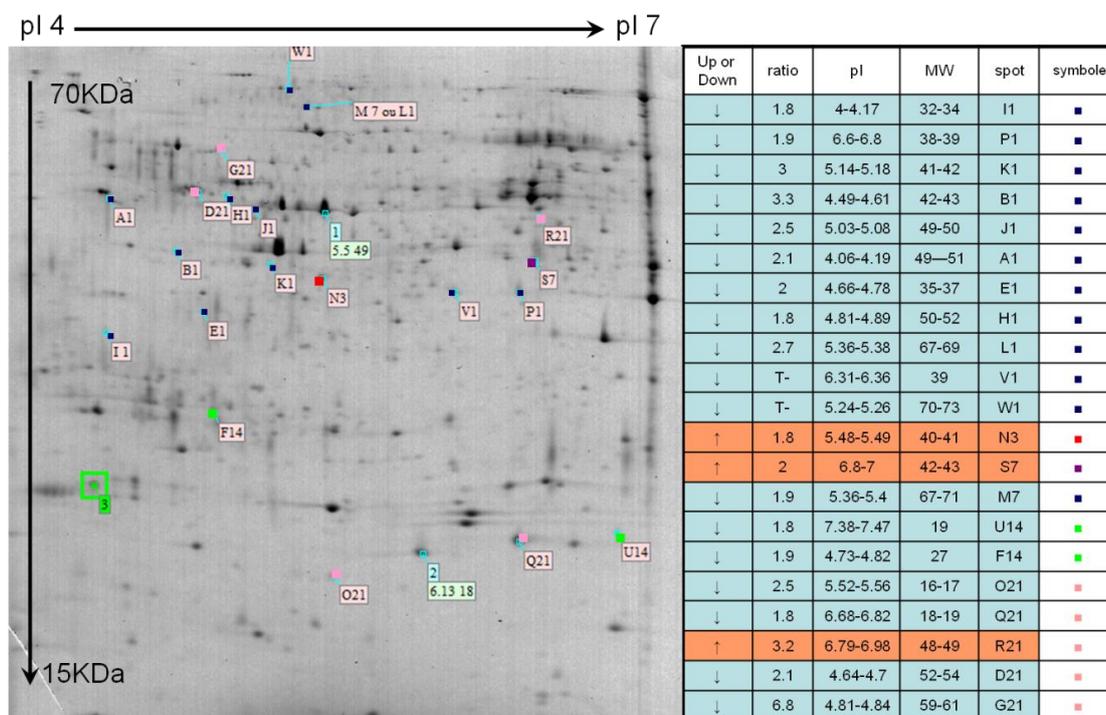


Figure 17 : Profil protéomique des glandes digestives de corbicules exposées à l'effluent de la STEP de l'hôpital psychiatrique de Montpon-Ménéstérol.

En conclusion, les différents systèmes enzymatiques des individus sont tour à tour mobilisés pour répondre à une modification du milieu intracellulaire. Chaque système est activé en réponse à l'activation du système précédent ayant produit un élément nécessitant une prise en charge. Il est donc très difficile de cibler un biomarqueur pour une analyse multi-doses et multi-temporalités mais il est nécessaire de cibler plusieurs protéines rendant compte de l'évolution du fonctionnement des différents systèmes enzymatiques et si possible d'identifier les protéines « atteintes » en fin de cascades enzymatiques qui pourraient éventuellement être à l'origine d'effets délétères pour l'organisme. Le séquençage des protéines inhibées ou surexprimées n'a permis d'identifier que 9 protéines. La quasi-totalité des protéines identifiées ont été inhibées en présence de l'effluent. Toutes ont des fonctions dans la structure des tissus ou dans le fonctionnement cellulaire ou dans le métabolisme cellulaire et la production d'énergie (figure 18). Seule l'alcool deshydrogénase est activée après 7 jours d'exposition aux effluents.

	exp pl	exp MW	Identification	Induction in exposed organism		
J1	A	4,13 0,05	50,00 1,00	Calreticuline	↓	Protéines de structure
	B	4,56 0,05	43,20 0,84	ND	↓	
	E	4,72 0,05	36,20 0,84	ND	↓	Protéines du fonctionnement cellulaire
	H	4,86 0,03	51,00 0,71	beta tubuline	↓	
	I	4,12 0,07	33,17 0,75	P17917 proteine proliferation cellulaire	↓	
	J	5,05 0,02	49,40 0,55	Aldehyde deshydrogenase 2 mitochondriale	↓	
	K	5,16 0,02	41,80 0,45	Actine	↓	Protéines du métabolisme cellulaire et production d'énergie
	L	5,38 0,01	68,00 0,71	ND	↓	
	P	6,50 0,01	38,71 0,49	ND	↓	
	v	6,26 0,01	39,00 0,00	ND	↓	
	w	5,26 0,01	71,75 1,26	Aconitate hydratase	↓	
	J3	N	5,49 0,00	40,63 0,52	ND	
	J7	M	5,53 0,39	66,22 9,15	ND	↓
		S	6,56 0,02	42,50 0,58	Alcool deshydrogénase	↑
J14	C	4,60 0,03	49,50 0,53	ND	↓	
	F	4,78 0,03	27,00 0,00	ND	↓	
	U	6,87 0,01	19,00 0,00	endo-1,4-beta-glucanase	↓	
J21	D	4,69 0,04	52,33 0,52	beta tubuline	↓	

Figure 18 : Identification des protéines inhibées ou surexprimées après exposition aux effluents de la STEP de l'hôpital de Montpon. J1, J3, J7, J14, J21 : nombre de jours d'exposition aux effluents.

D. Tâche 4 : Evaluation des effets de l'effluent de la STEP sur des organismes clés des réseaux trophiques par l'utilisation de biotests.

1. Les tests normalisés

Il existe de très nombreux tests normalisés pour évaluer les effets de composés divers et variés sur les milieux aquatiques.

Les tests choisis répondent à un besoin de représenter différents niveaux trophiques.

Nous avons ainsi les **producteurs primaires** représentés par le test algues utilisant *Selenastrum capricornutum*, les **consommateurs** représentés par les rotifères *Brachionus calyciflorus*, les crustacés *Daphnia magna* et *cerodaphnia dubia* et les bactéries *Vibrio fisheri* et enfin les **décomposeurs** représentés par les protozoaires *Tetrahymena thermophila*.

Tous les tests ont été réalisés avec des effluents prélevés lors de la campagne de prélèvements d'octobre 2011.

a) Le test algues

Le test d'inhibition de croissance à 72h de l'algue verte *Selenastrum capricornutum* est un test normalisé commercialisé par R-Biopharm (Algaltoxkit F™ (1996)). Ce test consiste à évaluer l'inhibition de la croissance de l'algue en présence de contaminants.

La concentration en algues au début de l'expérience est de 10^4 cellules/ml. Ont été analysés, les eaux en amont de la station d'épuration (diluées au 1/10, 1/25, 1/50, 1/100), L'effluent en sortie de STEP (pur et au 1/2) et les eaux de la rivière au niveau du rejet.

Le test est réalisé sur 72h à 23 degrés avec une illumination homogène et constante de 8000 lux.

Les résultats de croissance algale dans les différentes conditions sont présentés sur la figure 19.

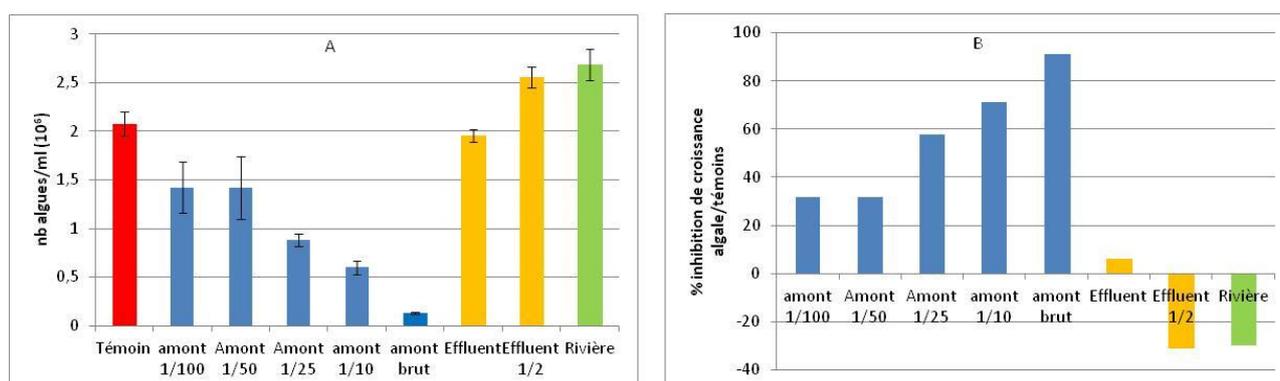


Figure 19 : Nombre de cellules algales (10^6)/ml chez les témoins, en amont de la STEP à différentes concentrations, dans les effluents de sortie de STEP et dans les eaux de la rivière l'Isle au niveau du rejet (A). % d'inhibition de croissance des algues dans les différentes conditions pré-citées par rapport aux témoins (B).

Les eaux brutes avant passage en STEP sont très toxiques pour les algues vertes *Selenastrum capricornutum*. Les effluents bruts sont très peu toxiques et les effluents dilués activent la croissance algale. Il doit donc y avoir dans les effluent des éléments qui en faible quantité (dilution au 1/2) favorisent le développement des algues. De la même manière, les eaux de la rivière, au niveau du rejet, favorisent la croissance algale. Là-aussi, il existe très certainement des éléments dans les eaux de la rivière favorisant le développement des algues.

b) Le test daphnies

Le test d'immobilisation des daphnies *Daphnia magna* après 24h et 48h d'exposition est un test normalisé commercialisé par R-Biopharm (Daphtoxkit F™, 1996). Ce test consiste à évaluer l'immobilisation des daphnies en présence de contaminants.

Ce test est réalisé avec des daphnies néonates (âgées de moins de 24h). Vingt daphnies sont réparties dans 4 puits (4 réplicats). Ont été analysés, les eaux en amont de la station d'épuration (diluées au 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100), L'effluent en sortie de STEP (pur et au 1/2) et les eaux de la rivière au niveau du rejet. Les daphnies sont exposées pendant 24h et 48h aux différentes eaux à 20 degrés et à l'obscurité.

Les résultats d'immobilisation des daphnies dans les différentes conditions sont présentés sur la figure 20.

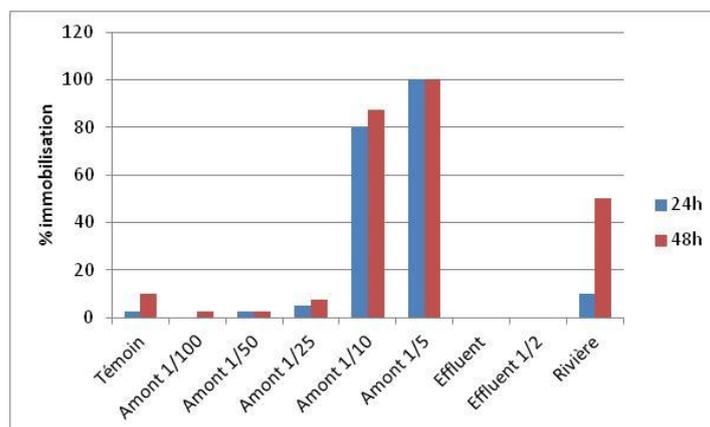


Figure 20 : % d'immobilisation des daphnies après 24h et 48h d'incubation en milieu de culture (témoins), en présence d'eau en amont de la STEP à différentes concentrations, en présence des effluents de sortie de STEP et dans les eaux de la rivière l'Isle au niveau du rejet.

Les eaux brutes avant passage en STEP sont très toxiques pour les daphnies. Par contre, les effluents de sortie de STEP ne présentent pas de toxicité pour les daphnies. A l'inverse, l'eau de la rivière, au niveau du rejet est toxique pour 40% de la population de daphnies étudiée.

c) Le test cériodaphnies

Le test de mortalité des cériodaphnies *Ceriodaphnia dubia* après 24h d'exposition est un test normalisé commercialisé par R-Biopharm (Ceriodaphtoxkit F™). Ce test consiste à évaluer la mortalité des cériodaphnies en présence de contaminants.

Ce test est réalisé avec des cériodaphnies neonates (âgées de moins de 24h). Trente cériodaphnies sont réparties dans 3 puits (triplicats). Ont été analysés, les eaux en amont de la station d'épuration (diluées au 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100), L'effluent en sortie de STEP (pur et au 1/2) et les eaux de la rivière au niveau du rejet. Les cériodaphnies sont exposées pendant 24h aux différentes eaux à 25 degrés et à l'obscurité.

Les résultats de mortalité des cériodaphnies dans les différentes conditions sont présentés sur la figure 21.

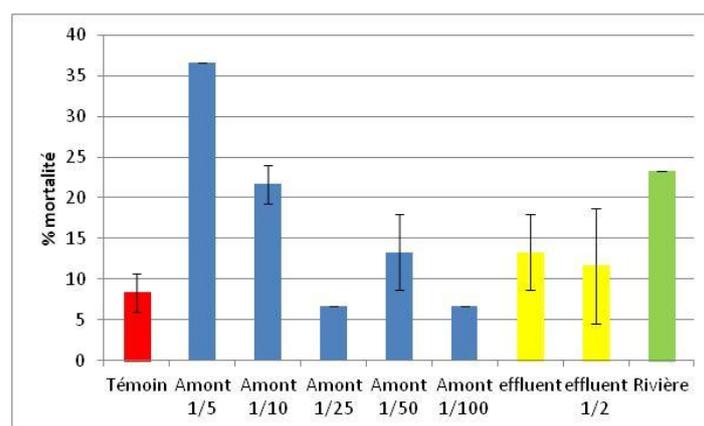


Figure 21 : % de mortalité des cériodaphnies après 24h d'incubation en milieu de culture (témoins), en présence d'eau en amont de la STEP à différentes concentrations, en présence des effluents de sortie de STEP et dans les eaux de la rivière l'Isle au niveau du rejet.

Les eaux brutes avant passage en STEP sont très toxiques pour les cériodaphnies. Les effluents de sortie de STEP comme les eaux de rivière au niveau du rejet sont également toxiques pour ce crustacé.

d) Le test rotifères

Le test d'inhibition de la reproduction des rotifères *Brachionus calyciflorus* après 48h d'exposition est un test normalisé commercialisé par R-Biopharm (Rotoxkit chronic FTM). Ce test consiste à évaluer la capacité de reproduction des rotifères en présence de contaminants.

Ce test est réalisé avec des rotifères neonates (âgées de moins de 20h). Un rotifère est placé dans un puits avec l'échantillon à analyser. Cette condition est répliquée 8 fois et constitue un test. Le test est réalisé en duplicat. Les eaux en amont de la station d'épuration (diluées au 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100), L'effluent en sortie de STEP (pur et au 1/2) et les eaux de la rivière au niveau du rejet ont été testés. Les rotifères sont exposés pendant 48h aux différentes eaux à 25 degrés et à l'obscurité.

Les résultats d'inhibition de la reproduction des rotifères dans les différentes conditions sont présentés sur la figure 22.

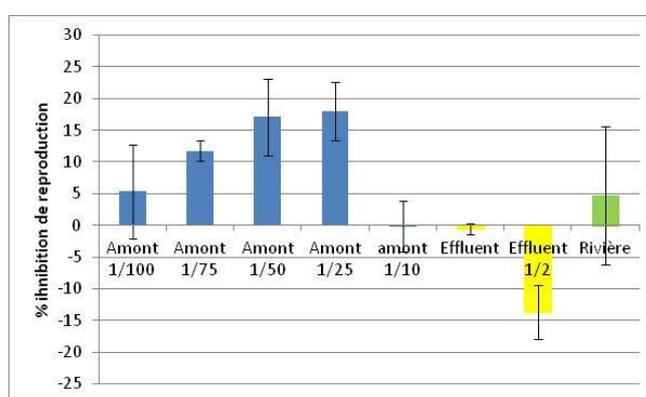


Figure 22 : % d'inhibition de la reproduction de rotifères après 48h d'incubation en milieu de culture (témoins), en présence d'eau en amont de la STEP à différentes concentrations, en présence des effluents de sortie de STEP et dans les eaux de la rivière l'Isle au niveau du rejet.

Concernant les effluents de sortie de STEP, le test utilisant les rotifères fournit le même type de résultats que le test algues à savoir pas d'effet en présence d'effluent brut et une capacité accrue à se reproduire pour les rotifères exposés aux effluents dilués au 1/2. Concernant les eaux de rivière au niveau du rejet des effluents de la STEP, les résultats mettent en évidence une très faible toxicité qui s'approchent des résultats obtenus avec les daphnies exposées 24h.

e) Le test protozoaires

Le test d'inhibition de croissance d'une population de protozoaires *Tetrahymena thermophila* est un test normalisé commercialisé par R-Biopharm (Protoxkit FTM). Ce test consiste à évaluer en 24h l'inhibition de prolifération des protozoaires en présence de contaminants.

Les eaux en amont de la station d'épuration (diluées au 1/5, 1/10, 1/25, 1/50, 1/100), L'effluent en sortie de STEP (pur et au 1/2) et les eaux de la rivière au niveau du rejet ont été testés.

Les résultats d'inhibition de croissance de la population de protozoaires sont présentés sur la figure 23.

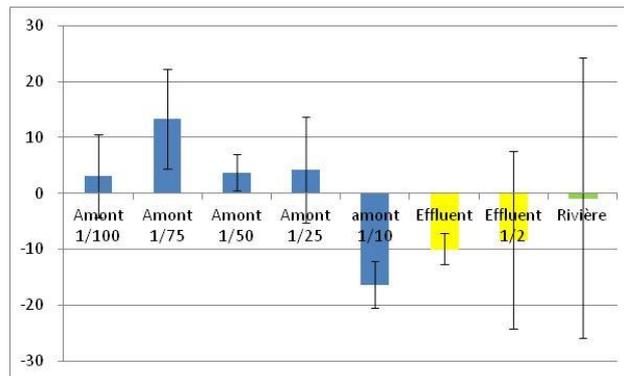


Figure 23 : % d'inhibition de croissance de la population de protozoaires après 24h d'exposition, en présence d'eau en amont de la STEP à différentes concentrations, en présence des effluents de sortie de STEP et dans les eaux de la rivière l'Isle au niveau du rejet.

Concernant les effluents de sortie de STEP, le test utilisant les protozoaires met en évidence une capacité accrue à se multiplier en présence des effluents de la STEP. Les résultats obtenus avec les eaux en amont de la STEP sont peu concluants. Dans tous les cas, les écart-types obtenus sont représentatifs d'une très forte variabilité analytique.

f) Le test microtox

Le test d'inhibition de bioluminescence émise par les bactéries *Vibrio fischeri* est un test normalisé commercialisé par R-Biopharm (AFNOR T 90-320 et ISO 11348). Ce test consiste à évaluer l'inhibition de la production de luminescence par les bactéries en présence de contaminants grâce à un luminomètre.

Les eaux en amont de la station d'épuration (brutes et diluées au 1/2, 1/5, 1/10, 1/25), L'effluent en sortie de STEP (pur et au 1/2) et les eaux de la rivière au niveau du rejet ont été analysés.

Les bactéries sont exposées pendant 5 minutes et 15 minutes aux différents échantillons à 15 degrés.

Les résultats d'inhibition de bioluminescence dans les différentes conditions sont présentés sur la figure 24.

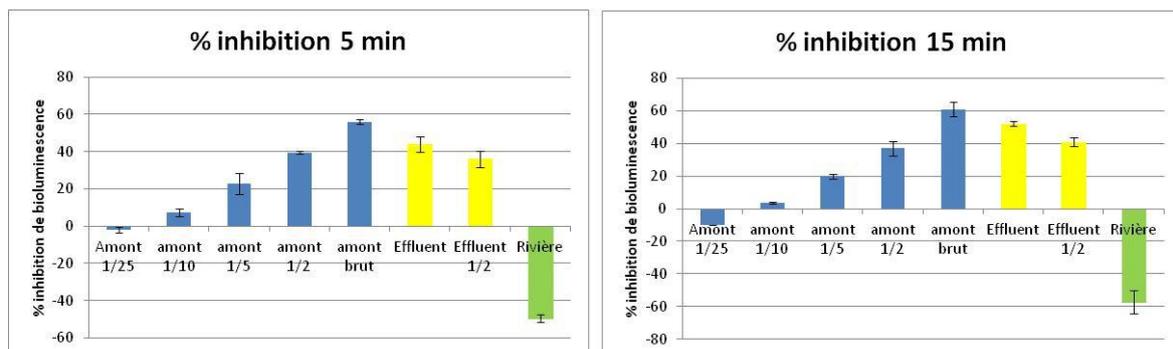


Figure 24 : % d'inhibition de bioluminescence produite par *Vibrio fischeri* après 5 minutes et 15 minutes d'exposition en présence d'eau en amont de la STEP à différentes concentrations, en présence des effluents de sortie de STEP et dans les eaux de la rivière l'Isle au niveau du rejet.

Contrairement aux autres tests utilisés, les effluents de sortie de STEP perturbent la production de luminescence par les bactéries *Vibrio fischeri*. Ils apparaissent toxiques pour les bactéries en perturbant la respiration cellulaire et notamment la production d'ATP nécessaire à la réaction à l'origine de la production de luminescence.

Comme pour le test algues, ce test met en évidence une stimulation de la production de luminescence en présence de l'eau de la rivière. Il y a donc, au niveau du rejet de l'effluent dans la rivière, des éléments favorisant la respiration cellulaire et donc la production de luminescence.

Algues et bactéries semblent mettre en évidence l'existence d'un phénomène d'hormèse en présence d'eau de rivière au niveau du rejet de la STEP.

En conclusion, les tests normalisés mettent tous en évidence un abattement de toxicité entre les eaux avant passage en station d'épuration et les effluents de sortie de STEP. Cependant, la quasi-totalité des tests mettent également en évidence une toxicité des effluents de la STEP qui se manifestent soit par une perte d'activité ou une mortalité accrue soit au contraire par un phénomène d'hormèse (augmentation de la croissance par exemple). Le même phénomène est observé pour les eaux de rivière prélevées au niveau du rejet.

2. Les tests non normalisés

a) *Le test sur embryons de mollusques : Radix auricularia*

Radix auricularia est un mollusque gastéropode pulmoné de la famille des Lymnaeidae.

Le test a débuté trois jours après l'ovoposition, au stade de la larve trocophore. Ce stade a été choisi afin d'avoir des stades de développement moins fragiles que dans les premières heures de développement facilitant la séparation des œufs et l'individualisation dans des puits de microplaques de 96 puits. Chaque œuf est déposé dans un puits avec 300 µl d'effluent de la STEP plus ou moins dilué avec l'eau de stabulation des mollusques ou 300 µl d'eau de la rivière au point de rejet de la STEP. Les dilutions d'effluents choisies sont : Effluent pur, effluent dilué au 1/2, effluent dilué au 1/5, effluent dilué au 1/10, effluent dilué au 1/20 et effluent dilué au 1/50.

Les plaques de 96 puits sont ensuite déposées dans un incubateur où la température est maintenue à 23 degrés et la photopériode de 12h/12h.

Le développement de *Radix auricularia* s'effectue sur 11 jours à 23 degrés (témoins) (photo 8). Après 3 jours, le stade de la larve trocophore est atteint (photos A et B). 30h après, le stade véligère est atteint (photos C à E). Après 6 jours de développement, nous pouvons observer les yeux pigmentés à la base des tentacules et nous pouvons aisément observer les battements du cœur. Le pied et la coquille sont formés. Ce stade évolue pendant encore 5 jours où la larve grossit, la coquille et le pied sont de plus en plus volumineux. Après 11 jours d'incubation, le jeune gastéropode sort de l'œuf (photo F).

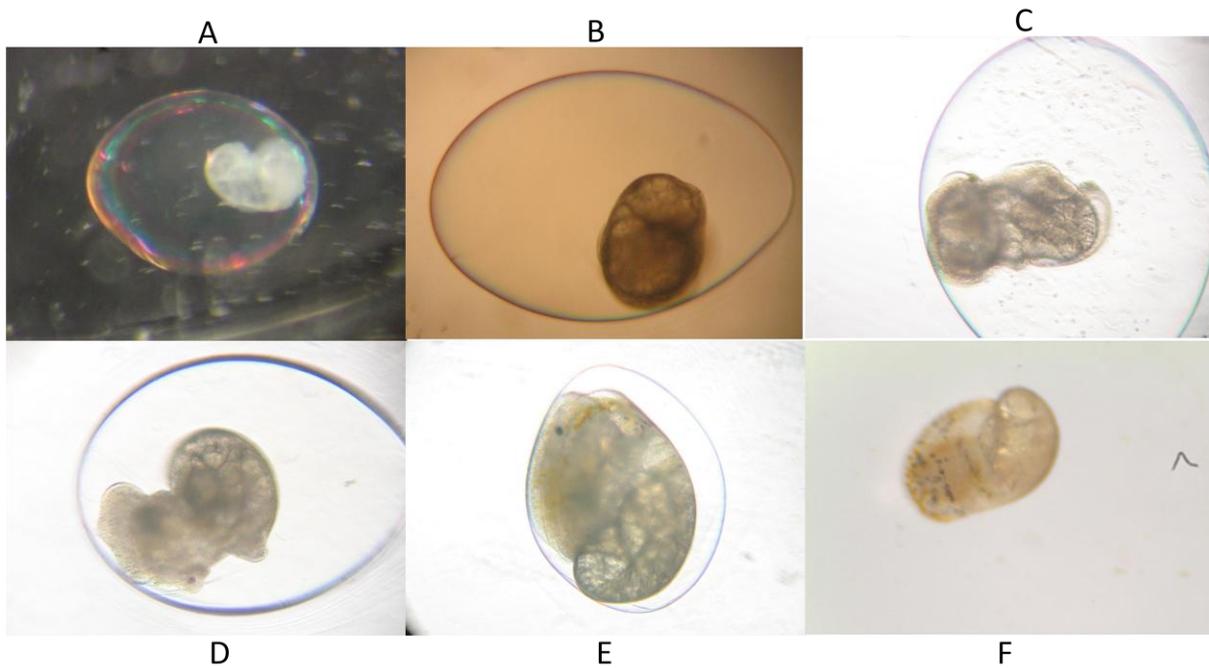


Photo 8 : Développement du mollusque gastéropode *Radix auricularia*.

Les résultats concernant le développement de *Radix auricularia* en présence d'effluents sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9 : Comparaison de l'évolution du développement de l'œuf de *Radix auricularia* en présence des effluents de sortie de STEP à différentes concentrations ou en présence d'eau de la rivière au niveau du rejet.

	30h d'exposition	5 jours d'exposition	6 jours d'exposition	7 jours d'exposition
Témoins	Coquille, pied bien visibles, cœur qui bat	93% d'éclosion parmi les mollusques ayant connu un développement normal	100% d'éclosion	
Effluent pur	Pas de pied, ébauche de la glande coquillère, pas de cœur pour 100% des œufs	0% d'éclosion	0% d'éclosion	53% d'éclosion parmi les mollusques ayant connu un développement normal
Effluent 1/2	40% développement identique aux témoins. 60% identique à l'effluent	8% d'éclosion parmi les mollusques ayant connu un développement normal	100% d'éclosion	
Effluent 1/5	90% développement identique aux témoins.	37% d'éclosion parmi les mollusques ayant connu un développement normal	95% d'éclosion	
Effluent 1/10	Développement identique aux témoins	70% d'éclosion parmi les mollusques ayant connu un développement normal	100% d'éclosion	
Effluent 1/20	Développement identique aux témoins	60% d'éclosion parmi les mollusques ayant connu un développement normal	90% d'éclosion	

Effluent 1/50	Développement identique aux témoins.	85% d'éclosion parmi les mollusques ayant connu un développement normal	95% d'éclosion	
Rivière au rejet	Développement identique aux témoins	81% d'éclosion parmi les mollusques ayant connu un développement normal	100% d'éclosion	

Les effluents de la STEP raccordée à l'hôpital spécialisé de Montpon provoquent donc un retard de développement du mollusque gastéropode *Radix auricularia*.

b) Le test sur Aselles : *Asellus aquaticus*

Les aselles ont été prélevées dans le Causse (affluent du Tarn, 81) et mises en stabulation en eau déchlorée et oxygénée pendant une semaine à 14°C avec une photopériode de 12h de jour et 12h de nuit. Des feuilles d'érable sont déposées dans les aquariums afin de nourrir les aselles.

Deux paramètres ont été analysés : la mortalité et la capacité à se déplacer.

Les aselles ont été placées individuellement dans des puits de 10 ml en présence de l'effluent brut, dilué au 1/2, au 1/5 et au 1/10 ou en présence de l'eau de la rivière au niveau du rejet pendant 7 jours.

La mortalité a été relevée quotidiennement et un pourcentage cumulé de mortalité a été calculé (figure 25).

Concernant le test évaluant le comportement des aselles, il a été réalisé après 7 jours d'exposition à l'effluent plus ou moins dilué ou à l'eau de la rivière. A l'état naturel, les aselles fuient la lumière. Ce comportement naturel est testé en présence d'aselles contaminées afin de voir si le comportement est modifié. Les aselles sont ainsi placées l'une après l'autre au centre d'un aquarium en plexiglass de 50 cm de long et 5 cm de large avec 3 cm d'eau non contaminée. Cet aquarium est éclairé à une extrémité. Nous observons le déplacement pendant 30 secondes.

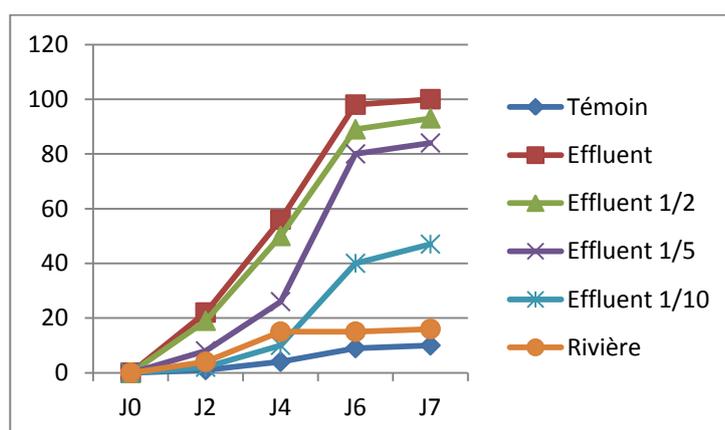


Figure 25 : Mortalité cumulée au cours du temps pour des aselles exposées à l'effluent brut, dilué au 1/2, au 1/5, ou au 1/10 ou exposées aux eaux de rivière en sortie de STEP.

L'effluent de sortie de STEP est toxique pour les aselles. Après 7 jours d'exposition, aucune aselle n'a survécu.

La figure 26 présente la capacité de déplacement des aselles en fonction de l'exposition aux effluents ou aux eaux de la rivière.

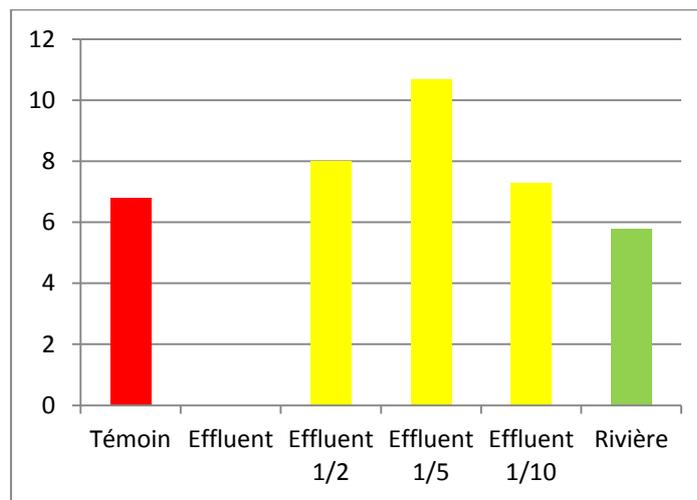


Figure 26 : Distance (cm) parcourue par les aselles témoins ou contaminées par les effluents dilués ou les eaux de rivière en 30 secondes et après 7 jours d'exposition.

Seul l'effluent dilué au 1/5 stimule le déplacement des aselles après 7 jours d'exposition sachant qu'il ne restait que 16% d'aselles vivantes. Ces aselles étaient donc probablement les plus résistantes.

c) Le test sur planaires : *Schmidtea polychroa*

Les planaires ont été prélevées dans le Causse (affluent du Tarn, 81) et mises en stabulation en eau déchlorée et oxygénée pendant une semaine à 14°C avec une photopériode de 12h de jour et 12h de nuit. Les planaires du genre *Schmidtea* se nourrissent de détritus, péryphyton voire invertébrés vivants ou morts. Nous avons donc placés dans chaque aquarium de stabulation des pierres recouvertes de péryphyton de telle sorte que le biofilm associé à ces pierres apporte les ressources nécessaires à la nutrition des individus.

quatre paramètres ont été analysés : la mortalité, la capacité à se reproduire, la capacité à se déplacer et la capacité de régénération.

Pour évaluer la capacité à se reproduire, 40 planaires ont été placées dans un bécquet avec 800ml d'effluent ou 800ml d'eau déchlorée. Le milieu est renouvelé toutes les semaines et l'expérience dure 5 semaines. Tous les trois jours, les planaires sont nourries avec deux mollusques ancyliidés. Pour les trois autres paramètres, les planaires ont été placées individuellement dans des puits de 10 ml en présence de l'effluent brut, dilué au 1/2, au 1/5 et au 1/10 ou en présence de l'eau de la rivière au niveau du rejet pendant 7 jours.

Aucune mortalité n'a été observée chez les témoins comme chez les contaminés.

Concernant la capacité à se reproduire, l'effluent a totalement inhibé la reproduction des planaires (figure 27)

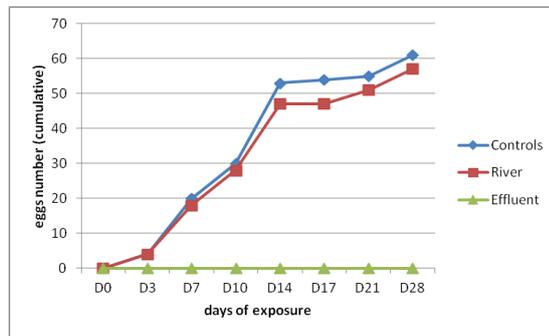


Figure 27 : nombre d’œufs cumulés pondus par les planaires pendant 28 jours d’expérience en présence d’eau de rivière (l’Isle) ou d’effluents de la station de Montpon.

Concernant le test évaluant le déplacement des planaires, il a été réalisé après 3 jours, 7 jours et 10 jours d’exposition à l’effluent plus ou moins dilué ou à l’eau de la rivière. Tour à tour, les planaires ont été placées au centre d’une boîte de pétri contenant de l’eau de stabulation. Leur déplacement a été noté sur une minute (figure 28) et la distance parcourue a été mesurée.



Figure 28 : Trajectoire des planaires suivie sur une minute.

Le test de régénération repose sur la capacité des planaires à retrouver leur intégrité. Comme Calevro et al., (1998), les planaires ont été sectionnées en deux entre les auricules et le pharynx. Ce test comporte deux parties :

- La première consiste à mesurer la longueur des parties sectionnées des planaires à J0, à J7 et à la fin de l’expérimentation. Toutes les planaires ont été mesurées en état de contraction maximale (pression sur la tête des planaires).
- La seconde vise à estimer le stade de régénération auquel sont les planaires en fin d’exposition. 4 stades de régénération ont été défini en fonction de l’avancement de la régénération (figure 29). Ces stades ne concernent que les parties postérieures régénérées qui permettent de mettre en évidence la réapparition des yeux.

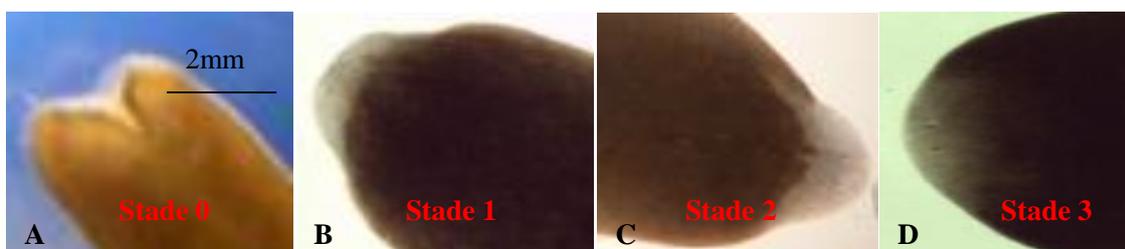


Figure 29 : Les différents stades de régénérations observés : A-Stade 0 : cicatrisation ; B-Stade 1 : apparition du blastème ; C-Stade 2 : apparition des yeux ; D-Stade 3 : yeux cerclés de blanc.

Les résultats concernant l’effet de l’exposition aux effluents sur le déplacement des planaires sont présentés sur la figure 30.

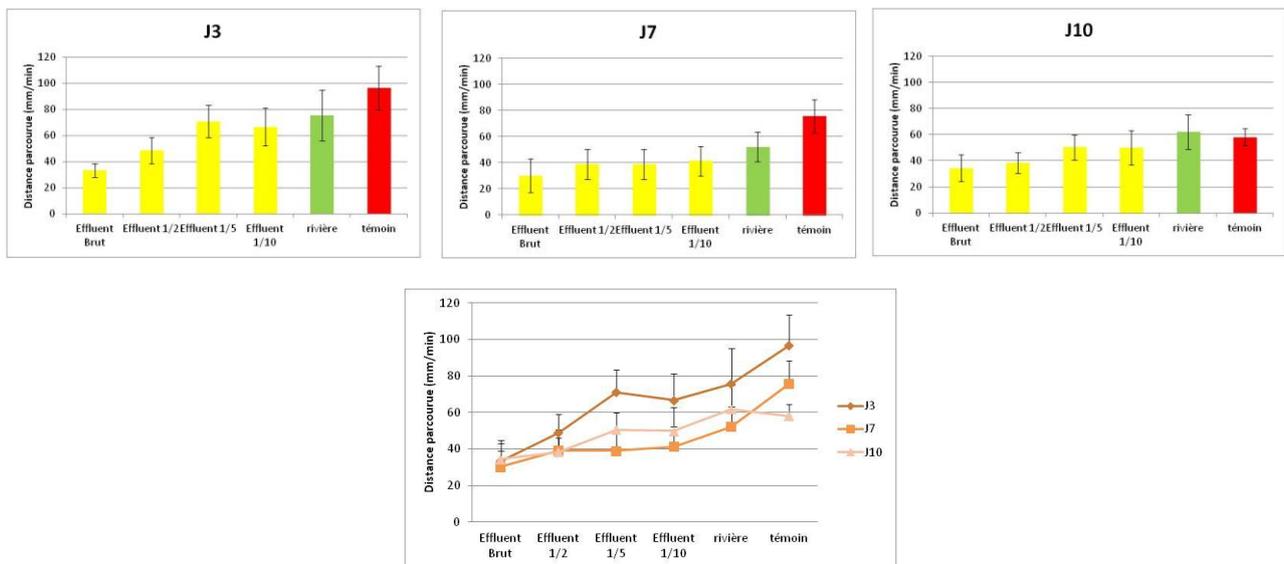


Figure 30 : Distance parcourue par les planaires témoins ou exposées aux eaux de rivière ou aux effluents de sortie de STEP bruts ou dilués au 1/2, au 1/5 ou au 1/10.

Ces résultats mettent en évidence que quelle que soit la durée d'exposition, les planaires parcourent moins de distance en présence des effluents qu'en présence d'eau de stabulation. Les effluents ont donc un impact sur la capacité à se déplacer pour les planaires.

Après 3 ou 7 jours d'exposition aux eaux de rivière au niveau du rejet de la STEP, les planaires présentent également une capacité moindre à se déplacer. Les distances parcourues sont significativement plus faibles pour les planaires exposées que pour les planaires témoins.

Concernant la capacité de régénération des planaires, la figure 31 présente l'évolution des longueurs des parties sectionnées chez les témoins et chez les planaires exposées.

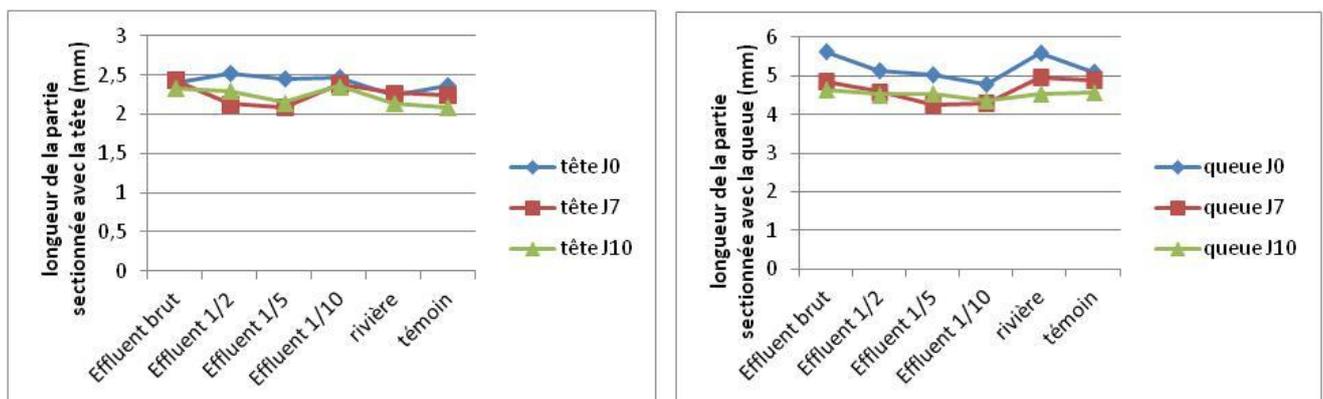


Figure 31 : Evolution de la longueur (mm) des parties sectionnées des planaires exposées à différentes concentrations d'effluent de sortie de STEP au cours du temps (J0, J3 et J7), aux eaux de rivière au niveau du rejet. Comparaison avec les témoins en eau de stabulation.

Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les longueurs des parties sectionnées chez les planaires témoins ou exposées aux différents effluents.

En conclusion, les biotests utilisés mettent tous en évidence une toxicité des effluents de la STEP qui se manifestent soit par une mortalité, soit par une modification comportementale soit par une perturbation du développement. Par contre, l'eau de la rivière n'a eu aucun effet sur les différents organismes étudiés.

E. Tâche 5 : Comment la société prend en compte la problématique des rejets de résidus médicamenteux en milieu aquatique ?

Cette partie a été coordonnée par Frédérique Blot (MCF en géographie, GEODE). Le travail de terrain a été effectué dans le cadre de l'atelier de la promotion 2011-2012 du master 2 Gestion de l'Environnement et Valorisation Territoriale (GSE-VRT) de l'Université d'Albi. Figurent dans ce qui suit les premiers éléments de réflexion et d'analyse développés dans le cadre du programme PSYCHEAU.

1. La pollution, une problématique relationnelle ?

Nous sommes interrogés sur la construction sociale d'un risque associée à la ***mise en évidence d'une pollution***, par les scientifiques, tant d'un point de vue environnemental que de santé publique – ici la mise en évidence de la présence de résidus médicamenteux dans les milieux aquatiques et d'une partie de leurs impacts étudiés dans le cadre des tâches 1 à 4. La question de la construction de la pollution médicamenteuse conduit à s'interroger de manière plus globale sur les relations entre la production de connaissances scientifiques et la nature des rapports à l'espace - en l'occurrence les milieux aquatiques - entretenus par la société.

Cette tâche requiert une approche constructiviste, puisque nous nous interrogeons sur la dynamique des relations sociétés/milieux aquatiques à travers la manière dont se construit la notion de pollution au sein de la société. Cette approche va ainsi nous permettre de questionner les représentations, mais également de mieux cerner les processus de régulation sociale, ainsi que le jeu entre les rationalités individuelles et institutionnelles qui entrent en jeu dans les relations sociétés/milieux. Dans ce cadre nous nous attacherons au sens des mots donnés par les acteurs rencontrés car ceux-ci rendent tout particulièrement compte des relations sociétés/milieux.

Le schéma présenté ci-dessous (figure 32) illustre les relations société/milieux aquatiques, en particulier au regard des pratiques et représentations autour du médicament. Ainsi, les groupes d'acteurs clé relatifs (médecins, institutions, industries, etc.) ont été identifiés. Ceux-ci agissent directement sur les milieux aquatiques par leurs nombreuses activités, toutes déterminées par les représentations sociales qui leur sont propres. L'autoarticulation permanente entre ces dernières et les pratiques se fait par l'intermédiaire des logiques rationnelles des acteurs. La rationalité est associée à la notion de validité. Elle caractérise une attitude particulière des sujets parlant et agissant à l'égard des énoncés et des actions qui sont évalués en fonction des ordres de réalité auxquels ils se rapportent. Autrement dit, l'étude des logiques rationnelles permet d'explicitier pourquoi un acteur agit de tel ou tel manière au regard de ses activités. Par ailleurs, des processus de régulation sociale vont assurer des ajustements entre les différents systèmes de représentations et de pratiques.

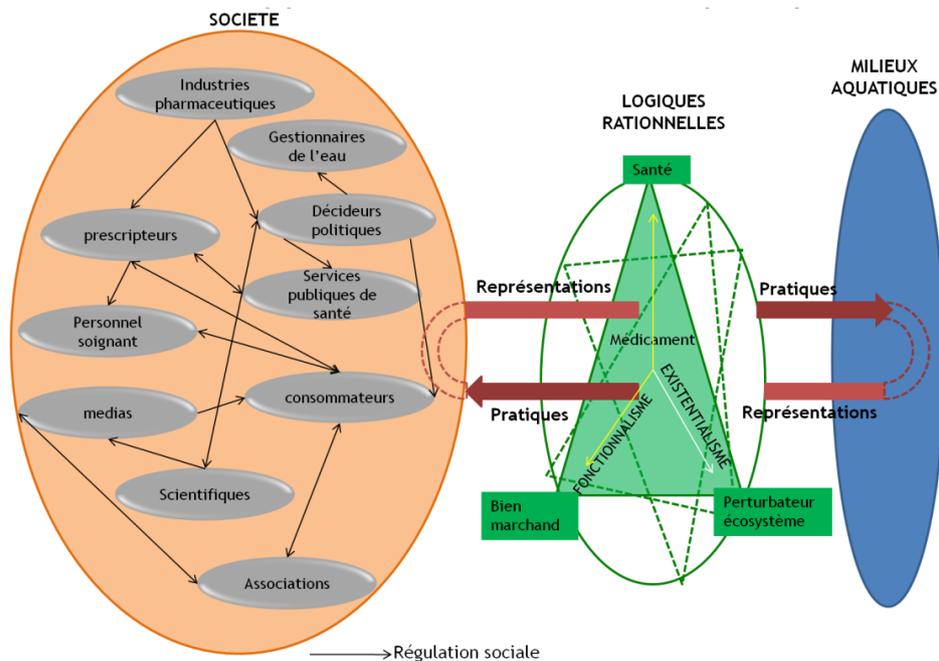


Figure 32 : Rapport Hommes/Milieus aquatiques.

Les logiques d'action au sein de la société peuvent être toutes représentées par des « triangles de rationalité » en interaction les uns avec les autres. La forme du triangle met en évidence trois pôles principaux de rationalité: économique, social et écologique. Dans notre cas, le triangle nous intéressant plus particulièrement est celui se dessinant autour du médicament. Ce dernier peut être vu soit préférentiellement comme un bien marchand - logique économique -, soit comme un perturbateur des écosystèmes - rationalité écologique-, soit encore comme un moyen de soigner les individus - logique sociale. Dans le cas où les deux premières seraient favorisées, l'individu se situerait plutôt dans un positionnement fonctionnaliste au regard de ses rapports avec les milieux aquatiques. Si, au contraire, l'argument écologique prenait le dessus, les relations seraient alors existentialistes (ce qui concerne peu d'acteurs, mise à part les personnes identifiées comme appartenant au mouvement de l'écologie profonde). Or, ce n'est que lorsque le médicament est envisagé comme perturbateur potentiel des écosystèmes que le lien entre les activités sociales et l'espace-support est perçu.

Le terme de pollution est défini en écologie comme « *une modification défavorable du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie comme le sous-produit de l'action humaine, au travers d'effets directs ou indirects altérant les modalités de répartition des flux d'énergie, des niveaux de radiation, de la constitution physico-chimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes* ». En sciences humaines, et plus particulièrement en géographie, la pollution peut être définie comme « *un des dommages les plus graves apportés à l'environnement et à la sécurité des populations. Elle est consécutive à la diffusion de déchets et de produits toxiques par divers processus de traitement industriel ou agricole, dans l'atmosphère, les eaux courantes et la mer* » (George et Verger, 2009). Suivant ces différentes définitions, la pollution renvoie aux activités humaines, aux relations et aux pressions qu'elles exercent sur l'environnement. En cela, elle constitue une mise en exergue d'un problème. Ainsi, le terme de pollution désigne à la fois un construit scientifique, puisque la pollution est définie par des normes et des seuils à respecter, mais également un construit social puisqu'elle renvoie au regard que la société porte sur ses pratiques et leurs conséquences sur l'environnement.

Plus précisément, ce terme traduit l'identification de contraintes sur le plan environnemental et, à terme, sur la santé humaine. Les résidus médicamenteux constituent aujourd'hui une pollution dite émergente, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas encore inclus dans la réglementation, mais pourront y être intégrés en

fonction des résultats que fera émerger la recherche sur leurs impacts sur l'environnement, et en fonction de la manière dont la société se saisira de ces résultats. Il semble que les questions qui se posent d'ordinaire concernant la pollution soient d'abord pragmatiques. Elles visent à déterminer sa présence ou son absence, son importance, sa densité, les risques, et enfin les moyens de la limiter, de la circonscrire, voire de l'anéantir. C'est aux scientifiques qu'il revient de répondre à ces questions. Mais il en est d'autres auxquelles ils n'ont pas pour mission de répondre, celles qui concernent la responsabilité, la régulation, mais aussi la signification de la pollution.

C'est ainsi que, souvent à rebours, interviennent les questions politiques : qui produit cette pollution ? Qui en est responsable ? Comment va-t-on désormais la contrôler, la réguler ? Certains s'interrogent également sur la nature des solutions à apporter : faut-il se contenter de trouver des solutions technologiques aux dégâts provoqués par la pollution ou faut-il envisager des solutions politiques, juridiques, voir éthiques en amont ? Quel sera alors le partage des pouvoirs entre autorités scientifiques et politiques, producteurs et citoyens, dans les choix technologiques et d'aménagement de la société (Van Staevel, 2006) ?

Dans ce cadre, nous nous intéressons à la fois à la construction scientifique de la pollution par les résidus médicamenteux et plus particulièrement des résidus de médicaments psychotropes, mais également à sa construction sociale. Il s'agit de savoir dans quelle mesure la mise en évidence de la présence de résidus de médicaments psychotropes dans les milieux aquatiques peut avoir des impacts sur les pratiques quotidiennes de l'ensemble des acteurs concernés par cette problématique (patients, corps médical, riverains, etc.). Les pratiques sont définies comme « *tout ce qui concerne l'action, la transformation de la réalité par l'action humaine* ». En cela, elles sont à rapprocher de la notion de représentation avec lesquelles elles s'inter-construisent.

Nous utilisons l'approche de Claude Gilbert et Emmanuel Henry (2005) pour appréhender le processus de construction de pollution par les médicaments psychotropes en tant que problème. Cette approche met l'accent sur les processus définitionnels du problème au lieu de se focaliser de manière traditionnelle sur son émergence dans l'espace public. Ceci nous amène inévitablement à mobiliser les concepts de représentations sociales et de référentiel global tel que défini par Jobert et Muller (1987). Ces derniers apportent un éclairage sur les conditions, les modalités et les conséquences de la construction d'un risque associé à la présence de résidus médicamenteux dans les milieux aquatiques.

Dans ce cadre, la pertinence d'une approche relationnelle, telle que définie par Claude Raffestin (1980) est évidente. Elle permet de saisir à la fois la complexité des relations (articulation représentations/pratiques) entre les acteurs concernés et les enjeux des processus de définition de la pollution en tant que problème qui sont liés à la construction des relations entre la société et son environnement et sont basés sur des rapports de force entre les acteurs.

Cette approche nous a permis, dans un premier temps, de mettre en évidence les systèmes d'acteurs et les relations qui existent entre eux en termes de stratégies, de finalités, de rapports de force, de médiatisation.

Dans un deuxième temps, de souligner les relations qui existent entre ces systèmes et les composantes spatiales et temporelles avec lesquelles ils interagissent. Cette analyse des relations permet de rendre compte des enjeux, des liens, et des résistances au changement. Ceci nous a conduit à mener en parallèle une série d'entretiens et la réalisation de questionnaires qualitatifs. Ces deux techniques sont complémentaires. En effet, les questionnaires quantitatifs permettent de sonder un échantillon représentatif de la population. Cette technique d'enquête permet de recueillir des informations et des premiers éléments d'analyse à grande échelle. Les entretiens qualitatifs, quant à eux, permettent de développer une analyse plus fine des représentations par groupe d'acteurs, et de discuter les hypothèses

via les discours produits. Leur mise en place participe du paradigme constructiviste dans lequel s'inscrit notre étude, puisque nous considérons que la pollution potentielle des milieux aquatiques par les médicaments psychotropes relève d'un construit social. A travers la réalisation de ces entretiens nous cherchons à avoir accès aux processus de construction des représentations et aux logiques rationnelles qui déterminent les pratiques des acteurs, via l'exploration du discours qu'ils produisent. Ces deux méthodes ont un objectif en commun : la collecte et l'analyse des faits sociaux, ces derniers concernant les systèmes de représentations (pensées construites) et les pratiques sociales (faits expérimentés). De cette manière, elles rendent possible l'identification des logiques rationnelles. 750 questionnaires quantitatifs ont été réalisés et 58 entretiens qualitatifs. L'échantillonnage a été réalisé en ciblant deux catégories d'acteurs :

- les riverains, les résidents d'instituts de soins, le personnel médical ou médico-social, les familles de résidents, des associations ;
- les instituts publiques et gestionnaires de l'eau.

2. Un diagnostic scientifique pour favoriser le changement de pratiques et les relations sociétés/écosystèmes aquatiques ?

Le problème au coeur de cette étude est donc de comprendre comment, et en quoi, la mise en évidence de la présence de résidus médicamenteux dans les milieux aquatiques débouche sur la construction d'une pollution par les scientifiques, pourrait modifier les représentations sociales et influencer l'ensemble des pratiques telles qu'elles existent aujourd'hui.

Si la science produit effectivement un nouveau cadre interprétatif susceptible de modifier les représentations sociales, ce travail pourrait à terme aboutir à une réflexion sur un changement de « référentiel global » tel que définit par Pierre Muller. L'état actuel des connaissances sur ce sujet et la demande de connaissances dans laquelle se trouvent les politiques aujourd'hui ne permettent pas de définir un nouveau référentiel. En revanche, cette étude pourrait nous donner les moyens d'identifier l'écart qui existe entre ce qui est et ce qui pourrait être, de définir les acteurs, les relations, et les leviers potentiels pour un changement de pratiques, et ce à travers le questionnement induit par la mise en évidence de la présence d'une pollution potentielle des milieux aquatiques par les résidus médicamenteux. La question qui se pose est donc simple : dans quelle mesure cette mise en évidence d'une pollution potentielle par des écotoxicologues peut-elle interroger nos représentations, nos pratiques, et les relations qu'entretient la société avec l'espace, et tout particulièrement avec les composantes environnementales de l'espace ? Cela suppose de prendre en compte plusieurs dimensions : économique, sociale, environnementale. L'articulation de ces trois éléments est au coeur de la notion de développement durable. En sachant que le développement durable implique pour beaucoup un changement radical des relations société / environnement, dans le contexte d'une mise en exergue d'une pollution médicamenteuse des milieux aquatiques, cela pourrait-il aboutir à un changement des relations existantes entre notre société et ces milieux ? Et donc aboutir, à terme, à un changement de référentiel global ?

a) Inertie ou changement de référentiel d'un système d'acteur complexe

Dans un premier temps, la formalisation du système d'acteurs inhérente à la mise en œuvre d'une démarche relationnelle permet de souligner les enjeux de pouvoir associés à la mise en évidence de la pollution médicamenteuse (figure 33).

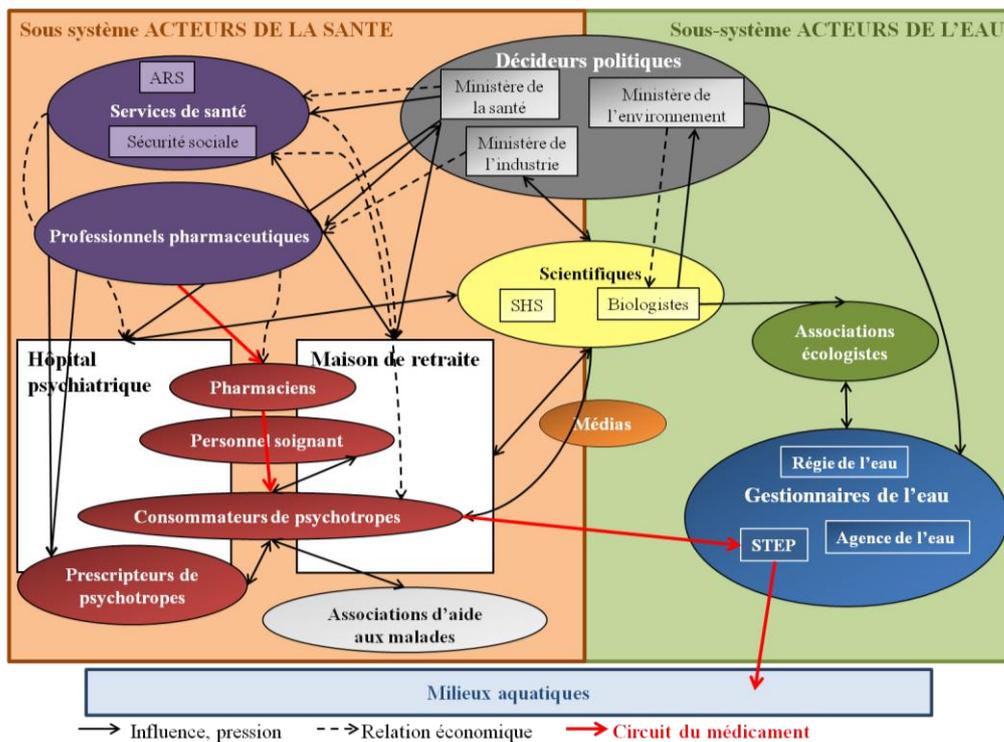


Figure 33 : Relations entre les différents acteurs impliqués dans la relation Psychotropes/eau.

Il est alors possible de proposer différentes évolutions potentielles à ce système d'acteur à l'issue de ces luttes définitionnelles qui détermineront le cadre du problème et les orientations collectives entreprises. Dans le cas de la pollution des eaux par les résidus de médicaments psychotropes, deux scénarii peuvent être envisagés en fonction de la nature des interactions science/société.

La première possibilité correspond au cas où la pollution en tant que problème se maintient dans des espaces discrets. La logique de confinement est favorisée, il n'y a aucun flux d'information qui passe de l'espace investi par les spécialistes à l'espace public. Des solutions de type sectoriel sont alors proposées par les scientifiques, en interaction avec la sphère politique et juridique, débouchant ainsi sur la modification de normes. Il n'y a, en conséquence, aucune modification du système de représentations sociales et de pratiques susceptible de contribuer à un changement de référentiel global. On débouche donc sur une résilience du système (figure 34).

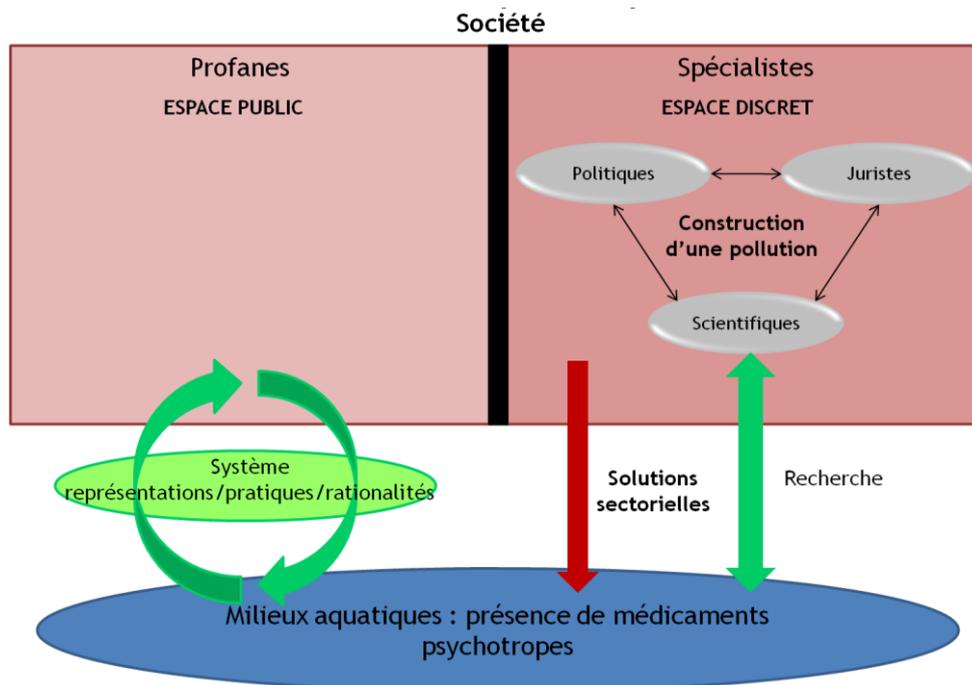


Figure 34 : Résilience du système par cloisonnement des espaces public/discret.

Ce scénario se profilerait si les luttes définitionnelles se développent dans des cadres d'échanges plus techniques, entre spécialistes du domaine scientifique, politique ou juridique. Les « profanes » sont de ce fait exclus du processus. Dans ce contexte, les acteurs agissent selon une logique de confinement. « *Ils prennent position au sein des espaces discrets, décident, échangent, négocient, prennent des décisions, sans nécessairement accompagner cet engagement d'une prise de position officielle et publique* » (Gilbert et Henry, 2012). Ce serait par exemple le cas si des solutions de traitement de l'eau étaient immédiatement envisagées suite à la mise en évidence de la présence de résidus médicamenteux psychotropes dans les milieux aquatiques. Dans ce contexte, les scientifiques, en partenariat avec les politiques, l'administration et les responsables juridiques, vont proposer une solution sectorielle du problème (comme le traitement des eaux en aval par exemple), inhibant de ce fait l'activation de possibles leviers de changement plus globaux (l'éducation concernant les voies non-médicamenteuses de soin) qui requièrent, eux, des initiatives venant de la société. Finalement, l'activation ou non de l'espace public dépend de « ce qui se joue » au sein des sphères de spécialistes, en fonction des compromis établis, c'est-à-dire de leur robustesse ou, au contraire, de leur fragilité.

Dans le deuxième scénario, les rapports de force entre les acteurs sont plus équilibrés et ceux-ci évoluent dans le même espace public. Il n'y a pas de cloisonnement. Dans ce contexte, une initiation du processus de construction de la pollution par la société (« les profanes ») est possible. Les échanges d'information et de connaissances débouchent sur une émergence de la pollution en tant que problème dans la sphère publique. Les processus de régulation sociale à l'oeuvre contribuent dans ce cas à des changements en amont des rapports homme/milieux aquatiques et une modification des rationalités (sociales/économiques/écologiques). Ces modifications traduisent une vision globale du problème par les acteurs. Suit une prise en charge par les politiques et un possible changement de référentiel global (figure 35).

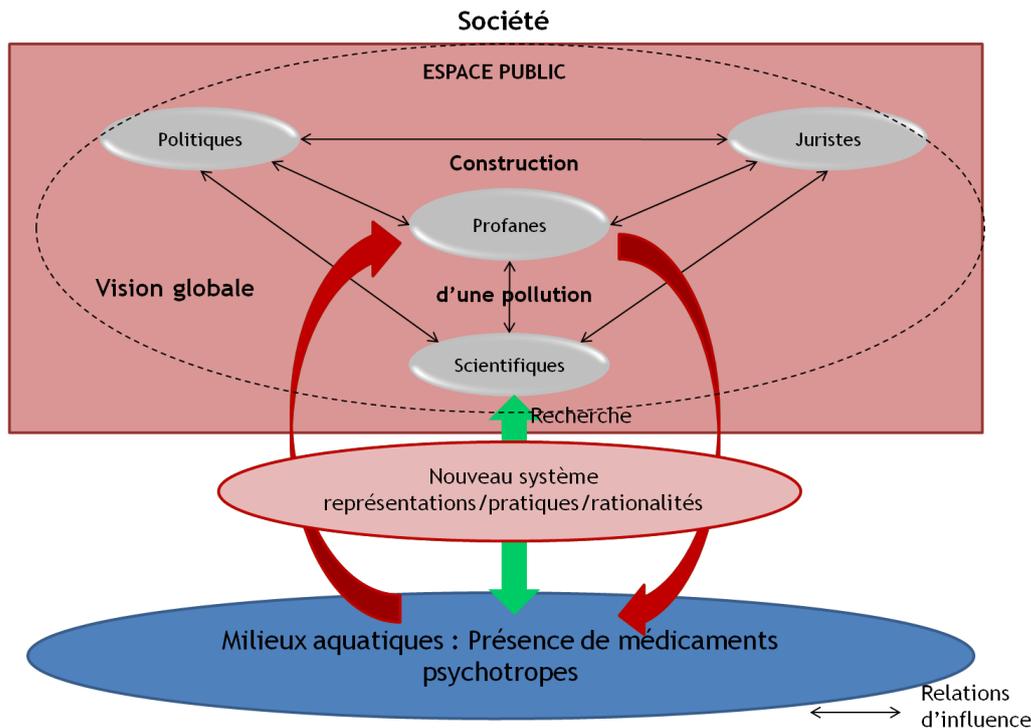


Figure 35 : Changement du système par rapport au référentiel par évolution des rapports homme/milieux et des rationalités.

Le deuxième scénario aurait lieu s'il y a une diffusion de l'information et une « conscientisation » de la société par les scientifiques au sujet de cette problématique. Le processus de constitution du problème va alors émerger dans l'espace public selon une logique de mobilisation et de mouvements d'action collective (débats publics, controverses, etc.), que les auteurs appellent « *logique de publicisation* ». Dans ce cas, un large public est concerné. L'accès à l'information - aspect déterminant dans les rapports de force - est facilité.

Par conséquent, ce n'est pas parce que la communauté scientifique définit la présence de médicaments psychotropes dans les milieux aquatiques en tant que problème environnemental, que la société, elle aussi, l'identifie comme un risque associé à une pollution. En effet, si les rapports de force sont tels que les spécialistes prennent le dessus et confinent les échanges d'information et de connaissance sur le sujet, la société va être exclue du processus de construction. En revanche, si les flux d'information et de connaissance dépassent le cloisonnement spécialistes/société, ou plus particulièrement science/société, alors les relations de pouvoir seront plus équilibrées, la société va pouvoir s'approprier le sujet et éventuellement aller vers la construction d'un problème. Pour tenter de savoir quelle logique sera privilégiée dans notre cas, il nous faut interroger et identifier les représentations, pratiques et logiques rationnelles des divers acteurs concernés. En effet, l'issue du processus de construction de la pollution en tant que problème dépend directement des processus cognitifs (les représentations) et sociaux (les pratiques), les deux s'autoarticulant par le biais des logiques rationnelles.

Afin de tester nos différentes hypothèses les thèmes abordés dans les enquêtes par questionnaires quantitatifs et entretiens qualitatifs ont été : les représentations des milieux aquatiques et la pollution associée, le traitement des eaux, le monde médical et son évolution, les pratiques alternatives à l'utilisation de médicaments, les leviers à mettre en place pour limiter les pollutions aquatiques par les médicaments.

b) Les milieux aquatiques et les pratiques médicales deux mondes disjoints... que les scientifiques pourraient relier ?

Le croisement des résultats d'enquêtes par questionnaire et par entretiens soulignede façon flagrante une dissociation entre les pratiques médicales et les milieux aquatiques. Le lien entre la consommation de médicaments et la présence de médicaments dans l'eau n'est pas perçu, ce qui est révélateur d'un cloisonnement entre le secteur médical et celui de la gestion de l'eau.

Pour les acteurs interrogés, les milieux aquatiques sont avant tout une ressource paysagère et patrimoniale (figure 36).

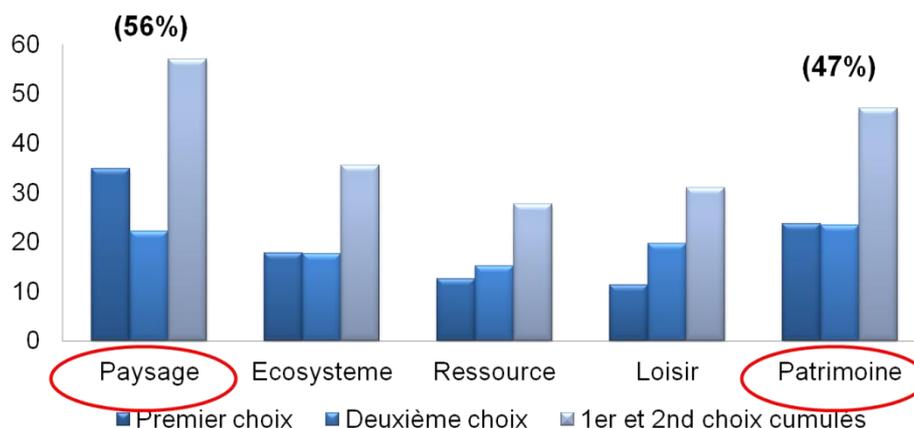


Figure 36 : % de réponses à la question : Que représente pour vous un cours d'eau ?

Ces enquêtes montrent que la pollution est perçue comme la principale menace des milieux aquatiques mais que les médicaments ne constituent que très rarement des sources de pollution potentielles (la première source identifiée étant les polluants d'origine agricole). Le médicament occupe une place particulière dans notre société, il est considéré comme une ressource, et non comme un risque. Pour les personnes enquêtées, le médicament n'est pas et ne peut pas être une pollution. Ainsi à la question « Pouvez-vous classer, par ordre d'importance, les deux principales natures de pollution de l'eau ? », les principales sources de pollution sont de loin les pesticides et ensuite les métaux (figure 37).

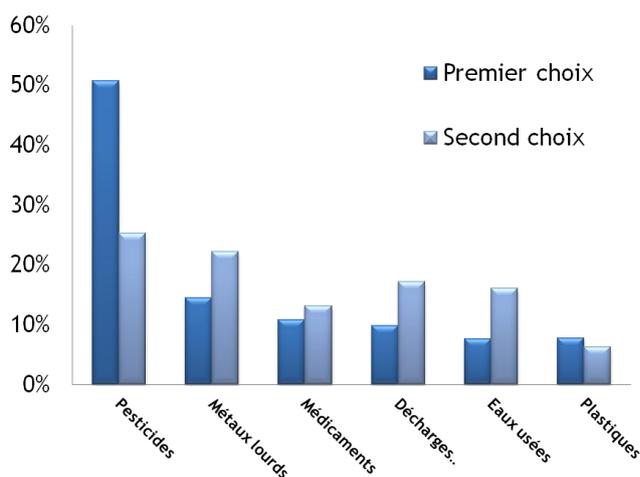


Figure 37 : Principales sources de pollution perçues par les personnes interrogées.

Les scientifiques semblent tenir une place importante dans le processus de construction de la pollution car ils permettent une prise de conscience et la création de lien. Au regard des différents leviers d'actions

préconisés par les acteurs interrogés, nous pouvons conclure en une tendance actuelle allant vers une validation de l'hypothèse de la résilience du système des relations qu'entretient la société avec les milieux aquatiques. En effet, ceux-ci sont en grande majorité conformes à une logique sectorielle. Si on analyse les leviers proposés par les différents acteurs, nous retrouvons des leviers en amont de la pollution et des leviers en aval de celle-ci (figure 38)

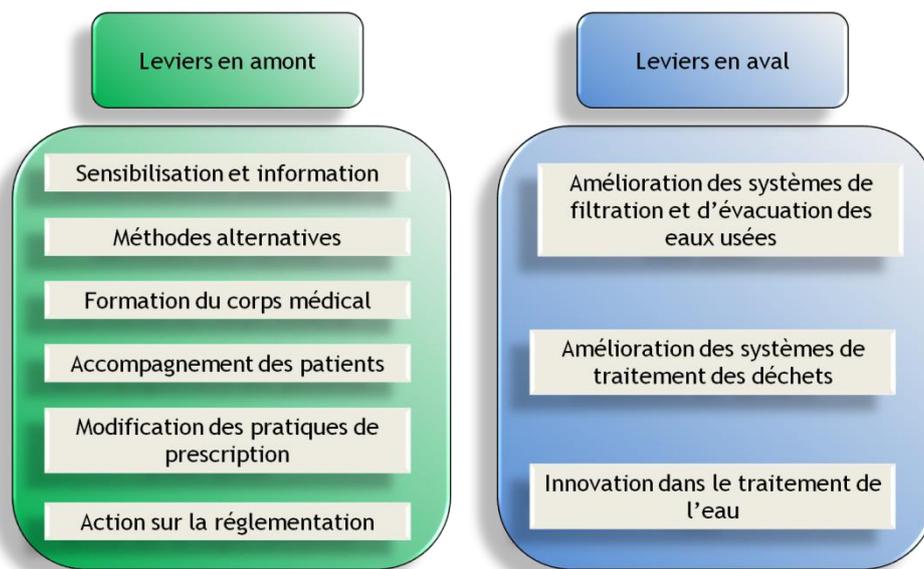


Figure 38 : les leviers proposés par les différents acteurs en amont de la pollution et en aval de celle-ci.

c) Une nécessaire mise en débat

Le levier principal cité est celui de la sensibilisation de la population et de la formation du corps médical. Lorsque nous discutons ce levier au regard des piliers du développement durable, nous mettons en évidence le fait que, dans le contexte actuel, la diffusion de l'information, par le biais d'une controverse socio-technique par exemple, ne permet pas de contribuer à l'émergence d'une vision globale du problème. Une diffusion de la connaissance est en réalité nécessaire pour opérer une modification des rapports homme/environnement. Or, les résultats ont montré que la connaissance est cloisonnée. La clé du changement réside donc dans le décloisonnement des disciplines scientifiques qui se traduit par l'adoption d'une démarche transdisciplinaire et le passage du paradigme disciplinaires à celui de la complexité. La controverse socio-technique pourrait être ici un outil adapté. C'est un débat entre acteurs sociaux divers autour de questions liées à des connaissances scientifiques et techniques non assurées, en lien avec la société, relayée à plus ou moins grande échelle par les médias. Trois grands piliers peuvent être identifiés pour caractériser une controverse socio-technique :

- Une incertitude scientifique et technique, des connaissances non stabilisées sur un thème ;
- Un lien direct avec la société, de part les conséquences de l'incertitude scientifique et techniques qui peuvent être morales, environnementales, juridiques, économiques, etc. ;
- Un débat au sein de la sphère publique, la médiatisation de cette question qui peut mener à une mise sur l'agenda politique de la question débattue.

Dans le cas des risques potentiels liés à la présence de médicaments psychotropes dans les milieux aquatiques, nous ne sommes pas face à une controverse socio-technique car tous les éléments ne sont pas

réunis. Les productions scientifiques sur la question ne sont pas suffisantes, le lien entre la question et son impact sur la société n'est pas fait et enfin, la médiatisation de la question n'est pas encore significative. Nous sommes face à une controverse potentielle.

L'analyse des controverses peut être un outil d'aide à la décision dans un contexte d'incertitude où les choix scientifiques et techniques ne seront plus faits par les seuls experts, mais par une multitude d'acteurs (Callon *et al.*, 2001). Elle va permettre d'inventorier les acteurs, leurs opinions et arguments et leurs intérêts sur une question. Elle va donc entre autre permettre de prendre en compte les points de vue multiples sur une question et d'intégrer l'expertise des non-spécialistes. Elle mettra en exergue pour tous, professionnels, scientifiques, politiques et citoyens, l'ensemble des considérations à prendre en compte. Son avantage par rapport à la mise en oeuvre du débat public tel que nous le connaissons à l'heure actuelle est que les sources d'informations sont multiples, et qu'elle permet d'atténuer l'opposition « experts » / « profanes ». L'expertise des profanes sur une question est prise en compte. Le point de vue de chacun est exposé.

En conclusion, il est important que le rapport de force des acteurs autour de la problématique « Médicaments et milieux aquatiques » soit rééquilibré par le niveau d'accès à l'information. La question de la circulation de l'information est primordiale. Aujourd'hui, il existe de nombreuses limites à la diffusion de l'information scientifique dans la sphère publique. En effet, si l'on peut citer la difficulté des chercheurs à remplir leur mission de communication par manque de temps, de moyen ou de compétence en la matière, l'individualisation de l'évaluation des chercheurs semble plus pesante. En effet, la diffusion est compliquée par des raisons de propriété intellectuelle, de crainte de la concurrence, de la fuite des idées. Mais au-delà d'un simple problème de diffusion de l'information, l'enjeu étant le changement des rapports homme-environnement et des rationalités, c'est sans doute une question de diffusion des connaissances qui est ici en jeu. En effet, la diffusion de l'information au sein de la sphère publique ne favorise pas forcément la diffusion de la connaissance. Et en effet, nous l'avons vu, la connaissance est cloisonnée. D'autres signes tendent à le prouver, tels que la myriade de laboratoires, et unités de recherches spécialisées que l'on rencontre au sein de la recherche française. Ainsi l'organisation de la recherche elle-même illustre le frein que constitue l'approche disciplinaire de la science qui domine à l'heure actuelle. Comment dans ce contexte un changement de référentiel global favorisant la mise en évidence des liens qu'il existe entre l'Homme et l'environnement pourrait être enclenché ? A l'heure actuelle, Chacun ne voit la problématique qu'à l'aune de son secteur d'activité, de sa discipline et personne ne fait le lien entre les différents champs. Ainsi, même si un débat venait à émerger sur la question, on peut supposer que c'est bien encore une fois la résilience du système actuel qui en ressortirait. A moins qu'un lien isolé ne naisse dans les esprits entre les pratiques médicales et l'environnement, comme il peut déjà en exister entre les pratiques agricoles et l'environnement par exemple. Mais le travail serait à refaire lors de l'émergence de la prochaine question posée, il n'y aura pas de changement durable des représentations, des pratiques et des rationalités à l'oeuvre. Il apparaît donc que pour favoriser un changement du système, il faille favoriser un changement de paradigme. Ne faudrait-il pas passer du paradigme disciplinaire au paradigme de la complexité ?

VII. Bibliographie

Barbault R., 1981. Ecologie des populations et des peuplements. *Edition Masson*, p 100.

Bartelt-Hunt S., Snow D., Damon T., Shockley J., Hoagland K., 2009. The occurrence of illicit and therapeutic pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters in Nebraska. *Environmental Pollution*, 157, 786-791.

- Beausse J., 2004. Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 753-761.
- Besse J.P., Garric J., 2007. Médicaments à usage humain : Risque d'exposition et effets sur les milieux récepteurs. Agence de l'eau R.M.C., Lyon, 241p.
- Billetorte D., Saubesty M., 2008. Synthèse des campagnes d'analyse de perturbateurs endocriniens dans les eaux destinées à la consommation humaine. *Colloque "Résidus de médicaments dans l'eau : Des molécules à surveiller? Des risques à évaluer?"* Paris.
- Brooks B.W., Foran C.M., Richards S.M., Weston J., Turner P.K., Stanley J.K., Solomon K.R., Slattery M., La Point T.W., 2003. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicology Letters*, 142, 169-183.
- Callon, M., Lascoumes P., Barthe Y., 2001. Agir dans un monde incertain : essai sur la démocratie technique, Éditions du Seuil, Paris
- Chambaretaud S., 2000. La consommation de médicaments dans les principaux pays industrialisés. DREES – Etudes et Résultats, n° 47, janvier 2000.
- Clevers M., 2003. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicology Letters*, 142, 185-194.
- Clevers M., 2004. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 309-315.
- Dedourge-Geffard O., Palais F., Biagianni-Risbourg S., Geffard O., Geffard A., 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum* : an *in situ* experiment. *Chemosphere*, 11, 1569-1576.
- Fent K., Weston A., Caminada D., 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76, 122-159.
- Flaherty C., Dodson S., 2005. Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction. *Chemosphere*, 61, 200-207.
- Forestry Research Support Programme for Asia and the Pacific, 1999. *A Statistical Manual for Forestry Research*, p 193.
- George P., Verger F., 2009. Dictionnaire de la géographie, 10ème édition.
- Gilbert C., Henry E., 2012. La définition des problèmes publics : entre publicité et discrétion. *Revue française de sociologie*, 531, 35-59.
- Ginebreda A., Munoz I., Lopez de Alda M., Brix R., Lopez-Doval J., Barcelo D., 2011. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers : Relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environment International*, in press.
- Gonzales Alonso S., Catala M., Romo Maroto R., Rodriguez Gil J., Gil de Miguel A., Valcarcel Y., 2010. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environment International*, 36, 195-201.
- Halling-Sorensen B, Nielsen SN, Lanrky PF, Ingerslev F, Holten Lützhof HC, Jorgensen SE, 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. A review, *Chemosphere*, 36, 357-393.
- Heberer T, 2002. Occurrence, fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicology Letters*, 131, 5-17.
- IMS Health, 2008, IMS retail drug monitoring. Tracking 13 key global pharma markets, 12 months to december 2006, IMS Health, 7 Harewood avenue, London, UK.
- Jobert B., Muller P., 1987. L'Etat en action, Paris, PUF, 242 p.
- Jones OAH, Lester JN, Voulvoulis N, 2005. Pharmaceuticals: a threat to drinking water?, *Trends Biotechnology*, 23, 163-167.
- Jorgensen SE, Halling-Sorensen B, 2000. Drugs in the environment, editorial. *Chemosphere*, 40, 691-699.
- Kajak Z. et Dusoge K., 1971. The regularities of vertical distribution of benthos in bottom sediments of three masurian lakes, *Ekologia Polska*, 32, 485-499.
- Kim Y., Choi K., Jung J., Park S., Kim P., Park J., 2007. Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamide, and their potential ecological risks in Korea. *Environment International*, 33, 370-375.
- Kümmerer K., Radka A., Huttig J., Schöll A., 2004. Standardized tests fail to assess the effects of antibiotics on environmental bacteria. *Water Research*, 38, 2111-2116.
- Muller P., 1990. Les politiques publiques. collection *Que sais-je*, Edition PUF, 128p.

- Muñoz I., López-Doval J. C., Ricart M., Villagrasa M., Brix R., Geiszinger A., Ginebreda A., Guasch H., de Alda M. J., Romaní A. M., Sabater S., Barceló D., 2009. Bridging levels of pharmaceuticals in river water with biological community structure in the Llobregat river basin (northeast Spain).
- Raffestin C., 1980. Pour une géographie du pouvoir. *LITEC*, 280p.
- Santos L.H.M.L.M., Araujo A.N., Fachini A., Pena A., Delerue-Matos C., Montenegro M.C.B.S.M., 2010. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175, 45-95.
- Sherfy Mark H., Kirkpatrick Roy L. et Richkus Kenneth D., 2000. Benthos core sampling and chironomid vertical distribution : implications for assessing shorebird food availability. *Wildlife Society Bulletin*, 18, 124-130.
- Sousa M.A., Goncalves C., Cunha F., Hajslova J., Alpendurada M.F., 2011. Cleanup strategies and advantages in the determination of several therapeutic classes of pharmaceuticals in wastewater samples by SPE-LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399, 807-822.
- Togola A., Budzinski H., 2007. Development of polar organic integrative samplers for analysis of pharmaceuticals in aquatic systems, *Analytical Chemistry*, 79, 6734-6741.
- USEPA, 2000. Estimation Program Interface (EPI). Suite, V3.12. USEPA, Office of Pollution Prevention and Toxics, Washington DC.
- Van Staëvel, E., 2006. La pollution sauvage. Le Monde-PUF. 191 p
- Zhang Y, Geiben S.U., Gal C., 2008. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73, 1151-1161.
- Zorita S., Mårtensson L., Mathiasson L., 2010. Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden, *Science of the Total Environment*, in press.
- Zuccato E, Calamari D, Natangelo M, Fanelli R, 2000. Presence of therapeutic drugs in the environment. *The Lancet*, 355, 1789-179.

VIII. Bilan financier

Bilan financier Agence de l'eau	
Déplacement	projet
Albi - Montpon - Albi	217,9
Total	217,9
Consommables	projet
Matériel aquariophilie (Jardinerie Tarnaise, Jardiland, Julien, M. Bricolage)	621
Librairie (AFNOR, Amazon)	166
Consommables (SDS, CML, GE Healthcare, Eurogentec, Fisher Bioblock)	5113
Consommables Biotests 2011 (R-Biopharm)	1074
Consommables Biotests 2012 (R-Biopharm)	993
Total	7967
Gros équipements	projet
Participation Equipement protéomique (fournisseur GE Healthcare)-2011	1642
Ph-mètre + agitateur (VWR)	1141
Ordinateur protéomique (Dell)	1316
Agitateur à bascule protéomique (Sodipro)	1190
Frigo-congélateur protéomique (Darty)	712
Total	6001
total des subventions accordées pour le projet	14000
Sommes dépensées	14185,9

IX. Annexes

A. Annexe1 : Identification des psychotropes analysés

A partir des données de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé, les organismes répartiteurs des médicaments pour les officines et la caisse primaire d'assurance maladie, une liste de l'ensemble des médicaments utilisés en France a été dressée en fonction du tonnage de chaque molécule.

Parmi les psychotropes utilisés (qui agissent sur l'état du système nerveux central), il existe des médicaments de la classe des antidépresseurs (qui corrigent l'humeur dépressive), des anxiolytiques (utilisés contre l'anxiété), des antipsychotiques (à effet neurobiologique utilisés dans le traitement de certaines affections du système nerveux central telles que la schizophrénie et) ou des anti-épileptiques (anti-convulsivants).

Lorsque tous les médicaments et les métabolites ont été recensés, des calculs de PECs (Concentrations prédites dans l'environnement) ont été réalisés. 3 PECs ont été calculées pour chaque molécule :

PEC phase1 : calcul basé uniquement sur l'utilisation de la dose maximale journalière de médicament (ne tient pas compte des données de consommation).

PEC phase2 : Tient compte des données de consommation (PEC phase 2A) et de différents facteurs de correction tels que le métabolisme, l'abattement dans les STEP (PEC phase 2B).

Puis, toutes les données écotoxicologiques existantes concernant les différentes molécules ont été utilisées afin d'établir une liste de priorisation des molécules à rechercher.

La première phase de classification utilise les PEC (figure 4).

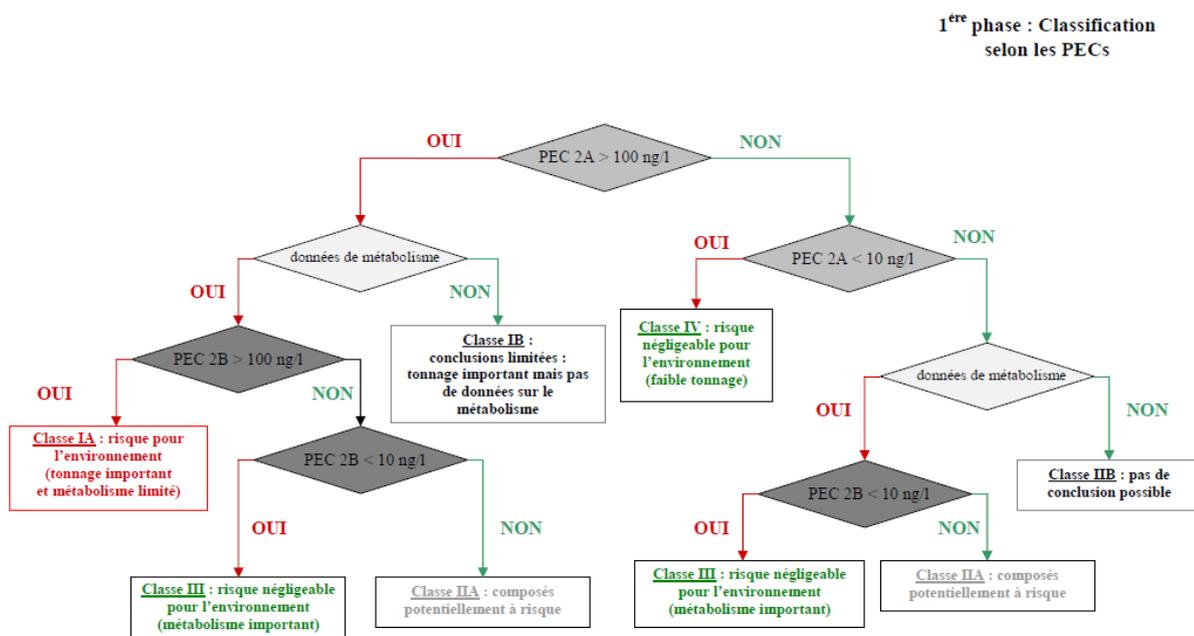


Figure 4 : Démarche de classification des molécules à partir des valeurs de PEC. Mise en place d'une liste de priorisation préliminaire basée sur l'exposition. 100 ng/l : valeur seuil retenue par la FDA (FDA 1998) ; 10 ng/l : valeur seuil retenue par l'EMA (EMA 2006).

A partir de ces données PEC, des classes ont été établies (tableau 3).

Classe IA : Risque pour l'environnement (tonnage important et métabolisme limité)

Classe IIA : Composés potentiellement à risque

Classe IB : Conclusions limitées : tonnage important mais pas de données sur le métabolisme.

Classe IIB : Pas de conclusion possible

Classe III : Risque négligeable pour l'environnement (métabolisme important)

Classe IV : Risque négligeable pour l'environnement (faible tonnage).

Tableau 3 : Quantités consommées des principaux psychotropes en France au cours de l'année 2004 et classification de ceux-ci en fonction des calculs de PECs.

molécule	Usage thérapeutique	Quantité consommée (Kg)	PEC phase1 (ng/l)	PEC phase 2A (ng/l)	PEC phase2B (ng/l)	classe
Acide valproïque	Anti-épileptique	112162,5	10500	2561	1357	IA
carbamazépine	Anti-épileptique	33514,2	10000	765		IB
Hydroxyzine	anxiolytique	6638,2	1500	152		IB
Sertraline	Antidépresseur sérotoninergique	6224,5	1000	142	20	IIA
Oxazepan	anxiolytique	6194,6	750	141	141	IA
Paroxétine	Antidépresseur sérotoninergique	5515,1	300	126	4	III
Cyamemazine	antipsychotique	5440,9	3000	124		IB
Phenobarbital	Anti-épileptique	3915,4	1050	89,4	22,3	IIA
Fluoxétine	Antidépresseur sérotoninergique	3740,3	300	85,4	8,54	III
citalopram	Antidépresseur sérotoninergique	3486,5	300	79,6	32	IIA
Zolpidem	hypnotique	3343,8	100	76,3	0,76	III
Bromazepam	anxiolytique	2603,5	180	59,4	1,78	III
Miansérine	antipsychotique	2423,7	300	55,3		IIB
Prazepam	anxiolytique	2165,5	300	49,4	1,48	III
tianeptine	Antidépresseur	2152,2	187,5	49,1	3,93	III
Clorzépate	anxiolytique	2108,9	450	48,1	0,48	III
Zopiclone	hypnotique	1948,2	37,5	44,5	1,78	III
Levomépromazine	antipsychotique	1699,0	1250	38,8		IIB
Fluvoxamine	Antidépresseur sérotoninergique	1121,4	1500	25,6		IIB
Loxapine	antipsychotique	960,8	1500	21,9		IIB
Lorazepan	anxiolytique	584,8	37,5	13,3	11,35	IIA
Diazepan	anxiolytique	526,4	100	12	0,12	III
Haloperidol	antipsychotique	341,9	200	7,81		IV
Nordazepan	anxiolytique	236,7	75	5,4	0,05	IV
Alprazolam	anxiolytique	177,5	20	4,05	0,04	IV
Midazolam	Hypnotique	97,8	15	2,23		IV
Clonazepam	anxiolytique	21,4	35	0,49		IV
Escitalopram	Antidépresseur sérotoninergique	4,6	100	0,11		IV

La seconde phase de classification tient compte des données écotoxicologiques (figure 5)

2^{ème} phase : Stratégie de classification en fonction des données biologiques

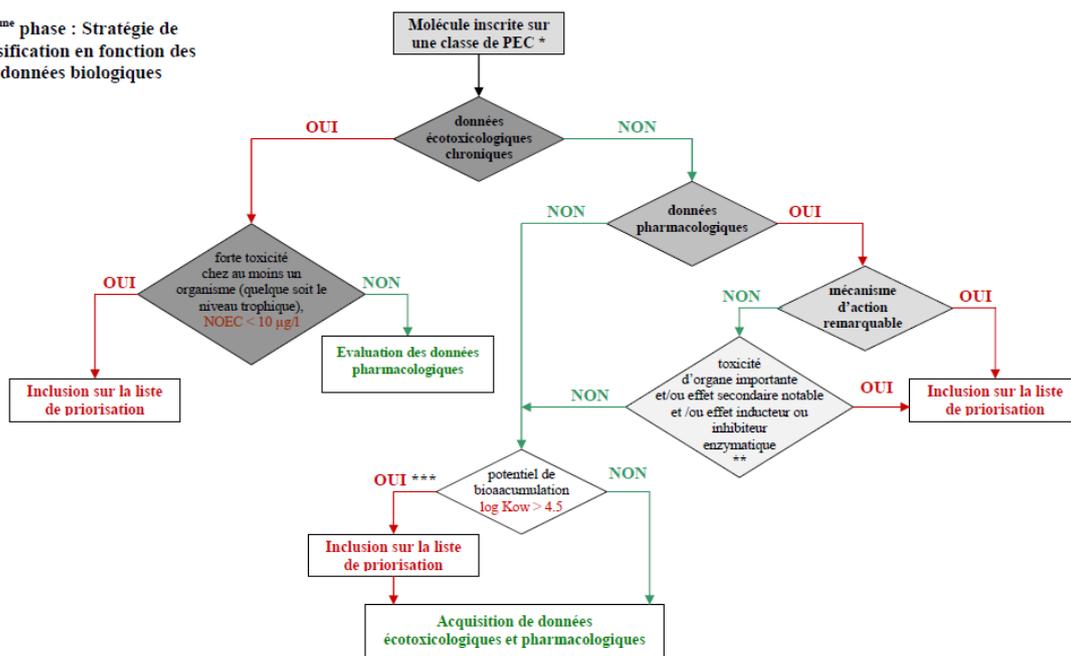


Figure 5 : Démarche de classification des molécules et d'établissement d'une liste de priorisation en fonction des données biologiques. Revue de la classification par exposition en fonction des données disponibles dans la littérature scientifique. * Cette démarche peut également s'appliquer à des molécules non inscrites sur les classes de PEC définies précédemment mais mises en évidence par la littérature scientifique. ** : Au moins deux paramètres sont nécessaires pour pouvoir inclure une molécule sur la liste de priorisation. *** : oui, seulement si la molécule possède un autre paramètre notable (effet secondaire ou autre) ou une PEC>10 ng/l.

A partir de ces différentes classifications, une liste des molécules prioritaires à étudier a été établie.

D'une manière générale, la classe IA est retenue comme liste préliminaire de molécules à surveiller en priorité. Dans un premier temps, tous les composés présents dans cette classe sont retenus quelque soient leurs propriétés et leur toxicité. Ensuite, sont ajoutés à cette liste, indépendamment de la classe des molécules, celles présentant un mécanisme d'action remarquable (tous les antibiotiques), les antidépresseurs IRS sont également inclus en raison de leur activité sérotoninergique.

Puis, sont incluses les molécules présentant une NOEC<10µg/l (concentration sans effet).

Cas des Antidépresseurs de type IRS

Sertraline, fluoxétine, fluvoxamine, paroxétine, citalopram et escitalopram appartiennent à la classe des antidépresseurs IRS. Compte-tenu de leurs propriétés pharmacologiques, ils ont été inclus dans un premier temps à la liste de priorisation. Puis, en se basant sur l'ensemble des données, n'ont été retenues comme prioritaires que la fluoxétine et la sertraline.

Prise en compte des métabolites : La norfluoxétine (métabolite de la fluoxétine) est un composé à surveiller. L'activité pharmacologique et la sélectivité de la norfluoxétine pour sa cible sérotoninergique apparait comparable à celle du composé parent.

A partir de l'ensemble des données, la liste des molécules psychotropes retenues comme prioritaires par ces auteurs est la suivante :

- Acide valproïque

- Carbamazépine
- Cyamémazine
- Fluoxétine
- Oxazepam
- Sertraline
- Norfluoxétine

Compte tenu des molécules utilisées par l'hôpital de Vauclaire et des quantités de comprimés prescrites, nous avons élargi cette liste avec 3 molécules supplémentaires : **le Lorazepam, l'hydroxyzine et le citalopram**. Ces trois molécules sont classées en IB ou IIA par Besse et Garric donc potentiellement à risque.

B. Annexe 2 : Protocole de préparation des échantillons pour le dosage des biomarqueurs et l'analyse protéomique des tissus de corbicule.

Trois types de broyage ont été nécessaires pour la constitution des pools (figure 1):

- Broyage pour plusieurs biomarqueurs : GST, Catalase, AChE, EROD, MXR
Tampon phosphate sucrose pH 7,4, cocktail d'inhibiteurs de protéase
- Broyage pour le dosage du malondialdéhyde
Tampon phosphate sans sucrose pH 7,4 cocktail d'inhibiteurs de protéase, BHT
- Broyage pour la protéomique
Tampon Hepes, Na₂EDTA, DTT, PMSF, cocktail d'inhibiteurs de protéase

Afin de réaliser le broyage, les tissus sont pesés pour ajuster le volume de tampon adéquat. Pour les broyages « biomarqueurs » et « MDA » le ratio est de 1 masse pour 5 volumes (1g pour 5 mL). Pour la protéomique le ratio est de 1 masse pour 3 volumes de tampon.

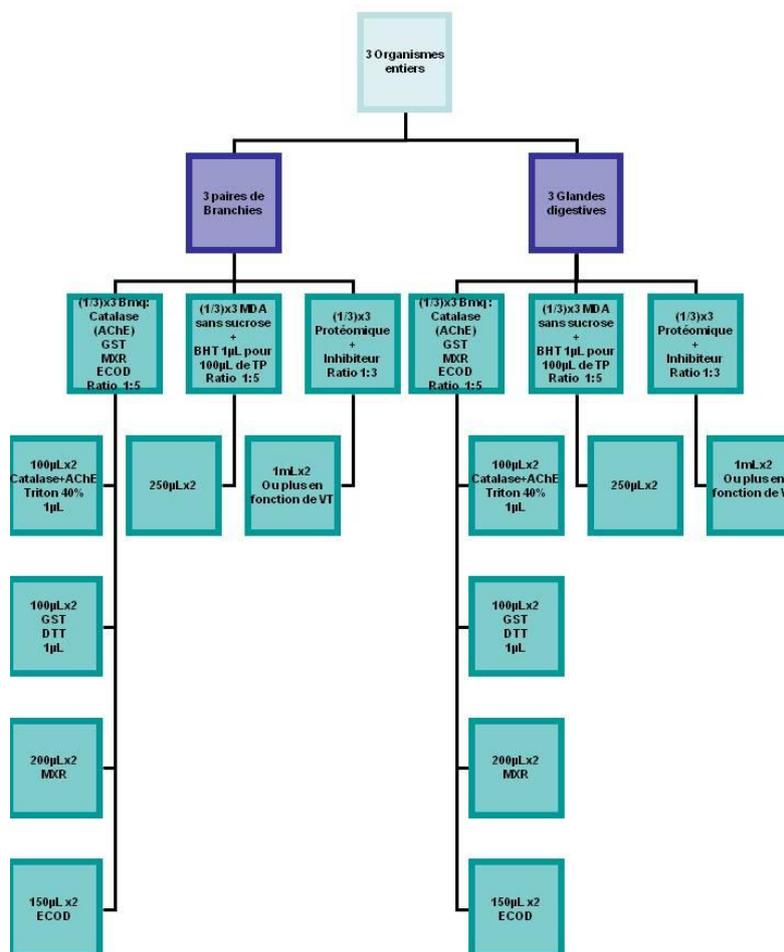


Figure 1 : protocole de séparation des homogénats pour chaque type d'analyses (biomarqueurs, protéomique) dans les branchies et glandes digestives de corbicules.

X. Suppléments au rapport : données concernant les effets de mélanges de molécules pures

3 concentrations de médicaments ont été utilisées pour toutes les expérimentations. Ces concentrations représentent celles trouvées dans les effluents de la STEP de l'hôpital de Vauclaire (concentration 2), dans l'Isle au niveau du rejet (concentration 1) et la troisième concentration testée correspond à 10 fois la concentration 2. Cette concentration a été choisie afin d'évaluer les effets d'une plus forte concentration en psychotropes tout en restant à des concentrations très faibles voire environnementales (tableau 1).

Tableau 1 : concentrations en psychotropes dans les 3 mélanges utilisés pour les expérimentations en conditions contrôlées.

molécule	Concentration 1 (rivière) ng/l	Concentration 2 (effluent) ng/l	Concentration 3 (10*effluent) ng/l
Carbamazepine	200	2000	20000
oxazepam	500	5000	50000
Sertraline	1.5	15	150
Fluoxétine	3	30	300
Norfluoxétine	0.2	2	20
Lorazepam	40	400	4000
Cyamémazine	30	300	3000
Citalopram	15	150	1500
Hydroxyzine	2	20	200
Acide valproïque	400	4000	40000

Seules les concentrations 1 et 2 ont été utilisées, dans un premier temps, pour évaluer les effets de psychotropes sur divers organismes.

Les concentrations 1 et 2 utilisées ont été réalisées à partir d'une solution mère de psychotropes dilués dans de l'éthanol 96°. Dans tous les tests il y aura donc des témoins alcool correspondant aux teneurs en alcool dans mélanges.

A. Les Tests normalisés

1. Le test daphnies

Les résultats d'immobilisation des daphnies dans les différentes conditions sont présentés sur la figure 1.

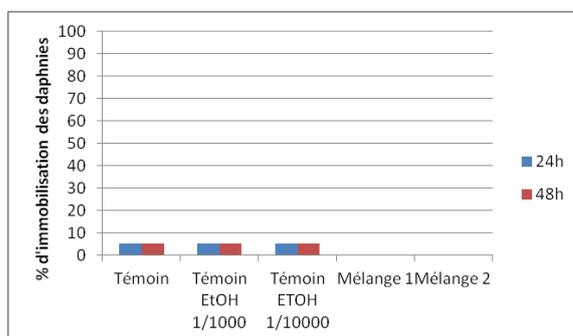


Figure 1 : % d'immobilisation des daphnies après 24h et 48h d'incubation en milieu de culture (témoins), en présence d'éthanol aux concentrations utilisées et en présence des 2 mélanges de psychotropes (mélange 1 = concentration 1 et mélange 2 = concentration 2).

Les deux mélanges de psychotropes testés n'ont aucun effet sur le déplacement des daphnies.

2. Le test algues

Le test d'inhibition de croissance de l'algue *Selenastrum capricornutum* est réalisé sur une période de 72h à 23 degrés avec une illumination homogène de 8000 lux.

Les résultats de croissance algale dans les différentes conditions sont présentés sur la figure 2.

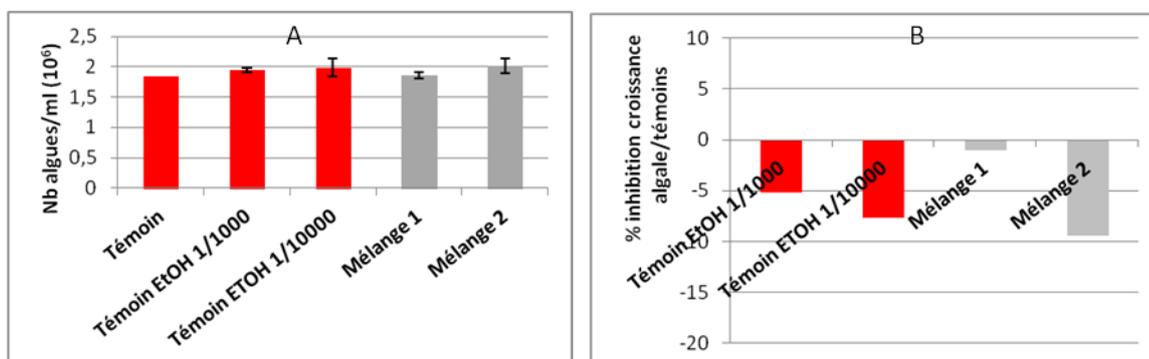


Figure 2 : Nombre de cellules algales (10^6)/ml chez les témoins, témoins alcool et en présence des deux mélanges de médicaments (A). % d'inhibition de croissance des algues dans les différentes conditions pré-citées par rapport aux témoins (B).

Les mélanges de psychotropes n'affectent en aucun cas la croissance de l'algue *Selenastrum capricornutum*.

3. Le test microtox

Le test d'inhibition de bioluminescence émise par les bactéries *Vibrio fischeri* est réalisé sur les mélanges de médicaments (figure 3).

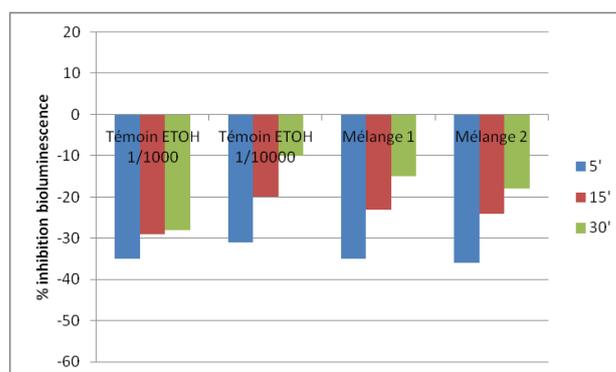


Figure 3 : % d'inhibition de bioluminescence produite par *Vibrio fischeri* après 5 minutes, 15 minutes et 30 minutes d'exposition en présence d'éthanol et des deux mélanges de psychotropes.

Les mélanges de médicaments n'ont eu aucun effet sur la production de bioluminescence par les bactéries *Vibrio fischeri*.

En conclusion, les tests normalisés n'ont mis en évidence aucun effet des deux mélanges de médicaments testés correspondant aux concentrations en psychotropes trouvés dans les effluents ou dans la rivière sur les organismes utilisés.

B. Les tests non normalisés sur planaires : *Schmidtea polychroa*

1. La reproduction

40 planaires par condition sont placées dans un b cher avec 800ml de la solution test. Toutes les semaines, le milieu est renouvelé totalement et l'expérience a une durée de 5 semaines. Tous les 3 jours, les planaires sont nourries avec 2 mollusques ancyli s.

Le nombre d'œufs pondus par planaire est représenté sur la figure 4.

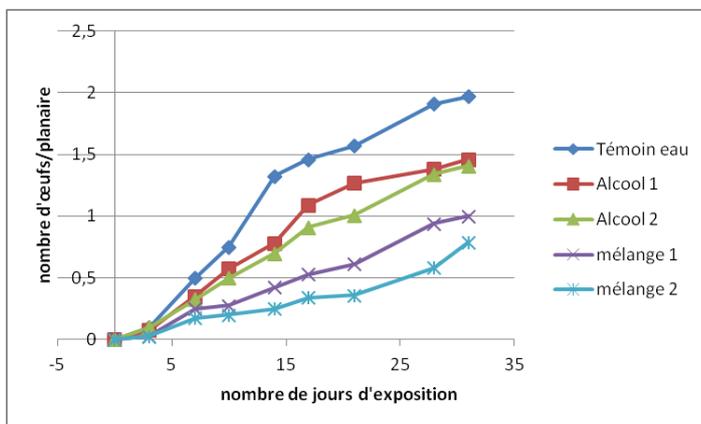


Figure 4 : nombre d'œufs pondus par planaire en fonction des différentes conditions expérimentales.

Les mélanges de psychotropes affectent la reproduction des planaires et ceci de manière dose dépendante. Cependant, l'effluent reste plus reprotoxique que le mélange de médicaments aux concentrations de l'effluent. Il existe donc dans l'effluent des molécules accentuant la toxicité du mélange. Ces molécules peuvent être d'autres médicaments, de la caféine ou des détergents par exemple.

2. Le déplacement

La distance moyenne parcourue par les planaires en présence des mélanges de médicaments n'est pas affectée. Statistiquement, aucune différence significative n'a été mise en évidence en fonction des différentes conditions.

3. La régénération

a) Régénération du corps

La figure 5 représente la régénération du corps des planaires à partir de la tête.

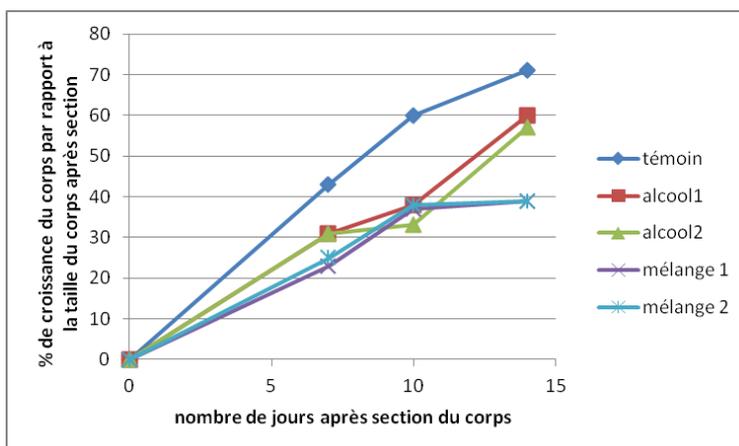


Figure 5 : Régénération du corps des planaires à partir de la tête en fonction des différentes conditions et après 14 jours d'expérimentation.

Les mélanges de médicaments inhibent la croissance des planaires. Après 14 jours d'expérimentation, les planaires exposées aux deux mélanges n'ont eu une croissance que de 39% par rapport à leur taille de départ alors que les témoins ont eu une croissance de 71%.

b) Régénération de la tête

Afin d'évaluer la régénération de la tête des planaires, 4 stades ont été identifiés (cf page 39).

Tous les jours et pendant 7 jours les planaires sont observées à la loupe binoculaire afin d'identifier le stade de régénération de la tête. Les résultats sont présentés sur la figure 6.

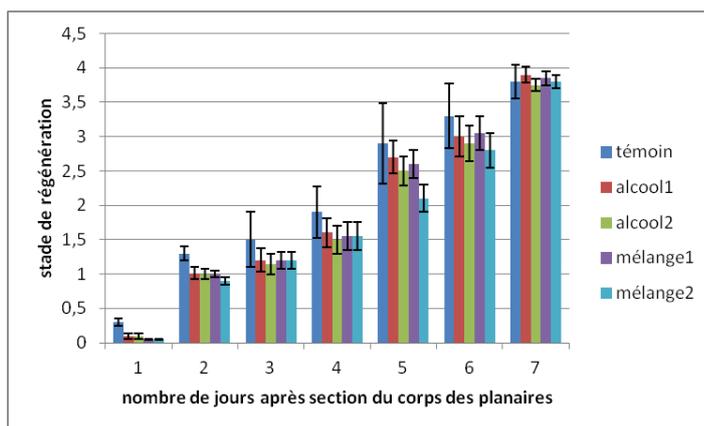


Figure 6 : Régénération des têtes de planaires en fonction des différentes conditions.

Le second mélange de psychotropes correspondant aux concentrations en médicaments de l'effluent perturbe légèrement la régénération de la tête des planaires. La régénération est totale comme pour les autres conditions mais elle est plus lente. Au bout du cinquième jour, les planaires n'ont en moyenne atteint que le stade 2 de régénération alors que dans les autres conditions, c'est le stade 2,5 qui est atteint.

En conclusion, les planaires sont affectées par les mélanges de psychotropes tout particulièrement au niveau de la reproduction qui est une fonction essentielle pour la pérennité des populations de planaires et pour l'équilibre des communautés de macro-invertébrés benthiques des cours d'eau.

XI. Suppléments au rapport : données concernant les molécules pures de psychotropes utilisées isolément.

A. Les tests normalisés

Dans un premier temps, une seule concentration de chaque molécule a été testée afin d'affiner par la suite la concentration provoquant un effet chez les différents organismes testés et pouvoir établir un gradient de toxicité des différentes molécules.

L'acide valproïque, la norfluoxétine et l'oxazepam n'ont pas encore été testés.

Les concentrations testées des autres molécules sont les suivantes :

Sertraline : 1500 µg/l

Citalopram : 1500 µg/l

Fluoxétine : 1500 µg/l

Carbamazépine : 1200 µg/l

Lorazepam : 1180 µg/l

Cyamémazine : 1180 µg/l

Hydroxyzine : 1000 µg/l

1. Test daphnies

Les résultats concernant la toxicité des différents psychotropes pris isolément sont présentés sur la figure 7.

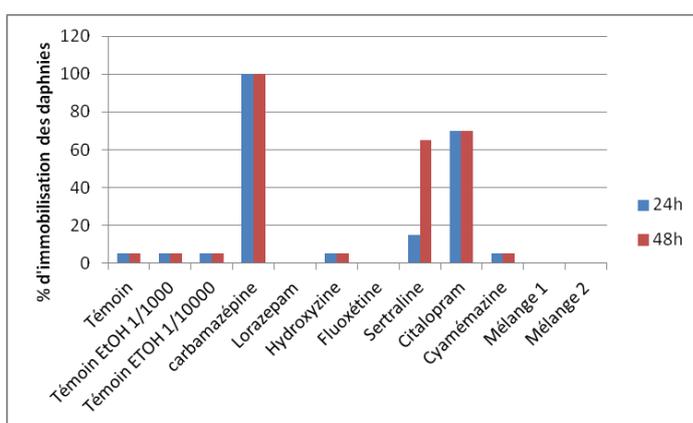


Figure 7 : % d'immobilisation des daphnies après 24h et 48h d'incubation en milieu de culture (témoins), en présence d'éthanol aux concentrations utilisées, en présence des 2 mélanges de psychotropes (mélange 1 = concentration 1 et mélange 2 = concentration 2) et en présence de molécules pures de psychotropes (carbamazépine, lorazepam, hydroxyzine, fluoxétine, sertraline, citalopram et cyamémazine).

La carbamazépine, la sertraline et le citalopram semblent être les molécules les plus toxiques pour les daphnies.

2. Test algues

Les résultats concernant la toxicité des différents psychotropes pris isolément vis-à-vis de l'algue *Selenastrum capricornutum* sont présentés sur la figure 8.

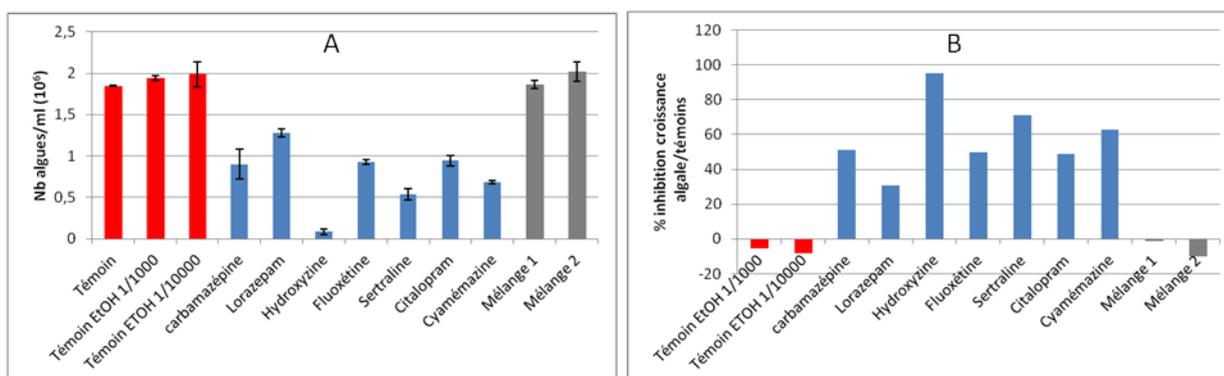


Figure 8 : Nombre de cellules algales (10⁶)/ml chez les témoins, témoins alcool, en présence des deux mélanges de médicaments en présence de molécules pures de psychotropes (carbamazépine, lorazepam, hydroxyzine, fluoxétine, sertraline, citalopram et cyamémazine) (A). % d'inhibition de croissance des algues dans les différentes conditions pré-citées par rapport aux témoins (B).

Tous les psychotropes utilisés provoquent une inhibition de la croissance des algues. La molécule la plus efficace est l'hydroxyzine.

3. Test microtox

Les résultats concernant la toxicité des différents psychotropes pris isolément vis-à-vis de la bactérie *Vibrio fischeri* sont présentés sur la figure 9.

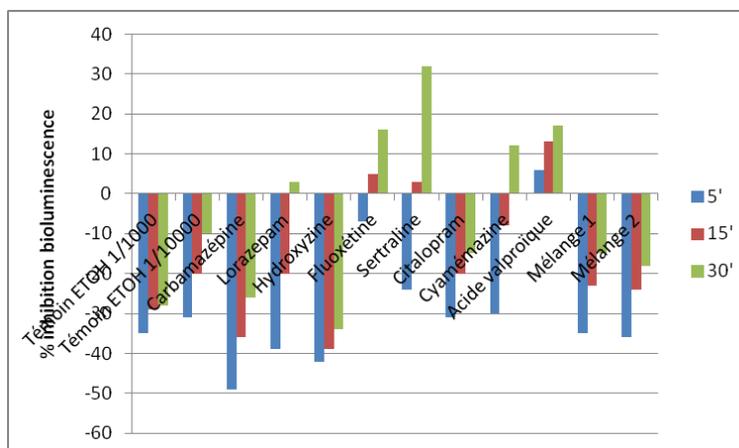


Figure 9 : % d'inhibition de bioluminescence produite par *Vibrio fischeri* après 5 minutes, 15 minutes et 30 minutes d'exposition en présence d'éthanol, des deux mélanges de psychotropes et des molécules pures de psychotropes (carbamazépine, lorazéпам, hydroxyzine, fluoxétine, sertraline, citalopram et cyamémazine).

La molécule la plus toxique pour la bactérie *Vibrio fischeri* semble être la sertraline suivie de la fluoxétine, l'acide valproïque et la cyamémazine.

Tous ces résultats demandent à être affinés pour trouver une concentration efficace, à 50% par exemple, permettant de classer toutes les molécules vis-à-vis de leur toxicité.

B. Tests non normalisés sur planaire *Schmidtea polychroa*

Dans le cas des tests sur les planaires, seules deux molécules ont été utilisées pour leur mode d'action différent et leur éventuelle toxicité issue de données bibliographiques. Ces deux molécules sont la carbamazépine et l'oxazéпам.

Dans les deux cas, 6 concentrations plus le témoin ont été testées : 0.002 mg/L, 0.01 mg/L, 0.1 mg/L, 1mg/L, 5mg/L et 10 mg/L.

1. Le déplacement

Les résultats concernant les effets de l'oxazéпам et de la carbamazépine sur le déplacement des planaires sont présentés sur la figure 10.

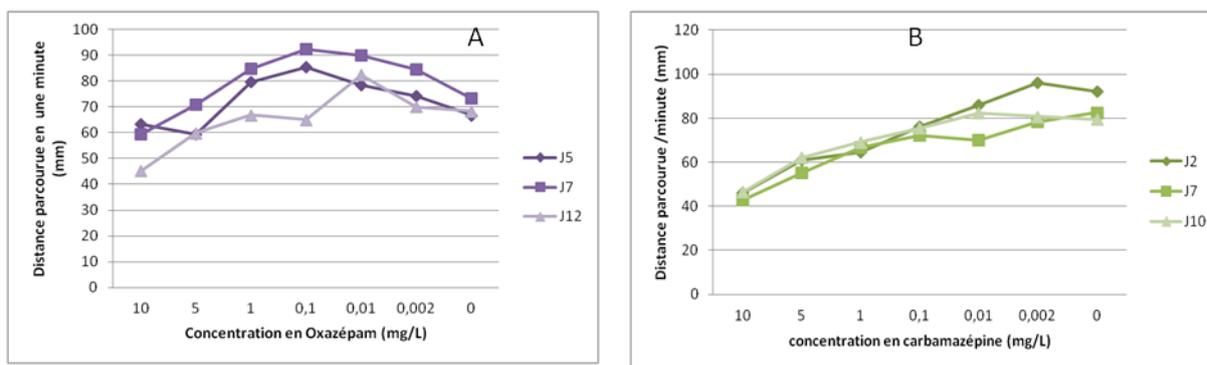


Figure 10 : Effet de l'oxazepam (A) et de la carbamazépine (B) à différentes concentrations sur le déplacement des planaires.

A partir de 0.1 mg/L d'oxazepam, le déplacement des planaires est altéré. Par contre, de faibles concentrations d'oxazepam semblent stimuler le déplacement des planaires.

La carbamazépine ne permet pas de stimuler la motricité des planaires. Au contraire, dès 0.01 mg/L de carbamazépine, le déplacement est perturbé et les planaires parcourent des distances moindres sur une même durée d'expérimentation. A 10 mg/L de carbamazépine, la distance parcourue est deux fois plus faible que chez les témoins alcool.

2. La régénération

Les résultats concernant les effets de l'oxazepam et de la carbamazépine sur la régénération de la tête des planaires sont présentés sur la figure 11.

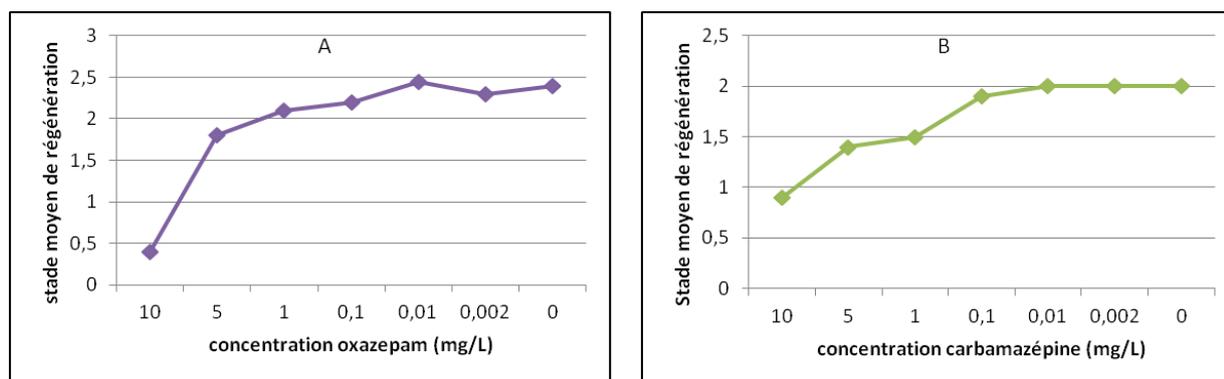


Figure 11 : Effet de l'oxazepam (A) et de la carbamazépine (B) à différentes concentrations sur la régénération de la tête des planaires exprimée par rapport aux stades de régénération (cf page 39).

L'oxazepam et la carbamazépine retarde la régénération de la tête des planaires à partir de 1mg/l de molécule.

La toxicité des molécules prises isolément intervient pour des concentrations très nettement supérieures aux concentrations environnementales. Cependant, en mélange, aux concentrations environnementales, la toxicité apparaît. Il existe donc, un fort effet synergique lorsque les molécules sont utilisées en mélange.

Ces tests utilisant les molécules pures n'ont de but que de définir un classement de toxicité des différentes molécules.