

# UNIVERSITE MONTPELLIER 1

UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET  
BIOLOGIQUES

---

## CONTAMINATION DE MOULES (*MYTILUS SP.*) EN MILIEU MARIN PAR DES SUBSTANCES PHARMACEUTIQUES ET PRODUITS DE SOIN

---

Thèse présentée pour l'obtention du grade de :

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER 1**

ECOLE DOCTORALE : SIBAGHE

(Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosiences, Environnement)

FORMATION DOCTORALE : Sciences de l'eau dans l'environnement continental

N° SECTION CNU : 40 – Sciences du médicament

Par

**Morgane BACHELOT**

Docteur en Pharmacie

**Soutenue le 8 juillet 2010**

### **JURY**

Mme Catherine ALIAUME

Mme Claude CASELLAS

Mr Serge CHIRON

Mr François GALGANI

Mme Catherine GONZALEZ

Mr Dominique MUNARON

Examineur

Directeur de thèse

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Co-directeur de thèse

Mr Jean LESNE

Invité



# Remerciements

## Aux membres du jury

Je tiens tout d'abord à témoigner toute ma reconnaissance aux membres du jury d'évaluation de cette thèse : merci à Mr Serge Chiron, maître de conférences en chimie de l'environnement à l'Université d'Aix Marseille I et à Mr François Galgani, directeur adjoint du laboratoire environnement et ressource de Provence-Azur Corse à Ifremer Bastia ; vos rapports m'ont permis d'améliorer ce manuscrit ; merci à Mme Catherine Aliaume, professeur à l'Université Montpellier 2 sur les écosystèmes lagunaires, à Mme Catherine Gonzalez, professeur en chimie de l'environnement à l'École des Mines d'Alès, membres du jury et à Mr Jean Lesne, responsable de l'unité de recherche et veille sanitaire à l'AFFSET, invité. Merci d'avoir accepté de lire et de juger ce travail.

## A l'équipe d'Hydrosciences Montpellier de la Faculté de pharmacie

Je tiens tout d'abord à remercier Claude Casellas, directrice de ce travail de thèse, pour m'avoir accueillie dans ce laboratoire en stage de master 2, puis pour m'avoir ensuite impliquée dans la définition d'un sujet de thèse et dans la recherche d'une bourse. Enfin, merci pour avoir encadré ce travail, pour m'avoir guidée et m'avoir mise en contact avec des personnes passionnantes. Je remercie Mr Eric Servat, directeur d'Hydrosciences Montpellier ; qui après m'avoir acceptée en Master 2, a soutenue activement ma candidature en thèse et a toujours été présent en cas de besoin. Un grand merci à Elena Gomez et Héléne Fenet pour leur encadrement au cours de ce travail, pour leurs conseils et leurs idées, et pour leur aide précieuse que ce soit dans la dissection de moules ou dans la rédaction de ce manuscrit.

Merci aux deux compères : David et Abdel qui, avec leur blagues incessantes, m'ont permis de relativiser et sans qui le laboratoire ne pourrait pas tourner : merci pour les impressions de thèse, les réparations d'ordinateurs, les cafés, les nettoyages du four micro-onde ou de la GC-MS et les nombreux autres services que vous avez pu me rendre. Merci à Mireille pour avoir su faire face aux pires situations administratives même au dernier moment : tes efforts sont admirables. Merci à Mme Bernadette Picot et Mme Aurélie Escande pour leurs conseils quand j'en ai eu besoin, pour l'ouverture qu'elles ont pu m'apporter sur d'autres sujets que je connaissais moins. A mes co-thésards Olfa, Marie, Arthur, Zhi, Yacouba et Hilmiya, je tiens à dire que les moments passés avec vous ont été enrichissants et qu'en dépit des quelques chamailleries, je garderai un bon souvenir de notre travail en commun : les moments de solidarité resteront les plus forts. A Sonia, « LA co-thésarde », que dire sinon merci, pour ton amitié, pour les bons moments et le soutien dans les moins bons, pour nos déjeuners et nos discussions qui m'ont toujours permis d'avancer. Merci à tous les membres du DSESP que j'ai pu croiser au cours de ces presque 5 ans passés ici. Il a toujours été agréable de travailler avec vous, en particulier, je tiens à citer Lucie et Laetitia qui ne l'ont pas encore été alors que j'ai beaucoup apprécié de vous côtoyer.

## A l'équipe Ifremer du LER-LR

Merci à Thierry Laugier, responsable du Laboratoire Environnement et Ressources du Languedoc-Roussillon pour m'avoir accueillie dans son équipe avec chaleur, pour m'avoir apporté

toute l'aide dont j'ai pu avoir besoin, y compris en participant à mes comités de thèse, à mes pêches aux moules, aux week-ends de moules sitting. Merci ensuite à Dominique Munaron, qui a encadré ce travail et a tout mis en œuvre pour que je puisse effectuer les expérimentations que je souhaitais sur le site de Sète dans les meilleures conditions. Merci pour ton aide et pour ta participation à mes nombreuses séances de prélèvements ou de dissection. Merci à tous ceux qui m'ont aidée dès que j'en avais besoin : Annie, Christian, Danièle, Frank, Jean, Jean-Louis, Laurent, Martine, Nathalie, Ophélie, Patrick, Yves, et j'en oublie sûrement. Et merci à toute l'équipe du laboratoire pour votre sympathie, pour votre soutien et pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail, vous avez toujours rendu agréables mes visites à Sète.

### **A tous les collaborateurs de ce travail**

Merci à Ifremer et à la Région Languedoc-Roussillon, pour avoir soutenu financièrement ce travail.

Merci aux membres de mon comité de pilotage de thèse qui m'ont aidée, m'ont orientée et m'ont prodigué d'utiles conseils : Mme Cécile Miège, Mr Danièle Gouy, Mme Catherine Aliaume.

Merci aux stagiaires avec qui j'ai travaillé. Je tiens en particulier à remercier : Zhi pour sa motivation, son travail efficace et sa gentillesse, tu as bien fait de continuer en thèse ; Sandrine pour les litres d'eau qu'elle a changés et pour l'aide inestimable qu'elle m'a apportée lors des expérimentations d'exposition de moules ; Nicole pour la révélation de combien peut être agréable le travail en équipe et pour son soutien inconditionnel en cette fin de thèse plus encore que pour l'aide qu'elle m'a apportée. Je n'oublie pas Julie, Priska, Mathilde et Aurélie qui ont également participé de près ou de loin à ce travail.

Merci aux équipes ayant participé aux campagnes de prélèvement SCOPE et en particulier Jean-Louis Gonzalez : en plus des prélèvements forts utiles, le travail sur l'Europe a toujours été agréable grâce à vous. Merci aux équipes Ifremer de Nantes et d'Arcachon pour les prélèvements réalisés sur les sites de La Baule et du banc d'Arguin.

Merci à Sanofi-Aventis pour avoir fourni le tétrazépam.

### **Sans oublier...**

Les amis qui sont présents et qui m'ont toujours soutenue. Merci aux parisiens, aux montpelliérains et aux expatriés aux quatre coins de la France ou du monde. Les nombreuses blagues sur mon élevage de moules m'ont toujours permis d'envisager les choses avec humour, même le dimanche matin quand il fallait aller changer l'eau des charmantes bestioles ...

Romain, merci pour tout, et pour comprendre que je n'en dise pas plus.

La famille toujours présente et toujours confiante : Pépette et ses p'tites blagues, Marraine et son apport de magnésium nécessaire pour la survie en thèse, Jean-Yves et sa curiosité, et bien sur Eveline et Jean-Pierre. Merci enfin à mes parents qui ont activement participé à cette thèse : merci pour la pêche aux moules à Saint Pierre Quiberon et pour les corrections d'orthographe. Merci surtout pour avoir toujours cru en moi et pour m'avoir soutenu dans les moments de doute ou de crise. Merci à tous pour les bons repas du dimanche midi qui aident toujours !

# Table des matières

<b>Remerciements</b>	<b>3</b>
<b>Table des matières</b>	<b>5</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>9</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>10</b>
<b>Liste des photographies</b>	<b>12</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>13</b>
<b>Introduction</b>	<b>15</b>
<b>Chapitre 1. Synthèse bibliographique</b>	<b>19</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>21</b>
<b>II. Les filtres UV dans l'environnement</b>	<b>22</b>
II.1. Rayonnement UV et santé humaine	22
II.2. Classes de filtres UV	24
II.3. Occurrence dans l'environnement	27
II.3.1. Dans les stations d'épuration (STEP)	29
II.3.2. Eau de piscine et de douche	32
II.3.3. Dans les eaux douces de surface et les sédiments	32
II.3.4. Dans le milieu marin	34
II.3.5. Dans le biota	34
II.3.6. Dégradation	37
II.4. Conclusion	38
<b>III. Les médicaments psychotropes dans l'environnement</b>	<b>39</b>
III.1. Chez l'Homme	39
III.1.1. Définition des médicaments	39
III.1.2. Les médicaments psychotropes	40
III.1.3. Données de consommation	42
III.1.4. Métabolisation	43
III.2. Occurrence dans l'environnement	45
III.2.1. Sources	49
III.2.2. Dans les stations d'épuration	50
III.2.3. Dans les eaux douces de surface et les sédiments	52
III.2.4. Dans le biota	52
III.2.5. Dégradation dans l'environnement	55
III.3. Conclusion	56
<b>IV. Organismes aquatiques et contaminants organiques</b>	<b>57</b>
IV.1. Accumulation de contaminants organiques dans les organismes aquatiques	57
IV.1.1. Phénomènes biologiques	57
IV.1.2. Définitions	58
IV.1.3. Expression des facteurs	59
IV.2. Présentation du modèle d'étude ( <i>Mytilus galloprovincialis</i> et <i>Mytilus edulis</i> )	60
IV.2.1. Anatomie et physiologie	60
IV.2.2. Ecologie	63

IV.2.3.	Utilisations des bivalves comme outils de surveillance	63
IV.3.	Facteurs influant sur la bioaccumulation d'une substance chimique organique	67
IV.4.	Modélisation de l'accumulation de contaminants dans les organismes	71
IV.4.1.	Relation quantitative structure activité (QSAR)	71
IV.4.2.	Les modèles empiriques de bioaccumulation	71
IV.4.3.	Les modèles à compartiments	72
IV.5.	Etudes de bioaccumulation de contaminants émergents	76
IV.6.	Conclusion	78
<b>Chapitre 2. Méthodes d'analyse des filtres UV et des benzodiazépines dans l'eau de mer et dans <i>M. galloprovincialis</i> : développement et validation</b>		<b>79</b>
<b>I.</b>	<b>Introduction</b>	<b>81</b>
<b>II.</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>85</b>
II.1.	Réactifs	85
II.1.1.	Filtres UV	85
II.1.2.	Benzodiazépines	86
II.1.3.	Etalons internes	87
II.1.4.	Solvants	88
II.2.	Matériel	88
II.3.	Méthodes d'extraction	89
II.3.1.	Eau de mer	89
II.3.2.	<i>Mytilus sp.</i>	90
II.4.	Méthode de purification des extraits de moules	91
II.5.	Analyse des substances en GC-MS	92
II.5.1.	Conditions chromatographiques	92
II.5.2.	Conditions en spectrométrie de masse	94
II.6.	Validation des méthodes	97
II.6.1.	Validation des méthodes d'analyse des filtres UV et des benzodiazépines dans l'eau de mer filtrée contenant du phytoplancton	97
II.6.2.	Validation de la méthode d'analyse des filtres UV et des benzodiazépines dans les moules	99
II.7.	Statistiques	100
<b>III.</b>	<b>Résultats</b>	<b>100</b>
III.1.	Validation de la méthode d'analyse dans l'eau de mer filtrée contenant du phytoplancton	100
III.1.1.	Filtres UV	100
III.1.2.	Benzodiazépines	103
III.2.	Validation de la méthode d'analyse des filtres UV dans les moules	106
III.3.	Validation de la méthode d'analyse des benzodiazépines dans les moules	109
<b>IV.</b>	<b>Synthèse</b>	<b>111</b>
<b>Chapitre 3. Etude de la contamination des moules côtières par les filtres UV</b>		<b>113</b>
<b>I.</b>	<b>Introduction</b>	<b>115</b>
<b>II.</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>119</b>
II.1.	Sites d'études	119
II.1.1.	Etudes de l'impact des activités récréatives	119
II.1.2.	Etudes de l'impact des rejets de station d'épuration	124
II.2.	Echantillonnage	125
II.2.1.	Collecte de moules sauvages	125
II.2.2.	Exposition des moules dans des cages	126

II.3.	Préparation des échantillons de moules _____	127
II.4.	Méthodes d'analyse des filtres UV et des benzodiazépines dans les moules _____	128
II.5.	Statistiques _____	128
<b>III.</b>	<b>Résultats</b> _____	<b>129</b>
III.1.	Etude de la contamination des moules sauvages provenant de sites côtiers français avec activités récréatives _____	129
III.1.1.	Caractérisation des sites et des prélèvements _____	129
III.1.2.	Contamination des moules sauvages provenant de sites côtiers français avec activités récréatives _____	132
III.2.	Contamination de moules exposées à des rejets de STEP _____	137
<b>IV.</b>	<b>Discussion</b> _____	<b>138</b>
IV.1.	Influence des activités récréatives sur la contamination des moules par les filtres UV en milieu côtier _____	139
IV.2.	Influence des rejets de STEP sur la contamination des moules par les filtres UV en milieu côtier _____	140
IV.3.	Accumulation des filtres UV dans les moules en milieu côtier ? _____	141
<b>Chapitre 4.</b>	<b><i>Exposition des moules aux filtres UV en conditions contrôlées</i></b> _____	<b>143</b>
<b>I.</b>	<b>Introduction</b> _____	<b>145</b>
<b>II.</b>	<b>Matériel et méthodes</b> _____	<b>147</b>
II.1.	Conditions d'élevage de moules _____	147
II.2.	Conditions expérimentales _____	148
II.2.1.	Exposition des moules _____	148
II.2.2.	Expérimentations _____	148
II.3.	Traitement des échantillons de moules _____	150
II.4.	Méthodes d'analyse _____	150
II.4.1.	Analyse des filtres UV _____	150
II.4.2.	Analyse de la chlorophylle <i>a</i> et des phéopigments _____	150
II.5.	Statistiques _____	151
<b>III.</b>	<b>Résultats</b> _____	<b>151</b>
III.1.	Suivi des expérimentations _____	151
III.2.	Exposition d'une semaine à 1 µg/bac/jour d'EHMC suivie par une semaine de décontamination _____	152
III.3.	Influence des niveaux d'exposition de l'EHMC _____	153
III.4.	Accumulation de l'EHMC et de l'OC sur 48h _____	154
III.5.	Répartition de l'EHMC dans les organes _____	156
<b>IV.</b>	<b>Discussion</b> _____	<b>157</b>
IV.1.	Exposition à court terme de moules à l'EHMC et à l'OC _____	158
IV.2.	Répartition de l'EHMC dans les organes _____	159
IV.3.	Facteur de bioaccumulation _____	160
IV.4.	Comparaison avec les niveaux de contamination des moules dans l'environnement _____	161
<b>Chapitre 5.</b>	<b><i>Concentrations de benzodiazépines dans les moules : en milieu marin et exposition en conditions contrôlées</i></b> _____	<b>163</b>
<b>I.</b>	<b>Introduction</b> _____	<b>165</b>
<b>II.</b>	<b>Matériel et méthodes</b> _____	<b>167</b>
II.1.	Sites d'études de l'impact des rejets de station d'épuration _____	167
II.1.1.	Emissaire de la station A _____	167
II.1.2.	Emissaire de la station B _____	167
II.1.3.	Site d'arrivée d'une rivière transitoire traversant une agglomération méditerranéenne : l'Huveaune (13) _____	168
II.2.	Exposition des moules en conditions contrôlées _____	168

II.2.1.	Conditions d'élevage des moules	168
II.2.2.	Conditions expérimentales	169
II.3.	Traitement des échantillons de moules	170
II.4.	Méthodes d'analyse	171
II.4.1.	Méthode d'analyse des benzodiazépines	171
II.4.2.	Méthodes d'analyse de la chlorophylle <i>a</i> et des phéopigments dans l'eau	171
II.5.	Statistiques	171
<b>III.</b>	<b>Résultats</b>	<b>172</b>
III.1.	Contamination de moules en zone côtière	172
III.2.	Exposition des moules aux benzodiazépines en conditions contrôlées	172
III.2.1.	Suivi des expérimentations	172
III.2.2.	Cinétique d'accumulation et de décontamination du tétrazépam à 10 µg/l	173
III.2.3.	Cinétique d'accumulation et de décontamination du tétrazépam à 2 µg/l	174
III.2.4.	Cinétique d'accumulation et de décontamination du diazépam à 10 µg/l	175
III.2.5.	Facteurs de bioconcentration	176
<b>IV.</b>	<b>Discussion</b>	<b>177</b>
IV.1.	Niveaux de contamination des organismes aquatiques par les benzodiazépines	177
IV.2.	Accumulation des benzodiazépines dans les moules en conditions contrôlées	178
<b>Chapitre 6. Conclusions et perspectives</b>		<b>183</b>
<b>Références bibliographiques</b>		<b>195</b>
<b>Annexes</b>		<b>207</b>
<b>Annexe 1 : Développement d'un médicament</b>		<b>209</b>
I.1.	Dossier d'AMM	209
I.1.1.	Phase d'essai pré-clinique	209
I.1.2.	Développement clinique	210
I.1.3.	Eléments de pharmacologie	211
I.2.	Evaluation du risque environnemental (EMEA 2006)	213
I.2.1.	Phase 1 : Estimation de l'exposition	214
I.2.2.	Phase 2 : Devenir dans l'environnement et analyse des effets	215
<b>Annexe 2 : Stabilité des filtres UV dans l'eau de mer et dans le phytoplancton</b>		<b>219</b>
<b>Annexe 3 : Stabilité des benzodiazépines dans l'eau de mer</b>		<b>221</b>
<b>Annexe 4 : Résultats des études de bioaccumulation</b>		<b>223</b>
	Protocoles	223
	Accumulation-dose	223
	Cinétique à 10 µg/l	223
	Résultats	223
	Accumulation-dose	223
	Cinétique à 10 µg/l	224
<b>Annexe 5 : Publications</b>		<b>227</b>
	Communications par affiche	227
	Publications scientifiques	227
	Notes d'actualité scientifique	229

## Liste des tableaux

Tableau 1. Indices UV et protections recommandées.....	24
Tableau 2. Principaux filtres UV minéraux, seul le titanium dioxyde est autorisé par l'Union Européenne (Communauté Européenne 1976) .....	25
Tableau 3. Filtres UV autorisés par l'Union Européenne (Communauté Européenne 1976) .....	26
Tableau 4. Propriétés des filtres UV retrouvés le plus fréquemment dans l'environnement .....	29
Tableau 5. Niveaux de contamination du biota en filtres UV.....	35
Tableau 6. Données de consommation de médicaments du système nerveux central remboursés par la sécurité sociale en 2008 (L'Assurance Maladie 2009).....	43
Tableau 7. Propriétés physico-chimiques de quelques médicaments psychotropes retrouvés dans l'environnement .....	48
Tableau 8. Concentrations en médicaments psychotropes dans les stations d'épuration, revue de littérature, (ND = non détecté, NQ = non quantifié).....	51
Tableau 9. Concentrations en médicaments psychotropes dans des organismes aquatiques (ND : non détecté).....	53
Tableau 10. Caractéristiques physicochimiques de l'EHMC, de l'OD-PABA et de l'OC.....	85
Tableau 11. Caractéristiques physicochimiques du tétrazépam et du diazépam .....	86
Tableau 12. Caractéristiques physicochimiques du diazépam-d5, du chrysène-d12 et du PCB 30 ....	88
Tableau 13. Caractéristiques du programme de détection des filtres UV en MS-MS et SIM.....	96
Tableau 14. Caractéristiques du programme de détection des benzodiazépines UV en MS-MS et en SIM .....	97
Tableau 15. Paramètres de linéarité de la méthode d'analyse de l'EHMC, de l'OD-PABA et de l'OC dans l'eau de mer (n = 15) .....	102
Tableau 16. Rendements d'extraction, biais et coefficients de variation (CV) de l'analyse de l'EHMC, de l'OD-PABA et de l'OC dans l'eau de mer contenant du phytoplancton à 1, 10 et 50 µg/l (n = 6).....	102
Tableau 17. Paramètres de linéarité de l'analyse du tétrazépam et du diazépam dans l'eau de mer (n = 15).....	104
Tableau 18. Rendements d'extraction, biais et coefficients de variation (CV) de l'analyse du tétrazépam et du diazépam dans l'eau de mer contenant du phytoplancton à 1, 10 et 50 µg/l (n = 6).....	105
Tableau 19. Paramètres de linéarité de l'analyse de l'EHMC, de l'OD-PABA et de l'OC dans les moules (n = 21) .....	107
Tableau 20. Rendements d'extraction, biais et coefficients de variation (CV) de l'analyse de l'EHMC, de l'OD-PABA et de l'OC dans les moules (n = 4).....	108
Tableau 21. Paramètres de linéarité de l'analyse du tétrazépam et du diazépam dans les moules (n = 18).....	110
Tableau 22. Rendements d'extraction, biais et coefficients de variation (CV) de l'analyse du tétrazépam et du diazépam dans des moules (n = 4).....	110
Tableau 23. Caractéristiques des méthodes d'analyse développées .....	111
Tableau 24. Caractéristiques des sites de prélèvement de moules sauvages sur des sites côtiers français avec activités récréatives liées à l'eau.....	130

Tableau 25. Caractéristiques des prélèvements de moules sauvages sur des sites côtiers français avec activités récréatives liées à l'eau (nr : non renseigné) .....	131
Tableau 26. Indices de conditions (IC) et concentrations en filtres UV dans des moules <i>M. edulis</i> provenant de sites atlantiques d'activités récréatives .....	132
Tableau 27. Indices de condition (IC) et concentrations en filtres UV dans des moules <i>M. galloprovincialis</i> provenant de sites méditerranéens d'activités récréatives .....	133
Tableau 28. Concentrations théoriques et concentrations réelles d'exposition des moules aux filtres UV lors des expérimentations .....	152
Tableau 29. Concentrations en EHMC en ng/g ps dans les organes (n = 1) (branchies, glandes digestives et manteaux) de moules .....	156
Tableau 30. Concentrations d'exposition des moules aux benzodiazépines (n = 6) .....	173
Tableau 31. Etudes physico-chimiques, de devenir et d'effets recommandés dans la partie A de la phase II, d'après EMEA 2006.....	216
Tableau 32. Etudes complémentaires de devenir et d'effets recommandées dans la partie B de la phase II de l'analyse des risques environnementaux pour les médicaments, d'après EMEA 2006 .....	218
Tableau 33. Etudes des voies d'exposition des moules à l'EHMC (n = 2) .....	219

## Liste des figures

Figure 1. Concentrations en filtres UV et abattement dans les stations d'épurations (Balmer et al. 2005; Kupper et al. 2006; Li et al. 2007; Plagellat et al. 2006) .....	31
Figure 2. Concentrations en filtres UV dans le milieu aquatique (Balmer et al. 2005; Buser et al. 2006; Cuderman et Heath 2007; Fent et al. 2009b; Giokas et al. 2004; Giokas et al. 2005; Goksoyr et al. 2009; Jeon et al. 2006; Lambropoulou et al. 2002; Langford et Thomas 2008; Poiger et al. 2004; Rodil et Moeder 2008a; Rodil et Moeder 2008b).....	33
Figure 3. Voies de métabolisation humaine de benzodiazépines (Centre Suisse du Contrôle Qualité) .....	44
Figure 4. Voies de métabolisation humaine du tétrazépam (Baumann et al. 2009) .....	45
Figure 5. Voies d'introduction des médicaments dans l'environnement.....	49
Figure 6. Anatomie d'une moule <i>Mytilus sp.</i> .....	61
Figure 7. Stades de développement sexuel de la moule <i>Mytilus sp.</i> .....	63
Figure 8. Schéma conceptuel du modèle de bioaccumulation cinétique avec un compartiment et équation correspondante .....	73
Figure 9. Principe d'utilisation de l'énergie selon la théorie DEB (d'après Kooijman 2001) .....	76
Figure 10. Isomères E et Z de l'EHMC .....	86
Figure 11. Chromatogrammes en UV à 290 nm de la purification par HPLC, les fractions de collecte sont indiquées en vert et les pics des substances d'intérêt sont repérés.....	91
Figure 12. Chromatogramme en GC-MS d'un extrait d'eau de mer avec phytoplancton contenant un mélange de filtres UV avec étalons interne, détection en full-scan avec sélection des ions majoritaires .....	93

Figure 13. Chromatogramme en GC-MS d'un extrait de moule contenant le tétrazépam et le diazépam à 300 ng/g avec les étalons internes, détection suivant le programme présenté Tableau 14.....	94
Figure 14. Spectre de masse de l'octocrylène en full-scan (en haut) et en MS-MS sur l'ion 248 avec une énergie de collision de 1,45 et un Qz de 0,3 (en bas).....	95
Figure 15. Chromatogrammes en MS-MS sur l'ion 248, avec détection des ions 165+176+220, d'un extrait blanc d'eau de mer contenant du phytoplancton (en haut) et d'un extrait dopé à 5 µg/l d'OC (en bas).....	101
Figure 16. Chromatogrammes en MS-MS sur l'ion 256, avec détection des ions 221, d'un extrait blanc d'eau de mer contenant du phytoplancton (en haut) et d'un extrait dopé à 5 µg/l de diazépam (en bas) .....	104
Figure 17. Chromatogrammes en MS-MS sur l'ion 178, avec détection des ions 121+132+161, d'un extrait blanc de moules (en haut) et d'un extrait de moules dopées à 50 ng/g ps d'EHMC (en bas) .....	106
Figure 18. Chromatogrammes en MS-MS sur l'ion 253, avec détection de l'ion 196+225, d'un extrait blanc de moules (en haut) et d'un extrait de moules dopées à 100 ng/g ps de tétrazépam (en bas) .....	109
Figure 19. Carte des sites de prélèvement de moules sauvages sur des plages françaises en 2008 ..	120
Figure 20. Boîtes à moustaches (min à max) des concentrations en EHMC dans les moules en ng/g ps en fonction de la période de prélèvement .....	134
Figure 21. Boîtes à moustaches (min à max) des concentrations en EHMC dans les moules en ng/g ps en fonction des sites .....	135
Figure 22. Boîtes à moustaches (min à max) des concentrations en EHMC dans les <i>M. edulis</i> prélevées en Atlantique et dans les <i>M. galoprovincialis</i> prélevées en Méditerranée sur les sites M-P2, M-P4, M-P5 et M-P7 .....	136
Figure 23. Boîtes à moustaches (min à max) des concentrations en EHMC dans les moules en ng/g ps en fonction du type de site .....	137
Figure 24. Concentrations en EHMC dans les moules (moyenne et écart-type, n = 3) lors de l'étude de la cinétique d'accumulation et d'élimination dans les moules à 1 µg/bac/jour d'EHMC, la période d'exposition est en rose, la période d'épuration non .....	153
Figure 25. Concentrations en EHMC dans les moules (moyenne et écart-type, n = 3) au cours de l'étude de la relation accumulation-dose de l'accumulation de l'EHMC pendant 1 semaine... ..	154
Figure 26. Concentrations en EHMC dans les moules (moyenne et écart-type, n = 3) lors de l'étude du comportement de l'EHMC à 10 µg/bac/jour sur 48 h, les apports de phytoplancton dopé sont en rose .....	155
Figure 27. Concentrations en OC dans les moules (moyenne et écart-type, n = 3) lors de l'étude du comportement de l'OC à 10 µg/bac/jour sur 48 h, les apports de phytoplancton dopé sont en rose.....	155
Figure 28. Schéma de déroulement de l'exposition des moules aux benzodiazépines.....	170
Figure 29. Concentrations de tétrazépam dans les moules (moyenne et écart-type, n=3) lors de l'étude de la cinétique d'accumulation et de d'élimination à 10 µg/l, la période d'exposition est indiqué en rose .....	174
Figure 30. Concentrations de tétrazépam dans les moules (moyenne et écart-type, n=3) lors de l'étude de la cinétique d'accumulation et de d'élimination à 2 µg/l, la période d'exposition est indiqué en rose .....	175

Figure 31. Concentrations de diazépam dans les moules (moyenne et écart-type, n=3) lors de l'étude de la cinétique d'accumulation et de d'élimination à 10 µg/l, la période d'exposition est indiquée en rose .....	176
Figure 32. Concentrations en EHMC (moyenne et écart-type, n = 3) dans l'eau de mer contenant du phytoplancton en µg/bac pendant 24h .....	220
Figure 33. Concentrations en TZP (moyenne et écart-type, n = 2) dans l'eau de mer contenant du phytoplancton en µg/l pendant 24h.....	221
Figure 34. Concentrations en DZP (moyenne et écart-type, n = 2) dans l'eau de mer contenant du phytoplancton en µg/l pendant 24h.....	222
Figure 35. Concentrations en EHMC dans les moules (moyenne et écart-type, n = 3) en ng/g ps au cours de l'étude de la relation accumulation-dose de l'accumulation de l'EHMC pendant 1 semaine .....	224
Figure 36. Concentrations en EHMC dans les moules (moyenne et écart-type, n = 3) lors de l'étude de la cinétique d'accumulation et d'élimination à 10 µg/bac/jour d'EHMC, la période d'exposition est en rose.....	225

## Liste des photographies

Photographie 1. Site de prélèvement de Saint Pierre Quiberon (A-P1).....	123
Photographie 2. Banc d'Arguin (A-B).....	123
Photographie 3. Site de prélèvement de la plage de La Roquille au Cap d'Agde (M-P1) .....	123
Photographie 4. Site de prélèvement de la plage des Quilles à Sète (M-P3).....	123
Photographie 5. Site de prélèvement de la plage du Quartier du Grau à Frontignan (M-P4).....	123
Photographie 6. Site de prélèvement sur la plage Saint-Pierre de Palavas (M-P5) .....	123
Photographie 7. Site de prélèvement dans le port de Palavas-les-Flots (M-Po).....	123
Photographie 8. Site de prélèvement de la plage du centre ville à La Grande Motte (M-P6) .....	123
Photographie 9. Site de prélèvement de la plage Rive Droite du Grau du Roi (M-P7).....	123
Photographie 10. Site de rejet de l'émissaire de la STEP A.....	125
Photographie 11. Site de rejet de la STEP B .....	125
Photographie 12. Prélèvements de moules sauvages pour l'analyse de filtres UV dans le port de Palavas .....	127
Photographie 13. Prélèvements de moules sauvages pour l'analyse de filtres UV sur un épis de la plage de la Roquille au Cap d'Agde .....	127
Photographie 14. Système de transplantation de moules avant la mise à l'eau sur le pont de l'Europe .....	127
Photographie 15. Mesure d'une moule avec un pied à coulisse .....	127
Photographie 16. Expérimentation de bioaccumulation en laboratoire .....	147
Photographie 17. Expérimentation de bioaccumulation en laboratoire .....	169

## Liste des abréviations

Remarque : certaines abréviations utilisées n'ont volontairement pas été traduites en français car la forme anglo-saxonne est plus utilisée en France que leur traduction française.

ADME : Absorption, Distribution, Métabolisation, Excrétion

AFSSAPS : Agence française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

AO : Acide Oxolinique

ATD : Antidépresseur

BAF : Facteur de bioaccumulation (BioAccumulation Factor)

BP-3 : Benzophénone-3

BCF : Facteur de bioconcentration (BioConcentration Factor)

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BZD : Benzodiazépine

CNEEIC : Collège National d'Experts en Environnement de l'Industrie Chimique

CPG : Chromatographie par Perméation de Gel

CV : Coefficient de Variation

CYP450 : Cytochrome P450

DEB : Budget dynamique énergie (Dynamic Energy Budget)

DDT : DichloroDiphénylTrichloroéthane

DZP : Diazépam

EHMC : Ethyl Hexyl MéthoxyCinnamate

EI : Etalon Interne

EMA : Agence Européenne pour l'Évaluation des Médicaments

GABA : Acide Gamma-AminoButyrique

GC : Chromatographie gazeuse (Gas Chromatography)

IC : Indice de Condition

IFREMER : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER

INCI : Nomenclature Internationale des Ingrédients Cosmétiques

INPES : Institut National de Prévention et d'Education pour la Santé

IRSN : Inhibiteur de la Recapture de la Sérotonine et de la Noradrénaline

ISRS : Inhibiteur Sélectif de la Recapture de la Sérotonine

HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique

HMS : Homosalate

HPLC : Chromatographie liquide haute performance (High Performance Liquid Chromatography)

$K_{ow}$  : Coefficient de partage octanol-eau

LC : Chromatographie liquide (Liquid Chromatography)

LD : Limite de Détection

LQ : Limite de Quantification

MAE : Extraction assistée par micro-onde (Micro-wave Assisted Extraction)

MAME : Extraction micellaire assistée par micro-onde (Micro-wave Assisted Micellar Extraction)

MS : Spectrométrie de masse (Mass Spectrometry)  
4-MBC : 4-Méthyl Benzylidène Camphre  
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
OC : OctoCrylène  
OCDE : Organisation et Coopération de Développement Economiques  
OD-PABA : Ethylhexyl diméthyl acide 4-*p*-aminobenzoïque  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
OSPAR : OSlo-PARis  
OT : Octyl Triazone  
OTC : OxyTétraCycline  
PABA : Acide 4-*p*-aminobenzoïque  
PBPK : Pharmacocinétique à base physiologique (Physiologically-Based Pharmacokinetic)  
PBR : récepteur périphériques aux benzodiazépines (Peripheral Benzodiazepine Receptor)  
PBT : Persistant, Bioaccumulables et Toxiques  
PCB : PolyChlorobiPhényle  
PEC : Concentration Prévisible dans l'Environnement  
pf : poids frais  
POCIS : échantillonneurs intégratifs de substances chimiques organiques polaires (Polar Organic Chemical Integrative Sampler)  
PNEC : Concentration sans effet prévisible (Previsible Non Effect Concentration)  
PPCP : Substances pharmaceutiques et produits de soin (Pharmaceuticals and Personal care Products)  
ps : poids sec  
QSAR : relation quantitative structure activité (Quantitative Structure-Activity Relationship)  
RINBIO : Réseau Intégrateur Biologique, programme IFREMER  
RP : Phase inverse (Reverse Phase)  
SCCP : Comité scientifique européen pour les Produits de Consommation (Scientific Committee on Consumer Products)  
SPMD : dispositifs à membrane semi-perméable (SemiPermeable Membrane Device)  
SIM : mode de sélection d'ion : Selected Ion Monitoring  
SMR : Service Médical Rendu  
SNC : Système Nerveux Central  
SPE : Extraction en phase solide (Solid Phase Extraction)  
STEP : STation d'EPuration  
TZP : Tétrazépam  
UE TGD : European Chemicals Bureau, Technical Guidance Document  
UV : UltraViolet

## Introduction

Les contaminants issus des utilisations de produits pharmaceutiques et des activités de soin sont devenus une préoccupation sociétale au cours de ces dernières années : leur présence avérée dans les eaux de surface et le manque de connaissances sur leur devenir dans l'environnement, sur leurs impacts potentiels sur la santé humaine et sur les écosystèmes sont devenus un sujet d'actualité tant pour les scientifiques et que pour les organismes de réglementation environnementale. Ces contaminants, regroupés avec nombre d'autres substances sous le terme de contaminants émergents, sont définis par Daughton et Ternes (1999) comme un groupe de milliers de substances chimiques d'une très large diversité autant du point de vue de leurs propriétés physico-chimiques que de leurs usages ; leur principale caractéristique commune est de se retrouver dans l'environnement aquatique à des concentrations extrêmement faibles, de l'ordre du ng au µg pour quelques exceptions. Le terme émergent ne se réfère pas forcément à la présence de ces contaminants dans l'environnement mais plus à la prise de conscience de leur présence dans l'environnement, conséquence des capacités récentes de nos méthodes d'analyse à les quantifier (Daughton 2004). Ils comprennent entre autres, les médicaments, les parfums, les cosmétiques, les filtres UV et les retardateurs de flammes. Parmi les contaminants émergents, les médicaments et les produits de soin personnel (Pharmaceuticals et Personnel Care Products : PPCP) sont classiquement regroupés en raison de leurs usages bénéfiques pour la protection ou le soin du corps humain. Pour les produits de soin, certains ont montré par exemple, des activités mimétiques de celles des hormones (Gomez et al. 2005). Pour les médicaments, conçus pour être actifs biologiquement, la préoccupation est liée à la diversité des modes d'action et au peu d'informations encore disponibles sur leur devenir dans l'environnement et leur impact potentiel sur des organismes non cibles. Daughton et Ternes (1999) ont réalisé une synthèse des données de la littérature sur la problématique environnementale des PPCP. Par la suite, les travaux de Crane et al. 2006 et de Fent et al. 2006 proposent une première identification et hiérarchisation des risques écotoxicologiques liés à ces substances.

Après utilisation, les médicaments et les produits de soin sont éliminés par deux voies majoritaires : par introduction directe lors d'activités récréatives ou indirectement via les eaux usées. En effet, les médicaments après usage thérapeutique sont principalement excrétés par voie urinaire ou fécale. Les produits de soin appliqués sur la peau sont transférés du corps vers le linge, vers les eaux de lavage, ou vers les eaux de baignade au cours d'activités récréatives (Kümmerer 2009). Les médicaments et les produits de soin ont fait l'objet de nombreux travaux au cours de ces 10 dernières années, des revues de littérature synthétisent ces travaux dont Kümmerer 2009; Nikolaou et al. 2007 . Ces substances ont été retrouvées dans les stations d'épuration, dans les lacs et les rivières,

dans les eaux souterraines et dans les sols. En revanche, peu d'études sont disponibles sur le milieu marin. En mer, seule la présence de la caféine, de l'ibuprofène et de ses métabolites a été rapportée (Siegener et Chen 2002; Weigel et al. 2004; Weigel et al. 2002).

Pourtant, le milieu marin côtier est le récepteur ultime de nombre de contaminants, y compris les PPCP. Le devenir des contaminants diffère en milieu marin par rapport aux eaux douces de surface de par ses caractéristiques physico-chimiques : force ionique, pH ou salinité ; par exemple, le temps de demi-vie du triclosan est de 8 jours dans l'eau douce et de 4 jours en eau de mer (Aranami et Readman 2007 in Bachelot et Casellas 2007). La dilution des contaminants est très importante mais la zone de dilution est dépendante des courants. Ainsi, les apports par les eaux douces aboutissent à des zones de mélange qui changent en fonction des courants.

Afin d'améliorer la qualité des eaux de surface continentales, la réduction des rejets des stations d'épuration est devenue une priorité. En zone côtière, ceci s'est traduit par une augmentation du nombre d'émissaires en mer permettant de rejeter les eaux usées, traitées ou non. La mise en place d'émissaires marins permet de limiter les rejets dans les rivières se déversant dans les zones côtières en les émettant directement à distance de la côte, dans des zones hydrologiques où la dilution et les courants sont plus favorables à la protection de la côte. Cependant, compte tenu de l'augmentation de population et des activités prévues sur les zones côtières dans les années à venir, la spécificité des villes côtières et l'impact de leurs émissaires restent à étudier.

Aborder la contamination du milieu marin côtier nécessite une méthodologie spécifique avec la sélection de compartiments à étudier, de méthodes analytiques adaptées. Les volumes d'eau du milieu marin sont très importants, associés à des concentrations dissoutes très faibles. Pour faciliter la détection des substances en milieu côtier, il apparaît nécessaire d'orienter les études vers des compartiments concentrateurs comme la microcouche de surface ou les sédiments, vers des méthodes d'échantillonnage intégrateur comme les échantillonneurs passifs et vers des organismes « bioconcentrateurs ». Les méthodes analytiques doivent être adaptées à ce milieu. Dans le milieu marin, des médicaments ont pu être quantifiés dans des estuaires (Benotti et Brownawell 2007; Thomas et Hilton 2004) et des filtres UV dans des zones d'activités récréatives (Langford et Thomas 2008). L'étude de la contamination par les PPCP en milieu côtier est restée ciblée sur ces quelques zones spécifiques ; aucun suivi élargi de la contamination côtière n'a été effectué. Pour réaliser un tel suivi, il faut choisir une technique qui permette la concentration de ces contaminants et qui puisse être mise en place à large échelle. Les capteurs passifs sont proposés pour le suivi des contaminants organiques : des dispositifs à membrane semi-perméables (SemiPermeable Membrane Device (SPMD)) sont utilisés pour le suivi des filtres UV (Goksoyr et al. 2009) et des échantillonneurs

intégratifs de substances chimiques organiques polaires (Polar Organic Chemical Integrative Sampler : POCIS) pour le suivi de médicaments (Togola et Budzinski 2007). Cependant, l'utilisation de ces échantillonneurs nécessite une calibration en laboratoire pour pouvoir traduire une concentration environnementale et le développement de méthodes d'analyse adaptées. De plus, ils ne rendent pas compte de la métabolisation des molécules d'intérêt dans les organismes vivants. Les moules (*Mytilus sp.*) sont utilisées en biosurveillance pour le suivi de la contamination par des polluants persistants bioaccumulables et toxiques comme les HAP ou les PCB (Andral et al. 2004). C'est une espèce bioconcentratrice qui présente à priori, l'avantage de refléter la fraction biodisponible et l'exposition réelle d'organismes (David et al. 2010). Elles sont présentes sur tout le littoral français sont aisément manipulables, peu chères et abondantes

Parmi les produits de soin, les filtres UV comptent des congénères lipophiles dont l'éthylhexylméthoxycinnamate ( $\log K_{ow} = 5.8$ ) et l'octocrylène ( $\log K_{ow} = 6.88$ ) qui sont les filtres UV les plus utilisés dans les produits de protection solaire (Rastogi 2002). Ces substances ont été retrouvées à plusieurs reprises dans des poissons de lacs et de rivières et dans des moules d'eau douce (Balmer et al. 2005; Buser et al. 2006; Fent et al. 2009b). L'OC et l'EHMC atteignent des concentrations importantes dans l'eau de mer en zones côtières d'activités récréatives (Langford et Thomas 2008), pourtant aucune donnée n'est disponible quant à la présence de ces contaminants dans les organismes en milieu côtier. Parmi les médicaments, les psychotropes sont un groupe de substances créées pour agir sur le système nerveux central et devant pour cela passer la barrière hémato-encéphalique. Ces substances font partie des médicaments ayant un coefficient de partage octanol-eau ( $K_{ow}$ ) relativement élevés, bien que de l'ordre de 3 uniquement. Certains ont été quantifiés dans des poissons d'eau douce (Ramirez et al. 2009; Schultz et al. 2010). Les benzodiazépines sont une classe de psychotropes utilisés dans le monde entier (International narcotics control board 2010). Le diazépam, deuxième congénère utilisé au niveau mondial (International narcotics control board 2010), a été quantifié dans le foie de poissons marins (Kwon et al. 2009). Il est, par ailleurs, un des métabolites du tétrazépam qui est, en France, le congénère le plus consommé en tonnes (L'Assurance Maladie 2009). A notre connaissance, le tétrazépam n'a été recherché qu'une fois dans l'environnement (González Alonso et al. 2010).

L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier la contamination de 3 filtres UV : l'EthylHexyl MéthoxyCinnamate (EHMC), l'OctoCrylène (OC) et l'Octyl Diméthyl Acide p-AminoBenzoïque (OD-PABA), et de 2 benzodiazépines : le diazépam (DZP) et le tétrazépam (TZP), dans les moules marines (*Mytilus sp.*). Pour cela, le travail se décline en 3 sous-objectifs :

- Développer des méthodes d'analyse de filtres UV et de benzodiazépines dans les moules et dans l'eau de mer ;
- Evaluer les niveaux de contamination des moules en milieu marin côtier par 3 filtres UV et 2 médicaments ;
- Effectuer des expositions de moules en conditions contrôlées afin de mieux comprendre le lien existant entre la contamination du milieu marin et ces organismes biofiltreurs.

Conformément aux objectifs énoncés, le travail est organisé dans ce document de la manière suivante :

Le **Chapitre 1** est consacré à une synthèse bibliographique sur les filtres UV et les médicaments psychotropes dans l'environnement : leurs principales caractéristiques sont rappelées et les concentrations dans le milieu aquatique sont présentées. Dans un deuxième temps, des connaissances concernant la bioaccumulation de substances chimiques organiques dans les organismes et plus particulièrement dans la moule sont présentées ; quelques études de bioaccumulation de PPCP sont exposées. Enfin, les paramètres présentés comme influant sur la bioaccumulation de substances chimiques organiques et quelques propositions de modélisation sont rapportés.

Le **Chapitre 2** de ce travail présente la mise au point et la validation des méthodes de dosage des 3 filtres UV et des 2 benzodiazépines étudiés dans deux matrices différentes : l'eau de mer et les moules.

Le **Chapitre 3** expose l'étude de la contamination par les filtres UV de *Mytilus sp.* en milieu côtier. Trois filtres UV ont ainsi été recherchés dans des moules issues de sites potentiellement contaminés par des filtres UV : des sites d'activités récréatives et des sites recevant des rejets de stations d'épuration.

Le **Chapitre 4** est consacré à l'exposition de moules (*Mytilus galloprovincialis*) par des filtres UV en conditions contrôlées. Des cinétiques d'accumulation et de décontamination de l'EHMC et de l'OC ont été réalisées en exposant les moules à travers leur alimentation (phytoplancton). La répartition dans les différents organes de la moule a été étudiée pour l'EHMC.

Le **Chapitre 5** présente les niveaux de concentrations de tétrazépam et de diazépam dans des moules (*Mytilus galloprovincialis*) exposées par dans des cages sur des sites recevant des rejets de STEP et dans des moules exposées à ces substances en conditions contrôlées : étude des cinétiques d'absorption et d'élimination.

# **Chapitre 1. Synthèse bibliographique**



# I. Introduction

Ce travail de thèse s'intéresse à la contamination en milieu marin par des PPCP. Pour appréhender cette problématique, nous avons choisi de travailler sur des filtres UV et sur des médicaments psychotropes. Avant d'exposer les résultats du travail de thèse, une synthèse bibliographique des connaissances sur ces substances est effectuée. Dans la première et la deuxième partie de cette synthèse, les connaissances sur les filtres UV et les médicaments psychotropes dans le milieu aquatique sont présentées, en se concentrant sur les molécules étudiées par la suite. Dans ces parties, après une présentation de leurs utilisations, le devenir dans l'environnement de ces substances est exposé, des émissions aux milieux récepteurs. Les émissions sont associées aux usages : que ce soient les filtres UV ou les médicaments, ils sont utilisés, entre autre, pour prévenir ou traiter des problèmes de santé humaine.

La troisième partie de cette synthèse bibliographique traite des contaminants organiques dans les organismes aquatiques. Le modèle biologique que nous avons retenu, le bivalve *Mytilus galloprovincialis*, est présenté. Quelques études de bioaccumulation de PPCP sont exposées. Les facteurs influant sur l'accumulation de contaminants organiques dans les organismes aquatiques sont exposés ainsi que quelques modèles utilisés principalement pour étudier la bioaccumulation de contaminants Persistants, Bioaccumulables et Toxiques.

## **II. Les filtres UV dans l'environnement**

La directive européenne 76/768/CEE du 27 juillet 1976 définit comme produits cosmétiques « toute substance ou préparation destinée à être mise en contact avec les diverses parties superficielles du corps humain ou avec les dents et les muqueuses buccales en vue, exclusivement ou principalement, de les nettoyer, de les parfumer, d'en modifier l'aspect et/ou de corriger les odeurs corporelles et/ou de les protéger ou de les maintenir en bon état ». Les filtres UV sont définis par cette directive comme des substances qui, contenues dans des produits cosmétiques de protection solaire, sont destinées spécifiquement à filtrer certaines radiations pour protéger la peau contre certains effets nocifs de ces radiations. Ces filtres peuvent être ajoutés à d'autres produits cosmétiques. Cette directive prévoit une liste limitative de 28 substances pouvant être utilisées comme filtre UV en cosmétique, ainsi que les concentrations maximales à utiliser (Tableau 3). Comme les médicaments, l'utilisation des cosmétiques est donc liée au corps humain. Ainsi, l'émission de filtres UV contenus dans les cosmétiques dans le milieu aquatique se fait principalement par les eaux de lavage du corps humain ou des ses vêtements : ils se retrouvent dans le compartiment aquatique, transportés par les eaux de station d'épuration ou insérés directement lors d'activités récréatives.

En plus de leur utilisation en cosmétologie pour protéger la peau des rayonnements UV, les filtres UV peuvent être utilisés pour protéger certains composants de produits cosmétiques, éviter la dégradation des polymères par les rayons UV dans des plastiques (Schlumpf et al. 2004), pour stabiliser la couleur des textiles (Soto et Sonnenschein 2005), et dans l'industrie alimentaire, en surface des emballages, pour préserver le contenu. Dans ce cas, les filtres UV sont soumis à la directive européenne 67/548/CE du 27 juin 1967 relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses. Ces utilisations induisent d'autres sources d'émission dans l'environnement en plus que celles liées à leur utilisation en cosmétique : rejets industriels et effluents de STEP.

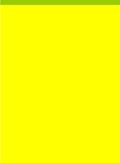
### **II.1. Rayonnement UV et santé humaine**

Près de 5% de l'énergie du soleil est émise sous forme de rayonnement UV. Ces rayons UV sont classés dans trois catégories en fonction de leur longueur d'onde : les UV-A (400-315 nm), les UV-B (315-280 nm) et les UV-C (280-10 nm). Toutefois, en raison de l'absorption des UV par la couche d'ozone de l'atmosphère, 99 % de la lumière UV qui atteint la surface de la terre appartient à la gamme des UV-A, les UV B constituant la part restante. Les UV traversent l'atmosphère même par temps froid ou nuageux.

Chez l'homme, le rayonnement UV en petite quantité est bénéfique et indispensable à la synthèse de la vitamine D. Les rayons UV servent ainsi à traiter plusieurs maladies, dont le rachitisme, le psoriasis, l'eczéma et l'ictère. Cependant, une exposition prolongée au rayonnement UV peut avoir des effets néfastes aigus et chroniques au niveau cutané, oculaire et immunitaire (Lucas et al. 2006). Au niveau ophtalmique, les UV provoquent des désagréments allant du simple œil rouge à des troubles plus sérieux : affections de la rétine, inflammations, apparition prématurée de la cataracte. Au niveau cutané, le coup de soleil (érythème) est l'effet aigu le mieux connu de l'exposition excessive aux UV, c'est une brûlure locale de l'épiderme d'étendue et de degré variables due aux rayons ultraviolets A et B. La répétition de coups de soleil augmente fortement le risque de cancer cutané, surtout si elle a lieu dans l'enfance. A plus long terme, le vieillissement cutané prématuré est une des conséquences d'une surexposition solaire. Les effets se manifestent 10 ou 20 ans après les irradiations par des taches pigmentaires, des kératoses actiniques, des pétéchies, une accentuation de la sécheresse cutanée et des rides... Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) classe comme cancérigène les radiations solaires (groupe 1) en répertoriant les UVA et UVB comme probablement cancérigènes (groupe 2A). Deux types de cancers de la peau sont induits par les UVA et B : les carcinomes et les mélanomes. Les carcinomes sont les plus fréquents (95% de l'ensemble des cancers cutanés). En France, plus de 50 000 personnes par an en sont atteintes et presque toutes en guérissent. Le mélanome est plus dangereux. Chaque année en France, 4 000 à 5 000 cas sont découverts, 1 000 personnes en meurent (Lucas et al. 2006). Si on ne reconnaît pas le mélanome dès son stade initial, il peut croître et générer des métastases. En outre, tout porte à croire que l'intensité du rayonnement UV dans l'environnement pourrait supprimer l'immunité à médiation cellulaire et renforcer ainsi le risque de maladies infectieuses, tout en limitant l'efficacité des vaccinations (Lucas et al. 2006).

En raison des dangers que représentent les rayons UV pour la santé, de nombreuses campagnes de prévention sont mises en place au niveau mondial : par l'OMS (projet mondial INTERSUN), au niveau européen ou au niveau national par l'INPES (campagne de communication "Prévention solaire"). Les mesures de protections préconisées par ces programmes dépendent de l'intensité des rayons UV (Tableau 1). L'indice UV est une norme définie par l'OMS, afin d'harmoniser la mesure du niveau de rayonnement UV dans le monde. C'est une échelle de mesure de l'intensité du rayonnement UV du soleil, et du risque qu'il représente pour la santé. Il se décline en 5 catégories, correspondant à un niveau de risque (Tableau 1). Pour chaque niveau de risque, des mesures de protection sont recommandées.

**Tableau 1. Indices UV et protections recommandées**

Indice UV	Risque	Couleur	Protection(s) recommandée(s)
1 - 2	Faible		Port de lunettes de soleil en cas de journées ensoleillées.
3 - 5	Modéré		Couvrez-vous, portez un chapeau et des lunettes de soleil. Appliquez un <b>écran solaire</b> de protection moyenne surtout si vous êtes à l'extérieur pendant plus de 30 min. Cherchez l'ombre aux alentours de midi quand le soleil est au zénith.
6 - 7	Élevé		Réduisez l'exposition entre 12h et 16h. Appliquez un <b>écran solaire</b> de haute protection, portez un chapeau et des lunettes de soleil, et placez-vous à l'ombre.
8 - 10	Très élevé		Sans protection, la peau sera endommagée et peut brûler. Évitez l'exposition au soleil entre 12h et 16h. Recherchez l'ombre, couvrez-vous, portez un chapeau et des lunettes de soleil, et appliquez un <b>écran solaire</b> de très haute protection.
11 +	Extrême		La peau non protégée sera endommagée et peut brûler en quelques minutes. Évitez toute exposition au soleil, et si ce n'est pas possible couvrez-vous absolument, portez un chapeau et des lunettes de soleil, et appliquez un <b>écran solaire</b> de très haute protection.

Les premières mesures de protection recommandées sont d'éviter l'exposition au soleil lors des périodes à indice UV élevé, puis, les mesures de protection mécanique de la peau et des yeux sont mises en avant. Enfin, l'utilisation d'écrans solaires est préconisée. Les substances actives de ces écrans solaires sont les filtres ultraviolets (filtres UV). Un filtre UV est une substance capable de filtrer certaines radiations pour protéger la peau contre les effets nocifs de ces radiations. Les filtres UV sont les ingrédients actifs des crèmes solaires.

## II.2. Classes de filtres UV

Il existe deux catégories de filtres UV : les filtres minéraux qui reflètent ou dispersent les rayons UV et les absorbants chimiques qui absorbent les rayons UV. Généralement, plusieurs filtres UV sont combinés dans une même formulation, afin de recouvrir une plus grande gamme de longueur d'onde et d'obtenir un plus grand indice de protection.

Les filtres minéraux sont des poudres inertes et opaques qui reflètent la lumière (Tableau 2). Ce sont l'oxyde de zinc (ZnO) et le dioxyde de titane (TiO<sub>2</sub>) qui sont utilisés dans les crèmes solaires. Ces pigments blancs reflètent et diffusent les radiations UV (UVA et UVB) mais aussi une partie de la lumière visible, en agissant comme un miroir. Les écrans minéraux ne pénètrent pas dans la peau mais restent à la surface. On les retrouve généralement dans les produits solaires destinés aux peaux sensibles et aux enfants.

Les premiers produits solaires contenant des filtres minéraux étaient difficiles à étaler et laissaient des traces blanchâtres. Pour diminuer les inconvénients de ces produits solaires, les mêmes filtres minéraux sont utilisés avec des particules plus petites qui réfléchissent les UV mais pas la lumière visible, cela inclut l'utilisation de nanoparticules.

**Tableau 2. Principaux filtres UV minéraux, seul le titanium dioxyde est autorisé par l'Union Européenne (Communauté Européenne 1976)**

<b>Nom INCI</b>	<b>Autres dénominations</b>	<b>UV filtrés</b>	<b>Photostable</b>
Titanium dioxyde	Dioxyde de titane	UVA, UVB	oui
Zinc oxyde	Oxyde de zinc	UVA, UVB	oui
Talc		UVA, UVB	oui
Kaolin (argile blanche)		UVA, UVB	oui

Les filtres UV organiques sont des composés chimiques organiques qui absorbent la lumière ultraviolette. Les filtres UV sont utilisés depuis près de 75 ans (Giokas et al. 2007). Il existe un grand nombre de filtres chimiques. Chaque filtre chimique protège dans une gamme donnée de longueurs d'onde. Pour une protection contre tous les ultraviolets, il faut associer plusieurs filtres différents. Sur les 27 substances autorisées comme filtres UV par l'union européenne (Communauté Européenne 1976), 26 sont des filtres organiques (Tableau 3) et 1 est un filtre minéral (Tableau 2). Les filtres organiques sont des composés aromatiques souvent associés à d'autres groupements carbonyles ou des doubles liaisons carbone-carbone. La délocalisation des électrons des cycles aromatiques et des doubles liaisons demande une énergie qui est similaire aux rayons UV. Lorsque la molécule de filtre solaire reçoit une radiation ultraviolette, elle passe dans un état excité. Elle retourne dans son état stable par une relaxation en dissipant l'énergie reçue par des vibrations ou/et en réémettant une radiation moins dangereuse pour la peau (infrarouge par exemple). Une fois dans son état stable, la molécule est de nouveau prête à recevoir de la lumière ultraviolette et à continuer le cycle de protection. Ce sont ces substances qui nous intéressent particulièrement.

**Tableau 3. Filtres UV autorisés par l'Union Européenne (Communauté Européenne 1976)**

<b>Famille chimique</b>	<b>N° CAS</b>	<b>Concentration maximale autorisée</b>
<b>Substances</b>		
<b>Benzophénones</b>		
Benzophénone-3 (BP-3)	131-57-7	10 %
Benzophénone-5	6628-37-1	5 % en acide
<b>Dérivés de l'acide <i>p</i>-aminobenzoïque</b>		
Acide 4- <i>p</i> -aminobenzoïque (PABA)	150-13-0	5 %
Ethyle-4-aminobenzoate éthoxylé	113010-52-9	10 %
Ethylhexyl diméthyle PABA (OD-PABA)	21245-02-3	8 %
<b>Salicylates</b>		
Homosalate (HMS)	118-56-9	10 %
2-Ethylhexyl salicylate (EHS)	118-60-5	5 %
<b>Cinnamates</b>		
Ethylhexyl méthoxycinnamate (EHMC)	5466-77-3	10 %
<i>p</i> -Méthoxycinnamate d'isoamyle	71617-10-2	10 %
<b>Dérivés du camphre</b>		
Méthosulfate camphre de benzalkonium	52793-97-2	6 %
Acide téréphtalidène dicamphre sulfonique et ses sels	90457-82-2	10 % en acide
Acide benzylidène camphre sulfonique	56039-58-8	6 % en acide
Polyacrylamidométhyl benzylidène camphre	113783-601-2	6 %
4-méthyl benzylidène camphre (4-MBC)	36861-47-9	4 %
3-Benzylidène camphre (3-BC)	15087-24-8	2 %
<b>Triazines</b>		
Ethylhexyltriazone (OT)	88122-99-0	5 %
Diéthylhexylbutamidotriazone	154702-15-5	10 %
bis-Ethylhexyloxyphénol méthoxyphényl triazine	187393-00-6	10 %
<b>Benzotriazoles</b>		
Drometrisole trisiloxane	155633-54-8	15 %
Méthylène bis-benzotriazolyl tétraméthylbutylphénol	103597-45-1	10 %
<b>Dérivés de benzimidazoles</b>		
Phénylbenzimidazole, acide sulfonique, et ses sels de potassium, de sodium et de triéthanolamine	27503-81-7	8 % en acide
4-sulfonate de phényldibenzimidazole, sel disodique	180898-37-7	10 % en acide
<b>Dérivés de dybenzoyl méthane</b>		
Butyl méthoxydibenzoylméthane	70356-09-1	5 %
Diéthylaminohydroxybenzoylhexylbenzoate	302776-68-7	10 %
<b>Autres</b>		
Octocrylène (OC)	6197-30-4	10 % en acide
Polysilicone-15	207574-74-1	10 %

### II.3. Occurrence dans l'environnement

Les publications scientifiques consacrées à l'étude des filtres UV dans l'environnement sont peu nombreuses. Les premières découvertes de filtres UV dans l'environnement datent des années 80, sans que ces études ne fassent le lien avec l'utilisation de ces substances en cosmétique. L'intérêt pour ces substances a fait suite à leur détection dans des poissons (Nagtegaal et al. 1997) et à la découverte d'effets inattendus par Schlumpf et al. (2001). Les propriétés mimétiques des hormones de quelques filtres UV mises en évidence par des études *in vitro* et *in vivo* ont fait l'objet de discussions et de controverses et sont aujourd'hui acceptées. Le caractère estrogénique et anti-androgénique a été montré pour de nombreuses familles d'écrans-UV : les dérivés de benzophénone (Gomez et al. 2005; Schlumpf et al. 2001; Schlumpf et al. 2004), les salicylates (Gomez et al. 2005; Schlumpf et al. 2001; Schlumpf et al. 2004), les dérivés du camphre (Gomez et al. 2005; Holbech et al. 2002; Ma et al. 2003; Schlumpf et al. 2001; Schlumpf et al. 2004), les méthoxycinnamates (Gomez et al. 2005; Ma et al. 2003; Schlumpf et al. 2001; Schlumpf et al. 2004), l'acide p-aminobenzoïque et ses dérivés (Gomez et al. 2005; Schlumpf et al. 2001; Schlumpf et al. 2004). Les filtres 4-MBC, BP-3, 2, 4, 4'-triOH-BP, 3-BC sont les plus puissants des perturbateurs estrogéniques. Le 3-BC a été défini par Holbech et al. (2002) comme l'un des xénoestrogènes les plus puissants retrouvés dans l'environnement.

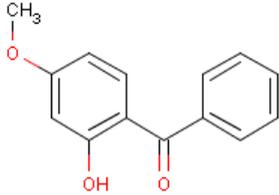
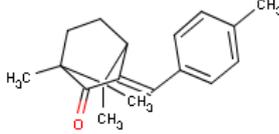
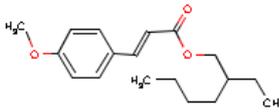
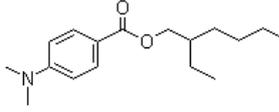
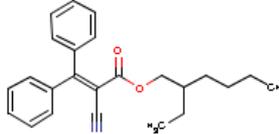
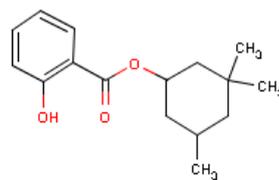
Curieusement, les études permettant de connaître la contamination environnementale et plus particulièrement celle du milieu aquatique sont peu nombreuses. La majorité des travaux dont on dispose provient de recherches effectuées en Suisse où de gros efforts de recherche ont été consacrés à cette thématique. Les données disponibles dans la littérature concernent les niveaux retrouvés dans des pays développés principalement européens. Les études se concentrent en général sur les filtres UV les plus utilisés que sont l'éthylhexylméthoxycinnamate (EHMC), le 4-méthylbenzylidène camphre (4-MBC), les benzophénones (BP), l'octocrylène (OC), l'éthylhexyltriazone (OT), l'homosalate (HMS) ou l'éthylhexyl diméthyl acide 4-p-aminobenzoïque (OD-PABA). Ces substances sont lipophiles, leur log de  $K_{ow}$  allant de 3,1 pour la BP-3 à 8,1 pour l'OT (Tableau 4).

Les filtres UV sont utilisés essentiellement dans des produits cosmétiques appliqués superficiellement sur la peau. La pénétration des filtres UV à travers la peau est estimée entre 0,1 et 4% de la dose appliquée sur la peau (Giokas et al. 2007). Cependant, ce résultat est controversé : la pénétration cutanée des filtres UV dépend très fortement de la formulation et sous l'action des radiations, les filtres UV vont évoluer chimiquement et peuvent pénétrer dans les couches cutanées ou être transférés vers l'environnement. Les filtres UV appliqués sur la peau sont éliminés soit au cours d'activités récréatives, dans l'eau ou sur le sable (ils atteignent alors directement le milieu

aquatique) soit ils restent fixés sur la peau ou sur les vêtements et atteignent les stations d'épuration via les eaux de lavage, où ils rejoignent ceux utilisés comme stabilisateur UV dans des plastiques, papiers, textiles ... Leur présence dans de nombreux produits de la vie courante a amené à les détecter également dans des particules de l'air intérieur (Negreira et al. 2009).

Deux revues présentent la synthèse des connaissances sur le devenir des filtres UV dans l'environnement : Giokas et al. 2007 présentent les niveaux de contamination d'échantillons biologiques et environnementaux et les méthodes analytiques associées ; Díaz-Cruz et al. (2008) axent leur travail sur les niveaux des filtres UV dans l'environnement aquatique et plus particulièrement sur leurs métabolites et leurs produits de dégradation.

**Tableau 4. Propriétés des filtres UV retrouvés le plus fréquemment dans l'environnement**

Substance	Masse molaire en g	Formule développée	Log $K_{ow}$	pKa	Solubilité dans l'eau en mg/l	Constante de Henry en $\text{atm.m}^3/\text{mol}$
<b>BP-3</b>	228		3,79 <sup>a</sup>	7,56 <sup>a</sup>	68,6 <sup>a</sup>	1,5.10 <sup>-8 a</sup>
<b>4-MBC</b> (Isomères Z et E)	254		5,1 <sup>b</sup>	-		
<b>EHMC</b> (Isomères Z et E)	290		5,80 <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	0,155 <sup>a</sup>	1,78.10 <sup>-6 a</sup>
<b>OD-PABA</b>	277		6,15 <sup>b</sup>	2,39 <sup>b</sup>		
<b>OC</b>	361		6,88 <sup>a</sup>	- <sup>a</sup>	0,00381 <sup>a</sup>	3.10 <sup>-9 a</sup>
<b>HMS</b>	262		6,16 <sup>a</sup>	8,09 <sup>a</sup>	0,42 <sup>a</sup>	1,93.10 <sup>-5 a</sup>

<sup>a</sup> Valeurs expérimentales provenant de la base de données de propriétés physico-chimiques. Syracuse Research Corporation : <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>, <sup>b</sup> Merck, information sur les produits

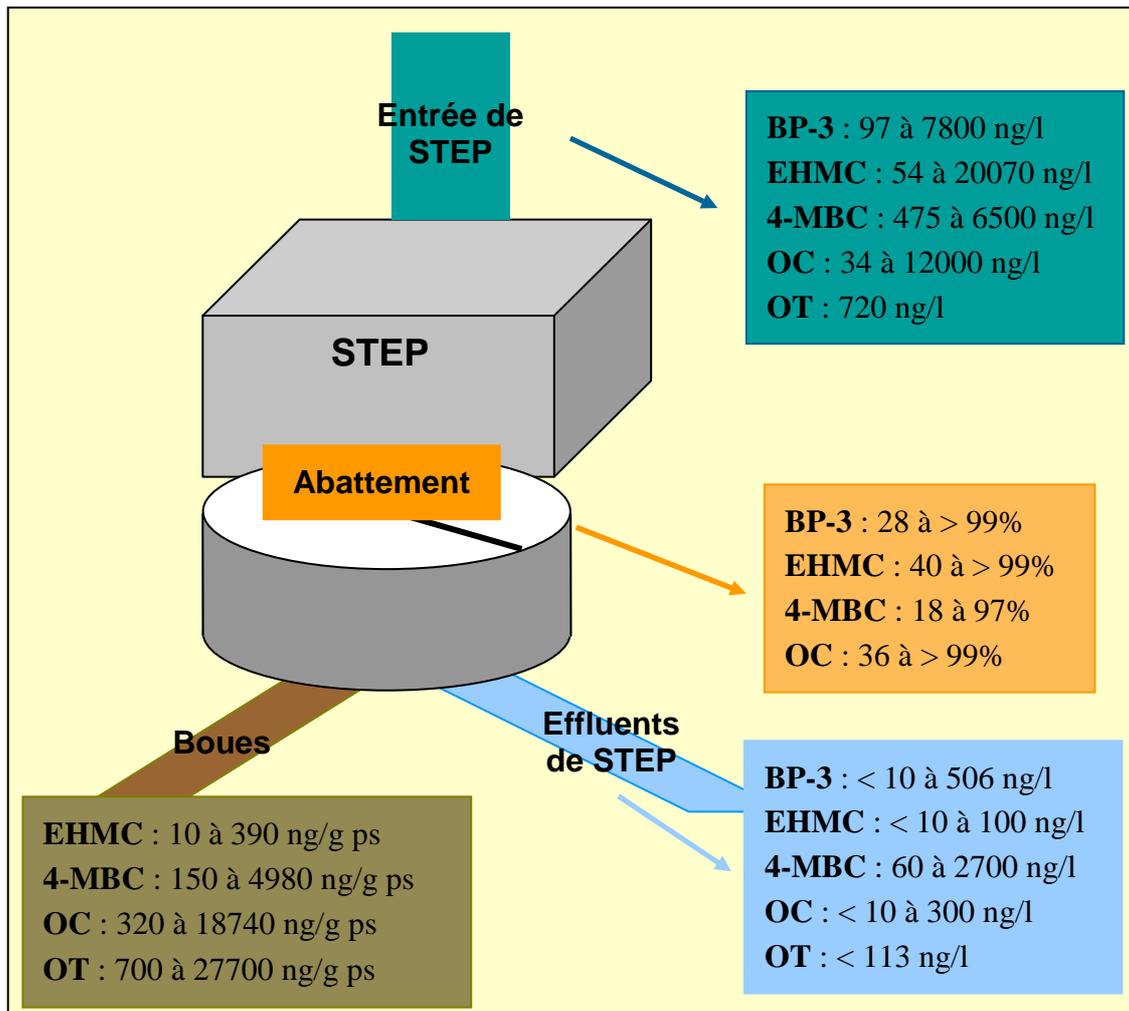
### II.3.1. Dans les stations d'épuration (STEP)

Les études sur les filtres UV dans les stations d'épuration portent majoritairement sur les substances lipophiles : le 4-méthylbenzilidène camphre (4-MBC), l'éthylhexyl méthoxycinnamate (EHMC), la benzophénone-3 (BP-3), l'octocrylène (OC) et l'éthylhexyl triazone (OT). Ces filtres UV sont toujours retrouvés en entrée de stations d'épuration (Balmer et al. 2005; Kupper et al. 2006; Li et al. 2007; Plagellat et al. 2006) (Figure 1). Les concentrations varient cependant en fonction des substances, des STEP et des saisons. En entrée de STEP, après sédimentation primaire, l'EHMC est la substance retrouvée majoritairement à des concentrations allant jusqu'à 20 070 ng/l (Kupper et al.

2006), suivie par la BP-3 et le 4-MBC à des niveaux équivalents pouvant atteindre respectivement des concentrations de 7 800 ng/l et 6 500 ng/l (Balmer et al. 2005).

En sortie de STEP, les concentrations en filtres UV sont variables, allant de la non détection pour l'EHMC (Kupper et al. 2006) à des concentrations en µg/l pour le 4-MBC (Balmer et al. 2005; Li et al. 2007) (Figure 1). De manière générale, les concentrations en filtres UV dans les effluents sont de la dizaine à la centaine de ng/l : pour le 4-MBC (Rodil et Moeder 2008a), l'EHMC (Li et al. 2007; Rodil et Moeder 2008a), l'OC (Kupper et al. 2006; Li et al. 2007; Rodil et Moeder 2008a), l'OD-PABA (Rodil et Moeder 2008a), l'HMS (Rodil et Moeder 2008a). La substance majoritaire est le 4-MBC, suivie par le BP-3 puis à des niveaux équivalents par l'EHMC et l'OC, avec des concentrations respectivement de 60 à 2 700 ng/l, 10 à 700 ng/l, <10 à 100 ng/l et <10 à 270 ng/l (Balmer et al. 2005). Cependant, ces concentrations relatives ne sont informatives que pour une STEP et sont fonction des quantités utilisées qui sont variables dans le temps.

Dans les travaux de Plagellat et al. (2006), 4 filtres UV : le 4-MBC, l'EHMC, l'OC et l'OT, sont détectés dans tous les échantillons de boue de STEP à une concentration de l'ordre du µg/kg de poids sec (Figure 1). En moyenne, les teneurs des boues en filtres UV sont de 5 517 µg/kg poids sec pour l'OT, de 4834 µg/kg poids sec l'OC, de 1 777 µg/kg poids sec pour le 4-MBC et 110 µg/kg poids sec pour l'EHMC. Des estimations faites sur la consommation de ces filtres UV dans les crèmes solaires en Suisse indiquent que le filtre UV le plus utilisé serait l'EHMC, suivi par l'OC et le 4-MBC à des niveaux équivalents puis par l'OT, bien moins utilisé (Plagellat 2004; Plagellat et al. 2006). Pour Plagellat et al. (2006), les différences entre les données de consommation et les niveaux dans les boues s'expliquent par les propriétés physicochimiques et la persistance des substances. La lipophilie importante de l'OT ( $\log K_{ow}$  : 8,1), sa résistance à la biodégradation et sa photostabilité induisent des concentrations dans les boues plus importantes que des substances bien plus consommées comme l'EHMC ou le 4-MBC. De même, l'OC, moins fréquemment utilisé que l'EHMC et le 4-MBC, se retrouve être en forte concentration dans les boues car il est photostable et difficilement biodégradable. Inversement, l'EHMC bien qu'ayant un  $\log K_{ow}$  de 5,8 et étant le plus utilisé, est moins retrouvé dans les boues car il est facilement biodégradable et photodégradable (Plagellat et al. 2006; Straub 2002a).



**Figure 1. Concentrations en filtres UV et abattement dans les stations d'épurations (Balmer et al. 2005; Kupper et al. 2006; Li et al. 2007; Plagellat et al. 2006)**

Les STEP ont une efficacité variable pour l'élimination des filtres UV : les abattements varient de 18% pour le 4-MBC à plus de 99% pour la BP-3, l'EHMC ou l'OC dans des STEP en Suisse (Balmer et al. 2005). L'élimination dans les stations d'épuration à boues activées passe par la sorption sur les solides et par la biodégradation (Balmer et al. 2005; Kupper et al. 2006). La sorption varie selon les substances en fonction de leurs caractéristiques physicochimiques. Balmer et al. (2005) estiment ainsi que moins de 5% de la BP-3, 50% du 4-MBC, 90% de l'EHMC et 99% pour l'OC sont fixés sur la matière organique. Dans une station chinoise de réutilisation d'eaux usées traitées par traitement de coagulation-floculation, microfiltration et ozonation recevant des effluents de STEP à boues activées, les abattements vont de 28% pour la BP-3, à 43% pour l'EHMC. Ces abattements ne varient pas de manière significative entre la période chaude et la période froide alors que les concentrations sont différentes (Li et al. 2007). La faible efficacité de la station peut s'expliquer par l'absence de traitement biologique. Dans cette étude, l'ozonation présente l'efficacité

la plus importante avec un taux d'élimination de 16-17% pour l'OC, à 26-28% pour l'EHMC, tandis que la micro-filtration présente l'efficacité la moins importante, inférieure à 10% (Li et al. 2007).

En l'absence de données sur l'utilisation des filtres UV, on suppose qu'elle est augmentée en été par l'utilisation des écrans solaires. Cette tendance est vérifiée dans les STEP pour l'OT (Plagellat et al. 2006), et pour la BP-3, le 4-MBC, l'EHMC et l'OC (Balmer et al. 2005; Li et al. 2007) : les concentrations en période chaude étant plus importantes qu'en période froide. Cette variabilité saisonnière est toutefois temporisée par les autres utilisations de ces filtres UV, tant cosmétiques qu'industrielles. Ainsi Plagellat et al. (2006) ont montré que les filtres UV de STEP proviennent principalement des ménages privés, le ruissellement des eaux de surface et les industries pouvant être considérées comme des sources additionnelles.

### **II.3.2. Eau de piscine et de douche**

Des articles de mise au point de méthodes analytiques rapportent que les filtres UV BP3, OC, EHMC, OD-PABA, 4-MBC et HMS sont retrouvés dans les eaux de piscines et dans les eaux d'écoulement de douche de piscine (Cuderman et Heath 2007; Giokas et al. 2004; Lambropoulou et al. 2002). Les concentrations vont de quelques ng/l à quelques µg/l pour une même substance selon les articles que ce soit dans les piscines ou dans les écoulements de douche.

### **II.3.3. Dans les eaux douces de surface et les sédiments**

Deux types d'études s'intéressent à la contamination des eaux de lacs par les filtres UV : les articles présentant des méthodes analytiques, effectuant des mesures ponctuelles pour valider leur travail (Cuderman et Heath 2007; Jeon et al. 2006; Rodil et Moeder 2008a); et des études spécifiques de la contamination des lacs ou de rivières par les filtres UV (Balmer et al. 2005; Poiger et al. 2004) (Figure 2). Les filtres UV sont présents dans les lacs à des niveaux pouvant atteindre la centaine de ng/l pour la BP-3 (Poiger et al. 2004), pour le 4-MBC (Rodil et Moeder 2008a), pour l'EHMC (Cuderman et Heath 2007) et pour l'OC (Rodil et Moeder 2008a) (Figure 2). Les substances les plus répandues sont la BP-3 et le 4-MBC (Balmer et al. 2005; Poiger et al. 2004). Cette contamination est associée à une activité anthropique : les filtres UV sont retrouvés dans des lacs recevant des effluents de STEP alors qu'ils ne sont pas retrouvés dans des lacs de montagne (Balmer et al. 2005). Les activités de baignades sont également sources de contamination, puisqu'on retrouve des filtres UV en été dans des lacs ne recevant pas d'autres sources de contamination (Balmer et al. 2005). Les concentrations de filtres UV dans les lacs sont plus importantes en période chaude qu'en période froide (Balmer et al. 2005; Poiger et al. 2004; Rodil et Moeder 2008a).

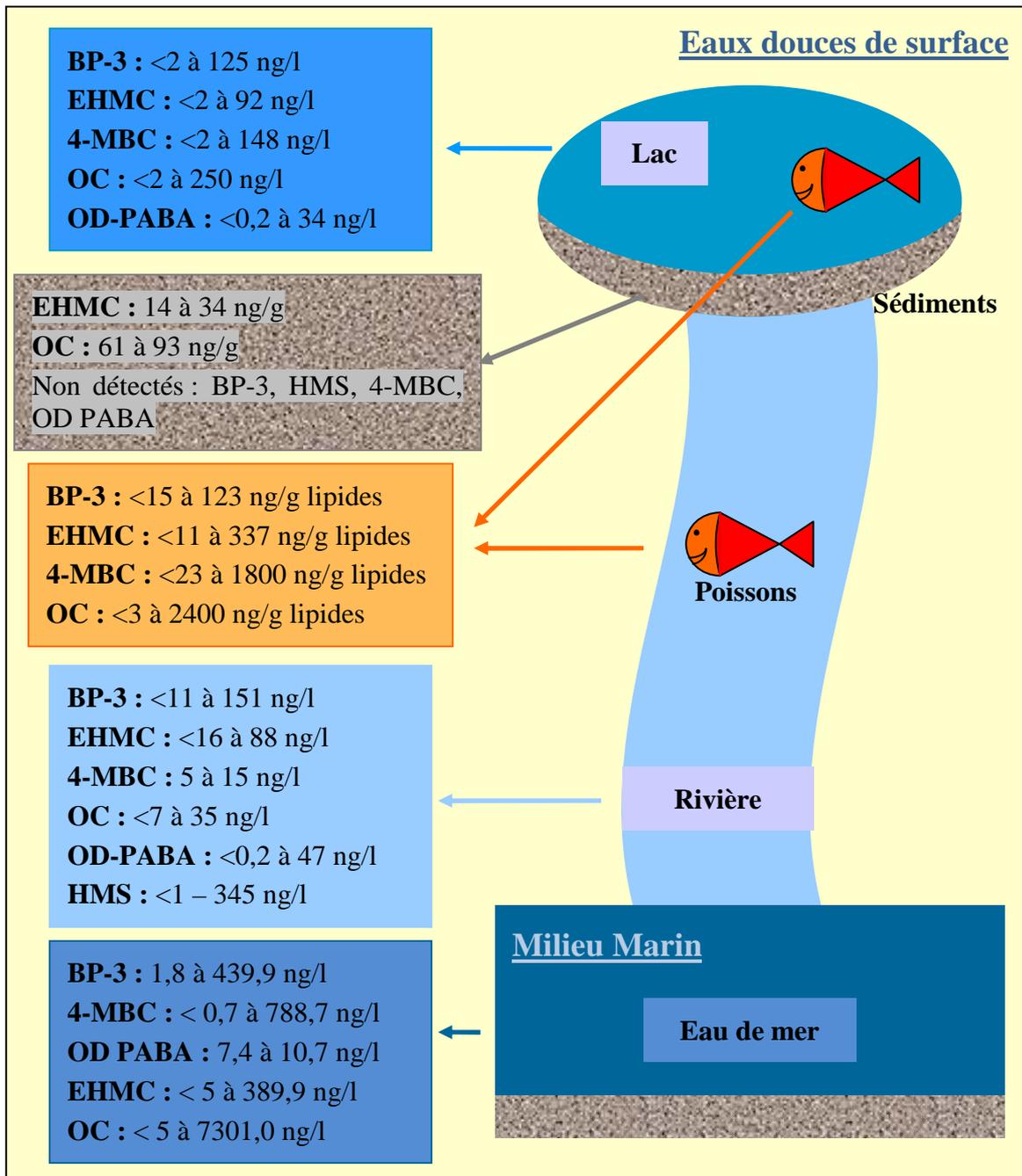


Figure 2. Concentrations en filtres UV dans le milieu aquatique (Balmer et al. 2005; Buser et al. 2006; Cuderman et Heath 2007; Fent et al. 2009b; Giokas et al. 2004; Giokas et al. 2005; Goksoyr et al. 2009; Jeon et al. 2006; Lambropoulou et al. 2002; Langford et Thomas 2008; Poiger et al. 2004; Rodil et Moeder 2008a; Rodil et Moeder 2008b)

Peu d'études s'intéressent à la contamination de l'eau de rivière par les filtres UV (Figure 2). Les concentrations quand les substances sont détectées vont jusqu'à la centaine de ng/l pour la BP-3, l'HMS, l'EHMC dans des rivières slovènes (Cuderman et Heath 2007). (Rodil et Moeder 2008a) mettent en évidence des filtres UV dans des rivières allemandes à des niveaux maximaux de l'ordre

de la dizaine de ng/l pour la BP-3, l'OC, l'EHMC, le 4-MBC et l'HMS. Cette équipe conclue à une variation mensuelle des concentrations entre mai et juin pour la BP-3, l'OC, le 4-MBC et l'HMS avec une augmentation des concentrations pour la période la plus chaude.

Des filtres UV ont été recherchés dans des sédiments de lacs et d'étangs en Corée (Jeon et al. 2006) et en Allemagne (Rodil et Moeder 2008b). Seul l'OC et l'EHMC ont été quantifiés à des concentrations allant respectivement de 61 à 93 ng/g de poids sec de sédiments et de 14 à 34 ng/g de poids sec de sédiments (Rodil et Moeder 2008b) (Figure 2). La BP-3 (Jeon et al. 2006), l'HMS, le 4-MBC ou l'OD-PABA n'ont pas été détectés (Rodil et Moeder 2008b).

#### **II.3.4. Dans le milieu marin**

Les filtres UV ont été peu recherchés dans le milieu marin (Giokas et al. 2004; Giokas et al. 2005; Goksoyr et al. 2009; Langford et Thomas 2008). La BP-3, l'OD-PABA et le 4-MBC ont été détectés dans des eaux de mer en zone de baignade à des concentrations de 1,8 à 8,2 ng/l pour la BP-3 ; traces à 19,7 ng/l pour le 4-MBC ; de 7,4 à 10,7 ng/l pour l'OD-PABA ; l'EHMC n'a pas été détecté dans ces échantillons (Giokas et al. 2004; Giokas et al. 2005) (Figure 2).

Langford et Thomas (2008) ont recherché 4 filtres UV : la BP-3, le 4-MBC, l'EHMC et l'OC, dans des eaux non filtrées de sites d'activités récréatives liées à l'eau en Norvège, en mai et juillet. Les concentrations de toutes les substances étaient inférieures en mai par rapport au mois de juillet, en pleine période de baignade. En juillet, seuls 3 échantillons ne contenaient pas de filtres UV, ils étaient à distance des sources, dans une zone ouverte, à forte dilution. Des concentrations très élevées ont été mesurées dans la zone de baignade en été : jusqu'à 439,9 ng/l pour la BP-3, jusqu'à 798,7 ng/l pour le 4-MBC, jusqu'à 389,9 ng/l pour l'EHMC et jusqu'à 7 301,0 ng/l pour l'OC.

Enfin une étude a réalisé des échantillonnages de microcouches de surface et détecté l'EHMC à des concentrations atteignant 92 ng/l de microcouche dans l'Océan Pacifique (Polynésie) (Goksoyr et al. 2009). L'EHMC a également été détecté jusqu'à 35 ng/SPMD (SemiPermeable Membrane Device) dans le Pacifique (Goksoyr et al. 2009).

#### **II.3.5. Dans le biota**

La première étude sur les filtres UV dans les poissons de lac et de rivières a été réalisée en Allemagne (Nagtegaal et al. 1997). Depuis, quelques études ont apportées des données sur la contamination des organismes d'eau douce par les filtres UV (Balmer et al. 2005; Buser et al. 2006; Fent et al. 2009b; Mottaleb et al. 2009; Straub 2002b; Zenker et al. 2008) (Figure 2).

Des poissons de lacs suisses (gardons, perches et corégones) ont été analysés (Balmer et al. 2005) : l'OC n'a été détecté qu'une fois à 25 ng/g lipides, l'EHMC n'a été détecté que deux fois à des concentrations atteignant 72 ng/g de lipides, le 4-MBC et la BP-3 ont été quantifiés à des concentrations atteignant 166 ng/g lipides et 123 ng/g lipides, respectivement (Figure 2).

**Tableau 5. Niveaux de contamination du biota en filtres UV**

Milieu	Substance	Min - Max	Références
<b>Mollusques</b> en ng/g de lipides	BP-3	ND(36) <sup>a</sup>	(Fent et al. 2009b)
	EHMC	22-150 <sup>a</sup>	(Fent et al. 2009b)
<b>Crustacés</b> en ng/g de lipides	BP-3	ND(36) <sup>b</sup>	(Fent et al. 2009b)
	EHMC	91-133 <sup>b</sup>	(Fent et al. 2009b)
<b>Poissons</b> en ng/g de lipides	BP-3	ND(15) – 123 <sup>c</sup>	(Balmer et al. 2005)
		ND (36) <sup>d</sup>	(Zenker et al. 2008)
		ND(36) <sup>e, g, h</sup>	(Fent et al. 2009b)
		ND(36)-151 <sup>f</sup>	(Fent et al. 2009b)
	4-MBC	ND(36) – 166 <sup>c</sup>	(Balmer et al. 2005)
		50 – 1800 <sup>i</sup>	(Buser et al. 2006)
		ND (23) <sup>d</sup>	(Zenker et al. 2008)
	EHMC	ND(28) – 72 <sup>c</sup>	(Balmer et al. 2005)
		4 – 142 <sup>d</sup>	(Zenker et al. 2008)
		23-79 <sup>e</sup>	(Fent et al. 2009b)
		NQ(11)-205 <sup>f</sup>	(Fent et al. 2009b)
		NQ(11)-337 <sup>g</sup>	(Fent et al. 2009b)
OC	30 <sup>h</sup>	(Fent et al. 2009b)	
	ND(3) – 25 <sup>c</sup>	(Balmer et al. 2005)	
<b>Oiseaux</b> en ng/g de lipides	BP-3	40-2400 <sup>i</sup>	(Buser et al. 2006)
		ND(36) <sup>j</sup>	(Fent et al. 2009b)
	EHMC	16-701 <sup>j</sup>	(Fent et al. 2009b)

<sup>a</sup> Etude sur *Dreissena polymorpha* (n=5) ; <sup>b</sup> Etude sur *Gammarus* sp. (n=3) ; <sup>c</sup> Etudes sur plusieurs espèces : gardon, perche et corégone (n=10) ; <sup>d</sup> Etude sur poissons (n=9) ; <sup>e</sup> Etude sur *Leuciscus cephalus* (n=5) ; <sup>f</sup> Etude sur *Salmo trutta* (n=22) ; <sup>g</sup> Etude sur *Barbus barbus* (n=6) ; <sup>h</sup> Etude sur *Anguilla anguilla* (n=1) ; <sup>i</sup> Etude sur *Salmo trutta* (n=19) ; <sup>j</sup> Etude sur *Phalacrocorax* sp. (n=4) ; <sup>k</sup> Etude sur (*Lepomis macrochira*)

Des filtres UV ont également été recherchés dans des poissons de rivière (Buser et al. 2006; Fent et al. 2009b; Zenker et al. 2008) (Tableau 5). Le 4-MBC et l'OC ont été détectés dans des truites brunes (*Salmo trutta*) échantillonnées dans des rivières suisses (Buser et al. 2006). Les concentrations en 4-MBC allaient de 50 à 1 800 ng/g de lipides avec une moyenne à 420 ng/g de lipides pour le 4-MBC et de 40 à 2 400 ng/g de lipides avec une moyenne à 630 ng/g de lipides pour l'OC (Buser et al. 2006). La BP-3 a été détectée dans des poissons de rivière suisse à des concentrations atteignant 151 ng/g de lipides (Fent et al. 2009b; Zenker et al. 2008). L'EHMC a été détecté dans la majorité des poissons prélevés dans des rivières suisses avec des niveaux compris entre < LQ (11 ng/g lipides) et 337 ng/g de lipides (Fent et al. 2009b; Zenker et al. 2008) (Figure 2 et Tableau 5). Les niveaux maximaux de contamination des poissons ont été rapportés pour des stations proches des sorties de STEP, d'ailleurs considérées comme la source principale d'EHMC dans les poissons de rivière (Fent et al. 2009b). Les poissons sédentaires sont 5 fois plus contaminés que les poissons préférant les eaux « ouvertes » (Fent et al. 2009b). De plus, les concentrations sont plus élevées en septembre qu'en mai pour l'OC et la BP-3 (Fent et al. 2009b).

Les concentrations en 4-MBC sont plus importantes dans les poissons de rivière que dans les lacs, ce qui s'explique par une forte contribution des effluents de stations aux rivières échantillonnées. Par ailleurs, la variabilité est plus grande chez les poissons de rivière que chez les poissons de lac, suggérant que les poissons de rivière ont des parcours d'exposition plus variables que les poissons de lac (Buser et al. 2006). L'OC est fortement présent dans les poissons de rivière alors qu'il est quasiment absent des poissons de lac (Buser et al. 2006). Cette différence très marquée pose plusieurs questions : ces variations sont-elles dues à des concentrations ou biodisponibilités différentes de l'OC dans les lacs et dans les rivières ou à des comportements de bioaccumulation différents dus à des poissons différents (biomagnification, métabolisation différentes...) (Buser et al. 2006) ? Ces interrogations sont encore accentuées lorsque l'on compare les profils de contamination de l'OC et du 4-MBC. Les sources principales sont, dans le cas des lacs et des rivières, les effluents de STEP (Balmer et al. 2005; Buser et al. 2006) ; il est donc peu probable que les proportions de 4-MBC et d'OC introduits dans l'environnement soient très différentes dans les deux cas. Ces différences s'expliqueraient donc principalement par une biodisponibilité différente (sorption aux sédiments) et/ou par des phénomènes de dégradation sélectifs dus à un temps de séjour plus élevé dans les lacs que dans les rivières (chimique, biologique, photochimique, vaporisation) (Buser et al. 2006). La contamination de quelques macro-invertébrés et de quelques oiseaux a été étudiée pour l'EHMC et la BP-3 (Fent et al. 2009b), seul l'EHMC a été détecté. Les niveaux étaient similaires dans les moules et dans les crevettes alors que leur niche écologique et la localisation du prélèvement

étaient différents,  $84,2 \pm 59,7$  ng/g lipides pour les moules et  $117,3 \pm 22,9$  pour les crevettes. Les moules collectées en sortie d'un lac de baignade présentaient des niveaux en EHMC supérieurs après la saison estivale. La contamination des cormorans pouvait atteindre 701 ng/g lipides, valeurs dans la même échelle que pour les poissons mais qui tendent à être un peu supérieurs (Fent et al. 2009b).

Quelques études proposent des facteurs de bioaccumulation (BCF) : Fent et al. (2009b) ont calculé des BCF pour l'EHMC à partir des concentrations mesurées dans l'environnement : les BCF obtenus pour deux espèces de poissons (*Barbus barbus*, *Leuciscus cephalus*) vont de 167 à 1 500, avec une moyenne à 762. Enfin, le facteur de bioaccumulation du 4-MBC dans le brochet a été évalué entre 9 700 et 23 000 (Balmer et al. 2005). Ces valeurs sont inférieures à celles attendues compte tenu des propriétés lipophiles de la substance ( $\log K_{ow} = 5,1$ ), et comparativement au méthyl triclosan ( $\log K_{ow} = 5$ ) pour qui le facteur de bioaccumulation est estimé à 100 000 (Balmer et al. 2005). Tous ces BCF calculés étaient inférieurs aux valeurs attendues pour des substances ayant des  $\log K_{ow}$  aussi élevés.

### II.3.6. Dégradation

Rodil et al. (2009a) ont testé la photostabilité en solution aqueuse de l'OC, du 4-MBC, de l'OD-PABA, de la BP-3 et de l'EHMC en conditions contrôlées pendant 72 h. L'OC, la BP-3 et le 4-MBC ont été stables pendant la durée de l'expérience ; cependant le 4-MBC a changé de conformation : la forme E était majoritaire en début d'expérience, au bout de 14 h, le ratio Z/E était de 3. L'EHMC et l'OD-PABA ont vu leur concentration diminuer fortement au cours de l'expérimentation avec des demi-vies d'élimination de 22 h et 20 h respectivement. La diminution de l'OD-PABA est expliquée par une dégradation de la molécule mère. Le E-EHMC s'isomérisse en Z-EHMC dont la concentration est maximale après 7h, puis il se forme des dimères d'EHMC. L'isomérisation suivie de la dimérisation de l'EHMC à la lumière avait déjà été démontrée (Broadbent et al. 1996), le Z EHMC devenant majoritaire par rapport au E-EHMC en 3 h. La photolyse de l'OD-PABA a également été testée dans différents types d'eau : avec une lumière naturelle, dans l'eau distillée, sa demi-vie d'élimination est de 27 h ; en eau de piscine, elle est de 32 h et en eau de mer de 39 h (Sakkas et al. 2003). Avec une irradiation en laboratoire, les demi-vies sont de 1,6 h, 2,1 h et 2,7 h pour l'eau distillée, l'eau de piscine et l'eau de mer, respectivement (Sakkas et al. 2003).

## II.4. Conclusion

En conclusion, l'étude de la bibliographie fait apparaître que certains filtres UV, utilisés pour prévenir les effets néfastes des rayonnements solaires sur la santé humaine, sont consommés à plus de 1 000 tonnes par an dans au moins un des pays de l'Union Européenne. Ces substances sont émises dans l'environnement par deux voies principales : les rejets de STEP et les activités récréatives. Certains filtres UV, comme l'EHMC ou l'OC, sont retrouvés dans tous les compartiments du milieu aquatique dont les organismes d'eau douce. Ils ont été retrouvés en milieu marin avec des concentrations maximales en période estivale. Cependant, aucune donnée n'est disponible sur la contamination des organismes marins côtiers. De plus, les études sur les processus de bioaccumulation de ces substances sont très parcellaires. Ces deux points font l'objet de ce travail de thèse.

### **III. Les médicaments psychotropes dans l'environnement**

Les médicaments sont des substances par définition biologiquement actives. Si leurs propriétés et leurs mécanismes d'action sont bien connus chez l'homme, leur devenir dans l'environnement est encore mal connu. L'action des médicaments sur des cibles biologiques spécifiques suscite des questionnements sur les risques écologiques et sanitaires liés à leur présence dans l'environnement. Or la contamination du milieu aquatique par ces substances est un phénomène aujourd'hui reconnu : la première publication qui a mis en évidence la présence d'acide clofibrigue dans les eaux usées date de 1976 (Nikolaou et al. 2007). Une des difficultés dans le suivi des médicaments dans l'environnement est la très grande variété des molécules tant sur le plan de leurs propriétés pharmacologiques que sur le plan de leur structure chimique et propriétés physicochimiques. Le devenir des médicaments après leur rejet dans l'environnement va dépendre de leur biodégradation, de leur transformation et de leur répartition entre les différents compartiments. Dans le cadre de ce travail, nous avons choisi de nous intéresser à la bioaccumulation des médicaments, pour cela nous avons ciblé notre étude sur une classe médicamenteuse : les médicaments du système nerveux central (SNC), auxquels nous avons ajouté les myorelaxants. Cette partie fait la synthèse des connaissances sur la contamination du milieu aquatique par ces médicaments.

#### **III.1. Chez l'Homme**

##### **III.1.1. Définition des médicaments**

En France, le médicament est défini par le code de la Santé Publique, article L5111-1. « On entend par médicament toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou pouvant lui être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique. » Les produits utilisés pour la désinfection des locaux et pour la prothèse dentaire ne sont pas considérés comme des médicaments.

Cette définition implique que les médicaments sont une classe de substances regroupées en fonction de leur utilisation : deux médicaments peuvent n'avoir que peu de caractéristiques physicochimiques communes. Cette définition légale des médicaments s'accompagne d'une réglementation quant à leur commercialisation, passant par un dossier d'Autorisation de Mise sur le

Marché ; dans ce dossier, une partie est consacrée à l'évaluation du risque pour l'environnement (EMA 2006). Ce dossier fournit de nombreux renseignements sur la substance et sur sa forme lors de l'introduction dans l'environnement. Aujourd'hui, ces données ne sont que peu utilisées lors de la recherche de ces substances dans l'environnement. L'annexe 1 de ce travail, s'attache à présenter les étapes du développement d'un médicament et les informations disponibles dans les documents déposés auprès des autorités compétentes.

### III.1.2. Les médicaments psychotropes

#### III.1.2.1 Le système nerveux central

Le **système nerveux** humain est responsable de l'envoi, de la réception et du traitement des influx nerveux. Il contrôle les actions et les sensations de toutes les parties du corps, ainsi que la pensée, les émotions et la mémoire. Le **système nerveux central (SNC)**, composé de neurones, est la portion du système nerveux constituée du cerveau, du tronc cérébral, du cervelet et de la moelle épinière. Le SNC a un rôle de réception, de traitement, d'intégration et d'émission des messages nerveux. L'ensemble du système nerveux central est protégé par une enveloppe osseuse ainsi que par des tissus protecteurs : les méninges. Le système nerveux central est classiquement opposé au **système nerveux périphérique (SNP)**, partie du système nerveux formée de ganglions et de nerfs qui fait circuler l'information entre les organes et le système nerveux central et réalise les commandes motrices de ce dernier. Il comprend le système nerveux somatique et le système nerveux autonome. Le système nerveux somatique reçoit messages des fibres sensorielles de la peau, des muscles et des articulations et regroupe les fibres motrices primaires des muscles. Il permet d'interagir avec le monde extérieur en participant à l'équilibre et la motricité. Pour cela l'innervation somatique commande le tonus et la contraction des muscles du squelette. Le système nerveux autonome ou végétatif dirige les fonctions organiques internes, comme la nutrition ou l'homéostasie. Il innerve essentiellement les organes internes. Le système nerveux central est isolé du reste de l'organisme par la barrière hémato-encéphalique (BHE) : c'est une barrière anatomique qui filtre et contrôle le passage des substances sanguines et les empêche de passer librement du sang au liquide extra-cellulaire de la substance grise du Système Nerveux Central (SNC). Elle isole ainsi la substance grise du reste de l'organisme et lui permet d'avoir un milieu spécifique, différent du milieu intérieur du reste de l'organisme. Cependant, quelques molécules peuvent passer cette barrière dont des nutriments ou certains médicaments.

### III.1.2.2 Médicaments psychotropes

Afin d'agir sur le SNC, les médicaments psychotropes doivent passer la barrière hémato-encéphalique (BHE). En général, pour diffuser au travers de la barrière hémato-encéphalique, les médicaments du SNC doivent présenter des caractéristiques apolaires. Toutefois, pour être adsorbés les médicaments doivent être suffisamment hydrophiles. Ainsi les médicaments du SNC comptent des médicaments parmi les plus apolaires et donc les plus susceptibles de se bioaccumuler. Les médicaments du SNC sont utilisés principalement en psychiatrie et en neurologie. Ils comptent de nombreuses classes dont plusieurs sont présentées ici. Les médicaments psychotropes sont souvent utilisés pour une indication principale, puis pour de nombreuses indications secondaires. Ainsi, une molécule anxiolytique pourra parfois être utilisée comme hypnotique, un antidépresseur comme anxiolytique.

#### *Antidépresseurs*

Les antidépresseurs sont des substances chimiques qui corrigent et relèvent l'humeur dépressive. Ce sont des stimulants psychiques ou psycho-analeptiques qui ont une action sur les fonctions thymiques. Ils sont principalement prescrits dans le traitement de certaines dépressions et de certains troubles anxieux. Il existe différentes classes d'antidépresseurs. Le mécanisme d'action des antidépresseurs est généralement lié à un effet sur les neurotransmetteurs (en particulier la sérotonine et la noradrénaline). On compte plusieurs familles d'antidépresseurs : les inhibiteurs des monoamine-oxydases, de moins en moins utilisés ; les antidépresseurs tricycliques, les plus anciens qui restent très efficaces malgré des effets secondaires parfois gênants, dont la **rispéridone**, l'**amitriptyline** ou l'**imipramine** ; les **inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS)** dont la fluoxétine ; et les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine-noradrénaline (IRSNa) dont la **venlafaxine**.

#### *Anxiolytiques*

Les anxiolytiques sont des médicaments utilisés contre l'anxiété. Plusieurs familles de médicaments sont utilisées dans cette indication : les **benzodiazépines (BZD)** ; des anxiolytiques de familles diverses dont des antihistaminiques (hydroxyzine), des carbamates (méprobamate), l'étilofexine, la buspirone, le captodiamine ; les antidépresseurs utilisés comme anxiolytiques (dans l'anxiété généralisée, les troubles obsessionnels compulsifs ou certaines phobies) ; les neuroleptiques à faible dose sont parfois utilisés dans cette indication.

### *Hypnotiques*

Les hypnotiques (ou somnifères) sont une classe de médicaments ayant la propriété d'induire le sommeil. Sont utilisés comme hypnotiques les barbituriques, les benzodiazépines et principalement des médicaments apparentés aux benzodiazépines : le zolpidem (en général sous forme d'hémitartrate de zolpidem) et le zopiclone.

### *Neuroleptiques*

Les neuroleptiques ou antipsychotiques sont des médicaments à effet neurobiologique, utilisés entre autres dans le traitement de certaines affections du système nerveux central : les psychoses, telles que la schizophrénie et certains autres syndromes comportant des hallucinations, du délire et de l'agitation psychomotrice. Ils agissent particulièrement au niveau de la transmission synaptique (notamment pour les neurotransmetteurs comme la dopamine). Les médicaments neuroleptiques diminuent les effets des pathologies comme les symptômes positifs ou productifs (hallucinations, délire, agitation, angoisse), les symptômes négatifs ou déficitaires (autisme, repli affectif, apragmatisme) et les dissociations (ambivalence, troubles du cours de la pensée, bizarrerie). En général, les symptômes positifs répondent mieux aux neuroleptiques que les symptômes négatifs. Les neuroleptiques comprennent les neuroleptiques typiques : les phénothiazines, l'halopéridol, le pimozide, la cyamémazine ; et les neuroleptiques atypiques : la clozapine, l'olanzapine, la **rispéridone**, la quétiapine, la ziprasidone.

### *Myorelaxants*

Un myorelaxant est une substance qui provoque une détente des muscles de la motricité. Le **tétrazépam** est le plus utilisé ; il appartient à la classe des benzodiazépines dont les principaux congénères ont des effets anxiolytiques.

### **III.1.3. Données de consommation**

Depuis 1990, environ 200 pays et territoires ont fait état au moins une fois de la fabrication ou du commerce des benzodiazépines en quantités supérieures à 1 kg par an (International narcotics control board 2010). Vingt-deux benzodiazépines sont généralement classées parmi les anxiolytiques. Le diazépam et l'alprazolam, principales substances de ce groupe, représentaient ensemble 70 % du total des benzodiazépines en 2008 (International narcotics control board 2010). Le diazépam est la substance du groupe des anxiolytiques de type benzodiazépine faisant l'objet des échanges les plus importants. (International narcotics control board 2010).

La consommation nationale moyenne calculée d'anxiolytiques de type benzodiazépine est plus élevée en Europe que dans les autres régions (International narcotics control board 2010). La consommation des médicaments est, en effet, variable d'un pays à l'autre. En France, la commercialisation des médicaments est le monopole des pharmaciens et de très nombreux médicaments ne peuvent être délivrés sans prescription dont les médicaments psychotropes et les myorelaxants. Le Tableau 6 présente les données de consommation de quelques médicaments psychotropes et d'un myorelaxant en France. Ces données proviennent de la sécurité sociale et sont calculés à partir des remboursements pour 2008 (L'Assurance.Maladie 2009). Les médicaments psychotropes, réputés comme fortement consommés en France, sont principalement prescrits par la médecine de ville (Tableau 6), leur consommation est donc diffuse sur l'ensemble du territoire, bien que des disparités régionales puissent exister.

**Tableau 6. Données de consommation de médicaments du système nerveux central remboursés par la sécurité sociale en 2008 (L'Assurance Maladie 2009)**

Classe thérapeutique	Substance	Dénombrement en boîte	Quantité en kg	Base de remboursement	% des prescriptions faites en ville
Antidépresseurs	Citalopram	2 683 390	1 497	39 204 992 €	90%
	Fluoxétine	6 080 693	1 967	42 482 004 €	92%
	Paroxétine	10 945 390	3 163	84 564 759 €	91%
	Sertraline	3 113 484	3 168	33 178 843 €	89%
	Venlafaxine	6 266 617	10 893	120 363 112 €	87%
Anxiolytiques	Alprazolam	12 325 208	135	26 121 047 €	89%
	Bromazépam	9 538 769	1 717	25 335 811 €	93%
	Diazépam	1 560 697	377	2 812 109 €	80%
	Lorazépam	7 312 986	330	15 492 108 €	93%
	Oxazépam	5 834 033	4 689	14 440 487 €	83%
Hypnotiques	Zolpidem	15 821 818	2 205	39 938 285 €	93%
	Zopiclone	10 879 324	1 125	29 198 789 €	90%
Myorelaxants	Tétrazépam	7 294 106	7 294	33 440 131 €	95%

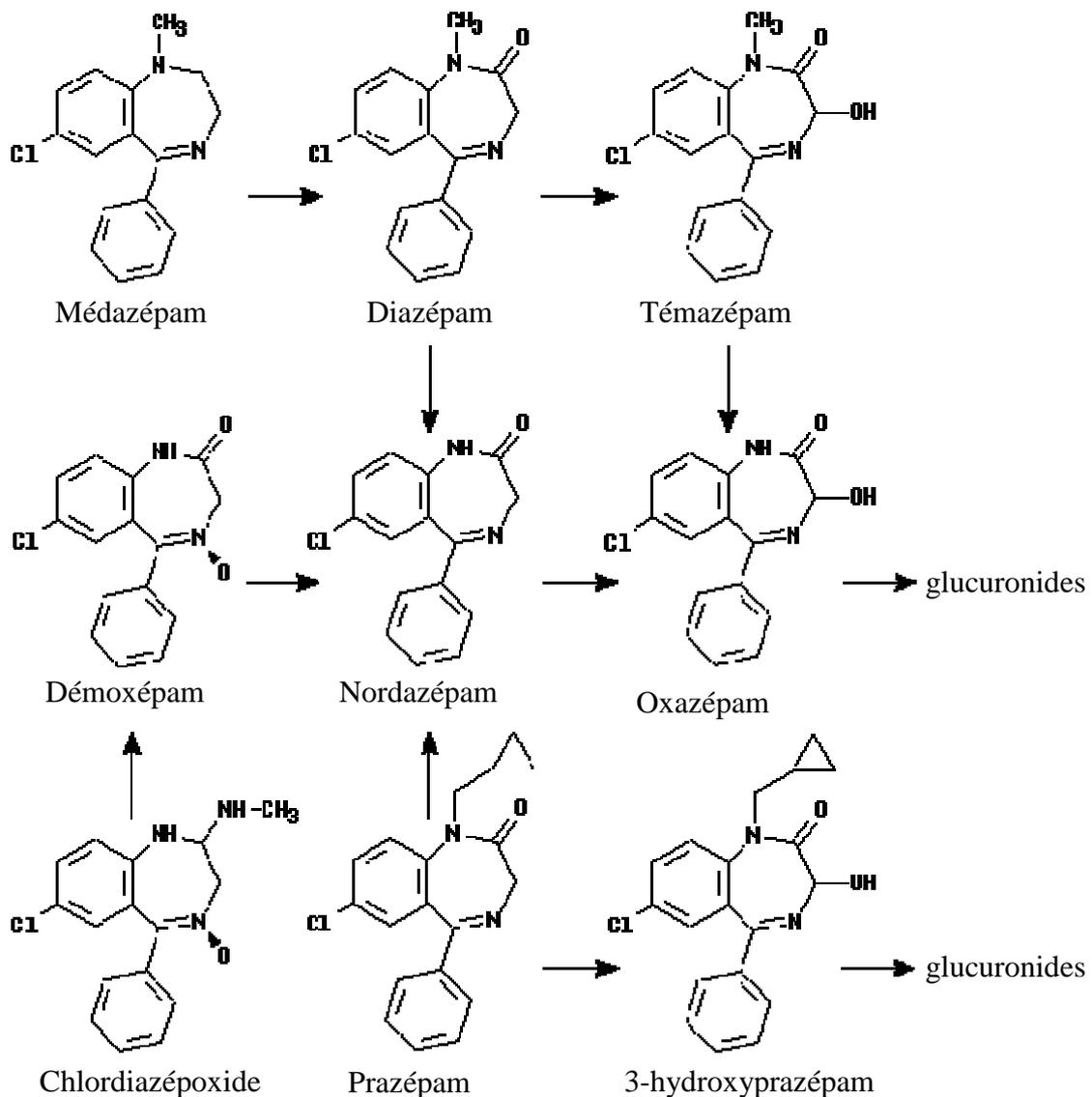
### III.1.4. Métabolisation

La principale source des médicaments humains dans l'environnement étant l'excrétion après consommation humaine, il est important de connaître la forme sous laquelle la molécule est excrétée. Or ces données font partie du dossier d'AMM des médicaments. Les médicaments sont excrétés sous

forme inchangée ou sous forme de métabolites (Chapitre 6. I.1) qui peuvent être soit des molécules différentes, soit la molécule mère sous forme conjuguée.

### Cas des benzodiazépines

Le métabolisme est fonction de la substitution. Deux voies majoritaires de phase I participent à celui-ci : la N-déméthylation oxydative et l'hydroxylation aliphatique (Figure 3). Par ces voies métaboliques, les benzodiazépines se transforment les unes dans les autres. Enfin par le métabolisme de phase II, elles sont glucuronocconjuguées et excrétées par les urines.



**Figure 3. Voies de métabolisation humaine de benzodiazépines (Centre Suisse du Contrôle Qualité)**

La chaîne de métabolisation présentée dans la Figure 3 met en évidence que le diazépam et l'oxazépam sont émis dans l'environnement après consommation d'autres benzodiazépines.

Le myorelaxant tétrazépam, appartenant à la famille des benzodiazépines, compte le diazépam parmi ses métabolites (Figure 4). Sa consommation aboutit donc à une émission de diazépam dans l'environnement, via les urines humaines.

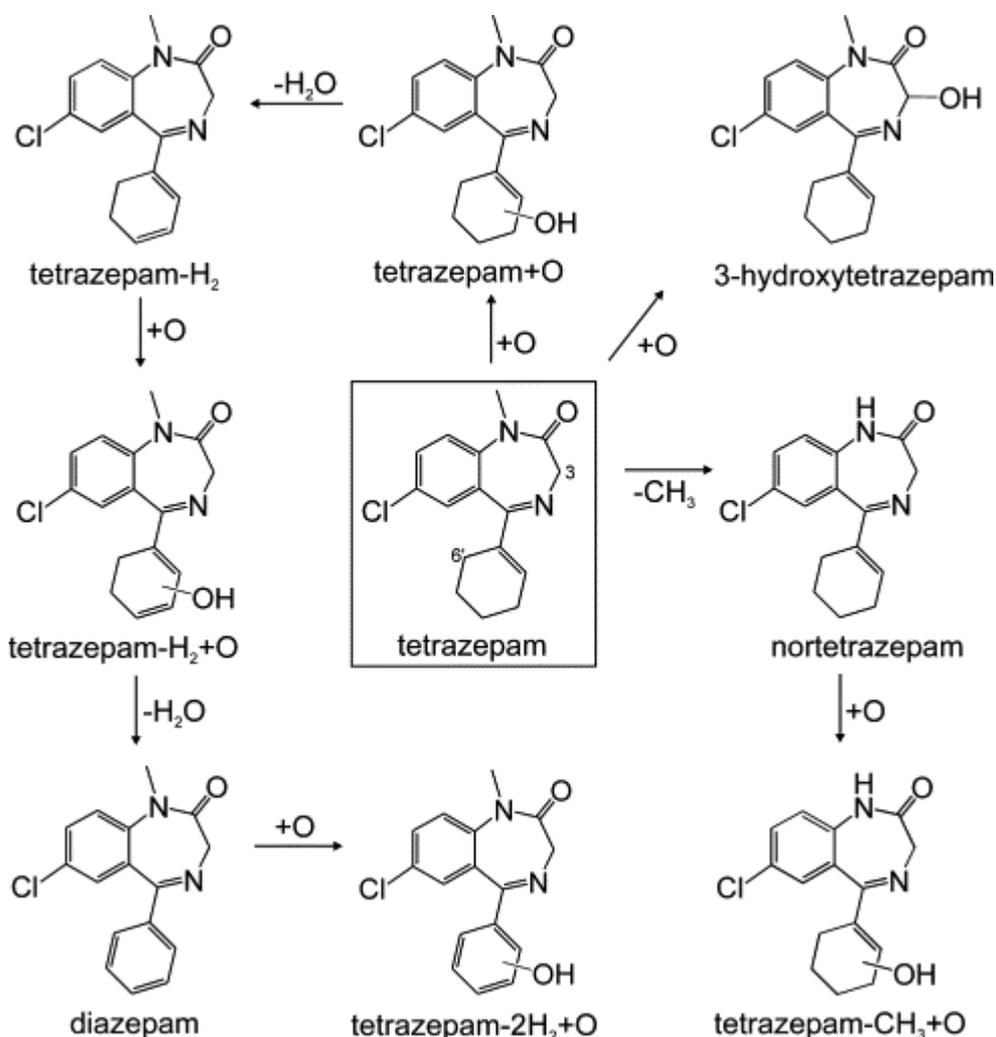


Figure 4. Voies de métabolisation humaine du tétrazépam (Baumann et al. 2009)

### III.2. Occurrence dans l'environnement

Comparativement à d'autres classes de médicaments comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens ou les  $\beta$ -bloquants, peu de données sont disponibles quant à la contamination des milieux aquatiques par les médicaments psychotropes. Le diazépam est le premier à avoir été retrouvé dans l'environnement en 1981 (Calisto et Esteves 2009) à une concentration supérieure à 1  $\mu\text{g/l}$  dans un effluent d'eaux usées.

Les médicaments psychotropes agissent chez l'humain sur des neurotransmetteurs. Ces neurotransmetteurs existent également chez les organismes aquatiques. Une étude sur la moule, par exemple, a montré que *Mytilus galloprovincialis* présentent des neurotransmetteurs dans les nerfs du

ped, dont la sérotonine et l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA<sub>A</sub>), ces systèmes de neurotransmetteurs sont chez l'humain les cibles des ISRS ou des benzodiazépines (Vitellaro-Zuccarello et al. 1990). Il est donc légitime de s'interroger sur la toxicité des médicaments psychotropes sur les organismes aquatiques ; elle a pourtant été peu étudiée. La fluoxétine fait l'objet d'études de toxicité principalement sur les poissons. Quelques études de toxicité du diazépam ont été effectuées sur des moules.

Les ISRS agissent sur la recapture d'un neurotransmetteur du cerveau, la sérotonine, au niveau de la fente synaptique. Les poissons produisent de la sérotonine (Khetan et Collins, 2007) et possèdent des récepteurs à la sérotonine (Yamaguchi et Brenner, 1997) et un transporteur de la sérotonine. Puisque le système neuro-endocrine de la sérotonine est analogue à celui des mammifères (Gould et al. 2007), les poissons peuvent présenter les mêmes réponses biologiques aux ISRS et peuvent être sensibles aux mêmes effets indésirables qui sont associés à l'exposition ISRS chez les mammifères.

Lister et al. 2009 rapportent que l'exposition du poisson-zèbre (*Danio rerio*) à la fluoxétine pendant 7 jours à des concentrations environnementales pertinentes (0,32 à 32  $\mu\text{g/l}$ ) peut réduire de façon significative la production d'œufs. Des médakas japonais (*Oryzias latipes*) exposés à la fluoxétine à des concentrations aussi faibles que 0,1  $\mu\text{g/l}$  pendant 4 semaines, ont présenté des niveaux d'estradiol plasmatiques significativement élevés et des déformations du développement dans la progéniture (Foran et al. 2004). Chez le poisson rouge (*Carassius auratus*), la fluoxétine (cinq injections de 5  $\mu\text{g/g}$  sur 14 jours) diminue les niveaux de transcription dans le cerveau de l'isotocine, homologue chez le poisson de l'ocytocine des mammifères, ce qui indique un lien mécanique entre l'exposition à la fluoxétine et des dysfonctionnements d'organes reproducteurs (Mennigen et al. 2008). Le poisson-crapaud (*Opsanus beta*) présente une baisse de l'osmolalité plasmatique et une augmentation de l'excrétion d'urée après un traitement de 24 h à 25  $\mu\text{g/g}$  de fluoxétine (Morando et al. 2009). Des changements dans le comportement alimentaire de vairons (*Pimephales promelas*) ont été constatés pour une exposition à la fluoxétine pendant 7 jours (Stanley et al. 2007). Enfin des niveaux anormaux de neuropeptides régulant le comportement alimentaire de poissons rouges ont été observées après injection de 5  $\mu\text{g/g}$  de fluoxétine tous les 3 jours pendant 13 :jours (Mennigen et al. 2009).

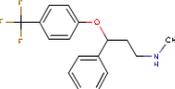
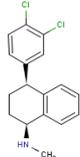
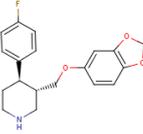
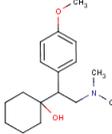
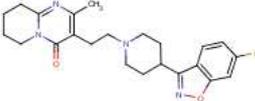
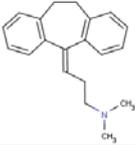
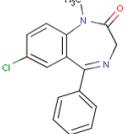
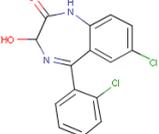
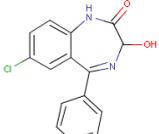
L'effet pharmacologique des benzodiazépines chez les humains et autres vertébrés passe par la liaison spécifique au récepteur neuronal au GABA<sub>A</sub>. Un deuxième type de récepteurs, indépendant du système GABAergique a été mis dans les tissus périphériques, les cellules sanguines et les cellules gliales du cerveau chez les mammifères : les récepteurs périphériques aux BZD (PBR). Ces

récepteurs sont principalement présents dans la paroi mitochondriale externe, leur rôle physiologique et pharmacologique est encore mal connu. Des récepteurs périphériques aux BZD ont été mis en évidence chez les organismes aquatiques : Betti et al. (2003) ont montré que les moules (*M. galloprovincialis*) présentent des récepteurs périphériques aux benzodiazépines dans les membranes des tissus mous (manteaux, glandes digestives, branchies et muscles) identiques à ceux des poissons. La proportion de ces récepteurs augmente pour des organismes provenant de sites pollués par rapport à des organismes de sites non pollués (Betti et al. 2003).

Gagné et al. ont étudié les effets neurochimiques du diazépam sur des moules d'eau douce (*Elliptio complanata*) : le diazépam affecte de manière significative les taux de sérotonine et de glutamate chez ces organismes. Les concentrations seuils mises en évidence pour ces perturbations biologiques sont de l'ordre de 350 ng/g de moules. Ce travail conclut à la nécessité d'études approfondies de la toxicité du diazépam chez la moule.

La toxicité de la fluoxétine et du diazépam chez les organismes aquatiques et la détection des premiers médicaments psychotropes dans les effluents de STEP ont entraîné la mise en place d'études spécifiques sur le devenir de ces médicaments dans le milieu aquatique. Deux classes sont principalement recherchées : les anxiolytiques avec les benzodiazépines comme le diazépam, et les antidépresseurs avec les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) comme la fluoxétine et les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSN<sub>a</sub>) comme la venlafaxine. Les caractéristiques physicochimiques et les structures des médicaments psychotropes les plus fréquemment étudiés sont présentées dans le Tableau 7. Ces médicaments, en tant que psychotropes, sont assez lipophiles : ils ont des log  $K_{ow}$  supérieurs à 2 pour les BZD et à 3,3 pour les antidépresseurs (Tableau 7). Ces substances sont toutefois solubles dans l'eau à plus de 2 mg/l (Tableau 7). Les études incluent en général les métabolites principaux de ces substances. A notre connaissance, le tétrazépam est le seul myorelaxant à avoir été recherché une fois dans des eaux de rivières en Espagne : il n'a pas été détecté (González Alonso et al. 2010). Depuis plusieurs études sont venues compléter les quelques données présentées.

**Tableau 7. Propriétés physico-chimiques de quelques médicaments psychotropes retrouvés dans l'environnement**

Substance	Classe pharmaceutique	Masse molaire en g	Formule développée	Log K <sub>ow</sub>	pKa	Solubilité dans l'eau en mg/l
Fluoxétine		309,33		4,05	10,05	60
Sertraline	ISRS Antidépresseur	306,24		5,29		4
Paroxétine		329,37		3,95	9	35,3
Venlafaxine	IRSNa Antidépresseur	277,41		3,28		267
Rispéridone		410,50		9,57	3,49	2
Amitriptyline	Antidépresseur tricyclique	277,41		4,92	9,4	10
Diazépam		284,75		2,82	3,4	50
Bromazépam	Benzodiazépine Anxiolytique	316,16		2,05		175
Lorazépam		321,17		2,39	13	80
Oxazépam		286,72		2,24		179

Valeurs expérimentales provenant de la base de données de propriétés physico-chimiques. Syracuse Research Corporation : <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>.

### III.2.1. Sources

L'émission des médicaments dans l'environnement est associée à leur utilisation thérapeutique par le patient et leur excrétion dans les eaux usées (Figure 5). Les émissions se font sous forme de la molécule mère ou sous forme de métabolites. Le regroupement de malades dans des structures comme les maisons de retraite, ou des structures de soins comme les hôpitaux concentrent les personnes consommant des médicaments. Les effluents de ces structures présentent des concentrations supérieures en médicament et un panel de substances différent de celui retrouvé en ville (Montiel 2006).

Les médicaments sont émis en continu dans l'environnement, par une même personne, quand il s'agit de traitement chronique comme par les  $\beta$ -bloquants, soit par des personnes différentes, qui suivent tour à tour un même traitement sur une période définie comme pour les antibiotiques. Les apports en médicaments dépendant de la consommation humaine, on observe une variation saisonnière dans les concentrations retrouvées dans l'environnement pour certaines classes thérapeutiques (Loraine et Pettigrove 2006).

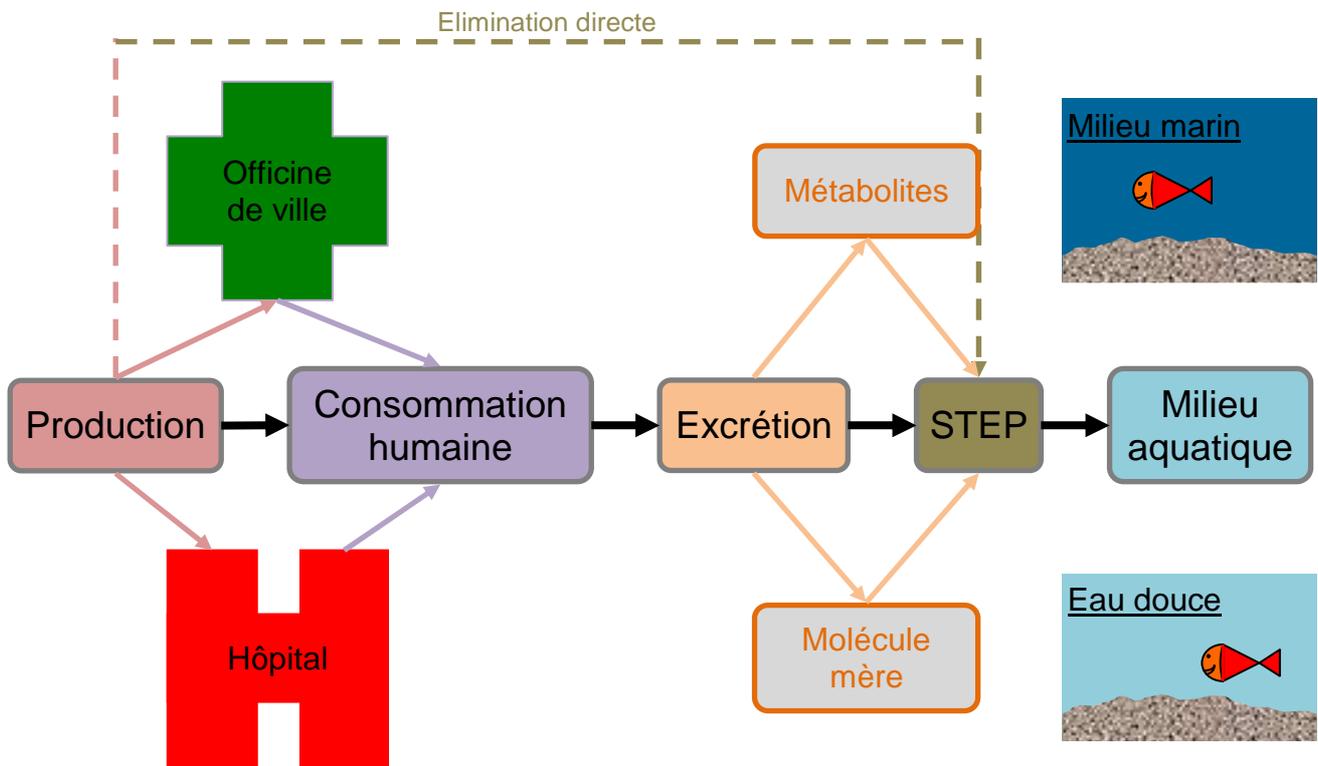


Figure 5. Voies d'introduction des médicaments dans l'environnement

### III.2.2. Dans les stations d'épuration

Le Tableau 8 présente les concentrations maximales en médicaments psychotropes dans les stations d'épuration rapportées dans la littérature. Dans les stations d'épuration, le diazépam a été retrouvé à des concentrations atteignant 1 180 ng/l en entrée de STEP et 660 ng/l en sortie en Belgique (van der Ven et al. 2004) ; en Allemagne, les concentrations en sortie de STEP atteignaient 53 ng/l (Ternes et al. 2001; Ternes 1998). Le diazépam a également été recherché sans être détecté en France, en Espagne, en Autriche et en Allemagne (Clara et al. 2005; Halling-Sorensen et al. 1998; Togola et Budzinski 2008; Unceta et al. 2010; Wick et al. 2009). Le nordazépam, métabolite du diazépam et d'autres BZD a été quantifié à 8,3 ng/l dans des effluents de STEP en France (Togola et Budzinski 2008), il n'a pas été quantifié en Allemagne (Wick et al. 2009). L'oxazépam a été quantifié en Allemagne dans deux études : en entrée de STEP jusqu'à 190 ng/l et en sortie jusqu'à 180 ng/l (Wick et al. 2009), et jusqu'à 250 ng/l en sortie (Heberer 2002b). Enfin, le lorazépam a été détecté sans être quantifié à une reprise dans des influents de STEP en Espagne (Unceta et al. 2010).

Parmi les antidépresseurs, la fluoxétine et le citalopram, deux ISRS, ont été retrouvés en entrée de STEP à des concentrations allant de la non détection à 177 ng/l pour la fluoxétine et de 47 à 62 ng/l pour le citalopram (Unceta et al. 2010). Dans les effluents, la fluoxétine est retrouvée jusqu'à 127 ng/l pour la fluoxétine et jusqu'à 59 ng/l pour le citalopram (Unceta et al. 2010). L'amitriptyline et l'imipramine, des antidépresseurs tricycliques ont été quantifiés systématiquement en STEP : en entrée jusqu'à 214 ng/l pour l'amitriptyline et jusqu'à 48 ng/l pour l'imipramine, et en sortie jusqu'à 122 ng/l pour l'amitriptyline et jusqu'à 55 ng/l pour l'imipramine (Unceta et al. 2010). La venlafaxine et la rispéridone n'ont jamais été quantifiées (Unceta et al. 2010). La fluoxétine a également été quantifiée à 99 ng/l dans des effluents de STEP au Canada (Metcalf et al. 2003). L'amitriptyline a été quantifié à 6,0 ng/l en France en sortie de STEP (Togola et Budzinski 2008). En outre, des quantités élevées de fluoxétine ont été trouvées dans des boues de STEP entre 130 à 4 700 µg/kg de boues (Kinney et al. 2006).

**Tableau 8. Concentrations en médicaments psychotropes dans les stations d'épuration, revue de littérature, (ND = non détecté, NQ = non quantifié)**

<b>Matrice</b>	<b>Substance</b>	<b>Max</b>	<b>Références</b>
<b>Entrée de STEP</b> en ng/l	Diazépam	1 180	(van der Ven et al. 2004)
		ND (10)	(Clara et al. 2005)
	Oxazépam	190	(Wick et al. 2009)
	Lorazépam	NQ	(Unceta et al. 2010)
	Fluoxétine	177	(Unceta et al. 2010)
	Citalopram	62	(Unceta et al. 2010)
	Amitriptyline	214	(Unceta et al. 2010)
	Imipramine	48	(Unceta et al. 2010)
	Venlafaxine	NQ	(Unceta et al. 2010)
Rispéridone	NQ	(Unceta et al. 2010)	
<b>Sortie de STEP</b> en ng/l	Diazépam	660	(van der Ven et al. 2004)
		53	(Ternes et al. 2001)
		ND	(Togola et Budzinski 2008)
		ND	(Halling-Sorensen et al. 1998)
		ND (10)	(Clara et al. 2005)
		ND	(Unceta et al. 2010)
		ND	(Wick et al. 2009)
		ND	(Wick et al. 2009)
		8,3	(Togola et Budzinski 2008)
		180	(Wick et al. 2009)
		250	(Heberer 2002a)
		127	(Unceta et al. 2010)
		99	(Metcalf et al. 2003)
		59	(Unceta et al. 2010)
		122	(Unceta et al. 2010)
6,0	(Togola et Budzinski 2008)		
Imipramine	55	(Unceta et al. 2010)	
Venlafaxine	NQ	(Unceta et al. 2010)	
Rispéridone	NQ	(Unceta et al. 2010)	
<b>Boues de STEP</b> en µg/kg	Fluoxétine	4 700	(Kinney et al. 2006)

### **III.2.3. Dans les eaux douces de surface et les sédiments**

Parmi les anxiolytiques, le diazépam a été détecté dans des eaux de rivières allemandes à des concentrations comprises entre 0,13 et 880 ng/l (Halling-Sorensen et al. 1998; Moldovan 2006; Ternes et al. 2001; Ternes 2001). En France, le diazépam a été recherché sans être quantifié et le nordazépam a été détecté à une concentration de 2,4 ng/g dans des eaux de rivière (Togola et Budzinski 2008).

Les antidépresseurs et certains de leurs métabolites humains ont fait l'objet de deux études dans des rivières aux USA (Schultz et al. 2010) et au Canada (Metcalfé et al. 2010). Tous les antidépresseurs étudiés ont été détectés au moins une fois dans les eaux analysées : les ISRS fluoxétine, sertraline, paroxétine et citalopram et l'IRSNa venlafaxine. La venlafaxine et son métabolite O-desméthyl ont été quantifiés aux concentrations les plus importantes soit jusqu'à 1472 ng/l pour la O-desméthyl venlafaxine et 901 ng/l pour la venlafaxine (Metcalfé et al. 2010). Les concentrations quantifiées vont de 0,8 à 141 ng/l pour la fluoxétine ; de 2 à 30,5 ng/l pour la sertraline ; de 0,8 à 7 ng/l pour la paroxétine ; de 4 à 901 ng/l pour la venlafaxine ; de 4 à 212 ng/l pour le citalopram (Metcalfé et al. 2010; Schultz et al. 2010). Les concentrations maximales au niveau des rejets de STEP diminuent en aval, les proportions restant les mêmes pour tous les échantillons, la venlafaxine étant majoritaire suivie par le citalopram (Metcalfé et al. 2010; Schultz et al. 2010). En amont de STEP, seul le citalopram et la venlafaxine ainsi que leurs métabolites ont été détectés (Metcalfé et al. 2010).

Tous les antidépresseurs étudiés ont été détectés au moins une fois dans les sédiments de rivières aux USA : les ISRS fluoxétine, sertraline, paroxétine et citalopram et l'IRSNa venlafaxine (Schultz et al. 2010). Les concentrations quantifiées atteignent 18,16 ng/g pour la fluoxétine, 14,40 ng/g pour la sertraline, 3,22 ng/g pour la paroxétine, 12,83 ng/g pour le citalopram, et 23,82 ng/g pour la venlafaxine.

### **III.2.4. Dans le biota**

#### **III.2.4.1 Etudes environnementales**

Le Tableau 9 présente les concentrations en psychotropes dans les organismes aquatiques rapportées dans la littérature. Parmi les anxiolytiques, seul le diazépam a été quantifié dans des foies de poissons marins entre 23 et 110 ng/g de poids frais (Kwon et al. 2009) ; il a été quantifié dans tous les échantillons analysés.

Plusieurs antidépresseurs ont été déterminés dans les tissus des poissons : (Brooks et al. 2005) trouvent des concentrations de l'ordre de 0,1 à 10 ng/g pour la fluoxétine et la sertraline, ainsi que pour leurs métabolites. Des concentrations du même ordre de grandeur ont été rapportées pour le citalopram, la paroxétine et la venlafaxine (Chu et Metcalfe 2007; Metcalfe et al. 2010; Schultz et al. 2010). Des concentrations très supérieures ont été rapportées pour la sertraline dans des cerveaux de poissons jusqu'à 545 ng/g (Ramirez et al. 2009). Les métabolites de ces antidépresseurs sont également quantifiés dans ces poissons (Chu et Metcalfe 2007; Metcalfe et al. 2010; Ramirez et al. 2009; Schultz et al. 2010). Les concentrations dans les poissons sont plus importantes dans le foie et dans le cerveau que dans les muscles pour tous les antidépresseurs étudiés (Brooks et al. 2005).

**Tableau 9. Concentrations en médicaments psychotropes dans des organismes aquatiques (ND : non détecté)**

<b>Matrice</b>	<b>Substance</b>	<b>Min - Max</b>	<b>Références</b>
Poissons Concentration en ng/g poids frais	Diazépam	23 - 110 <sup>a</sup>	(Kwon et al. 2009)
	Fluoxétine	ND (0,07) - 1,02 <sup>b</sup>	(Chu et Metcalfe 2007)
		ND (2,54) - 80 <sup>c</sup>	(Ramirez et al. 2009)
		ND (0,5) - <LQ(0,5) <sup>d</sup>	(Metcalfe et al. 2010)
		ND (0,015) - 0,18 <sup>e</sup>	(Schultz et al. 2010)
	Paroxétine	ND (0,24) - 0,57 <sup>b</sup>	(Chu et Metcalfe 2007)
		ND (0,24) <sup>d</sup>	(Metcalfe et al. 2010)
		ND (0,015) - 0,02 <sup>e</sup>	(Schultz et al. 2010)
	Sertraline	ND (0,71) - 545 <sup>c</sup>	(Ramirez et al. 2009)
		ND (0,71) - 19 <sup>f</sup>	(Ramirez et al. 2009)
		<LQ (0,5) - 3,83 ± 1,81 <sup>d</sup>	(Metcalfe et al. 2010)
		ND (0,015) - 1,8 <sup>e</sup>	(Schultz et al. 2010)
	Citalopram	<LQ(0,5) - 2,90 ± 1,31 <sup>d</sup>	(Metcalfe et al. 2010)
		ND (0,015) - 0,07 <sup>e</sup>	(Schultz et al. 2010)
Venlafaxine	ND (0,5) - 1,20 ± 0,36 <sup>d</sup>	(Metcalfe et al. 2010)	
	ND (0,015) - 0,02 <sup>e</sup>	(Schultz et al. 2010)	

<sup>a</sup> foies de poissons marins ; <sup>b</sup> mélange d'espèces ; <sup>c</sup> cerveaux de poissons mélangés ; <sup>d</sup> vairons males ; <sup>e</sup> cerveaux de meunier noir ; <sup>f</sup> filets de poissons.

### III.2.4.2 Etudes d'accumulation en laboratoire

*Etude de l'accumulation de la fluoxétine et de la norfluoxétine sur poissons (Paterson et Metcalfe 2008)*

Dans cette étude, des médakas (*Oryzias latipes*) ont été exposés à la fluoxétine à une concentration nominale de 0,64 µg/l pendant 7 jours puis laissés à dépurifier dans de l'eau claire pendant une période de 21 jours. L'absorption de la fluoxétine par les médakas a été observée dès les 5 premières heures d'exposition et son métabolite biologiquement actif, la norfluoxétine, a également été détecté dans les tissus des médakas durant cette période. Une concentration maximale de fluoxétine a été mesurée dans les médakas après trois jours d'absorption atteignant  $49,4 \pm 6,4$  ng/g de poids frais, ce qui donne une constante de vitesse d'absorption ( $k_1$ ) de  $5,9 \pm 0,5$  (d<sup>-1</sup>). La concentration maximale en norfluoxétine a été obtenue au bout de 7 jours à  $64,3 \pm 8,7$  ng/g de poids frais. Au cours de la phase de décontamination, une demi-vie de  $9,4 \pm 1,1$  jours a été déterminée pour la fluoxétine. A partir de ces données, des valeurs de facteur de bioconcentration de 74 et de 80 ont été estimées pour la fluoxétine et un pseudo-BCF (le ratio de la concentration de norfluoxétine dans le médaka sur la concentration de la fluoxétine dans l'eau) de 117 a été calculé pour la norfluoxétine. Ces résultats indiquent une plus longue persistance et une plus grande possibilité de bioaccumulation de la norfluoxétine dans les tissus de poissons par rapport à la fluoxétine.

*Etude de la bioaccumulation de la fluoxétine chez les médakas juvéniles, influence du pH (Nakamura et al. 2008)*

L'étude vise à évaluer l'influence du pH sur la bioaccumulation de la fluoxétine chez les médakas juvéniles (*Oryzias latipes*), le pKa de la fluoxétine étant de 10,1. Les concentrations en fluoxétine et en norfluoxétine ont été mesurées dans le corps des poissons et dans leur foie pour une exposition à 15 µg/l de fluoxétine. 3 pH ont été testés : 7, 8 et 9. Les facteurs de bioconcentration de la fluoxétine pour les médakas étaient de 8,8, 30 et de 260 dans le corps des poissons et de 330, 580 et de 3 100 dans le foie pour des pH de 7, 8 et 9, respectivement. Les valeurs de BCF, inférieures à un pH de 7 et supérieures à un pH 9, s'expliquent principalement par l'augmentation des espèces non ionisées à un pH plus proche du pKa, ces espèces ayant une hydrophobicité significativement plus élevée que les espèces ionisées. Une tendance similaire a été observée pour la norfluoxétine. Les valeurs de pseudo-BCF (ratio de la concentration en norfluoxétine dans le poisson sur la concentration en fluoxétine dans l'eau) ont été supérieures d'un ordre de grandeur aux valeurs du BCF de la fluoxétine quel que soit le pH.

### III.2.5. Dégradation dans l'environnement

La biodégradabilité du diazépam et de l'oxazépam a été testée sur des matrices solides et liquides en présence de bactéries de boues d'épuration (Redshaw et al. 2008). Aucune dégradation n'a été observée pour le diazépam au bout de 60 jours d'expérimentation en phase liquide. L'oxazépam a subi une perte de 40 % par la biodégradation ; cependant, l'étude soulève l'hypothèse de la formation d'un autre métabolite biologiquement actif et persistant (Redshaw et al. 2008). Dans le système eau/sédiment, l'oxazépam est considéré par Loffler et al. (2005) comme modérément persistant avec une demi-vie d'élimination de 54 jours. Pour le diazépam, la  $DT_{90}$  est supérieure à 365 jours dans le système eau-sédiment (Loffler et al. 2005). Le diazépam et l'oxazépam s'adsorbent rapidement sur les sédiments (Loffler et al. 2005).

Plusieurs expériences ont montré que la fluoxétine et la norfluoxétine sont résistantes à la biodégradation dans des liquides contenant des cultures de bactéries de boues d'épuration (Kwon et Armbrust 2006; Redshaw et al. 2008). Les concentrations en fluoxétine sont restées stables dans des eaux en présence de bactéries typiques de boues de STEP sur 60 jours, et dans des sols dans les conditions de sols traités par des boues d'épuration sur 270 jours (Redshaw et al. 2008). La fluoxétine a également été rapportée stable à l'hydrolyse et à la photolyse dans les milieux aquatiques (avec une demi-vie supérieure à 100 jours) (Kwon et Armbrust 2006). Néanmoins, la préoccupation majeure sur le devenir de la fluoxétine doit être centrée sur sa persistance dans les sédiments et sols plutôt que dans l'eau ; en effet, la fluoxétine s'adsorbe très rapidement (Kwon et Armbrust 2006; Redshaw et al. 2008).

### III.3. Conclusion

En conclusion, l'étude de la bibliographie fait apparaître que les médicaments psychotropes dont les benzodiazépines, substances utilisées en médecine humaine pour traiter les pathologies du système nerveux central, sont principalement émis dans l'environnement sous forme de molécule mère ou de métabolites après consommation et excrétion humaine. Les émissions dans le milieu aquatique de médicaments humains sont liées à leur consommation. En France, en 2008, le tétrazépam a été consommé à plus de 7 tonnes. Les résidus de médicaments atteignent le milieu aquatique principalement par les rejets de STEP. Le diazépam est retrouvé dans les effluents de STEP puis dans des rivières recevant ces effluents. Parmi les médicaments psychotropes, plusieurs antidépresseurs ont été retrouvés dans des poissons de rivières recevant des rejets de STEP : la fluoxétine a d'ailleurs fait l'objet d'études de bioaccumulation en conditions contrôlées. Parmi les benzodiazépines, une seule étude a recherché le diazépam dans des organismes aquatiques montrant la présence de diazépam dans des foies de poissons marins pêchés en Californie près de rejets de STEP. Ces données ponctuelles mettent en évidence le peu de données sur la présence de benzodiazépines dans les organismes. Le tétrazépam, bien qu'étant la benzodiazépine la plus consommée en quantité en France et une des plus lipophiles, n'a fait l'objet que d'une étude d'occurrence dans l'environnement, et aucune dans les organismes. L'objet de ce travail est d'apporter des données sur la contamination d'organismes côtiers par le tétrazépam et le diazépam et d'étudier leur devenir dans ces mêmes organismes.

## **IV. Organismes aquatiques et contaminants organiques**

Il a été largement montré que des contaminants, métaux ou contaminants organiques lipophiles, pouvaient se retrouver en concentration plus importantes dans des organismes aquatiques que dans le milieu environnant (Andral et al. 2004; Goldberg 1975). Ces phénomènes sont appelés bioaccumulation, bioconcentration ou biomagnification. Ces organismes peuvent être des algues, des invertébrés, des poissons, des mammifères... Le milieu environnant inclut l'eau que les organismes respirent, l'eau ou les sédiments dans lesquels ils vivent, et la nourriture qu'ils consomment.

Plusieurs éléments poussent à s'intéresser à l'étendue de la bioaccumulation et à ces substances dites bioaccumulables. Tout d'abord, les organismes qui bioaccumulent peuvent être utilisés pour étudier la contamination environnementale. Ensuite, la consommation d'organismes contaminés comme les poissons ou les mollusques peut exposer le consommateur à des doses importantes de contaminants. Enfin, la réponse d'un organisme à une substance toxique dépend de la quantité de cette substance qui atteint l'organe ou le tissu cible.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de bioaccumulation de contaminants chimiques organiques et aux différents paramètres influant sur la présence de ces contaminants dans des organismes aquatiques et plus particulièrement dans les mollusques.

### **IV.1. Accumulation de contaminants organiques dans les organismes aquatiques**

#### **IV.1.1. Phénomènes biologiques**

La bioaccumulation et la bioconcentration ont lieu lorsque les quantités de substances absorbées par les organismes sont supérieures à celles excrétées ou dégradées.

##### **IV.1.1.1 Absorption**

Il existe plusieurs voies d'entrée pour une substance dans un organisme : directement à partir de l'eau par adsorption sur la surface de l'organisme telle que la barrière cutanée ou par adsorption dans des zones d'échange telles que les branchies ou les parois digestives, ou par ingestion de proies contaminées. Chez les organismes aquatiques simples tels que le plancton, la bioaccumulation se fait par des phénomènes d'absorption passifs. Chez les organismes plus « complexes », l'absorption passe principalement par la respiration et l'alimentation. L'équilibre entre ces deux voies dépend des concentrations relatives du contaminant dans l'eau et dans la nourriture et de la disponibilité de la nourriture. Une fois dans l'organisme, la substance peut diffuser vers les différents organes. Plus les

substances sont lipophiles, plus elles auront tendance à s'accumuler dans les tissus lipidiques. Plus on s'élève dans les niveaux trophiques, plus la part due à l'alimentation augmente (Deudero et al. 2007).

#### IV.1.1.2 Elimination

Les voies d'élimination d'un contaminant peuvent être variées ; toutefois l'excrétion est la voie principale d'élimination, elle s'accompagne ou non de métabolisation. En effet, contrairement aux métaux ou aux radionucléides, certains contaminants chimiques organiques peuvent être dégradés par les organismes (Livingstone 1998). La métabolisation entraîne la diminution plus ou moins rapide de contaminants parents, biotransformés en composés plus polaires plus faciles à éliminer. Les métabolites ainsi formés peuvent s'avérer stables, eux-mêmes bioaccumulables, ou toxiques. En fonction des contaminants ; l'élimination sous forme soluble peut se faire par désorption, par des procédés d'échanges ioniques ou par voies d'excrétion actives. L'élimination des contaminants peut également se faire sous forme particulaire avec des particules solides comme le matériel fécal ou les produits de reproduction. D'autres phénomènes participent de la diminution de la concentration en contaminants : la croissance de l'individu entraînant une dilution du contaminant et la reproduction. En effet, la libération des gamètes, la gestation et surtout l'allaitement chez les mammifères sont sources d'élimination du contaminant par l'individu adulte. Elle induit, en revanche, une augmentation de la contamination de la nouvelle génération.

Quand un organisme est transféré d'un environnement contaminé vers un environnement non contaminé, il se produit une décroissance rapide du niveau de contamination, suivie par une perte plus lente. La diminution initiale rapide peut être due à la désorption de polluants faiblement liés, à la défécation des matières non assimilées, à la libération de composés non métabolisés ... L'élimination plus lente reflète quant à elle, une perte provenant de compartiments de l'organisme où le contaminant est plus étroitement lié au tissu (Casas 2007).

#### IV.1.2. Définitions

L'accumulation de substances dans les organismes est nommée **bioconcentration**, **bioaccumulation** ou **biomagnification** selon les voies d'entrée de la substance dans l'organisme. (Papp 2009) dans un rapport du Collège National d'Experts en Environnement de l'Industrie Chimique (CNEEIC) définit ces trois termes. La bioconcentration est le résultat net de l'absorption, de la distribution et de l'élimination de la substance par l'espèce étudiée, du fait de l'exposition de l'espèce dans l'eau. La bioaccumulation est le résultat net des phénomènes d'absorption (uptake), de distribution et d'élimination de la substance dans l'espèce, du fait de toutes les voies d'exposition

(eau, nourriture, respiration). La bioconcentration et la bioaccumulation peuvent être caractérisées, respectivement, par un facteur de bioconcentration (BCF) ou un facteur de bioaccumulation (BAF). On appelle biomagnification, l'accumulation et le transfert de substances chimiques à travers la chaîne alimentaire (par exemple : algues – invertébrés – poissons – mammifères) due à l'ingestion d'une espèce par l'autre et dont le résultat est l'augmentation du niveau de concentration de la substance dans les organismes successifs de la chaîne trophique. Toutes les substances ne sont pas bioaccumulables et toutes les substances bioaccumulables ne se biomagnifient pas forcément. Enfin, le concept de **biodisponibilité** permet de faire la distinction entre les substances dont l'état physico-chimique leur permet d'agir sur le vivant et celles qui ne le peuvent pas. Est **biodisponible** une substance sous une forme physico-chimique qui lui permet de franchir les barrières biologiques d'un organisme (Papp 2009).

#### IV.1.3. Expression des facteurs

Le facteur de bioconcentration (BCF) est défini par le ratio de la concentration en un contaminant dans l'organisme ( $C_o$ ) sur la concentration de la fraction dissoute du contaminant ( $C_{wd}$ ).

$$BCF = \frac{C_o}{C_{wd}}$$

Le facteur de bioaccumulation (BAF) est défini par le ratio de la concentration en un contaminant dans l'organisme ( $C_o$ ) sur la concentration dans l'eau brute ( $C_{wt}$ ).

$$BAF = \frac{C_o}{C_{wt}}$$

Les unités utilisées pour la quantification des facteurs de bioaccumulation et de bioconcentration varient : le plus souvent, les concentrations dans les organismes sont exprimées en quantité sur la masse humide ou sèche. Si l'unité dans l'organisme est le  $\mu\text{g}/\text{kg}$  et dans l'eau  $\mu\text{g}/\text{l}$ , alors le BAF et le BCF seront exprimés en  $\text{l}/\text{kg}$  (si la densité de la moule et de l'eau sont égales alors les facteurs sont sans dimension).

Le facteur de biomagnification (BMF) est défini comme le ratio de la concentration du contaminant dans l'organisme ( $C_o$ ) sur la concentration dans son régime alimentaire ( $C_d$ ). De manière générale, les concentrations sont rapportées à la masse de lipides, le BMF étant alors sans dimension. Un problème se pose quand un organisme ingère plusieurs types de proies contenant des taux différents en contaminant (Mackay et Fraser 2000).

$$BMF = \frac{C_o}{C_d}$$

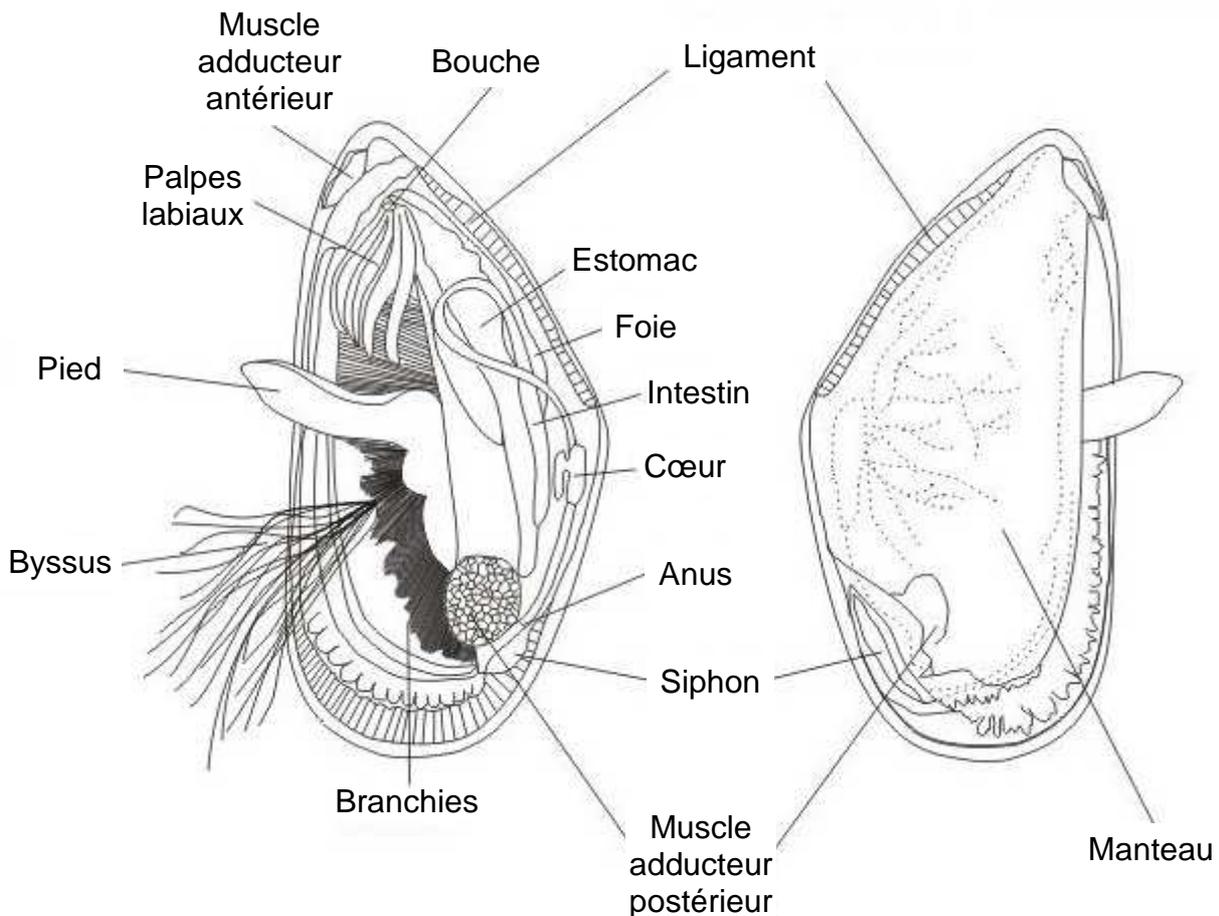
## IV.2. Présentation du modèle d'étude (*Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus edulis*)

Dans ce travail, deux espèces de moules ont été utilisées : *Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus edulis*. Ces deux espèces sont très proches. *Mytilus galloprovincialis*, la moule de Méditerranée et *Mytilus edulis*, la moule bleue, sont des mollusques appartenant à la classe des lamellibranches ou bivalves de la famille des mytilidés. Les deux espèces possèdent le même nombre de chromosomes et des croisements entre elles sont possibles. Elles diffèrent principalement par leur croissance et leur cycle sexuel. Le genre *Mytilus* est extrêmement répandu dans le monde, allant des régions tropicales aux mers polaires. *M. galloprovincialis* est retrouvée principalement en Méditerranée tandis que *M. edulis* est majoritairement présente en Atlantique et en Mer du Nord.

### IV.2.1. Anatomie et physiologie

L'anatomie de la moule est présentée dans la Figure 6. La moule est composée de deux valves égales, reliées par un **ligament** externe au niveau d'une charnière sans dent et maintenues par deux **muscles adducteurs**. La coquille est composée à 95 % de carbonate de calcium. Le corps de la moule est entouré du **manteau** composé de deux lobes. Ces deux lobes sont soudés dorsalement sauf au niveau du **siphon exhalant** et libres ventralement, ils délimitent alors la cavité palléale. Le rôle principal du manteau est d'assurer la formation de la coquille, sa calcification et la sécrétion du ligament. Le **pied** est une saillie musculaire d'une grande mobilité qui contient la glande byssogène. Le **byssus**, de nature protéique, est constitué de nombreux filaments très résistants terminés par un disque adhésif. La moule peut rompre ces filaments les uns après les autres pour se déplacer.

Le **système nerveux** de la moule est décentralisé et comprend trois paires de ganglions cérébro-pleuraux. Le **cœur** est situé sur la face dorsale, il comprend deux oreillettes et un ventricule et est entouré d'une mince membrane : le péricarde. Le sang passe dans deux aortes, une antérieure et une postérieure, puis dans des artères et artérioles et aboutit dans des lacunes ou sinus où il circule pour baigner les tissus. Le sang est ensuite ramené au cœur par des veines. Le sang contient des **amibocytes**, cellules à très grand pouvoir phagocytaire qui transportent les produits de la digestion vers les différents tissus et les déchets vers leur voies d'évacuation et qui assurent l'arrêt des hémorragies.



**Figure 6. Anatomie d'une moule *Mytilus sp.***

Les **branchies** à filaments séparés sont au nombre de deux ; elles sont reliées à la masse viscérale sur la face dorsale par l'intermédiaire de l'axe branchiale. Les branchies sont les organes de la respiration : elles assurent l'oxygénation du sang. Elles créent également le courant d'eau assurant la survie de la moule : le courant d'eau pénètre entre les lobes du manteau, traverse les branchies et ressort par le siphon exhalant. Enfin, les branchies retiennent les particules en suspension pour l'alimentation.

La **bouche** est située dans la partie antérieure du corps, c'est une ouverture transversale dont les lèvres se continuent par deux paires de palpes labiaux. L'œsophage est très court et débouche sur l'**estomac** dont partent les diverticules digestifs également appelés **foie**. L'**intestin** est relié à l'estomac et se termine par le rectum qui traverse le ventricule du cœur. L'**anus** est situé près du siphon exhalant.

La collecte des particules en suspension dans l'eau est assurée par les branchies. Une fois captées, les particules consommables sont convoyées vers les palpes branchiaux et la bouche alors que les particules non consommables sont rejetées à l'extérieur (pseudofécès). La digestion presque

exclusivement intracellulaire a lieu dans les cellules des tubules digestifs et dans les phagocytes du sang. Les éléments non digérés sont rejetés avec les fèces. La moule filtre jusqu'à 100 litres d'eau par jour; elle est capable d'opérer un tri concernant la nature et la taille des particules qu'elle ingère dont le diamètre est compris entre 3 et 13 micromètres. Elle se nourrit de phytobenthos (diatomées), de phytoplancton et de débris organiques.

Le système excréteur comprend deux **reins** qui communiquent à la fois avec la cavité péricardique et la cavité palléale. Une partie des déchets vient directement du sang par passage de la paroi du cœur ; elle tombe dans la cavité péricardique avec les produits d'excrétion des glandes péricardiques. Le liquide de cette cavité passe ensuite dans les reins qui ajoutent leur propre sécrétion, puis le rejettent dans la cavité palléale.

Chez la moule, les sexes sont séparés et la maturité sexuelle est acquise au bout d'un an. La glande génitale s'étend de façon diffuse dans le manteau. Les gonades sont blanchâtres chez les mâles et jaunes orangés chez les femelles. Les gonades sont constituées d'une multitude de follicules où se forment ovules ou spermatozoïdes. Les canaux excréteurs se regroupent pour former des troncs principaux convergents sous le péricarde et les deux gonoductes terminaux aboutissent à deux papilles génitales près du muscle adducteur postérieur. Le cycle sexuel de la moule (Figure 7) comprend quatre stades, allant du repos au cours duquel l'animal accumule des réserves, à la maturité sexuelle. Ces stades dépendent de la maturité des follicules puis des gamètes. Lorsque les produits génitaux sont arrivés à maturité, ils sont expulsés dans le milieu extérieur où a lieu la fécondation et la réussite de la reproduction dépend de la rencontre dans l'eau des gamètes mâles et femelles. Les variations brusques du milieu favorisent cette émission. Plusieurs pontes peuvent se succéder au cours de la période de reproduction. La période de reproduction est définie de février à juillet. La larve, de type véligère, est zooplanctonique, puis se fixe pour donner l'individu adulte qui, dans la nature, restera fixé.

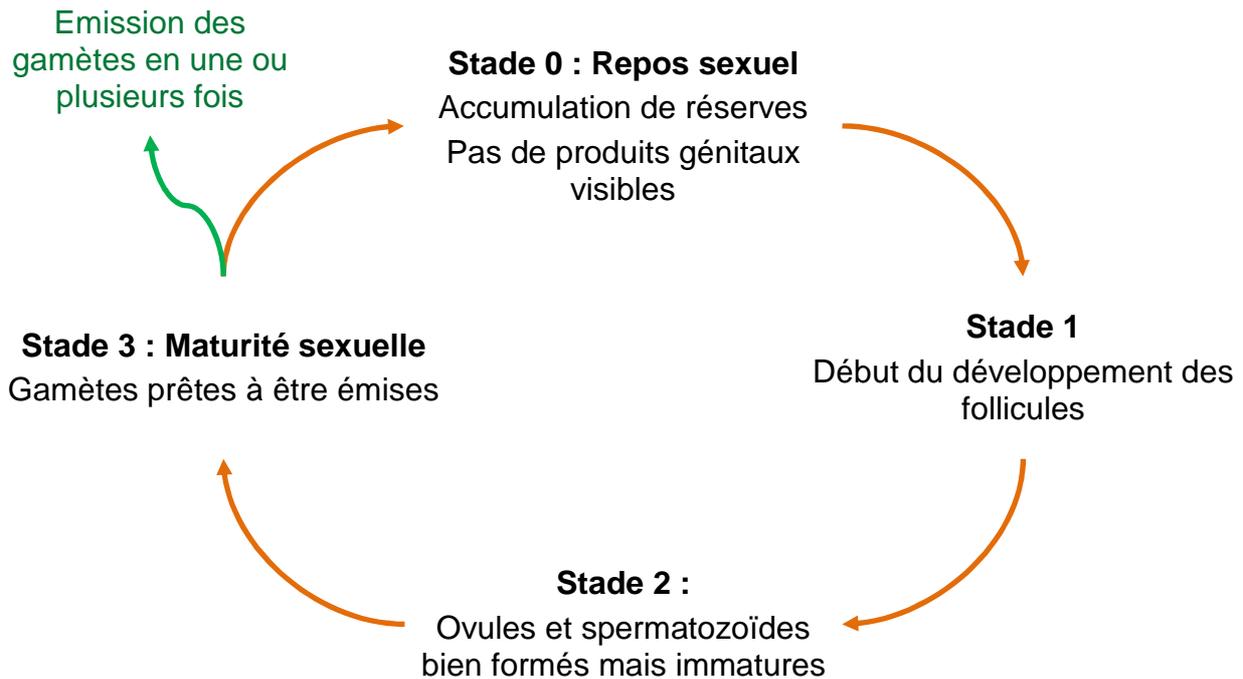


Figure 7. Stades de développement sexuel de la moule *Mytilus sp.*

#### IV.2.2. Ecologie

La moule est un animal commun des côtes françaises. Cet animal grégaire et sessile vit sur le sable ou les rochers de l'estran ou la sub-surface. Elle résiste aux courants, aux chocs des vagues et à l'arrachement grâce aux solides filaments du byssus qui sont soudés au rocher. Elle est pourtant capable de se déplacer après avoir rompu une partie des filaments du byssus et avoir déposé un peu plus loin sur le rocher de nouveaux filaments grâce auxquels elle se hale. La moule est résistante, elle est capable de supporter une longue émergence grâce à une réserve d'eau entre les deux valves.

#### IV.2.3. Utilisations des bivalves comme outils de surveillance

De nombreuses études s'intéressent à la contamination des mollusques bivalves dans les milieux aquatiques, et en particulier aux moules. Différentes espèces sont utilisées : en eaux douces, les moules zébrées (*Dreissena polymorpha*) (Berny et al. 2002), et en eaux de mer, les moules bleues (*Mytilus edulis*) (Ramu et al. 2007), les moules de Méditerranée (*Mytilus galloprovincialis*) (Andral et al. 2004; Rosen et Lotufo 2007), les moules vertes (*Perna viridis*) (Shek et al. 2008)... Les espèces sont choisies en fonction des zones étudiées. Les moules présentent l'avantage d'être des organismes benthiques, de petites tailles, grégaires, communs et sessiles. Elles sont présentes en grand nombre dans de nombreux environnements et sont aisément manipulables. Ces particularités,

associées à leurs caractéristiques d'espèce bioaccumulatrice, en font des organismes fréquemment utilisés pour la biosurveillance de l'environnement.

Les premières utilisations de mytilidés pour étudier les niveaux et les évolutions de contaminations chimiques dans le milieu aquatique datent du milieu des années 1970 (Goldberg 1975). La bioaccumulation a d'abord été mise en évidence pour les métaux bivalents, puis pour les substances chimiques organiques lipophiles comme les organochlorés (Andral et al. 2004). Depuis, de nombreuses substances organiques lipophiles ont été recherchées et retrouvées dans les mytilidés dont les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Baumard et al. 1999), les polychlorobiphényles (PCB) (Bergen et al. 1993) ou le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) ou ces dérivés (Tanabe 2000). Des moules ont été utilisées avec succès pour la surveillance de la contamination des milieux côtiers en polluants organiques et des programmes de surveillance ont été développés aux Etats-Unis (Goldberg et Bertine 2000), en Asie (Monirith et al. 2003) et en Europe (Andral et al. 2004). Récemment, l'étude de la bioaccumulation s'est étendue aux perturbateurs endocriniens (Janer et al. 2005), aux pesticides (Berny et al. 2002), aux médicaments (Le Bris et Pouliquen 2004) et autres contaminants émergents. La bibliographie comporte 2 types d'étude sur les substances chimiques organiques dans les moules : les études qui étudient la faculté d'accumulation de substances chimiques organiques dans les moules et les études de surveillance de la contamination du milieu qui utilisent les moules comme bioconcentrateur (Andral et al. 2004; Goldberg et Bertine 2000; Monirith et al. 2003).

#### IV.2.3.1 Stratégies utilisées

L'utilisation des moules pour la surveillance du milieu peut faire appel à 2 stratégies : la biosurveillance passive utilisant des moules présentes sur les sites (Claisse 1989; Goldberg 1975; Monirith et al. 2003) ou la biosurveillance active utilisant la transplantation de moules sur les sites à surveiller (Andral et al. 2004). La biosurveillance passive demande la mise en place d'un programme d'échantillonnage moindre que la biosurveillance active et est parfois nécessaire dans des environnements où on ne peut pas transplanter de moules. La biosurveillance active permet de pallier les différences de population entre les sites d'étude, de calibrer les moules pour travailler avec des individus de même taille et au même stade de développement et de maîtriser le temps d'exposition des individus.

#### IV.2.3.2 Avantages

L'utilisation d'organismes pour évaluer la contamination d'un milieu permet de s'affranchir des fluctuations journalières des masses d'eau et d'évaluer le niveau de contamination sur une

période de plusieurs mois. La moule est une espèce bioaccumulatrice : elle concentre une large gamme de contaminants par rapport aux concentrations dans l'eau environnante, donnant une représentation directe de toutes les fractions biodisponibles de la colonne d'eau des polluants (Bergen et al. 1993). Elle possède par ailleurs une activité P450 relativement faible. Sa large répartition géographique, sa taille et sa résistance permettent une utilisation aisée pour cette ressource abondante.

#### IV.2.3.3 Inconvénients

Bien que les concentrations mesurées dans les tissus soient fonction de la biodisponibilité et des niveaux des contaminants, la bioaccumulation dépend également de la croissance des moules en relation avec les caractéristiques physico-chimiques, de la présence de nourriture dans l'environnement et de la saison d'échantillonnage (Andral et al. 2004). Les moules sont également capables de métaboliser certains contaminants ; dans ce cas, elles ne reflètent pas les concentrations environnementales (Livingstone 1998). Enfin, la mise en place de campagne de prélèvements est plus lourde que pour des prélèvements d'eau ou de sédiments.

#### IV.2.3.4 Programmes de surveillance

##### *US Mussel Watch (Kimbrough 2008)*

Le programme de surveillance US Mussel Watch a été mis en place en 1986 : il comptait à l'époque 145 sites. Le but de ce programme est de soutenir une gestion fondée sur les écosystèmes par le biais d'un programme national intégré de surveillance de l'environnement, d'évaluation et de recherche pour décrire l'état et les tendances des estuaires et des côtes des Etats-Unis. L'US Mussel Watch compte actuellement près de 300 sites de surveillance où plus de 140 contaminants, métaux ou chimiques organiques dont des dieldrines, des butylétains, des PCB, des DDT, des HAP et des Chlordane sont mesurés dans des populations de bivalves résidents. En effet, la zone suivie ne comprenant pas une espèce de moules ou d'huîtres présentes partout, l'étude porte sur des moules (*Mytilus sp.*), des huîtres (*Crassostrea virginica*) et des moules zébrées (*Dreissena sp.*). Des niveaux élevés en contaminants organiques se trouvent près de zones urbaines et industrielles. La plupart des contaminants organiques étudiés n'ont pas de source naturelle, pourtant, leur distribution est ubiquitaire. Globalement depuis 20 ans, les concentrations en contaminants organiques dans les moules ont décliné pour tous les sites étudiés.

##### *Réseau Intégrateurs Biologiques : RINBIO (Andral et al. 2004)*

Le Réseau Intégrateurs Biologiques (RINBIO) a pour objectif d'évaluer les niveaux de contamination chimique et radiologique dans un ensemble de stations qui se répartissent sur tout le

littoral méditerranéen. Il utilise la technique des transplants sur une période de 3 mois. Cette méthode de transplantation permet de contrôler la source, l'âge (de 18 à 24 mois) et le stade de maturité sexuelle (en dormance) des échantillons. Des PCB, des HAP, les congénères du DDT et des HCH ( $\gamma$  et  $\alpha$ ) sont analysés dans les moules. Les PCB 138 et 153 ont été détectés à des niveaux atteignant 72 ng/g de poids sec, le fluoranthène a été le seul HAP détecté en 2000. Durant les différentes campagnes de transplantation de moules sur le littoral méditerranéen, Andral et al. (2004) ont ainsi déterminé des corrélations entre l'indice de condition (IC) ( $IC = \text{masse de chair sèche} / \text{masse de coquille sèche}$ ) et les concentrations en différents contaminants organiques (comme les HAP, le PCB 153, 138 ou le DDT et ses métabolites) dans les moules.

*Programme de surveillance du pacifique asiatique par des moules : Asia-Pacific mussel watch (Monirith et al. 2003; Tanabe 2000)*

Le programme de surveillance par les moules dans le Pacifique asiatique s'est intéressé aux composés organochlorés persistants que sont les PCB (polychlorobiphényles), le DDT et ses métabolites (DDT), les isomères d'HCH (hexachlorocyclohexane) (HCH), les composés chlordanes (CHLS), et le HCB (hexachlorobenzène). Ces substances ont été analysées dans des moules collectées dans des eaux côtières de pays d'Asie dont le Cambodge, la Chine, Hong Kong, l'Inde, l'Indonésie, le Japon, la Corée, la Malaisie, les Philippines, la Russie, Singapour et le Vietnam en 1994, 1997, 1998, 1999 et 2001. Des composés organochlorés persistants ont été détectés dans toutes les moules recueillies sur tous les sites d'échantillonnage. En particulier, des niveaux considérables de DDT, allant jusqu'à 61 000 ng/g de lipides, ont été retrouvés dans les moules, comparativement aux concentrations retrouvées dans les pays développés. D'autre part, des concentrations en PCB plus faibles dans les moules en provenance des pays asiatiques en développement (en moyenne 35 ng/g de lipides au Cambodge) que dans les moules de pays développés (en moyenne 3 000 ng/g de lipides au Japon) indiquent que la contamination en PCB dans les moules est fortement liée à l'activité industrielle.

#### IV.2.3.5 Accumulation de muscs polycycliques dans des moules dans l'environnement (Shek et al. 2008)

Des muscs polycycliques ont été détectés dans des moules à lèvres vertes (*Perna viridis*) de Hong Kong : le celestolide, le galaxolide et le tonalide. Ils atteignent des concentrations de 74,3  $\mu\text{g/g}$  de lipides pour le celestolide, de 6 080 ng/g de lipides pour le galaxolide et de 738 ng/g de lipides pour le tonalide. Aucun BCF n'a pu être calculé.

### IV.3. Facteurs influant sur la bioaccumulation d'une substance chimique organique

La capacité d'une substance à se bioaccumuler est liée à sa biodisponibilité qui dans le cas de substances organiques neutres est en relation avec sa solubilité dans l'eau. De nombreux paramètres influent sur la biodisponibilité d'une substance : ses caractéristiques physicochimiques mais également de nombreux paramètres environnementaux. Le dernier élément à prendre en compte est l'organisme lui-même.

#### IV.3.1.1 Propriétés physico-chimiques des contaminants

La faculté d'une substance à se bioaccumuler dépend de sa nature et plus particulièrement de sa solubilité dans les lipides. Le coefficient de partage octanol-eau ( $K_{ow}$ ) exprime l'affinité d'une substance pour les phases hydrophobes. Des expériences de bioconcentration ont permis d'établir des corrélations entre le facteur de bioconcentration et le coefficient de partage octanol-eau (Mackay et Fraser 2000). Classiquement, les substances ayant un  $\log K_{ow}$  supérieur à 4,5 sont dites bioaccumulables (OSPAR). Plusieurs paramètres structuraux rentrent également en compte : des molécules ayant une masse moléculaire comprise entre 200 et 600 Da, ne comprenant pas de groupement polaire mais plutôt des liaisons Carbone-Carbone aliphatiques ou aromatiques ou des substitués halogénés sont les plus susceptibles de s'accumuler dans les organismes. Ces caractéristiques structurales réduisent la solubilité des molécules mais renforcent leur persistance (résistance aux processus de dégradation). Parmi les exemples de composés bioaccumulés figurent les polluants organiques persistants (POP) comme l'aldrine, le chlordane, les DDT, des PCB...

Toutefois, l'ensemble d'un contaminant présent dans l'eau n'est pas disponible pour être accumulé. Une partie peut être emprisonnée sous des formes adsorbées ou absorbées sur le carbone organique dissout ou particulaire. Classiquement, on considère que la fraction biodisponible d'un contaminant est la partie dissoute de ce contaminant (Mackay et Fraser 2000). En principe, si une solution contient une fraction volumique de matériel adsorbant  $v_s$  et que la substance a un coefficient de partage entre la phase dissoute et la phase particulaire  $K_{sw}$ , la fraction de concentration dissoute ( $C_{wd}$ ) sur la concentration totale ( $C_{wt}$ ) est :

$$\frac{C_{wd}}{C_{wt}} = \frac{1}{(1 - v_s) + K_{sw} v_s}$$

Or,  $K_{sw}$  peut-être calculé à partir du coefficient de partage octanol-eau ( $K_{ow}$ ) et de la teneur en carbone organique de la fraction absorbante (Mackay et Fraser 2000). Ainsi, les substances ayant un  $K_{ow}$  élevé ( $>10^5$ ) ont un  $K_{sw}$  élevé et la fraction biodisponible diminue.

#### IV.3.1.2 Paramètres biologiques

##### *Variabilité inter-espèces*

Toutes les espèces n'ont pas les mêmes capacités d'accumulation des contaminants organiques. Tout d'abord, la teneur en lipides est souvent un facteur influant puisqu'il constitue un compartiment de stockage important. De manière générale, les niveaux trophiques supérieurs peuvent accumuler plus que les niveaux inférieurs (Deudero et al. 2007). Afin de comparer, les niveaux de contamination d'un contaminant entre plusieurs espèces, les concentrations sont souvent rapportées à la masse de lipides. Ensuite, l'habitat d'une espèce va déterminer son exposition : les organismes benthiques seront par exemple en contact avec les sédiments et la microcouche de surface n'aura pas d'influence sur leur contamination. Les voies d'alimentation qui sont des voies d'exposition, jouent également un rôle important.

Les mollusques bivalves filtreurs comme la moule de Méditerranée (*Mytilus galloprovincialis*) sont des espèces dites « bioaccumulatrices » car elles ont la capacité d'accumuler les contaminants à des niveaux supérieurs à ceux du milieu, permettant ainsi une surveillance du degré de contamination des milieux aquatiques (Andral et al. 2004). Leur mode de vie entraîne des contacts avec les contaminants de la phase dissoute par leur respiration et des contacts avec les contaminants de la phase particulaire par leur alimentation. Les moules se situent sur la deuxième marche de la chaîne trophique.

Enfin, certaines substances peuvent être dégradées *in vivo* par des procédés enzymatiques dans les tissus des espèces marines ; ces procédés peuvent varier d'une espèce à l'autre. La biotransformation de substances organiques passe par l'introduction d'un groupement fonctionnel (phase I) suivi de l'attachement d'un groupement polaire (phase II) favorisant l'élimination. La plupart des enzymes responsables de la biotransformation chez les mammifères ont également été retrouvées ou indiquées chez des poissons ou des invertébrés marins dont des enzymes de phase I telle que la cytochrome P450 (CYP 450) monooxygénase, ou de phase II que la glutathion S-transferase (Livingstone 1998). Les isoenzymes du CYP 450 sont d'une importance centrale dans la métabolisation de substance endogène ou exogène, or le taux de CYP 450 est en général supérieur chez les poissons d'un facteur 10 à celui des invertébrés marins (Livingstone 1998). Ainsi, il a été montré que les poissons métabolisaient les PCB et le benzo[a]pyrène plus rapidement que les mollusques et que les crustacés métabolisaient les hydrocarbures plus rapidement que les mollusques (Livingstone 1998). Les différences dans les taux de biotransformation entre les invertébrés et les vertébrés aquatiques influent sur la bioaccumulation des substances facilement métabolisables tels que les HAP avec une bioaccumulation plus élevée au bas de la chaîne alimentaire chez les

invertébrés marins (Livingstone 1998). A l'inverse, pour les substances non biodégradables, comme certains congénères de PCB, la bioaccumulation augmente le long de la chaîne trophique.

#### *Variabilité intra-espèce*

Au sein d'une même espèce, les performances d'accumulation varient en fonction de l'âge, du stade de développement, du stade dans le cycle de reproduction de l'organisme. Les teneurs en lipides doivent être prises en compte dans l'étude de la bioaccumulation des polluants organiques hydrophobes. Or les teneurs en tissus adipeux varient selon les saisons. Ces variations sont dues à la fois au cycle de reproduction et aux conditions biologiques des organismes marins. Chez les mollusques bivalves, et en particulier chez les moules, les processus liés à la reproduction entraînent une accumulation temporaire de réserves importantes qui sont ensuite converties en gamètes puis expulsées lors de la ponte, occasionnant une perte brutale de poids et un ralentissement, voire un arrêt de la croissance. Durant la ponte, plus de 40 % du poids des tissus est perdu.

Ainsi, il a été montré qu'il y avait une relation claire entre l'âge et la taille de moules d'eau douce (*Dreissena polymorpha*) et leur potentiel d'accumulation du lindane (Berny et al. 2002) : les individus les plus petits accumulant significativement plus de lindane que les plus grands, et les individus les plus âgés présentant une demi-vie terminale d'élimination plus longue.

#### IV.3.1.3 Paramètres environnementaux

Les paramètres physico-chimiques du milieu peuvent également influencer sur les performances de bioaccumulation de deux façons : en influant sur la biodisponibilité de la substance et en influant sur les performances de l'organisme.

##### *Influent sur la biodisponibilité*

La fraction biodisponible d'un contaminant correspond en général à sa fraction dissoute. Or, la part dissoute d'un contaminant dépend de sa solubilité dans l'eau, mais également de la composition du milieu. Si la fraction volumique de matériel adsorbant est élevée (cf IV.3.1.1), la fraction dissoute biodisponible est diminuée (Mackay et Fraser 2000). De même, les caractéristiques des sédiments influent sur la biodisponibilité des composés organiques hydrophobes : une faible teneur en carbone organique augmente la biodisponibilité des substances (Baumard et al. 1998).

De manière générale, les moules qui filtrent de grands volumes d'eau et retiennent des particules en suspension de 3 à 13  $\mu\text{m}$ , sont exposées à la fraction dissoute mais également à la partie de la fraction particulaire qu'elles consomment. Toutefois, quand la turbidité de l'eau est faible, ce qui est généralement le cas en Méditerranée (autour de 1mg/l), les moules sont principalement

exposées à la fraction dissoute des substances organiques hydrophobes (Baumard et al. 1998). A l'inverse, des bivalves situés dans des eaux turbides ou proches des sédiments, accumulent plus de HAP hydrophobes au contact de la phase particulaire (Baumard et al. 1999).

Enfin, dans le cas des HAP, la microcouche présente à l'interface air-eau semble être une source biodisponible (Baumard et al. 1998) pouvant expliquer un niveau de HAP élevé chez des moules provenant d'un site faiblement contaminé. Ce phénomène avait déjà été rapporté par Naes et al. (1995) pour qui les niveaux en HAP sont plus importants dans des espèces de moules vivant en surface (*Mytilus edulis*) que dans des moules provenant de la colonne d'eau (*Modiolus modiolus*).

### *Influent sur les organismes*

Les organismes adaptent leur métabolisme aux caractéristiques physico-chimiques du milieu qui les entoure ainsi qu'à la disponibilité de leur nourriture. Ainsi, *M galloprovincialis* adapte son taux de filtration à son environnement : la filtration sera maximale pour ces conditions optimales : une salinité comprise entre 30 et 38‰, une température de l'ordre de 20°C (Riva et Massé 1983). A l'inverse, la filtration sera très fortement diminuée, voire stoppée pour des conditions de stress : pour une salinité inférieure à 15‰ ou supérieure à 40‰ ou pour des températures supérieures à 28°C (Riva et Massé 1983).

Chez *M. edulis*, des différences dans la ration alimentaire influencent le taux d'absorption des PCB, la décontamination est quant à elle principalement affectée par les différences de concentration en algues. Ces différences d'absorption sont principalement causées par une modification de l'activité physiologique des moules et seulement dans une moindre mesure par des changements dans la biodisponibilité des PCB (Björk et Gilek 1997). En laboratoire, une concentration en algues plus élevée augmente la bioaccumulation du benzo[a]pyrène dans *M. edulis* (Okay et al. 2000).

## **IV.4. Modélisation de l'accumulation de contaminants dans les organismes**

La grande diversité des substances chimiques organiques et le renouvellement constant des molécules utilisées ne permettent pas d'étudier la bioaccumulation de toutes ces substances dans toutes les espèces. Afin d'identifier les molécules pouvant se bioaccumuler et poser des problèmes spécifiques de toxicité, des modèles ont tenté de prédire le comportement des substances dans les organismes. Ces modèles peuvent être très simples en se basant uniquement sur le  $\log K_{ow}$  ou spécifiques d'une espèce comme les modèles basés sur le bilan énergétique (DEB). Les modèles environnementaux ont été mis au point et principalement utilisés sur des contaminants au comportement connu que sont les PBT.

### **IV.4.1. Relation quantitative structure activité (QSAR)**

L'étude de la relation quantitative structure-activité est la mise en corrélation d'une structure chimique avec un effet déterminé comme l'activité biologique ou la réactivité chimique. Dans le contexte de la bioaccumulation des substances chimiques organiques, ce type de modèle a surtout été utilisé pour évaluer le  $\log K_{ow}$  des substances chimiques permettant d'évaluer la bioaccumulation de la substance (Sabljić 2001). Ces modèles ont également servi à évaluer les facteurs de bioconcentration en particulier pour les substances chimiques organiques fortement hydrophobes (Papa et al. 2007).

### **IV.4.2. Les modèles empiriques de bioaccumulation**

Les premiers modèles de bioaccumulation de substances organiques chimiques ont été basés sur l'utilisation de corrélations empiriques pour décrire les phénomènes de bioconcentration dans les organismes aquatiques en utilisant les propriétés physicochimiques des contaminants (Neely et al. 1974). Ce premier travail a établi une corrélation entre le  $\log K_{ow}$  des contaminants chimiques organiques lipophiles et le facteur de bioaccumulation :

$$\log BCF = 0,542 \log K_{ow} + 0,124$$

Plusieurs études ont ensuite approfondi ce type de corrélation jusqu'à établir des relations fonction de la nature du contaminant, ionique ou non, et de son  $\log K_{ow}$  (Meylan et al. 1999). Ce traitement par classes a le mérite de refléter la décroissance observée dans le BCF des substances à très fort  $\log K_{ow}$ . Cependant, le pH et le pKa ne sont pas pris en compte pour les composés ioniques. Enfin, il n'y a pas de traitement mécanistique de la biodisponibilité, ni de prise en compte de la taille

de molécules, alors que de très grosses molécules avec des hautes valeurs de  $K_{ow}$  passent moins bien les membranes (Mackay et Fraser 2000).

Enfin, un troisième type d'étude a montré que le coefficient de corrélation entre le BCF et le  $K_{ow}$  peut être estimé par la teneur en lipides de l'organisme (Mackay et Fraser 2000). Ainsi (Mackay et Fraser 2000) propose l'utilisation d'un modèle simple empirique lors d'une première évaluation de la bioaccumulation d'un contaminant dans un organisme :

$$BCF = 1 + L.K_{ow}$$

avec  $L$  : la teneur en lipides de l'organisme.

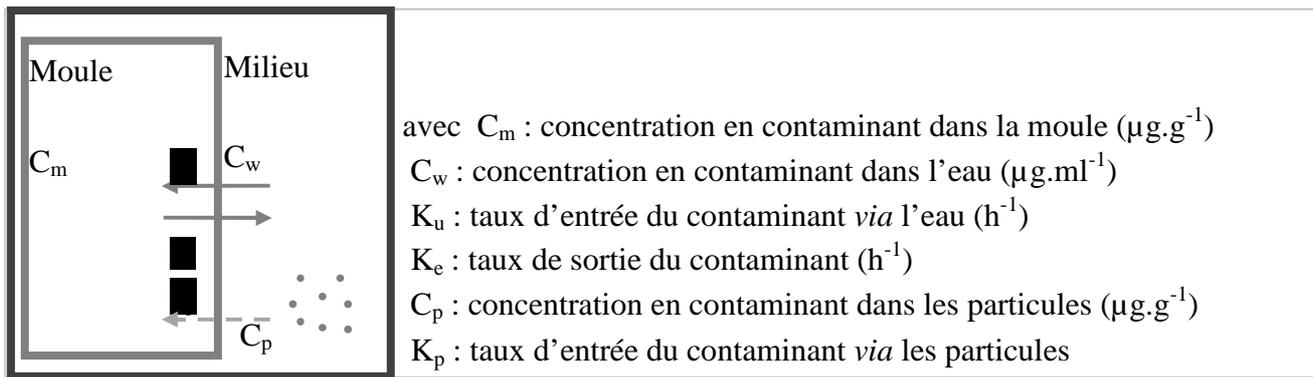
Cette équation est applicable pour les substances avec un BCF supérieur à 5000 ou un  $K_{ow}$  supérieur à 100 000, la substance n'étant pas ionisable. Quand cette teneur n'est pas connue,  $L$  peut être estimé par 0,05. Cette équation est basée sur les hypothèses suivantes : la répartition dans les lipides est majoritaire ; il n'y a pas de métabolisation ; il n'y a pas de biomagnification ; 100% de la substance est biodisponible ; l'équilibre est atteint. Selon (Mackay et Fraser 2000), ce type d'approche simpliste est nécessairement sujet à erreurs en raison de l'influence couplée de facteurs environnementaux et biologiques sur la bioaccumulation ; il reste cependant utile pour une première évaluation de la bioaccumulation d'un contaminant dans un organisme.

### **IV.4.3. Les modèles à compartiments**

L'approche dominante de modélisation en écotoxicologie se fait via les modèles à compartiments. L'analyse commence par l'identification des compartiments qui peuvent être n'importe quelle entité traitée de façon homogène au regard d'une entité transportée à partir ou vers ce compartiment : les compartiments peuvent être une part de l'environnement (comme un lac ou un site expérimental) ou un organisme (comme un poisson ou un bivalve) ou une partie spécifique d'un organisme (comme l'estomac ou le soma). L'entité transportée est dans ce cas le contaminant. Il existe plusieurs types de modèles à compartiments plus ou moins complexes.

#### **IV.4.3.1 Les modèles cinétiques**

Les modèles cinétiques compartimentaux décrivent les flux de contaminants au cours du temps entre des compartiments. Une substance transite dans un compartiment avec un taux d'entrée ( $k_u$ ) et un taux d'élimination ( $k_e$ ) (Figure 8). Dans ces modèles, la moule est représentée par un compartiment unique où l'accumulation et les pertes sont liées à la concentration en contaminant présent dans le milieu, indépendamment de l'état physiologique de l'organisme.



**Figure 8. Schéma conceptuel du modèle de bioaccumulation cinétique avec un compartiment et équation correspondante**

La concentration en contaminant dans l'organisme ( $C_{\text{moule}}$ ) résulte de la balance nette de la capture de contaminant *via* l'eau ( $k_u C_{\text{eau}}$ ) et de l'élimination par l'organisme ( $k_e C_{\text{moule}}$ ). L'organisme est ainsi vu comme un compartiment unique homogène. Il est possible de rajouter une entrée du contaminant sous forme particulaire ( $k_p C_{\text{part}}$ ) (Figure 8). La résolution de l'équation différentielle du modèle (Figure 8) implique un certain nombre d'hypothèses pour être appliquée : le compartiment est supposé homogène au vu de la concentration en contaminant donc sa répartition au sein de l'organisme est instantanée ; la capture et l'élimination sont le résultat d'un processus passif : les flux sont proportionnels à la concentration en contaminant du milieu donneur ; la concentration d'exposition est constante et non influencée par la capture au sein de l'organisme ; le compartiment récepteur a un volume constant : l'organisme ne grandit et ne maigrit pas ; les taux sont constants en temps et en concentration.

L'interprétation de l'accumulation de contaminants dans les organismes biologiques peut être réalisée en utilisant des modèles à plusieurs compartiments. En effet, les contaminants, sous forme libre ou complexée, accèdent à différents compartiments internes de l'organisme. Les processus d'accumulation dans les tissus sont extrêmement complexes. Le degré de complexité peut devenir très important pour suivre, par exemple, la dynamique des contaminants au sein de plusieurs organes d'un individu afin d'en expliquer l'organotropisme. Ainsi, la nature et l'étendue des processus de partition pour chaque contaminant sont variables selon le compartiment et l'organe et sont déterminées par un nombre important de propriétés physico-chimiques correspondantes à chaque sous-unité.

#### IV.4.3.2 Les modèles cinétiques à base physiologique (Björk et Gilek 1997)

Dans la représentation des processus apparaissent des paramètres. Ceux-ci sont souvent mal connus et leur détermination *in situ* est quasi impossible. C'est dans cette optique que s'est

développée, à partir des modèles cinétiques à compartiments basiques, une stratégie à base physiologique. Pour modéliser la capture de PCB dans des moules, *M. edulis*, (Björk et Gilek 1997) étendent un modèle cinétique à compartiments en exprimant les constantes par des paramètres physiologiques :

$$\frac{dC_m}{dt} = AE_w C_{dw} F_w + AE_a C_a F_a - k_d C_m$$

avec  $C_m$  : concentration en contaminant dans la moule ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  d.w.) ;

$C_{dw}$  : concentration en contaminant dissout dans l'eau ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) ;

$C_a$  : concentration en contaminant dans les algues ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  carbone) ;

$AE_w$  : efficacité d'assimilation via l'eau (s.u.) ;

$F_w$  : flux d'eau masse-spécifique ( $\text{ml}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  d.w.) ;

$AE_a$  : efficacité d'assimilation via les algues (s.u.) ;

$F_a$  : flux d'algues masse-spécifique (filtration) ( $\text{g}\cdot\text{carbone}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  d.w.) ;

$k_d$  : taux de décontamination ( $\text{h}^{-1}$ ) ;

Ce type de modèle peut se complexifier en prenant en compte un plus grand nombre de paramètres : différents types de nourriture ; différentes voies d'entrée ; en adaptant le taux de filtration à la masse de l'organisme, à la matière organique particulaire, à la température ; variation du taux d'ingestion ; croissance de l'individu ; différents paramètres de sortie ; efficacité d'assimilation....

#### IV.4.3.3 Modèle pharmacocinétique à base physiologique (PBPK)

Les modèles toxicocinétiques/pharmacocinétiques décrivent le devenir des substances toxiques/pharmaceutiques dans un organisme vivant au cours du temps. Ce devenir est déterminé par les processus d'absorption, de distribution, de métabolisation et d'élimination (ADME). Ces modèles sont parmi les plus perfectionnés des modèles à compartiments et sont déterminés suivant une réalité biologique. Ce type de modèle permet de répondre à des problèmes d'extrapolation (inter-doses, inter-espèces, inter-groupes de sujets) et de prendre en compte les spécificités liées à des organes précis. Cependant, l'ajustement d'un modèle PBPK à des données expérimentales peut se révéler difficile en raison de la complexité du modèle, du nombre important de paramètres à estimer et de la nature des données toxicocinétiques (généralement peu nombreuses, éparses et entachées d'erreur de mesure). Ces modèles sont fréquemment utilisés chez les mammifères en pharmacologie ou en toxicologie, chez les humains et chez les rongeurs en particulier.

#### IV.4.3.4 Les modèles basés sur le bilan énergétique (DEB)

L'énergie a été présentée comme la variable explicative privilégiée pour décrire l'évolution des traits physiologiques des organismes. En effet, tout organisme a besoin d'énergie pour assurer sa survie, son activité, sa croissance et sa reproduction. La bioénergétique est donc apparue comme le moyen d'interprétation des cycles de l'histoire de vie des organismes, par la description des principales fonctions physiologiques et de leurs interactions. Une telle conceptualisation a permis une description plus réaliste des phénomènes de bioaccumulation, ainsi que l'intégration d'effets toxiques des contaminants sur les organismes.

Le plus répandu est le modèle de type « Scope for Growth » (SFG) (Bayne 1998). Il part du principe que l'énergie acquise par l'alimentation est égale à l'énergie dépensée pour la maintenance, la croissance et la reproduction des organismes. Il prend en compte les variations de l'environnement (température, disponibilité en nourriture) et a pour cela été largement utilisé pour décrire la croissance de divers organismes marins dans leur milieu, en particulier les mollusques bivalves (Bayne 1998). Il a également été utilisé pour décrire les effets toxiques de contaminants sur la croissance et la reproduction d'invertébrés benthiques (Maltby et al. 1990). Il est peu générique, car spécifique à une espèce et souvent à une zone géographique ; il contient par ailleurs un grand nombre de paramètres.

Une approche plus générique de type « Dynamic Energy Budget » (DEB) a été développée par Kooijman et van Haren (1990). Cette théorie présente des lois mécaniques simples, décrivant les apports et l'utilisation de l'énergie issue de l'alimentation, et les conséquences pour l'organisation physiologique d'un bout à l'autre du cycle de vie d'un organisme, incluant la relation de l'énergie avec l'âge. Ce type de modèle utilise des équations différentielles pour décrire les taux auxquels les organismes assimilent et utilisent l'énergie de leur nourriture pour leur maintenance, croissance, reproduction et développement. Ces taux dépendent de l'état de l'organisme (âge, sexe, taille, statut nutritionnel etc.) et des conditions de leur environnement (densité de nourriture, température...). Les solutions des équations du modèle représentent "l'histoire de la vie" d'un organisme dans un environnement potentiellement variable. Le principe de l'utilisation de l'énergie est simple (Kooijman 2001). L'énergie extraite de la nourriture est stockée dans les réserves (lipides, protéines, carbohydrates) et est utilisée pour quatre destinations : la croissance, correspondant à l'augmentation de la biomasse structurale, principalement sous forme protéique ; la maintenance somatique, spécifiant l'énergie dépensée pour l'activité et le renouvellement des molécules ; la complexification de l'organisme pour les juvéniles, et la reproduction pour les adultes ; la maintenance de la complexité de l'organisme.

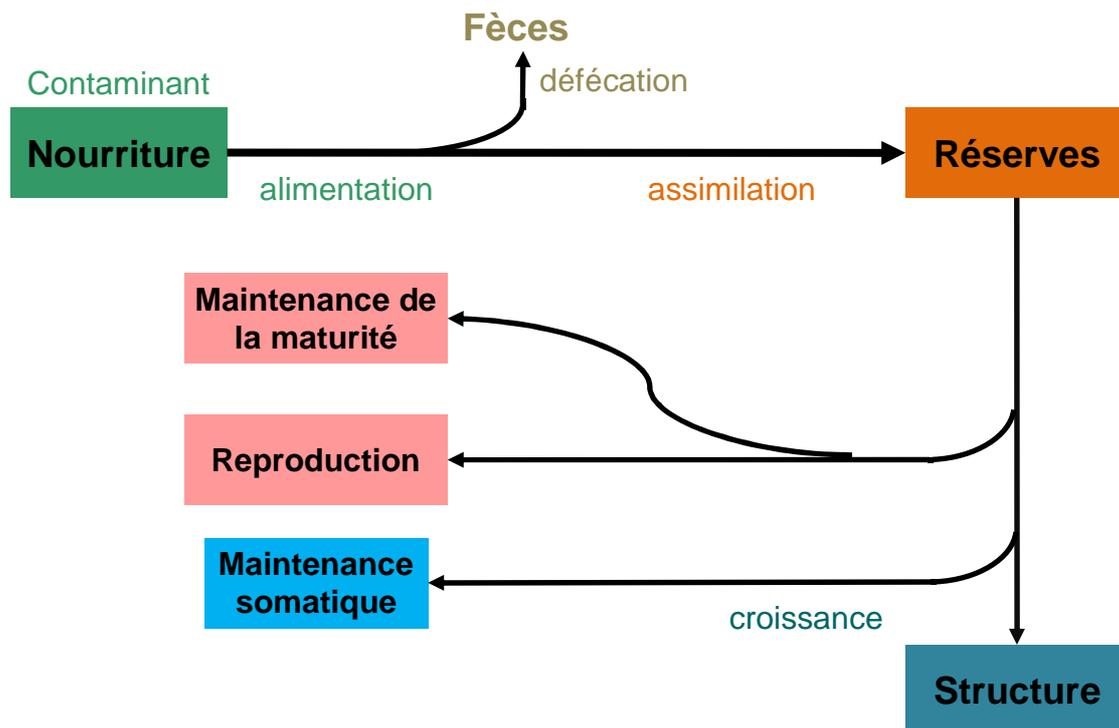


Figure 9. Principe d'utilisation de l'énergie selon la théorie DEB (d'après Kooijman 2001)

Ce type de modèle a été utilisé pour décrire la croissance de nombreux organismes marins dont les moules (Van Haren et Kooijman 1993) ainsi que pour étudier la cinétique de contaminants organiques tels que les HAP (hydrocarbures aromatiques polycycliques) et les PCB (polychlorobiphényles) (Kooijman et van Haren 1990) y compris chez la moule (van Haren et al. 1994).

## IV.5. Etudes de bioaccumulation de contaminants émergents

### IV.5.1.1 Accumulation du diclofénac chez la truite arc en ciel en conditions contrôlées (Schwaiger et al. 2004b)

Des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ont été exposées à des concentrations en diclofénac allant de 1 µg/l à 500 µg/l sur une période de 28 jours ; les résidus de diclofénac ont été analysés dans les différents organes. L'analyse a montré une augmentation des concentrations en diclofénac dans tous les organes examinés. Les niveaux les plus élevés ont été détectés dans le foie, puis dans les reins, les branchies. Les concentrations retrouvées dans les tissus musculaires étaient très faibles. Pour une exposition à 1 µg/l, les concentrations ont atteint 2 882,4 ng/g de poids frais dans le foie, 1 024,8 ng/g de poids frais dans les reins et 804,6 ng/g de poids frais dans les branchies, et 72,8 ng/g de poids frais dans les muscles. Les facteurs de bioconcentration calculés varient en

fonction de la concentration d'exposition et vont de 12 à 2732 dans le foie, de 5 à 971 dans les reins, de 3 à 763 dans les branchies et de 0,3 à 69 dans les muscles.

#### IV.5.1.2 Etude de l'accumulation de deux antibiotiques chez la moule bleue en conditions contrôlées (Le Bris et Pouliquen 2004)

La capacité de la moule bleue (*Mytilus edulis*) à accumuler deux antibiotiques à usage vétérinaire (l'acide oxolinique (AO) et l'oxytétracycline (OTC)) a été testée expérimentalement par l'étude de la cinétique d'accumulation et de décontamination avec une exposition à des concentrations comprises entre 1 et 1,5 mg/l pendant 8 jours et une phase de décontamination de 2 semaines. L'absorption des antibiotiques a été rapide dans les parties molles de la moule. L'AO a été rapidement éliminé alors que l'OTC a été relâché plus lentement (demi-vie dans les glandes digestives de 3,9 jours). AO et OTC ont été préférentiellement accumulés dans les branchies et dans les glandes digestives, respectivement. Les concentrations maximales étaient de 0,79 µg/g dans les branchies pour l'AO et de 1,83 µg/g dans les glandes digestives pour l'OTC. Les facteurs de bioaccumulation étaient faibles : au maximum de 2 pour l'OTC dans les glandes digestives et de 0,55 pour l'AO dans les branchies, ce qui est en accord avec leur log  $K_{ow}$  faible (log  $K_{ow}$  de 0,30 pour l'OTC et de 1,67 pour l'AO). Les antibiotiques persistent un peu plus dans les coquilles (OTC : demi-vie = 8,3 jours). Les auteurs concluent que la plupart des antibiotiques vétérinaires et humains tels que les tétracyclines et les sulfamides ayant des log  $K_{ow}$  faibles (< 2) s'accumulent faiblement dans des moules ce qui pourrait limiter l'utilisation de la moule comme bioindicateur de la contamination par les antibiotiques dans l'environnement marin.

## IV.6. Conclusion

La bioaccumulation d'une substance résulte d'un équilibre entre l'absorption et l'élimination de cette substance par l'organisme. L'étude de la bibliographie met en évidence que, concernant les substances chimiques organiques, ce phénomène a été étudié principalement pour des contaminants Persistants Bioaccumulables et Toxiques (PBT) tels que les HAP ou les PCB. Le  $\log K_{ow}$  est le facteur prédictif de bioaccumulation le plus utilisé. Les modèles de bioaccumulation de contaminants chimiques ont été calibrés et sont principalement utilisés avec des contaminants PBT. Les mollusques bivalves filtreurs sont considérés comme une espèce bioaccumulatrice et pour cela, sont utilisés pour la biosurveillance de la contamination des côtes par ces contaminants PBT. Des études de bioaccumulation de contaminants émergents en conditions contrôlées existent dans la littérature y compris sur quelques PPCP. Cependant, ces données sont peu abondantes et les informations sur le devenir des PPCP dans les organismes, notamment la moule dont les capacités métaboliques diffèrent de celles des poissons, ne sont pas disponibles. L'objet de ce travail est de comparer la contamination de bivalves filtreurs dans le milieu marin côtier par 3 filtres UV et 2 benzodiazépines et de réaliser des études en conditions contrôlées afin de mieux comprendre le devenir de ces molécules dans les moules de Méditerranée après absorption.

**Chapitre 2.** Méthodes  
d'analyse des filtres UV et des  
benzodiazépines dans l'eau de mer et  
dans *M. galloprovincialis* :  
développement et validation



# I. Introduction

Pour pouvoir mener correctement des études de caractérisation de concentrations environnementales de contaminants émergents dans le milieu marin, il faut disposer de méthodes d'analyses adaptées. Ces méthodes doivent permettre l'extraction des molécules d'intérêt des matrices biologiques et leur dosage à des limites de quantification voisines ou inférieures à la dizaine de ng/g. Le dosage de médicaments ou de filtres UV dans l'eau, ou dans les organismes ne peut se faire directement : des méthodes d'extraction et de concentrations sont nécessaires avant la quantification par des méthodes sensibles et spécifiques.

Les techniques d'extraction et de quantification des produits de soin dans l'eau ont fait l'objet de revues de littérature (Peck 2006; Pietrogrande et Basaglia 2007). Pour le dosage des filtres UV dans l'eau, plusieurs techniques d'extraction sont proposées : des techniques d'extraction liquide-liquide assistées par membrane (Rodil et al. 2009b), des techniques d'extraction en phase solide (solid phase extraction, SPE) (Balmer et al. 2005; Fent et al. 2009b; Giokas et al. 2005; Langford et Thomas 2008), des techniques d'extraction sur barreau (stir bar sorptive extraction, SBSE) (Rodil et Moeder 2008a), des techniques de microextraction en phase solide (solid phase microextraction, SPME) (Felix et al. 1998). La SPE en phase inverse est la technique majoritairement proposée ; les phases utilisées sont, pour les filtres UV lipophiles, des phases apolaires comme des phases C18 de Supelco (Giokas et al. 2005; Li et al. 2007), des phases Strata-X de Phenomex (Langford et Thomas 2008), des phases SM-2 de Bio-Beads (Balmer et al. 2005). Les solvants d'élution sont un mélange acétate d'éthyle/dichlorométhane (Giokas et al. 2005; Li et al. 2007), de méthanol/dichlorométhane (Balmer et al. 2005) ou éthyle acétate puis dichlorométhane (Langford et Thomas 2008).

Les techniques d'extraction des benzodiazépines dans les phases aqueuses sont du même type que celles proposées pour les filtres UV : la SPE est majoritairement proposée (González Alonso et al. 2010; Metcalfe et al. 2010; Moldovan 2006; Togola et Budzinski 2008), mais également la SPME (Unceta et al. 2010). En SPE, la cartouche OASIS HLB a été utilisée pour l'extraction du diazépam et du tétrazépam, parmi d'autres psychotropes, avec une élution par un mélange dichlorométhane/2-propanol/hydroxide d'ammonium (75:24,5:0,5) (González Alonso et al. 2010). Cette phase est également utilisée pour des extractions de mélanges de médicaments contenant le diazépam (Moldovan 2006; Wick et al. 2009), la cartouche OASIS MCX est également utilisée (Metcalfe et al. 2010; Togola et Budzinski 2008).

L'extraction des contaminants à partir de matrices biologiques nécessite la mise en place de techniques d'extraction différentes de celles précédemment présentées, souvent suivies d'une étape

de purification pour éliminer les interférents co-extraits qui gêneraient la quantification. Pour l'analyse de filtres UV dans des matrices biologiques, des méthodes d'extraction et d'analyse ont été développées pour permettre la quantification dans les poissons (Meinerling et Daniels 2006; Mottaleb et al. 2009; Zenker et al. 2008). Les premières méthodes présentées pour le dosage des filtres UV dans les poissons, mettaient en œuvre une extraction Soxhlet sur tissus (Meinerling et Daniels 2006). Les méthodes développées ensuite pour le dosage des filtres UV dans les poissons proposaient plusieurs types de méthodes d'extraction sur tissus frais : une extraction liquide avec ultra-son (Mottaleb et al. 2009) ou une extraction liquide favorisée par mixage et homogénéisation (Zenker et al. 2008). Les benzodiazépines, dont le diazépam et le tétrazépam, n'ont jamais été recherchées dans une matrice mollusque. Cependant, pour le dosage de médicaments comme la carbamazépine, le kétoprofène, le naproxène, l'ibuprofène et le bézafibrate dans des mollusques, une extraction micellaire assistée par micro-onde (MAME) est proposée (Cueva-Mestanza et al. 2008). Les méthodes développées pour le dosage des médicaments psychotropes dans les poissons proposent plusieurs types de méthodes d'extraction sur tissus frais : une extraction liquide sous pression (Chu et Metcalfe 2007) ou une extraction liquide favorisée par mixage et homogénéisation (Kwon et al. 2009; Ramirez et al. 2007).

Les techniques d'extraction utilisées dans les études présentées sont principalement favorisées par mixage, or les extractions par solvant peuvent également être facilitées par la pression (Pressurised Liquid Extraction, PLE) ou par les micro-ondes (Microwave-Assisted Extraction, MAE). La MAE est utilisée pour la quantification de nombreux contaminants émergents dans les matrices solides comme le recensent (Sanchez-Prado et al. 2010) dans leur revue bibliographique. Elle est par exemple utilisée pour l'extraction de médicaments dans des sols et des sédiments (Rice et Mitra 2007) ou pour l'extraction de muscs dans des boues par de l'acténone:hexane (1:1) (Smyth et al. 2007). Lorsque ces techniques sont utilisées avec des solvants apolaires, elles vont entraîner l'extraction des lipides et nécessiter la mise en place de purification adaptée.

Les filtres UV étudiés sont lipophiles ; leur extraction se fait en général conjointement avec les lipides des organismes rendant nécessaire une étape de purification pour les éliminer. Deux méthodes sont proposées : la chromatographie par perméation de gel (CPG) (Meinerling et Daniels 2006; Mottaleb et al. 2009) et la purification en phase inverse par chromatographie liquide haute performance (RP-HPLC) (Zenker et al. 2008). Cette dernière méthode présente l'avantage par rapport à la CPG d'être beaucoup moins consommatrice de solvants organiques et de permettre une bonne séparation des molécules d'intérêt. Pour les médicaments, plus polaires, la purification est

classiquement effectuée sur phase solide, principalement sur OASIS MCX (Chu et Metcalfe 2007; Cueva-Mestanza et al. 2008; Kwon et al. 2009).

Les méthodes de quantification proposées sont une combinaison de techniques de séparation chromatographique et de détection. La séparation se fait principalement par chromatographie liquide haute performance (HPLC) ou par chromatographie gazeuse (GC) et la détection par spectromètre de masse (MS). La séparation et la quantification des filtres UV sont effectuées principalement par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) quand il s'agit des substances à haut  $K_{ow}$  et pouvant facilement se volatiliser, par HPLC couplée à la spectrométrie de masse (HPLC-MS) pour des substances polaires moins volatiles (Mottaleb et al. 2009; Zenker et al. 2008). Ils peuvent également être quantifiés par LC-MS/MS (Meinerling et Daniels 2006). La séparation et quantification des médicaments psychotropes est effectuée principalement par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS) (Chu et Metcalfe 2007; Kwon et al. 2009; Ramirez et al. 2007).

Le travail de Hao et al. 2007 présente les utilisations de la GC-MS et de la LC-MS pour la quantification des PPCP. La quantification par LC-MS est principalement proposée dans les études récentes sur l'analyse par les PPCP en raison de la possibilité de quantifier un plus large spectre de molécules comprenant des substances polaires ou non volatiles. Cependant les interférences matricielles sont plus importantes avec des phénomènes de suppression ou d'augmentation de signal et nécessitent la mise en place de nombreux contrôles (Hao et al. 2007). Pour estimer les interférences matricielles, des étalons deutérés sont utilisés. Pour nos molécules d'étude, seul le diazépam-d5 est disponible. L'inconvénient principal de la GC-MS pour la quantification des PPCP est l'éventail restreint des molécules qu'elle permet de quantifier sans avoir pratiqué une étape de dérivation (Hao et al. 2007). Dans notre étude, toutes les molécules sélectionnées sont quantifiables en GC et les matrices sont complexes ; dans ce cas, l'utilisation de la GC-MS est appropriée. Nous avons choisi de travailler avec un spectromètre de masse à chambre d'ionisation, permettant un travail en MS-MS abaissant fortement le bruit de fond et un meilleur contrôle de la spécificité de l'analyse qu'avec un quadripôle.

La combinaison de ces techniques d'extraction, de purification et de quantification pour l'analyse des filtres UV ou des médicaments dans les organismes permet d'atteindre des limites de quantification comprises entre 5 et 20 ng/g de lipides pour l'OC (Balmer et al. 2005; Buser et al. 2006) et entre 11 et 300 ng/g de lipides pour l'EHMC (Balmer et al. 2005; Buser et al. 2006; Zenker et al. 2008). Ces limites varient en fonction des méthodes et de la teneur en lipides des poissons. Des limites de détection en ng/g de poids frais ont été rapportées entre 8 et 17 ng/g pour l'OC

(Meinerling et Daniels 2006; Mottaleb et al. 2009) et de 8 ng/g de filets pour l'EHMC (Meinerling et Daniels 2006). A notre connaissance, aucune méthode n'a été publiée pour la détection de l'OD-PABA dans des matrices biologiques. Les limites de détection en médicaments dans les mollusques (carbamazépine, ibuprofène, kétoprofène, bézafibrate et naproxène) sont comprises entre 30 et 220 ng/g de poids sec (Cueva-Mestanza et al. 2008). Dans des foies de poissons marins, la limite de quantification du diazépam est de 8,2 ng/g pf (Kwon et al. 2009). Dans cette même étude, les limites de quantification d'autres médicaments (carbamazépine, simvastatine, 17 $\beta$ -éthinyloestradiol) sont comprises entre 4,2 et 12,3 ng/g pf. Dans les poissons, des limites de quantification d'antidépresseurs ont été rapportées à partir de 0,5 ng/g pf pour la fluoxétine, la sertraline ou le citalopram (Metcalf et al. 2010), à partir de 0,015 ng/g pf pour la fluoxétine, la paroxétine la sertraline, le citalopram et la venlafaxine (Schultz et al. 2010)

Les objectifs de nos travaux ont été de mettre au point des méthodes d'analyse permettant une quantification à des concentrations voisines de quelques dizaines de ng/g de poids sec de 3 filtres UV : l'EHMC, l'OD-PABA et l'OC et de 2 benzodiazépines : le tétrazépam et le diazépam dans des moules (*Mytilus galloprovincialis*). La méthode d'extraction choisie est l'extraction assistée par micro-onde (MAE), la purification est réalisée par chromatographie liquide en phase inverse et la quantification par GC-MS-MS. La validation de ces méthodes comprend les étapes suivantes : s'assurer de leur spécificité, de leur répétabilité, de leur précision et définir la limite de quantification et le domaine de linéarité. De plus, afin de pouvoir suivre l'exposition de moules *M. galloprovincialis* lors d'études de bioaccumulation en conditions contrôlées, deux méthodes de dosage des 3 filtres UV et des 2 benzodiazépines dans de l'eau de mer contenant du phytoplancton (*Tetraselmis suecica* à 50 000 cellules/ml) par extraction en phase solide et quantification par GC-MS-MS ont été validées.

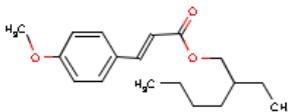
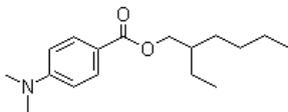
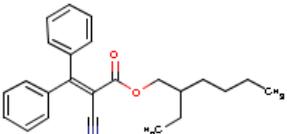
## II. Matériel et méthodes

### II.1. Réactifs

#### II.1.1. Filtres UV

Les structures et les principales caractéristiques physico-chimiques des 3 filtres UV : l'octocrylène (OC), l'éthylhexylméthoxycinnamate (EHMC) et l'octyldiméthyl acide-p-aminobenzoïque (OD-PABA) sont présentées dans le tableau 1. Les log  $K_{ow}$  varient de 5,77 pour l'OD-PABA à 6,88 pour l'OC. Les solubilités de ces molécules dans l'eau sont de 0,115, de 0,006 et de 0,004 mg/l à 25°C pour l'EHMC, l'OD-PABA et l'OC respectivement (Tableau 10). L'EHMC présente 2 isomères : le Z et le E-EHMC (Figure 10).

**Tableau 10. Caractéristiques physicochimiques de l'EHMC, de l'OD-PABA et de l'OC**

	<b>EHMC</b>	<b>OD-PABA</b>	<b>OC</b>
Formule brute	$C_{18}H_{26}O_3$	$C_{17}H_{27}NO_2$	$C_{24}H_{27}NO_2$
N° CAS	5466-77-3	21245-02-3	6197-30-4
Formule développée			
Masse molaire en g	290,41 <sup>a</sup>	277,41 <sup>b</sup>	361,49 <sup>a</sup>
Log $K_{ow}$	5,80 <sup>a</sup>	5,77	6,88 <sup>a</sup>
Solubilité dans l'eau en mg/l à 25°C	0,155 <sup>a</sup>	0,3 à 20°C <sup>b</sup>	0,004 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Valeurs expérimentales provenant de la base de données de propriétés physico-chimiques. Syracuse Research Corporation : <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>. ; <sup>b</sup> Merck, information sur les produits

Les filtres-UV EHMC (Eusolex 2292, isomère E, pureté 99,5%) et OD-PABA (Eusolex 6007, pureté 98,5%) ont été fournis par Merck (Darmstadt, Germany). L'OC (pureté 97%) a été fourni par Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). Les solutions mères à 1000 mg/l ont été préparées dans des flacons en verre ambré dans de l'heptane pour les filtres UV et dans de l'éthanol pour les médicaments. Elles ont été conservées au congélateur pendant au maximum 1 an après fabrication, la hauteur du signal de la solution étant vérifiée tous les mois après dilution.

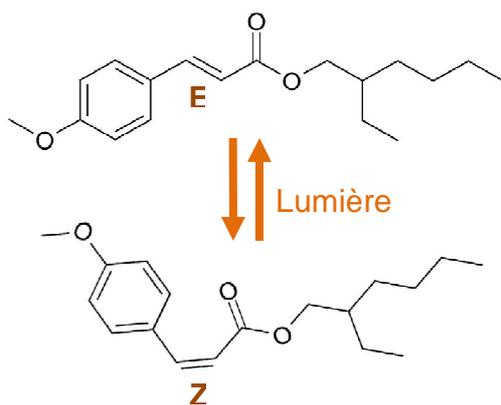


Figure 10. Isomères E et Z de l'EHMC

### II.1.2. Benzodiazépines

Les caractéristiques physicochimiques du diazépam et du tétrazépam sont présentées dans le Tableau 11. Le tétrazépam est plus lipophile que son congénère le diazépam :  $\log K_{ow}$  de 3,2 et 2,82 pour le tétrazépam et le diazépam, respectivement (Tableau 11). Le tétrazépam et le diazépam ont des solubilités dans l'eau de 26 et 50mg/l à 25°C, respectivement (Tableau 11).

Tableau 11. Caractéristiques physicochimiques du tétrazépam et du diazépam

	Tétrazépam	Diazépam
Famille	Benzodiazépine	Benzodiazépine
Formule brute	$C_{16}H_{17}ClN_2O$	$C_{16}H_{13}ClN_2O$
N° CAS	10379-14-3	439-14-5
Formule développée		
Masse molaire en g	288,78 <sup>a</sup>	284,75 <sup>a</sup>
Log $K_{ow}$	3,20 <sup>a</sup>	2,82 <sup>a</sup>
pKa	- <sup>a</sup>	3,4 <sup>a</sup>
Solubilité dans l'eau en mg/l à 25°C	26 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Valeurs expérimentales provenant de la base de données de propriétés physico-chimiques. Syracuse Research Corporation : <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>.

Le diazépam (pureté > 98%) a été fourni par Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne) et le tétrazépam (pureté > 99 %) a été fourni par Sanofi-Aventis (Gentilly, France). Les solutions mères à 1000 mg/l ont été préparées dans des flacons en verre ambré dans de l'heptane pour les filtres UV et dans de l'éthanol pour les médicaments. Elles ont été conservées au congélateur pendant au maximum 1 an après fabrication, la hauteur du signal de la solution étant vérifiée tous les mois après dilution.

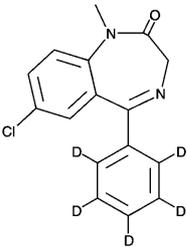
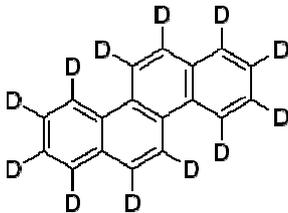
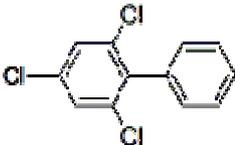
### **II.1.3. Etalons internes**

Des étalons internes (EI) d'extraction sont utilisés. Pour les benzodiazépines, le diazépam-d5 et le nordazépam-d5 sont disponibles dans le commerce. Le nordazépam-d5 devant être dérivatisé avant analyse en chromatographie en phase gazeuse n'a pas été retenu. Le diazépam-d5 a été utilisé comme étalon interne d'extraction du diazépam mais aussi du tétrazépam ; ces caractéristiques physicochimiques sont présentées dans le Tableau 12. Pour les filtres UV, seule la benzophénone-d10 est disponible auprès des fournisseurs, or ces caractéristiques physicochimiques sont différentes de celles des filtres UV que nous avons étudiés (log  $K_{ow}$  de 3,18). Par conséquent, une molécule de log de  $K_{ow}$  de l'ordre de 6, voisin des molécules étudiées, a été sélectionnée : le chrysène-d12 (Tableau 12). Nous nous sommes assurés que cette molécule avait un comportement similaire aux différents filtres UV lors des étapes d'extraction et de purification.

En plus des étalons internes d'extraction, un étalon interne est ajouté avant l'injection en GC-MS pour s'assurer de la performance de la quantification et du volume injecté. Cet étalon de contrôle ne subit pas l'étape d'extraction mais uniquement l'analyse en GC-MS et permet de vérifier l'injection. Le PCB 30 (caractéristiques physicochimiques présentées dans le Tableau 12), fréquemment utilisé comme étalon interne pour l'étude de PCB, et dont le comportement est connu, a été sélectionné pour être utilisé comme étalon interne d'injection pour les médicaments et pour les filtres UV.

Le chrysène-d12 (pureté 99,9%) a été fourni par Sigma-Aldrich (Steinheim, Allemagne). Le diazépam-d5 (pureté 99,6%) a été acheté chez Cluzeau (Courbevoie, France). Le PCB 30 (pureté 96,5%) a été fourni par Dr Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Allemagne). Les solutions mères à 1000 mg/l ont été préparées dans des flacons en verre ambré dans de l'heptane pour les filtres UV et dans de l'éthanol pour les médicaments. Elles ont été conservées au congélateur pendant au maximum 1 an après fabrication, la hauteur du signal de la solution étant vérifiée tous les mois après dilution.

**Tableau 12. Caractéristiques physicochimiques du diazépam-d5, du chrysène-d12 et du PCB 30**

	Diazépam-d5	Chrysène-d12	PCB 30
Formule brute	C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> D <sub>5</sub> ClN <sub>2</sub> O	C <sub>8</sub> D <sub>12</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub>
N° CAS	65854-76-4	1719-03-5	35693-92-6
Formule développée			
Masse molaire en g	289,77 <sup>b</sup>	240,36 <sup>b</sup>	257,55 <sup>a</sup>
Log K <sub>ow</sub>			5,47 <sup>a</sup>
Solubilité dans l'eau en mg/l à 25°C			0,252 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Valeurs expérimentales provenant de la base de données de propriétés physico-chimiques. Syracuse Research Corporation : <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>.

<sup>b</sup> Sigma-Aldrich, information sur les produits.

#### II.1.4. Solvants

Tous les solvants utilisés pour l'analyse et l'extraction étaient de qualité pour l'analyse de pesticides, ceux utilisés pour la purification par HPLC de qualité ultrapure (99,9%). Ces solvants ont été obtenus chez Carlo Erba (Val de Reuil, France).

#### II.2. Matériel

3 types de filtres sont utilisés : les filtres GF/F (Whatmann®) de diamètre 150 mm pour filtrer l'eau de mer, les filtres Suppor® 200 (Pall, Mexico) de 47 mm de diamètre et 0,2 µm de taille de pores pour les extraits sortant de la MAE et les filtres Minisart® de taille de pores de 0,45 µm (Sartorius Stedim) avant les étapes de purification par HPLC.

2 types de cartouches SPE sont utilisées : les cartouches LC-18 de 1 g (Supelclean™ LC-18 6 ml, 1 g, Supelco, Bellefonte, USA) et les cartouches LC Oasis HLB de 500 mg, 6 ml (Waters, Irlande). Elles sont utilisées avec un Visiprep™ DL (Supelco)

Pour les procédures d'extraction, un four micro-onde Multiwave 3 000 (Anton Paar) est utilisé. La purification se fait sur une HPLC Ultimate 3 000 fournie par Dionex comprenant une pompe LPG-3400 M, un injecteur WPS-3000 TSL équipé d'une boucle 2,5 ml, un détecteur UV

UVD-340 U et un collecteur de fraction Teledyne Isco. La colonne utilisée est une colonne en phase inverse Spherisorb® ODS2 (4,6 x 150 mm x 5 µm) fournie par Waters (Irlande) précédée d'une colonne de garde Zorbax Eclipse XDB-C8 (2,1 x 12,5 mm x 5 µm) fournie par Agilent.

La quantification est effectuée par chromatographie gazeuse sur un Ultra Trace fourni par Thermo Electron Corporation équipé d'une colonne capillaire SGE-BPX5 (30 m de longueur, 0,25 mm de diamètre interne, 0,25 µm d'épaisseur de film, Australie), couplée à la spectrométrie de masse à chambre d'ionisation sur un Polaris Q fourni par Thermo Electron Corporation. L'injection était effectuée avec un injecteur automatique AI 3000 fourni par Thermo Electron Corporation. Les données ont été interprétées par l'intermédiaire du logiciel Xcalibur fourni par Thermo.

Les moules (*Mytilus galloprovincialis*) utilisées pour la validation et pour les témoins proviennent du commerce, le phytoplancton (*Tetraselmis suecica*) est fourni par Greensea (Mèze, France). L'eau de mer a été majoritairement pompée dans un canal reliant l'étang de Thau à la mer à Sète, d'autres sites de pompage ont été utilisés pour tester la spécificité des méthodes d'analyse des benzodiazépines et des filtres UV dans l'eau de mer.

## **II.3. Méthodes d'extraction**

### **II.3.1. Eau de mer**

La mise au point de méthodes de dosage des substances étudiées dans l'eau de mer a pour objectif d'utiliser ces techniques pour le suivi de l'exposition au cours des expériences de bioaccumulation. Deux méthodes ont été mises au point pour l'extraction de 100 ml d'eau de mer contenant du phytoplancton (*Tetraselmis suecica*) à 50 000 cellules/ml : une pour l'analyse des filtres UV et une pour l'analyse des benzodiazépines. Les méthodes d'extraction en phase solide ont été adaptées des méthodes validées de Li et al. 2007 pour le dosage des filtres UV et de Gomez et al. 2007 pour le dosage des médicaments dans les eaux de surface.

#### *Extraction des filtres UV*

Les filtres UV sont extraits de l'eau de mer sur phase solide par cartouche LC-18 de 1 g. L'extraction se fait sur 100 ml d'eau de mer filtrée contenant 50 000 cellules/ml de *Tetraselmis suecica*. Après le conditionnement de la cartouche avec 2 ml de méthanol, suivi de 2 ml d'eau distillée, les 100 ml d'eau de mer, auxquels a été ajouté l'étalon interne d'extraction : 0,5 µg de Chrysène-d12, sont déposés sur la cartouche à un débit d'environ 2 ml/min. Le lavage de la cartouche se fait par 2 ml d'eau distillée. Les cartouches sont séchées pendant 2 h sous vide. L'élution des substances d'intérêt est faite par 3 fois 2 ml d'un mélange d'acétate d'éthyle:heptane

(1:1). Après élution, les extraits sont filtrés sur sulfate de sodium anhydre, évaporés à sec sous flux d'azote puis repris dans 0,5 ml d'heptane contenant du PCB 30 à 0,1 mg/l comme étalon interne d'injection.

### *Extraction des benzodiazépines*

Les benzodiazépines sont extraites de l'eau de mer sur phase solide par cartouche Oasis HLB de 1 g. L'extraction est faite sur 100 ml d'eau de mer filtrée contenant 50 000 cellules/ml de *Tetraselmis suecica* sans ajustement de pH.

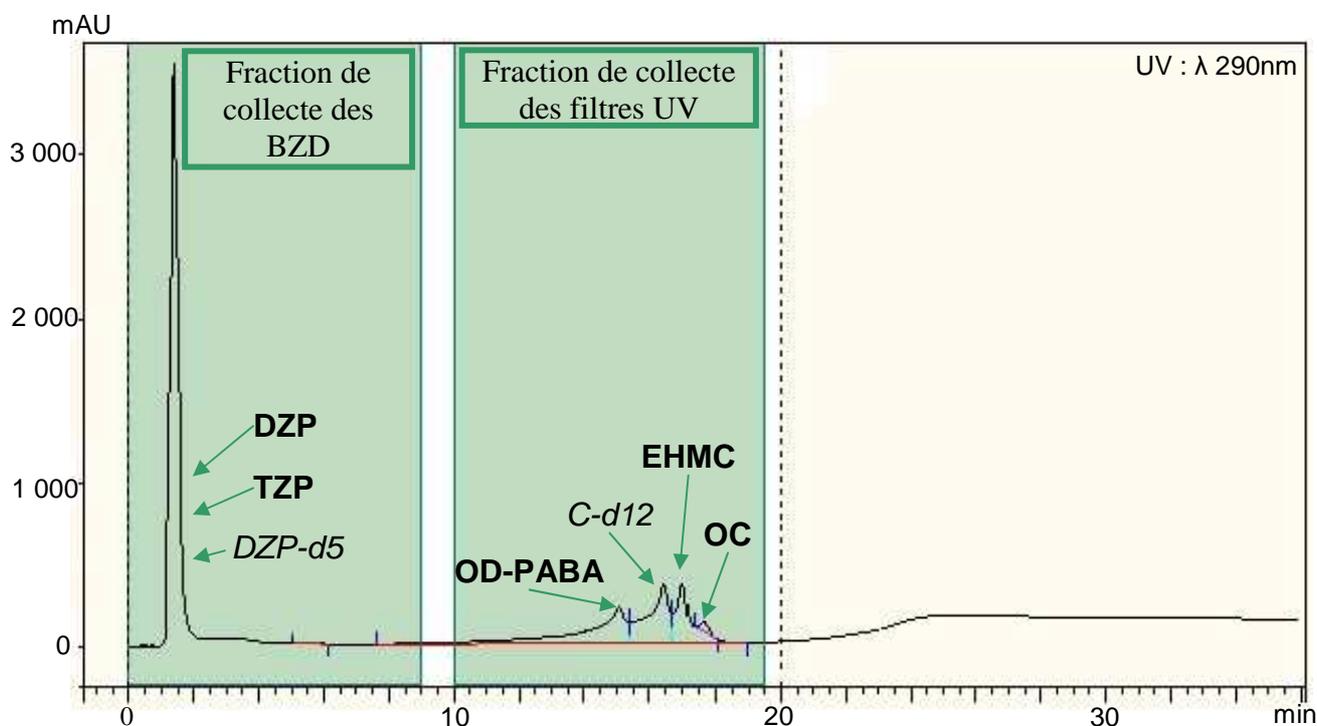
Les cartouches sont conditionnées avec 2 ml de méthanol suivis de 2 ml d'eau milliQ. 100 ml d'eau, auxquels est ajouté 1 ml de diazépam d5 à 2 mg/l dans l'éthanol (2 µg), sont déposés sur la phase solide à un débit de 2 ml/min environ. La cartouche est ensuite lavée avec 2 ml d'eau milliQ. La cartouche est séchée pendant au moins 2 h par application de vide sur la cartouche. L'élution est faite par 3 fractions de 2 ml d'acétate d'éthyle. Après élution, les extraits sont filtrés sur sulfate de sodium anhydre, évaporés à sec sous flux d'azote puis repris dans 0,5 ml d'heptane contenant du PCB 30 à 0,1 mg/l comme étalon interne d'injection.

### **II.3.2. *Mytilus sp.***

3 g de moules lyophilisées, broyées et homogénéisées sont dopées avec 1 ml d'étalon interne d'extraction : le chrysène-d12 à 0,1 mg/l pour les filtres UV et le diazépam-d5 à 0,25 mg/l pour les médicaments. Un échantillon de moules non dopé mais contenant les EI est ajouté systématiquement pour 7 échantillons comme blanc d'extraction. Les échantillons ainsi préparés sont extraits avec 25 ml d'un mélange acétone:heptane (1:1) dans un four à micro-ondes Multiwave 3000 en conformation extraction de solvant pendant 5 min à 110°C. Les extraits sont refroidis jusqu'à température ambiante. Les liners ayant servi à l'extraction sont rincés 3 fois avec 5 ml de mélange acétone:heptane (1:1). Les extraits obtenus sont filtrés sur Suppor® 200 garnis d'environ 10 g de sulfate de sodium anhydre puis évaporés à sec avec un évaporateur rotatif dans un bain marie à 35°C. La masse de lipides de l'extrait a été déterminée gravimétriquement en pesant le résidu sec après cette étape d'évaporation et exprimée en ng/g ps (Dévier et al. 2010). Les extraits secs sont repris par 3\*0,6 ml d'éthanol, qui sont filtrées sur Minisart® pour obtenir l'extrait A placé dans un flacon adapté à l'HPLC.

## II.4. Méthode de purification des extraits de moules

La méthode de purification a été adaptée de celle décrite par Zenker et al. (2008). 1 ml de l'extrait A est purifié par HPLC en phase inverse. La phase mobile est composée d'un mélange méthanol:eau (70:30) pendant 4 min, suivi d'une augmentation jusqu'à 100% de méthanol en 16 min, maintenu pendant 20 min. Le retour aux conditions initiales est effectué en 5 min puis maintenu pendant 10 min pour équilibration. Deux fractions sont collectées : de 0 à 9 min pour les médicaments et de 10 à 19,5 min pour les filtres UV. Les lipides sortent après 20 min. Les fractions collectées sont évaporées à sec avec un évaporateur rotatif dans un bain marie à 35°C, puis repris dans 2\*0,5 ml d'heptane contenant 0,1 mg/l de PCB 30 comme étalon interne d'injection. On obtient l'extrait B analysé en GC-MS.



**Figure 11. Chromatogrammes en UV à 290 nm de la purification par HPLC, les fractions de collecte sont indiquées en vert et les pics des substances d'intérêt sont repérés**

La sélection des fractions de collecte a été faite en déterminant les temps d'éluion des molécules d'intérêt par détection UV à 290 nm après injection en HPLC d'une solution éthanolique contenant chacun des 3 filtres UV à 5 mg/l et EI d'extraction (Figure 11). Le temps d'éluion des benzodiazépines a été déterminé en injectant une solution contenant chacune des deux molécules et EI d'extraction à 5 mg/l dans le méthanol. La validité des fractions de collecte a ensuite été vérifiée

séparément pour les médicaments et pour les filtres UV sur des moules dopées à 100 ng/g ps avec une quantification par GC-MS.

## **II.5. Analyse des substances en GC-MS**

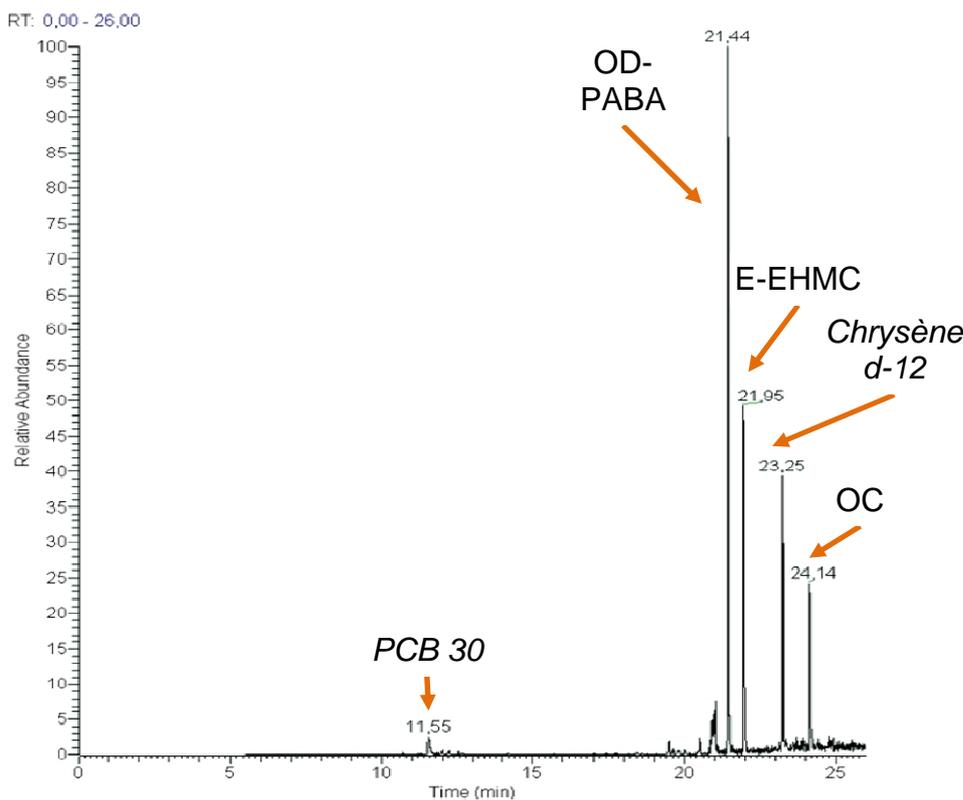
La quantification des substances étudiées est faite par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. La quantification a été effectuée par impact électronique avec une énergie d'ionisation de 70 eV, la source étant à 220°C. La séparation est effectuée avec une colonne capillaire SGE-BPX5. Le gaz vecteur est l'hélium, utilisé à un débit de 1,3 ml/min. L'hélium est également utilisé comme gaz tampon à 0,3 ml/min. Le temps maximum de remplissage de la trappe est de 25 ms. L'injection de 1 µl d'échantillon est effectuée avec un injecteur automatique. La quantification est effectuée avec les hauteurs des pics.

### **II.5.1. Conditions chromatographiques**

Les programmes de séparation en chromatographie gazeuse ont été établis afin d'obtenir une bonne résolution des pics pour une durée totale du programme la plus courte possible. Afin de s'assurer du passage de l'ensemble des molécules présentes dans les matrices injectées, les programmes de températures ont toujours été jusqu'à 300°C, maintenu pendant 10min.

#### **II.5.1.1 Filtres UV**

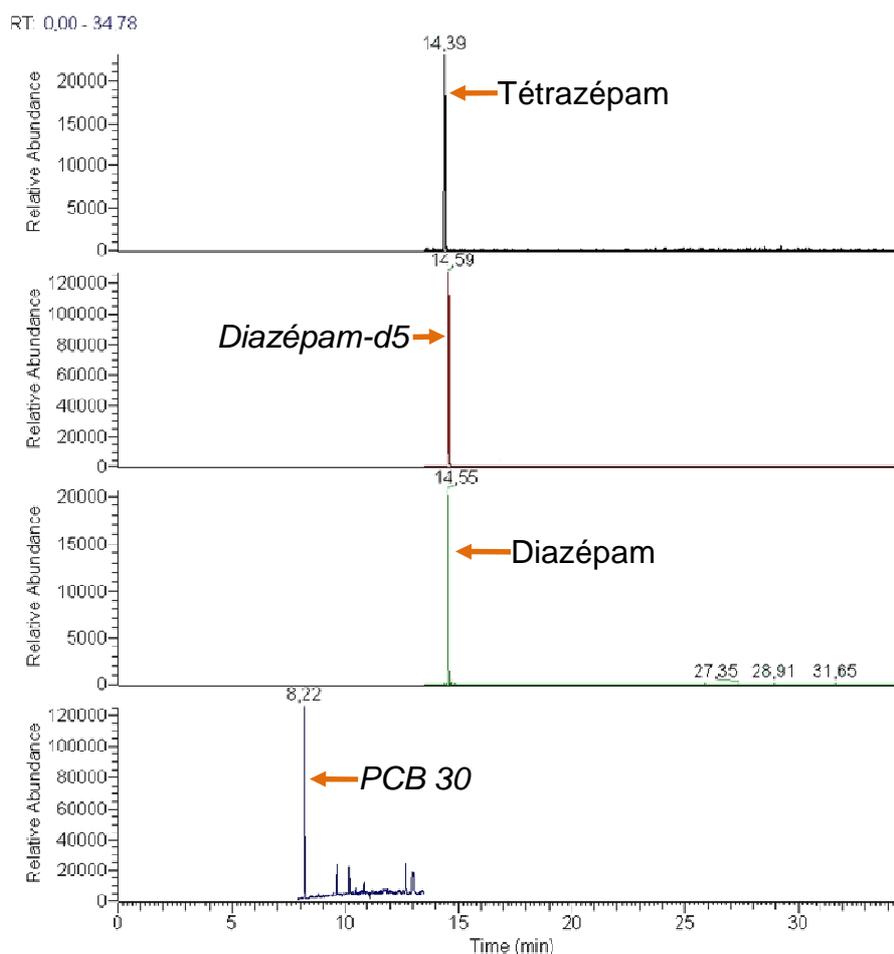
1 µl de la solution à analyser est injecté dans un injecteur garni de laine de verre à 250°C en mode split/spitless, le mode splitless durant 1 min avant de repasser en split à un débit de 50 ml/min. La seringue d'injection est rincée 5 fois avec l'heptane puis 2 fois avec la solution à analyser avant de prélever pour l'injection. La seringue est rincée 7 fois après l'injection avec le solvant. La température initiale de GC est de 80°C. 0,5 min plus tard, la température augmente à une vitesse de 20°C/min jusqu'à 150°C, puis de 5°C/min jusqu'à 200°C. La température est ensuite maintenue à 200°C pendant 2 min, avant d'augmenter jusqu'à 220°C à une vitesse de 5°C/min. La température augmente ensuite jusqu'à la température finale de 300°C à une vitesse de 20°C/min. La colonne est maintenue à 300°C pendant 10 min. La ligne de transfert est à 300°C pendant tout le déroulement. Le programme dure au total 34 min. Dans ces conditions chromatographiques, les temps de rétention obtenus sont présents dans le Tableau 13.



**Figure 12. Chromatogramme en GC-MS d'un extrait d'eau de mer avec phytoplancton contenant un mélange de filtres UV avec étalons interne, détection en full-scan avec sélection des ions majoritaires**

### II.5.1.2 Benzodiazépines

1  $\mu$ l de la solution à analyser est injecté dans un injecteur garni de laine de verre à 250°C en mode split/spitless, le mode splitless durant 1 min avant de repasser en split à un débit de 50 ml/min. La seringue d'injection est rincée 5 fois avec de l'heptane puis 2 fois avec la solution à analyser avant de prélever pour l'injection. La seringue est rincée 7 fois après l'injection avec de l'heptane. La température initiale de GC est de 80°C. 0,5 min plus tard, la température augmente à une vitesse de 20°C/min jusqu'à 210°C, puis de 10°C/min jusqu'à 250°C. La température augmente ensuite jusqu'à 255°C à une vitesse de 0,5°C/min, puis de 5°C/min jusqu'à 265°C. La température augmente ensuite jusqu'à la température finale de 300°C à une vitesse de 20°C/min. La colonne est maintenue à 300°C pendant 10 min. La ligne de transfert est à 300°C pendant tout le déroulement. Le programme dure au total 34,75 min. Les temps de rétention des benzodiazépines dans ces conditions chromatographiques sont présentés dans le Tableau 14.



**Figure 13. Chromatogramme en GC-MS d'un extrait de moule contenant le tétrazépam et le diazépam à 300 ng/g avec les étalons internes, détection suivant le programme présenté Tableau 14**

## II.5.2. Conditions en spectrométrie de masse

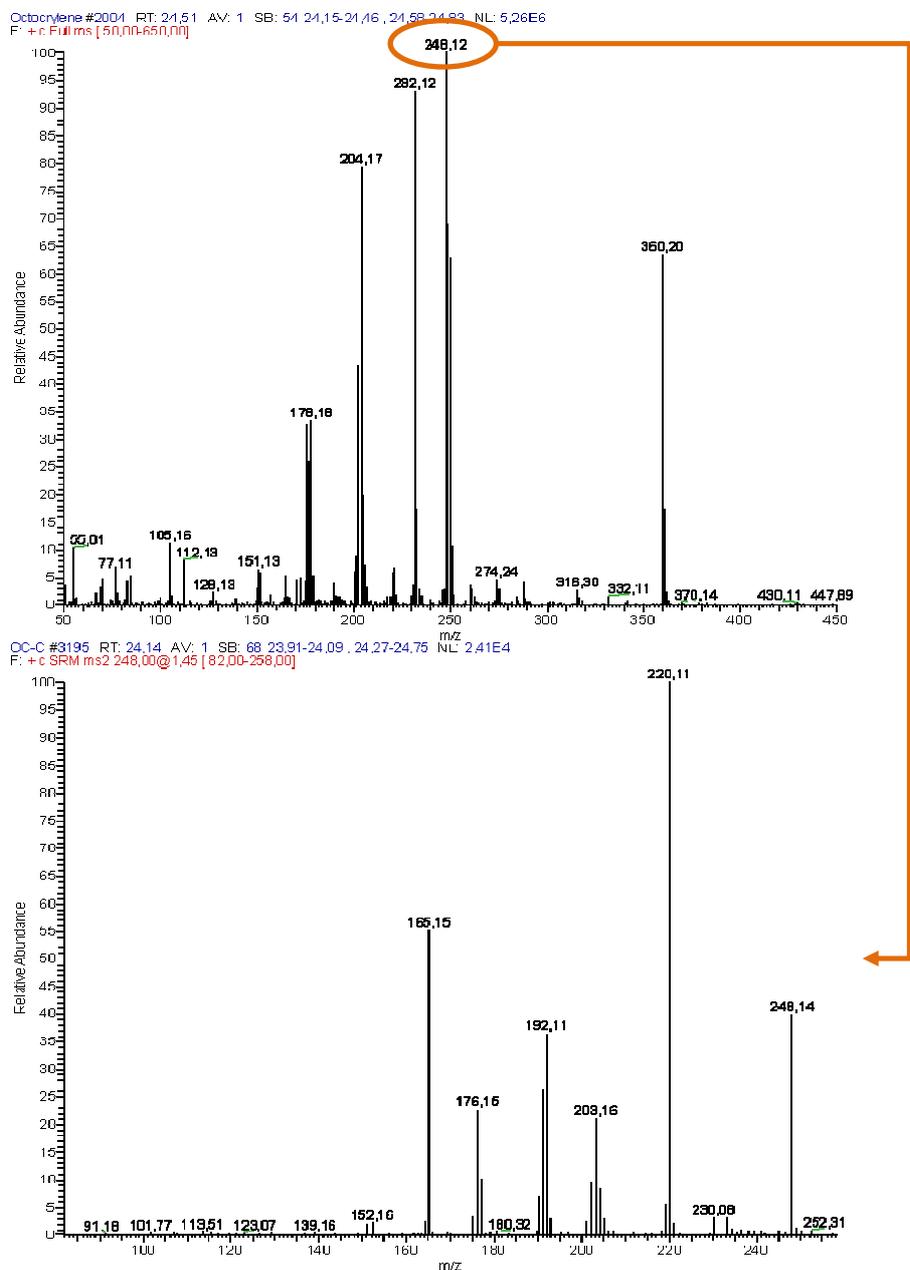
### II.5.2.1 Optimisation

La mise au point de la méthode de spectrométrie de masse a été faite comme suit :

Étape 1 : **Injection et détection en full scan** de la molécule à 10 mg/l : le spectre de masse de la molécule est enregistré. Les ions principaux sont sélectionnés. A partir de cette étape, on peut travailler sur un mélange de molécules dans le solvant à une concentration intermédiaire (0,5 mg/l) si leur temps de rétention est différent.

Étape 2 : Test de la **fenêtre de masse** : sur, un ou deux ions parents, il faut s'assurer que la fenêtre de masse, fixée par défaut à 1, est suffisante pour conserver dans la trappe l'intégralité du courant ionique de l'ion sélectionné. Pour cela, le programme de MS-MS est effectué sans appliquer d'énergie de collision et est comparé au niveau obtenu en full-scan.

Etape 3 : Sélection de **l'énergie de collision** : il faut déterminer l'énergie de collision optimale pour casser l'ion parent sans casser les ions fils : plusieurs énergies sont testées et la recherche est affinée sur plusieurs injections afin d'obtenir le meilleur signal sur bruit possible.



**Figure 14. Spectre de masse de l'octocrylène en full-scan (en haut) et en MS-MS sur l'ion 248 avec une énergie de collision de 1,45 et un Qz de 0,3 (en bas)**

Etape 4 : Sélection de la **profondeur du puits de potentiel** : les 3 profondeurs de puits de potentiel (Qz) disponibles (0,45, 0,3, 0,225) sont testées. Théoriquement, la profondeur la plus importante permet une meilleure stabilité des ions, mais la fenêtre de détection est plus faible, risquant ainsi de perdre un ion fils majoritaire. En pratique, le Qz permettant d'obtenir le meilleur signal sur bruit est sélectionné.

Étape 5 : Sélection des **ions de quantification** : injection de la molécule à une concentration plus faible (proche de la limite de quantification) et dans une matrice complexe afin de sélectionner les ions majoritaires spécifiques à la molécule qui seront utilisés pour la quantification.

La Figure 14 présente le spectre de masse de l'octocrylène en MS (en haut) puis en MS-MS sur l'ion 248 avec une fenêtre de masse de 1, une énergie de collision de 1,45V et un Qz de 0,3 (en bas).

### II.5.2.2 Filtres UV

Le spectromètre de masse détecte tout le long du programme un scan complet allant de 50 à 650 m/z avec 1 µscan par point. En parallèle, les programmes de détection des molécules d'intérêt se succèdent, avec une détection en mode de sélection d'ion (SIM) pour les 2 étalons internes : le PCB 30 et le chrysène-d12, et une détection en MS-MS pour les substances étudiées : l'OD-PABA, le Z et le E-EHMC et l'OC. En SIM, la détection est effectuée sur l'ion majoritaire, respectivement le 256 et le 240 pour le PCB 30 et le chrysène-d12, la confirmation est assurée par deux ions supplémentaires (Tableau 13). En MS-MS, les ions parents sont les 178, 165 et 248 pour l'E-HMC, l'OD-PABA et l'OC, respectivement, avec une fenêtre de masse de 1. La quantification est effectuée sur 2 ou 3 ions produits (Tableau 13).

**Tableau 13. Caractéristiques du programme de détection des filtres UV en MS-MS et SIM**

	Temps de rétention (min)	Ion parent (m/z)	MS-MS				Nombre de µscan par point
			Fenêtre de masse (m/z)	Energie de collision (V)	Qz	Ions fils de quantification (m/z)	
<b>Z-EHMC</b>	19,77	178	1	1,3	0,3	121+132+161	2
<b>OD-PABA</b>	21,40	165	1	1,3	0,45	91+118+148	2
<b>E-EHMC</b>	21,94	178	1	1,3	0,3	121+132+161	2
<b>OC</b>	24,15	248	1	1,45	0,3	220+165+176	2
<b>SIM</b>							
	Temps de rétention	Ion de quantification		Ions de confirmation		Nombre de µscan par point	
<i>PCB 30</i>	11,56	256		186 ; 258		1	
<i>Chrysène-d12</i>	23,30	240		236 ; 241		1	

### II.5.2.3 Benzodiazépines

Le spectromètre de masse détecte tout le long du programme un scan complet allant de 50 à 450 m/z avec 1 µscan par point. En parallèle, les programmes de détection des molécules d'intérêt se succèdent, avec une détection en mode de sélection d'ion (SIM) pour l'étalon interne d'injection : le PCB 30, et une détection en MS-MS pour les substances étudiées et l'étalon interne d'extraction : le tétrazépam, le diazépam et le diazépam-d5. En SIM, la détection est effectuée sur l'ion majoritaire 256 pour le PCB 30, la confirmation étant assurée par deux ions supplémentaires (Tableau 14). En MS-MS, les ions parents sont les 253, 256 et 261 pour le tétrazépam, le diazépam et le diazépam-d5, respectivement, avec une fenêtre de masse de 1. La quantification a été effectuée sur 1 ou 2 ions produits (Tableau 14).

**Tableau 14. Caractéristiques du programme de détection des benzodiazépines UV en MS-MS et en SIM**

	Temps de rétention (min)	Ion parent (m/z)	MS-MS				Ions fils de quantification (m/z)	Nombre de µscan par point
			Fenêtre de masse (m/z)	Energie de collision (V)	Qz			
<b>Tétrazépam</b>	14,15	253	1	1,4	0,225	196+225	3	
<i>Diazépam-d5</i>	14,36	261	1	1,3	0,3	226	2	
<b>Diazépam</b>	14,41	256	1	1,2	0,3	221	2	
SIM								
	Temps de rétention	Ion de quantification		Ions de confirmation		Nombre de µscan par point		
<i>PCB 30</i>	7,97	256		186 ; 258		2		

## II.6. Validation des méthodes

### II.6.1. Validation des méthodes d'analyse des filtres UV et des benzodiazépines dans l'eau de mer filtrée contenant du phytoplancton

La validation des méthodes d'extraction a été effectuée sur de l'eau de mer dopée, préalablement filtrée sur filtres GF/F et contenant du phytoplancton (*T. suecica*) à une concentration de 50 000 cellules/ml. Ces eaux dopées ont été préparées en ajoutant 1 ml de solutions éthanoliques dopantes dans 99 ml d'eau. Elles ont été extraites dans les mêmes conditions que les échantillons.

Les suspensions de phytoplancton dopées ont été extraites tout de suite, elles n'ont jamais été conservées. Les cartouches de SPE ont été conservées après le chargement de l'échantillon jusqu'à un mois au congélateur avant élution. La **conservation des cartouches** a été testée en comparant les rapports des hauteurs des pics des substances d'intérêt sur la hauteur du pic de l'étalon d'extraction pour des cartouches éluées de suite ( $n = 4$ ) et pour des cartouches conservées un mois au congélateur avant d'être éluées ( $n = 4$ ) pour un même échantillon d'eau dopée à  $5 \mu\text{g/l}$  pour les filtres UV d'une part et pour les benzodiazépines d'autre part.

Des extraits d'eau de mer ont été dosés le plus rapidement possible après extraction. La **stabilité** des substances d'intérêt dans des extraits conservés à  $-24^\circ\text{C}$ , a été testée en comparant le rapport des hauteurs des pics de substances d'intérêt sur l'étalon interne d'extraction après un mois de conservation à  $-24^\circ\text{C}$ , au rapport des hauteurs des pics de substances d'intérêt sur l'étalon interne d'extraction des mêmes extraits ( $n = 6$ ) juste après extraction.

La **spécificité** de la méthode a été contrôlée en comparant les chromatogrammes d'extraits de blancs d'eau de mer contenant différentes souches de phytoplancton préparés suivant les mêmes procédures d'extraction ( $n = 6$ ) aux chromatogrammes d'extraits dopés contenant de l'EHMC ( $5 \mu\text{g/l}$ ), de l'OD-PABA ( $5 \mu\text{g/l}$ ) et de l'OC ( $5 \mu\text{g/l}$ ), pour les filtres UV et du tétrazépam ( $10 \mu\text{g/l}$ ) et du diazépam ( $10 \mu\text{g/l}$ ), pour les médicaments.

La **linéarité** des méthodes a été étudiée en réalisant 3 gammes dans de l'eau de mer, extraites suivant la même procédure d'extraction. Les gammes comprenaient 5 niveaux de concentration compris entre  $0,1 \mu\text{g/l}$  et  $50 \mu\text{g/l}$ . La gamme a été établie en traçant le rapport des hauteurs de pic de la substance sur l'étalon interne d'extraction en fonction du rapport des concentrations de la substance sur l'étalon interne d'extraction.

Les **limites de détection (LD) et de quantification (LQ)** ont été établies expérimentalement tel que le signal sur bruit en hauteur de pic corresponde à 3 pour la LD et à 10 pour la LQ.

Les **rendements d'extraction** ont été calculés en divisant les concentrations mesurées par les concentrations théoriques, exprimés en pourcentage. Les rendements d'extraction sont exprimés par la moyenne des répétitions à une concentration plus ou moins son écart-type. La **précision** des méthodes a été vérifiée en calculant les biais ; ils ont été calculés pour chaque concentration et correspondent à la différence entre valeur calculée et valeur théorique divisée par la valeur théorique. Ils sont exprimés en pourcentage. Enfin la **répétabilité** de la procédure a été calculée avec le coefficient de variation (CV) des concentrations obtenues. Il a été calculé en divisant l'écart-type d'une série de répétitions par la moyenne des concentrations calculées de la série ; il est exprimé en

pourcentage. Les rendements d'extraction, les biais et les CV ont été calculés à 3 niveaux de concentration : 1, 10 et 50 µg/l (n = 6).

## II.6.2. Validation de la méthode d'analyse des filtres UV et des benzodiazépines dans les moules

La méthode d'analyse des substances étudiées dans les moules a été validée séparément pour les filtres UV et pour les benzodiazépines. Pour la préparation des dopages, 3 g de moules ont été dopés avec 1 ml de solution de filtres UV dans l'heptane ou 1 ml de benzodiazépines dans l'éthanol. La préparation des moules dopées a été effectuée en dispersant la solution dopante goutte à goutte sur les moules contenues dans une boîte de Pétri en verre, et en laissant s'évaporer le solvant avant extraction. Elles ont été extraites de la même manière que les échantillons.

Des extraits de moules ont été dosés le plus rapidement possible après extraction. La **stabilité** des substances d'intérêt dans des extraits de moules, conservés à -24°C, a été testée en comparant le rapport des hauteurs des pics de substances d'intérêt sur l'étalon interne d'extraction après 3 semaines de conservation à -24°C pour les benzodiazépines et après 1 mois pour les filtres UV au rapport des hauteurs des pics de substances d'intérêt sur l'étalon interne d'extraction des mêmes extraits (n = 6) juste après extraction.

La **spécificité** de la méthode a été contrôlée en comparant les chromatogrammes d'extraits de blancs de moules, provenant de différentes sources commerciales (n=6) préparés suivant les mêmes procédures d'extraction (n = 6) aux chromatogrammes d'extraits dopés contenant l'EHMC (50 ng/g), l'OD-PABA (50 ng/g) et l'OC (50 ng/g), pour les filtres UV et le tétrazépam (100 ng/g) et le diazépam (100 ng/g) pour les benzodiazépines.

La **linéarité** de la méthode a été étudiée en réalisant l'extraction suivant la même procédure de 3 gammes de moules dopées. Les gammes comprenaient 7 niveaux de concentration compris entre 5 ng/g et 300 ng/g pour les filtres UV, et entre 10 ng/g et 500 ng/g pour les médicaments. Les gammes ont été établies en traçant le rapport des hauteurs de pic des substances sur l'étalon interne d'extraction en fonction du rapport des concentrations des substances sur l'étalon interne d'extraction.

Les **limites de détection (LD) et de quantification (LQ)** ont été établies expérimentalement afin que le signal sur bruit en hauteur de pic corresponde à 3 pour la LD et à 10 pour la LQ.

Les **rendements d'extraction** ont été calculés en divisant les concentrations mesurées par les concentrations théoriques, exprimés en pourcentage. Les rendements d'extraction sont exprimés par la moyenne des répétitions à une concentration plus ou moins son écart-type. La **précision** des

méthodes a été vérifiée en calculant les biais ; ils ont été calculés pour chaque concentration et correspondent à la différence entre valeur calculée et valeur théorique divisée par la valeur théorique. Ils sont exprimés en pourcentage. Enfin la **répétabilité** de la procédure a été calculée avec le coefficient de variation (CV) des concentrations obtenues. Il a été calculé en divisant l'écart-type d'une série de répétitions par la moyenne des concentrations calculées de la série ; il est exprimé en pourcentage. Les rendements d'extraction, les biais et les CV ont été calculés à 3 niveaux de concentration : 25, 50 et 100 ng/g ps pour les filtres UV (n = 4) et 50, 100 et 500 ng/g ps pour les benzodiazépines (n = 4).

## **II.7. Statistiques**

La correspondance des gammes d'étalonnage avec le modèle linéaire est testée par ANOVA avec Statgraphics®. Les écarts-type des pentes et des ordonnées à l'origine sont calculés avec un intervalle de confiance de 95 %.

## **III. Résultats**

### **III.1. Validation de la méthode d'analyse dans l'eau de mer filtrée contenant du phytoplancton**

#### **III.1.1. Filtres UV**

##### *Conservation des cartouches*

Les cartouches de SPE C18 peuvent être conservées pendant un mois après chargement des eaux de mer. En effet, le rapport des hauteurs de pics de la substance d'intérêt sur l'étalon interne pour des cartouches éluées après un mois de conservation à - 24°C, correspond à  $99 \pm 7$  % du rapport des hauteurs pour les cartouches éluées sans congélation pour l'EPMC,  $110 \pm 8$  % pour l'OD-PABA et  $103 \pm 12$  % pour l'OC (n = 4).

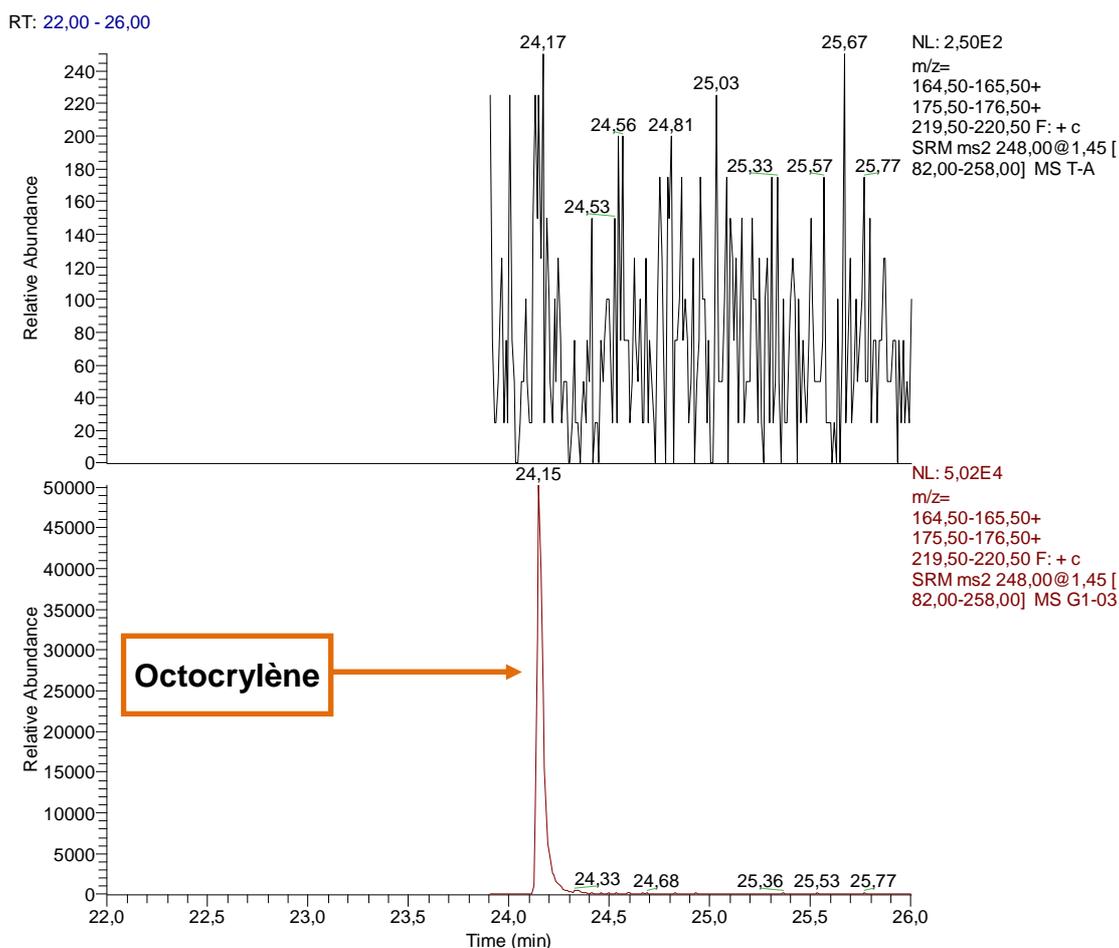
##### *Stabilité des extraits*

L'extrait obtenu après SPE peut-être conservé au congélateur pendant un mois après son élution. En effet, le rapport des hauteurs de pics des substances d'intérêt sur l'étalon interne d'extraction d'extraits d'eau de mer conservés au congélateur pendant un mois représente  $101 \pm 8$  % du rapport des hauteurs de pics des substances d'intérêt sur l'étalon interne d'extraction du même

extrait analysé immédiatement après l'extraction, pour l'EHMC,  $102 \pm 11 \%$  pour l'OD-PABA et  $99 \pm 5 \%$  pour l'OC.

### Spécificité

Les extraits blancs d'eau avec du phytoplancton ( $n = 6$ ) étaient exempts d'interférences aux temps de rétention correspondant aux substances d'intérêt : EHMC, OC et OD-PABA. La Figure 15 présente le chromatogramme d'un extrait blanc (en haut) et le chromatogramme d'un extrait d'eau de mer qui contenait  $5 \mu\text{g/l}$  d'OC (en bas).



**Figure 15. Chromatogrammes en MS-MS sur l'ion 248, avec détection des ions 165+176+220, d'un extrait blanc d'eau de mer contenant du phytoplancton (en haut) et d'un extrait dopé à  $5 \mu\text{g/l}$  d'OC (en bas).**

### Linéarité

L'étude statistique des résultats révèle que les gammes d'étalonnage pour l'EHMC, l'OD-PABA et l'OC s'adaptent au modèle linéaire de  $0,1$  à  $50 \mu\text{g/l}$ . Les paramètres des équations de

droite : pentes et ordonnées à l'origine avec leur écart-type, et les coefficients de corrélation sont présentés dans le Tableau 15.

**Tableau 15. Paramètres de linéarité de la méthode d'analyse de l'EPMC, de l'OD-PABA et de l'OC dans l'eau de mer (n = 15)**

	<b>Pente</b>	<b>Ordonnée à l'origine</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>EPMC</b>	1,368 ± 0,029	- 0,123 ± 0,473	0,994
<b>OD-PABA</b>	1,719 ± 0,055	0,616 ± 0,925	0,0986
<b>OC</b>	0,448 ± 0,008	- 0,044 ± 0,172	0,996

#### *LD et LQ*

La limite de quantification est de 0,1 µg/l à la fois pour l'EPMC, l'OD-PABA et l'OC. La limite de détection est de 0,03 µg/l pour l'EPMC, l'OD-PABA et l'OC.

#### *Rendements d'extraction*

Les rendements d'extraction moyens étaient de 77 ± 3, 83 ± 7 et 84±6% pour l'EPMC; 82±5, 90 ± 5 et 93 ± 9% pour l'OD-PABA et 110 ± 7, 88 ± 8 et 92 ± 7% pour l'OC, respectivement pour les trois niveaux de dosage 1, 10 et 50 µg/l (Tableau 16).

**Tableau 16. Rendements d'extraction, biais et coefficients de variation (CV) de l'analyse de l'EPMC, de l'OD-PABA et de l'OC dans l'eau de mer contenant du phytoplancton à 1, 10 et 50 µg/l (n = 6)**

<b>Concentration de dosage</b> en µg/l	<b>Rendement</b> <b>d'extraction</b> en %	<b>Biais</b> en %	<b>CV</b> en %
<b>EPMC</b>			
1	82 ± 3	-18	3
10	83 ± 7	-17	9
50	84 ± 6	-16	8
<b>OD-PABA</b>			
1	96 ± 10	-4	11
10	90 ± 5	-10	6
50	93 ± 9	-7	9
<b>OC</b>			
1	110 ± 7	+5	7
10	88 ± 8	-12	9
50	92 ± 7	-8	7

#### *Précision*

Les biais par rapport aux concentrations attendues allaient de -18 à -16 % pour l'EPMC, de -10 à -4% pour l'OD-PABA et de +5 à -12% pour l'OC (Tableau 16).

### *Répétabilité*

Les coefficients de variation de la méthode sont inférieurs ou égaux à 11 % pour les 3 substances et pour les 3 concentrations (Tableau 16).

### **Conclusion**

Cette méthode d'extraction de 100 ml d'eau de mer filtrée contenant du phytoplancton (*T. suecica*) à 50 000 cellules/ml par SPE sur cartouche C18 a été validée entre 0,1 et 50 µg/l pour 3 filtres UV : l'EHMC, l'OD-PABA et l'OC. Les rendements d'extraction supérieurs à 75 %, la répétabilité de la méthode avec un coefficient de variation inférieur à 11 % sont satisfaisants. La limite de quantification à 0,1 µg/l pour les 3 filtres UV permet le suivi d'expérimentations d'exposition de moules en conditions contrôlées au laboratoire.

### **III.1.2. Benzodiazépines**

#### *Conservation des cartouches*

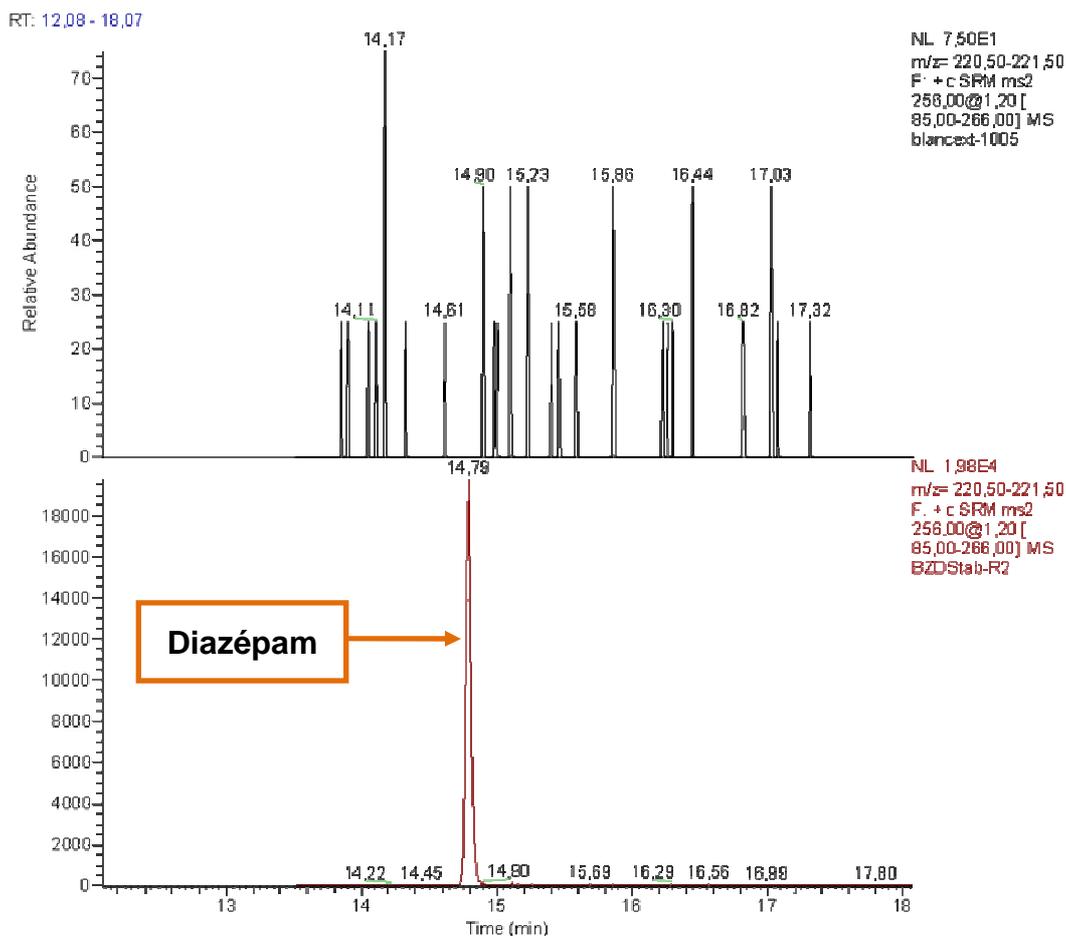
Les cartouches OASIS HLB peuvent être conservées un mois au congélateur après chargement. En effet, le rapport des hauteurs de pics de la substance d'intérêt sur l'étalon interne pour des cartouches éluées après un mois de conservation à -24°C, correspondait à 98±10% du rapport des hauteurs pour les cartouches éluées sans congélation pour le tétrazépam et 105±7% pour le diazépam.

#### *Stabilité des extraits*

Les benzodiazépines restent stables dans les extraits d'eau de mer filtrée contenant du phytoplancton au moins 4 semaines au congélateur. En effet, le rapport des hauteurs de pics des substances d'intérêt sur l'étalon interne d'extraction d'extraits d'eau de mer conservés au congélateur pendant 4 semaines représente 99 ± 5 % du rapport des hauteurs de pics des substances d'intérêt sur l'étalon interne d'extraction du même extrait analysé immédiatement après l'extraction, pour le tétrazépam, et 101 ± 7 % pour le diazépam.

#### *Spécificité*

Les extraits blancs d'eau avec du phytoplancton (n=6) étaient exempts d'interférences aux temps de rétention correspondant aux substances d'intérêt. La Figure 16 présente le chromatogramme d'un extrait blanc (en haut) et le chromatogramme d'un extrait d'eau de mer qui contenait 5 µg/l de diazépam (en bas).



**Figure 16. Chromatogrammes en MS-MS sur l'ion 256, avec détection des ions 221, d'un extrait blanc d'eau de mer contenant du phytoplancton (en haut) et d'un extrait dopé à 5 µg/l de diazépam (en bas)**

### *Linéarité*

L'étude statistique des résultats révèle que les droites d'étalonnage pour le tétrazépam et le diazépam s'adaptent au modèle linéaire de 0,1 à 50 µg/l. Les paramètres des équations de droite : pentes et ordonnées à l'origine avec leur écart-type, et les coefficients de corrélation sont présentés dans le Tableau 17.

**Tableau 17. Paramètres de linéarité de l'analyse du tétrazépam et du diazépam dans l'eau de mer (n = 15)**

	<b>Pente</b>	<b>Ordonnée à l'origine</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>TZP</b>	0,427 ± 0,005	0,144 ± 0,052	0,998
<b>DZP</b>	0,844 ± 0,006	0,144 ± 0,063	0,999

## LD et LQ

La limite de quantification a été déterminée à 0,1 µg/l à la fois pour le tétrazépam et pour le diazépam. La limite de détection a été définie à 0,03 µg/l pour le tétrazépam et pour le diazépam.

## Rendements d'extraction

Les rendements d'extraction moyens étaient de  $111 \pm 8$ ,  $102 \pm 5$  et  $102 \pm 5$  % pour le tétrazépam et  $93 \pm 11$ ,  $107 \pm 3$  et  $112 \pm 4$  % pour le diazépam, à 1, 10 et 50 µg/l respectivement (Tableau 18).

## Précision

Les biais par rapport aux concentrations attendues allaient de + 2 à + 11 % pour le tétrazépam et de - 4 à + 12 % pour le diazépam (Tableau 18).

## Répétabilité

Les coefficients de variation de la méthode sont inférieurs à 11 % pour les 2 substances et pour les 3 concentrations (Tableau 18)

**Tableau 18. Rendements d'extraction, biais et coefficients de variation (CV) de l'analyse du tétrazépam et du diazépam dans l'eau de mer contenant du phytoplancton à 1, 10 et 50 µg/l (n = 6)**

Concentration de dopage en µg/l	Rendement d'extraction en %	Biais en %	C.V. en %
<b>Tétrazépam</b>			
1	$111 \pm 8$	+ 11	7
10	$102 \pm 5$	+ 2	5
50	$102 \pm 5$	+2	5
<b>Diazépam</b>			
1	$93 \pm 11$	- 4	11
10	$107 \pm 3$	+ 7	2
50	$112 \pm 4$	+ 12	3

## Conclusion

Cette méthode d'extraction et de quantification de 100 ml d'eau de mer filtrée contenant du phytoplancton (*T. suecica*) à 50 000 cellules/ml par SPE sur cartouche Oasis HLB<sup>®</sup> a été validée entre 0,1 et 50 µg/l pour le diazépam et le tétrazépam. Les rendements d'extraction sont compris entre 93 et 112 %, les coefficients de variation inférieurs à 11% et les biais inférieurs à 12%. Les limites de quantification sont de 0,1 µg/l pour le diazépam et le tétrazépam ; elles permettent le suivi des expérimentations de bioaccumulation en conditions contrôlées.

### III.2. Validation de la méthode d'analyse des filtres UV dans les moules

#### Stabilité des extraits de moules

Les filtres UV restent stables dans les extraits de moules au moins un mois au congélateur. En effet, le rapport des hauteurs de pics des substances d'intérêt sur l'étalon interne d'extraction d'extraits de moules conservés au congélateur pendant 1 mois représente  $98 \pm 6 \%$  du rapport des hauteurs de pics des substances d'intérêt sur l'étalon interne d'extraction du même extrait analysé immédiatement après l'extraction, pour l'EHMC, de  $105 \pm 11 \%$  pour l'OD-PABA et de  $102 \pm 7 \%$  pour l'OC.

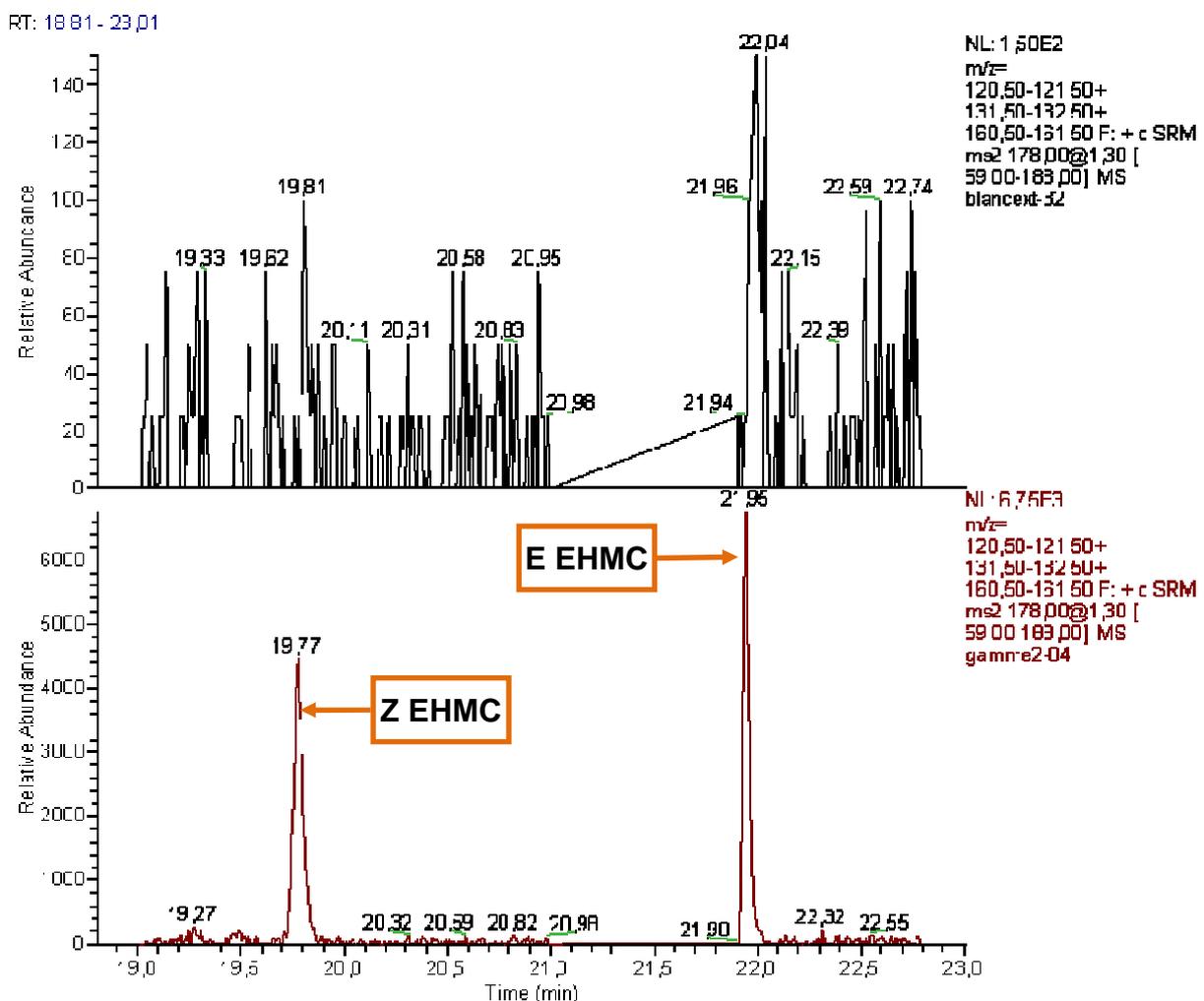


Figure 17. Chromatogrammes en MS-MS sur l'ion 178, avec détection des ions 121+132+161, d'un extrait blanc de moules (en haut) et d'un extrait de moules dopées à 50 ng/g ps d'EHMC (en bas)

### *Spécificité*

Les extraits blancs de moules (n = 6) étaient exempts d'interférences aux temps de rétention correspondant aux substances d'intérêt. La

Figure 17 présente le chromatogramme d'un extrait blanc et le chromatogramme d'un extrait de moules qui contenait 50 ng/g ps d'EHMC, isomères Z et E.

### *Linéarité*

L'étude statistique des résultats révèle que les gammes d'étalonnage pour l'EHMC, l'OD-PABA et l'OC correspondent au modèle linéaire de 5 à 500 ng/g ps. Les paramètres des équations de droite : pentes et ordonnées à l'origine avec leur écart-type, et les coefficients de corrélation sont présentés dans le Tableau 19.

**Tableau 19. Paramètres de linéarité de l'analyse de l'EHMC, de l'OD-PABA et de l'OC dans les moules (n = 21)**

	<b>Pente</b>	<b>Ordonnée à l'origine</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>EHMC</b>	0,367 ± 0,008	- 0,065 ± 0,038	0,992
<b>OD-PABA</b>	0,451 ± 0,016	0,025 ± 0,072	0,977
<b>OC</b>	0,189 ± 0,005	- 0,014 ± 0,022	0,987

### *LD et LQ*

La limite de quantification est de 5 ng/g à la fois pour l'EHMC, l'OD-PABA et l'OC. La limite de détection est de 2 ng/g l'EHMC, l'OD-PABA et l'OC.

### *Rendements d'extraction*

Les rendements d'extraction moyen (n = 4) de filtres UV dans les moules étaient de 89 ± 10, 99 ± 10 et 95 ± 12 % pour l'EHMC; 111 ± 17, 103 ± 9 et 117 ± 12 % pour l'OD-PABA et 100 ± 15, 89 ± 7 et 101 ± 13 % pour l'OC, respectivement (Tableau 20).

### *Précision*

Les biais allaient de - 11 à - 1 % pour l'EHMC, de + 16 à + 3 % pour l'OD-PABA et de + 1 à - 11 % pour l'OC (Tableau 20).

### *Répétabilité*

Les coefficients de variation étaient tous inférieurs à 13 % (Tableau 20).

**Tableau 20. Rendements d'extraction, biais et coefficients de variation (CV) de l'analyse de l'EHMC, de l'OD-PABA et de l'OC dans les moules (n = 4)**

<b>Concentration de dopage</b> en ng/g ps	<b>Rendement d'extraction</b> en %	<b>Biais</b> en %	<b>CV</b> en %
<b>EHMC</b>			
25	89 ± 10	-11	9
50	99 ± 13	-1	12
100	95 ± 11	-5	11
<b>OD-PABA</b>			
25	111 ± 17	+11	13
50	103 ± 9	+3	10
100	116 ± 12	+16	8
<b>OC</b>			
25	100 ± 15	0	13
50	89 ± 7	-11	9
100	101 ± 13	+1	10

## Conclusion

Ces travaux ont abouti à la validation d'une méthode d'extraction et d'analyse de 3 filtres UV lipophiles dans les moules marines, ce qui n'a jamais été publié à ce jour. Les rendements d'extraction de la méthode d'extraction sont supérieurs à 89 %, les coefficients de variation inférieurs à 13 % et les biais inférieurs à 16%. Les limites de détection sont de 2 ng/g de poids sec pour l'EHMC, l'OD-PABA et de l'OC. La teneur en lipides des moules est de l'ordre de 10 %, les limites de détection sont de 20 ng/g de lipides. Ces limites sont similaires à celles retrouvées dans la littérature pour l'analyse d'EHMC et OC dans la chair de poissons. En effet, les limites de quantification de l'OC étaient à 3 ng/g de lipides (Balmer et al. 2005; Buser et al. 2006) et pour l'EHMC entre 11 et 28 ng/g de lipides (Balmer et al. 2005; Buser et al. 2006; Zenker et al. 2008). Ces limites varient en fonction des méthodes et de la teneur en lipides des poissons. Des limites de détection en ng/g de poids frais ont été rapportées entre 8 et 17 ng/g pour l'OC (Meinerling et Daniels 2006; Mottaleb et al. 2009) et de 8 ng/g de filets pour l'EHMC (Meinerling et Daniels 2006). A notre connaissance, aucune méthode n'a été publiée pour la détection de l'OD-PABA dans des matrices biologiques.

### III.3. Validation de la méthode d'analyse des benzodiazépines dans les moules

#### *Stabilité des extraits*

Les benzodiazépines restent stables dans les extraits de moules au moins 3 semaines au congélateur. En effet, le rapport des hauteurs de pics des substances d'intérêt sur l'étalon interne d'extraction d'extraits de moules conservés au congélateur pendant 3 semaines représente  $100 \pm 13 \%$  du rapport des hauteurs de pics des substances d'intérêt sur l'étalon interne d'extraction du même extrait analysé immédiatement après l'extraction, pour le tétrazépam et  $102 \pm 6 \%$  pour le diazépam.

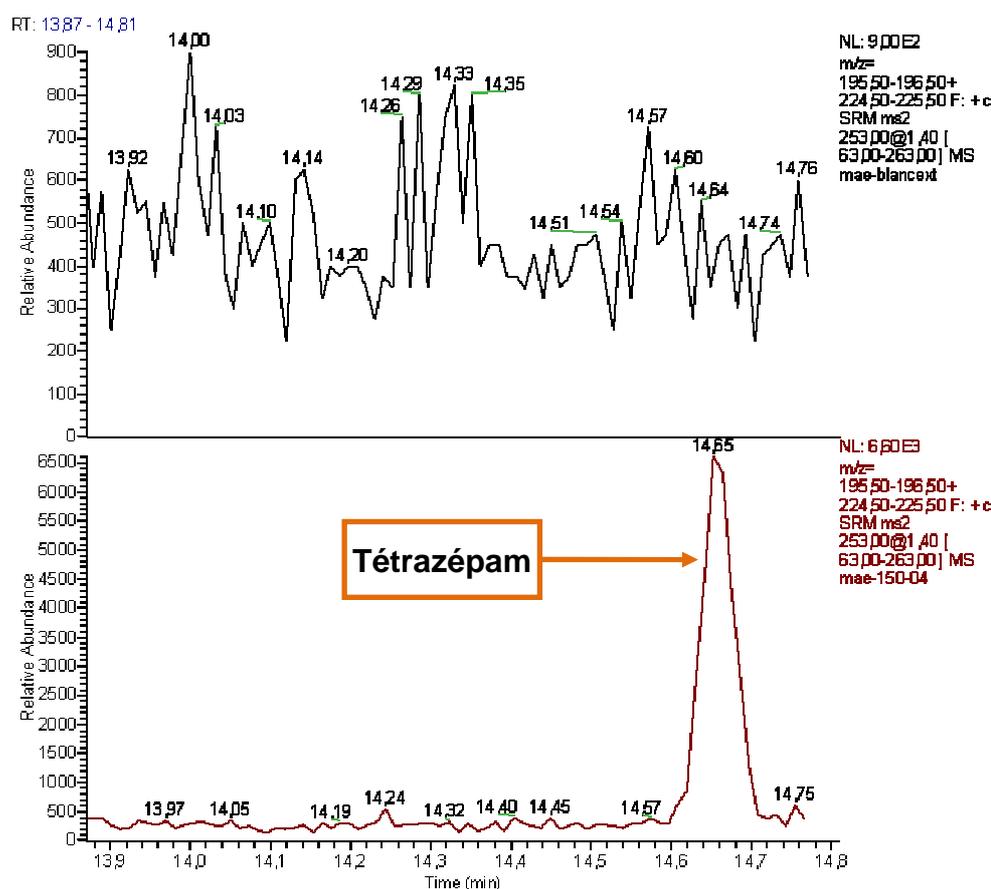


Figure 18. Chromatogrammes en MS-MS sur l'ion 253, avec détection de l'ion 196+225, d'un extrait blanc de moules (en haut) et d'un extrait de moules dopées à 100 ng/g ps de tétrazépam (en bas)

### Spécificité

Les extraits blancs de moules (n=6) étaient exempts d'interférences aux temps de rétention correspondant aux substances d'intérêt. La Figure 18 présente les chromatogrammes d'un extrait blanc et d'un extrait de moules qui contenait 100 ng/g ps de diazépam.

### Linéarité

L'étude statistique des résultats a révélé que l'étalonnage pour le tétrazépam et le diazépam correspond au modèle linéaire de 20 à 700 ng/g ps. Les paramètres des équations de droite : pentes et ordonnées à l'origine avec leur écart-type, et les coefficients de corrélation sont présentés dans le Tableau 26.

**Tableau 21. Paramètres de linéarité de l'analyse du tétrazépam et du diazépam dans les moules (n = 18)**

	<b>Pente</b>	<b>Ordonnée à l'origine</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
<b>TZP</b>	0,952 ± 0,058	0,285 ± 0,124	0,957
<b>DZP</b>	0,934 ± 0,034	0,076 ± 0,054	0,989

### LD et LQ

La limite de quantification a été déterminée à 20 ng/g à la fois pour le tétrazépam et pour le diazépam. La limite de détection a été définie à 5 ng/g pour le tétrazépam et pour le diazépam.

### Rendements d'extraction

Les rendements d'extraction moyen (n = 4) de filtres UV dans les moules était de 99 ± 10, 95 ± 8 et 101 ± 13 % pour le tétrazépam et 101 ± 10, 92 ± 15 et 98 ± 8 % pour le diazépam, pour 50, 100 et 500 ng/g, respectivement (Tableau 22).

**Tableau 22. Rendements d'extraction, biais et coefficients de variation (CV) de l'analyse du tétrazépam et du diazépam dans des moules (n = 4)**

<b>Concentration de dopage</b> en ng/g ps	<b>Rendement d'extraction</b> en %	<b>Biais</b> en %	<b>CV</b> en %
<b>Tétrazépam</b>			
50	99 ± 10	-3	10
100	95 ± 8	-5	7
500	101 ± 13	+1	14
<b>Diazépam</b>			
50	101 ± 10	-3	9
100	92 ± 15	-8	16
500	98 ± 8	-2	9

### Précision

Les biais allaient de - 5 à + 1 % pour le tétrazépam et de - 2 à - 8% pour le diazépam (Tableau 22).

### Répétabilité

Les coefficients de variation étaient tous inférieurs à 16 % (Tableau 22).

### Conclusion

Cette méthode d'extraction et d'analyse de deux benzodiazépines dans les moules a été validée, ce qui n'a jamais été publié à ce jour. Les rendements d'extraction de la méthode sont supérieurs à 92 %, les coefficients de variation inférieurs à 16 % et les biais compris entre - 8 et 1 %. Les limites de détection sont de 5 ng/g de poids sec pour le diazépam et le tétrazépam et les limites de quantification de 20 ng/g ps. Cette limite de détection est équivalente à celles proposées par Cueva-Mestanza et al. (2008) pour des médicaments (carbamazépine, ibuprofène, kétoprofène, bézafibrate et naproxène) dans des mollusques comprises entre 30 et 220 ng/g de poids secs. La teneur en eau des moules, calculée sur 46 lots, est de  $76 \pm 3$  %. Dans ces conditions, la limite de détection des benzodiazépines dans les moules équivaut à 4,8 ng/g pf. Cette limite est voisine de celle du diazépam dans des foies de poissons marins de 8,2 ng/g pf (Kwon et al. 2009).

## IV. Synthèse

Le Tableau 23 présente la synthèse des caractéristiques des méthodes développées et validées dans ce chapitre de thèse (LD et LQ, zone de linéarité) en vue de leur utilisation dans les chapitres suivants.

**Tableau 23. Caractéristiques des méthodes d'analyse développées**

	Eau de mer contenant du phytoplancton		Moules ( <i>Mytilus sp.</i> )	
	Filtres UV	BZD	Filtres UV	BZD
Expression des concentrations	µg/l ou µg/bac		ng/g ps	
LD – LQ	0,02 – 0,1	0,02 – 0,1	2 - 5	5 – 20
Zone de linéarité	0,1 – 50	0,1 – 50	5 - 500	20 -700



# **Chapitre 3.** Etude de la contamination des moules côtières par les filtres UV



# I. Introduction

Les filtres UV sont des substances utilisées pour prévenir les effets néfastes des rayonnements solaires. Ces molécules sont utilisées dans les crèmes de protection solaire, mais également dans de nombreux autres produits cosmétiques. Cette utilisation comme produits personnels de soin est règlementée par la directive européenne (76/768/CEE) qui limite la proportion de chaque filtre UV chimique organique à 10 % de la formulation totale. Plusieurs filtres UV, dont l'EHMC, font partie des « high production volume chemicals : HPVC » substances chimiques produites ou importées à plus de 1 000 tonnes par an dans au moins un des pays de l'Union Européenne. Parmi les filtres UV organiques, certains comme l'EHMC ou l'OC sont plus fréquemment retrouvés dans les crèmes solaires. Rastogi 2002 qui a étudié la composition de 75 produits solaires a montré que 81 % de ces produits contenaient un mélange de filtres UV ; le filtre UV retrouvé le plus fréquemment est l'EHMC présent dans 49 % des produits étudiés, (proportions comprises entre 1,4 et 4,7 %) ; l'OC est retrouvé dans 22,7 % des produits solaires testés, c'est le 3<sup>ème</sup> filtre UV, à égalité avec le 4-MBC ; l'OD-PABA n'a été retrouvé que dans un des produits analysés.

Parmi les filtres UV organiques, certains ont montré un potentiel de perturbation endocrinienne dans des études *in vitro* (Kunz et Fent 2006; Schlumpf et al. 2001) et *in vivo* (Schlumpf et al. 2001). L'EHMC et l'OD-PABA ont été rapportés comme présentant une activité estrogénique *in vitro* sur des cellules humaines cancéreuses exprimant naturellement le récepteur aux estrogènes (MCF-7) (Gomez et al. 2005; Schlumpf et al. 2001; Schlumpf et al. 2004). Cependant, dans des essais sur cellules de levures présentant le récepteur humain estrogénique (hER $\alpha$ ), l'EHMC, l'OD-PABA et l'OC n'ont pas présenté d'activité estrogénique ; néanmoins, ils ont tous les trois présenté une activité anti-estrogénique importante (Kunz et Fent 2006). Sur le même type de cellules présentant les récepteurs humains androgéniques (hAR), les trois filtres UV présentent une activité anti-androgénique notable (Kunz et Fent 2006) alors que Ma et al. 2003 n'a pas noté d'activité anti-androgénique pour l'EHMC et l'OD-PABA sur des cellules humaines cancéreuses (MDA-kb2) exprimant le récepteur aux androgènes humains.

Ces filtres UV organiques présents dans de nombreuses formulations, notamment de produits cosmétiques, sont retrouvés dans le milieu aquatique à l'issue de leur utilisation notamment, comme produits de soin corporel. Deux sources de contamination ont été principalement identifiées : les rejets de station d'épuration et les émissions directes lors d'activités récréatives liées à l'eau comme la baignade, les activités de plaisance, le surf ou le rafting. Dans les STEP, les filtres UV sont retrouvés en entrée à des concentrations atteignant 21 000 ng/l pour l'EHMC et 12 000 ng/l pour

l'OC (Balmer et al. 2005; Kupper et al. 2006; Li et al. 2007). Ces filtres UV lipophiles sont partiellement éliminés par les traitements en STEP et ils sont retrouvés dans les effluents jusqu'à 100 ng/l pour l'EHMC, 270 ng/l pour l'OC et 7 ng/l pour l'OD-PABA (Balmer et al. 2005; Cuderman et Heath 2007; Kupper et al. 2006; Li et al. 2007; Rodil et Moeder 2008a).

Par conséquent, ces filtres UV présents dans les effluents de STEP sont retrouvés dans les milieux récepteurs. En effet, ces substances ont été trouvées dans des eaux de rivière à des concentrations atteignant 88 ng/l pour l'EHMC, 35 ng/l pour l'OC et 47 ng/l pour l'OD-PABA (Cuderman et Heath 2007; Rodil et Moeder 2008a). Des filtres UV ont par ailleurs été détectés dans les sédiments à des concentrations atteignant 34 ng/g pour l'EHMC et 93 ng/g pour l'OC (Jeon et al. 2006; Rodil et Moeder 2008b). Des filtres UV ont été également retrouvés dans des lacs recevant des effluents de STEP, à des concentrations voisines de 92 ng/l, 250 ng/l et 34 ng/l pour l'EHMC, l'OC et l'OD-PABA, respectivement (Balmer et al. 2005; Cuderman et Heath 2007; Poiger et al. 2004; Rodil et Moeder 2008a). Dans ces sites soumis à des effluents de STEP, que ce soit des eaux de rivière ou de lacs, des augmentations des concentrations ont été observés en période estivale (Rodil et Moeder 2008a). Ces variations sont probablement dues à une augmentation de l'usage de ces produits de soins comme protection solaire en période estivale. Bien que ces différents travaux concluent que les sources majoritaires associées aux filtres UV soient les rejets de STEP, pour des sites présentant une activité récréative liée à l'eau, l'émission directe peut être une source de contamination du milieu notamment en été. Ainsi, certains auteurs comme Balmer et al. (2005) ont montré que dans certains lacs, les concentrations en filtres UV ne sont pas corrélées aux concentrations en méthyl-triclosan, un marqueur de contamination par les effluents de STEP.

De même, en milieu marin, Langford et Thomas (2008) ont montré l'influence des activités récréatives sur les niveaux de concentrations en EHMC et OC. Ces auteurs ont recherché l'EHMC et l'OC en zone côtière en dehors et au cours de la saison touristique. En dehors de la saison touristique, la concentration en EHMC varie de la non-détection à 32,6 ng/l, l'OC n'étant détecté qu'une seule fois à la concentration de 24,8 ng/l. Au cours de la saison touristique, période de baignades, les concentrations hors zone de plage sont de 38,6 à 189,3 ng/l pour l'EHMC et de la non détection jusqu'à 105,1 ng/l pour l'OC ; en revanche, dans la zone de baignade, les concentrations atteignent 389,9 ng/l pour l'EHMC et 7 301,0 ng/l pour l'OC. Certains filtres UV comme l'EHMC ont également été détectés dans l'Océan Pacifique (Polynésie), dans la microcouche de surface à des concentrations atteignant 92 ng/l de microcouche (Goksoyr et al. 2009). Ces études témoignent de la contamination possible de la zone côtière par des filtres UV, notamment en fonction des activités qui

y sont développées comme les activités récréatives. Les zones côtières urbanisées, fortement touristiques constituent des zones sensibles à la contamination par les filtres UV.

Ces filtres UV présents à des concentrations voisines du  $\mu\text{g/l}$  dans les eaux de surface ou dans certaines zones côtières génèrent une exposition des organismes qui vivent dans ces sites. Plusieurs études se sont intéressées à la contamination des organismes aquatiques en eau douce (Balmer et al. 2005; Buser et al. 2006; Fent et al. 2009b; Nagtegaal et al. 1997; Zenker et al. 2008). Dans les rivières soumises à des rejets de STEP, l'OC a été retrouvé dans des poissons à des concentrations voisines de 600 ng/g de lipides (Buser et al. 2006). L'EHMC a été quantifié dans des crustacés (*Gammarus* sp.), dans des mollusques (*Dreissena polymorpha*) et dans plusieurs espèces de poissons à des niveaux allant respectivement jusqu'à 133, 150 et 76 ng/g lipides (Fent et al. 2009b). L'OD-PABA n'a, à notre connaissance, jamais été recherché dans les organismes aquatiques. Les niveaux de contaminations des poissons dépendent des espèces, de leur teneur en lipides (Balmer et al. 2005; Buser et al. 2006; Fent et al. 2009b). Fent et al. (2009b) ont montré que les poissons sédentaires sont 5 fois plus contaminés que les poissons préférant les eaux « ouvertes ». Dans les sites soumis à des activités récréatives, il apparaît que les concentrations en filtres UV augmentent avec la pratique de la baignade, comme cela a été mis en évidence pour les concentrations en filtres UV dans les eaux. En effet, Buser et al. (2006) ont montré que les concentrations en OC retrouvées dans des poissons en septembre, après la période de baignade, étaient de 3 à 5 fois supérieures à celles retrouvées en mai, avant cette période de baignade. De même, Fent et al. (2009b) ont montré que les moules d'eau douce collectées à la sortie d'un lac où la baignade est pratiquée, présentent des concentrations plus élevées après la période estivale qu'avant. L'ensemble de ces travaux réalisés en eaux douces montre que les niveaux de concentration retrouvés dans les organismes aquatiques sont plus importants dans les sites recevant des effluents de STEP et soumis à des activités récréatives. Aucune donnée n'est aujourd'hui disponible sur les niveaux de ces filtres UV dans des organismes marins présents dans des sites impactés par des effluents de STEP ou des activités de baignade. Or comme nous l'avons cité précédemment, la zone côtière montre une contamination par les filtres UV pouvant être importante et dépendante en outre des activités récréatives (Giokas et al. 2005; Goksoyr et al. 2009; Langford et Thomas 2008).

Pour étudier les concentrations en milieu marin de polluants organiques traces, la moule apparaît comme un modèle pertinent (Andral et al. 2004). Il s'agit d'une espèce sédentaire exposée en continu aux contaminants du site étudié. Si aucune donnée n'existe aujourd'hui sur les moules de mer, des données sur les moules d'eau douce (Fent et al., 2009) suggèrent une bioconcentration de ces molécules. Cependant, même les études réalisées sur les moules d'eaux douces sont rares et on

ne dispose pas de données sur le devenir (métabolisme, accumulation, organes concentrateurs...) des filtres UV dans ces organismes. Pour les études en milieu marin, les moules peuvent soit être pêchées *in situ* soit être mises en cage pendant des temps définis. L'exposition dans des cages permet de palier les variations de ressources entre les sites d'étude, de calibrer les individus pour qu'ils soient au même stade de développement et de maîtriser le temps d'exposition. Si la méthode d'exposition dans des cages est utilisée pour étudier la contamination par des polluants organiques comme les PCB ou les HAP (Namiesnik et al. 2008), l'utilisation des cages pour le suivi des filtres UV en milieu marin reste à étudier. Cependant, la méthode d'exposition dans des cages apparaît comme la plus adaptée à l'étude de site soumis à des rejets d'effluents de STEP en milieu marin (Andral et al. 2004).

Notre objectif est de réaliser une première estimation en France de la contamination de la zone côtière par des filtres UV, EHMC, OC et OD-PABA en utilisant un organisme bioconcentrateur : la moule. La contamination du littoral étant soumise aux pressions anthropiques (urbanisation des côtes, rejet des effluents de STEP directement en mer par des émissaires, et activités récréatives), différents sites ont été sélectionnés afin d'évaluer l'influence de ces pressions anthropiques sur les niveaux de concentrations des moules.

Pour l'étude de l'influence des activités récréatives, des sites côtiers ont été sélectionnés en fonction de paramètres pouvant avoir une influence sur le niveau d'exposition : nombre de baigneurs potentiels (dépendant des conditions météorologiques), caractéristiques hydrodynamiques et conformation de plages. Différentes caractéristiques et informations ont été relevées pour aboutir à une description qualitative des sites. Les activités de baignade étant largement dépendantes de la fréquentation touristique, des prélèvements ont été effectués du début à la fin d'une saison touristique, soit 3 à 5 prélèvements de juin à novembre. Les activités de baignade étant également largement dépendantes des conditions de température, les données météorologiques ont été collectées pour chacun des sites. Pour cette étude, la pêche de moule *in situ* a été retenue ; en effet, des moules sont présentes sur l'ensemble des sites sélectionnés et le d'exposition dans des cages de moules dans des sites avec activité récréative n'est pas envisageable. Cependant, les espèces rencontrées sur la côte Atlantique *Mytilus edulis* et sur la côte Méditerranéenne *Mytilus galloprovincialis* sont distinctes. Les indices de condition des organismes et leurs concentrations en filtres UV sont comparés pour déterminer si les données peuvent être traitées ensemble.

Pour l'étude des zones côtières soumises à des rejets d'effluents de STEP, soit directement par des émissaires, soit indirectement par l'arrivée de rivières contaminées, la méthode d'exposition dans des cages de moules a été retenue. Des moules de l'espèce *Mytilus galloprovincialis* ont été

exposées pendant 2 mois sur les sites de rejets d'effluents de station d'épuration de 2 villes méditerranéennes et à l'arrivée d'une rivière transitoire traversant une grande ville côtière méditerranéenne. L'objectif spécifique de ce travail avec exposition de moules dans des cages est d'estimer si les moules mises en cage pour le suivi des émissaires en mer contiennent des filtres UV après 2 mois d'exposition dans des zones situées dans le panache de rejet des effluents de stations d'épuration.

## II. Matériel et méthodes

### II.1. Sites d'études

#### II.1.1. Etudes de l'impact des activités récréatives

La campagne de prélèvements de moules sauvages a été effectuée en 2008 sur 10 sites côtiers français (Figure 19). Les sites de prélèvement sont tous des zones d'activités récréatives liées à l'eau. Ils ont été sélectionnés à priori pour leur fréquentation et pour la disponibilité de moules sauvages toute l'année. Notre campagne a compté : 7 plages en ville (P) : Saint-Pierre Quiberon (A-P1), le Cap d'Agde (M-P2), Sète (M-P3), Frontignan (M-P4), Palavas-les-Flots (M-P5), la Grande Motte (M-P6) et le Grau du Roi (M-P7) ; 1 plage accessible uniquement en bateau (B) : le Banc d'Arguin (A-B) ; 1 récif dans une baie bordée de plages (R) : les Impairs (A-R) ; et 1 port de plaisance (Po) : Palavas-les-Flots (M-Po) (Figure 19). La campagne a été menée entre juin et novembre 2008 et a compté 5 prélèvements pour la majorité des sites. Trois sites étaient situés sur la côte Atlantique (A), les échantillons étaient composés de moules de l'espèce *Mytilus edulis*, et 7 sites étaient sur la côte Méditerranéenne (M) avec des échantillons de *Mytilus galloprovincialis*.

##### II.1.1.1 Saint Pierre Quiberon (56) : A-P1

La commune de Saint Pierre Quiberon est située dans le Morbihan, au nord de la presqu'île de Quiberon et s'étend sur 7,24 km<sup>2</sup>. Le site de prélèvement (Photographie 1) est situé dans les rochers de la zone d'estran de la plage du Petit Rohu, ouverte sur la baie de Quiberon. Le site se trouve en face d'un camping comptant 110 emplacements, ouvert de fin mars à début novembre. Des prélèvements de *M. edulis* ont été effectués sur ce site les 20/07/08, 08/08/08, 03/09/08 et 30/10/08.

##### II.1.1.2 La Baule-Escoublac (44) : Récifs des Impairs : A-R

La Baule-Escoublac est une commune de Loire Atlantique de 10,58 km. Cette station balnéaire de la Côte d'Amour est réputée pour sa longue plage de 9 km située au fond de la baie du

Pouliguen. 3 prélèvements de moules de l'espèce *M. edulis* ont été effectués durant l'été 2008 à La Baule sur le récif des impairs, dans la baie du Pouliguen, à 800 m de la plage. Des prélèvements de *M. edulis* ont été effectués sur ce site les 10/07/08, 07/08/08 et 19/09/08.

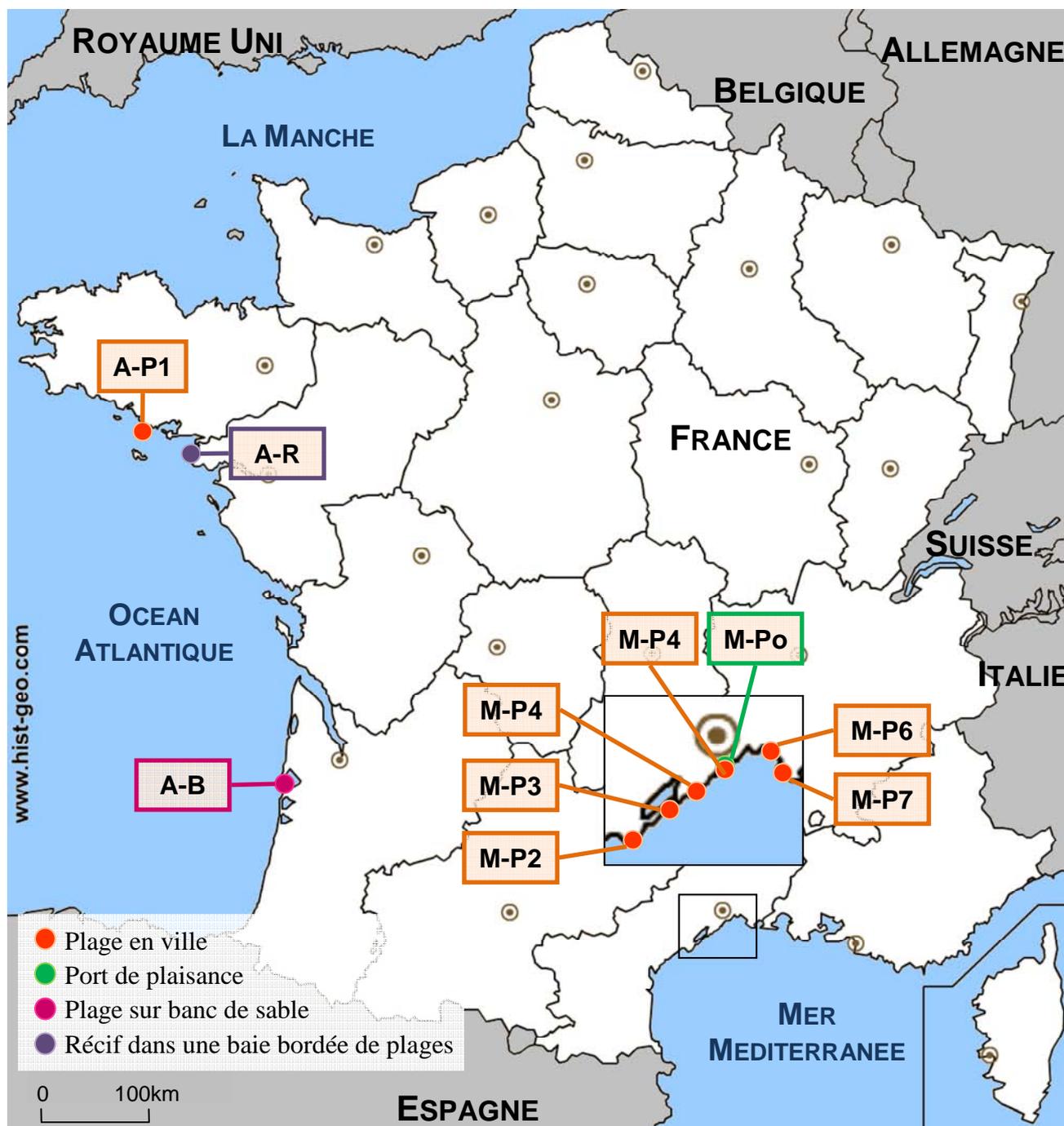


Figure 19. Carte des sites de prélèvement de moules sauvages sur des plages françaises en 2008

### II.1.1.3 Le banc d'Arguin (33) : A-B

La réserve naturelle du banc d'Arguin (Photographie 2) est un banc de sable qui se situe à l'entrée du bassin d'Arcachon entre la dune du Pilat et la Pointe du Cap Ferret, elle dépend de la

commune de La Teste-de-Buch. A marée basse, le Banc d'Arguin représente environ 4 km de long sur 2 km de large ; il est partiellement recouvert à marée haute. Sous l'action des courants marins, des marées et du vent, les bancs de sable changent continuellement de forme et d'emplacement. Les milliers de mètres cubes d'eau venant remplir puis vider le bassin d'Arcachon plusieurs fois par jour passent au contact du Banc d'Arguin. Les échantillons de *M. edulis* ont été collectés sur le sable du banc, dans la zone d'estran. Ce banc est une zone très fréquentée l'été par les plaisanciers. Les prélèvements de *M. edulis* ont été récoltés les 23/06/08, 17/07/08, 18/08/08, 17/09/08 et 14/10/08.

#### II.1.1.4 Le Cap d'Agde (34) : M-P2

Le Cap d'Agde dépend de la commune d'Agde qui s'étend sur 50,90 km<sup>2</sup>. Le Cap d'Agde, station balnéaire de la commune d'Agde, est développé autour d'un port de plaisance, de marinas, de 14 km de plages, de son centre d'hélio-tourisme, d'un parc d'attractions. Les prélèvements ont été réalisés sur la plage de La Roquille (Photographie 3), sur un épi perpendiculaire à la plage, à environ 30 m du bord, le site est partiellement protégé. Les prélèvements de moules (*M. galloprovincialis*) ont été collectés les 03/07/08, 29/07/08, 27/08/08, 25/09/08 et 26/11/08.

#### II.1.1.5 Sète (34) : M-P3

La commune de Sète, située dans l'Hérault, s'étend sur 24,21 km<sup>2</sup> entre l'étang de Thau et la Mer Méditerranée. Sète compte 12 km de plage. Le site de prélèvement (Photographie 4) est situé sur la plage des Quilles, une des plages les plus proches du centre ville. Les moules ont été prélevées sur l'épi parallèle à la plage, à moins de 10 m du bord, coté plage. Les prélèvements de moules (*M. galloprovincialis*) ont été collectés les 03/07/08, 29/07/08, 27/08/08, 25/09/08 et 26/11/08.

#### II.1.1.6 Frontignan (34) : M-P4

Frontignan est une commune de 31,72 km<sup>2</sup> du département de l'Hérault, située autour de l'Etang d'Ingril. Frontignan Plage et le Quartier du Grau constituent la partie côtière de la commune qui compte 7 km de plages. Les prélèvements ont été effectués dans le Quartier du Grau, sur la jetée extérieure Est de la sortie du port de plaisance à environ 20 m du bord (Photographie 5). Les prélèvements de moules (*M. galloprovincialis*) ont été collectés les 03/07/08, 29/07/08, 27/08/08, 25/09/08 et 26/11/08.

#### II.1.1.7 Palavas-les-Flots (34) : M-P5 et M-Po

Palavas-les-flots est une station balnéaire de l'Hérault qui s'étend sur 2,38 km<sup>2</sup> entre les Etangs du Prévost et du Grec et le Golfe Du Lion ; elle compte 7 km de plages. Deux sites ont été

sélectionnés sur la commune de Palavas-les-Flots : un sur la plage Saint-Pierre (rive droite) et un dans le port de plaisance. Le prélèvement de moules (*M. galloprovincialis*) de la plage Saint Pierre a été effectué sur un épi parallèle à la plage à une distance de 30 m du bord (Photographie 6). Le prélèvement de moules (*M. galloprovincialis*) du port a été effectué sur la jetée intérieure du bord ouest du port (Photographie 7). Le port d'un tirant d'eau de 5 m, possède 1 088 places. Les prélèvements ont été collectés les 02/07/08, 30/07/08, 26/08/08, 24/09/08 et 24/11/08.

#### II.1.1.8 La Grande Motte (34) : M-P6

La Grande Motte est une station balnéaire de l'Hérault Cette commune s'étend sur 10,58 km<sup>2</sup> entre l'étang de l'Or, l'étang du Ponant et la Méditerranée par le Golfe d'Aigues-Mortes. Les échantillons de moules ont été collectés sur la plage du centre ville (Photographie 8). Les prélèvements de moules (*M. galloprovincialis*) ont été récoltés sur un épi parallèle à la plage à moins de 5 m du bord. Les prélèvements ont été collectés les 02/07/08, 30/07/08, 26/08/08, 24/09/08 et 24/11/08.

#### II.1.1.9 Le Grau du Roi (30) : M-P7

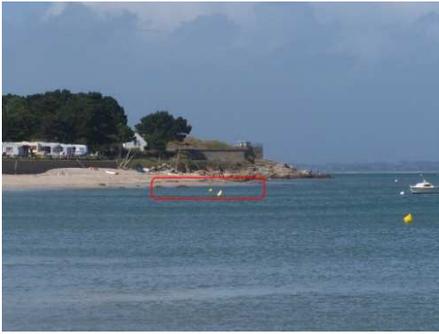
Le Grau du Roi, commune du Gard s'étend sur 54,73 km<sup>2</sup> le long du Golfe d'Aigues-Mortes. Les prélèvements ont été effectués à la plage rive droite du Grau du Roi (Photographie 9) sur un rocher affleurant à 30 m du bord. Les prélèvements de moules (*M. galloprovincialis*) ont été collectés les 02/07/08, 30/07/08, 26/08/08, 24/09/08 et 24/11/08.

#### II.1.1.10 Recueil des données de caractérisation des prélèvements

Pour tous les échantillons, l'heure de prélèvement a été renseignée. Lors des prélèvements en Méditerranée, la température de l'eau, la salinité et la teneur en oxygène dissout ont été mesurés.

Les conditions météorologiques des sites sur la décade de prélèvement ont été recueillies auprès de METEO France pour les stations les plus proches des sites de prélèvement : la température de l'air, la durée d'insolation, la vitesse moyenne du vent, le nombre de jours de pluie ont été retenus. (Météo France 2008).

Pour estimer la fréquentation des plages, la population de la ville où est situé le site de prélèvement (INSEE 2010) et la capacité en hébergement touristique ont été renseignées (INSEE 2009).



**Photographie 1. Site de prélèvement de Saint Pierre Quiberon (A-P1)**



**Photographie 2. Banc d'Arguin (A-B)**



**Photographie 3. Site de prélèvement de la plage de La Roquille au Cap d'Agde (M-P1)**



**Photographie 4. Site de prélèvement de la plage des Quilles à Sète (M-P3)**



**Photographie 5. Site de prélèvement de la plage du Quartier du Grau à Frontignan (M-P4)**



**Photographie 6. Site de prélèvement sur la plage Saint-Pierre de Palavas (M-P5)**



**Photographie 7. Site de prélèvement dans le port de Palavas-les-Flots (M-Po)**



**Photographie 8. Site de prélèvement de la plage du centre ville à La Grande Motte (M-P6)**



**Photographie 9. Site de prélèvement de la plage Rive Droite du Grau du Roi (M-P7)**

## **II.1.2. Etudes de l'impact des rejets de station d'épuration**

### **II.1.2.1 Emissaire de la station A**

La station d'épuration A a une capacité de 470 000 équivalent-habitants. Le traitement comprend des prétraitements physiques (dégrillage, dessablage, déshuilage) suivis d'un traitement secondaire par boues activées très forte charge et d'une biofiltration sur billes de polystyrène. Le débit moyen de la STEP est de 130 000 m<sup>3</sup>/jour. Les effluents de la station sont émis en mer par le biais d'un tuyau de 1,6 m de diamètre et de plus de 20 km de long qui est constitué d'un tronçon terrestre de 4,8 km, un tronçon lagunaire de 4,3 km, et un tronçon maritime de 11 km. L'extrémité de l'émissaire, située à 30 m de profondeur et à 11 km de la côte est dotée d'un diffuseur qui a pour effet de diluer les rejets sur une plus grande zone (Photographie 10). La mise en service date de novembre 2005. En septembre-octobre 2004, un lot de moules a été exposé sur le site d'arrivée du futur émissaire de la station d'épuration. En juin-juillet 2007, deux lots de moules ont été exposés : un à l'est du rejet et un à l'ouest.

### **II.1.2.2 Emissaire de la station B**

La STEP B est une station qui traite les eaux de 16 communes pour un volume de 1 800 000 équivalent-habitants. Les eaux sont traitées par un prétraitement (dégrillage, dessablage, déshuilage), elles passent ensuite dans une série de prédécanteurs et de décanteurs lamellaires, puis sont traitées par bio-filtration sur billes de Biostyrène<sup>TM</sup> immergées et flottantes. Cette station a été mise en service en février 2008. Auparavant, la STEP B datant de 1987 assurait le traitement de 1 300 000 équivalents habitants. Cette installation ne possédait pas de traitement biologique. Le rejet de la station d'épuration B se fait par l'intermédiaire d'un émissaire ouvert sur la mer Méditerranée (Photographie 11).

Les campagnes de mise en place des cages de moules ont eu lieu en novembre 2006 et 2008 à partir de l'Europe, bateau océanographique côtier de l'IFREMER. Les moules ont été récupérées en décembre ou janvier suivant la mise à l'eau. Les prélèvements ont été effectués avant (2006) et après (2008) la mise en service de la nouvelle STEP B.



**Photographie 10. Site de rejet de l'émissaire de la  
STEP A**



**Photographie 11. Site de rejet de la STEP B**

### **II.1.2.3 Site d'arrivée d'une rivière transitoire traversant une agglomération méditerranéenne : l'Huveaune (13)**

L'Huveaune est une rivière côtière du département des Bouches-du-Rhône de 48,4 km de long qui prend sa source dans le Massif de la Sainte-Baume, dans le vallon de Castelette et se jette à Marseille dans la Mer Méditerranée. L'Huveaune arrose un bassin versant de 373 km<sup>2</sup> comprenant la Haute Vallée de l'Huveaune en amont d'Aubagne, relativement rurale, et la Basse Vallée de l'Huveaune, d'Aubagne jusqu'à l'embouchure sur la Mer Méditerranée, marquée par une forte industrialisation. Elle traverse Aubagne, La Penne-sur-Huveaune et les quartiers Est et Sud de Marseille. Depuis 1986, la majeure partie du cours d'eau est déviée vers la Station d'épuration des eaux de Marseille car il pollueait les plages de la ville situées à proximité de son embouchure. En cas de fortes précipitations, le trop plein d'eau du fleuve ne pouvant être absorbé par la station d'épuration est évacué par l'ancien lit naturel.

Les campagnes de mise en place des cages de moules ont eu lieu en novembre 2006 et 2007 à partir de l'Europe, bateau océanographique côtier de l'IFREMER au niveau du rejet naturel de l'Huveaune. Les moules ont été récupérées en décembre ou janvier suivant la mise à l'eau.

## **II.2. Echantillonnage**

### **II.2.1. Collecte de moules sauvages**

Pour chaque prélèvement, une cinquantaine de moules entre 4,5 et 7 cm a été prélevée à la main ou à l'aide d'une grappe par des agents ne portant pas de crème solaire (Photographie 12 et Photographie 13). Les moules ont été récoltées dans la zone d'estran pour les sites situés sur la côte Atlantique ou entre la surface et 200 cm de profondeur pour les sites situés sur la côte

méditerranéenne. Les moules prélevées ont été dégrappées, rincées extérieurement sur le site puis placées dans des sachets en polyéthylène. Pendant le transport, elles ont été stockées en glacières.

## **II.2.2. Exposition des moules dans des cages**

L'échantillonnage actif a été réalisé par transplantation de moules (*M. galloprovincialis*) provenant d'un site de référence situé en mer à distance de sites d'activité récréatives et de rejets de station d'épuration, vers les sites d'influence des émissaires de STEP. Les moules de l'espèce *Mytilus galloprovincialis* utilisées pour l'exposition dans des cages provenaient d'une filière d'élevage de pleine mer située au large de Frontignan (34). Pour nos études, les individus avaient été calibrés entre 5 et 6 cm correspondant à un âge de 12 à 24 mois (Andral et al. 2004). Les dispositifs de transplantation ont été placés en subsurface à 3 mètres de profondeur environ. Le dispositif retenu pour la technique de transplantation des moules (Photographie 14) est adapté de celui développé par IFREMER lors des campagnes RINBIO (Réseau Intégrateur Biologique). Des lots de 150 moules calibrées ont été disposés dans des poches ostréicoles de maille 18 mm de dimension limitée à 0,5 m X 0,35 m. Les poches étaient rigidifiées par deux tubes PVC de diamètre 40mm fendus dans leur longueur et enfilés sur la partie supérieure et inférieure de la poche. Des flotteurs de 11 litres fixés au-dessus des poches ont assuré leur maintien à 3 mètres de la surface. La tenue du système au fond a été assurée par un lest de 30 kg constitué de 4 maillons de chaîne. La liaison entre le lest et la poche a été réalisée par du cordage polypropylène flottant de diamètre 7 mm. Les sites d'immersion ont été repérés par GPS. Lors de la récupération, les dispositifs ont été repérés au point GPS. Les dispositifs ont alors été sortis de l'eau, les poches ont été détachées et conservées dans une glacière jusqu'à l'arrivée au laboratoire.



**Photographie 12. Prélèvements de moules sauvages pour l'analyse de filtres UV dans le port de Palavas**



**Photographie 13. Prélèvements de moules sauvages pour l'analyse de filtres UV sur un épis de la plage de la Roquille au Cap d'Agde**



**Photographie 14. Système de transplantation de moules avant la mise à l'eau sur le pont de l'Europe**



**Photographie 15. Mesure d'une moule avec un pied à coulisse**

### **II.3. Préparation des échantillons de moules**

Le traitement des moules a été identique pour les moules prélevées sur les plages et celles exposées dans des cages. Un tri a été effectué pour ôter les moules mortes qui ont été comptabilisées. Les moules ont été grattées extérieurement pour éliminer le biofilm et les épibiontes présents sur la coquille en prévision de leur pesée, le byssus a été ôté. 20 moules choisies aléatoirement dans chaque lot, ont été pesées et mesurées (Photographie 15). Le décoquillage a ensuite été réalisé avec un scalpel en acier inoxydable rincé au solvant, en évitant d'endommager le mollusque avec la lame. La chair a été mise à égoutter sur un papier absorbant. Le temps d'égouttage était de 30 min environ. Les mollusques ont ensuite été stockés dans des sachets en polyéthylène à -20 °C avant d'être lyophilisés.

La masse de chair humide après égouttage a été mesurée pour le lot d'individus calibrés, l'indice de condition du lot, correspondant à la masse de chair sèche sur la masse de coquille sèche, a été mesuré. Pour cela, le sachet contenant les individus à caractériser a été pesé avant congélation et après lyophilisation. Les coquilles correspondantes ont été pesées après un séchage de 48 h à l'étuve à 60°C. L'indice de condition global du lot a été calculé en divisant la masse de chair sèche par la masse de coquilles sèches (Andral et al. 2004).

## **II.4. Méthodes d'analyse des filtres UV et des benzodiazépines dans les moules**

Les méthodes d'analyse des filtres UV et des benzodiazépines dans les moules lyophilisées sont présentées dans le chapitre 2.

## **II.5. Statistiques**

Les boîtes à moustaches de la valeur minimale à la valeur maximale ont été réalisées avec le logiciel GraphPad Prism 5.

Les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Statgraphics plus. Des corrélations de Spearman ont été testées pour les échantillons de plages méditerranéennes. Le degré de significativité est fixé à  $p < 0,05$ .

### **III. Résultats**

#### **III.1. Etude de la contamination des moules sauvages provenant de sites côtiers français avec activités récréatives**

##### **III.1.1. Caractérisation des sites et des prélèvements**

L'ensemble des paramètres récoltés pour caractériser les sites de prélèvements est présenté dans le Tableau 24. Plusieurs types de sites ont été étudiés : des plages en ville (P) avec des prélèvements effectués dans la zone de baignade ; un récif (R) dans une baie bordée de plage subissant l'influence des activités de baignade à une distance de 700 m ; un banc de sable (B) accueillant en été de nombreux plaisanciers venus pique-niquer et s'y baigner ; et enfin un port de plaisance (Po). La profondeur de prélèvement peut être un facteur influant puisqu'il a été montré que des moules prélevées en surface étaient plus contaminées en HAP que des moules prélevées dans la colonne d'eau (Baumard et al. 1998; Naes et al. 1995). La protection de la zone face aux vagues et aux courants et la présence de marée semblent également un facteur influant puisque dans une zone protégée et sans marée, les mélanges et la dilution sont limités tandis que dans une zone ouverte avec des marées, la dilution et les mélanges sont plus importants, entraînant une diminution des concentrations en filtres UV dans la zone de baignade (Langford et Thomas 2008). Au vue de la configuration de ces sites nous avons défini 3 classes de sites : protégé, partiellement protégé et ouvert. On considère que pour les sites protégés, les mélanges sont limités tandis qu'ils sont importants pour les sites ouverts. Parmi les facteurs de fréquentation, la population, le nombre d'hébergements touristiques et la superficie de la ville permettent d'évaluer la fréquentation de la plage.

**Tableau 24. Caractéristiques des sites de prélèvement de moules sauvages sur des sites côtiers français avec activités récréatives liées à l'eau**

Site	Type de site	Espèce prélevée	Classification proposée du site de prélèvement	Profondeur de prélèvement	Population en habitants	Hébergement touristique en unité	Superficie en km <sup>2</sup>
<b>A-P1</b>	Plage en ville	<i>M. edulis</i>	Ouvert	Zone d'estran	2 217	3 785	7,24
<b>A-B</b>	Plage accessible en bateau	<i>M. edulis</i>	Ouvert	Zone d'estran	24 616	6 461	180
<b>A-R</b>	Récif	<i>M. edulis</i>	Ouvert	Zone d'estran	16 719	13 648	22,19
<b>M-P2</b>	Plage en ville	<i>M. galloprovincialis</i>	Partiellement protégé	0 - 150 cm	21 104	35 112	50,9
<b>M-P3</b>	Plage en ville	<i>M. galloprovincialis</i>	Protégé	0 - 50 cm	42 972	7 282	24,21
<b>M-P4</b>	Plage en ville	<i>M. galloprovincialis</i>	Partiellement protégé	0 - 150 cm	23 068	2 664	31,72
<b>M-P5</b>	Plage en ville	<i>M. galloprovincialis</i>	Ouvert	0 - 200 cm	6 048	6 587	2,38
<b>M-P0</b>	Port de plaisance	<i>M. galloprovincialis</i>	Protégé	0 - 50 cm			
<b>M-P6</b>	Plage en ville	<i>M. galloprovincialis</i>	Protégé	0 - 50 cm	8 246	17 118	10,58
<b>M-P7</b>	Plage en ville	<i>M. galloprovincialis</i>	Ouvert	0 - 200 cm	8 173	20 010	54,73

En plus de la caractérisation des sites, des informations sur le site au moment du prélèvement ont été récoltées à chaque date ; elles sont présentées dans le Tableau 25 et comprennent la date et l'heure du prélèvement, des données météorologiques sur la décade (Météo France 2008) et les caractéristiques de l'eau mesurées au moment du prélèvement.

La durée d'insolation et la température de l'air sont corrélées entre elles et inversement corrélées avec la vitesse du vent et le nombre de jours de pluie ( $p < 0,05$ ). Par la suite, nous avons donc choisi d'utiliser la température de l'air pour représenter les conditions météorologiques car elle est renseignée sur plus de sites de référence que la durée d'insolation et présente une plus grande variabilité que le nombre de jours de pluie.

**Tableau 25. Caractéristiques des prélèvements de moules sauvages sur des sites côtiers français avec activités récréatives liées à l'eau (nr : non renseigné)**

Site	Prélèvement		Météo de la décade de prélèvement				Mesure au point de prélèvement		
	Date	Heure	Température moyenne en °C	Vitesse moyenne du vent en m/s	Durées d'insolation en min	Jour avec précipitation > 1mm	Température de l'eau en °C	Salinité en ‰	O <sub>2</sub> dissous en mg/l
<b>A-P1</b>	02/07/08	13,50	17,0	4,8	4 369	1	17,0	nr	nr
	30/07/08	13,00	18,4	5,9	3 157	2	18,0	nr	nr
	26/08/08	12,00	16,9	7,7	2 989	6	17,5	nr	nr
	24/09/08	10,50	11,1	5,8	2 376	5	15,0	nr	nr
<b>A-R</b>	10/07/08	nr	17,2	5,7	4 423	5	nr	nr	nr
	07/08/08	nr	18,7	5,1	3 452	3	nr	nr	nr
	17/09/08	nr	14,7	3,6	4 911	1	nr	nr	nr
<b>A-B</b>	23/06/08	14,50	21,5	4,3	6 219	2	nr	nr	nr
	17/07/08	nr	20,3	4,5	5 683	3	nr	nr	nr
	18/08/08	11,66	19,8	4,8	2 817	6	nr	nr	nr
	17/09/08	nr	17,7	4,1	4 527	3	nr	nr	nr
	14/10/08	nr	17,6	3,1	3 670	2	nr	nr	nr
<b>M-P2</b>	03/07/08	10,25	22,5	4,2	6 605	0	23,1	35,7	7,11
	29/07/08	9,50	23,1	3,9	7 962	0	19,0	37,8	6,79
	27/08/08	10,00	21,8	3,9	7 335	0	17,6	36,5	6,75
	25/09/08	10,00	16,3	4,2	6 287	0	nr	36,0	8,74
	26/11/08	10,00	8,3	4,9	3 020	1	11,6	37,6	7,77
<b>M-P3</b>	03/07/08	11,33	23,2	4,2	6 605	0	23,1	35,4	7,91
	29/07/08	11,50	24,0	3,9	7 962	0	22,4	38,1	5,18
	27/08/08	12,83	23,2	3,9	7 335	0	20,3	36,4	6,98
	25/09/08	12,50	17,4	4,2	6 287	0	18,4	36,4	9,30
	26/11/08	12,83	8,6	4,9	3 020	1	10,0	37,7	8,00
<b>M-P4</b>	03/07/08	13,00	23,2	4,2	6 605	0	23,5	35,4	7,87
	29/07/08	10,66	24,0	3,9	7 962	0	21,6	38,0	5,86
	27/08/08	11,50	23,2	3,9	7 335	0	20,1	36,6	6,73
	25/09/08	11,16	17,4	4,2	6 287	0	17,5	36,2	9,75
	26/11/08	11,58	8,6	4,9	3 020	1	11,7	38,2	7,83
<b>M-P5</b>	02/07/08	9,83	23,1	4,0	6 605	0	23,5	35,6	8,10
	30/07/08	11,75	24,0	3,5	7 962	0	23,9	37,4	5,79
	26/08/08	12,41	22,7	3,5	7 335	0	18,5	38,0	nr
	24/09/08	12,00	16,2	3,4	6 287	0	17,7	36,1	9,80
	24/11/08	11,00	7,7	4,3	3 020	1	12,7	38,3	7,66
<b>M-Po</b>	02/07/08	10,25	23,1	4,0	6 605	0	23,7	34,9	7,81
	30/07/08	12,16	24,0	3,5	7 962	0	24,2	37,2	5,90
	26/08/08	12,75	22,7	3,5	7 335	0	18,5	38,0	nr
	24/09/08	12,50	16,2	3,4	6 287	0	17,9	35,5	9,29
	24/11/08	11,25	7,7	4,3	3 020	1	13,7	37,5	5,70
<b>M-P6</b>	02/07/08	12,00	23,3	3,7	6 605	0	24,9	32,8	8,37
	30/07/08	10,00	23,6	3,1	7 962	0	24,3	35,3	7,44
	26/08/08	11,75	22,5	3,1	7 335	0	19,0	36,0	nr
	24/09/08	11,50	16,8	3,3	6 287	0	16,6	37,0	10,35
	24/11/08	10,50	8,2	4,2	3 020	1	13,1	37,9	7,52
<b>M-P7</b>	02/07/08	12,66	23,1	3,7	6 605	0	24,9	34,1	9,42
	30/07/08	10,50	23,6	3,1	7 962	0	24,7	35,6	6,39
	26/08/08	10,75	22,1	3,1	7 335	0	19,9	37,1	nr
	24/09/08	10,83	16,7	3,3	6 287	0	14,8	37,5	9,68
	24/11/08	10,00	8,2	4,2	3 020	2	12,4	37,7	7,76

### III.1.2. Contamination des moules sauvages provenant de sites côtiers français avec activités récréatives

Les résultats obtenus pour les sites atlantiques (Tableau 26) et méditerranéens (Tableau 27) sont exprimés en ng/g de poids secs. Les concentrations retrouvées dans les moules prélevées sur des sites avec activités récréatives des côtes françaises varient de la non détection (<2 ng/g ps) à 7 064 ng/g ps pour l'OC et de 4 à 240 ng/g ps pour l'EHMC (Tableau 26 et Tableau 27). L'OD-PABA n'a jamais été détecté dans les moules, la limite de détection étant de 2 ng/g p.s. Pour pouvoir comparer nos données à celles existantes, les concentrations ont également été rapportées à la masse de lipides (Tableau 26 et Tableau 27).

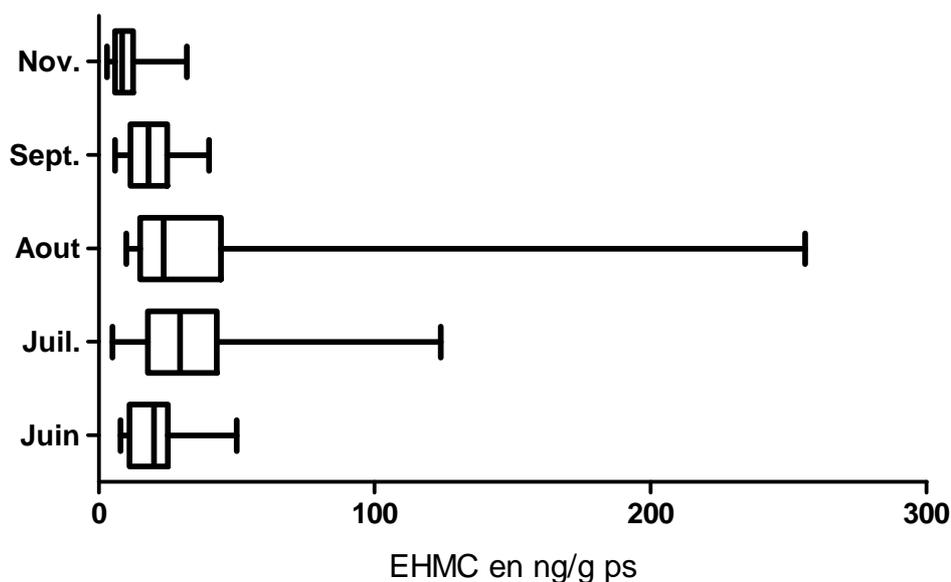
**Tableau 26. Indices de conditions (IC) et concentrations en filtres UV dans des moules *M. edulis* provenant de sites atlantiques d'activités récréatives**

	Date de prélèvement	IC	Concentration en EHMC			Concentration en OC		
			Duplicats en ng/g ps		Moyenne en ng/g lipides	Duplicats en ng/g ps		Moyenne en ng/g lipides
<b>A-B</b>	23/06/08	0,137	12	10	155	NQ	NQ	NQ
	17/07/08	0,166	29	30	359	12	14	160
	18/08/08	0,110	45	42	660	23	23	347
	17/09/08	0,146	14	21	281	NQ	NQ	NQ
	14/10/08	0,115	32	24	464	9	10	164
<b>A-R</b>	10/07/08	0,110	5	8	72	NQ	NQ	NQ
	07/08/08	0,163	12	21	268	NQ	NQ	NQ
	17/09/08	0,123	6	7	64	NQ	NQ	NQ
<b>A-P1</b>	20/07/08	0,078	20	17	302	NQ	NQ	NQ
	08/08/08	0,102	15	15	234	17	11	221
	03/09/08	0,086	8	11	171	NQ	NQ	NQ
	30/10/08	0,077	7	11	145	NQ	NQ	NQ

**Tableau 27. Indices de condition (IC) et concentrations en filtres UV dans des moules *M. galloprovincialis* provenant de sites méditerranéens d'activités récréatives**

	Date de prélèvement	IC	Concentration en EHMC			Concentration en OC		
			Duplicats en ng/g ps		Moyenne en ng/g lipides	Duplicats en ng/g ps		Moyenne en ng/g lipides
<b>M-P2</b>	03/07/08	0,085	15	22	290	36	43	608
	29/07/08	0,096	41	39	554	214	222	3 162
	27/08/08	0,107	22	24	338	168	176	2 540
	25/09/08	0,115	16	18	304	10	10	181
	25/11/08	0,100	9	6	122	NQ	NQ	NQ
<b>M-P3</b>	03/07/08	0,153	25	26	423	248	252	3 934
	29/07/08	0,138	115	124	1 836	1 286	1 297	19 491
	27/08/08	0,126	224	256	2 923	7 015	7 112	86 110
	25/09/08	0,144	19	18	284	32	31	475
	25/11/08	0,130	9	9	144	NQ	NQ	NQ
<b>M-P4</b>	03/07/08	0,129	25	24	386	36	30	520
	29/07/08	0,083	42	43	707	137	124	1 999
	27/08/08	0,092	30	27	475	95	75	1 401
	25/09/08	0,098	24	25	461	NQ	NQ	NQ
	25/11/08	0,071	8	10	167	NQ	NQ	NQ
<b>M-P5</b>	02/07/08	0,106	19	21	359	42	47	683
	30/07/08	0,112	35	26	383	119	132	1 598
	26/08/08	0,109	13	15	270	36	34	544
	24/09/08	0,098	40	39	613	NQ	NQ	NQ
	24/11/08	0,104	7	6	102	NQ	NQ	NQ
<b>M-P6</b>	02/07/08	0,215	50	48	669	390	454	5 741
	30/07/08	0,199	62	53	686	1 111	1 141	13 329
	26/08/08	0,208	106	99	1 239	842	803	9 964
	24/09/08	0,150	26	30	297	22	29	275
	24/11/08	0,086	18	17	202	NQ	NQ	NQ
<b>M-P7</b>	02/07/08	0,192	8	13	135	23	18	267
	30/07/08	0,214	11	16	154	98	94	1 107
	26/08/08	0,188	10	16	160	97	78	1 109
	24/09/08	0,182	16	20	239	NQ	NQ	NQ
	24/11/08	0,100	3	8	85	NQ	NQ	NQ
<b>M-Po</b>	02/07/08	0,107	9	11	150	60	47	791
	30/07/08	0,091	21	24	304	65	61	856
	26/08/08	0,123	23	26	339	NQ	NQ	NQ
	24/09/08	0,119	8	13	136	NQ	NQ	NQ
	24/11/08	0,075	3	5	80	NQ	NQ	NQ

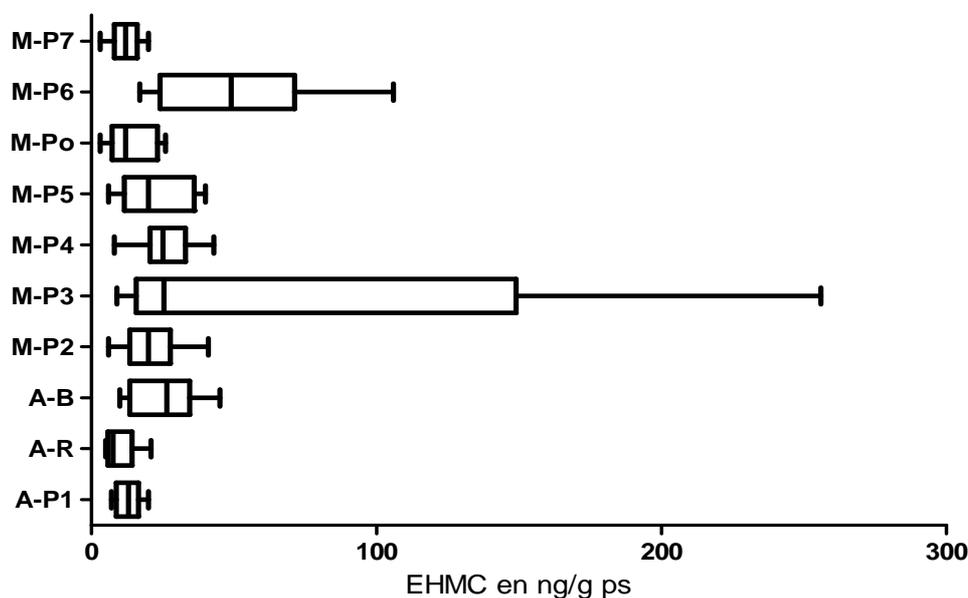
Les concentrations en EHMC et en OC sont significativement corrélées entre elles ( $p < 0,05$ ) et varient fortement suivant les sites et les périodes de prélèvement. Les prélèvements de moules ont eu lieu sur 5 périodes : fin juin-début juillet, juillet, août, septembre et octobre-novembre. Comme l'illustre la Figure 20, les concentrations en EHMC et en OC sont significativement corrélées avec la date de prélèvement ( $p < 0,05$ ). Les concentrations sont maximales en juillet et en août, ce qui correspond à la période de fréquentation maximale des sites de baignade, elles atteignent 240 ng/g ps d'EHMC et 7 064 ng/g ps d'OC. Les niveaux de contamination sont minimaux en novembre avec des concentrations en EHMC toujours inférieures à 30 ng/g et l'OC n'est jamais détecté, le mois de novembre correspondant à une fréquentation des plages sans baignade. De plus, il apparaît que les concentrations en EHMC et en OC sont significativement corrélées avec la température de l'air ( $p < 0,05$ ) pour l'EHMC et l'OC, la température de l'air pouvant être associée aux activités de baignade.



**Figure 20. Boîtes à moustaches (min à max) des concentrations en EHMC dans les moules en ng/g ps en fonction de la période de prélèvement**

La Figure 21 présente les concentrations en EHMC dans les moules en fonction des sites. Les variations entre les sites s'expriment particulièrement sur les concentrations maximales, obtenues en période estivale : juillet ou août. Les sites les plus contaminés sont M-P3 et M-P6, deux plages en ville protégées Tableau 24. Les plages A-B, M-P5, M-P4 et M-P2 présentent également des moules contaminées en EHMC et en OC avec des concentrations maximales en juillet ou août allant jusqu'à 44 ng/g ps d'EHMC (soit 660 ng/g lipides) et 218 ng/g d'OC (soit 3 162 ng/g lipides). L'OC est peu

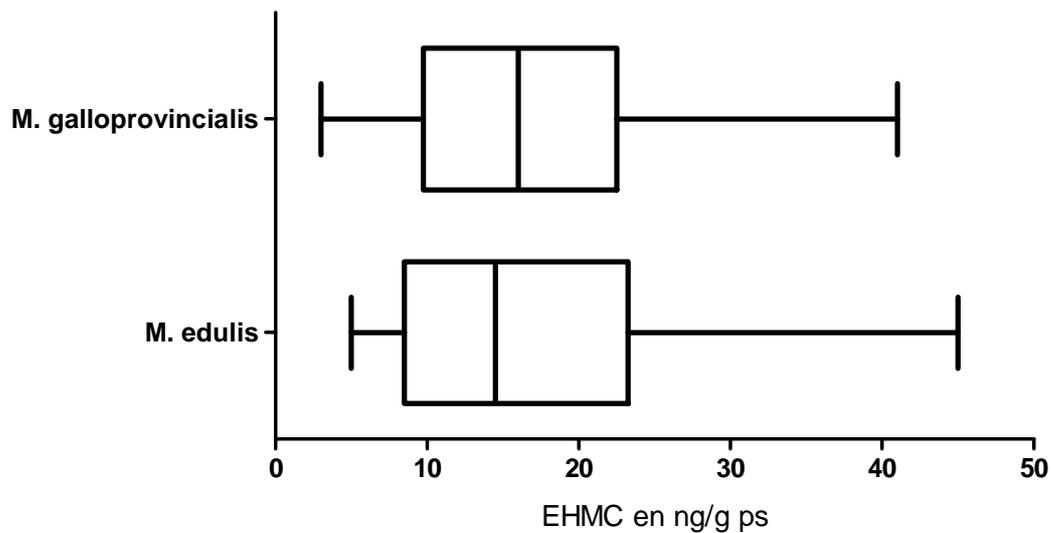
présent dans les moules provenant des sites de la façade Atlantique : il n'est détecté que 4 fois sur les 12 échantillons et la concentration maximale est de 23 ng/g ps.



**Figure 21. Boîtes à moustaches (min à max) des concentrations en EHMC dans les moules en ng/g ps en fonction des sites**

Les concentrations en OC et en EHMC ne sont pas corrélées avec les indices de conditions des moules ni avec leur teneur en lipides. Les moules prélevées sont de deux espèces. La Figure 22 présente les concentrations en EHMC et en OC dans les moules en fonction de l'espèce étudiée. La concentration en EHMC étant liée à la fréquentation des sites et aux activités de baignade, nous avons choisi de comparer les concentrations en EHMC et OC pour des moules prélevées dans les sites de Méditerranée définis comme site ouvert ou partiellement protégé (sites M-P3, M-P4, M-P5 et M-P7) sachant que les moules en Atlantique étaient prélevées en zone d'estran avec un brassage d'eau.

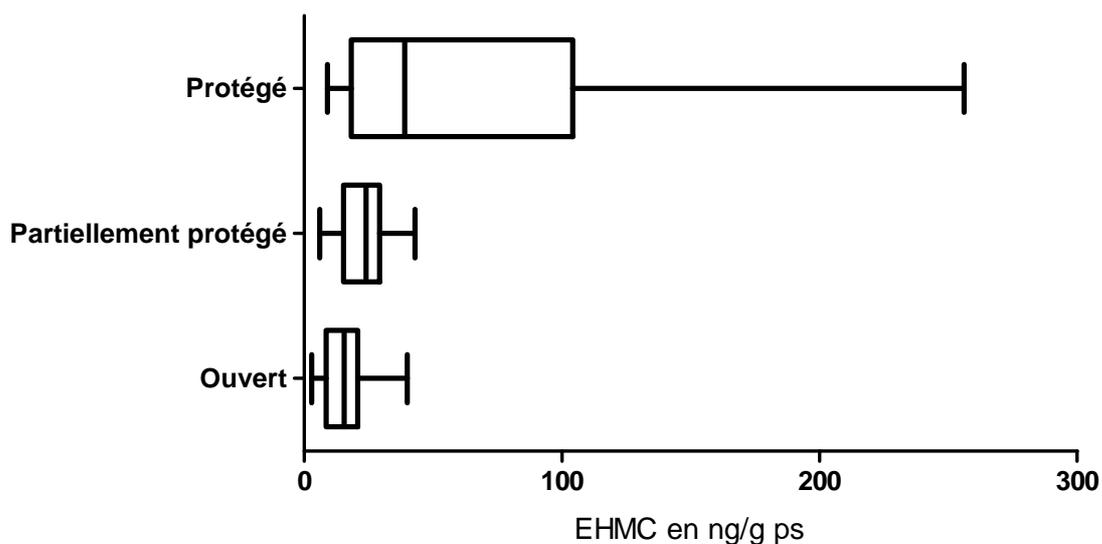
Pour ces sites, les indices de conditions des moules ne sont pas significativement différents : ils sont de  $0,112 \pm 0,035$  pour *M. edulis* et  $0,127 \pm 0,042$  pour *M. galloprovincialis*.



**Figure 22. Boîtes à moustaches (min à max) des concentrations en EHMC dans les *M. edulis* prélevées en Atlantique et dans les *M. galloprovincialis* prélevées en Méditerranée sur les sites M-P2, M-P4, M-P5 et M-P7**

Les sites de plages méditerranéennes présentant des caractéristiques similaires (même espèces de moules, plages en ville, absence de marée) ont été comparés afin de mieux caractériser la variation entre les sites. La Figure 23 présente les concentrations dans les moules en fonction du type de site (ouvert, partiellement protégé ou protégé) tel que décrit dans le Tableau 24. Les moules des sites protégés présentent des concentrations en filtres UV supérieures à celle des sites ouverts. Les sites protégés correspondent aux sites où les moules ont été prélevés le plus près de la surface alors que pour les sites ouverts elles ont été prélevées jusqu'à 2 m de profondeur. Pour les plages méditerranéennes :

- Les concentrations en OC et en EHMC sont significativement plus élevées dans les sites protégés ( $p < 0,05$ ).
- La population de la ville où est située la plage n'est pas significativement corrélée avec les concentrations moyennes obtenues en EHMC et en OC



**Figure 23. Boîtes à moustaches (min à max) des concentrations en EHMC dans les moules en ng/g ps en fonction du type de site**

### **III.2. Contamination de moules exposées à des rejets de STEP**

Les moules exposées sur le site du rejet de l'émissaire de la STEP A avant sa mise en service en septembre-octobre 2004 ne présentent pas de concentration détectable en filtres UV. En juillet 2007, les concentrations en filtres UV dans les moules exposées au niveau du rejet de l'émissaire de la station A n'étaient quantifiables dans aucun des deux lots (Est et Ouest).

Les moules exposées aux rejets de station d'épuration B en novembre-décembre 2006, avant la rénovation de la station et en novembre-décembre 2008, après ce changement, n'ont pas présenté de concentrations détectables en filtres UV. Les concentrations étaient donc inférieures à 2 ng/g ps pour chacun des 3 filtres UV.

Les moules exposées au niveau de l'arrivée de l'Huveaune en novembre-décembre 2006 et en novembre-décembre 2007 n'ont jamais présenté de niveaux détectables en filtres UV.

## IV. Discussion

Les sites les plus soumis à un apport anthropiques en filtres UV en zone côtière sont ceux recevant des effluents de stations d'épuration et ceux qui font l'objet d'activité récréative et notamment de baignade.

Dans cette étude après une exposition de 2 mois, les moules exposées aux effluents de STEP et à l'arrivée d'une rivière transitoire traversant une grande agglomération méditerranéenne présentent des niveaux non détectables pour l'EHMC, l'OC et l'OD-PABA.

Comme attendu, les moules pêchées *in situ* sur des sites côtiers touristiques contiennent en période estivale de l'EHMC et de l'OC. L'EHMC et l'OC ont été détectés dans la majorité des échantillons provenant de sites d'activités récréatives, ces résultats sont comparables à ceux obtenus dans les travaux sur la contamination d'organismes de rivières en EHMC (Fent et al. 2009b) et en OC (Buser et al. 2006). Leurs concentrations dans les moules de plage dépendent des caractéristiques hydrodynamiques des sites et peuvent aller jusqu'à 240 ng/g ps pour l'EHMC ce qui correspond à 2 923 ng/g lipides et jusqu'à 7 064 ng/g ps pour l'OC soit 86 100 ng/g lipides. Pour l'EHMC, les niveaux de contamination des moules de plages sont équivalents ou supérieurs à ceux rapportés dans une étude portant sur des moules d'eaux douces (*Dreissena polymorpha*) où l'EHMC a été quantifié à des niveaux compris entre 22 et 150 ng/g de lipides. Les filtres UV comme l'EHMC et l'OC ont également été détectés dans des poissons de rivières à des concentrations allant jusqu'à 337 ng/g lipides pour l'EHMC et jusqu'à 2 400 ng/g lipides pour l'OC (Buser et al. 2006; Fent et al. 2009b). Des poissons provenant de lac présentaient des niveaux en EHMC ou en OC bien inférieures : l'EHMC n'était détecté que deux fois et l'OC une fois (Balmer et al. 2005).

L'OD-PABA n'est jamais détecté dans les moules analysées, qu'elles proviennent de sites d'activités récréatives ou qu'elles aient été exposées au niveau de rejet de STEP. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation beaucoup moins fréquente de l'OD-PABA par rapport à l'OC ou à l'EHMC comme l'a montré Rastogi 2002 dans son analyse des produits solaires : l'OD-PABA n'est détecté que dans un produit sur les 75 étudiés, alors que l'EHMC est présent dans 49% des produits et l'OC dans 23%. Dans le milieu aquatique, quand l'OD-PABA est recherché, ses concentrations dans les eaux douces de surface sont inférieures à celle de l'EHMC et de l'OC : maximum à 47 ng/l pour l'OD-PABA, contre 92 ng/l pour l'EHMC et 148 ng/l pour l'OC (Balmer et al. 2005; Cuderman et Heath 2007; Rodil et Moeder 2008a), et dans les eaux de mer : maximum à 10,7 ng/g pour l'OD-PABA (Giokas et al. 2005) contre 390 ng/l pour l'EHMC (Langford et Thomas 2008) et 7 301 ng/l pour l'OC (Langford et Thomas 2008).

## IV.1. Influence des activités récréatives sur la contamination des moules par les filtres UV en milieu côtier

Dans l'étude du littoral français, les espèces de moules autochtones sont différentes. Cette différence est à considérer lors de la comparaison des sites atlantiques et méditerranéens, cependant les deux espèces étudiées sont très proches génétiquement et dans nos travaux, nous n'avons pas mis en évidence de différence de concentrations en filtres UV attribuables à l'espèce. Les concentrations plus élevées dans les moules méditerranéennes apparaissent fortement liées aux activités récréatives. Les niveaux rencontrés en novembre en dehors des activités de baignade sont similaires pour les deux espèces. L'utilisation d'espèces différentes de moules est la seule alternative pour l'étude de zone côtière étendue et est effectuée dans le cadre de programme de surveillance du littoral comme le programme de surveillance de la contamination de la côte asiatique par les HAP, les PCB et les DDT (Monirith et al. 2003) : trois espèces différentes sont utilisées *Perna viridis*, *Mytilus gallorovincialis* et *Crenomytilus grayamus*, et les résultats sont comparés sans tenir compte de l'espèce utilisée.

Les données de la littérature montrent une influence de la fréquence des activités récréatives et notamment de baignade sur les concentrations en filtres UV dans les eaux de surface et les eaux côtières (Langford et Thomas 2008). Des moules d'eau douce collectées à l'arrivée d'un lac où se pratique des activités récréatives présentaient des niveaux en EHMC allant jusqu'à 150 ng/g de lipides (Fent et al. 2009b). Dans notre étude, les concentrations maximales ont été retrouvées dans les moules provenant de plages et les concentrations les plus faibles ont été retrouvées pour les moules provenant d'un récif à distance de plage. Ces données étaient attendues dans la mesure où les baigneurs s'enduisent de filtres solaires peu de temps avant de se baigner. La faible contamination des moules du récif indique que bien que les plages soient une source de contamination des moules par les filtres UV, cette contamination reste localisée autour du site de baignade. Les activités de baignade réalisées sur les plages semblent avoir un impact plus important que les activités de plaisance pour lesquelles nous supposons un apport de filtres UV par les eaux de lavage des habitants des bateaux et de leur linge. En effet, les concentrations retrouvées dans le port de plaisance sont inférieures à celle retrouvée sur la plage du même site côtier.

Les variations de contamination sont étudiées sur les plages méditerranéennes afin de s'affranchir de l'utilisation de deux espèces différentes. Les concentrations détectées dans les moules de plages méditerranéennes sont liées à la fréquentation des sites d'activités récréatives avec des concentrations plus élevées en juillet et août. Les concentrations en filtres UV sont corrélées avec la température de l'air ( $p < 0,05$ ) et de manière non significative avec la population des villes dont

dépendent les sites de prélèvement. Les concentrations maximales ont été détectées pour des sites protégés et pour des moules prélevées à de faibles profondeurs. Un site protégé implique un mélange de l'eau et une dilution plus limitée, et donc, pour une dose initiale équivalente, une concentration dans l'eau plus importante que dans des sites ouverts. La profondeur de prélèvement pourrait aussi avoir un lien avec la contamination des moules : les filtres UV dont l'EHMC ont été détectés dans la microcouche de surface en mer (Goksoyr et al. 2009) or, pour les HAP, il a été montré que la microcouche de surface pouvait être une fraction aisément biodisponible pour les moules (Baumard et al. 1998; Naes et al. 1995). Il est donc possible que les niveaux plus importants dans les moules prélevées près de la surface soient dus à une accumulation de filtres UV à partir de la microcouche de surface.

Le profil de contamination en EHMC et en OC des moules prélevées sur les plages rappelle les résultats présentés par Langford et Thomas (2008) dans l'eau de mer de sites d'activités récréatives. Les concentrations détectées en été dans les eaux sont très importantes dans les zones de baignade et décroissent rapidement avec la distance par rapport à la source : les niveaux de contamination d'eau de plage atteignant 389,9 ng/l pour l'EHMC et 7 301,0 ng/l pour l'OC (Langford et Thomas 2008). Il semble donc qu'en milieu côtier, la principale source de filtres UV pour les organismes soit les activités récréatives. Ce profil serait différents de celui des rivières ou des lacs, où les activités récréatives sont une source minoritaire au regard des rejets de STEP (Buser et al. 2006; Fent et al. 2009b).

## **IV.2. Influence des rejets de STEP sur la contamination des moules par les filtres UV en milieu côtier**

En milieu côtier, les moules exposées au niveau des rejets de STEP n'ont pas présenté de niveaux quantifiables en filtres UV. Les filtres UV sont retrouvés de façon ubiquitaire dans les effluents de STEP avec cependant des concentrations soumises aux usages, soit des concentrations plus élevées en période estivale. L'EHMC a été retrouvé dans les effluents de la station d'épuration A à une concentration de 25 ng/l en mai (résultats non présentés). La mise en place de cages de moules a eu lieu en novembre-décembre pour les rejets de la station B, et pour le site d'arrivée de l'Huveaune. Pour le site de rejet de la station A, les moules ont été exposées en septembre-octobre en 2004 avant la mise en place du rejet, et en juin-juillet en 2007.

L'EHMC et l'OC sont présents à des concentrations très importantes en entrée de station d'épuration, jusqu'à 20 070 ng/l et 12 000 ng/l respectivement (Balmer et al. 2005; Kupper et al. 2006), reflétant leur très large utilisation. Ces substances sont bien éliminées avec des coefficients

d'abattement pouvant être supérieurs à 99% (Balmer et al. 2005), entraînant des concentrations dans les effluents de l'ordre de la dizaine à la centaine de ng/l (Balmer et al. 2005; Kupper et al. 2006; Li et al. 2007). Cette différence de concentrations entre l'entrée et la sortie des stations d'épuration met en évidence les différences de quantité de filtres UV apportées avec une introduction directe ou par des eaux préalablement traitées, les activités récréatives représentant alors la source majoritaire de filtres UV en période de baignade. Cette différence d'apport supposée explique en partie la différence de détection entre les moules exposées aux rejets de STEP et les moules des sites d'activité récréatives.

Toutefois, les poissons collectés dans des rivières recevant des rejets de STEP présentent des concentrations importantes en EHMC ou en OC allant jusqu'à 337 ng/g de lipides pour l'EHMC et 2 400 ng/g de lipides pour l'OC (Buser et al. 2006; Fent et al. 2009b). Les auteurs ont d'ailleurs établi que les rejets de STEP sont la source principale de contamination de ces organismes, cette source représentant un apport continu de filtres UV. Dans des lacs recevant des rejets de station d'épuration, l'EHMC et l'OC n'ont été détectés qu'une fois sur 8 sites (Balmer et al. 2005).

L'absence de contamination des moules exposées à des rejets de STEP, y compris contenant de l'EHMC, en milieu côtier s'explique par la forte dilution du milieu marin et l'efficacité de l'étude hydrodynamique préalables pour le choix des sites de rejet. En milieu côtier, comme dans les lacs, les rejets de STEP sont dilués très rapidement dans un vaste volume d'eau. Dans les rivières, en revanche, les effluents de STEP constituent parfois une forte proportion du débit : les poissons de rivière contenant des filtres UV ont été prélevés dans des cours d'eau dont la contribution des eaux usées traitées allait jusqu'à 56% (Buser et al. 2006; Fent et al. 2009b). Cette dilution beaucoup plus faible entraîne, pour un même apport continu de filtres UV, une exposition des organismes plus importante et des concentrations dans les organismes plus élevées (Buser et al. 2006; Fent et al. 2009b). La mise en place de nouvelles stations d'épuration d'une part et d'émissaires placés dans des zones choisies pour leur propriétés hydrodynamiques favorisant la dilution d'autre part, rendent les concentrations en filtres UV sans effet quantifiable dans les moules mises en cage pendant 2 mois au niveau des rejets.

### **IV.3. Accumulation des filtres UV dans les moules en milieu côtier ?**

Le comportement de bioaccumulation des moules à partir des filtres UV présents dans l'environnement est encore mal compris. A quelle vitesse les moules accumulent-elles les filtres UV ? Les concentrations mesurées dans les moules sont-elles le reflet d'une contamination longue ou au contraire des niveaux de contamination de la journée passée ? La présence de concentration très

importante en OC en été et son absence en hiver laissent penser que cette molécule est bien éliminée par les moules, toutefois, aucune cinétique n'est disponible. La contamination ubiquitaire des moules de zones d'activités récréatives en EHMC incite à s'interroger sur le devenir de ce filtre UV dans ces organismes. Les moules contiennent-elles toutes de l'EHMC parce qu'il est toujours présent dans l'environnement ou le stockent-elles. Si les moules peuvent stocker l'EHMC, dans quels organes s'accumule-t-il ? Pour une meilleure interprétation de ces données de terrain que ce soit les concentrations observées sur des moules pêchées dans des zones d'activité récréatives ou l'absence de filtre UV pour des moules mises en cage au niveau des émissaires, il est nécessaire de comprendre les cinétiques d'accumulation et de décontamination de ces filtres UV dans la moule.

# **Chapitre 4.** Exposition des moules aux filtres UV en conditions contrôlées



# I. Introduction

Des filtres UV ont été détectés dans tous les milieux aquatiques étudiés : lacs (Balmer et al. 2005), rivières (Buser et al. 2006; Fent et al. 2009b), littoral (Langford et Thomas 2008) et microcouches de surface dans l'Océan Pacifique (Goksoyr et al. 2009). Deux sources principales ont été mises en évidence : les rejets de STEP et les activités récréatives (Balmer et al. 2005; Fent et al. 2009b; Langford et Thomas 2008). Dans ces milieux, les filtres UV apparaissent comme biodisponibles pour les organismes. En effet, des filtres UV ont été retrouvés dans différentes espèces : cormorans, poissons et invertébrés jusqu'à des concentrations de 701 ng/g de lipides pour l'EHMC et de 2 400 ng/g de lipides pour l'OC (Balmer et al. 2005; Buser et al. 2006; Fent et al. 2009b). Les profils de contamination des filtres UV dans les organismes ne sont pas les mêmes suivant les milieux. Par exemple, en Suisse, dans des poissons de lac, l'OC et l'EHMC ne sont que rarement détectés (Balmer et al. 2005) tandis qu'ils sont fréquemment retrouvés dans des poissons de rivière (Buser et al. 2006; Fent et al. 2009b). Les concentrations en EHMC observées dans des moules prélevées sur le littoral le long de plages françaises augmentent en période estivale (Chapitre 3). Cette augmentation a également été mise en évidence dans des moules d'eau douce prélevées en Suisse (Fent et al. 2009b). Ces variations n'ont, en revanche, pas été observées chez les poissons (Fent et al. 2009b). Une seule étude propose des facteurs de bioaccumulation pour l'EHMC Fent et al. (2009b) ont calculé des BCF pour l'EHMC à partir des concentrations mesurées dans l'environnement de 167 à 1 500, avec une moyenne à 762. Par ailleurs, des facteurs de biomagnification ont été calculés pour 3 espèces de poissons ; ils vont de 0,6 à 1,5. Si la biomagnification n'est pas mise en évidence par ces calculs, les auteurs estiment tout de même que l'EHMC a une tendance à se biomagnifier (Fent et al. 2009b).

Malgré ces résultats d'études *in situ* qui montrent l'accumulation de certains filtres UV, à notre connaissance, aucune étude de la bioaccumulation de filtres UV en conditions contrôlées n'a été publiée. De telles études ont déjà été mises en place pour d'autres substances comme des HAP (Okay et al. 2000), des substances explosives (Rosen et Lotufo 2007), des médicaments (Paterson et Metcalfe 2008). Afin de mieux comprendre les phénomènes de bioaccumulation, les travaux étudient différents paramètres : l'accumulation et la décontamination étudiées par Rosen et Lotufo (2007) pour des substances explosives sur quelques heures ; la répartition entre les organes comme (Le Bris et Pouliquen 2004) qui s'intéressent à la répartition de deux antibiotiques dans les branchies, le manteau, la glande digestive et la coquille. Les modes d'exposition des moules sont aussi à prendre en compte. Si certains auteurs procèdent à une exposition par contamination de l'eau de culture des moules, d'autres auteurs utilisent du phytoplancton contaminé comme cela a été fait par Okay et al.

(2000) pour une exposition au benzo[a]pyrène. Ces derniers auteurs ont étudié l'influence de la concentration en algues sur son accumulation et ont montré que la bioaccumulation du benzo[a]pyrène dans des tissus de *M. edulis* augmentait avec une élévation de la concentration en algues.

L'objectif de cette étude est de comprendre, en laboratoire, les mécanismes responsables de l'accumulation de filtres UV observée *in situ*. Un protocole d'exposition des moules à l'EHMC par le phytoplancton a été développé en nous inspirant du travail de (Okay et al. 2000). Cette méthodologie a été choisie pour éviter les problèmes liés à l'instabilité de ces molécules en milieu aqueux. Avec ce protocole, nous avons étudié le comportement d'accumulation et d'épuration vis-à-vis de l'EHMC des moules sur 14 jours (7 jours d'exposition journalière par la nourriture et 7 jours avec apport de nourriture non contaminée). Pour savoir si une exposition à des niveaux de contamination différents a un effet sur les concentrations retrouvées dans les moules, une deuxième expérimentation a été réalisée sur 7 jours, avec 4 concentrations différentes d'EHMC dans la nourriture. Les résultats obtenus avec ces expérimentations nous ont amenés à nous questionner sur la biodisponibilité de l'EHMC au cours de la journée et sur son devenir dans les moules. Nous avons alors réalisé une expérimentation de bioaccumulation sur 48 heures, avec une mise à disposition de phytoplancton similaire aux précédentes, mais avec des mesures plus rapprochées dans le temps, et ceci pour l'EHMC et pour l'OC. Une dernière étude nous a permis d'analyser la répartition de l'EHMC dans les organes. Deux études supplémentaires sont présentées dans l'Annexe IV.

## II. Matériel et méthodes

### II.1. Conditions d'élevage de moules

Les moules de l'espèce *Mytilus galloprovincialis* utilisées pour les expériences en laboratoire proviennent d'une filière d'élevage de pleine mer située au large de Frontignan (34). Pour nos études, les individus sélectionnés sont calibrés entre 5 et 6 cm correspondant à un âge de 12 à 24 mois (Andral et al. 2004). Les moules, préalablement nettoyées et débarrassées des organismes présents sur leur coquille, sont placées dans des bacs en verre Duran® de 1,5 l : 6 moules sont placées par bac (Photographie 16). Les bacs sont remplis d'1 l d'eau de mer pompée dans un canal entre l'étang de Thau et la mer, à Sète, filtrée sur filtres en fibres de verre GF/F (Whatman®) de diamètre 150 mm. L'eau de mer est changée tous les jours. Les moules sont nourries quotidiennement avec une suspension de *Tetraselmis suecica* fourni par Greensea (Mèze, France) à 100 000 000 cellules/ml afin d'obtenir une concentration de 50 000 cellules/ml dans les bacs. Les bacs sont aérés en continu (50 l/h) par des pipettes pasteur reliées à des bulleurs Rena Air 50. Lors du changement d'eau, les bacs sont essuyés et rincés avec 100 ml d'eau de mer filtrée afin de limiter le développement de biofilm sur les parois des bacs, avant de les remplir à nouveau. La température de la pièce est maintenue entre 16 et 20°C avec de l'eau de mer à une température comprise entre 18 et 20°C. Un rythme nycthéméral de 14 h de jour et 10 h de nuit est imposé.



**Photographie 16. Expérimentation de**

#### **bioaccumulation en laboratoire**

L'ensemble du matériel utilisé pour les expérimentations d'exposition est en verre afin d'éviter l'adsorption des substances sur les matières plastiques. Toute la verrerie est rincée à l'acétone et à l'eau distillée avant utilisation, et quand cela est possible, passée au four à 400°C.

Les moules sont acclimatées au moins une semaine dans ces conditions avant de procéder aux expérimentations. Un bac (6 moules) constitue une unité expérimentale soit un échantillon. Des triplicats ont été réalisés dans 3 bacs différents.

## II.2. Conditions expérimentales

### II.2.1. Exposition des moules

Avant de procéder aux expérimentations, la stabilité de l'EHMC dans l'eau de mer a été étudiée dans nos conditions expérimentales, sans moules et sans phytoplancton. Une dissipation de 26% est observée en une heure, 77% en 24 h (Annexe II). Nous avons alors choisi de tester la méthode décrite par Okay et al. (2000), les moules ont été exposées aux filtres UV par le phytoplancton. Pour cela, nous avons mesuré la concentration en EHMC d'un mélange eau de mer et phytoplancton dopé pendant 24h ; la concentration en EHMC est stable 1 h après l'introduction dans l'eau de mer de phytoplancton dopé ; après 24h, il restait plus de 65% de l'EHMC introduit (Annexe II). Ces résultats nous ont amenés à exposer les moules par le phytoplancton.

Pour la préparation des suspensions utilisées dans l'expérimentation, la suspension commerciale de phytoplancton est diluée au 10<sup>ème</sup>, soit à une concentration de 10 000 000 cellules/ml. Un volume de 0,05 ml de solution de filtre UV dans l'éthanol (préparée juste avant la mise en place de l'expérimentation) est ajouté pour 5 ml de suspension de phytoplancton à doper (soit 1 % d'éthanol). La suspension de phytoplancton dopé est maintenue au réfrigérateur, sous agitation magnétique, pendant 24 h avant utilisation. Les concentrations des solutions de dopage sont adaptées aux dopages souhaités. Pour les moules témoins, du phytoplancton témoin était préparé en remplaçant la solution de dopage par de l'éthanol. Ensuite, 5 ml de la suspension de phytoplancton, dopé ou témoin, sont ajoutés dans chaque bac contenant les moules.

### II.2.2. Expérimentations

#### *Exposition une semaine à 1 µg/bac/jour d'EHMC suivi par une semaine de décontamination*

La cinétique a été étudiée avec des moules exposées à 1 µg/bac/jour d'EHMC par le phytoplancton pendant une semaine, puis en conditions de décontamination pendant une semaine ; en parallèle, des moules témoins ont été exposées à de l'éthanol seul. Des prélèvements de 3 bacs de moules exposées et d'1 bac de moules témoins ont été effectués à t = 0, au bout de 1, 3 et 7 jours d'exposition et de 1, 3 et 7 jours de décontamination. Tous les prélèvements sont réalisés 24 h après l'ajout du phytoplancton. L'exposition réelle des moules a été contrôlée par la mesure de la concentration en filtres UV dans le mélange eau et phytoplancton à 3 dates d'expositions différentes : 2 analyses ont été réalisées dans des bacs contaminés et dans des bacs témoins avant le changement d'eau et 2 analyses ont été effectuées dans des bacs contaminés et dans des bacs témoins au moment du dopage. La consommation du phytoplancton a été évaluée par la mesure de la chlorophylle *a* et

des phéopigments au moment de l'introduction de phytoplancton dans les bacs et après 24 h à 3 dates différentes ; 2 mesures ont été réalisées à chaque fois.

### *Influence des niveaux d'exposition de l'EHMC*

L'influence du niveau de contamination sur l'accumulation a été étudiée avec des moules exposées pendant une semaine. En plus des témoins, 3 concentrations d'EHMC ont été testées dans le phytoplancton : 1, 10 et 50 µg/bac/jour. 3 lots de 6 moules ont été analysées avant le début de l'expérience et 3 bacs de 6 moules ont été analysés pour chaque concentration. L'exposition réelle des moules a été contrôlée par la mesure de la concentration en filtres UV dans le mélange eau et phytoplancton ainsi que la consommation de phytoplancton comme cela est décrit dans le paragraphe précédent

### *Accumulation de l'EHMC et de l'OC sur 48h*

L'étude de l'accumulation de filtres UV dans les moules a été étudiée sur 48 h pour permettre des prélèvements plus rapprochés. Les conditions de renouvellement d'eau et d'ajout de phytoplancton sont restées identiques par rapport aux expériences précédentes (chaque jour). 3 lots de 6 moules ont été échantillonnées avant le début de l'exposition puis 3 bacs de 6 moules ont été analysés à 1 h, 6 h, 24 h (avant le changement d'eau), à 25 h, 31 h et enfin 48 h. 3 expérimentations ont été menées successivement : des moules ont été exposées à de l'éthanol non contaminé, à de l'OC à 10 µg/bac/jour d'OC et à de l'EHMC à 10 µg/bac/jour. La concentration dans les bacs a été vérifiée au moment du dopage pour chaque expérimentation (n = 4). Des BAF ont été calculés pour cette expérience en divisant la concentration dans les moules en µg/kg de poids frais (pf) par la concentration mesurée dans l'eau brute en µg/l (eau et phytoplancton).

### *Répartition de l'EHMC dans les organes*

L'étude de la répartition de l'EHMC dans les organes a été réalisée avec 4 lots de 40 moules, chaque lot étant maintenu dans un aquarium rempli avec 10 litres d'eau de mer. Dans cette seule expérimentation, la contamination a été réalisée directement dans l'eau, chaque jour. Dans 2 aquariums, l'EHMC a été ajouté en solution éthanolique pour atteindre une concentration théorique de 100 µg/l et dans les 2 autres aquariums de l'éthanol seul a été ajouté. De la nourriture non contaminée (*T. suecica* à 50 000 cellules/ml) a été apportée tous les jours. Au bout d'une semaine, les moules ont été prélevées. Les moules exposées ont été mélangées puis séparées en deux groupes : l'un pour l'analyse entière (20 moules), l'autre pour l'analyse des organes (60 moules). Le manteau, les branchies et les glandes digestives ont été séparés et conservés comme les échantillons de moules entières, avant analyse.

### **II.3. Traitement des échantillons de moules**

Pour chaque prélèvement, un tri est effectué pour ôter les moules mortes qui sont comptabilisées. Les moules sont grattées extérieurement pour éliminer le biofilm et les épibiontes présents sur la coquille en prévision de leur pesée, le byssus est ôté. Toutes les moules constituant un lot d'analyse sont pesées et mesurées. Le décoquillage est ensuite réalisé avec un scalpel en acier inoxydable rincé au solvant, en évitant d'endommager le mollusque avec la lame. La chair est mise à égoutter sur un papier absorbant. Le temps d'égouttage est de 30 min environ. Les mollusques sont ensuite stockés dans des sachets en polyéthylène à -20 °C avant d'être lyophilisés. Les moules sont lyophilisées avec un lyophilisateur Heto Power dry LL 3000, Thermo.

La masse de chair humide après égouttage est mesurée par pesée pour le lot d'individus calibrés, l'indice de condition du lot, correspondant à la masse de chair lyophilisée sur la masse de coquille sèche (Andral et al. 2004), est calculé. Pour cela, le sachet contenant les individus à caractériser est pesé avant congélation et après lyophilisation. Les coquilles correspondantes sont pesées après un séchage de 48 h à l'étuve à 60°C.

La dissection des moules est réalisée, après décoquillage, avec un scalpel et des ciseaux en acier inoxydable rincés au solvant. Le manteau est coupé, puis les branchies, enfin les glandes digestives ont été récoltées, le reste de la moule a été éliminé. Les organes sont mis à égoutter séparément sur du papier absorbant. Le temps d'égouttage est de 30 min environ. Les différents organes sont ensuite placés dans des sachets en polyéthylène, pesés puis stockés à -20 °C avant d'être lyophilisés.

### **II.4. Méthodes d'analyse**

#### **II.4.1. Analyse des filtres UV**

La méthode d'analyse des filtres UV dans les moules lyophilisées et la méthode d'analyse des filtres UV dans l'eau de mer filtrée contenant du phytoplancton sont présentées dans le chapitre 2.

#### **II.4.2. Analyse de la chlorophylle *a* et des phéopigments**

L'analyse de la chlorophylle *a* et des phéopigments est réalisé dans les suspensions homogénéisées. 100 ml sont prélevés et filtrés sur filtres GF/F (Whatman) de 47 mm de diamètre. Les filtres sont conservés dans des tubes en verre hermétiques de 15 à 20 ml à -20°C pendant un mois maximum, protégés de la lumière avec de l'aluminium. Pour l'extraction de la chlorophylle *a* et des phéopigments, 10 ml d'acétone 90 % sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont

homogénéisés au vortex pendant 1 minute, puis les filtres sont broyés à l'aide d'une tige en plastique. Le tout est réhomogénéisé pendant 1 min. L'extraction se déroule au frais et dans l'obscurité pendant 6 heures au minimum et 36 h au maximum. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3 000 rpm pendant 10 min. 6 ml de surnageant sont prélevés et placés dans une cuve adaptée au spectrophotomètre, l'absorbance est lue à 665 et 750 nm. Les concentrations en chlorophylle *a* et phéopigments sont ensuite calculées à partir des gammes d'étalonnage.

## II.5. Statistiques

Le test de Student a été utilisé pour comparer les valeurs moyennes des résultats au cours des expérimentations d'exposition. Ce test a permis de comparer deux à deux les concentrations successives au cours des expérimentations. La différence significative est notée aux seuils de  $p < 0,10$  et  $p < 0,05$ .

## III. Résultats

### III.1. Suivi des expérimentations

Pour un apport de nourriture de 50 000 cellules/ml de *T. suecica* et quelles que soient les conditions d'élevage, au bout de 24h, la chlorophylle *a* et les phéopigments sont à une concentration totale inférieure à 5  $\mu\text{g/l}$  alors que la concentration initiale était de  $95,6 \pm 23,9 \mu\text{g/l}$  pour la chlorophylle *a* et de  $50,6 \pm 14,7 \mu\text{g/l}$  pour les phéopigments. On peut donc estimer que la consommation du phytoplancton est pratiquement totale. On peut estimer que les moules ont été exposées à une grande partie des filtres UV contenus par le phytoplancton. Cependant les quantités émises dans les pseudo-fèces n'ont pas été évaluées.

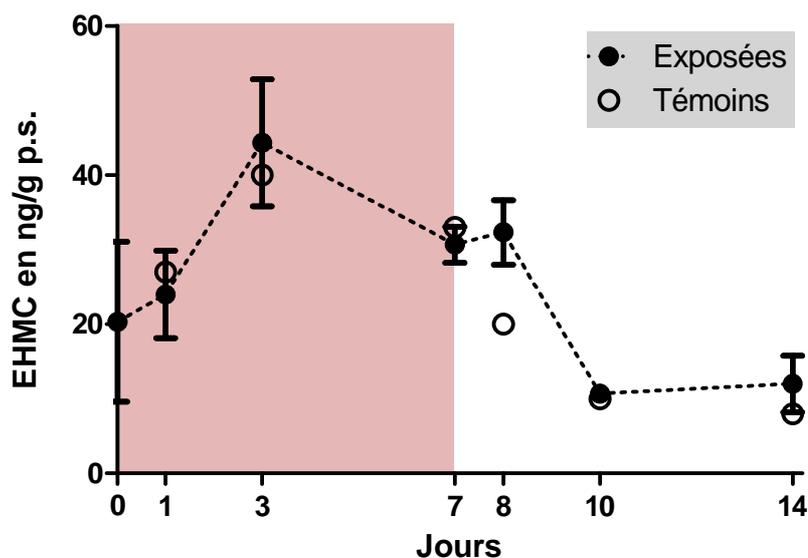
Les concentrations d'exposition des moules mesurées sont présentées dans le Tableau 28. Après 24h, les concentrations de filtres UV dans les bacs n'étaient plus quantifiables, c'est à dire inférieures à 0,1  $\mu\text{g/bac}$ . Les concentrations de filtres UV dans les bacs des lots témoins n'ont jamais été quantifiables. Le Tableau 28 présente également les concentrations d'exposition rapportées à la masse de moules par le bac en masse sèche.

**Tableau 28. Concentrations théoriques et concentrations réelles d'exposition des moules aux filtres UV lors des expérimentations**

	Concentration d'exposition théorique en ng/bac	Concentration d'exposition (n = 4)	
		Dans l'eau en ng/bac	Rapportée à la masse de moule en ng/g de moule ps
EHMC - Cinétique sur 2 semaines	1	0,84 ± 0,08	470
EHMC - Influence des concentrations	1	0,88 ± 0,16	260
	10	8,32 ± 1,27	2 440
	50	61,94 ± 5,85	18 150
OC – Exposition sur 48 h	10	11,58 ± 1,34	4 210
EHMC – Exposition sur 48 h	10	11,92 ± 0,32	3 660

### **III.2. Exposition d'une semaine à 1 µg/bac/jour d'EHMC suivie par une semaine de décontamination**

Au cours de l'expérience de cinétique sur 2 semaines (Figure 22), la concentration d'exposition mesurée est de  $0,84 \pm 0,08$  µg/bac/jour d'EHMC pour les moules exposées pendant 7 jours et inférieure à 0,1 µg/bac (LQ) pour les moules témoins (concentrations d'EHMC non quantifiables). L'indice de condition des moules est équivalent pour tous les lots, avec une moyenne à  $0,062 \pm 0,009$  (n = 27). Les moules contiennent  $5,2 \pm 0,7$  % de lipides (n = 27). L'EHMC est détecté dans tous les échantillons : au début de l'expérimentation avant toute exposition, les moules contenaient 20 ng/g ps d'EHMC (Figure 24). Au cours de cette expérience, la concentration en EHMC dans les moules a augmenté pour atteindre un maximum après trois jours d'exposition à  $44 \pm 15$  ng/g ps (différences significatives entre J1 et J3,  $p < 0,1$ ) et entre J3 et J7,  $p < 0,05$ ). Puis la concentration a décliné avec une concentration minimale dans les moules après 3 jours de décontamination à  $10 \pm 1$  ng/g ps (différence significative entre J7 et J10,  $p < 0,05$ ). Les concentrations observées dans les moules témoins et dans les moules exposées ne sont pas différentes.



**Figure 24.** Concentrations en EHMC dans les moules (moyenne et écart-type, n = 3) lors de l'étude de la cinétique d'accumulation et d'élimination dans les moules à 1 µg/bac/jour d'EHMC, la période d'exposition est en rose, la période d'épuration non

### III.3. Influence des niveaux d'exposition de l'EHMC

Au cours de l'expérience d'accumulation à différentes doses (Figure 25), les moules ont été exposées à  $0,88 \pm 0,16$  ;  $8,32 \pm 1,27$  ou  $61,94 \pm 5,85$  µg/bac/jour (Figure 25). Les moules témoins ont été exposées à des concentrations inférieures à la LQ. Après 24 h, les concentrations dans les bacs ont toujours été inférieures à la LQ. L'indice de condition des moules est équivalent pour tous les lots avec une moyenne de  $0,093 \pm 0,013$  (n = 15). La teneur en lipides des moules est de  $7,8 \pm 0,7$  % (n = 15) du poids sec pour l'ensemble de l'expérience. Les moules contiennent  $7 \pm 6$  ng/g ps d'EHMC avant l'exposition en laboratoire. Après une semaine d'exposition, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les niveaux de contamination des moules non exposées ou exposées à 1, 10 ou 50 µg/bac/jour. l'EHMC dans les moules a été retrouvé à des concentrations allant de 14 à 39 ng/g ps. Ces concentrations sont toutes significativement différentes des concentrations dans les moules au début de l'expérience ( $p < 0,1$ ).



**Figure 25.** Concentrations en EHMC dans les moules (moyenne et écart-type, n = 3) au cours de l'étude de la relation accumulation-dose de l'accumulation de l'EHMC pendant 1 semaine

### III.4. Accumulation de l'EHMC et de l'OC sur 48h

Dans l'expérimentation pour étudier les niveaux de filtres UV au cours de 48h, les moules ont été exposées à  $11,92 \pm 0,32$  µg/bac/jour pour l'EHMC et à  $11,58 \pm 1,34$  µg/bac/jour pour l'OC. Les concentrations en EHMC et en OC dans les bacs témoins n'étaient pas détectables, soit inférieures à 0,02 µg/l. Les lots de moules contiennent respectivement  $7,4 \pm 1,1$  % (n = 21),  $7,2 \pm 1,0$  % (n = 21) et  $6,4 \pm 0,6$  % (n = 21) de lipides pour les moules témoins, les moules exposées à l'EHMC et celles exposées à l'OC, respectivement. Les indices de conditions des moules témoins sont de  $0,079 \pm 0,011$  (n = 21), ceux des moules exposées à l'EHMC de  $0,074 \pm 0,026$  (n = 21) et ceux des moules exposées à l'OC de  $0,077 \pm 0,007$  (n = 21). Il n'y a pas de variation significative des indices de condition au cours de l'expérience. Les moules témoins contiennent des concentrations en EHMC inférieures à la limite de quantification, soit inférieures à 5 ng/g ps. Les concentrations en EHMC dans les moules exposées, présentées dans la Figure 26, sont maximales au bout d'une heure d'exposition : de 138 ng/g à 1 h et 107 ng/g à 25 h. Elles décroissent ensuite fortement pour atteindre 25 ng/g au bout de 24 h et 38 ng/g au bout de 48 h. La variabilité des concentrations au sein des triplicats est faible au bout d'une heure d'exposition, le coefficient de variation est inférieur à 11 % à 1 h et 25 h. Elle est beaucoup plus importante au cours de la décroissance : le coefficient de variation est toujours supérieur à 40 %.

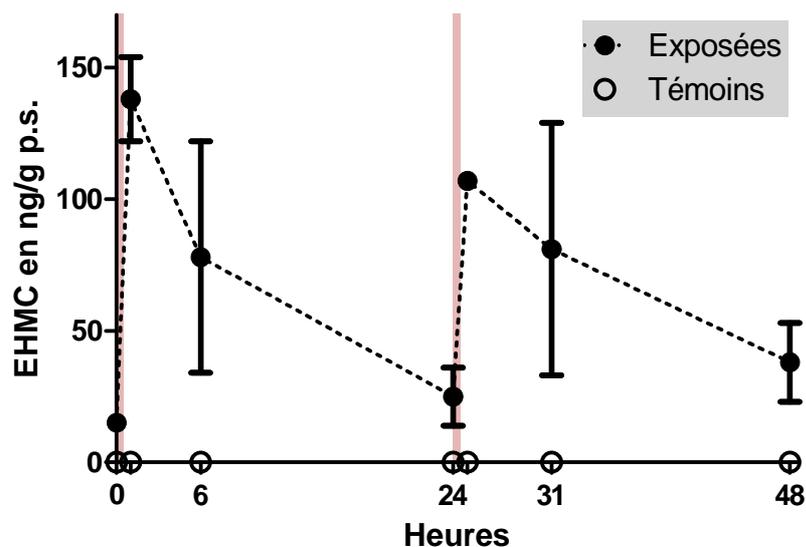


Figure 26. Concentrations en EHMC dans les moules (moyenne et écart-type, n = 3) lors de l'étude du comportement de l'EHMC à 10 µg/bac/jour sur 48 h, les apports de phytoplancton dopé sont en rose

Les concentrations en OC dans les moules témoins ne sont pas détectables, soit inférieures à 2 ng/g ps. Les concentrations en OC dans les moules exposées, présentées dans la Figure 27, sont maximales au bout d'une heure d'exposition : de 849 ng/g à 1 h et 1 179 ng/g à 25 h. Elles décroissent ensuite fortement pour atteindre 33 ng/g au bout de 24 h et 60 ng/g au bout de 48 h. La variabilité entre les bacs est faible : l'écart-type entre les valeurs représente toujours moins de 13 % de la moyenne.

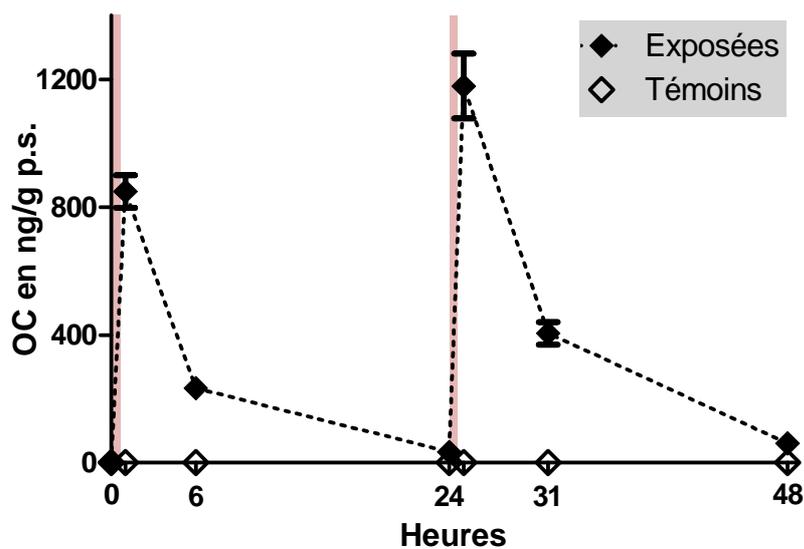


Figure 27. Concentrations en OC dans les moules (moyenne et écart-type, n = 3) lors de l'étude du comportement de l'OC à 10 µg/bac/jour sur 48 h, les apports de phytoplancton dopé sont en rose

Pour les expérimentations d'exposition à court terme, les calculs de BAF ont été faits à 1 h et à 25 h, pour l'OC et pour l'EHMC. Les BAF obtenus pour l'EHMC sont 1,7 l/kg et 1,5 l/kg à 1 h et 25 h, respectivement ; pour l'OC, les BAF sont 11,0 l/kg et 15,5 l/kg à 1 h et 25 h, respectivement.

### III.5. Répartition de l'EHMC dans les organes

Dans la dernière expérience, nous avons d'abord étudié les concentrations d'EHMC dans les moules entières. Les moules témoins qui n'ont pas été exposées présentent une concentration en EHMC de 32 ng/g ps (Tableau 29). Les moules exposées par voie aqueuse présentent une concentration de 459 ng/g ps d'EHMC.

**Tableau 29. Concentrations en EHMC en ng/g ps dans les organes (n = 1) (branchies, glandes digestives et manteaux) de moules**

	<b>Organes</b>	<b>Concentration en EHMC en ng/g ps</b>
	<i>Moules entières</i>	32
<b>Moules faiblement contaminées</b>	Branchies	20
	Glandes digestives	11
	Manteaux	6
	<i>Moules entières</i>	459
<b>Moules fortement contaminées</b>	Branchies	73
	Glandes digestives	9
	Manteaux	19

Dans les deux cas, les branchies sont les organes les plus contaminés, au moins deux fois plus que les autres organes étudiés, les glandes digestives et le manteau (Tableau 29). Pour les moules fortement contaminées, la somme des concentrations dans les organes ne correspond pas à la concentration dans la moule entière. Ces analyses sont à confirmer, elles n'ont pas été répétées.

## IV. Discussion

A notre connaissance, aucune donnée n'est disponible sur les processus de bioaccumulation de filtres UV dans des organismes marins dont *M. galloprovincialis*. L'étude présentée dans ce chapitre a permis d'obtenir les premières données sur le devenir dans *M. galloprovincialis* d'écrans UV, soit l'EHMC et l'OC, après exposition à du phytoplancton dopé ou à de l'eau dopée pour l'étude de la répartition entre organes.

L'étude de la cinétique d'accumulation de l'EHMC dans les moules sur une semaine à 1 µg/bac, correspondant à une exposition de 470 ng/g ps de moules suivie d'une semaine d'élimination a montré une augmentation des concentrations durant l'exposition partant de 20 ng/g ps avec un maximum à 3 jours à  $44 \pm 15$  ng/g ps suivie d'une diminution pour atteindre 12 ng/g ps à 14 jours. Cette expérimentation met en évidence que la concentration d'EHMC dans les moules varie en fonction de l'exposition. Toutefois, les moules sont faiblement contaminées en début d'expérimentation. L'expérimentation réalisée sur 7 jours à des concentrations allant jusqu'à 50 µg par bac, ce qui correspond à une exposition par 18 150 ng/g ps d'EHMC, entraîne une augmentation des concentrations pour toutes les expositions mais sans relation de proportionnalité entre exposition et accumulation.

Les concentrations dans les bacs n'ont pas excédé les limites de quantification de l'EHMC dans l'eau à 0,1 µg/l (ce qui correspond à une exposition de 40 ng/g ps de moule), et les concentrations dans les bacs des moules exposées à 1, 5 ou 50 µg/l sont significativement différentes ( $p < 0,05$ ) (Tableau 28).

Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer les niveaux relativement bas et équivalents dans toutes les moules après une semaine d'expérimentation : soit les moules consomment tout le phytoplancton contaminé dans la première heure et l'éliminent très rapidement (excrétion et/ou métabolisation), lissant les différences de concentrations en n'exprimant qu'un niveau basal dans les moules au bout de 24 h ; soit l'ensemble de l'EHMC proposé n'est pas biodisponible et est dégradée dans l'eau. En effet, Rodil et al. (2009a) ont montré que l'EHMC était rapidement dégradé en milieu aqueux. Cette dernière hypothèse est peu probable, car les tests de stabilité de l'EHMC fixé au le phytoplancton ont montrés le maintien de plus de 60% de l'EHMC après 24h (Annexe II). De plus, nous avons estimé qu'une partie non négligeable du phytoplancton a été consommé, impliquant que les moules ont été exposées à l'EHMC. Dans ces conditions, l'hypothèse la plus probable est que les moules exposées à l'EHMC l'éliminent rapidement. Les

expérimentations à court terme ont pour objectif de valider cette hypothèse et d'apporter des informations sur le comportement de l'EHMC au cours des 24 h suivant l'apport de contaminants.

#### **IV.1. Exposition à court terme de moules à l'EHMC et à l'OC**

Le suivi de l'exposition des moules à l'EHMC et à l'OC sur 48 h a mis en évidence deux phases : dans un premier temps, les moules absorbent le filtre UV à partir du phytoplancton, puis dans un deuxième temps, le filtre UV est éliminé et/ou métabolisé. La phase d'absorption est rapide, avec un maximum de concentration à 1 h pour l'EHMC et pour l'OC, suivi d'une décontamination rapide pour atteindre un niveau de 25 ng/g ps d'EHMC ou 33 ng/g ps d'OC. Le même phénomène se répète après une seconde exposition. Ces expérimentations confirment l'hypothèse d'une élimination rapide de l'EHMC par les moules et montrent que l'OC semble avoir un comportement similaire.

Les concentrations maximales de filtres UV dans les moules sont supérieures d'un facteur 10 pour l'OC par rapport à l'EHMC pour des concentrations d'exposition identiques (Tableau 28) : la concentration maximale en OC est de 1 179 ng/g ps alors qu'elle est de 138 ng/g ps pour l'EHMC. Cette différence pourrait s'expliquer par une plus forte vitesse de métabolisation de l'EHMC par rapport à l'OC qui est favorisée par la différence de leurs log de  $K_{ow}$  (6,9 pour l'OC et 5,8 pour l'EHMC). Après 24 h, les niveaux des deux filtres UV dans les moules sont similaires : entre 25 et 38 ng/g ps pour l'EHMC et entre 33 et 60 ng/g ps pour l'OC.

Des cinétiques d'élimination rapides pour des contaminants organiques dans les moules ont déjà été mises en évidence pour d'autres substances. Après une exposition de 5 jours au lindane en laboratoire, des moules d'eau douce l'éliminent en deux phases : une première élimination rapide qui a lieu en moins de 12 h et entraîne un quasi-retour aux conditions initiales (Berny et al. 2002), suivie d'une seconde phase où le résidu de lindane est éliminé lentement ( $1/2$  vie terminale comprise entre 20 et >168 h). De même pour des composés explosifs dans *M. galloprovincialis* (2,4,6-trinitrotoluène (TNT), hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX), et octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX)), les taux d'élimination sont élevés et les demi-vies d'élimination inférieures à 0,5 h pour tous les composés, les niveaux de TNT et de RDX n'étant plus détectables dans les moules après 6 h et les niveaux de HMX après 18 h (Rosen et Lotufo 2007). Dans les moules, le lindane n'est que peu bioaccumulable (Berny et al. 2002) et les composés explosifs ne sont pas bioaccumulables (Rosen et Lotufo 2007). Ce phénomène de décroissance rapide dans les heures qui suivent l'arrêt de l'apport de contaminant peut être dû à la désorption de polluants faiblement liés, à la défécation des matières non assimilées (pseudo-fèces) ou à la libération de composés non métabolisés (Morrison et al. 1995). Les niveaux d'EHMC et d'OC dans les moules au bout de 24 h

sont similaires à ceux retrouvés pour le lindane après 24 h : 31 ng/g (Berny et al. 2002). Les auteurs suggèrent que l'élimination se ferait en deux phases : une rapide que nous avons observée, suivie d'une plus lente qui serait due à une désorption à partir des lipides et à une métabolisation des substances stockées (Morrison et al. 1995). Ce type d'élimination biphasique avait déjà été suggérée par Gossiaux et al. (1996). L'étude de l'épuration des moules sur un temps plus long permettrait de vérifier l'hypothèse d'une élimination biphasique pour l'EHMC et pour l'OC.

L'exposition des moules par du phytoplancton entièrement consommé dans les 24 h, induit une décroissance rapide observée pour les deux filtres UV ; elle peut être due à une élimination des substances sous forme inchangée dans les pseudo-fèces, à leur métabolisation ou à une combinaison des deux processus. Le contaminant lié au phytoplancton est amené des branchies vers la bouche par les palpes labiaux pour atteindre le système digestif (estomac, intestins, foie) où il pourrait être métabolisé. L'absence de filtres UV dans l'eau après 24 h plaide pour une métabolisation et non pour une simple décontamination. L'étude de la répartition dans les organes pourrait permettre de valider cette hypothèse.

## **IV.2. Répartition de l'EHMC dans les organes**

La concentration en EHMC dans les moules entières après une exposition par l'eau a été de 459 ng/g ps ; c'est la plus importante concentration de toutes celles qui ont été mesurées au cours de ce travail. Pour une exposition par l'eau, l'EHMC est majoritairement retrouvé dans les branchies des moules. Les branchies sont les premières surfaces d'échange avec l'eau, elles servent de filtre aux moules, ce n'est classiquement pas une zone de stockage. La concentration majoritaire de l'EHMC dans les branchies par rapport aux glandes digestives et au manteau, laisse supposer que l'EHMC est adsorbée sur la première surface organique qu'il rencontre. La répartition de l'EHMC dans les organes a été étudiée après une exposition des moules par l'eau, les voies d'entrée dans l'organisme ne sont pas les mêmes que pour une exposition par le phytoplancton : dans le cas d'une exposition par le phytoplancton, celui-ci serait fixé par les branchies, puis amené vers le système digestif alors que pour une exposition par l'eau le contact se fait directement au niveau des branchies. La concentration bien supérieure mesurée après une exposition par l'eau pourrait être due au fait que la molécule restant fixée au niveau des branchies ne passe pas par les glandes digestives et n'est donc pas métabolisée.

### IV.3. Facteur de bioaccumulation

(Mackay et Fraser 2000) propose l'utilisation d'un modèle simple empirique pour une première évaluation des facteurs de bioaccumulation d'un contaminant dans un organisme :  $BCF = 1 + L.K_{ow}$ , avec L la teneur en lipides de l'organisme. Appliqué aux deux filtres UV étudiés dans les moules (7% de lipides), le modèle donne une estimation de 531 005 pour l'OC et de 44 168 pour l'EHMC. Ces valeurs sont très supérieures aux niveaux mesurés dans notre étude. Elles doivent toutefois être nuancées : ce type de modèle considère que la fraction dans l'eau est entièrement biodisponible et ne prend que la teneur en lipides de l'organisme comme facteur biologique, négligeant la métabolisation, l'excrétion, la ponte, la croissance... Comme le suggère (Straub 2002a), il est probable que pour des substances dégradables comme l'EHMC, ces BCF soient surestimés.

Les facteurs de bioaccumulation calculés pour l'EHMC, de 1,7 au maximum, sont inférieurs à ceux calculés par Fent et al. (2009b) dans des conditions environnementales, compris entre 167 et 1500 avec une moyenne à 762, pour deux espèces de poissons d'eau douce. La différence d'espèces peut expliquer une partie des différences observées : les moules possèdent un métabolisme par CYP 450 10 fois inférieure à celui des poissons (Livingstone 1998), mais la biomagnification est plus importante chez les poissons plus élevés dans la chaîne trophique (Deudero et al. 2007). La teneur en lipides des organismes est également un paramètre qui influence sur les BCF (Mackay et Fraser 2000). Une deuxième explication quant à la différence dans ces BCF peut être la différence de la forme d'exposition par l'EHMC : dans l'étude en laboratoire, les moules ont été exposées par la phase particulaire tandis que les BCF calculés par Fent et al. (2009b) considèrent la concentration dans l'eau. Plusieurs théories s'opposent : classiquement la fraction biodisponible correspond majoritairement à la fraction dissoute (Mackay et Fraser 2000), cependant, le mode d'alimentation des moules, par filtration du phytoplancton et des particules de même taille, implique que les moules sont exposées à la fraction particulaire. Pour (Bruner et al. 1994), à une concentration faible, l'exposition de moules zébrées aux hexachlorobiphényles passent principalement par l'adsorption de sédiments (39%) puis d'algues contaminées (23%). Pour l'EHMC, les résultats obtenus dans ce travail associés à ceux de la littérature suggèrent que la fraction particulaire serait plus rapidement métabolisée que la fraction dissoute. La prise en compte de la fraction particulaire uniquement aurait alors pour conséquence de sous-estimer le BAF de la molécule en conditions environnementales.

## **IV.4. Comparaison avec les niveaux de contamination des moules dans l'environnement**

Les expériences d'exposition des moules à l'EHMC et à l'OC sur 48 h, montre la rapidité de variation des niveaux mesurés dans les moules en fonction de l'exposition. Cette réactivité des niveaux d'EHMC et d'OC dans les moules expliquerait la variabilité des concentrations environnementales. Sur les plages en période estivale, les moules sont exposées à des concentrations importantes de filtres UV (Langford et Thomas 2008), elles présentent alors des niveaux qui peuvent être très élevés jusqu'à 340 ng/g ps pour l'EHMC et 7 064 ng/g ps pour l'OC. En novembre, on suppose l'exposition très faible, les moules présentent des concentrations inférieures à 28 ng/g en EHMC et les concentrations en OC ne sont pas quantifiables (chapitre 3). Pour l'EHMC, ces concentrations sont de l'ordre de celles des moules après 24 h lors de l'expérimentation en laboratoire. Pour l'OC, cette absence de contamination plaide en faveur d'une deuxième phase d'élimination qui suivrait la première phase très rapide que nous avons observée en laboratoire. L'EHMC et l'OC ne s'accumulent pas à long terme dans les moules, en revanche les concentrations dans les moules semblent reflétées la contamination du milieu pour la période du prélèvement. Les moules pourraient être utilisées comme bioindicatrices d'une contamination par l'EHMC et l'OC localisées dans le temps et l'espace.



**Chapitre 5.** Concentrations de  
benzodiazépines dans les moules : en  
milieu marin et exposition en  
conditions contrôlées



## I. Introduction

Il a été mis en évidence que les médicaments psychotropes sont présents dans le milieu aquatique, depuis les effluents de stations d'épuration jusqu'aux poissons (Calisto et Esteves 2009; Metcalfe et al. 2010; Ramirez et al. 2009; Schultz et al. 2010). Les études récentes s'intéressant à ces substances, y compris dans les organismes, ont majoritairement porté sur les antidépresseurs et en particulier sur les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) avec la fluoxétine et sur les inhibiteurs de la recapture de la sérotonine et de la noradrénaline (IRSNa) avec la venlafaxine. Ainsi, la fluoxétine ( $\log K_{ow}$  de 4,05) a été retrouvée jusqu'à 80 ng/g pf dans des cerveaux de poissons (Ramirez et al. 2009), la sertraline ( $\log K_{ow}$  de 5,29), jusqu'à 545 ng/g pf dans des cerveaux de poissons (Ramirez et al. 2009) et la venlafaxine ( $\log K_{ow}$  de 3,28) jusqu'à 1,2 ng/g pf dans des poissons entiers. L'ensemble de ces études a porté sur des poissons d'eau douce, dans des eaux recevant des effluents de station d'épuration.

En parallèle de ces études *in situ*, des études d'accumulation ont été menées en conditions contrôlées pour la fluoxétine sur des poissons (*Oryzias latipes*) (Nakamura et al. 2008; Paterson et Metcalfe 2008). Pour une exposition de 7 jours à 0,64  $\mu\text{g}/\text{l}$  de fluoxétine, la concentration maximale mesurée dans les poissons se produit après trois jours d'absorption et atteint  $49,4 \pm 6,4$  ng/g de poids frais (Paterson et Metcalfe 2008), les facteurs de bioconcentration associés à ces expériences vont de 74 à 80. Cette étude met en évidence une dégradation de la fluoxétine en norfluoxétine dans les poissons : la décroissance des concentrations en fluoxétine est associée à une augmentation des concentrations en norfluoxétine. Par ailleurs, Nakamura et al. 2008 présentent des facteurs de bioconcentration de la fluoxétine pour les médakas juvéniles de 8,8, 30 et de 260 dans le corps des poissons pour des pH de 7, 8 et 9, respectivement, ces variations sont liées au pKa de la fluoxétine de 10,1.

L'ensemble de ces données *in situ* et en conditions contrôlées, met en évidence que certains médicaments, en particulier des psychotropes, peuvent être retrouvés dans les organismes aquatiques, en dépit de leur  $\log K_{ow}$  relativement modéré. En dehors des antidépresseurs. Le diazépam est le seul autre médicament psychotrope à avoir été recherché dans des organismes aquatiques ; une seule étude (Kwon et al. 2009) a détecté cette molécule à des concentrations atteignant 110 ng/g pf dans le foie de poissons marins pêchés près de zones de rejets de STEP. Le diazépam est un anxiolytique de la classe des benzodiazépines ; c'est le congénère de cette classe qui a fait l'objet du plus grand nombre de travaux dans les eaux. Il a été retrouvé dans les effluents de station d'épuration jusqu'à 660 ng/l (van der Ven et al. 2004) et dans des eaux de rivière recevant des eaux de STEP jusqu'à

880 ng/l (Ternes 2001). Aucune benzodiazépine n'a été recherchée dans le milieu marin en dehors de l'analyse des 10 poissons menée par Kwon et al. (2009).

Les benzodiazépines sont une classe de médicaments très proches structurellement et dont certains congénères sont les métabolites d'autres. Ainsi le diazépam est un métabolite du tétrazépam (Baumann et al. 2009), la benzodiazépine la plus consommée en kg en France. Une seule étude l'a recherché dans des eaux de rivières en Espagne où il n'a pas été détecté (González Alonso et al. 2010). L'objectif de cette étude est, dans un premier temps, d'évaluer la contamination d'organismes aquatiques en tétrazépam et en diazépam dans des zones recevant des effluents de station d'épuration. Pour cela, nous avons choisi de travailler sur un organisme bioconcentrateur fréquemment utilisé en biosurveillance (Andral et al. 2004) et aisément manipulable, la moule *Mytilus galloprovincialis*. Afin de s'affranchir des difficultés d'une collecte de moules sauvages, nous avons travaillé avec la technique d'exposition dans des cages sur les sites de rejet de deux stations d'épuration et sur un site d'arrivée d'une rivière transitoire traversant une grande agglomération méditerranéenne. Ces expositions ont été réalisées simultanément avec celles effectuées pour l'étude des filtres UV.

En parallèle, nous avons exposé des moules en conditions contrôlées au tétrazépam et au diazépam afin de mieux comprendre les mécanismes d'accumulation de ces deux médicaments psychotropes. Ces expérimentations visent également à apporter des explications aux concentrations retrouvées ou non dans les moules exposées aux rejets de STEP. Pour cela, trois expériences ont été menées : des moules ont été exposées à une benzodiazépine pendant une semaine puis laissées à décontaminer pendant une semaine. Ces études de cinétiques ont été réalisées à 10 µg/l de tétrazépam, à 2 µg/l de tétrazépam et à 10 µg/l de diazépam.

## **II. Matériel et méthodes**

### **II.1. Sites d'études de l'impact des rejets de station d'épuration**

#### **II.1.1. Emissaire de la station A**

La station d'épuration A a une capacité de 470 000 équivalent-habitants. Le traitement comprend des prétraitements physiques (dégrillage, dessablage, déshuilage) suivis d'un traitement secondaire par boues activées très forte charge et d'une biofiltration sur billes de polystyrène. Le débit moyen de la STEP est de 130 000 m<sup>3</sup>/jour. Les effluents de la station sont émis en mer par le biais d'un tuyau de 1,6 m de diamètre et de plus de 20 km de long qui est constitué d'un tronçon terrestre de 4,8 km, d'un tronçon lagunaire de 4,3 km, et d'un tronçon maritime de 11 km. L'extrémité de l'émissaire, située à 30 m de profondeur et à 11 km de la côte est dotée d'un diffuseur qui a pour effet de diluer les rejets sur une plus grande zone (Photographie 10). La mise en service date de novembre 2005. En septembre-octobre 2004, un lot de moules a été exposé deux mois sur le site d'arrivée du futur émissaire de la station d'épuration. En juin-juillet 2007, deux lots de moules ont été exposés pendant deux mois : un à l'est du rejet et un autre à l'ouest.

#### **II.1.2. Emissaire de la station B**

La STEP B est une station qui traite les eaux de 16 communes pour un volume de 1 800 000 équivalent-habitants. Les eaux sont traitées par un prétraitement (dégrillage, dessablage, déshuilage) ; elles passent ensuite dans une série de prédécanteurs et de décanteurs lamellaires, puis sont traitées par bio-filtration sur billes de Biostyrène™ immergées et flottantes. Cette station a été mise en service en février 2008. Auparavant, la STEP B datant de 1987 assurait le traitement de 1 300 000 équivalent- habitants. Cette installation ne possédait pas de traitement biologique. Le rejet de la station d'épuration B se fait par l'intermédiaire d'un émissaire ouvert sur la mer Méditerranée (Photographie 11).

Les campagnes de mise en place des cages de moules ont eu lieu en novembre 2006 et 2008 à partir de l'Europe, bateau océanographique côtier de l'IFREMER. Les moules ont été récupérées en décembre ou janvier suivant la mise à l'eau. Les prélèvements ont été effectués avant (2006) et après (2008) la mise en service de la nouvelle STEP B.

### **II.1.3. Site d'arrivée d'une rivière transitoire traversant une agglomération méditerranéenne : l'Huveaune (13)**

L'Huveaune est une rivière côtière du département des Bouches-du-Rhône de 48,4 km de long qui prend sa source dans le Massif de la Sainte-Baume, dans le vallon de Castelette et se jette à Marseille dans la Mer Méditerranée. L'Huveaune arrose un bassin versant de 373 km<sup>2</sup> comprenant la Haute Vallée de l'Huveaune en amont d'Aubagne, relativement rurale, et la Basse Vallée de l'Huveaune, d'Aubagne jusqu'à l'embouchure sur la Mer Méditerranée, marquée par une forte industrialisation. Elle traverse Aubagne, La Penne-sur-Huveaune et les quartiers Est et Sud de Marseille. Depuis 1986, la majeure partie du cours d'eau est déviée vers la station d'épuration des eaux de Marseille car il pollueait les plages de la ville situées à proximité de son embouchure. En cas de fortes précipitations, le trop plein d'eau du fleuve ne pouvant être absorbé par la station d'épuration est évacué par l'ancien lit naturel.

Les campagnes de mise en place des cages de moules ont eu lieu en novembre 2006 et 2007 à partir de l'Europe, bateau océanographique côtier de l'IFREMER au niveau du rejet naturel de l'Huveaune. Les moules ont été récupérées en décembre ou janvier suivant la mise à l'eau.

## **II.2. Exposition des moules en conditions contrôlées**

### **II.2.1. Conditions d'élevage des moules**

Les moules de l'espèce *Mytilus galloprovincialis* utilisées pour les expériences en laboratoire proviennent d'une filière d'élevage de pleine mer située au large de Frontignan (34). Pour nos études, les individus sélectionnés sont calibrés entre 5 et 6 cm correspondant à un âge de 12 à 24 mois (Andral et al. 2004). Les moules préalablement nettoyées et débarrassées des organismes présents sur leur coquille, sont placées dans des bacs en verre Duran® de 1,5 l : 6 moules sont placées par bac (Photographie 16). Les bacs sont remplis d'1 l d'eau de mer pompée dans un canal entre l'étang de Thau et la mer, à Sète, filtrée sur filtres en fibres de verre GF/F (Whatman®) de diamètre 150 mm. L'eau de mer est changée tous les jours. Les moules sont nourries quotidiennement avec une suspension de *Tetraselmis suecica* fourni par Greensea (Mèze, France) à 100 000 000 cellules/ml afin d'obtenir une concentration de 50 000 cellules/ml dans les bacs. Les bacs sont aérés en continu (50 l/h) par des pipettes pasteur reliées à des bulleurs Rena Air 50. Lors du changement d'eau, les bacs sont essuyés et rincés avec 100 ml d'eau de mer filtrée afin de limiter le développement de biofilm sur les parois des bacs, avant de les remplir à nouveau. La température de

la pièce est maintenue entre 16 et 20°C avec celle de l'eau de mer entre 18 et 20°C. Un rythme nyctéméral de 14 h de jour et 10 h de nuit est imposé.



**Photographie 17. Expérimentation de bioaccumulation en laboratoire**

Les moules sont acclimatées au moins une semaine dans ces conditions avant de procéder aux expérimentations. Un bac (6 moules) constitue une unité expérimentale soit un échantillon. Des triplicats ont été réalisés dans 3 bacs différents.

Le matériel utilisé pour les expérimentations d'exposition est en verre afin d'éviter l'adsorption des substances sur les matières plastiques. Toute la verrerie est rincée à l'acétone et à l'eau distillée avant utilisation, et quand cela est possible, passé au four à 400°C.

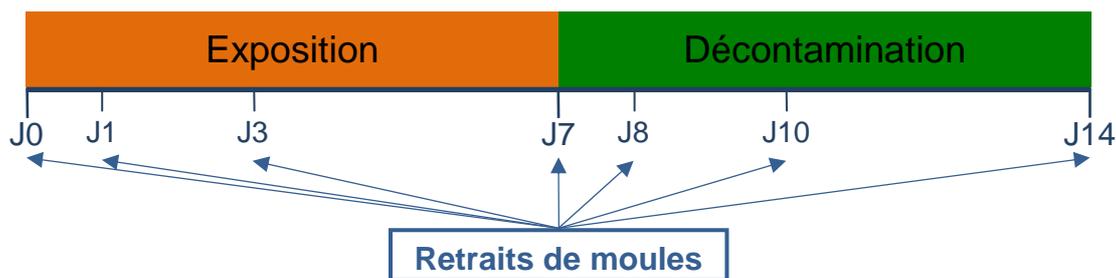
## **II.2.2. Conditions expérimentales**

### **II.2.2.1 Exposition des moules**

En l'absence de moules, les concentrations en diazépam et en tétrazépam dans l'eau sont stables. Nous n'avons pas constaté de baisse significative de la concentration de BDZ dans l'eau de mer après 24h à température ambiante (Annexe III). L'exposition des moules par les benzodiazépines est donc faite par l'eau de mer. 1 ml de solution dopante éthanolique est ajouté tous les jours dans les bacs, une fois l'eau changée et le phytoplancton ajouté (0,1 % d'éthanol). Pour les bacs témoins, la solution dopante éthanolique est remplacée par de l'éthanol.

### **II.2.2.2 Etude des cinétiques d'accumulation et de décontamination**

Trois études de cinétiques ont été réalisées avec à chaque fois une exposition pendant une semaine et une décontamination pendant une semaine (Figure 28) : une étude avec du **tétrazépam à 10 µg/l**, une étude avec du **tétrazépam à 2 µg/l** et une étude avec du **diazépam à 10 µg/l**. Le déroulement des expérimentations s'est fait de la même manière pour les 3 études : des moules ont été analysées au début des expérimentations (à  $t=0$ ), puis après 1 jour, 3 jours et 7 jours d'exposition et après 1 jour, 3 jours et 7 jours de décontamination (Figure 28). A chaque fois, un lot de 6 moules non exposées et 3 lots de 6 moules exposées ont été analysées.



**Figure 28. Schéma de déroulement de l'exposition des moules aux benzodiazépines**

A partir des expérimentations d'exposition des moules aux benzodiazépines, des facteurs de bioaccumulation ont été calculés en divisant la concentration dans les moules en  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de poids frais par la concentration mesurée dans l'eau brute en  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

Un suivi des concentrations d'exposition a été réalisé. Pour chacune des expérimentations, 2 mesures des concentrations ont été réalisées dans les bacs contaminés et dans les bacs témoins au moment du dopage et 2 mesures ont été effectuées dans les bacs contaminés et dans les bacs témoins après 24 h, à 3 dates différentes, soit  $n = 6$ . Afin d'évaluer la consommation du phytoplancton par *M. galloprovincialis*, la chlorophylle *a* et les phéopigments ont été mesurés. Pour chacune des expérimentations, 2 mesures ont été effectuées au moment de l'introduction du phytoplancton dans les bacs et 2 mesures ont été réalisées après 24 h dans des bacs à trois jours différents, soit  $n = 6$ .

### II.3. Traitement des échantillons de moules

Pour chaque prélèvement, un tri est effectué pour ôter les moules mortes qui sont comptabilisées. Les moules sont grattées extérieurement pour éliminer le biofilm et les épibiontes présents sur la coquille en prévision de leur pesée, le byssus est ôté. 20 moules choisies aléatoirement dans chaque lot, ou le lot entier si  $n < 20$ , sont pesées et mesurées. Le décoquillage est ensuite réalisé avec un scalpel en acier inoxydable rincé au solvant, en évitant d'endommager le mollusque avec la lame. La chair est mise à égoutter sur un papier absorbant. Le temps d'égouttage est de 30 min environ. Les mollusques sont ensuite stockés dans des sachets en polyéthylène à  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  avant d'être lyophilisés.

La masse de chair humide après égouttage est mesurée pour le lot d'individus calibrés, l'indice de condition du lot, correspondant à la masse de chair lyophilisée sur la masse de coquille sèche (Andral et al. 2004) est calculé. Pour cela, le sachet contenant les individus à caractériser est pesé avant congélation et après lyophilisation. Les coquilles correspondantes sont pesées après un séchage de 48 h à l'étuve à  $60\text{ }^\circ\text{C}$ .

## **II.4. Méthodes d'analyse**

### **II.4.1. Méthode d'analyse des benzodiazépines**

La méthode d'analyse des benzodiazépines dans les moules lyophilisées et la méthode d'analyse des benzodiazépines dans l'eau de mer filtrée contenant du phytoplancton sont présentées dans le chapitre 2.

### **II.4.2. Méthodes d'analyse de la chlorophylle *a* et des phéopigments dans l'eau**

L'analyse de la chlorophylle *a* et des phéopigments est réalisé dans les suspensions homogénéisées. 100 ml sont prélevés et filtrés sur filtres GF/F (Whatman) de 47 mm de diamètre. Les filtres sont conservés dans des tubes en verre hermétiques de 15 à 20 ml à -20°C pendant un mois maximum, protégés de la lumière avec de l'aluminium. Pour l'extraction de la chlorophylle *a* et des phéopigments, 10 ml d'acétone 90 % sont ajoutés dans chaque tube. Les tubes sont homogénéisés au vortex pendant 1 minute, puis les filtres sont broyés à l'aide d'une tige en plastique. Le tout est réhomogénéisé pendant 1 min. L'extraction se déroule au frais et dans l'obscurité pendant 6 heures au minimum et 36 h au maximum. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3 000 rpm pendant 10 min. 6 ml de surnageant sont prélevés et placés dans une cuve adaptée au spectromètre, l'absorbance est lue à 665 et 750 nm. Les concentrations en chlorophylle *a* et phéopigments sont ensuite calculées à partir des gammes d'étalonnage.

## **II.5. Statistiques**

Le test de Student a été utilisé pour comparer les valeurs moyennes des résultats au cours des expérimentations d'exposition. Ce test a permis de comparer deux à deux les concentrations successives au cours des expérimentations. La différence significative est notée aux seuils de  $p < 0,10$  et  $p < 0,05$ .

## **III. Résultats**

### **III.1. Contamination de moules en zone côtière**

Les moules exposées sur le site du rejet de l'émissaire de la STEP A avant sa mise en service en 2004 ne présentent pas de concentration détectable en benzodiazépines. En juillet 2007, les concentrations en benzodiazépines dans les moules exposées au niveau du rejet de l'émissaire de la station A n'étaient quantifiables dans aucun des deux lots (Est et Ouest). Les moules exposées aux rejets de station d'épuration de la STEP B en 2006, avant la rénovation de la station, et en 2008, après ce changement, n'ont pas présenté de concentrations détectables en benzodiazépines. Les moules exposées au niveau de l'arrivée de l'Huveaune en 2006 et en 2007 n'ont jamais présenté de niveaux détectables en benzodiazépines. Les concentrations étaient donc inférieures à 10 ng/g ps, pour les benzodiazépines.

### **III.2. Exposition des moules aux benzodiazépines en conditions contrôlées**

#### **III.2.1. Suivi des expérimentations**

Les concentrations d'exposition des moules mesurées sont présentées dans le Tableau 30 en  $\mu\text{g/l}$  d'eau et rapportées à la masse de moules en poids sec par bac. Après 24 h, il restait 43 % du tétrazépam dans les bacs pour une exposition à  $14,9 \mu\text{g/l}$ , 35 % de tétrazépam pour une exposition à  $2,3 \mu\text{g/l}$  et 79 % de diazépam pour une exposition à  $13,2 \mu\text{g/l}$  (Tableau 30).

Compte tenu des concentrations d'exposition et des concentrations mesurées dans le bac après 24h :

- Pour l'expérience à  $10 \mu\text{g/l}$  de TZP, par jour et par gramme de poids sec de moule : 2 610 ng de TZP serait consommé ;
- Pour l'expérience à  $2 \mu\text{g/l}$  de TZP, par jour et par gramme de poids sec de moule : 430 ng de TZP serait consommé ;
- Pour l'expérience à  $10 \mu\text{g/l}$  de DZP, par jour et par gramme de poids sec de moule : 1 690 ng de DZP serait consommé.

**Tableau 30. Concentrations d'exposition des moules aux benzodiazépines (n = 6)**

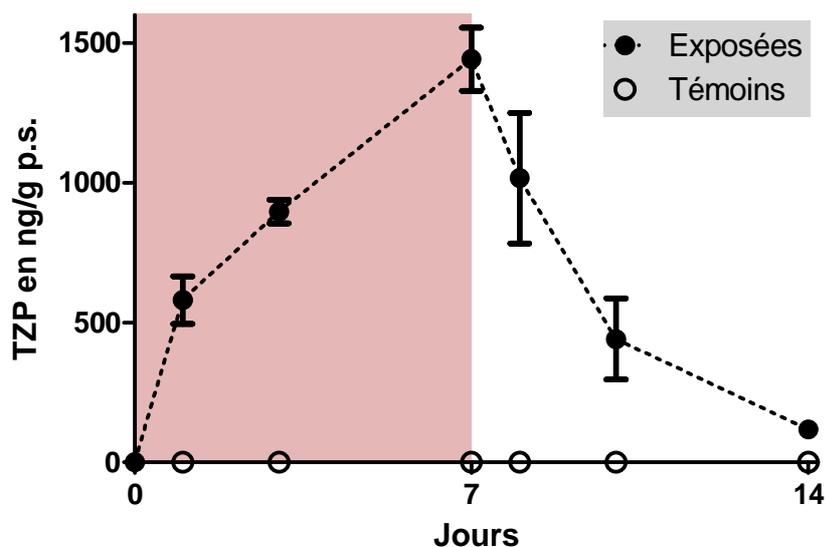
	Concentration d'exposition		Concentration après 24h en µg/l
	Dans l'eau en µg/l	Rapportée à la masse de moule en ng/g ps de moule	
TZP : Cinétique à 10 µg/l	14,9 ± 1,8	4 580	6,4 ± 1,1
TZP : Cinétique à 2 µg/l	2,3 ± 0,2	660	0,8 ± 0,1
DZP : Cinétique à 10 µg/l	13,2 ± 1,6	7 960	10,4 ± 1,3

Au moment de l'apport de phytoplancton, la concentration moyenne en chlorophylle *a* était de 70,9 ± 18,3 µg/l et celle en phéopigments de 48,7 ± 23,4 µg/l. Au bout de 24 h, la chlorophylle *a* et les phéopigments étaient à une concentration de 1,7 ± 0,6 µg/l en chlorophylle *a* et de 1,5 ± 3,4 µg/l en phéopigments. Les moules ont consommé tout le phytoplancton au cours des expérimentations de bioaccumulation.

### III.2.2. Cinétique d'accumulation et de décontamination du tétrazépam à 10 µg/l

Les indices de condition des lots ne sont pas différents entre eux, l'indice de condition moyen est de 0,084 ± 0,011 (n = 27). La teneur en lipides des moules est de 6,8 ± 1,2 % (n = 27). Les moules au début de l'expérimentation et les moules témoins n'ont pas présenté de concentrations détectables en benzodiazépines, soit une concentration inférieure à 5 ng/g ps.

La Figure 29 présente les concentrations en tétrazépam détectées dans les moules au cours de l'expérimentation. Les concentrations dans les moules augmentent régulièrement tout au long de l'exposition (en rose sur le graphique), pour atteindre 1442 ng/g ps au bout de 7 jours. Au cours de la phase de décontamination, les concentrations en TZP dans les moules décroissent régulièrement jusqu'à 118 ng/g ps à J14. Les concentrations successives sont toujours significativement différentes (p<0,05 entre J0 et J1, J1 et J3, J3 et J7, J10 et J14 ; p<0,1 entre J7 et J8 et entre J8 et J10). Le diazépam, un des métabolites du tétrazépam, a été quantifié dans un des lots de moules à J7, à J8 et à J10, les concentrations sont comprises entre 15 et 33 ng/g ps.



**Figure 29.** Concentrations de tétrazépam dans les moules (moyenne et écart-type, n=3) lors de l'étude de la cinétique d'accumulation et de d'élimination à 10 µg/l, la période d'exposition est indiquée en rose

Si on applique un modèle de décroissance mono-exponentielle à la cinétique de décroissance mesurée, avec le temps exprimé en jours, l'équation de la décroissance est la suivante :

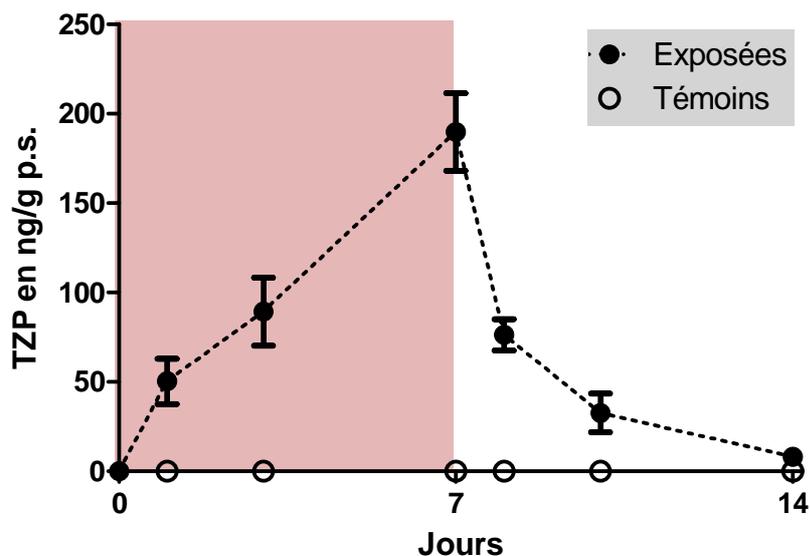
$$C(t) = 1338,3 \cdot e^{-0,367t} ; R^2 = 0,8466$$

Ce qui donne une demi-vie d'élimination de 1,89 jour, soit 45,4 h.

### III.2.3. Cinétique d'accumulation et de décontamination du tétrazépam à 2 µg/l

Les indices de condition des lots ne sont pas différents entre eux, l'indice de condition moyen de  $0,101 \pm 0,013$  (n = 27). La teneur en lipide des moules est de  $7,2 \pm 1,1$  % (n = 27). Les moules témoins n'ont pas présenté de concentrations détectables en benzodiazépines.

La Figure 30 présente les concentrations en tétrazépam détectées dans les moules au cours de l'étude du comportement du tétrazépam pour une exposition à 2 µg/l pendant une semaine suivie d'une semaine de décontamination. Les concentrations dans les moules augmentent régulièrement tout au long de l'exposition (en rose sur le graphique), pour atteindre 190 ng/g ps au bout de 7 jours. Au cours de la phase de décontamination, les concentrations en TZP dans les moules décroissent régulièrement jusqu'à une concentration détectable mais non quantifiable (comprise entre 20 et 5 ng/g ps) à J14. Les concentrations successives sont toutes significativement différentes ( $p < 0,05$  entre J0 et J1, J3 et J7, J7 et J8, J8 et J10 et entre J10 et J14 ;  $p < 0,1$  entre J1 et J3). Le diazépam n'a pas été détecté.



**Figure 30. Concentrations de tétrazépam dans les moules (moyenne et écart-type, n=3) lors de l'étude de la cinétique d'accumulation et de d'élimination à 2 µg/l, la période d'exposition est indiquée en rose**

Si on applique un modèle de décroissance mono-exponentielle à la cinétique de décroissance mesurée, avec le temps exprimé en jours, l'équation de la décroissance est la suivante :

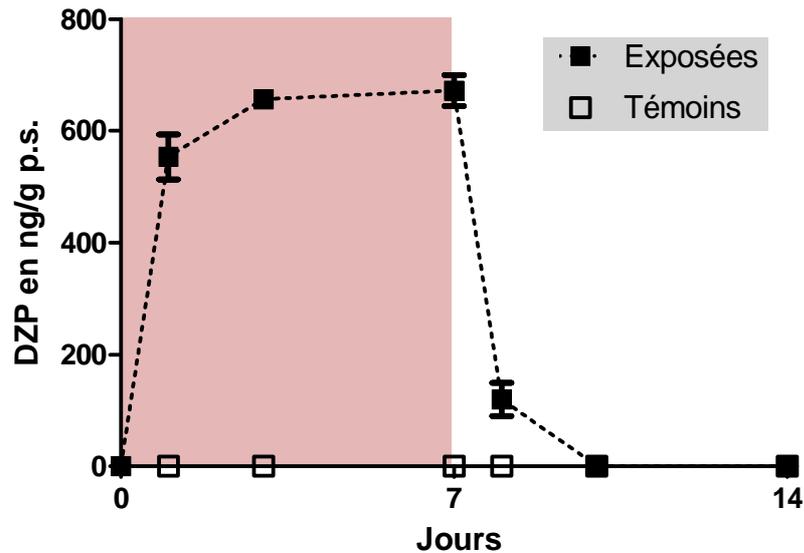
$$C(t) = 139,8 \cdot e^{-0,446t} ; R^2 = 0,8684$$

Ce qui donne une demi-vie d'élimination de 1,55 jour, soit 37,2 h.

### III.2.4. Cinétique d'accumulation et de décontamination du diazépam à 10 µg/l

Les indices de condition des lots ne sont pas différents entre eux, l'indice de condition moyen est de  $0,083 \pm 0,011$  (n = 27). La teneur en lipide des moules est de  $5,3 \pm 0,8$  % (n = 27). Les moules témoins n'ont pas présenté de concentrations détectables en benzodiazépines.

La Figure 31 présente les concentrations en diazépam détectées dans les moules au cours de l'étude du comportement du diazépam dans les moules exposées pendant une semaine à 10 µg/l, suivie d'une semaine de décontamination. Les concentrations dans les moules augmentent rapidement pour atteindre un palier autour de 650 ng/g ps entre J3 et J7. A l'arrêt de l'exposition, la concentration diminue très rapidement à 120 ng/g ps au bout à J8 puis les concentrations ne sont plus détectables à J10 et J14. Les concentrations dans les moules sont significativement différentes entre J0 et J1 ( $p < 0,05$ ), J1 et J3, J7 et J8 et entre J8 et J10 ( $p < 0,05$  pour toutes).



**Figure 31.** Concentrations de diazépam dans les moules (moyenne et écart-type, n=3) lors de l'étude de la cinétique d'accumulation et de d'élimination à 10 µg/l, la période d'exposition est indiquée en rose

Si on applique un modèle de décroissance mono-exponentielle à la cinétique de décroissance mesurée, avec le temps exprimé en jours, l'équation de la décroissance est la suivante :

$$C(t) = 765,1 \cdot e^{-2,1816t} ; R^2 = 0,9927$$

Ce qui donne une demi-vie d'élimination de 0,32 jour, soit 7,7 h.

### III.2.5. Facteurs de bioconcentration

A partir des expérimentations d'exposition des moules aux benzodiazépines, des facteurs de bioconcentration ont été calculés en divisant la concentration dans les moules en µg/kg de poids frais par la concentration mesurée dans l'eau brute en µg/l. Les concentrations maximales en benzodiazépines ayant été observées après 7 jours d'exposition, les facteurs de bioconcentration ont été calculés à cette date. Pour le tétrazépam, les BCF sont de 15,7 pour une exposition à 2,3 µg/l et de 16,1 pour une exposition de 14,9 µg/l. Pour le diazépam, le BCF est de 8,6 pour une exposition à 13,2 µg/l.

## IV. Discussion

Les échantillons environnementaux étudiés ne présentent pas de concentrations détectables en tétrazépam ou en diazépam. Ces molécules se retrouvent à des concentrations dans les moules exposées pouvant être supérieures au  $\mu\text{g/g}$  ps pour le tétrazépam après exposition à des eaux de mer de concentrations voisines de  $10 \mu\text{g/l}$  ; notons que ces concentrations d'exposition sont 10 à 1000 fois plus élevées que celles retrouvées en aval d'une station d'épuration. Ce travail est le premier à rechercher le tétrazépam et le diazépam dans des mollusques et le premier à étudier leur absorption par des organismes exposés.

### IV.1. Niveaux de contamination des organismes aquatiques par les benzodiazépines

L'exposition de moules aux rejets de STEP ou à l'arrivée d'une rivière transitoire traversant une grande agglomération méditerranéenne française, n'a jamais entraîné de niveaux détectables de diazépam ou de tétrazépam dans les moules. A notre connaissance, ces substances n'avaient jamais été recherchées dans les moules. Le tétrazépam n'a d'ailleurs jamais été recherché en milieu marin, ni dans les organismes aquatiques. Le diazépam a, quant à lui, été quantifié dans 10 échantillons de foies de poissons marins, pêchés dans une zone de rejet de STEP, entre 23 et 110  $\text{ng/g}$  pf (Kwon et al. 2009).

Le diazépam n'est pas toujours présent dans les effluents de STEP et quand il l'est, c'est à quelques dizaines de  $\text{ng/l}$  (Clara et al. 2005; Ternes et al. 2001; Unceta et al. 2010; van der Ven et al. 2006; Wick et al. 2009). Dans les eaux douces de surface, les concentrations en tétrazépam ou en diazépam ne sont pas fréquemment détectables (Calisto et Esteves 2009; González Alonso et al. 2010; Togola et Budzinski 2008; van der Ven et al. 2004). Or, nous avons montré dans le Chapitre 3 que les conditions hydrodynamiques dans les zones d'apport de contaminants pouvaient favoriser la dispersion des contaminants. Dans les trois sites étudiés, les mélange et la dilution rendent les filtres UV non détectables dans les moules exposées aux rejets des stations A et B et à l'arrivée de l'Huveaune, alors que les filtres UV sont fréquemment retrouvés dans des effluents de STEP et dans les organismes. Dans ces conditions, on peut donc supposer que, pour nos sites d'étude, les mêmes phénomènes de dilution se produisent pour le tétrazépam et le diazépam. La seule étude ayant analysé le diazépam dans les organismes aquatiques (Kwon et al. 2009) ne fournit pas d'information sur les sites de prélèvement des poissons contaminés.

La différence de résultats entre l'étude de (Kwon et al. 2009) et la nôtre peut également être expliquée par la différence d'espèces : les poissons et les moules ne sont pas exposés aux mêmes fractions des contaminants et n'ont pas des capacités métaboliques équivalentes (Livingstone 1998). L'étude de la bioaccumulation du diazépam et du tétrazépam doivent fournir des informations quant à la capacité de concentration des deux benzodiazépines dans les moules. De plus, l'analyse d'organes concentrateurs comme le foie chez le poisson peut permettre d'augmenter la sensibilité de l'analyse du contaminant dans l'organisme en augmentant la proportion de contaminants par rapport à la matrice. Il serait pertinent d'étudier la répartition du diazépam entre les différents organes de la moule, pour pouvoir, le cas échéant analyser spécifiquement un organe fortement concentrateur.

## **IV.2. Accumulation des benzodiazépines dans les moules en conditions contrôlées**

Les concentrations en tétrazépam lors de l'étude de son comportement dans les moules au cours d'une semaine d'accumulation suivie d'une semaine de décontamination présentent des courbes similaires pour les 2 concentrations d'exposition : la concentration dans les moules augmente progressivement pour atteindre un maximum après 7 jours d'exposition de 190 ng/g ps et de 1 442 ng/g ps pour une exposition à 2,3 µg/l et 14,9 µg/l respectivement. Les concentrations décroissent ensuite régulièrement au cours de la décontamination pour atteindre des concentrations inférieures à 20 ng/g ps et de 118 ng/g ps pour l'exposition à 2,3 µg/l et à 14,9 µg/l respectivement. L'absorption du tétrazépam dans les moules semble donc un phénomène proportionnel à la dose d'exposition. Ainsi, les BCF calculés pour les deux expérimentations sont équivalents : 15,7 pour une exposition à 2,3 µg/l et 16,2 pour une exposition à 14,9 µg/l.

L'exposition des moules à 13,2 µg/l de diazépam entraîne une concentration de diazépam dans les moules de 553 ng/g ps dès le premier jour d'exposition, la concentration augmente ensuite faiblement avec un maximum à J7 de 672 ng/g ps. A l'arrêt de l'exposition, la concentration diminue très rapidement : elle est à 120 ng/g à J8 et devient ensuite non quantifiable (< 5 ng/g ps).

Notre étude montre que les facteurs abiotiques n'influencent pas les niveaux de concentration des molécules étudiées ; seuls les facteurs biotiques sont responsables de modifications de ces concentrations. Après un jour d'exposition au tétrazépam, 22 % de la quantité de tétrazépam supposée consommée est effectivement retrouvé dans les moules pour l'expérimentation à 10 µg/l (2 610 ng/g ps vs 580 ng/g ps) et 12 % pour l'exposition à 2 µg/l (430 ng/g ps vs 50 ng/g ps). Après une semaine, 8 % de la quantité totale supposée consommée est quantifié dans les moules pour l'exposition à 10 µg/l (18 270 µg/g ps vs 1 442 ± 196 ng/g ps) et 6 % pour l'exposition à 2 µg/l

(3 010 µg/g ps vs 190 ± 38 ng/g ps). Après un jour d'exposition au diazépam, 32% de la quantité de diazépam supposée consommée est effectivement retrouvé dans les moules (1 690 ng/g ps vs 533 ng/g ps), après 7 jours, 6% de la quantité totale supposée consommée est retrouvé dans les moules (11 830 ng/g ps vs 672 ng/g ps).

En l'absence de moules, il n'y a pas de pertes de diazépam ni de tétrazépam en 24 h (Annexe III). La consommation de BZD dans les bacs ne provient donc pas d'une dégradation dans l'eau, ni de volatilisation, processus qui auraient été mis en évidence lors de l'étude de la stabilité. Les autres possibilités de pertes sont l'absorption par les moules et l'adsorption sur du biofilm ou sur les particules (pseudo-fèces) pouvant être présents dans les bacs. Or à chaque changement d'eau, les bacs sont essuyés et rincés pour éviter le développement d'un biofilm et l'accumulation de matériel biologique, l'adsorption sur ces compartiments faiblement présents peut donc être considéré comme limité. La majorité de la consommation de benzodiazépines provient donc de l'absorption par les moules. Or, on ne retrouve qu'une faible proportion des BZD consommées dans les moules. On peut donc supposer que les moules mettent en place une métabolisation des benzodiazépines.

Les deux benzodiazépines sont absorbées par les moules exposées de façon continue, l'absorption étant alors supérieure à l'élimination de la molécule avec une augmentation des concentrations dans les moules exposées pour le tétrazépam. Après arrêt de l'exposition, la concentration dans l'organisme décroît plus ou moins rapidement témoignant d'une élimination par l'organisme associée à une métabolisation de la molécule. En effet, dans les organismes exposés à du tétrazépam à 10 µg/l, la demi-vie d'élimination est de 45,4 h et pour des moules exposées à 2 µg/l elle est de 37,2 h. De plus le diazépam, métabolite humain minoritaire du tétrazépam, a été détecté dans 3 échantillons de moules, témoignant des capacités métaboliques de la moule vis-à-vis de cette molécule. La demi-vie d'élimination du diazépam, pour une exposition à 10 µg/l est de 7,7 h. La moule possède un système d'élimination qui comprend des enzymes de phase I telle la cytochrome P450 (CYP 450) monooxygénase, ou de phase II telle la glutathion S-transferase (Livingstone 1998). Cependant, l'efficacité de son système de métabolisation est en général inférieure d'un facteur 10 à celui des poissons (Livingstone 1998). Par comparaison, la demi-vie d'élimination du tétrazépam chez l'homme est de 10 à 25 h (Kintz 1998) et celle du diazépam de 15 à 60 h (Kintz 1998). Le tétrazépam présente, une demi-vie d'élimination plus lente chez la moule que chez l'homme, ce qui est attendu compte tenu de la plus grande complexité des voies de métabolisation chez l'homme que chez la moule. En revanche, le diazépam est éliminé beaucoup plus rapidement chez la moule. Ce qui implique soit des voies de métabolisation différentes chez l'homme et chez la moule d'une part et entre les deux molécules d'autre part, soit une absence d'absorption du diazépam par la moule. Or, la

vitesse d'équilibration des concentrations chez la moule laisse supposer qu'il se crée un simple équilibre entre la concentration en diazépam dans l'eau et la concentration dans la moule qui serait dû à des phénomènes d'adsorption et d'élimination simples. Des métabolisations différentes pourraient donc être dues à des voies d'absorption différentes.

Le comportement du diazepam peut être rapproché de celui de l'acide oxolinique (AO), un antibiotique vétérinaire, qui présente des cinétiques dans la moule (*M. edulis*) similaire à celle du diazepam. Lors de l'exposition, un palier est atteint dès le premier pas de temps ; au cours de la décontamination, il est détectable au premier pas de temps uniquement (Le Bris et Pouliquen 2004). Le diazepam, tout comme l'AO, n'est pas une substance persistante dans les moules : quand l'exposition s'arrête, ils sont très rapidement éliminés.

Cette molécule au log  $K_{ow}$  de 1,67 est majoritairement quantifiée dans les branchies, puis dans les glandes digestives (Le Bris et Pouliquen 2004). La répartition entre les différents organes de la moule est importante à réaliser afin de connaître le devenir des BZD dans la moule. Il semble que les organes qui risquent de concentrer le plus le diazepam sont les branchies qui représentent la surface d'échange privilégiée avec l'eau.

Les expérimentations d'exposition des moules ont permis de calculer des facteurs de bioconcentration de 15,7 et 16,1 pour le tétrazepam et de 8,6 pour le diazepam. L'utilisation du modèle proposé par (Mackay et Fraser 2000) pour une première évaluation des facteurs de bioconcentration d'un contaminant dans un organisme :  $BCF = 1 + L \cdot K_{ow}$ , avec L la teneur en lipides de l'organisme, donne un BCF de 112 pour le tétrazepam (teneur en lipides de 7% et log de  $K_{ow}$  de 3,2) et de 36 pour le diazepam (teneur en lipides de 5,3% et log de  $K_{ow}$  de 2,82). Ces résultats sont à titre indicatif : ce modèle a été mis en place pour des contaminants PBT et n'a pas été ajusté pour des molécules à log de  $K_{ow}$  aussi bas ni pour des substances métabolisables. Le modèle ne tenant pas compte des processus d'excrétion actifs ou de métabolisation, surestime les facteurs de bioconcentration; cependant, les valeurs obtenues sont du même ordre de grandeur que celles calculées dans nos expérimentations.

Les concentrations dans les eaux de surface pour le diazepam, quand elles sont détectables, sont de l'ordre de la dizaine de ng/g. En considérant qu'on a une concentration dans l'eau de mer de 10 ng/l et qu'à cette concentration, le BAF soit toujours de 16, la concentration dans la moule serait alors de 160 ng/kg pf, soit environ 10 ng/g ps. Cette concentration est comprise entre les limites de détection et de quantification. Elle pourrait donc être mise en évidence par les moules. D'autant plus que l'augmentation constante des concentrations en tétrazepam dans les moules au cours des

expositions pose la question de savoir si on a atteint un maximum ou si la concentration de tétrazépam dans les moules peut encore augmenter.

En conclusion, ces deux benzodiazépines sont des molécules qui sont retrouvées dans les moules au cours d'une exposition continue bien qu'elles n'apparaissent pas comme des substances bioaccumulables. En effet, la moule *M. galloprovincialis* semble présenter des capacités de métabolisation du tétrazépam et du diazépam permettant une diminution rapide des concentrations à l'arrêt de l'exposition. Cependant, dans l'environnement, les moules, organismes sessiles, peuvent être exposés de façon continue à de faibles concentrations de BZD, qui pourraient entraîner des concentrations quantifiables, en particulier si la proportionnalité de réponse des moules observée pour le tétrazépam étaient conservée. Or, les moules (*M. galloprovincialis*) présentent des récepteurs périphériques aux benzodiazépines dans les membranes des tissus mous (manteaux, glandes digestives, branchies et muscles) (Betti et al. 2003). Il a été montré que l'exposition au diazépam pouvait affecter de manière significative les taux de sérotonine et de glutamate chez des moules d'eau douce (*Elliptio complanata*) et ce à partir de concentration de l'ordre de 350 ng/g de moules (Gagné et al.), du l'ordre des concentrations détectées après une exposition en conditions contrôlées.



# **Chapitre 6.** Conclusions et perspectives



Ce travail de thèse visait à étudier la contamination par 3 filtres UV et 2 benzodiazépines dans les moules marines (*Mytilus sp.*). La moule, choisie comme bioconcentrateur pour ses caractéristiques écologiques est présente sur tout le littoral français et est fréquemment utilisée pour la biosurveillance de contaminants persistants, bioaccumulables et toxiques. Cinq molécules ont été suivies : trois filtres UV lipophiles : l'éthylhexyl methoxycinnamate, l'octyl dimethyl acide *p*-aminobenzoïque et l'octocrylène et deux benzodiazépines : le diazépam et le tétrazépam. Dans un premier temps, une méthodologie pour le suivi des filtres UV et des benzodiazépines dans les moules et l'eau de mer a été proposée. La méthode de dosage des filtres UV et des benzodiazépines dans les moules, mise en place et validée dans cette thèse, permet la quantification dans des conditions satisfaisantes de 5 substances pharmaceutiques et produits de soin dans les moules à partir de niveaux de concentrations similaires à ceux rapportés dans la littérature pour des PPCP dans des organismes.

Une fois ces méthodes en place, la thèse a visé à :

- Evaluer la contamination des moules du milieu marin côtier par 3 filtres UV et 2 benzodiazépines. : en fournissant les premières données de contamination d'organismes marins par ces substances ; en étudiant plusieurs sources de contamination ;
- Etudier l'accumulation et l'épuration de moules exposées à ces substances en conditions contrôlées. L'objectif de ces expérimentations était de mieux comprendre le comportement de ces substances dans les moules de l'environnement et de présenter les arguments permettant de mieux comprendre la contamination des moules du milieu marin côtier par les filtres UV et par les benzodiazépines.

Des expérimentations de bioaccumulation ont été menées en laboratoire pour évaluer l'absorption par les moules de l'EHC et de l'OC à partir de phytoplanctons contaminés. Après deux expositions ponctuelles à 24h, les concentrations de ces filtres UV dans la chair des moules augmentent immédiatement pour atteindre en 1h des concentrations de l'ordre de celles retrouvées dans les moules de plages en période estivale. Dès l'arrêt de l'exposition, les concentrations décroissent rapidement. La répartition des filtres UV dans les moules, en particulier pour l'EHC qui a été étudié, apparaît différente suivant les organes avec une concentration plus élevée dans les branchies. Des facteurs de bioaccumulation estimés à partir des ces expérimentations n'excèdent pas

1,7 pour l'EHMC et 15,5 pour l'OC, ce qui est faible par rapport à ceux attendus pour des substances ayant un  $\log K_{ow}$  de cet ordre.

Ce travail a montré que les filtres UV ne se bioaccumulent pas dans les moules. Les moules montrent une grande réactivité aux variations d'exposition, suggérant la mise en place de voies de métabolisation. Dans l'eau, Rodil et al. (2009a) ont montré que dans un premier temps, l'EHMC s'isomérisait à la lumière puis qu'il se formait des dimères, avant leur dégradation. Les deux isomères de l'EHMC ont été pris en compte ; en revanche, les dimères n'ont pas été recherchés. Par ailleurs, les moules possèdent un système de métabolisation simple. La recherche des métabolites de l'EHMC et de l'OC et des dimères de l'EHMC dans les moules et dans l'eau après exposition permettrait de comprendre les voies de métabolisation mises en jeu : l'élimination est-elle réalisée par la moule ou rejette-t-elle par les pseudo-fèces ces filtres UV qui sont ensuite dimérisés ou dégradés dans l'eau ?

L'exposition des moules aux benzodiazépines a montré que bien que ces deux substances appartiennent à la même classe de substances pharmaceutiques, leur comportement dans les moules est différent. Le tétrazépam présente une augmentation des concentrations au cours de l'exposition, suivie d'une diminution progressive lors de la dépuración. Les deux concentrations testées présentent des profils de contamination similaire avec une concentration dans la moule proportionnelle à la concentration d'exposition. Les concentrations en diazépam dans les moules sont directement dépendantes de l'exposition : lorsque les moules sont exposées, le palier de concentration est atteint en une journée ; dès l'arrêt de l'exposition, les concentrations décroissent très rapidement et sont non détectables 3 jours après l'arrêt de l'exposition. Des facteurs de bioaccumulation ont été calculés lors de ces expériences : ils sont de 16,2 et 15,2 pour une exposition à 10 et à 2  $\mu\text{g/l}$  de tétrazépam respectivement, et à 8,6 pour 10  $\mu\text{g/l}$  de diazépam.

Ces expérimentations ont mis en évidence que les moules mettaient en place des voies d'élimination avec probablement une métabolisation de ces benzodiazépines. Bien que ces deux molécules soient proches, les voies de métabolisation semblent être différentes, ce qui peut être attribué à des voies d'absorptions différentes. Les moules n'accumulent pas le diazépam. L'exposition au tétrazépam pose les questions de savoir si la concentration dans les moules de tétrazépam augmenterait avec une exposition plus longue et si le rapport de proportionnalité observé pour ces deux concentrations est extrapolable à des concentrations environnementales.

La bioaccumulation des contaminants émergents est encore peu étudiée : parmi les PPCP, seuls quelques médicaments ont fait l'objet d'études en laboratoire. Quelques BAF ou BCF ont été calculés : pour la fluoxétine ; ils étaient compris entre 9 à 260 (Nakamura et al. 2008; Paterson et Metcalfe 2008), pour le diclofénac entre 0,3 à 2732 (Schwaiger et al. 2004a), pour 2 antibiotiques vétérinaires, ils sont au maximum de 2 pour l'OTC et de 0,55 pour l'AO (Le Bris et Pouliquen 2004). Dans notre étude, les BAF de l'EHMC étaient au maximum de 1,7, ceux de l'OC de 15,5, les BCF du TZP de 16,2 et ceux du diazépam de 8,6. Ces BAF et BCF sont inférieurs à ceux attendus compte tenu des propriétés physico-chimiques des filtres UV étudiés. Etant donnée la grande diversité des contaminants émergents, il n'est pas possible de faire une conclusion généraliste sur la bioaccumulation de ces contaminants à partir de ces quelques études, cependant, elles mettent en évidence que les règles établies pour les contaminants PBT ne sont pas applicables aux contaminants émergents.

L'étude de la contamination environnementale comprenait deux parties. D'une part, la contamination en filtres UV de moules sauvages provenant de sites côtiers français a été suivie de juin à novembre 2008. D'autre part, des moules ont été exposées sur des sites de rejets d'effluents de station d'épuration ou d'arrivée d'un cours d'eau transitoire traversant une grande agglomération méditerranéenne. Les concentrations en EHMC, OD-PABA, OC, tétrazépam et diazépam résultantes ont été analysées. Les moules exposées aux rejets de STEP ou au cours d'eau n'ont présenté de niveau détectable pour aucun des contaminants étudiés. En revanche, l'EHMC et l'OC ont été quantifiés dans des moules provenant de sites d'activités récréatives avec des profils de contaminations similaires bien que les concentrations maximales en OC soient d'un ordre de grandeur de plus que celles en EHMC. Les concentrations en filtres UV sont maximales en période estivale pour des moules prélevées à faible profondeur sur des plages en ville protégées. Les niveaux atteignent alors des concentrations supérieures à celles rapportées dans la littérature pour des poissons d'eau douce. En novembre, les concentrations dans les moules sont passées sous la limite de détection pour l'OC et étaient significativement inférieures aux valeurs estivales pour l'EHMC. Les concentrations en filtres UV dans les moules n'étaient pas corrélées à leur indice de condition, contrairement à ce qui avait été montré pour des PBT (Andral et al. 2004).

En milieu marin côtier, trois origines de contamination chimique organique sont principalement rapportées : l'introduction directe par les activités récréatives, les rejets de STEP et l'arrivée de cours d'eau douce contaminés. Au cours de cette étude, l'introduction directe et les rejets

de STEP ont principalement été étudiés pour l'émission de deux classes de PPCP : les filtres UV et les benzodiazépines. Compte tenu de l'efficacité des traitements des stations d'épuration (l'élimination peut être supérieure à 99% pour l'EHMC et l'OC (Balmer et al. 2005)), on peut supposer que les concentrations en filtres UV apportées par les rejets d'épuration sont nettement plus faibles que les concentrations apportées par les baigneurs en été. Seules les activités récréatives ont eu un impact quantifiable localisé sur les niveaux de contamination en filtres UV dans les moules. Les concentrations détectées dans les moules de plages méditerranéennes sont liées à la fréquentation des sites d'activités récréatives ; elles sont importantes dans les zones de baignade et décroissent rapidement avec la distance par rapport à la source. Il a été également noté une décontamination des moules après la période estivale.

En milieu côtier, à l'inverse des lacs et des rivières (Buser et al. 2006; Fent et al. 2009b), la principale source de filtres UV pour les organismes est les activités récréatives. Plus généralement, les impacts des rejets de stations d'épuration observés dans les eaux continentales ne sont pas extrapolables au milieu marin dans son ensemble car les volumes de dilution sont beaucoup plus importants. Par ailleurs, la mise en place d'émissaires pour le rejet des STEP se fait dans des zones de dispersion, choisies pour être des zones où les effluents vont être rapidement dilués et dispersés. L'étude de la contamination des sites d'activités récréatives a mis en évidence que les sites les plus contaminés étaient des sites protégés avec de faibles profondeurs, mettant en évidence l'importance de l'hydrodynamique du milieu. Ainsi, le milieu marin côtier ne peut être considéré comme homogène ou comme assimilé au milieu continental : dans sa grande majorité, les volumes de dilution et les courants entraînent une dispersion rapide des contaminants, rendant les niveaux de contamination non détectables. Cependant, quelques zones sont des sites privilégiés pour certains contaminants et donc pour leur étude ; c'est le cas des plages protégées pour les filtres UV, mais aussi des ports pour la caféine (Siegener et Chen 2002), des lagunes côtières ou des estuaires pour des médicaments (Benotti et Brownawell 2007; Thomas et Hilton 2004). En parallèle de ces sites plus « sensibles », on peut aussi mettre en évidence des compartiments « concentrateurs ». Dans notre étude, la microcouche de surface est soupçonnée d'entraîner une contamination en filtres UV plus importante pour des moules proches de la surface. L'EHMC a d'ailleurs été quantifié dans la microcouche de surface dans l'océan Pacifique (Goksoyr et al. 2009). D'autres compartiments concentrent les contaminants ; c'est le cas par exemple des sédiments pour les alkylphénols (David et al. 2010).

L'ensemble des résultats présentés dans ce travail pose la question de savoir si les moules reflètent la contamination du milieu marin côtier par les filtres UV et par les benzodiazépines de manière satisfaisante. Pour répondre à cette question, il est nécessaire de définir ce qui est attendu d'un indicateur de contamination. Il doit être :

- Sensible pour mettre en évidence une contamination la plus basse possible ;
- Proportionnel aux niveaux de contamination ;
- Simple de mise en œuvre.

D'autres critères peuvent ensuite être ajoutés en fonction de l'objectif du suivi ; on peut également souhaiter qu'il soit :

- Spécifique de la fraction biodisponible, pour refléter l'exposition des organismes ;
- Intégratif d'une période donnée pour s'affranchir des variations à court terme de la contamination et refléter un niveau moyen.

Les moules utilisées dans le suivi de la contamination des filtres UV ont présenté des variations de concentration suivant les sites et la période de prélèvement. Elles reflètent la fraction biodisponible pour cette espèce et les concentrations retrouvées peuvent être plus facilement comparées aux données de toxicité existantes. Cependant, les moules n'ont jamais présenté de niveaux de contamination détectables en filtres UV quand elles étaient exposées aux rejets de station d'épuration. En laboratoire, elles ont montré une réactivité très rapide aux changements d'exposition. Les résultats environnementaux montrent que les moules peuvent être utilisées comme bioindicateur de contamination par les filtres UV même si les expérimentations en conditions contrôlées n'ont pas permis de répondre à toutes les questions. Les moules prélevées dans l'environnement présentent-elles des concentrations représentatives de l'heure précédente ou d'une moyenne d'exposition sur une période plus longue ? Dans ce cas, comment estimer cette période ?

L'approfondissement de l'accumulation des filtres UV en conditions contrôlées pourrait permettre de répondre à certaines questions. Dans un premier temps, l'étude de la décontamination des filtres UV pourrait être approfondie : des moules pourraient être prélevées en été sur un site fortement contaminé, une partie des moules serait analysée au moment du prélèvement, l'autre partie serait laissée à dépurer en conditions contrôlées avec un suivi de la cinétique de décontamination. Cette stratégie présente l'avantage de suivre les deux filtres UV simultanément, de ne pas introduire de filtres UV dans le laboratoire ce qui a déjà entraîné des difficultés de gestion, et surtout de travailler avec des moules exposées dans des conditions environnementales. L'inconvénient de cette stratégie est que les moules ne sont pas acclimatées aux conditions de laboratoire. Dans ce cas, il faut

que ces conditions soient le plus proche possibles de la réalité environnementale (température de l'eau, durée du jour). Une alternative à ce transfert en laboratoire est le transfert des moules vers un site de référence. La technique d'exposition dans des cages serait employée pour laisser les moules dépurer sur un site soigneusement sélectionné ne présentant pas de contamination en filtres UV. La cinétique de décontamination devrait être suivie de manière rapprochée sur les deux premiers jours, puis pourrait s'espacer pour vérifier l'hypothèse d'une élimination biphasique proposée dans la discussion du chapitre 4. Ensuite, la question des voies d'absorption devrait être approfondie avant de procéder à d'autres études d'accumulation en conditions contrôlées. Pour cela, les répartitions des filtres UV dans les organes de moules exposées par le phytoplancton en conditions contrôlées, de moules prélevées en surface et de moules prélevées dans la colonne d'eau sur des sites contaminés en période estivale devront être comparées.

En laboratoire, les moules absorbent les benzodiazépines et quand l'exposition s'arrête, les concentrations dans les moules décroissent mais restent détectables après 7 jours de décontamination pour le tétrazépam. En théorie, il semblerait que les moules puissent être utilisées pour suivre les concentrations en benzodiazépines dans le milieu marin. Pourtant, aucun des lots de moules exposés dans l'environnement n'a présenté de concentration détectable en diazépam ou en tétrazépam car les concentrations environnementales sont généralement de l'ordre de la dizaine de ng lorsqu'ils sont détectés. Une première stratégie peut être mise en œuvre pour se rapprocher des conditions environnementales : approfondir l'étude d'accumulation de benzodiazépines en conditions contrôlées en exposant des moules en laboratoire à des concentrations de l'ordre de 10 à 100 ng/l et en mesurant les concentrations résultantes de cette exposition dans les moules. L'étude de l'accumulation des benzodiazépines dans les moules pourrait être poursuivie en étudiant la répartition de ces molécules dans les organes afin d'obtenir plus d'informations sur les voies d'absorption et la répartition des substances dans la moule. Enfin, d'autres métabolites des benzodiazépines pourraient être recherchés, comme le nordazépam et l'oxazépam.

Une autre stratégie pourrait être mise en œuvre pour tenter d'expliquer la non quantification des PPCP étudiés dans les moules exposées aux rejets de STEP : comparer les niveaux de contamination des moules avec ceux d'autres systèmes d'échantillonnage sur des sites de rejets de station d'épuration. L'évaluation des concentrations en contaminants émergents dans la colonne d'eau nécessite la mise en œuvre de techniques d'échantillonnage et d'analyse permettant une quantification à des concentrations très basses. Plusieurs autres systèmes ont été proposés : les

échantillonneurs passifs tels que les dispositifs à membrane semi-perméable (SemiPermeable Membrane Device : SPMD) ou les échantillonneurs intégratifs de substances chimiques organiques polaires (Polar Organic Chemical Integrative Sampler : POCIS) et le prélèvement des compartiments concentrateurs comme la microcouche de surface. La quantification de filtres UV, dont l'EHMC à l'aide de SPMD et dans la microcouche de surface a déjà été effectuée avec succès dans l'Océan Pacifique (Goksoyr et al. 2009). Utiliser des moules ou des SPMD est aussi complexe : les procédures d'exposition sont les mêmes et l'analyse nécessite autant de purification. D'un point de vue analytique, les POCIS sont d'un usage plus aisé ; ils sont employés pour la quantification de médicament, dont les benzodiazépines (Togola et Budzinski 2007). Ils sont toutefois plus fragiles que les SPMD ou les moules et les membranes résistent mal dans les zones à fort courant. L'interprétation des données de contamination issues d'échantillonneurs passifs est complexe : les concentrations ne peuvent pas être extrapolées en ng/l d'eau et ne représentent pas une réalité biologique comme les moules.

Enfin, les résultats présentés dans ce travail amènent à s'interroger sur les risques potentiels de ces substances dans le milieu marin, que ce soit pour les organismes ou pour l'homme. Pour les 5 substances étudiées, peu d'études existent quant à leur toxicité environnementale. Les concentrations environnementales mesurées dans les moules indiquent que la dilution du milieu marin est protectrice et limite les zones d'exposition aux lieux d'introduction semi-fermés, comme les plages protégées pour les filtres UV largement utilisés dans les écrans solaires. Les études en conditions contrôlées démontrent une élimination rapide dans les moules des 4 molécules étudiées, souvent sous formes métabolisées. Ainsi, il semble qu'individuellement les substances étudiées n'entraînent pas de risques quantifiables pour les moules. En milieu marin côtier, les effets de ces substances peuvent s'associer à ceux d'autres molécules mais ce domaine de recherche reste peu exploré à cause d'un manque de méthodologies adaptées pour l'étude des mélanges de molécules présentes à des concentrations faibles. Dans le cas des benzodiazépines, il existe un grand nombre de congénères dont certains se métabolisent en d'autres congénères actifs (Baumann et al. 2009). La moule présentant des récepteurs aux benzodiazépines (Betti et al. 2003) et une diminution significative de la sérotonine dès la concentration en diazépam de 350ng/g de moule (Gagné et al.), il est légitime de s'interroger sur les effets d'un mélange de plusieurs benzodiazépines qui pourraient être capables de se lier à ces récepteurs ou d'avoir des effets sur les systèmes de neurotransmetteurs. L'étude des benzodiazépines chez la moule reste donc pertinente dans les sites spécifiques d'exposition et nécessiterait la prise en compte d'un plus grand nombre de congénères.

Les zones entraînant une contamination des moules par les filtres UV sont limitées spatialement : les niveaux de contamination des moules décroissent avec la distance par rapport à la source. Concernant l'ensemble des écosystèmes, les organismes les plus susceptibles d'être exposés sont donc les espèces sédentaires comme les moules, vivant dans les zones « contaminées » telles que les zones de baignade protégées. En effet, la mise en place de processus d'élimination rapide mis en évidence chez la moule entraîne la décontamination de ces organismes lorsqu'ils sortent des zones ou des périodes d'exposition importante. Il semble que ce phénomène est extrapolable à d'autres espèces ; ainsi, dans les rivières les espèces de poissons sédentaires sont plus fortement contaminés que les poissons nomades (Fent et al. 2009b). Il est difficile d'extrapoler les risques que pourraient présenter les molécules étudiées à partir des concentrations dans les moules et de leur capacité de métabolisation. En effet, les voies d'exposition et les voies de métabolisation sont différentes : les moules, et les invertébrés en général, disposent d'un système de métabolisation moins performant que les poissons ou que les autres organismes marins supérieurs (Livingstone 1998). Les poissons, mobiles et supposé capables de métaboliser rapidement les molécules de notre étude, seraient donc moins susceptibles d'être exposés à des concentrations pouvant entraîner un risque écotoxicologique. Cette hypothèse reste toutefois à confirmer substance par substance puisque notre étude a montré que les moules sont capables de métaboliser le diazépam plus rapidement que l'homme. Reste la question des autres organismes invertébrés présents dans les zones d'exposition. Il a été montré ((Fent et al. 2009a) que pour les daphnies, il y aurait un risque dû à l'EHMC en zones de baignade fortement contaminées qui resterait à quantifier. De plus, la toxicité des filtres UV, en tant que perturbateur endocrinien, ne peut s'envisager individuellement mais doit être replacé dans le contexte de mélange. Ainsi (Fent et al. 2009a) concluent qu'on ne peut exclure la possibilité d'un risque écotoxicologique pour un mélange de filtres UV comprenant l'EHMC.

Enfin, le risque d'exposition humaine aux substances étudiées par la consommation de moules semble nul pour les 2 benzodiazépines et pour l'OD-PABA. Pour l'EHMC et l'OC, les concentrations environnementales restent faibles et un impact sur la santé humaine à travers la consommation de moules semble négligeable comparé à d'autres voies d'exposition majeures, comme l'application cutanée. En effet, les facteurs qui vont influencer le passage transdermique des molécules chimiques photoprotectrices sont nombreux, et peu d'études ont été menées sur leur pénétration effective plus particulièrement en fonction de la formulation et de l'état de la peau. Ce manque d'information n'a pas échappé aux instances de sécurité des produits de santé comme

l'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) en France et le SCCP (Scientific Committee on Consumer Products) au niveau de l'Europe, qui envisagent une réévaluation du passage de certains filtres UV inscrits à l'annexe VII de la directive Cosmétique 76/768/CEE. De plus il a été montré que l'application directe chez la mère a entraîné la détection de filtres UV dans le lait maternel (Schlumpf et al. 2008), ce qui pose la question majeure de l'exposition aux filtres UV de populations vulnérables comme les nouveau-nés.



# Références bibliographiques



- Andral B, Stanisiere JY, Sauzade D, Damier E, Thebault H, Galgani F, et Boissery P. 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin* 49(9-10):704-712.
- Aranami K, et Readman JW. 2007. Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. *Chemosphere* 66(6):1052-1056.
- Bachelot M, et Casellas C. 2007. Devenir du triclosan dans l'environnement, première approche de l'évaluation des risques. *Bulletin de veille scientifique*(5):12-13.
- Balk F, et Ford RA. 1999. Environmental risk assessment for the polycyclic musks AHTN and HHCB in the EU: I. Fate and exposure assessment. *Toxicology Letters* 111(1-2):57-79.
- Balmer ME, Buser HR, Muller MD, et Poiger T. 2005. Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss Lakes. *Environ Sci Technol* 39(4):953-962.
- Baumann A, Lohmann W, Schubert B, Oberacher H, et Karst U. 2009. Metabolic studies of tetrazepam based on electrochemical simulation in comparison to in vivo and in vitro methods. *Journal of Chromatography A* 1216(15):3192-3198.
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Narbonne JF, Burgeot T, Michel X, et Bellocq J. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus sp.*) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Marine Environmental Research* 47(5):415-439.
- Baumard P, Budzinski H, Michon Q, Garrigues P, Burgeot T, et Bellocq J. 1998. Origin and Bioavailability of PAHs in the Mediterranean Sea from Mussel and Sediment Records. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 47(1):77-90.
- Bayne BL. 1998. The physiology of suspension feeding by bivalve molluscs: an introduction to the Plymouth "TROPHEE" workshop. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 219(1-2):1-19.
- Benotti MJ, et Brownawell BJ. 2007. Distributions of Pharmaceuticals in an Urban Estuary during both Dry- and Wet-Weather Conditions. *Environmental Science & Technology* 41(16):5795-5802.
- Bergen BJ, Nelson WG, et Pruell RJ. 1993. Bioaccumulation of PCB congeners by blue mussels *Mytilus edulis* deployed in New Bedford Harbor, Massachusetts. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12(9):1671-1681.
- Berny P, Lachaux O, Buronfosse T, Mazallon M, et Gillet C. 2002. Zebra Mussels (*Dreissena polymorpha*) as Indicators of Freshwater Contamination with Lindane. *Environmental Research* 90(2):142-151.
- Betti L, Giannaccini G, Nigro M, Dianda S, Gremigni V, et Lucacchini A. 2003. Studies of peripheral benzodiazepine receptors in mussels: comparison between a polluted and a nonpolluted site. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54(1):36-42.
- Björk M, et Gilek M. 1997. Bioaccumulation kinetics of PCB 31, 49 and 153 in the blue mussel, *Mytilus edulis* L. as a function of algal food concentration. *Aquatic Toxicology* 38(1-3):101-123.
- Broadbent KK, Martincigh BS, Raynor MW, Salter LF, Moulder R, Sjöberg P, et Markides KE. 1996. Capillary supercritical fluid chromatography combined with atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry for the investigation of photoproduct formation in the sunscreen absorber 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate. *Journal of Chromatography A* 732(1):101-110.

- Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, Ramirez A, Banks KE, Johnson RD, et Lewis RJ. 2005. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ Toxicol Chem* 24(2):464-469.
- Bruner KA, Fisher SW, et Landrum PF. 1994. The Role of the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*, In Contaminant Cycling: II. Zebra Mussel Contaminant Accumulation from Algae and Suspended Particles, and Transfer to the Benthic Invertebrate, *Gammarus fasciatus*. *Journal of Great Lakes Research* 20(4):735-750.
- Buser HR, Balmer ME, Schmid P, et Kohler M. 2006. Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants. *Environ Sci Technol* 40(5):1427-1431.
- Calisto V, et Esteves VI. 2009. Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 77(10):1257-1274.
- Casas S. 2007. Modélisation de la bioaccumulation des contaminants organiques (PCB, DDT et HAP) chez la moule, *Mytilus galloprovincialis*, en milieu méditerranéen. Ifremer. p 241.
- Centre Suisse du Contrôle Qualité. Pharmacocinétique, détection et structures chimiques, 3-Benzodiazépines. Centre Suisse du Contrôle Qualité.
- Chu S, et Metcalfe CD. 2007. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1163(1-2):112-118.
- Claisse D. 1989. Chemical contamination of French coasts: The Results of a Ten Years Mussel Watch. *Marine Pollution Bulletin* 20(10):523-528.
- Clara M, Strenn B, Gans O, Martinez E, Kreuzinger N, et Kroiss H. 2005. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research* 39(19):4797-4807.
- Communauté Européenne. 1976. Directive du conseil du 27 juillet 1976 concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux produits cosmétiques. JO L 262. p 169.
- Crane M, Watts C, et Boucard T. 2006. Chronic aquatic environmental risks from exposure to human pharmaceuticals. *Science of The Total Environment* 367(1):23-41.
- Cuderman P, and Heath E. 2007. Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples. *Anal Bioanal Chem* 387(4):1343-1350.
- Cueva-Mestanza R, Torres-Padron ME, Sosa-Ferrera Z, et Santana-Rodriguez JJ. 2008. Microwave-assisted micellar extraction coupled with solid-phase extraction for preconcentration of pharmaceuticals in molluscs prior to determination by HPLC. *Biomed Chromatogr* 22(10):1115-1122.
- Daughton CG. 2004. Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environmental Impact Assessment Review* 24(7-8):711-732.
- Daughton CG, et Ternes TA. 1999. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environ Health Perspect* 107 Suppl 6:907-938.
- David A, Gomez E, Ait-Aissa S, Bachelot M, Rosain D, Casellas C, et Fenet H. 2010. Monitoring organic contaminants in small French coastal lagoons: comparison of levels in mussel, passive sampler and sediment. *J Environ Monit*.
- Deudero S, Box A, March D, Valencia JM, Grau AM, Tintore J, Calvo M, et Caixach J. 2007. Organic compounds temporal trends at some invertebrate species from the Balearics, Western Mediterranean. *Chemosphere* 68(9):1650-1659.

- Dévier M-H, Labadie P, Togola A, et Budzinski H. 2010. Simple methodology coupling microwave-assisted extraction to SPE/GC/MS for the analysis of natural steroids in biological tissues: Application to the monitoring of endogenous steroids in marine mussels *Mytilus* sp. *Analytica Chimica Acta* 657(1):28-35.
- Díaz-Cruz S, Llorca M, et Barceló D. 2008. Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry Advanced MS Analysis of Metabolites and Degradation Products - I* 27(10):873-887.
- EMA. 2006. Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. London: Committee for medicinal products for human use. p 12.
- Felix T, Hall BJ, et S. Brodbelt J. 1998. Determination of benzophenone-3 and metabolites in water and human urine by solid-phase microextraction and quadrupole ion trap GC-MS. *Analytica Chimica Acta* 371(2-3):195-203.
- Fent K, Kunz PY, Zenker A, et Rapp M. 2009a. A tentative environmental risk assessment of the UV-filters 3-(4-methylbenzylidene-camphor), 2-ethyl-hexyl-4-trimethoxycinnamate, benzophenone-3, benzophenone-4 and 3-benzylidene camphor. *Mar Environ Res*.
- Fent K, Weston AA, et Caminada D. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 76(2):122-159.
- Fent K, Zenker A, et Rapp M. 2009b. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environ Pollut*.
- Foran CM, Weston J, Slattery M, Brooks BW, et Huggett DB. 2004. Reproductive Assessment of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Following a Four-Week Fluoxetine (SSRI) Exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46(4):511-517.
- Gagné F, André C, et Gélinas M. Neurochemical effects of benzodiazepine and morphine on freshwater mussels. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* In Press, Corrected Proof.
- Giokas DL, Sakkas VA, et Albanis TA. 2004. Determination of residues of UV filters in natural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-photodiode array detection and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1026(1-2):289-293.
- Giokas DL, Sakkas VA, Albanis TA, et Lampropoulou DA. 2005. Determination of UV-filter residues in bathing waters by liquid chromatography UV-diode array and gas chromatography-mass spectrometry after micelle mediated extraction-solvent back extraction. *Journal of Chromatography A* 1077(1):19-27.
- Giokas DL, Salvador A, et Chisvert A. 2007. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26(5):360-374.
- Goksoyr A, Tollefsen KE, Grung M, Loken K, Lie E, Zenker A, Fent K, Schlabach M, et Huber S. 2009. Balsa raft crossing the Pacific finds low contaminant levels. *Environ Sci Technol* 43(13):4783-4790.
- Goldberg ED. 1975. The mussel watch -- A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 6(7):111-111.
- Goldberg ED, et Bertine KK. 2000. Beyond the Mussel Watch -- new directions for monitoring marine pollution. *The Science of The Total Environment* 247(2-3):165-174.
- Gomez E, Pillon A, Fenet H, Rosain D, Duchesne MJ, Nicolas JC, Balaguer P, et Casellas C. 2005. Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: parabens, UV screens, and musks. *J Toxicol Environ Health A* 68(4):239-251.

- Gomez MJ, Aguera A, Mezcua M, Hurtado J, Mocholi F, et Fernandez-Alba AR. 2007. Simultaneous analysis of neutral and acidic pharmaceuticals as well as related compounds by gas chromatography-tandem mass spectrometry in wastewater. *Talanta* 73(2):314-320.
- González Alonso S, Catalá M, Maroto RR, Gil JLR, de Miguel ÁG, et Valcárcel Y. 2010. Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environment International* 36(2):195-201.
- Gossiaux DC, Landrum PF, et Fisher SW. 1996. Effect of Temperature on the Accumulation Kinetics of PAHs and PCBs in the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*. *Journal of Great Lakes Research* 22(2):379-388.
- Gould GG, Brooks BW, et Frazer A. 2007. [3H] Citalopram Binding to Serotonin Transporter Sites in Minnow Brains. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 101(3):203-210.
- Halling-Sorensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lutzhoft HC, et Jorgensen SE. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review. *Chemosphere* 36(2):357-393.
- Hao C, Zhao X, et Yang P. 2007. GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26(6):569-580.
- Heberer T. 2002a. Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol Lett* 131(1-2):5-17.
- Heberer T. 2002b. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *Journal of Hydrology* 266(3-4):175-189.
- Holbech H, Norum U, Korsgaard B, et Poul B. 2002. The chemical UV-filter 3-benzylidene camphor causes an oestrogenic effect in an in vivo fish assay. *Pharmacol Toxicol* 91(4):204-208.
- INSEE. 2009. *Tourisme - Capacité des communes en hébergement touristique au 1er janvier 2008*. may 2009 ed.
- INSEE. 2010. *Population légale 2007*. 31/12/2009 ed.
- International narcotics control board. 2010. *Psychotropic Substances*. In: Nations U, editor. *Statistics for 2008 Assessments of Annual Medical and Scientific Requirements*. New York: International narcotics control board. p 388.
- Janer G, Lavado R, Thibaut R, et Porte C. 2005. Effects of 17beta-estradiol exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: a possible regulating role for steroid acyltransferases. *Aquat Toxicol* 75(1):32-42.
- Jeon HK, Chung Y, et Ryu JC. 2006. Simultaneous determination of benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1131(1-2):192-202.
- Kimbrough KL, W. E. Johnson, G. G. Lauenstein, J. D. Christensen et D. A. Apeti. 2008. *An Assessment of Two Decades of Contaminant Monitoring in the Nation's Coastal Zone*. Memorandum NOS NCCOS 74. ed. Silver Spring, MD. : NOAA Technical. p 105.
- Kinney CA, Furlong ET, Zaugg SD, Burkhard MR, Werner SL, Cahill JD, et Jorgensen GR. 2006. Survey of organic wastewater contaminants in biosolids destined for land application. *Environ Sci Technol* 40(23):7207-7215.
- Kintz P. 1998. *Toxicologie et pharmacologie médicolégales*. 719 p.
- Kooijman SA. 2001. Quantitative aspects of metabolic organization: a discussion of concepts. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1407):331-349.
- Kooijman SALM, et van Haren RJF. 1990. Animal energy budgets affect the kinetics of xenobiotics. *Chemosphere* 21(4-5):681-693.

- Kümmerer K. 2009. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *Journal of Environmental Management* 90(8):2354-2366.
- Kunz PY, et Fent K. 2006. Multiple hormonal activities of UV filters and comparison of in vivo and in vitro estrogenic activity of ethyl-4-aminobenzoate in fish. *Aquatic Toxicology* 79(4):305-324.
- Kupper T, Plagellat C, Brandli RC, de Alencastro LF, Grandjean D, et Tarradellas J. 2006. Fate and removal of polycyclic musks, UV filters and biocides during wastewater treatment. *Water Research* 40(14):2603-2612.
- Kwon J-W, et Armbrust KL. 2006. Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(10):2561-2568.
- Kwon JW, Armbrust KL, Vidal-Dorsch D, et Bay SM. 2009. Determination of 17 $\alpha$ -ethynylestradiol, carbamazepine, diazepam, simvastatin, and oxybenzone in fish livers. *J AOAC Int* 92(1):359-369.
- L'Assurance Maladie. 2009. *Medic'am 2004-2008*. septembre 2009 ed: L'assurance maladie.
- Lambropoulou DA, Giokas DL, Sakkas VA, Albanis TA, et Karayannis MI. 2002. Gas chromatographic determination of 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone and octyldimethyl-p-aminobenzoic acid sunscreen agents in swimming pool and bathing waters by solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A* 967(2):243-253.
- Langford KH, et Thomas KV. 2008. Inputs of chemicals from recreational activities into the Norwegian coastal zone. *J Environ Monit* 10(7):894-898.
- Le Bris H, et Pouliquen H. 2004. Experimental study on the bioaccumulation of oxytetracycline and oxolinic acid by the blue mussel (*Mytilus edulis*). An evaluation of its ability to bio-monitor antibiotics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 48(5-6):434-440.
- Li W, Ma Y, Guo C, Hu W, Liu K, Wang Y, et Zhu T. 2007. Occurrence and behavior of four of the most used sunscreen UV filters in a wastewater reclamation plant. *Water Research* 41(15):3506-3512.
- Lister A, Regan C, Van Zwol J, et Van Der Kraak G. 2009. Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: A mechanistic evaluation. *Aquatic Toxicology* 95(4):320-329.
- Livingstone DR. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 120(1):43-49.
- Loffler D, Rombke J, Meller M, et Ternes TA. 2005. Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environ Sci Technol* 39(14):5209-5218.
- Loraine GA, et Pettigrove ME. 2006. Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in southern California. *Environ Sci Technol* 40(3):687-695.
- Lucas R, McMichael T, Smith W, et Armstrong B. 2006. Solar Ultraviolet Radiation. Global burden of disease from solar ultraviolet radiation. Geneva: World Health Organization. p 258.
- Ma R, Cotton B, Lichtensteiger W, et Schlumpf M. 2003. UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicol Sci* 74(1):43-50.
- Mackay D, et Fraser A. 2000. Kenneth Mellanby Review Award. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environ Pollut* 110(3):375-391.

- Maltby L, Naylor C, et Calow P. 1990. Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 19(3):292-300.
- Meinerling M, et Daniels M. 2006. A validated method for the determination of traces of UV filters in fish using LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 386(5):1465-1473.
- Mennigen JA, Harris EA, Chang JP, Moon TW, et Trudeau VL. 2009. Fluoxetine affects weight gain and expression of feeding peptides in the female goldfish brain. *Regulatory Peptides* 155(1-3):99-104.
- Mennigen JA, Martyniuk CJ, Crump K, Xiong H, Zhao E, Popescu J, Anisman H, Cossins AR, Xia X, et Trudeau VL. 2008. Effects of fluoxetine on the reproductive axis of female goldfish (*Carassius auratus*). *Physiol Genomics* 35(3):273-282.
- Metcalf CD, Chu S, Judt C, Li H, Oakes KD, Servos MR, et Andrews DM. 2010. Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(1):79-89.
- Metcalf CD, Koenig BG, Bennie DT, Servos M, Ternes TA, et Hirsch R. 2003. Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants. *Environ Toxicol Chem* 22(12):2872-2880.
- Météo France. 2008. Climathèque. Météo France.
- Meylan WM, Howard PH, Boethling RS, Aronson D, Printup H, et Gouchie S. 1999. Improved method for estimating bioconcentration/bioaccumulation factor from octanol/water partition coefficient. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(4):664-672.
- Moldovan Z. 2006. Occurrences of pharmaceutical and personal care products as micropollutants in rivers from Romania. *Chemosphere* 64(11):1808-1817.
- Monirith I, Ueno D, Takahashi S, Nakata H, Sudaryanto A, Subramanian A, Karuppiah S, Ismail A, Muchtar M, Zheng J, Richardson BJ, Prudente M, Hue ND, Tana TS, Tkalin AV, et Tanabe S. 2003. Asia-Pacific mussel watch: monitoring contamination of persistent organochlorine compounds in coastal waters of Asian countries. *Marine Pollution Bulletin* 46(3):281-300.
- Montiel A. 2006. Les résidus de médicaments et le traitement des effluents d'hôpitaux. *Environnement, Risques et Santé* 5:296-300.
- Morando MB, Medeiros LR, et McDonald MD. 2009. Fluoxetine treatment affects nitrogen waste excretion and osmoregulation in a marine teleost fish. *Aquatic Toxicology* 93(4):253-260.
- Morrison H, Yankovich T, Lazar R, et Haffner GD. 1995. Elimination rate constants of 36 PCBs in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and exposure dynamics in the Lake St. Clair - Lake Erie corridor. *Canadian journal of fisheries and aquatic sciences* 52(12):2574-2582.
- Mottaleb MA, Usenko S, O'Donnell JG, Ramirez AJ, Brooks BW, et Chambliss CK. 2009. Gas chromatography-mass spectrometry screening methods for select UV filters, synthetic musks, alkylphenols, an antimicrobial agent, and an insect repellent in fish. *Journal of Chromatography A* 1216(5):815-823.
- Naes K, Knutzen J, et Berglund L. 1995. Occurrence of PAH in marine organisms and sediments from smelter discharge in Norway. *Science of The Total Environment* 163(1-3):93-106.
- Nagtegaal M, Ternes T, Baumann W, et Nagel R. 1997. UV-Filtersubstanzen in Wasser und Fischen. *Umweltwissenschaften und Schadstoff-Forschung* 9(2):79-86.
- Nakamura Y, Yamamoto H, Sekizawa J, Kondo T, Hirai N, et Tatarazako N. 2008. The effects of pH on fluoxetine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Acute toxicity in fish larvae and bioaccumulation in juvenile fish. *Chemosphere* 70(5):865-873.

- Namiesnik J, Moncheva S, Park Y-S, Ham K-S, Heo B-G, Tashma Z, Katrich E, et Gorinstein S. 2008. Concentration of bioactive compounds in mussels *Mytilus galloprovincialis* as an indicator of pollution. *Chemosphere* 73(6):938-944.
- Neely WB, Branson DR, et Blau GE. 1974. Partition coefficient to measure bioconcentration potential of organic chemicals in fish. *Environmental Science & Technology* 8(13):1113-1115.
- Negreira N, Rodriguez I, Rubi E, et Cela R. 2009. Determination of selected UV filters in indoor dust by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1216(31):5895-5902.
- Nikolaou A, Meric S, et Fatta D. 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Anal Bioanal Chem* 387(4):1225-1234.
- Okay OS, Donkin P, Peters LD, et Livingstone DR. 2000. The role of algae (*Isochrysis galbana*) enrichment on the bioaccumulation of benzo[a]pyrene and its effects on the blue mussel *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution* 110(1):103-113.
- Papa E, Dearden JC, et Gramatica P. 2007. Linear QSAR regression models for the prediction of bioconcentration factors by physicochemical properties and structural theoretical molecular descriptors. *Chemosphere* 67(2):351-358.
- Papp R. 2009. Les propriétés environnementales des substances. Collège National d'Experts en Environnement de l'Industrie Chimique. p 116.
- Paterson G, et Metcalfe CD. 2008. Uptake and depuration of the anti-depressant fluoxetine by the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 74(1):125-130.
- Peck AM. 2006. Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. *Anal Bioanal Chem* 386(4):907-939.
- Pietrogrande MC, et Basaglia G. 2007. GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry - Emerging contaminants in wastewaters* 26(11):1086-1094.
- Plagellat C. 2004. Origines et flux de biocides et de filtres uv dans les stations d'épuration des eaux usées. Lausanne: ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE. 222 p.
- Plagellat C, Kupper T, Furrer R, de Alencastro LF, Grandjean D, et Tarradellas J. 2006. Concentrations et specific loads of UV filters in sewage sludge originating from a monitoring network in Switzerland. *Chemosphere* 62(6):915-925.
- Poiger T, Buser H-R, Balmer ME, Bergqvist P-A, et Müller MD. 2004. Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes. *Chemosphere* 55(7):951-963.
- Ramirez AJ, Brain RA, Usenko S, Mottaleb MA, O'Donnell JG, Stahl LL, Wathen JB, Snyder BD, Pitt JL, Perez-Hurtado P et al. . 2009. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in fish: Results of a national pilot study in the U.S. *Environ Toxicol Chem*:1.
- Ramirez AJ, Mottaleb MA, Brooks BW, et Chambliss CK. 2007. Analysis of pharmaceuticals in fish using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 79(8):3155-3163.
- Ramu K, Kajiwarra N, Isobe T, Takahashi S, Kim E-Y, Min B-Y, We S-U, et Tanabe S. 2007. Spatial distribution and accumulation of brominated flame retardants, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in blue mussels (*Mytilus edulis*) from coastal waters of Korea. *Environmental Pollution* 148(2):562-569.
- Rastogi SC. 2002. UV filters in sunscreen products--a survey. *Contact Dermatitis* 46(6):348-351.

- Redshaw C, Cooke M, Talbot H, McGrath S, et Rowland S. 2008. Low biodegradability of fluoxetine HCl, diazepam and their human metabolites in sewage sludge-amended soil. *Journal of Soils and Sediments* 8(4):217-230.
- Rice SL, et Mitra S. 2007. Microwave-assisted solvent extraction of solid matrices and subsequent detection of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) using gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 589(1):125-132.
- Riva A, et Massé H. 1983. Etude écophysiologique de quelques mollusques bivalves. *Bases biologiques de l'aquaculture Montpellier* 1:17.
- Rodil R, et Moeder M. 2008a. Development of a method for the determination of UV filters in water samples using stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1179(2):81-88.
- Rodil R, et Moeder M. 2008b. Development of a simultaneous pressurised-liquid extraction and clean-up procedure for the determination of UV filters in sediments. *Anal Chim Acta* 612(2):152-159.
- Rodil R, Moeder M, Altenburger R, et Schmitt-Jansen M. 2009a. Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water. *Anal Bioanal Chem* 395(5):1513-1524.
- Rodil R, Schrader S, et Moeder M. 2009b. Non-porous membrane-assisted liquid-liquid extraction of UV filter compounds from water samples. *Journal of Chromatography A* 1216(24):4887-4894.
- Rosen G, et Lotufo GR. 2007. Bioaccumulation of explosive compounds in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Ecotoxicol Environ Saf* 68(2):237-245.
- Sabljić A. 2001. QSAR models for estimating properties of persistent organic pollutants required in evaluation of their environmental fate and risk. *Chemosphere* 43(3):363-375.
- Sakkas VA, Giokas DL, Lambropoulou DA, et Albanis TA. 2003. Aqueous photolysis of the sunscreen agent octyl-dimethyl-p-aminobenzoic acid: Formation of disinfection byproducts in chlorinated swimming pool water. *Journal of Chromatography A* 1016(2):211-222.
- Sanchez-Prado L, Garcia-Jares C, et Llompарт M. 2010. Microwave-assisted extraction: Application to the determination of emerging pollutants in solid samples. *Journal of Chromatography A* 1217(16):2390-2414.
- Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, Haller V, Steinmann B, et Lichtensteiger W. 2001. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ Health Perspect* 109(3):239-244.
- Schlumpf M, Kypke K, et CC, Birchler M, Durrer S, Faass O, Ehnes C, Fuetsch M, Gaille C, Henseler M Hofkamp L, Maerkel K, Reolon S, Zenker A, Timms B, Tresguerres JA F, et Lichtensteigera W. 2008. Endocrine Active UV Filters: Developmental Toxicity and Exposure Through Breast Milk. *CHIMIA International Journal for Chemistry* 62:345-351.
- Schlumpf M, Schmid P, Durrer S, Conscience M, Maerkel K, Henseler M, Gruetter M, Herzog I, Reolon S, Ceccatelli R, Faass O, Stutz E, Jarry H, Wuttke W, et Lichtensteiger W. 2004. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters-an update. *Toxicology* 205(1-2):113-122.
- Schultz MM, Furlong ET, Kolpin DW, Werner SL, Schoenfuss HL, Barber LB, Blazer VS, Norris DO, et Vajda AM. 2010. Antidepressant Pharmaceuticals in Two U.S. Effluent-Impacted Streams: Occurrence and Fate in Water and Sediment, and Selective Uptake in Fish Neural Tissue. *Environ Sci Technol*.

- Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, et Negele RD. 2004a. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat Toxicol* 68(2):141-150.
- Schwaiger J, Ferling H, Mallow U, Wintermayr H, et Negele RD. 2004b. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac: Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 68(2):141-150.
- Shek WM, Murphy MB, Lam JCW, et Lam PKS. 2008. Polycyclic musks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) from Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin 5th International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology* 57(6-12):373-380.
- Siegener R, et Chen RF. 2002. Caffeine in Boston Harbor seawater. *Mar Pollut Bull* 44(5):383-387.
- Smyth SA, Lishman L, Alae M, Kleywegt S, Svoboda L, Yang J-J, Lee H-B, et Seto P. 2007. Sample storage and extraction efficiencies in determination of polycyclic and nitro musks in sewage sludge. *Chemosphere* 67(2):267-275.
- Soto AM, et Sonnenschein C. 2005. Shining a light on sunscreens. *Endocrinology* 146(5):2127-2129.
- Stanley JK, Ramirez AJ, Chambliss CK, et Brooks BW. 2007. Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate. *Chemosphere* 69(1):9-16.
- Straub JO. 2002a. Concentrations of the UV filter ethylhexyl methoxycinnamate in the aquatic compartment: a comparison of modelled concentrations for Swiss surface waters with empirical monitoring data. *Toxicology Letters* 131(1-2):29-37.
- Straub JO. 2002b. Environmental risk assessment for new human pharmaceuticals in the European Union according to the draft guideline/discussion paper of January 2001. *Toxicol Lett* 135(3):231-237.
- Tanabe S. 2000. Asia-Pacific Mussel Watch Progress Report. *Marine Pollution Bulletin* 40(8):651-651.
- Ternes T, Bonerz M, et Schmidt T. 2001. Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 938(1-2):175-185.
- Ternes TA. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* 32(11):3245-3260.
- Ternes TA. 2001. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 20(8):419-434.
- Thomas KV, et Hilton MJ. 2004. The occurrence of selected human pharmaceutical compounds in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 49(5-6):436-444.
- Togola A, et Budzinski H. 2007. Development of Polar Organic Integrative Samplers for Analysis of Pharmaceuticals in Aquatic Systems. *Analytical Chemistry* 79(17):6734-6741.
- Togola A, et Budzinski H. 2008. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A* 1177(1):150-158.
- Unceta N, Sampedro MC, Bakar NKA, Gómez-Caballero A, Goicolea MA, et Barrio RJ. 2010. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in wastewaters by dual solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1217(20):3392-3399.
- van der Ven K, Keil D, Moens LN, Hummelen PV, van Remortel P, Maras M, et De Coen W. 2006. Effects of the antidepressant mianserin in zebrafish: Molecular markers of endocrine disruption. *Chemosphere* 65(10):1836-1845.

- van der Ven K, Van Dongen W, Maes BUW, Esmans EL, Blust R, et De Coen WM. 2004. Determination of diazepam in aquatic samples by capillary liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Chemosphere* 57(8):967-973.
- Van Haren RJF, et Kooijman SALM. 1993. Application of a dynamic energy budget model to *Mytilus edulis* (L.). *Netherlands Journal of Sea Research* 31(2):119-133.
- van Haren RJF, Schepers HE, et Kooijman SALM. 1994. Dynamic energy budgets affect kinetics of xenobiotics in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Chemosphere* 29(2):163-189.
- Vitellaro-Zuccarello L, Biasi S, et Amadeo A. 1990. Immunocytochemical demonstration of neurotransmitters in the nerve plexuses of the foot and the anterior byssus retractor muscle of the mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Cell and Tissue Research* 261(3):467-476.
- Weigel S, Berger U, Jensen E, Kallenborn R, Thoresen H, et Huhnerfuss H. 2004. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere* 56(6):583-592.
- Weigel S, Kuhlmann J, et Huhnerfuss H. 2002. Drugs and personal care products as ubiquitous pollutants: occurrence and distribution of clofibrilic acid, caffeine and DEET in the North Sea. *Sci Total Environ* 295(1-3):131-141.
- Wick A, Fink G, Joss A, Siegrist H, et Ternes TA. 2009. Fate of beta blockers and psycho-active drugs in conventional wastewater treatment. *Water Research* 43(4):1060-1074.
- Zenker A, Schmutz H, et Fent K. 2008. Simultaneous trace determination of nine organic UV-absorbing compounds (UV filters) in environmental samples. *J Chromatogr A* 1202(1):64-74.

# Annexes



# **Annexe 1 : Développement d'un médicament**

Le développement d'un médicament implique un certain nombre d'étapes qui fournissent de nombreuses informations sur la substance chimique et son utilisation. 10 à 15 ans sont nécessaires pour la découverte et le développement d'un nouveau médicament ; sur 10 000 molécules testées, 1 seule sera mise sur le marché. Pour être commercialisé, tout médicament fabriqué industriellement doit faire l'objet d'une Autorisation de Mise sur le Marché (Balk and Ford 1999) délivrée par les autorités compétentes européennes ou nationales que sont l'Agence Européenne pour l'Évaluation des Médicaments (EMA) ou l'Agence française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (Afsaps).

## **I.1. Dossier d'AMM**

Les laboratoires pharmaceutiques déposent auprès des autorités compétentes un dossier de demande d'AMM qui sera évalué selon des critères scientifiques de qualité, de sécurité et d'efficacité. Il existe deux types de procédures de demande d'AMM : les procédures communautaires utilisées lorsque le médicament est destiné à plusieurs Etats membres de la Communauté Européenne et la procédure nationale destinée aux médicaments qui sont commercialisés dans un seul Etat membre, ce type de procédure est de moins en moins utilisé.

L'accès au marché communautaire est, depuis le 1er janvier 1998, soumis soit à la procédure centralisée (définie dans le règlement (CEE) du Conseil 23/09/93), soit à la procédure de reconnaissance mutuelle (prévue notamment dans la directive 75/319/CEE). La procédure centralisée est obligatoire pour les produits issus des biotechnologies et optionnelle pour les nouvelles substances actives. Le laboratoire dépose son dossier de demande d'enregistrement à l'Agence Européenne pour l'Évaluation des Médicaments (EMA) dont le siège est à Londres. Si l'autorisation est octroyée, elle est d'emblée valable pour tous les pays membres de l'Union Européenne. Pour la procédure de reconnaissance mutuelle, le laboratoire dépose son dossier dans l'un des Etats membres. Si l'autorisation est accordée, elle peut être étendue aux autres Etats membres par une procédure de reconnaissance mutuelle. Le dossier de demande d'AMM contient les résultats des essais cliniques des phases 1 à 3 et une évaluation des risques environnementaux.

### **I.1.1. Phase d'essai pré-clinique**

Les premières étapes du développement d'un nouveau médicament visent à identifier et à sélectionner une molécule ou une classe de molécules susceptibles d'avoir un intérêt thérapeutique. Les molécules sont soumises à des tests rapides et automatisés qui servent à mesurer l'interaction avec une cible. Ils ont pour but de rechercher des structures moléculaires ayant le profil d'activité

souhaité (têtes de série). A partir de là, on va optimiser la molécule et la synthèse moléculaire. La molécule ainsi sélectionnée peut être issue d'une base de données, des avancées de la recherche biomédicale ou provenir d'une modification structurelle d'un actif préexistant. Une fois qu'une molécule est mise en lumière par le screening, débute le vaste chantier des tests chimiques et biologiques, tous effectués dans un but précis : prouver la sélectivité, la sécurité, l'efficacité et la développabilité de la molécule étudiée. Les tests sont d'abord pratiqués in vitro puis chez l'animal (pharmacologiques, pharmacocinétiques, pharmacodynamiques, toxicologiques...) permettant d'étudier le comportement et d'affirmer l'innocuité du candidat médicament. À ce stade, et si tous les résultats obtenus sont positifs, les tests cliniques sur des volontaires sains puis sur les premiers patients peuvent débiter.

### I.1.2. Développement clinique

Les études cliniques ont pour objet de vérifier l'innocuité du futur médicament et de mesurer son efficacité chez l'homme. L'objectif est de mettre en évidence un Service Médical Rendu (SMR) maximal et de garantir aux patients un rapport bénéfice/risque optimal.

#### I.1.2.1 Phase 1

Les premières administrations à l'homme se font sur un petit nombre de volontaires sains dans le but d'évaluer la sécurité du médicament et ses interactions avec l'organisme. Elles incluent des études de tolérance visant à trouver la dose maximale tolérée et des études de pharmacocinétique (administration, diffusion, métabolisme, excrétion) au cours desquelles sont également mesurés des paramètres pharmacologiques.

#### I.1.2.2 Phase 2

Les essais de phase 2 sont menés sur un petit groupe homogène de **patients**, avec pour objectif d'étudier **l'efficacité du produit**, d'analyser l'activité du futur médicament en termes d'effets dose-réponse et de déterminer la **posologie** optimale pour les essais de phase 3. Des études d'interactions médicamenteuses et de pharmacocinétique peuvent avoir lieu dès cette phase.

#### I.1.2.3 Phase 3

Les essais de phase 3 visent à apporter des preuves substantielles d'efficacité et de tolérance du médicament. Ils se déroulent sous forme d'essais comparatifs réalisés sur plusieurs centaines de patients. Le traitement en cours d'évaluation est comparé soit à un placebo, soit à un médicament de référence dans l'indication thérapeutique étudiée. L'efficacité du traitement est mesurée sur des

critères de jugement définis avant le début de l'essai. Le principe de l'essai repose sur l'attribution aléatoire des traitements et l'utilisation du double-aveugle. A ce stade, les études sont multicentriques et internationales. A l'issue de la phase 3, la détermination de la tolérance et de l'efficacité du produit permet d'évaluer son rapport bénéfice/risque. Après ces essais, le dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) est constitué.

#### I.1.2.4 Phase 4

Ces études sont réalisées après la mise sur le marché du médicament, elles sont réalisées dans les **conditions habituelles d'emploi** définies par l'Autorisation de Mise sur le Marché du médicament. Ces essais permettent d'affiner la connaissance du médicament et de mieux évaluer sa place dans la stratégie thérapeutique de la maladie. Les substances pharmaceutiques humaines sont principalement introduites dans l'environnement après utilisation par l'homme. La forme d'introduction de la substance dans l'environnement dépend du comportement du médicament dans l'organisme. Ce comportement est étudié lors de la mise sur le marché d'un médicament par les études de pharmacocinétique. Ces études fournissent les voies de dégradation et les voies d'élimination des substances. Classiquement quelque soit la forme d'élimination, les médicaments ou leur métabolites sont éliminés dans les eaux usées.

### I.1.3. Eléments de pharmacologie

Les phases d'essais cliniques permettent d'établir les paramètres pharmacocinétiques, définissant le comportement du médicament dans l'organisme, de son absorption à son élimination. Or la voie d'introduction principale des substances pharmaceutiques dans l'environnement est l'excrétion après utilisation. La forme d'excrétion par l'homme a donc une grande importance quant au devenir du médicament dans l'environnement. L'élimination des médicaments de l'organisme résulte de l'addition de deux processus principaux : la capacité métabolique de différents organes en premier lieu le foie, et l'excrétion sous toutes ses formes principalement rénale (urine) mais aussi hépatique (bile).

#### I.1.3.1 Métabolisation

Le terme de métabolisme fait référence à la transformation, par une réaction enzymatique d'un médicament en un ou plusieurs autres composés actifs ou inactifs au plan pharmacologique. De nombreux tissus peuvent réaliser cette transformation (peau, poumon, rein, intestin...). Néanmoins, le principal site de biotransformation est situé au niveau hépatique, dans les enzymes des microsomes. Les hépatocytes contiennent un grand nombre d'enzymes impliquées dans la transformation des

médicaments, en particulier les réactions d'oxydoréduction, les hydroxylations ou la rupture oxydative des liaisons N-C et O-C. L'élément fondamental de ce système enzymatique est le cytochrome P450 comprenant de nombreuses isoenzymes.

On distingue 2 phases de métabolisme selon les processus de transformation induits par ces enzymes : les réactions de phase I et celles de phase II.

Lorsqu'un médicament est métabolisé, il l'est rarement de façon unique et plusieurs voies métaboliques sont possibles. Tous les métabolites ne sont d'ailleurs pas toujours identifiés (en particulier à cause des problèmes analytiques qui se posent pour les isoler, les caractériser et définir leur structure).

### *Réactions de phase I*

Les réactions **d'oxydation** sont majoritairement localisées dans les microsomes hépatiques. Elles consomment du NADPH (nicotinamide phosphate réduit), de l'oxygène moléculaire et passent par les cytochromes P450. Les réactions de **réduction** sont beaucoup moins fréquentes et moins bien explorées. La réduction n'intervient pas exclusivement au niveau hépatique mais également dans l'intestin via la flore bactérienne. **L'hydrolyse** enfin est une voie métabolique banale qui intervient dans le foie, dans différents tissus et même dans le plasma. Les enzymes de type des estérases sont le plus souvent non spécifiques. La réaction d'hydrolyse par clivage d'un ester ou d'un amide, est chez l'homme, très rapide. L'oxydation, la réduction et l'hydrolyse sont des biotransformations regroupées sous le terme de « métabolisme de phase I » qui conduisent à des dérivés dont les groupements fonctionnels sont le plus souvent des hydroxyles (-OH), des amines (-NH<sub>2</sub>) ou des carboxyles (-COOH).

### *Réactions de phase II*

Les groupements fonctionnels issus des réactions de phase I peuvent être ensuite conjugués. C'est la réaction de phase II. Les mécanismes de conjugaison chez l'homme font généralement appel à l'acide glucuronique, au glyco-colle, au sulfate ou à l'acétyle. **Glucuroconjugaison**. La conjugaison avec l'acide glucuronique est la plus fréquente des conjugaisons. Elle est catalysée par le système enzymatique de la glucuronyltransférase et concerne les molécules possédant un groupement hydroxylé, carboxylé ou aminé. Les glucuronides sont très hydrosolubles ce qui explique la facilité avec laquelle ils sont éliminés dans l'urine et la bile. Dans quelques cas, les esters sont instables et après hydrolyse dans l'urine ou le plasma redonnent la molécule mère.

### I.1.3.2 Elimination

#### *Elimination rénale*

La plupart des molécules sont éliminées dans les urines, soit sous forme inchangée, soit sous forme de produits de dégradation. Le plus souvent les médicaments ou leurs métabolites ont une masse moléculaire bien inférieure à 5000 et sont de ce fait filtrés par le glomérule. Seule la partie non fixée est filtrée. La réabsorption tubulaire intervient tout au long du néphron. Il s'agit le plus souvent d'un processus passif qui est influencé par le degré d'ionisation du médicament : seule la fraction non ionisée au pH urinaire est réabsorbée. Cette propriété est utilisée dans certains surdosages pour accélérer l'élimination du médicament en alcalinisant les urines pour bloquer la réabsorption. Une sécrétion active est également observée pour quelques molécules, entre autres des cations ou anions qui sont sécrétés dans la lumière du tubule par des systèmes de transport spécifiques, consommant de l'énergie et à capacité saturable. On peut donc observer des phénomènes de compétition.

#### *Elimination hépatique*

Outre ses capacités métaboliques, le foie participe à l'excrétion des médicaments hors de l'organisme par le biais du système biliaire. Après excrétion dans la bile, le médicament se retrouve dans la lumière intestinale (où il peut être réabsorbé).

#### *Elimination digestive*

Les produits administrés par la muqueuse intestinale ayant une action locale dans le tube digestif et les produits absorbés par la muqueuse digestive insolubles dans l'eau passent alors dans la bile et sont éliminés dans les fèces.

#### *Autres voies d'excrétion*

Les autres voies (salivaire, pulmonaire...) sont usuellement négligeables par rapport aux voies rénale et hépatique.

## **I.2. Evaluation du risque environnemental (EMEA 2006)**

Depuis 2006, en accord avec l'article 8 de la directive 2001/83/EC, une évaluation des risques environnementaux doit accompagner les dossiers de demande d'AMM pour les médicaments humains. Cette évaluation doit suivre les recommandations de l'EMEA (EMEA 2006) ; elle a pour but de fournir des informations sur le comportement du médicaments dans l'environnement et des pistes quant à sa toxicité potentielle. Cette évaluation est une démarche par étapes, constituée de 2

phases. La première vise à évaluer l'exposition ; si cette exposition est faible, l'évaluation s'arrête là. Sinon, la seconde étape récolte et évalue des informations quant au devenir et aux effets de la substance dans l'environnement. Certaines substances, comme celles qui sont particulièrement lipophiles ou des perturbateurs endocriniens potentiels peuvent nécessiter une approche indépendante de la quantité libérée dans l'environnement.

### **I.2.1. Phase 1 : Estimation de l'exposition**

L'estimation de l'exposition en phase 1 concerne uniquement la substance mère quels que soient la voie d'administration, la forme pharmaceutique, le métabolisme et l'excrétion.

#### **I.2.1.1 Persistance, bioaccumulation et toxicité**

Se référant à la Convention OSPAR, les substances médicamenteuses ayant un  $\log K_{ow}$  supérieur à 4,5, doivent faire l'objet d'une étude poussée de persistance, de bioaccumulation et de toxicité.

#### **I.2.1.2 Calcul de la Concentration Prévisible dans l'Environnement (PEC)**

Dans la Phase 1, le calcul de la PEC est limité au compartiment aquatique. Le calcul initial de la PEC dans l'eau de surface suppose plusieurs points. La quantité utilisée prévue par an est répartie uniformément sur l'année et sur l'ensemble de la zone géographique. Le système de traitement des eaux usées est la voie principale d'introduction des médicaments dans l'eau de surface. Il n'y a pas de biodégradation ou de rétention de la substance médicamenteuse dans la station d'épuration (STEP). Le métabolisme chez le patient n'est pas pris en compte. Le facteur de pénétration du marché ( $F_{pen}$ ) pour la nouvelle molécule est une valeur par défaut fixée par l'EMA, soit affiné en fournissant des données raisonnablement justifiées, par exemple, basées sur les données épidémiologiques publiées. Les recommandations de l'EMA fournissent une formule à utiliser par défaut pour estimer la concentration dans les eaux de surface :

$$PEC_{\text{eau surface}} = \frac{\text{dose journalière maximale consommée par habitant} \times F_{pen}}{\text{Quantité d'eaux usées par personne et par jour} \times \text{Facteur de dilution}}$$

Pour chaque paramètre, il existe une valeur par défaut fournie par le guide.

#### **I.2.1.3 Critères de décision**

Si la valeur de la PEC en eau de surface est inférieure à 0,01  $\mu\text{g/l}$  et qu'aucune autre préoccupation environnementale n'est mise en évidence, on suppose que ce médicament est peu susceptible de présenter un risque environnemental lié à l'utilisation en médecine humaine :

l'évaluation s'arrête. Si la valeur de la PEC dans les eaux de surface est supérieure ou égale à 0,01 µg/l, alors une phase 2 de devenir environnemental et d'analyse d'effets doit être effectuée. Dans certains cas, le critère de décision ne peut être appliqué : certains médicaments peuvent affecter la reproduction des animaux inférieurs ou vertébrés à des concentrations inférieures à 0,01 µg/l. Ces substances doivent alors entrer dans la phase 2 et une stratégie d'évaluation des risques adaptée doit être suivie prenant en compte ses mécanismes d'action spécifique.

### **I.2.2. Phase 2 : Devenir dans l'environnement et analyse des effets**

L'évaluation recommandée en phase 2 est d'abord basée sur l'évaluation du rapport PEC/PNEC à partir de tests environnementaux pertinents et de concentrations environnementales prévues dans la partie A. Si un impact environnemental potentiel est mis en évidence, des tests plus poussés doivent permettre d'affiner les valeurs de PEC et de PNEC dans la partie B. Les études expérimentales doivent se référer au protocole de l'Union Européenne, de l'Organisation et Coopération de Développement Economique (OECD) ou de l'ISO. Dans le cas contraire, le choix doit être argumenté dans le rapport d'évaluation des risques environnementaux. Enfin, toutes les données pertinentes doivent être prises en compte telles que les propriétés physicochimiques, la pharmacodynamique, la toxicologie, le métabolisme...

#### *Partie A : Analyse initiale du devenir dans l'environnement et des effets*

Les analyses environnementales de la partie A (Tableau 31) sont effectuées sur le principe actif sauf exception dûment justifiée, par exemple si le médicament est une pro-drogue.

**Tableau 31. Etudes physico-chimiques, de devenir et d'effets recommandés dans la partie A de la phase II, d'après EMEA 2006**

<b>Type d'étude</b>	<b>Protocole recommandé</b>
Propriétés physico-chimiques et devenir	
Biodégradabilité Facile	OCDE 301
Adsorption/désorption selon une méthode d'équilibres successifs	OCDE 106
Estimation du coefficient d'adsorption ( $K_{oc}$ ) sur le sol et les boues d'épuration par chromatographie en phase liquide à haute performance (CLHP)	OCDE 121
Coefficient de partage octanol eau ( $K_{ow}$ )	TGD
Transformation aérobie et anaérobie dans les sédiments aquatiques	OCDE 308
Etudes des effets aquatiques	
Algues, Essai d'inhibition de la croissance	OCDE 201
Daphnia magna, essai de reproduction	OCDE 211
Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie	OCDE 210
Boue activée, essai d'inhibition de la respiration	OCDE 209

Le calcul de la PNEC est réalisé en appliquant un facteur d'estimation à la NOEC des études d'effets pertinentes. Le facteur d'estimation est l'expression du degré d'incertitude lors de l'extrapolation à partir des données issues des tests sur un nombre limité d'espèces à l'environnement réel. Des PNEC sont calculées pour l'eau de surface, les microorganismes et l'eau souterraine.

#### *Résultats de la partie A et analyse des effets*

Lorsque les études de la partie A ont été effectuées, un ensemble de données est disponible concernant : la toxicité à long terme sur les algues, les daphnies et les poissons ; des données sur l'inhibition microbienne et le taux d'absorption sur la matière organique ( $K_{oc}$ ). De plus, la  $PEC_{eau}$  de surface a été affinée avec des informations sur la prévision des ventes du produit. Les quotients de risques sont recalculés. Si les rapports PEC sur PNEC sont inférieurs à 1, alors on considère que le médicament n'est pas susceptible de représenter un risque pour l'environnement aquatique et l'évaluation du risque s'arrête là. Si un des rapports PEC sur PNEC pour l'eau de surface ou l'eau souterraine est supérieur à 1, ou si le rapport PEC sur PNEC pour les microorganismes est supérieur à 0,1, une évaluation plus approfondie est nécessaire et développée dans la partie B. Elle porte de

préférence sur le devenir du médicament et / ou de ses métabolites dans l'environnement aquatique. Si une substance n'est pas facilement biodégradable et que les résultats des études du système eau sédiment indiquent une affinité du médicament pour les sédiments, une évaluation des effets sur les organismes benthiques doit être envisagée. Si le  $K_{ow}$  est supérieur à 1000 (potentiel de bioaccumulation), le facteur de bioconcentration doit être examiné dans la partie B. Si le KOC est supérieur à 10 000 l/kg (risque d'adsorption sur les boues d'épuration), une évaluation environnementale terrestre du médicament doit être menée, à moins que la substance ne soit facilement biodégradable.

### *Partie B : Analyse étendue du devenir dans l'environnement et des effets*

Dans la partie B, l'évaluation des risques est affinée en ciblant les PEC et PNEC pour lesquelles un risque potentiel a été mis en évidence dans la partie A pour la molécule mère mais aussi pour les fractions de métabolites représentant plus de 10% de la quantité de médicament excrétée. L'évaluation des risques ne s'étend pas jusqu'à la transformation dans l'environnement considérée comme devant faire l'objet de jugement d'expert. Une évaluation des risques spécifiques doit être menée pour les médicaments avec un  $\log K_{ow} > 4,5$ . Lorsqu'un risque particulier pour les microorganismes ou pour la faune benthique est identifié, ce risque doit être étudié et comparé aux PEC spécifiques calculées (Tableau 32).

### *Résultats de la partie B et analyse des effets*

A la fin de la partie B, des informations provenant des données affinées sont disponibles comportant des informations sur les voies d'excrétion, des informations qualitatives et quantitatives sur les composés excrétés et éventuellement des compléments d'information sur la toxicité à long terme, sur l'inhibition microbienne ou sur la biodégradabilité de la substance.

**Tableau 32. Etudes complémentaires de devenir et d'effets recommandées dans la partie B de la phase**

**II de l'analyse des risques environnementaux pour les médicaments, d'après EMEA 2006**

<b>Type d'étude</b>	<b>Protocole recommandé</b>
<b>Devenir environnemental</b>	
Modélisation de STEP incorporant les tests de biodégradation facile (OCDE 301) et les données d'adsorption sur les boues (OCDE 106)	Décrit dans European Union System for the Evaluation of Substances
Affinage de la PEC eau de surface	Formule fournie
<b>Effets sur le système eau-sédiment</b>	
Effets sur les organismes benthiques (Hyalella sp. ; Lumbricus sp. ou Chironomus sp.)	Non spécifié
<b>Effets spécifiques sur les microorganismes</b>	
Calcul de la PEC bassin d'aération en vue d'affiner le quotient de risque microorganismes	Non spécifié
Détermination de la PNEC microorganismes : essais standardisés sur des espèces seules (par exemple : Pseudomonas putida)	TGD
Calcul du quotient de risque ainsi affiné : s'il est supérieur à 1 des tests complémentaires doivent être menés	Non spécifié
<b>Etudes d'effets et de devenir terrestre</b>	
Calcul de la PEC sol	
Transformation aérobie et anaérobie dans le sol	OCDE 307
Microorganismes du sol : essais de transformation de l'azote	OCDE 216
Ver de terre, essais de toxicité aiguë	OCDE 208
Plantes terrestres, essais de croissance	OCDE 207
Collembola, essais de reproduction	ISO 11267

## Annexe 2 : Stabilité des filtres UV dans l'eau de mer et dans le phytoplancton

### *Stabilité de l'EHMC dans l'eau de mer*

Avant d'étudier la bioaccumulation des filtres UV dans les moules, la stabilité de l'EHMC a été étudiée. Sa solubilité dans l'eau est de 0,115 mg/l. Plusieurs tests de stabilité ont été effectués. Dans un bac d'eau de mer filtrée, de l'EHMC en solution éthanolique a été ajouté tel que l'éthanol ne représente pas plus de 0,1 % de la solution finale et que la concentration théorique soit de 100 µg/l. Lors du premier test dans un bac en verre avec des joints en silicone, agité par un bulleur (50 l/h), il ne restait que 50 % de l'EHMC introduit dans le bac au bout d'1 h et que 3 % au bout de 24 h (Tableau 33). Afin de limiter les phénomènes d'adsorption sur les parois et les joints, nous avons travaillé dans les mêmes conditions avec des bacs entièrement en verre : il ne restait que 74 % de l'EHMC introduit dans le bac au bout d'1 h et 33 % au bout de 24 h. Des bacs en verre ont donc toujours été utilisés. Afin de limiter les phénomènes d'adsorption, nous avons changé les sucres reliés au bulleur par des pipettes pasteur, ainsi seul des éléments en verre étaient présent dans le bac. Dans un second temps, nous avons voulu nous assurer de l'homogénéisation dans les bacs, nous avons comparé les concentrations dans des bacs agités par des bulleurs et dans des bacs agités par un agitateur magnétique. Les résultats étaient comparables : autour de 100 % au bout d'1 h et de 35 % au bout de 24 h (Tableau 33).

**Tableau 33. Etudes des voies d'exposition des moules à l'EHMC (n = 2)**

Protocoles d'exposition	% d'EHMC restant pour une concentration initiale de 100 µg/l	
	Après 1 h	Après 24 h
Bac en verre avec joints en silicone Agitation par bulleur relié à un « sucre »	50 %	3 %
Bac entièrement en verre Agitation par bulleur relié à un « sucre »	74 %	33 %
Bac entièrement en verre Agitation par bulleur relié à une pipette pasteur	114 %	36 %
Bac entièrement en verre Agitation magnétique	101 %	35 %

### Stabilité de l'EHMC dans le phytoplancton

Dans un deuxième temps, la stabilité de l'EHMC adsorbé sur le phytoplancton et dilué dans l'eau de mer est étudiée pendant 24h, la concentration de départ est d'1  $\mu\text{g}/\text{bac}$ . L'EHMC est laissé à adsorber sur du phytoplancton à 10 000 000 cellules/ml pendant 24 h avant de le diluer dans le becher contenant de l'eau de mer filtrée pour atteindre 50 000 cellules/ml. Les concentrations dans l'eau sont représentées Figure 32. Après 24 h, il restait 66 % d'EHMC introduit dans le bac, soit environ 2 fois plus que pour une exposition par l'eau (Figure 32).

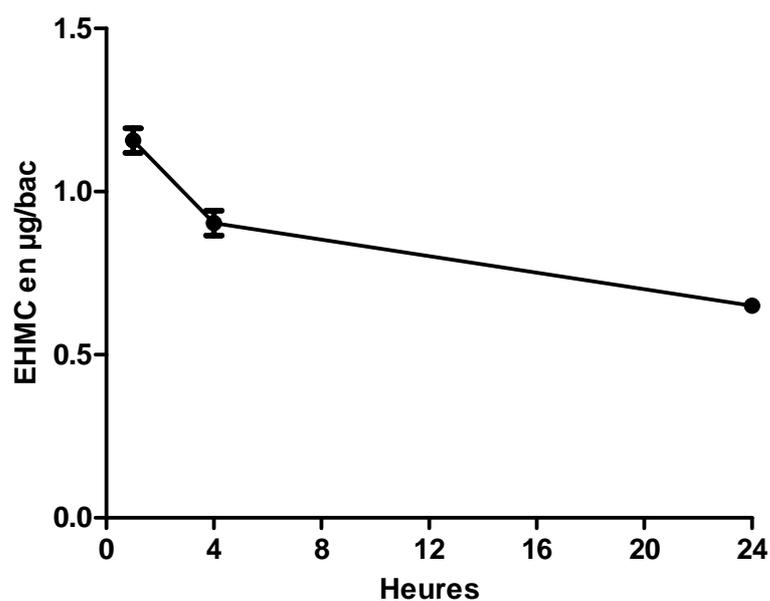


Figure 32. Concentrations en EHMC (moyenne et écart-type,  $n = 3$ ) dans l'eau de mer contenant du phytoplancton en  $\mu\text{g}/\text{bac}$  pendant 24h

## Annexe 3 : Stabilité des benzodiazépines dans l'eau de mer

Le diazépam et le tétrazépam sont des substances moins hydrophobes que les filtres UV. Une exposition par l'eau est donc plus facilement envisageable. Avant de procéder aux expérimentations par l'eau, la stabilité des deux substances a été testée dans l'eau de mer pendant 24h.

Pour cela, 1 ml de solution dopante éthanolique a été dilué dans un bécher contenant 1 l d'eau de mer filtrée, aérée par une pipette pasteur reliée à un bulleur (50 l/h). L'eau a été analysée au bout d'une heure, de 6h et de 24h. Deux concentrations ont été testées par substances : 10 et 100 µg/l.

### *Stabilité du tétrazépam*

La Figure 33 présente les concentrations en TZP dans l'eau au cours de l'étude de sa stabilité dans l'eau de mer pendant 24h. Après 24h, les concentrations dans l'eau correspondent aux concentrations introduites dans le bécher : le tétrazépam est stable dans l'eau de mer pendant 24h, l'exposition des moules peut être faite par l'eau directement.

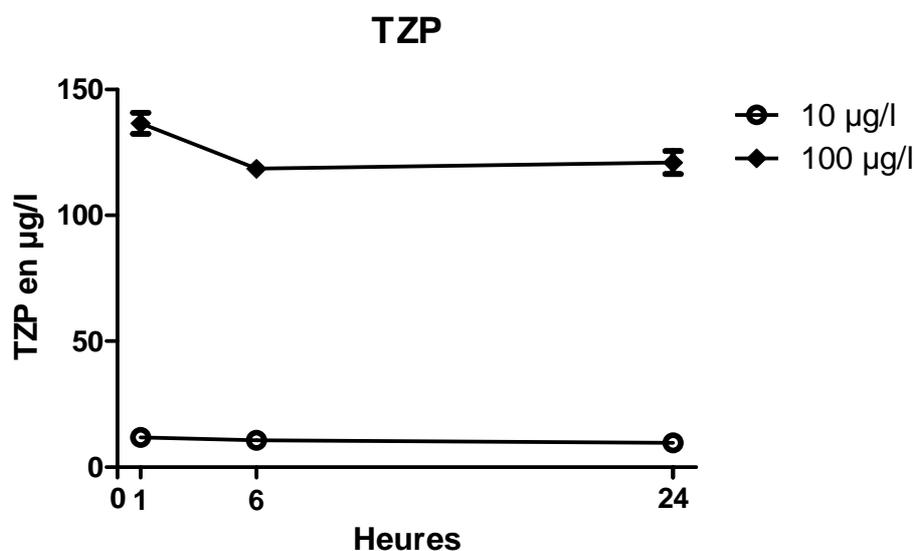


Figure 33. Concentrations en TZP (moyenne et écart-type, n = 2) dans l'eau de mer contenant du phytoplancton en µg/l pendant 24h

### Stabilité du diazépam

La Figure 34 présente les concentrations en diazépam dans l'eau de mer pendant 24h, au cours de l'étude de sa stabilité. Après 24h, les concentrations sont équivalentes à celles introduites dans les béchers pour les deux concentrations. Le diazépam est donc stable dans les conditions expérimentales pendant 24h. Pour l'exposition des moules, le diazépam est être introduit directement dans l'eau de mer.

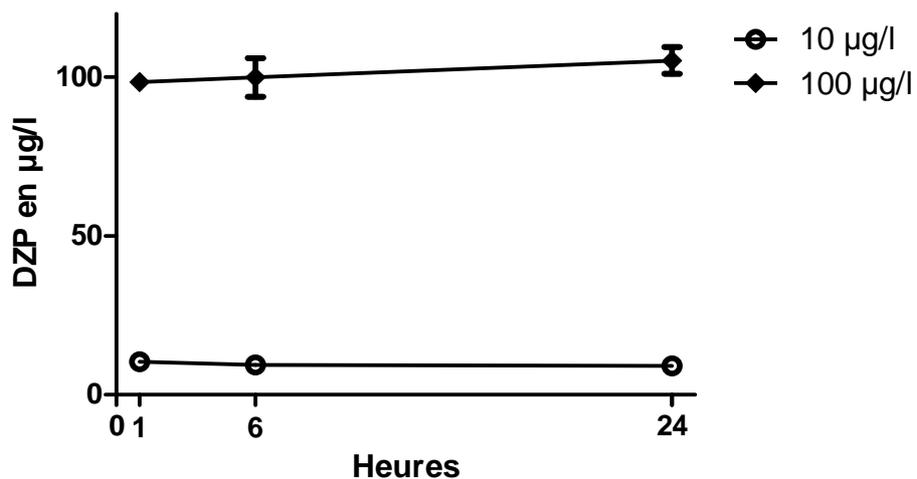


Figure 34. Concentrations en DZP (moyenne et écart-type, n = 2) dans l'eau de mer contenant du phytoplancton en µg/l pendant 24h

## **Annexe 4 : Résultats des études de bioaccumulation**

Les résultats des deux expérimentations d'exposition à l'EHMC présentés dans cette annexe, n'ont pas pu être utilisés en raison de contaminations lors de l'exposition, rendant les résultats difficilement interprétables.

### **Protocoles**

#### **Accumulation-dose**

Des moules ont été exposées une semaine à 5 concentrations d'EHMC par le phytoplancton à 0,5, 1, 2, 5 et 10 µg/bac/jour et à de l'éthanol seul. Un lot de moules a été analysé avant le début de l'expérience. Les concentrations d'exposition ont été suivies dans les bacs 4 fois au cours de l'expérience. A chaque fois, les concentrations ont été mesurées dans des bacs avant le changement d'eau et dans des bacs au moment du dopage.

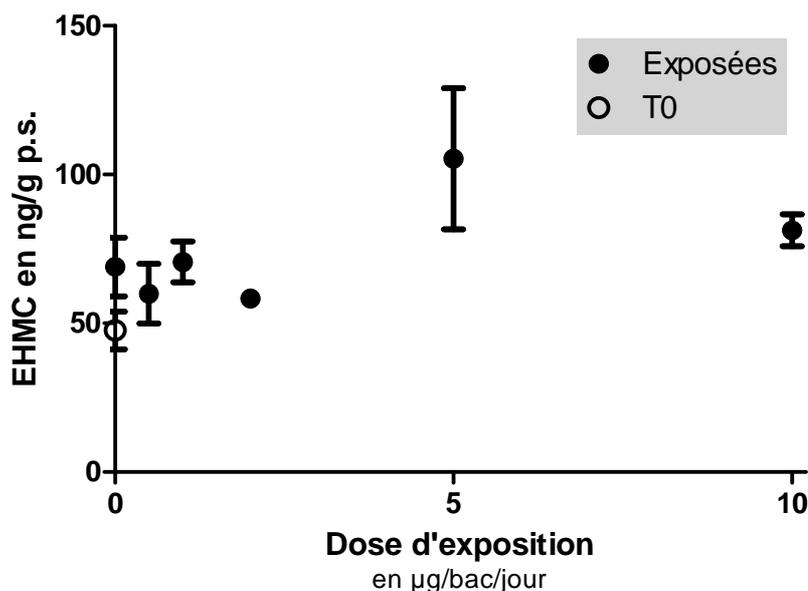
#### **Cinétique à 10 µg/l**

Des moules ont été exposées par le phytoplancton à de l'EHMC à 10 µg/bac/jour pendant une semaine, puis elles ont été laissées à décontaminer pendant une semaine. Des prélèvements ont été effectués au commencement de l'expérimentation puis au bout de 1, 3 et 7 jours d'exposition et de 1, 3 et 7 jours de décontamination. La concentration a été suivie dans les bacs 4 fois au cours de l'expérience. A chaque fois, la concentration a été mesurée dans 2 bacs avant le changement d'eau et dans 2 bacs au moment du dopage pour les moules exposées ; dans 1 bac avant le changement d'eau et dans 1 bac au moment du dopage pour les moules témoins.

### **Résultats**

#### **Accumulation-dose**

Au cours de l'expérience, les moules ont réellement été exposées à  $0,36 \pm 0,27$  ;  $0,76 \pm 0,32$  ;  $1,24 \pm 0,22$  ;  $5,44 \pm 0,77$  ou  $10,37 \pm 2,62$  µg/bac/jour. Les moules témoins ont été exposées à des concentrations inférieures à la limite de quantification. Après 24 h, les concentrations dans les moules ont toujours été inférieures à la LQ. L'indice de condition des moules était équivalent pour tous les lots avec une moyenne de 0,066. La teneur en lipides des moules étaient de  $6,8 \pm 0,7$  % du poids sec pour l'ensemble de l'expérience.

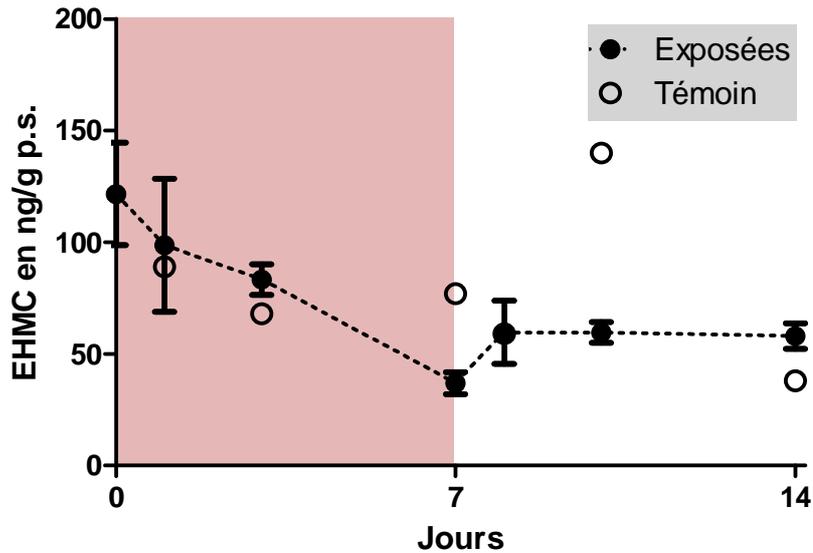


**Figure 35. Concentrations en EHMC dans les moules (moyenne et écart-type, n = 3) en ng/g ps au cours de l'étude de la relation accumulation-dose de l'accumulation de l'EHMC pendant 1 semaine**

Les niveaux détectés dans les moules sont présentés dans la Figure 35. Les moules analysées avant l'expérience étaient contaminées en EHMC à une concentration de  $48 \pm 11$  ng/g ps. Les niveaux de contamination des moules non exposées, exposées à 0,5, 1, 2, 5 ou 10 µg/bac/jour n'étaient pas différents. Après une semaine d'expérimentation, l'EHMC dans les moules a été retrouvé entre 58 et 105 ng/g ps.

### **Cinétique à 10 µg/l**

Au cours de cette expérience, les moules témoins ont été exposées à une concentration en EHMC inférieures à la limite de quantification, soit inférieure ( $0,1$  µg/bac). Les moules exposées l'ont été à  $10,52 \pm 1,03$  µg/jour/bac d'EHMC. La teneur en lipides des moules était de  $6,4 \pm 0,6$  % du poids sec pour l'ensemble de l'expérience. Les indices de condition étaient équivalents pour tous les lots avec une moyenne à 0,065.



**Figure 36. Concentrations en EHMC dans les moules (moyenne et écart-type, n = 3) lors de l'étude de la cinétique d'accumulation et d'élimination à 10 µg/bac/jour d'EHMC, la période d'exposition est en rose**

Les moules étaient contaminées avant le début de l'expérimentation à un niveau de  $122 \pm 40$  ng/g ps. Les moules exposées à de l'éthanol ont présenté des niveaux de contamination en EHMC équivalents à ceux des moules exposées à 10 µg/bac/jour d'EHMC. Les concentrations ont semblé décroître au cours de l'exposition de  $122 \pm 40$  ng/g ps à  $37 \pm 9$  ng/g ps et se stabiliser au cours de la décontamination avec des concentrations comprises entre  $58 \pm 10$  ng/g ps et  $60 \pm 25$  ng/g ps.



## Annexe 5 : Publications

Ce travail a fait l'objet de présentation par affiche dans des congrès internationaux à 4 reprises. Par ailleurs, au cours de ce travail de thèse, j'ai participé à 2 publications scientifiques et à 2 notes d'actualités scientifiques.

### Communications par affiche

**Morgane Bachelot**, Arthur David, Hélène Fenet, Claude Casellas, Dominique Munaron et Elena Gomez. Does bioaccumulation of ethylhexyl methoxycinnamate in mussels characterise marine biocontamination by UV filters ? 5th SETAC World Congress 2008, 3-7 Aug. Sydney, Australia.

**Morgane Bachelot**, Hélène Fenet, Claude Casellas, Dominique Munaron, Elena Gomez. Does bioaccumulation of ethylhexylmethoxycinnamate in mussels characterise marine contamination by UV filters? 15th International Symposium on Pollutant Responses In Marine Organisms 2009. 17-20 May, Bordeaux.

**Morgane Bachelot**, Elena Gomez, Zhi Li, Dominique Munaron, Claude Casellas, Helene Fenet. Is UV filter EHMC accumulated in mussels collected in coastal zones? 4th European Conference on Coastal Lagoon Research. 2009. 14-18 Dec. Montpellier, France.

Morgane Bachelot, Zhi Li, David Arthur, Dominique Munaron, Claude Casellas, Hélène Fenet, Elena Gomez. UV filters ethylhexylmethoxycinnamate and octocrylene in marine mussels. 2010. SETAC Europe 20th Annual Meeting. 23-27 May. Seville, Spain

### Publications scientifiques

*Monitoring organic contaminants in small French coastal lagoons: comparison of levels in mussel, passive sampler and sediment*

Arthur David, Elena Gomez, Sélim Aït-Aïssa, **Morgane Bachelot**, David Rosain, Claude Casellas et Hélène Fenet. Monitoring organic contaminants in small French coastal lagoons: comparison of levels in mussel, passive sampler and sediment. J. Environ. Monit., 2010

In this study, the distribution of organic contaminants was investigated in the particular context of three Mediterranean coastal lagoons, where pollution input was hypothesised to come mainly from sediments resuspension. Mussels and semi-permeable membrane devices (SPMDs) were exposed to the water column for one month and then their content in estrogen-, benzo[a]pyrene- and dioxin-like substances as well as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), polychlorinated biphenyls and alkylphenols was determined with biological and chemical analyses. PAH

concentration was high in sediments (up to 1028 ng g<sup>-1</sup> dry weight), however the aqueous PAH concentrations estimated from SPMD data could be considered below the levels inducing adverse effects according to the environmental quality standards proposed by the Water Framework Directive. Dioxin-like activity was observed in sediments but not in mussels and SPMDs. In the two sewage-impacted lagoons, nonylphenols could be quantified in sediments, SPMDs and mussels. Nonylphenol concentrations in mussels were among the highest found in the literature. However, since nonylphenols contributed only to a small part of the estrogenic activities observed, natural or synthetic steroids originating from wastewater discharges could be also implicated in these responses in sediments.

*Estrogen, aryl hydrocarbon and pregnane X receptors activities in reclaimed water and irrigated soils in Oued Souhil area (Nabeul, Tunisia)*

Olfa Mahjoub, Marie Leclercq, **Morgane Bachelot**, Claude Casellas, Aurélie Escande, Patrick Balaguer, Akissa Bahri, Elena Gomez et H  l  ne Fenet. Estrogen, aryl hydrocarbon and pregnane X receptors activities in reclaimed water and irrigated soils in Oued Souhil area (Nabeul, Tunisia). *Desalination*, Volume 246, Issues 1-3, 30 September 2009, Pages 425-434

Secondary effluents (SE) contain xenobiotic organics (XO) that may cause disturbance in living organisms. When SE are reused in agriculture, contamination of soils by XO is of concern. In this study, SE used for irrigation/aquifer recharge in Oued Souhil area (Nabeul, Tunisia), as well as effluents irrigated soils, were tested for their XO load. Estrogen receptor (ER), aryl hydrocarbon receptor (AhR) and pregnane X receptor (PXR) in vitro based bioassays were used to assess potential activities of XO. Results were expressed as estrogen equivalent (E2 Eq), dioxin equivalent (TCDD Eq) and rifampicine equivalent (Rf Eq). Reclaimed water showed activities with 77.58 pM E2 Eq/L, 319.5 pM TCDD Eq/L and 197 nM Rf Eq/L. Instrumental analysis (GC/MS) revealed the presence of nonylphenol isomers mixture (NPm) (6600 ng/L) and pyrene (32 ng/L). In infiltration basin soil, activities and chemical compounds were the same as those detected in reclaimed water. In the irrigated plot, no estrogenic activity was observed, though AhR and PXR activities were detected. These results emphasize the transfer of active XO from reclaimed water to soils and their relative persistence. Further studies on mobility and persistence of mid-polar and polar active XO in soils should be examined in order to explain the observed activities.

*En preparation*

Articles scientifiques en premier auteur sur la contamination des moules par les filtres UV dans l'environnement et en conditions contrôlées.

## Notes d'actualité scientifique

### *Devenir du triclosan dans l'environnement, première approche de l'évaluation des risques*

**Morgane BACHELOT**, Claude CASELLAS. Bulletin de veille scientifique de l'AFSSET, Décembre 2007. No5, p 12-13.

La présence dans l'environnement de produits personnels de soin est aujourd'hui avérée et soulève de plus en plus de questions quant à l'effet de ces substances sur le milieu aquatique. Certaines de ces substances, comme le triclosan, sont utilisées en quantités importantes. Le triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphényl éther) est un bactéricide à large spectre présent dans des produits de soin et également dans certains produits ménagers et certains textiles. En raison de son utilisation fréquente, le triclosan peut être utilisé comme indicateur de contamination humaine. Il est relativement lipophile ( $\text{Log } K_{ow} = 4,8$ ), propriété qui lui permet de traverser les membranes cellulaires. Son action antibactérienne passe par l'inhibition spécifique de l'enzyme enoyl-ACP réductase, bloquant ainsi la biosynthèse lipidique. La réglementation sur le triclosan est uniquement basée sur des effets non toxiques sur les mammifères. Pourtant ses effets biologiques toxiques ne sont pas limités aux bactéries. Canesi et al. rappellent qu'il a été montré que le triclosan peut agir sur les cellules eucaryotes par plusieurs mécanismes *in vitro* et *in vivo*. Il présente une capacité à altérer la fonction mitochondriale, à être inducteur du cytochrome P450, et à être perturbateur endocrinien. Sa toxicité sur les organismes aquatiques a été également déjà mise en évidence.

Récemment plusieurs études sont parues sur le devenir du triclosan dans l'environnement, particulièrement sur sa répartition et sa métabolisation. Le triclosan est émis dans l'environnement majoritairement par les effluents et les boues de stations d'épuration.

Ying et Kookana font le point sur le devenir du triclosan, systématiquement présent en entrée et sortie de stations d'épuration (STEP). Les coefficients d'abattement allant de 72 % à 93 % entraînent des concentrations médianes de 108 ng/L dans les effluents. Les résultats et leur comparaison avec les données de la littérature permettent aux auteurs de conclure que la biodégradation anaérobie du triclosan est négligeable. Le triclosan est majoritairement éliminé dans les STEP par biodégradation aérobie, l'adsorption jouant également un rôle significatif, ce qui explique une forte présence de triclosan dans les boues de stations d'épuration avec une médiane de 2,32 mg/kg sur les STEP étudiées. En se plaçant dans le scénario du « pire cas », l'épandage de boues pourrait entraîner un risque pour les cultures : le quotient de risque calculé est de 1360. Ce facteur de risque tient compte d'une dilution de la concentration en triclosan par 130 lors de l'application de boues sur les sols traités, soit une concentration prédite dans l'environnement (PEC)

de 0,13 mg/kg de sol. La concentration prédite sans effet toxique (PNEC) a été évaluée à partir de la toxicité sur le concombre, espèce connue la plus sensible. En raison de la pauvreté des données de toxicité sur les cultures, un facteur 1000 a été appliqué à cette valeur, donnant une PNEC de 0,096 µg/kg de sol.

La dégradation du triclosan dans le sol a été étudiée par Ying et al. Cette étude montre que le triclosan a dans cette étude une demi-vie de 18 jours dans les sols aérobies, alors que les modèles structure-activité donnent des demi-vies supérieures de biodégradation primaire (quelques semaines) et totale (quelques mois). Dans les sols anaérobies, le triclosan n'est pas dégradé au cours de l'expérience de 70 jours. Cette étude rappelle également que la dégradation du triclosan est très lente dans les sédiments (Singer et al., 2002, in Ying et al.). Des concentrations en triclosan sont détectées jusqu'à 75 ng/L dans les eaux de surface de cinq cours d'eau recevant les rejets de STEP.

La publication de Coogan et al. s'intéresse à la bioaccumulation du triclosan et du méthyl-triclosan dans des algues de cours d'eau recevant des rejets de stations d'épuration. L'étude met en évidence la bioaccumulation de ces deux molécules avec des facteurs de bioaccumulation, variant en fonction des sites, de 900 à 2100 pour le triclosan et de 700 à 1500 pour le méthyl-triclosan. Les concentrations dans les algues sont de 109 à 146 ng/g de poids frais pour le triclosan et de 50 à 89 ng/g pour le méthyl-triclosan. La teneur en lipide des algues fournit un point d'entrée dans la chaîne trophique qui pourrait amorcer des processus de biomagnification.

Dans l'eau, le triclosan est relativement résistant à l'hydrolyse; la photodégradation est sa voie d'élimination majoritaire, elle est associée à la production de 2,8- dichlorodibenzo-p-dioxine (DCDD). La photodégradation se produit quand le triclosan est dans sa forme phénolate, il est photostable dans sa forme phénolique. Aranami et Readman se sont intéressés à la photodégradation du triclosan, en comparant son comportement dans une eau désionisée, dans de l'eau douce et dans de l'eau de mer. Il montre que la photodégradation se produit dans les eaux de surface et marines (faiblement dans l'eau désionisée) et qu'il n'y a pas de dégradation sans lumière. 1 % du triclosan est photodégradé en DCDD, toutefois le DCDD est un produit intermédiaire photolabile. Leur étude permet de mettre en évidence des temps de demi-vie différents en eau douce et en eau de mer : le triclosan a une demi-vie de 8 jours dans l'eau douce et de 4 jours dans l'eau de mer. Tandis que le DCDD a une demi-vie de

26 jours en eau douce et de 122 jours en eau de mer. Ainsi un produit non persistant en eau douce peut le devenir en eau de mer. Les différences de comportements entre l'eau de mer et l'eau douce peuvent s'expliquer par la présence de matière organique qui photosensibilise le triclosan. Le pH de l'eau a également une large influence sur la spéciation du triclosan, son devenir et son

comportement. La présence dans l'environnement de co-soluté comme des ions métalliques ou de la matière organique joue probablement un rôle dans sa photosensibilité.

### **Conclusion générale**

En conclusion, ces études récentes permettent de soulever des questions importantes concernant le devenir du triclosan dans l'environnement. La période de rejet maximal du triclosan est l'été, correspondant aussi à une période de croissance rapide pour beaucoup d'organismes aquatiques, ce qui entraîne des niveaux de transferts trophiques importants. Toutefois, les effets toxiques de cette substance et de certains de ses métabolites, à des concentrations environnementales pertinentes, restent peu étudiés. En terme d'évaluation du risque, l'exemple du triclosan montre que l'évaluation du risque sanitaire n'est pas suffisante : elle ne permet pas de mettre en évidence des processus de biomagnification, ni la formation de métabolites toxiques comme le DCDD. L'évaluation du risque écotoxicologique est importante à mener et c'est au travers du transfert dans la chaîne trophique que le risque sanitaire devrait être évalué pour la substance mère, mais également pour ses métabolites.

### **Publications analysées**

Aranami K, Readman JW. Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. *Chemosphere* 2007 ; 66(6):1052-6.

Coogan MA, Edziyie RE, La Point TW et al. Algal bioaccumulation of triclocarban, triclosan, and methyl-triclosan in a North Texas wastewater treatment plant receiving stream. *Chemosphere*. 2007 ; 67(10):1911-8.

Ying GG, Kookana RS. Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants. *Environ. Int.* 2007 ; 33(2):199-205.

Ying GG, Yu XY, Kookana RS. Biological degradation of triclocarban and triclosan in a soil under aerobic and anaerobic conditions and comparison with environmental fate modelling. *Environ. Pollut.* 2007 sous presse.

### **Publications non retenues**

Canesi L, Ciacci C, Lorusso LC et al. Effects of Triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities: possible modes of action on non target organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 2007 ; 145(3):464-72.

*Contaminants présents dans les eaux résiduaires : comment prendre en compte les interactions et les produits de transformation dans l'évaluation du danger ?*

Claude CASELLAS, Laetitia PANIGAI, **Morgane BACHELOT** et Elena GOMEZ. Bulletin de veille scientifique de l'AFSSET. Juillet 2008. No7, p 22-23.

Depuis la prise de conscience, il y a un peu plus d'une dizaine d'années, de la présence de substances pharmaceutiques dans l'environnement, plusieurs études ont été menées dans le monde pour évaluer leur devenir et leurs effets écotoxicologiques après émission dans les écosystèmes aquatiques, principalement via les effluents des stations d'épuration. Ces études ont porté majoritairement sur les molécules mères. Or, l'excrétion des médicaments après ingestion par l'homme, se fait fréquemment sous forme de métabolites, parfois nombreux. Les formes excrétées peuvent à leur tour être transformées au cours des traitements en station d'épuration ou par des phénomènes de dégradations biotiques et abiotiques (biodégradation, photolyse...) et ainsi donner naissance à de nombreuses autres molécules. Or les études de toxicologie et d'écotoxicologie des xénobiotiques ne prennent que rarement en compte les métabolites et les produits de transformation. Par ailleurs, dans les conditions environnementales, les organismes sont exposés à une multitude de substances à des concentrations faibles et les interactions entre les différentes substances présentes dans les effluents sont importantes à prendre en considération afin de mieux refléter la réalité environnementale.

Deux études récentes montrent l'importance de ces phénomènes : Nalecz-Jawecki et al. se sont intéressés aux effets écotoxicologiques des métabolites d'un bêtabloquant et Filby et al. ont étudié les interactions entre différentes substances présentes dans les effluents de station d'épuration. Ces études mettent en évidence la nécessité d'une évaluation des risques qui ne s'arrête pas seulement aux molécules mères.

L'étude de Nalecz-Jawecki et al. a porté sur les effets écotoxicologiques du propranolol ainsi que ses métabolites. Le propranolol est un bêtabloquant très utilisé dans le traitement de l'hypertension artérielle, il est fréquemment retrouvé dans les effluents de station d'épuration à des concentrations allant jusqu'à 0,28 µg/l (Ashton et al., 2004). Nalecz-Jawecki et al. ont utilisé deux tests de toxicité aiguë, un sur protozoaire (*Spirostomum ambiguum*) et l'autre sur larves de crustacé (*Thamnocephalus platyurus*). En accord avec les études précédentes ayant montré que le propranolol présente un danger pour les organismes aquatiques (Cleuvers, 2005), les résultats obtenus montrent la toxicité du bêtabloquant avec une NOEC<sup>1</sup> pour le protozoaire de 0,62 mg/l. Cette toxicité a été comparée avec celle observée pour le mélange résultant de la biotransformation du propranolol. Ce mélange a été obtenu in vitro en laissant la molécule mère incuber avec des microsomes<sup>2</sup> de foie de

rat, vésicules responsables de la métabolisation. Les effets du propranolol seul et ceux du mélange constitué par la fraction de propranolol inchangée et ses différents métabolites ne diffèrent pas.

### **Commentaire**

L'originalité de ce travail réside en l'utilisation de la biotransformation *in vitro* pour les études écotoxicologiques, permettant de pallier à la difficulté d'obtention des nombreux métabolites (plus de 18 pour le propranolol) et l'indisponibilité de standards qui permettraient d'évaluer précisément la toxicité de chaque métabolite.

Filby et al. ont évalué la contribution de l'éthinylestradiol (EE2 - principe actif présent dans les contraceptifs) à la toxicité générée par des effluents de station d'épuration (STEP) sur un modèle de poisson (*Pimephales promelas*). Ils ont comparé les effets induits par l'éthinylestradiol seul à ceux induits par différents effluents de STEP, enrichis ou pas en EE2. Les effluents de STEP seuls sont responsables de l'apparition d'effets oestrogéniques chez les mâles (élévation de la vitellogénine), d'une diminution de lymphocytes, d'une augmentation des thrombocytes, d'une activité EROD<sup>3</sup> et d'effets génotoxiques. Pour toutes les expérimentations avec EE2 plus effluent, en plus des effets attendus, les auteurs ont mis en évidence une augmentation des effets génotoxiques (augmentation du nombre de mutations génétiques) et immunotoxiques (diminution des lymphocytes).

L'éthinylestradiol, ajouté à un effluent faiblement oestrogénique et immunosuppresseur, potentialise l'action immunosuppressive de cet effluent (diminution du nombre de lymphocytes circulant et augmentation du nombre de granulocytes). Administré seul, l'EE2 ne provoque aucun effet sur les leucocytes aux concentrations testées.

Cette étude souligne le manque de connaissances sur les effets biologiques des substances chimiques faisant partie de mélanges environnementaux. Les effets des oestrogènes administrés seuls ne peuvent pas toujours prédire les effets qui seront induits lorsqu'ils sont présents dans des mélanges environnementaux complexes. L'intérêt de cette étude réside dans l'utilisation d'effluents de station d'épuration réels, dopés en EE2. Cette approche a permis la comparaison des effets des mélanges par rapport aux substances seules. La diversité des techniques utilisées a permis de mettre en évidence différentes voies de toxicité induite par des mélanges environnementaux.

### **Conclusion générale**

L'étude de la toxicité des mélanges dans l'environnement est une question complexe, qui nécessite de nouvelles approches expérimentales. Les deux articles analysés abordent cette question en proposant une méthodologie originale : l'expérimentation avec des mélanges environnementaux et/ou le produit d'une biotransformation *in vitro*.

Les molécules présentes dans l'environnement peuvent subir des modifications de leur profil écotoxique par des interactions au sein d'un mélange complexe, comme l'ont montré Filby et al. dans leur étude sur les effets des oestrogènes présents seuls ou dans des effluents de station d'épuration.

Les études écotoxicologiques basées sur la molécule mère ne reflètent pas la complexité environnementale en ignorant les interactions entre les substances présentes dans le milieu et les effets potentiels des produits de dégradation. Le travail de Nalecz-Jawecki et al. illustre l'importance des métabolites et des produits de dégradation dans la toxicité des mélanges. Dans le cas du propranolol, le mélange des métabolites est aussi toxique que la molécule mère.

Ainsi l'évaluation des risques des xénobiotiques doit intégrer leur environnement et la toxicité de leurs produits de dégradation pour être représentative.

### **Lexique**

<sup>1</sup> NOEC : Concentration sans effet observé : concentration mesurée suite à des essais de toxicité et pour laquelle aucun effet n'est observé : la substance ne présente pas de toxicité en dessous de cette concentration.

<sup>2</sup> Microsome : Les microsomes sont des vésicules provenant de la fragmentation du réticulum endoplasmique.

<sup>3</sup> Activité EROD : L'activité EthoxyRésorufine O-Dééthylase est une activité type du cytochrome P450A1. Elle est induite par des polluants organiques comme les HAP, les PCB...

### **Publications analysées**

Filby AL, Neuparth T, Thorpe KL et al. Health impacts of estrogens in the environment, considering complex mixture effects. *Environ. Health Perspect.* 2007 ; 115(12):1704-10.

Nalecz-Jawecki G, Wojcik T, Sawicki J. Evaluation of in vitro biotransformation of propranolol with HPLC, MS/MS, and two bioassays. *Environ. Toxicol.* 2008 ; 23(1):52-8.

### **Publications de Référence**

Ashton D, Hilton M, Thomas KV. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. *Sci. Total Environ.* 2004 ; 333(1-3):167-84.

Clevers M. Initial risk assessment for three  $\beta$ -blockers found in the aquatic environment. *Chemosphere.* 2005 ; 59(2):199-205.