

Rapport Seine-Aval 4



MEDSEINE

Etude de la contamination par les médicaments de l'estuaire de la Seine.

Application des capteurs passifs à un meilleur diagnostic de leur présence, flux et impact toxique.



Budzinski H., Forget-Leray J., Aït-Aïssa S.



INERIS



Octobre 2012

GIP Seine-Aval
Pôle Régional des Savoirs
115 Bd de l'Europe
76 100 - Rouen

tel : 02 35 08 37 64
<http://www.seine-aval.fr>

Liste des scientifiques ayant participé au projet et des structures auxquelles ils appartiennent

Equipe 1 : Laboratoire : EPOC - LPTC UMR 5805 CNRS – Université Bordeaux 1

Intervenants :

Responsable scientifique

Hélène BUDZINSKI, h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr

Chercheurs (ou équivalents) permanents

Patrick MAZELLIER, p.mazellier@epoc.u-bordeaux1.fr

Marie-Hélène DEVIER, mh.devier@epoc.u-bordeaux1.fr

Patrick PARDON, p.pardon@epoc.u-bordeaux1.fr

Chercheurs (ou équivalents) contractuels

Nathalie TAPIE, n.tapie@epoc.u-bordeaux1.fr

Doctorants

Van Hoi BUI, doctorant vietnamien recruté début 2010 dans le cadre d'un accord bilatéral, bvhoi83@gmail.com

Caroline Gardia-Parege, c.gardia-parege@epoc.u-bordeaux1.fr

Angel BELLES, a.belles@epoc.u-bordeaux1.fr

Ingénieurs

Karyn LE MENACH, k.lemenach@epoc.u-bordeaux1.fr

Sylvie AUGAGNEUR, s.augagneur@epoc.u-bordeaux1.fr

Equipe 2 : Laboratoire : LEMA EA 3222 – Université du Havre

Intervenants :

Responsable scientifique

Joëlle FORGET-LERAY, joelle.leray@univ-lehavre.fr

Chercheurs (ou équivalents) permanents

Céline LECOMTE, celine.lecomte@univ-lehavre.fr

Techniciens

Cédric LAVENUC, cedric.lavenuc@univ-lehavre.fr

Equipe 3 : INERIS, Unité d'Ecotoxicologie in vitro et in vivo (ECOT)

Intervenants :

Responsable scientifique

Sélim AÏT-AÏSSA, Selim.AIT-AISSA@ineris.fr

Doctorants

Nicolas CREUSOT, Nicolas.CREUSOT@ineris.fr

Techniciens

Emmanuelle MAILLOT-MARECHAL, Emmanuelle.MAILLOT-MARECHAL@ineris.fr

Sommaire

I. Introduction et contexte	7
II. Caractérisation de la contamination chimique de l'estuaire de Seine	9
II.1. Optimisation et développements analytiques	9
II.1.1. Développements analytiques pour l'optimisation des méthodes d'analyses des SP	9
II.1.2. Développements analytiques pour la caractérisation des métabolites de la carbamazépine	12
II.1.3. Développements analytiques pour la caractérisation des hormones	12
II.2. Optimisation des méthodes d'échantillonnage passif pour le suivi des SP dans le milieu aquatique	12
II.3. Application des méthodes optimisées et développées au suivi environnementale de l'estuaire de Seine.	16
II.3.1. Stratégie d'échantillonnage	16
II.3.2. Contamination des STEP	17
II.3.3. Suivi de la contamination dans l'estuaire de Seine	22
III. Caractérisation des effets toxiques des effluents de stations d'épuration, des échantillons du milieu et des extraits des échantillonneurs passifs	28
III.1. Matériel et méthode : Techniques utilisées.....	28
III.1.1. Test sur micro-crustacé	28
III.1.1.a. Bioessai nauplien avec Eurytemora affinis	28
III.1.1.b. Test de neurotoxicité in vitro	29
III.1.2. Evaluation de la présence de composés oestrogéniques, androgéniques et dioxin-like à l'aide de bioessais in vitro	30
III.2. Résultats obtenus	31
III.2.1. Test sur micro-crustacé	31
III.2.1.a. Bioessai nauplien avec Eurytemora affinis	31
III.2.1.b. Test de neurotoxicité in vitro	33
III.2.1.c. Conclusion	35
III.2.2. Evaluation de la présence de composés oestrogéniques, androgéniques et dioxin-like à l'aide de bioessais in vitro	35
III.2.2.a. Activité dans les effluents de STEP	35
III.2.2.b. Activités dans le milieu naturel.....	37
III.2.2.c. Conclusion	38
IV. Etude de la dégradation des SP dans des effluents de STEP	39
IV.1. Matériel et Méthodes	39
IV.1.1. Dégradation à l'obscurité des effluents (vieillessement).....	39
IV.1.2. Photodégradation sous irradiation solaire simulée	39
IV.1.1. Photodégradation initiée par rayonnement UV	40
IV.1. Résultats obtenus	41
IV.1.1. Stabilité des SP contenus dans les effluents de stations d'épuration	41
IV.1.2. Dégradation sous irradiation solaire simulée ou par rayonnement UV	42
IV.1.2.a. Cas de trois anti-inflammatoires non stéroïdiens	42
IV.1.2.b. Cas des antibiotiques	43

IV.1.2.c. Cas de composés β -bloquants et antiviraux	43
IV.1.2.d. Bilan.....	44
IV.1.3. Evolution de l'activité oestrogénique, androgénique et dioxin-like d'effluents de STEP s soumis aux processus de photodégradation	44
V. Conclusion	46
VI. Retombées opérationnelles	47
VII. Perspectives	48
VIII. Difficultés rencontrées	48
IX. Bibliographie.....	49
X. Liste des communications présentées par l'ensemble des équipes du projet.....	53
X.1. Communications orales.....	53
X.1. Communications par affiche	53

I. Introduction et contexte

Le compartiment aquatique reçoit de nombreux xénobiotiques provenant des différentes activités humaines. Depuis une quinzaine d'années, l'attention des chercheurs s'est portée sur la présence, dans les eaux superficielles, les eaux souterraines et les eaux destinées à la consommation humaine, de composés qualifiés de polluants émergents parmi lesquels les produits pharmaceutiques et de soin personnel (Pharmaceuticals and Personal Care Products – PPCP). Ces contaminants ne sont pas nouvellement présents dans le compartiment aquatique mais de nombreuses données relatives à leur concentration dans les eaux de surface sont publiées depuis une quinzaine d'années grâce notamment à l'amélioration significative des instruments et des procédures analytiques. Malgré tout comparativement aux polluants organiques persistants, ces composés sont relativement méconnus d'un point de vue environnemental. Les substances pharmaceutiques (SP) ne sont que depuis très récemment considérées comme des polluants potentiels de l'environnement, étudiées sous le terme global de « contaminants émergents » (Halling-Sorensen et al., 1998 ; Ternes et al., 2002 ; Pedersen et al., 2003 ; Pedersen et al., 2005 ; Huber et al. 2005; Hernando et al, 2006).

Les SP sont particulièrement préoccupants d'une part du fait de leur activité biologique (ils ont été créés pour cela), mais aussi de par leur consommation très importante (Tableau 1) et enfin du fait de leur toxicité maintenant avérée pour certains d'entre eux (Oaks *et al.*, 2004, Triebkorn, 2004 ; Caminada *et al.*, 2006 ; Brain *et al.*, 2009). Ce sont des substances biologiquement actives qui se caractérisent par une grande diversité de structures chimiques.

Tableau 1 : Données de consommations exprimées en tonnes par an.

(a)Webb, 2001, (b) Hirsch et al., 1999 ; Ternes et al., 1998; Ternes, 2001, (c)(Khan et Ongerth, 2004, (d) (Janex et al., 2002)

Composés	Classe thérapeutique	Angleterre (2000) (a)	Allemagne (1995-1997) (b)	Australie (c)	France (d)
Paracétamol	Analgésique	2000	-	295	2294
Aspirine	AINS	770	> 500	20	880
Ibuprofène	AINS	-	105-180	14	166
Erythromycine	Antibiotique	27	-	11	
Kétoprofène	AINS	-	0,7	4	
Diclofénac	AINS	26	75	4	39
Pénicilline V	Antibiotique	22	140	9	

De nombreux pays s'intéressent à cette problématique. L'Allemagne, les Pays-Bas, la Suède, ont été les premiers à se préoccuper de la présence de ces composés dans les systèmes aquatiques et de leurs effets sur les organismes. Au delà d'un problème environnemental, c'est un problème sanitaire qui a vu le jour, dû aux difficultés d'approvisionnement en eau de plus en plus marquées qui incitent à la surveillance des systèmes aquatiques, qu'ils soient ou non directement destinés à la consommation humaine. La potabilisation de nouvelles ressources en eau soulève d'autant plus les problèmes gravitant autour de la contamination de ces ressources. En effet, certaines régions du monde, exposées à une pénurie en eau de plus en plus marquée, développent des techniques de réutilisation des eaux usées (Aertgeerts et Angelakis, 2003 ; US Environmental Protection Agency, 2001), pour l'agriculture (Blumenthal *et al.*, 2001), pour l'industrie (systèmes de refroidissement) et maintenant pour réalimenter les nappes phréatiques destinées à la consommation humaine (Ecosse, 2001).

Les nombreux efforts faits à l'échelle européenne notamment avec la Directive Cadre Eau, vont dans ce même sens d'une évaluation de la qualité environnementale des différentes ressources en eau disponibles, à plus ou moins long terme, pour la survie des espèces aquatiques mais aussi pour la consommation humaine. Depuis fin novembre 2009 la France a mis une priorité forte sur le problème de la contamination des ressources aquatiques par les substances pharmaceutiques avec le lancement du Plan National sur les Résidus de Médicaments (PNRM). La France est en effet le 4^{ème} consommateur mondial de médicaments. Plus de 3 000 médicaments humains et 300 médicaments vétérinaires sont actuellement disponibles sur le marché français. Après excrétion sous leur forme initiale ou comme métabolites, sous forme libre ou conjuguée (Halling-Sorensen *et al.*, 1998), les composés pharmaceutiques (usage vétérinaire ou humain), se retrouvent dans les écosystèmes naturels *via* différentes voies d'accès.. Les composés pharmaceutiques à usage humain sont dirigés dans les eaux résiduaires urbaines et donc dans les stations d'épuration (STEP) dont les effluents sont rejetés dans les eaux de surface du milieu naturel. Les

traitements des STEP ne dégradent pas complètement les substances pharmaceutiques qui donc se retrouvent dans les effluents et sont donc également rejetés dans le milieu naturel (Joss *et al.*, 2008). Les composés pharmaceutiques non utilisés peuvent être déposés directement dans les décharges et être ensuite entraînés dans l'environnement aquatique par le phénomène de lixiviation.

Antibiotiques, antidépresseurs, bêtabloquants... mais aussi médicaments à usage vétérinaire (antibiotiques, hormones, antiparasitaires) sont autant de substances qui sont rejetées dans les milieux aquatiques. Les concentrations dans le milieu récepteur varient selon la biodégradabilité des molécules et les performances des stations d'épuration ainsi que les modes d'apport (*via* les effluents liquides des stations d'épuration, *via* les lessivages de zones amendées par des lisiers, *via* des rejets d'industries pharmaceutiques, *via* les décharges, ...).

Dans la phase précédente de Seine Aval (Seine Aval 2 et Seine Aval 3) des études ont été menées pour documenter le problème des médicaments en estuaire de Seine et ont démontré la réalité de la contamination de l'estuaire par ces composés. L'estuaire de Seine s'est d'ailleurs révélé être l'estuaire atlantique de loin le plus contaminé (Labadie, 2005 ; Togola, 2006). Lors de ces travaux que l'on peut qualifier de pionniers une vingtaine de composés parmi les plus classiques ont été suivis comprenant des anti-inflammatoires non stéroïdiens, des analgésiques, des bronchodilatateurs, des hypolipémiants, des anti-dépresseurs.

Les objectifs du projet MEDSEINE ont donc été de réactualiser les connaissances acquises lors de ces projets antérieurs en étendant la gamme des composés étudiés à la fois au sein des classes déjà prises en compte par le passé (par exemple un seul hypolipémiant avait été recherché en 2003, le gemfibrozil contre 6 dans cette étude). En parallèle de la caractérisation chimique des échantillons une caractérisation basée sur des bioessais de toxicité a été menée. En effet, en mettant en œuvre une analyse chimique même très sophistiquée, il est nécessaire pour obtenir de bonnes performances en termes de sensibilité et de spécificité, d'effectuer des choix et de cibler les composés à analyser (analyses orientées), ce qui peut donc conduire à passer à côté de composés majoritaires et toxiques si ils n'ont pas été pré-sélectionnés. De plus, les coûts analytiques limitent le nombre de substances étudiées. La combinaison de tests de toxicité non spécifiques (cytotoxicité, toxicité aiguë) et spécifiques d'un mode d'action déterminé (génétoxicité, perturbation endocrinienne, neurotoxicité ...) peut s'avérer pertinente tant pour la quantification que pour l'identification de composés toxiques dans le milieu (*e.g.* équivalents-toxiques à l'aide de tests cellulaires avec gènes rapporteurs) (Eggen et Segner, 2003).

Au-delà des produits initiaux eux-mêmes une démarche prospective sur l'étude de produits de transformation de certains médicaments a été initiée. Les médicaments sont des molécules réactives qui peuvent se transformer de façon non négligeable et il y a un manque fort de connaissance sur les produits de transformation de ces composés alors qu'ils pourraient se révéler bien plus persistants et plus toxiques que les molécules initiales parentes. Les phénomènes de transformation ainsi que l'évolution de certaines réponses aux bioessais ont été investigués.

Enfin une partie de nos travaux a été consacrée au développement de nouvelles méthodologies d'échantillonnage. En effet les premiers travaux avaient aussi montré la très grande variabilité des concentrations et mis en évidence la difficulté d'appréhender une concentration moyenne d'exposition pour ces composés dans le cas de l'estuaire de Seine (Togola, 2006). Des outils échantillonnage passif permettant de quantifier ces substances dans les milieux naturels ont été déployés afin de documenter la présence des SP dans l'estuaire de Seine.

Ce projet s'articule autour de trois axes :

- Caractérisation de la contamination en SP de l'estuaire de Seine : réactualisation des données précédemment acquises et acquisition de données sur de nouvelles molécules.
- Etude du potentiel toxique des effluents de STEP et de l'eau de surface de l'estuaire de Seine basée sur des bioessais de toxicité.
- Étude des phénomènes de transformation des SP (dégradation, photo-dégradation) et leurs effets sur les organismes.

II. Caractérisation de la contamination chimique de l'estuaire de Seine

II.1. Optimisation et développements analytiques

II.1.1. Développements analytiques pour l'optimisation des méthodes d'analyses des SP

Le screening de substances pharmaceutiques (SP) dans l'environnement aquatique nécessite la maîtrise de protocoles analytiques multi-résidus complexes, longs à mettre en œuvre. Les screenings réalisés dans le milieu ont été réalisés grâce à deux méthodologies distinctes :

- l'une permettant de cibler les SP d'usage courant (20 molécules : alprazolam, amitriptyline, bromazepam, caféine, carbamazepine, clenbutérol, diazépam, doxépine, fluoxétine, imipramine, nordiazépam, paracétamol, salbutamol, terbutaline, théophylline, kétoprofène, naproxène, diclofénac, ibuprofène, gemfibrozil),
- La seconde permettant de cibler des substances plus spécifiques le plus souvent soumises à prescription (77 molécules : abacavir, acide fusidique, acide oxolinique, acide pipémidique, amoxicilline, ampicilline, aténolol, azithromycine, bacitracine, bisoprolol, céfalexine, céfotaxime, cefpodoxime, ceftiofur, céfuroxime, chloramphénicol, chlortétracycline, ciprofloxacine, clarithromycine, clindamycine, cloxacilline, cyclophosphamide, daunorubicine, dicloxacilline, docétaxel, doxorubicine, doxycycline, enrofloxacin, épirubicine, érythromycine, fluméquine, gemcitabine, ifosfamide, indinavir, josamycine, lamivudine, lincomycine, marbofloxacine, méthotrèxate, métoprolol, métronidazole, monensine, nelfinavir, névirapine, norfloxacine, ofloxacine, oxacilline, oxytétracycline, pénicilline G, pénicilline V, propranolol, rifampicine, ritonavir, roxithromycine, salinomycine, saquinavir, sildénafil, sotalol, spiramycine, stavudine, sulfadiazine, sulfadiméthoxine, sulfamérazine, sulfaméthazine, sulfaméthizole, sulfaméthoxazole, sulfanilamide, sulfapyridine, sulfathiazole, tamoxifen, tétracycline, thiamphénicol, timolol, triméthoprime, tylosine, virginiamycine, zidovudine).

Les extraits obtenus par ces deux protocoles sont également analysés de façon différenciés par des méthodes d'analyse différentes dans un couplage LC/MS/MS, chaque extrait étant injecté dans les deux méthodes d'ionisation par électrospray (ESI+ et ESI-) de façon à quantifier l'intégralité des SP recherchées.

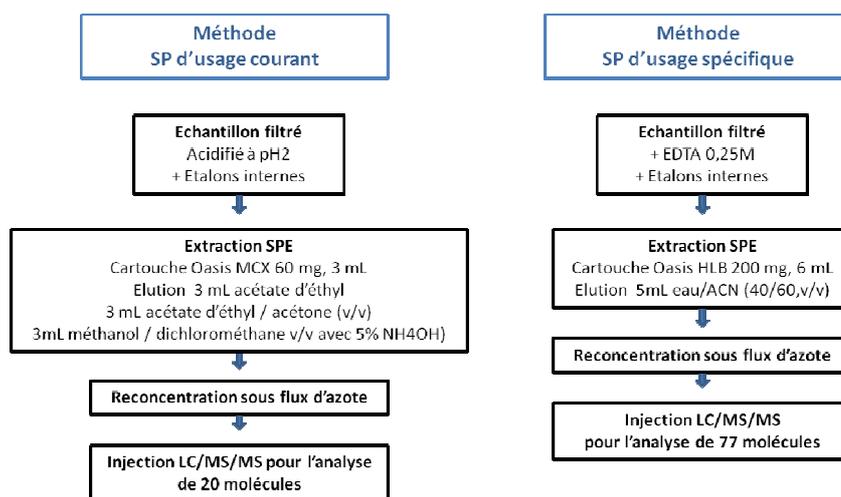


Figure 1 : Méthodologies d'extraction utilisées pour le suivi des SP dans les eaux.

Afin de faciliter le traitement des échantillons, de diminuer le temps passé et le coût des analyses une méthode d'extraction et d'analyse combinée supplémentaire a été développée afin de pouvoir quantifier 53 molécules parmi lesquelles des SP d'usage courant et les SP d'usage spécifique les plus retrouvées (abacavir, acide 4-chlorobenzoïque, acide clofibrique, acide fénofibrique, acide salicylique, alprazolam, amitriptyline, aspirine, aténolol, bézafibrate, bisoprolol, bromazépam, caféine, carbamazépamine, cétirizine, clenbutérol, clonazépam, clopidogrel, diazépam, diclofénac, disopyramide, doxépine, fluoxétine, gemfibrozil, ibuprofène, imipramine,

indinavir, kétoprofène, lamivudine, lorazépam, losartan, méprobamate, métoprolol, naproxène, nelfinavir, nevirapine, nordiazépam, oméprazole, oxazépam, paracétamol, pravastatine, primidone, propranolol, ranitidine, ritonavir, salbutamol, saquinavir, sildénafil, sotalol, terbutaline, théophylline, timolol, zidovudine). Ces 53 molécules sont extraites par extraction en phase solide (SPE) sur cartouche Oasis MCX, puis l'extrait est analysé par couplage LC/MS/MS dans les deux méthodes d'ionisation par électrobulisation (ESI⁺ et ESI⁻). Le détail de la méthodologie est décrit dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Méthodologie d'extraction et d'analyses développées pour le suivi des 53 SP d'usage courant et soumises à prescription.

Description du protocole d'extraction	
Extraction : SPE	Extraction en phase solide sur OASIS MCX (60mg, 3 cc, WATERS) conditionnement 3mL acétate d'éthyle, puis 3mL eau Vittel pH2 ajout 3mL eau pH = 2 dépôt de l'échantillon pH2 séchage sous vide élution : 3mL acétate d'éthyle, puis 3mL acétate d'éthyle/acétone (50/50, v/v) et 3mL méthanol/dichlorométhane/5% hydroxyde d'ammonium (50/50, v/v)
Purification :	pas de purification nécessaire ajout d'étalons d'injection aliquotage pour ESI ⁺ , ESI ⁻ et stockage
Volume final avant analyse :	100µL : acétonitrile pour analyses en mode négatif 100µL : eau milli-Q/acétonitrile (80/20, v/v) pour analyses en mode positif
Description de la méthodologie d'analyse en mode négatif	
Séparation chromatographique (pour le mode d'ionisation négatif)	Séparation par chromatographie en phase liquide (LC) : Colonne : Zorbax C18 (50mm* 2,1mm* 1,8 µm) Débit: 0,6 mL/min température = 30°C Mode gradient : (A) eau milli-Q ; (B) acétonitrile 0 min : 100 % (A) / 0 % (B) 30 min : 35 % (A) / 65 % (B) 31 min : 0 % (A) / 100 % (B) 32 min : 0 % (A) / 100 % (B) 33 min : 100 % (A) / 0 % (B) 38 min : 100 % (A) / 0 % (B)
Solvant de rinçage	ACN 0,1 % acide formique
Détection : pour la détection par masse : mode d'ionisation négatif	Détection par spectrométrie de masse MS/MS, ionisation à pression atmosphérique par electrospray (mode négatif), en mode sélection d'ions (MRM).
Type d'étalonnage	Quantification par étalonnage interne étalons internes : zidovudine-d3, aspirine-d4, acide salicylique-d6, diclofénac-d4, kétoprofène-d3, naproxène-d3, ibuprofène-d3, gemfibrozil-d6, pravastatine-d5, atorstatine-d5
Equipement :	Système RRLC-QQQ Agilent
Description de la méthodologie d'analyse en mode positif	
Séparation chromatographique	Séparation par chromatographie en phase liquide (LC) : Colonne : Zorbax SB C18 (50mm* 2,1mm* 1,8 µm) Débit: 0,6 mL/min température = 30°C Mode gradient : (A) eau milli-Q/0,1% acide formique ; (B) acétonitrile/0,1% acide 0 min : 98 % (A) / 2 % (B) 9,5 min : 50 % (A) / 50 % (B) 10 min : 0 % (A) / 100 % (B) 11,5 min : 0 % (A) / 100 % (B) 12,5 min : 98 % (A) / 2 % (B) 17 min : 98 % (A) / 2 % (B)
Solvant de rinçage	ACN / EAU (75/25)
Détection :	Détection par spectrométrie de masse MS/MS, ionisation à pression atmosphérique par electrospray ESI (mode positif), en mode multiple reaction monitoring dynamic (MRM).
Type d'étalonnage (interne)	Quantification par étalonnage interne étalons internes : abacavir-d4, indinavir-d6, nevirapine-d3, bromazepam-d4, nordiazepam-d5, diazepam-d5, oxazepam-d6, paracétamol-d4, atenolol-d7, propranolol-d7, sotalol-d6, fluoxétine-d5, amitriptyline-d6, carbamazépine-d10, caféine- ¹³ C, salbutamol-d3, sildénafil- ¹³ C, bezafibrate-d6 étalon d'injection : imipramine-d4

Cette nouvelle méthode a été validée tant au niveau de l'étape d'extraction qu'au niveau de l'étape d'analyse. La linéarité de la réponse a été testée et validée pour toutes les SP et leurs étalons internes dans une gamme de concentration allant de 1 à 7500 pg injectés, pour des limites de détection variant entre 0,01 et 45 pg injectés en fonction des composés considérés. Des tests d'extraction ont été réalisés sur des échantillons supplémentés d'eau et de POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler). Des échantillons supplémentés ainsi que des blancs de protocole ont également été réalisés dans chaque série d'échantillons.

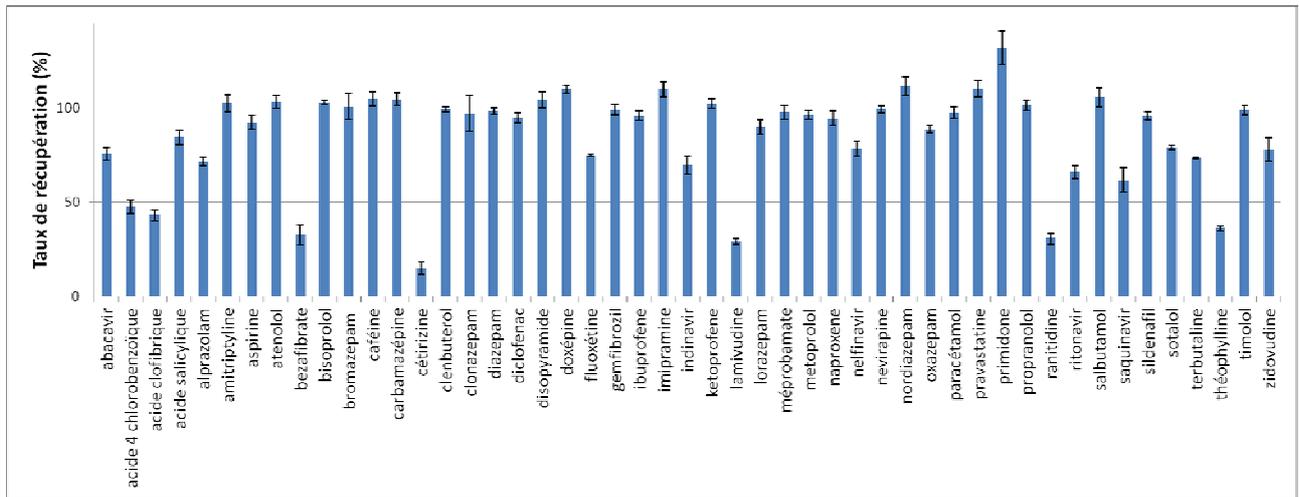


Figure 2 : Pourcentage de récupération des SP dans des échantillons d'eau supplémentés par la nouvelle méthodologie développée (n=3).

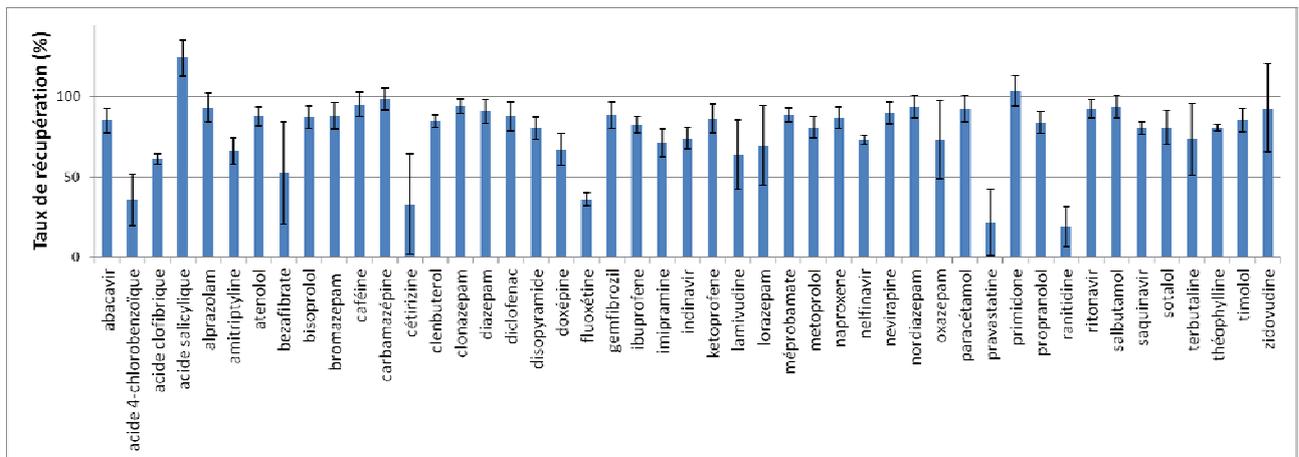


Figure 3 : Pourcentage de récupération des SP dans des échantillons de POCIS supplémentés par la nouvelle méthodologie développée (n=3).

Globalement l'ensemble des composés présente des pourcentages de récupération supérieurs à 80 %, mais certains composés comme le bézafibrate, la cétirizine, la fluoxétine, la pravastatine, la ranitidine présentent des rendements faibles inférieurs à 50%. Ces composés ont été conservés dans la méthode d'analyse pour un premier screening qualitatif. Une fois leur présence avérée dans l'environnement aquatique, leur quantification pourra être améliorée notamment par l'ajout d'étalon(s) interne(s) approprié(s) dans le protocole d'extraction.

II.1.2. Développements analytiques pour la caractérisation des métabolites de la carbamazépine

La carbamazépine fait parti des SP retrouvées régulièrement dans les effluents de station d'épuration et dans les écosystèmes aquatiques. Elle est rémanente et globalement résistante aux traitements appliqués dans les stations d'épuration (taux d'élimination inférieurs à 7 %, Golet *et al.*, 2001). Cette molécule relativement conservative peut servir de traceur pour suivre l'impact des rejets d'effluents sur un milieu récepteur.

Devant la forte présence de la carbamazépine, il a semblé intéressant de chercher à caractériser la présence des produits de transformation connus et des métabolites de la carbamazépine, un protocole de dosage spécifique de la carbamazépine et de ces métabolites principaux (trans-10,11-dihydro-10,11-dihydroxy-carbamazépine ; 10,11-dihydro-10-hydroxy-carbamazépine-o-β-D-glucuronide; carbamazépine-10,11-époxyde ; 2-hydroxy-carbamazépine ; 3-hydroxy-carbamazépine ; 10,11-dihydro carbamazépine) a été développé.

Un premier screening semi quantitatif a été réalisé sur un POCIS exposé au niveau du barrage de Poses du 19 juillet 2011 au 30 août 2011. Les concentrations retrouvées dans le POCIS exprimées en ng.g⁻¹ de phase sont présentées dans le Tableau 3. Cette première analyse a permis de confirmer la présence des métabolites de la carbamazépine dans le milieu à des concentrations égales voir supérieures à celles de la carbamazépine, confirmant l'intérêt de suivre ces molécules.

Tableau 3 : Concentration de la carbamazépine et de ses principaux métabolites retrouvées dans un POCIS exposé au niveau du barrage de POSES du 19 juillet 2011 au 30 août 2011

Composés	Concentration(ng.g ⁻¹)
Carbamazépine	293
trans 10,11 dihydro-10,11-dihydroxy carbamazépine	370
10,11 dihydro-10-hydroxy-carbamazépine-o-β-D glucuronide	nd
CBZ-10,11-époxyde	35
2-hydroxy carbamazépine	23
3-hydroxy carbamazépine	23
10,11-dihydro carbamazépine	nd

II.1.3. Développements analytiques pour la caractérisation des hormones

Afin de compléter le panel de molécules suivies sur les différents sites ciblés dans le projet, une méthodologie de dosage ciblée sur une trentaine d'hormones a été développée. Parmi les molécules sélectionnées on retrouve des hormones naturelles comme l'oestrone ou la testostérone, mais également des molécules de synthèse comme l'éthinylœstradiol ou le lévonorgestrel (11-cetotestosterone, 11a-OH-progesterone, 17-alpha oestradiol, 17-alpha-OH progesterone, 17-beta oestradiol, 17a-OH-20b-dihydroprogesterone, 17a-OH-pregnenolone, 4-androstene-3,17dione, 6-alpha-méthylprednisolone, canrenone, cortisone, dexaméthasone, DHA, DHEA, dihydrotestotérone , ethinyloestradiol , hydrocortisone, levonorgestrel, mestranol, norethindrone, norgestimate, oestriol, oestrone, prednisolone, prednisone, pregnenolone, progesterone, spironolactone, testostérone, thiolcolchicoside). La séparation est réalisée sur une colonne Kinetex de 10 cm grâce à un gradient eau/acétonitrile et l'analyse est réalisée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. La quantification de ces molécules est réalisée par étalonnage interne et les limites de détection obtenues pour cette méthodologie varient entre 0,2 et 9 pg injectés. La méthodologie analytique développée pour le suivi des hormones a été testée sur un extrait d'échantillonneur passif immergé au niveau de Poses au mois d'août 2011, cependant malgré les capacités de concentration de l'outil d'échantillonnage, aucune hormone n'a pu être détectée.

II.2. Optimisation des méthodes d'échantillonnage passif pour le suivi des SP dans le milieu aquatique

Classiquement, l'analyse des contaminants dans l'eau est réalisée après prélèvements d'échantillons d'eau en conditions "ultra-propres", afin d'éviter toute contamination des échantillons au cours du prélèvement et du traitement, et après la mise en œuvre de protocoles d'extraction-concentration en laboratoire. Ces techniques relativement longues, difficile à mettre en œuvre et coûteuses permettent de donner une image de la contamination à un instant t, mais pas (ou très difficilement) d'extrapoler la contamination du milieu dans le temps. Afin de palier ces inconvénients, une approche se basant sur des échantillonneurs passifs s'est développée durant ces dernières années (Vrana *et al.*, 2005, Alvarez *et al.*, 2004). Les échantillonneurs passifs sont des outils capables d'intégrer les contaminants ciblés présent dans le milieu pendant un temps défini. Classiquement ils sont composés d'un

adsorbant (ou d'un absorbant) capable de piéger les contaminants chimiques du milieu à analyser sans mécanisme d'extraction actif. Les contaminants diffusent donc du milieu vers l'échantillonneur de manière constante jusqu'à une condition d'équilibre non atteinte à l'échelle du temps d'échantillonnage. L'un des échantillonneurs passifs le plus adapté à l'échantillonnage des substances pharmaceutiques est le POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) (Munaron *et al.*, 2011 ; Togola et Budzinski, 2008; Alvarez *et al.*, 2004).

Les POCIS sont composés d'une phase adsorbante solide emprisonnée entre deux membranes de polyéthersulfone (PES). Ces membranes présentent des diamètres de pores de 0,1 µm permettant le passage des contaminants vers la phase adsorbante (Figure 4 et Figure 5)

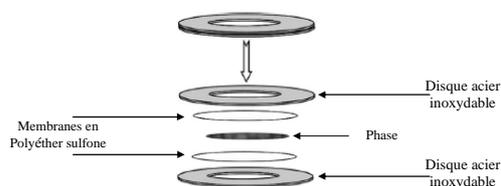
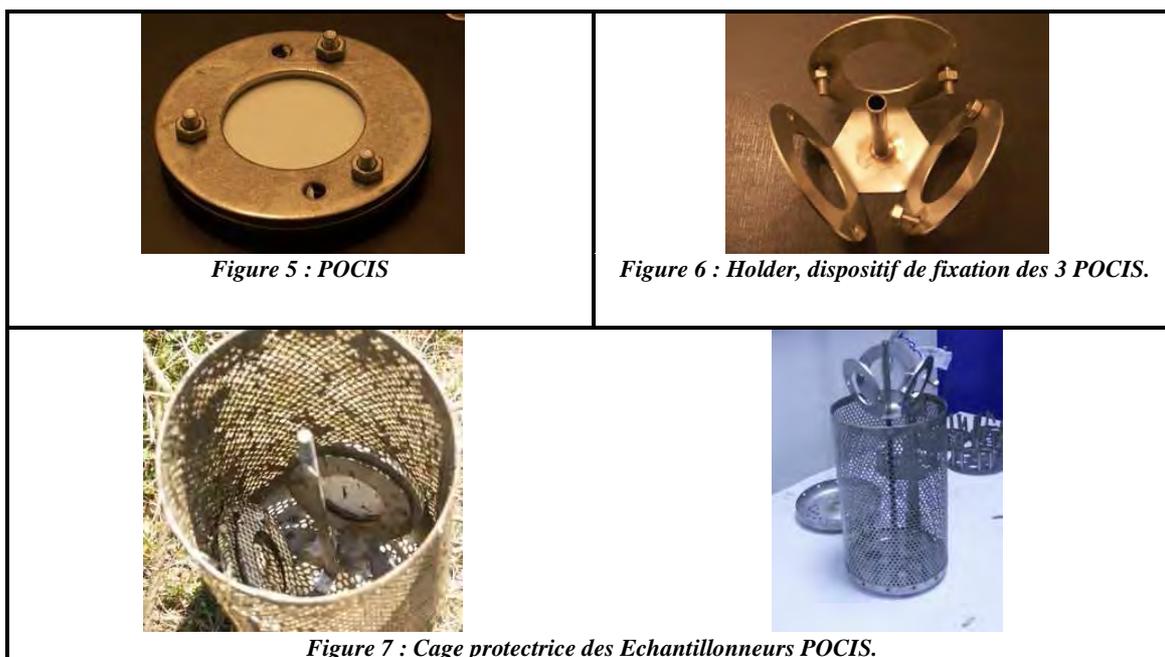


Figure 4 : Schéma d'un POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler)

Pour les installations sur le terrain, un dispositif permet d'exposer simultanément 3 échantillonneurs (Figure 6). Un système de protection des échantillonneurs est aussi disponible, qui limite le dépôt de macro-débris sur le dispositif et permet de fixer l'ensemble sur un support et d'ajouter des poids pour le lester et ainsi assurer son exposition permanente (Figure 7).



Dans le cadre de ce travail, l'approche PRC (Performance Reference Compound) (Huckins *et al.*, 2002) a été utilisée afin d'améliorer l'aspect quantitatif de l'échantillonnage par les POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler). Des composés de référence et de performance (PRC) ont été introduits dans les POCIS avant leur exposition (Mazzella *et al.*, 2010). Les PRC sont des molécules non interférentes, isotopiquement substituées dont la désorption durant la période d'exposition permet de calculer un taux d'échantillonnage *in situ* ($Rs_{in situ}$). Trois molécules PRC ont été utilisées ici la DIA d₅ (déisopropyl-atrazine d₅), la caféine C₁₃ et le salbutamol d₃. La DIA d₅ est un PRC validé en eau douce par Mazzella *et al.* (2007, 2010). La validation des autres PRC et leur validation en milieu estuarien sont en cours de finalisation dans la thèse d'Angel Belles (Thèse actuellement en cours et encadrée par Hélène Budzinski).

Le taux d'échantillonnage (Rs) établit un lien direct entre la quantité de composés retenue par les POCIS et leur concentration dans le milieu (Alvarez *et al.*, 2004; Vrana *et al.*, 2005).

$$[C_{\text{pocis}}] = [C_{\text{eau}}] \times R_s \times t$$

Où $[C_{\text{pocis}}]$: Concentration dans le POCIS (ng.g⁻¹)
 $[C_{\text{eau}}]$: Concentration moyenne dans l'eau pendant la période d'exposition (ng.L⁻¹)
 R_s : Taux d'échantillonnage (L.j⁻¹.g⁻¹)
 t : Temps (j)

Afin de pouvoir déterminer la concentration des composés ciblés dans l'eau à partir de la quantité de composés accumulés dans le POCIS, il faut donc connaître le temps d'exposition (t) et le taux d'échantillonnage (Rs) de chaque molécule ciblée. Traditionnellement le Rs est déterminé en laboratoire en conditions contrôlées, et les valeurs de Rs obtenues en laboratoire sont utilisées pour calculer les concentrations *in situ* des composés ciblés. Cependant le Rs est soumis à des variations en fonction des conditions du milieu (courant, turbulence, température, biofouling, salinité...) (Figure 8). Il varie donc selon les conditions environnementales.

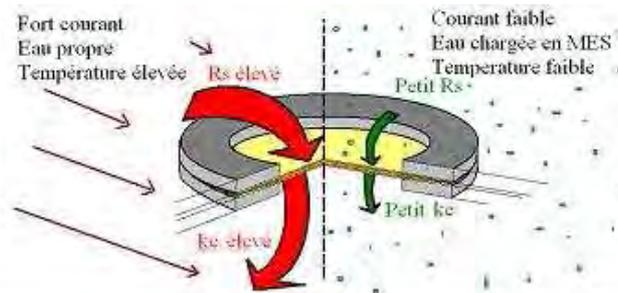


Figure 8 : Facteurs influençant ke et Rs (Belles com. pers.).

Afin de corriger ces variations induites par les conditions environnementales, l'approche PRC a été développée dans les POCIS (Mazzella *et al.*, 2010, Huckins *et al.*, 2002). Un ou plusieurs composés PRC sont introduits dans les POCIS avant leur immersion. La désorption de ces composés durant la période d'exposition va permettre le calcul d'une constante de désorption (ke) qui suit une cinétique d'ordre 1 dans le cas d'échange isotrope :

$$\frac{d C_{\text{POCIS}}}{dt} = -k_e C_{\text{POCIS}}$$

L'introduction de PRC et le suivi de leur cinétique de désorption du POCIS vers le milieu va donc permettre de calculer la constante de désorption ke des PRC *in situ*.

$$k_e \text{ PRC } in \text{ situ} = -\ln \frac{[C_{\text{POCIS prc}}]}{[C_{\text{POCIS prc } t_0}]} / t$$

Où ke : constante de désorption
 $[C_{\text{POCIS prc}}]$: concentration des PRC après exposition des POCIS
 $[C_{\text{POCIS prc } t_0}]$: concentration des PRC avant exposition des POCIS
 t : temps d'exposition

Cette constante ke est directement corrélée au Rs et varie en fonction des conditions du milieu, plus ke est faible plus Rs sera faible, et inversement (Figure 8). L'obtention de cette constante dans les conditions environnementales permet ensuite par comparaison aux Rs et aux ke obtenues durant les calibrations en laboratoire de déterminer un $R_{s \text{ in situ}}$ (Petty *et al.*, 2004)

$$R_{s \text{ in situ}} = (k_e \text{ in situ} / k_e \text{ calibration}) \times R_{s \text{ calibration}}$$

Où $R_{s \text{ in situ}}$: Taux d'échantillonnage calculé in situ dans les conditions environnementales.
 $k_e \text{ in situ}$: Constante de dépurabilité déterminé in situ dans les conditions environnementales.
 $k_e \text{ calibration}$: Constante de dépurabilité déterminé en laboratoire en conditions contrôlées.
 $R_{s \text{ calibration}}$: Taux d'échantillonnage déterminé en laboratoire en conditions contrôlées.

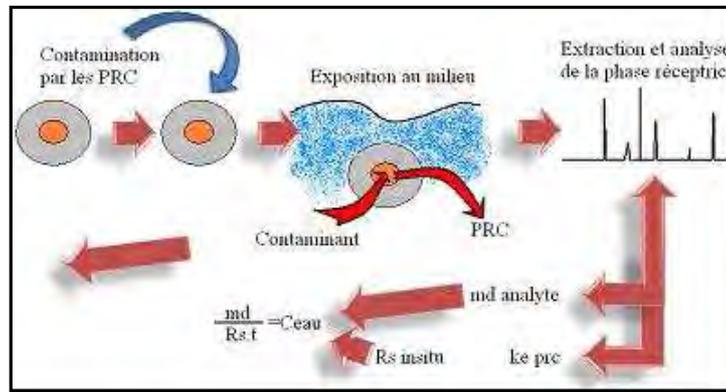


Figure 9 : Principe de quantification par les PRC (Belles com. pers.)

(PRC : Performance Reference Compounds, md : masse d'analytes après exposition, ke : Constante de dépurat, Rs : taux d'échantillonnage)

Ce $R_{s\ in\ situ}$ déterminé dans les conditions d'exposition *in situ* va permettre de déterminer la concentration des composés ciblés dans le milieu exprimé en $ng.L^{-1}$.

Dans le cadre de ce travail, les taux d'échantillonnage (R_s) de différentes SP ont pu être déterminés dans un premier temps au laboratoire dans des conditions d'expérimentations contrôlées (calibration laboratoire). Nous avons déterminé les taux d'échantillonnage (R_s) de plus de 50 molécules. Nous avons identifié deux potentiels composés PRC (caféine, salbutamol) et enfin nous avons étudié et démontré le peu d'influence des variations des conditions environnementales telles que le pH et la salinité sur les R_s . De façon à améliorer l'aspect quantitatif de l'outil (notamment vis-à-vis des conditions hydrodynamiques) nous avons dans une seconde phase développé et optimisé l'utilisation des PRC. Les couples $k_{e\ labo} / R_{s\ labo}$ ont été déterminés, permettant ainsi une approche quantitative plus fine sur les échantillonneurs exposés dans le milieu (Figure 10).

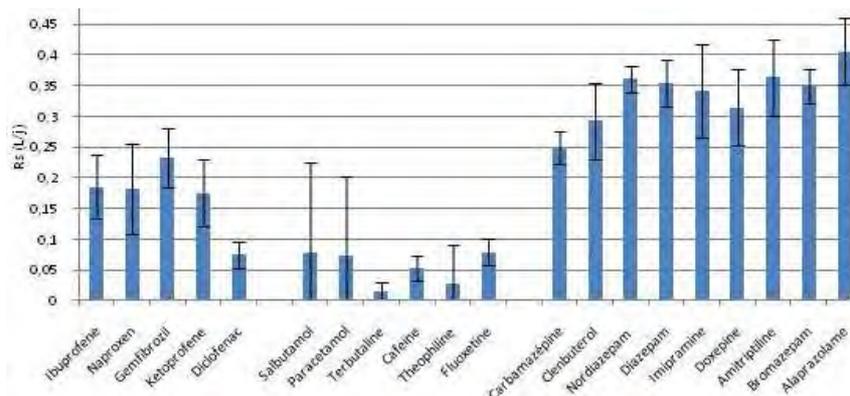


Figure 10 : Taux d'échantillonnage ($R_{s\ labo}$) déterminés en laboratoire en conditions contrôlées.

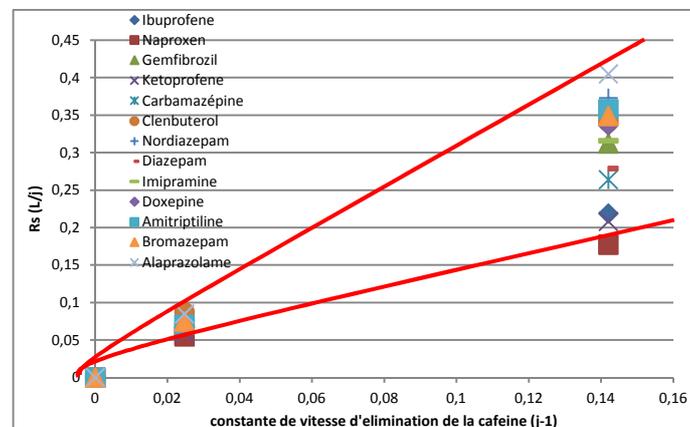


Figure 11 : Relation entre la constante d'élimination (k_e) de la caféine et le taux d'échantillonnage R_s de quelques pharmaceutiques modèles.

II.3. Application des méthodes optimisées et développées au suivi environnementale de l'estuaire de Seine.

II.3.1. Stratégie d'échantillonnage

Afin d'évaluer les niveaux de concentrations des différentes SP dans le milieu étudié et de quantifier les apports de SP par les STEP, des campagnes de prélèvements ont été réalisées sur 5 sites sur l'estuaire (8 campagnes « milieu ») et sur 4 STEP (6 campagnes « STEP ») (Tableau 4, Figure 12).

Tableau 4 : Campagnes d'échantillonnage menées dans le cadre du projet Medseine

	Date	Milieu Dissous	Milieu POCIS	STEP
Campagne 1	08/03/2011	x		
Campagne 2	05/04/2011	x		
Campagne 3	04/05/2011	x	x	x
Campagne 4	15/06/2011	x	x	x
Campagne 5	19/07/2011	x	x	x
Campagne 6	30/08/2011	x	x	x
Campagne 7	13/10/2011	x	x	x
Campagne 8	23/11/2011	x	x	x

Pour les campagnes « milieu », cinq sites d'échantillonnage répartis tout au long de l'estuaire ont été choisis :

- Poses : au niveau du barrage afin de caractériser les apports en SP venant de l'amont
- Elbeuf : au niveau du pont routier afin de caractériser les niveaux de contamination avant Rouen
- La Bouille : au niveau du bac pour caractériser les niveaux de contamination après Rouen
- Caudebec en Caux : au niveau du dernier ponton devant la mairie
- Honfleur : au niveau du radar de Honfleur

Les campagnes ont été conduites de mars à novembre 2011 dans des conditions de marée similaires. Les prélèvements ont été réalisés à marée descendante de l'amont vers l'aval sur des coefficients de marée d'environ 80. Le premier prélèvement à Poses a toujours été réalisé au moment de la marée haute au Havre et le dernier prélèvement au niveau de Honfleur à marée basse. Sur chaque site, des prélèvements ponctuels d'eau ont été réalisés. A partir du mois de mai en parallèle des prélèvements ponctuels des échantillonneurs passifs de type POCIS ont été déployés.

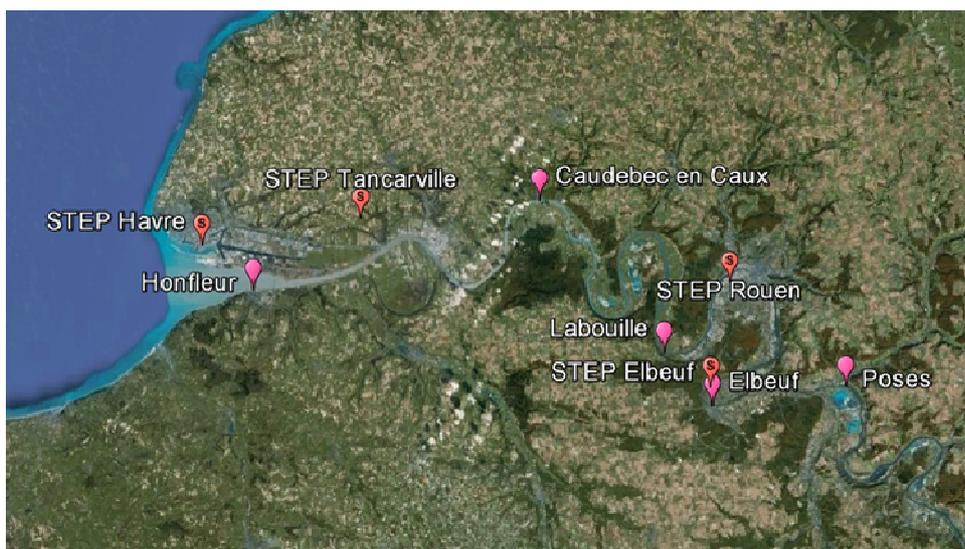


Figure 12 : Localisation géographique des stations de prélèvements sur l'estuaire et des 4 STEP échantillonnées.

Pour les campagnes « STEP », quatre STEP ont été suivies (<http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr/>):

- STEP Elbeuf : Saint Aubin les Elbeuf (capacité nominale 118 000 EH, débit de référence 15 800 m³.j⁻¹)
Prélèvements moyennés 24h de 11h à 11h, débit moyen lors des prélèvements : 10 000 ± 900 m³.j⁻¹.
- STEP Rouen : Le petit Quevilly (capacité nominale 500 000 EH, débit de référence 85 000 m³.j⁻¹)
Prélèvements moyennés 24h de 8h à 8h débit moyen lors des prélèvements : 65 600 ± 15000 m³.j⁻¹.
- STEP Tancarville : Tancarville (capacité nominale 1 800 EH, débit de référence 300 m³.j⁻¹)
Prélèvements ponctuels
- STEP Le Havre : Le Havre (capacité nominale 300 000 EH, débit de référence 52 000 m³.j⁻¹)
Prélèvements moyennés 24h de 0h à 0h.

II.3.2. Contamination des STEP

Dans les rejets de stations d'épuration l'ensemble des 97 SP d'usage courant et d'usage spécifique ont été suivis et 71 molécules ont été détectées au moins 1 fois. La Figure 13 illustre les niveaux de concentrations moyens en SP retrouvés dans les effluents des 4 STEP durant la période d'étude. Les concentrations moyennes retrouvées ne présentent pas de différences significatives et sont de l'ordre de 8 µg.L⁻¹.

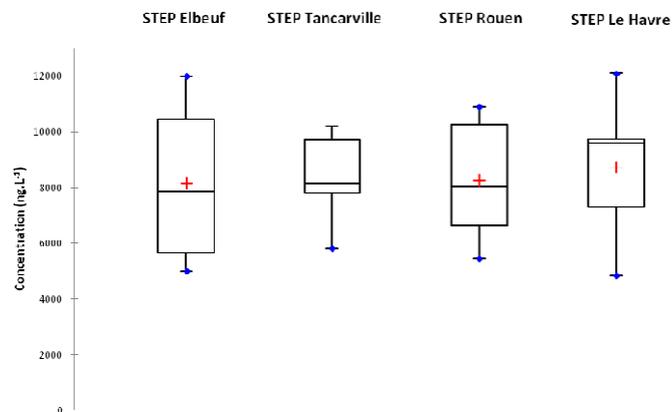


Figure 13 : Concentrations totales moyennes en SP retrouvées dans les 4 STEP échantillonnées.

Les concentrations exceptionnellement fortes retrouvées au moins de juin dans l'effluent de Tancarville ont été écartées du jeu de données pour cette représentation, afin que le profil atypique vraisemblablement dû à un dysfonctionnement de la STEP à ce moment là ne marque pas la tendance générale

Afin d'aller plus loin dans l'interprétation des niveaux de concentration des SP dans les effluents de STEP, les Figure 14, Figure 15 et Figure 16 illustrent les variations de concentration des différentes STEP, ainsi que l'empreinte moyenne de contamination. Les concentrations des différentes STEP présentent un profil de variation comparable avec des concentrations en SP plus fortes en juin, puis qui diminuent pendant l'été, et réaugmentent à l'automne. Les STEP d'Elbeuf et de Rouen présentent des profils de contaminations similaires dominés par des bêtabloquants comme le sotalol, l'aténolol, le propranolol et le bisoprolol, des antibiotiques appartenant à la famille des quinolones comme la ciprofloxacine et la norfloxacine ou à la famille des macrolides comme la clarithromycine et l'érythromycine, des anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) comme le diclofénac et le kétoprofène et un antiépileptique, régulateur de l'humeur la carbamazépine. La STEP de Tancarville qui est la seule STEP suivi par échantillonnage ponctuel, présente une forte concentration de paracétamol au mois de juin (70 µg.L⁻¹). Cette forte concentration exceptionnelle du mois de juin a été exclue de la représentation de l'empreinte de contamination moyenne (Figure 14) afin de ne pas marquer les tendances. Cette forte concentration de paracétamol est corrélée à la présence d'autres composés à des concentrations plus forte que la moyenne comme la caféine (4378 ng.L⁻¹), la théophylline (3066 ng.L⁻¹), l'aténolol (2043 ng.L⁻¹), l'azythromycine (943 ng.L⁻¹), la spiramycine (498 ng.L⁻¹) le sulfaméthoxazole 1988 ng.L⁻¹) la sulfapyridine (1659 ng.L⁻¹). Par ailleurs, le profil moyen (hors prélèvement du mois de juin) montre que la proportion d'antibiotiques et d'AINS est plus importante que dans l'effluent des STEP d'Elbeuf et Rouen. La caféine et la théophylline apparaissent également en proportions significatives. La STEP du Havre présente un profil de contamination légèrement différent des STEP de Rouen et d'Elbeuf avec une proportion plus importante d'antibiotiques et une moindre proportion de bêtabloquants.

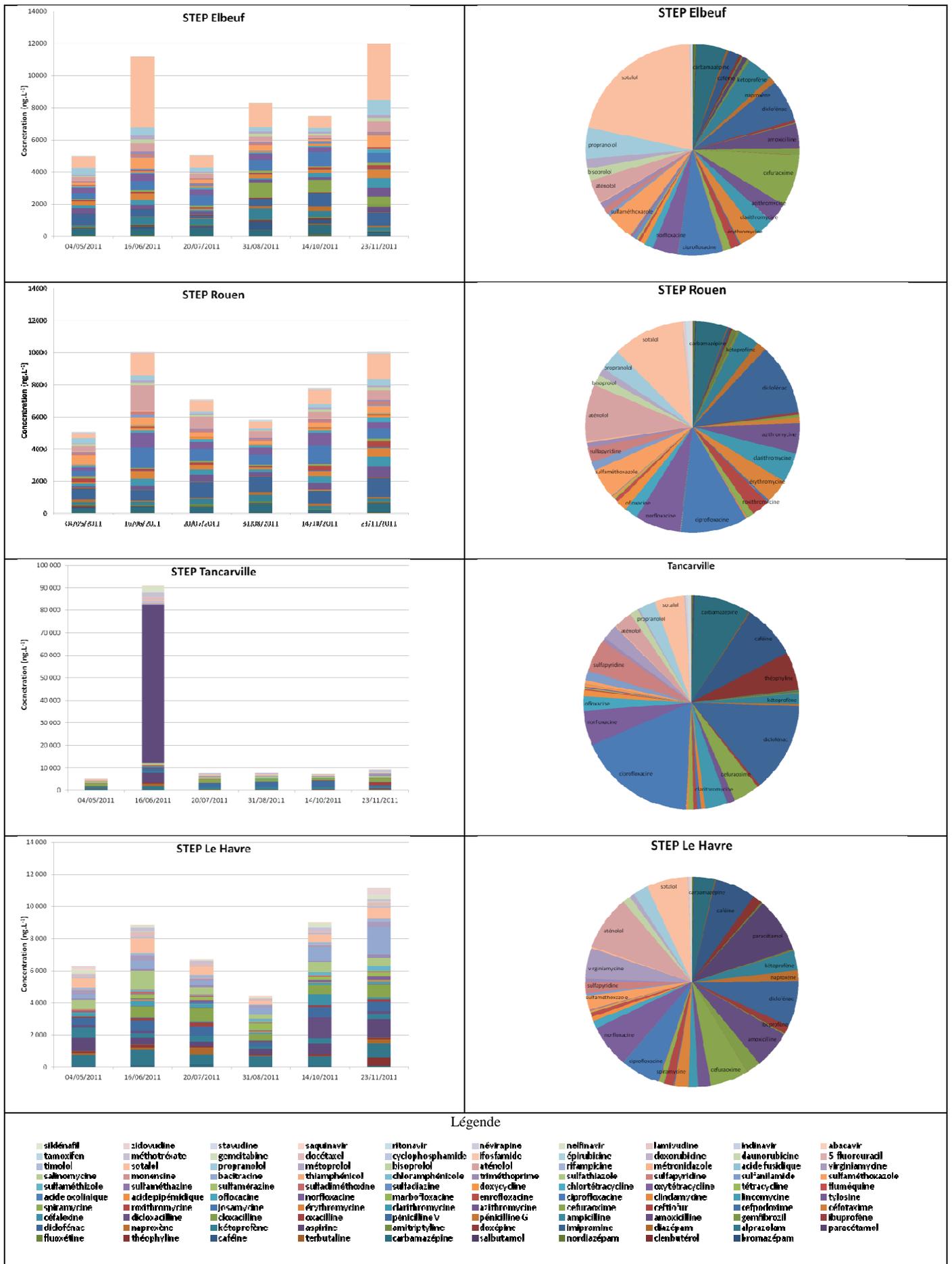


Figure 14 : Empreintes et concentrations des différentes substances pharmaceutiques analysées dans les effluents de stations d'épuration.

Les concentrations exceptionnellement fortes retrouvées au moins de juin dans l'effluent de Tancarville ont été écartées du jeu de données pour cette représentation, afin que le profil atypique vraisemblablement dû à un dysfonctionnement de la STEP à ce moment là ne marque pas la tendance générale

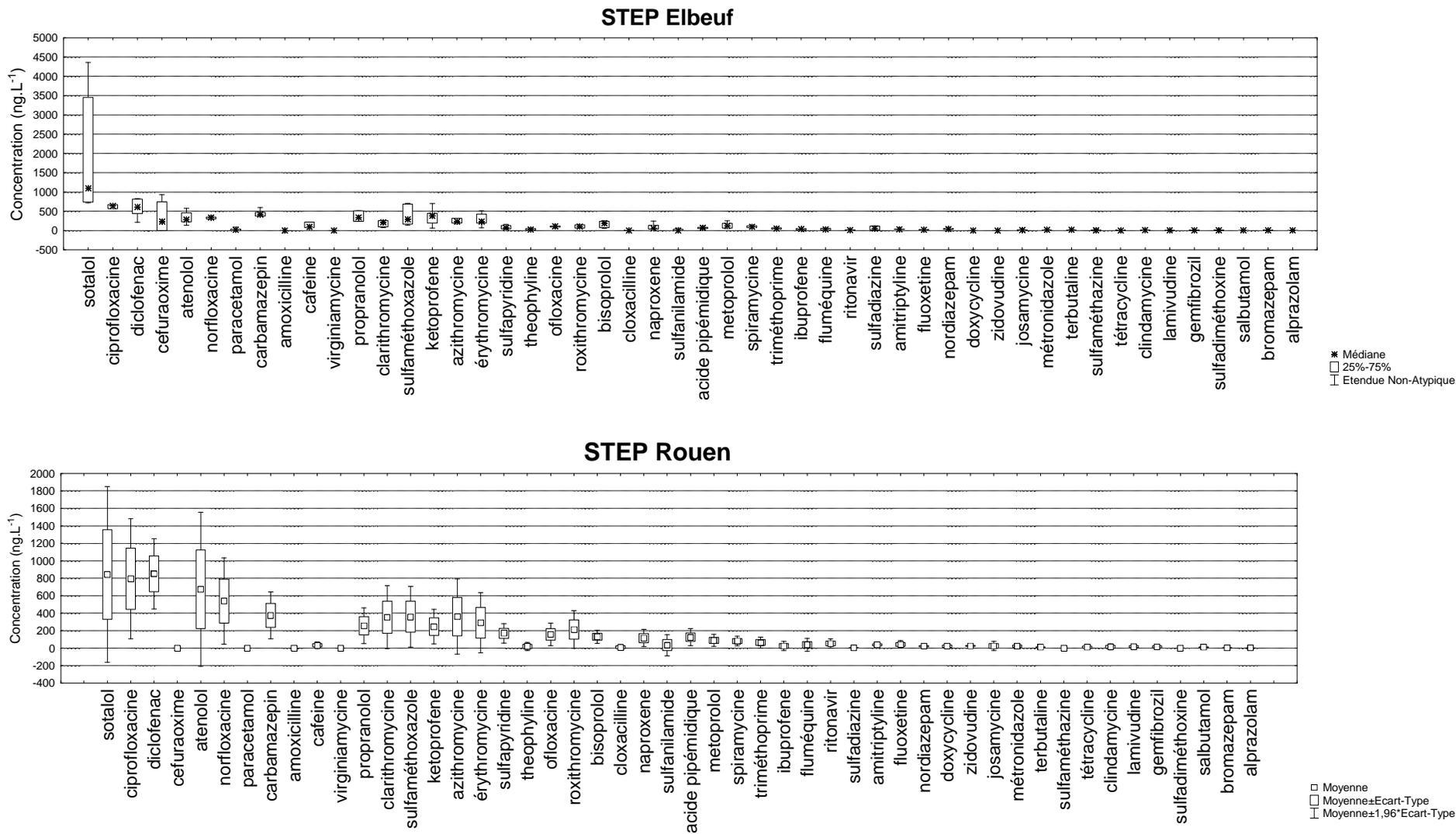


Figure 15: Concentrations moyennes retrouvées pour les différentes substances pharmaceutiques détectées dans les effluents des STEP de Rouen et Elbeuf durant la période d'étude.

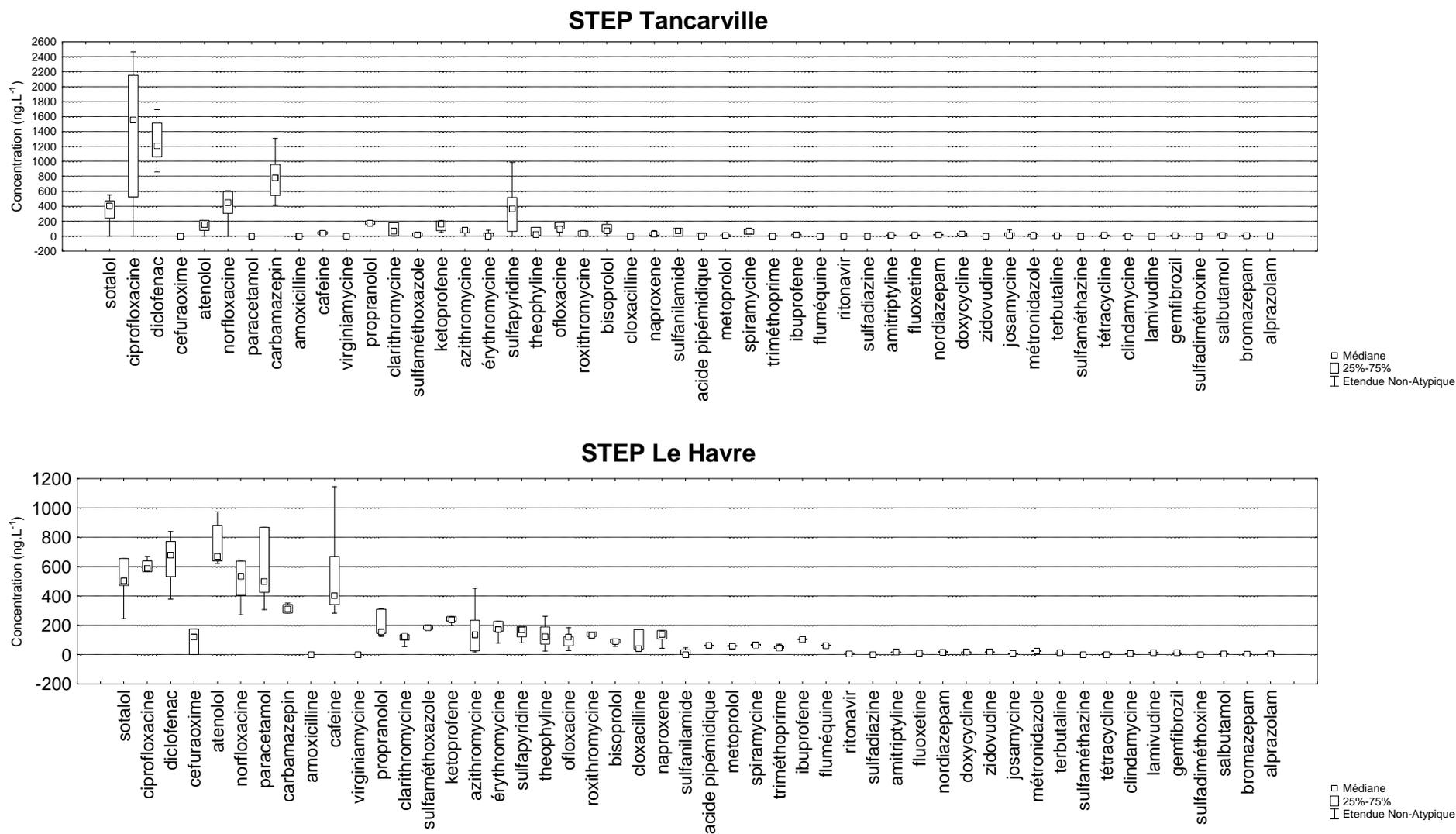


Figure 16 : Concentrations moyennes retrouvées pour les différentes substances pharmaceutiques détectées dans les effluents des STEP de Tancarville et du Havre durant la période d'étude.

Les concentrations exceptionnellement fortes retrouvées au moins de juin dans l'effluent de Tancarville ont été écartées du jeu de données pour cette représentation, afin que le profil atypique vraisemblablement dû à un dysfonctionnement de la STEP à ce moment là ne marque pas la tendance générale

Les données de concentrations obtenues dans le cadre de ce suivi ont été comparées pour quelques molécules modèles aux données obtenues dans des travaux antérieurs (Togola, 2006). Les concentrations retrouvées sont du même ordre de grandeur que celles observées en 2006. Dans la gamme des concentrations moyennes retrouvées dans les STEP européennes (Tableau 6).

Tableau 5 : Comparaison des données obtenues dans le cadre du suivi Medseine avec des données antérieures (Togola, 2006)

	STEP Elbeuf		STEP Rouen		STEP Tancarville	
	Togola, 2006	Medseine 2011	Togola, 2006	Medseine 2011	Togola, 2006	Medseine 2011
Caféine	54[nd-115]	163[34-446]	59[16-130]	33[9-66]	221[3-815]	761[19-4378]
Carbamazépine	367[nd-858]	413[198-594]	324[nd-858]	376[178-539]	813[113-2519]	797[414-1308]
Diclofénac	96[14-282]	586[214-827]	470[14-282]	852[631-1156]	464[26-1014]	1257862-1691]
Gemfibrozil	121[6-525]	12[5-26]	69[6-525]	14[2-34]	62[nd-135]	8[5-12]
Ibuprofène	100[nd-342]	36[14-61]	48[nd-342]	30[11-77]	44[7-95]	34[14-77]
Kétoprofène	217[21-1136]	361[63-698]	71[21-1136]	247[154-409]	988[nd-3903]	142[49-206]
Naproxène	140[nd-267]	90[13-244]	146[nd-267]	116[57-188]	160[14-620]	32[7-73]

Tableau 6 : Comparaison des données obtenues avec les données de la littérature

Composés	Cette étude	Pays	Concentration (ng.l ⁻¹)	Référence Bibliographique
Caféine	373[9-4378]	France	94 – 857	Togola 2006
		Etats Unis	jusqu' à 9 900	Batt <i>et al.</i> , 2006
		Suède	Jusqu'à 220	Bendz <i>et al.</i> , 2005
Carbamazépine	477 [157-1308]	France	194 - 1506	Togola 2006
		Suède	Jusqu'à 1180	Bendz <i>et al.</i> , 2005
		-	150 - 2300	Miege <i>et al</i> 2009
Ciprofloxacine	887 [294-2 465]	Suisse	72 ±14	Golet <i>et al.</i> , 2002a
		France	60	Andréozzi <i>et al.</i> , 2003
		Suède	30	Andréozzi <i>et al.</i> , 2003
Clarithromycine	266 [9-1235]	Allemagne	240	Hirsch <i>et al</i> , 1999
		-	359	Miege <i>et al.</i> , 2009
Diclofénac	842 [214-1691]	France	81 - 3243	Togola 2006
		-	35 - 1950	Miege <i>et al.</i> , 2009
Diazépam	4 [2-7]	Allemagne	jusqu' à 40	Ternes, 1998
		-	nd à 20	Togola 2006
Erythromycine	236 [40-509]	Allemagne	2500	Hirsch <i>et al</i> , 1999
		Allemagne	150 - 430	Huschek <i>et al</i> , 2004
		UK	10 -1840	Petrovic <i>et al</i> , 2005
		Canada	80	Petrovic <i>et al</i> , 2005
Gemfibrozil	12 [2-34]	France	100 - 1372	Togola 2006
		-	60 - 1340	Miege <i>et al.</i> , 2009
Ibuprofène	55 [11-200]	France	67 - 1768	Togola 2006
		Allemagne	jusqu'à 3400	Ternes, 1998
		-	2 - 24 600	Miege <i>et al.</i> , 2009
Kétoprofène	255 [49-698]	France	139 - 3341	Togola 2006
		-	40 - 1620	Miege <i>et al.</i> , 2009
Métoprolol	82 [0-248]	France	80	Andréozzi <i>et al.</i> , 2003
		Italie	10 - 100	Andréozzi <i>et al.</i> , 2003
Naproxène	93 [7-263]	France	1005 - 7355	Togola 2006
Ofloxacine	147 [28-556]	France	330 - 510	Andréozzi <i>et al.</i> , 2003
		Italie	290 - 580	Andréozzi <i>et al.</i> , 2003
		Suède	120	Andréozzi <i>et al.</i> , 2003
Paracétamol	8245 [35-70229]	France	424 – 16 667	Togola 2006
		Allemagne	jusqu'à 6000	Ternes, 1998
Propranolol	291 [116-945]	France	10 - 40	Andréozzi <i>et al.</i> , 2003
		Italie	10 - 90	Andréozzi <i>et al.</i> , 2003
Roxithromycine	139 [30-386]	Allemagne	110 – 520	Huschek <i>et al.</i> , 2004
Sulfaméthoxazole	266 [12-703]	Italie	10 -30	Andréozzi <i>et al.</i> , 2003
		Allemagne	400	Hirsch <i>et al</i> , 1999

Les données de concentration en SP retrouvées dans les STEP étudiées ont été corrigées par le débit de référence des STEP afin d'obtenir une approximation des flux de SP déversés dans l'estuaire par ces réseaux d'assainissement (<http://assainissement.developpement-durable.gouv.fr/>). A titre de comparaison, la Figure 17 présente les débits de SP en sortie des STEP et du barrage de Poses (l'axe des ordonnées est en échelle logarithmique). Le flux de SP observé sur le fleuve au niveau du barrage de Poses est de $15,75 \pm 5,89 \text{ kg.j}^{-1}$ alors que ceux observés aux niveaux des STEP sont pour Rouen de $0,47 \pm 0,07 \text{ kg.j}^{-1}$ pour Elbeuf de $0,08 \pm 0,023 \text{ kg.j}^{-1}$ pour Tancarville de $0,006 \pm 0,009 \text{ kg.j}^{-1}$ et pour Le Havre de $0,34 \pm 0,20 \text{ kg.j}^{-1}$. Le fleuve au niveau de Pose apporte donc 20 à 200 fois plus de SP que les STEP étudiées, le vecteur principal de SP dans l'estuaire est donc encore à l'heure actuelle l'activité anthropique en amont du barrage de Poses et selon toutes vraisemblance les STEP de la région parisienne comme par exemple la STEP d'Achère qui traite 7 500 000 EH et affiche un débit de référence de $2\,300\,000 \text{ m}^3.\text{j}^{-1}$.

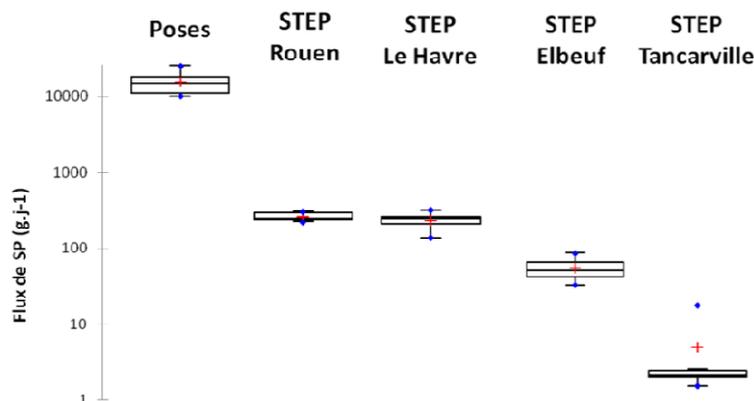


Figure 17 : Quantité de SP déversés pas jour dans l'estuaire au niveau du barrage de Poses et par les différentes STEP étudiées.
 Les concentrations exceptionnellement fortes retrouvées au mois de juin dans l'effluent de Tancarville ont été écartées du jeu de données pour cette représentation, afin que le profil atypique vraisemblablement dû à un dysfonctionnement de la STEP à ce moment là ne marque pas la tendance générale

II.3.3. Suivi de la contamination dans l'estuaire de Seine

Sur l'ensemble des 5 sites suivis tout au long de l'estuaire, 41 SP sur les 97 molécules suivies ont été détectées au moins une fois. La Figure 18 illustre les variations de la concentration totale en SP retrouvées sur les différents sites durant la période d'étude de mars à novembre 2011. Les concentrations les plus fortes sont retrouvées au niveau de Poses ($1850 \pm 741 \text{ ng.L}^{-1}$) puis décroissent tout au long de l'estuaire. Les sites de Elbeuf, La Bouille, Caudebec et Honfleur présentent respectivement des concentrations moyennes de $1210 \pm 599 \text{ ng.L}^{-1}$, $640 \pm 215 \text{ ng.L}^{-1}$, $498 \pm 263 \text{ ng.L}^{-1}$, $188 \pm 110 \text{ ng.L}^{-1}$. Globalement les concentrations en SP diminuent de l'amont vers l'aval vraisemblablement par un effet de dilution due à l'entrée d'eau marine dans l'estuaire. Cette observation confirme les tendances déjà observées (Togola, 2006) et confirme également le fait que l'apport majoritaire de SP dans l'estuaire vient de Poses.

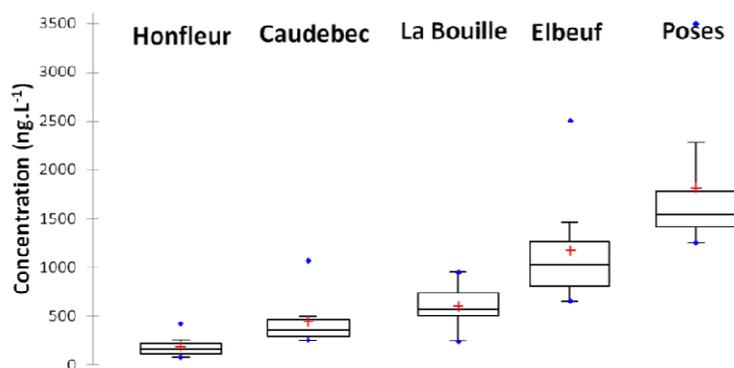
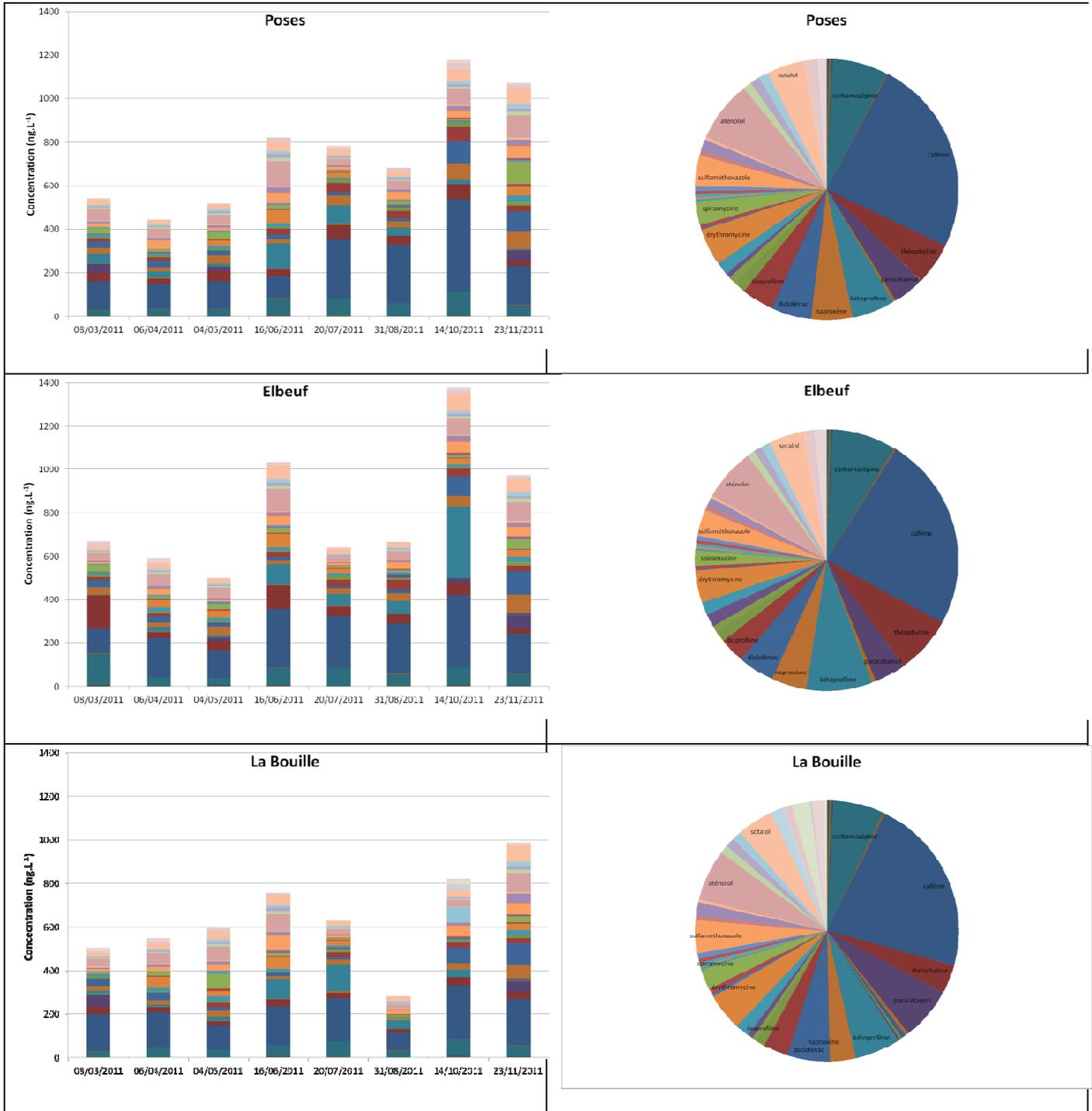


Figure 18 : Variation des concentrations en SP totales retrouvées sur les différents sites de l'estuaire de mars à novembre 2011.

Les profils de contaminations déterminés sur les différents sites après analyse des prélèvements ponctuels d'eau sont représentés dans la Figure 19. Sur l'ensemble des points suivis, les concentrations en SP semblent suivre une évolution similaire présentant une légère augmentation des concentrations au niveau du mois de juin, puis une hausse significative durant la période automnale vraisemblablement corrélée aux pics infectieux. Cette tendance a déjà été observée au niveau des STEP. Les profils de contamination sont similaires, ils sont dominés par les AINS comme le kétoprofène, l'ibuprofène et le diclofénac, les bêtabloquants comme le sotalolol et l'aténolol par des antibiotiques comme l'érythromycine et la spiramycine, la caféine et la carbamazépine représentent également une part importante des SP retrouvés dans l'estuaire.



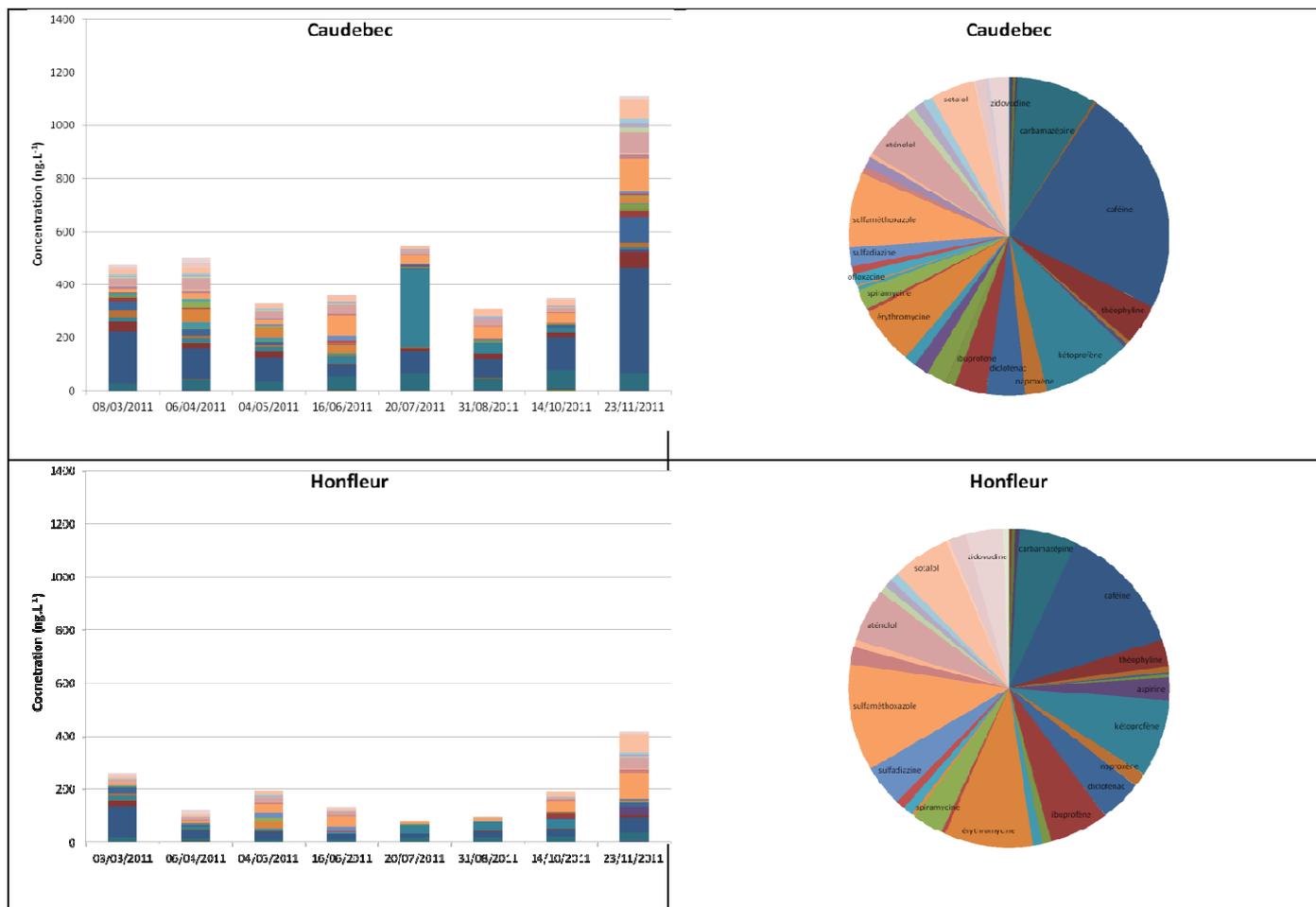


Figure 19 : Empreintes et concentrations des différentes SP retrouvées dans les échantillons ponctuels sur les stations de l'estuaire.

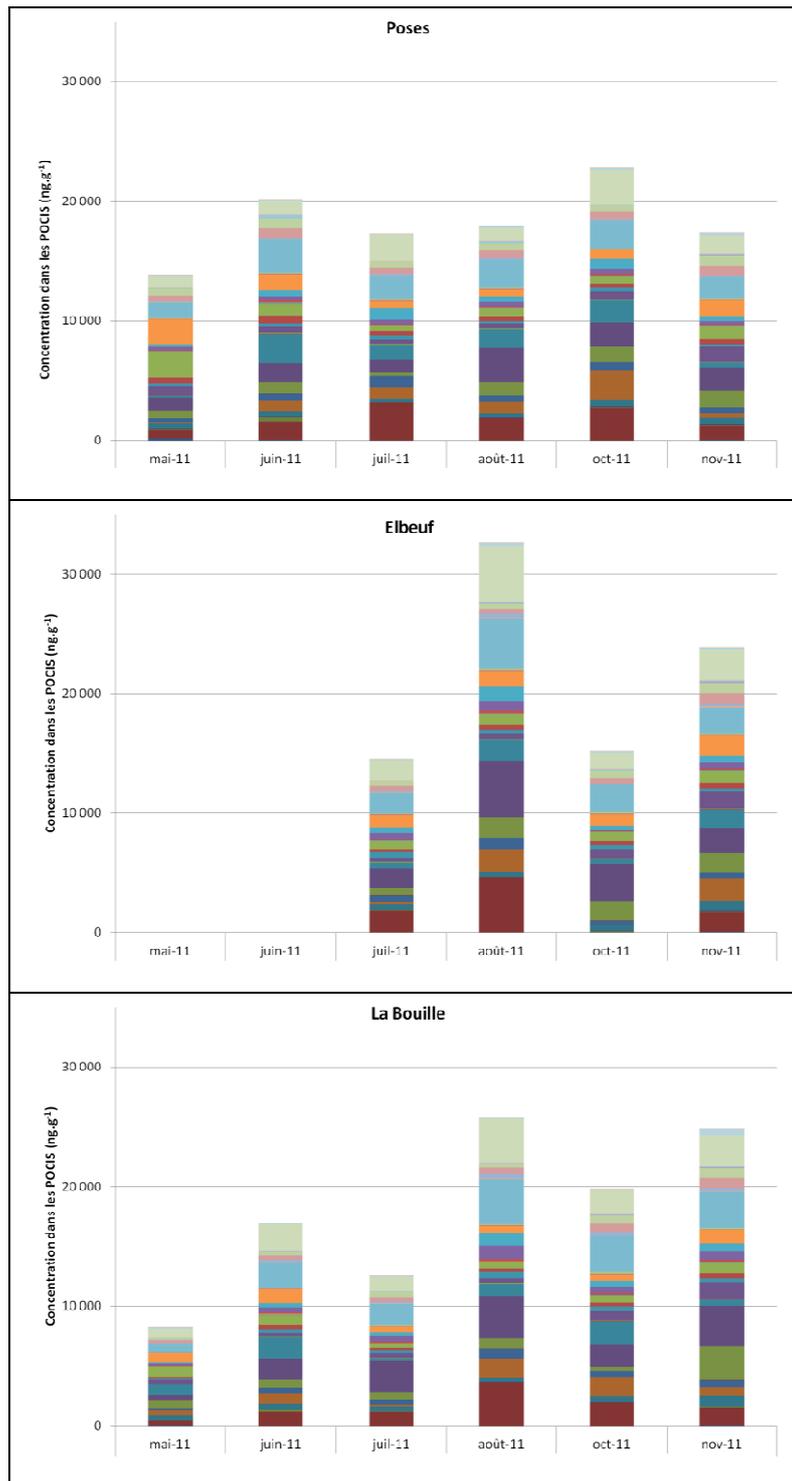
Les données obtenues au niveau du barrage de Poses lors de cette étude ont été comparées avec les données antérieures (Togola, 2006). Afin d'illustrer les flux de SP de façon plus parlante, les flux de quelques SP représentatives ont été calculés en nombre de comprimés déversés par jour au niveau du barrage de Poses (Tableau 7). Pour le calcul, le débit du fleuve à Poses a été multiplié par la concentration déterminée des SP dans l'eau prélevée au niveau du barrage. Globalement le nombre de comprimés déversés est équivalent à celui déversé en 2003, mis à part pour l'ibuprofène où la quantité de comprimé a significativement diminuée (ce qui pourrait être du à une amélioration du traitement biologique en lui-même des stations amont ou de l'adjonction de traitement tertiaire ou à une moindre consommation).

Tableau 7 : Comparaison des données obtenues au niveau de Poses dans le cadre du suivi Medseine avec des données antérieures (Togola, 2006)

	Quantité de comprimés déversés par jour au niveau du barrage de Poses	
	Togola, 2006	Medseine
carbamazépine (200 mg)	6 105 [584-16 816]	5 906 [2 951-12 312]
diclofénac (50 mg)	39 154 [5 030-81 900]	16 581 [4435-32 753]
gemfibrozil (450 mg)	498 [76-1 368]	475 [224-917]
ibuprofène (200 mg)	24 932 [1 031-108 149]	3 076 [0-7 063]
kétoprofène (200 mg)	3 466 [0-9 527]	5 065 [304-14 013]
naproxène (500 mg)	1 941 [214-4 864]	1 773 [609-2 922]

Parallèlement aux échantillonnages ponctuels, un suivi de la contamination par des échantillonneurs passifs de type POCIS a été réalisé. Ces échantillonneurs ont été analysés par la nouvelle méthodologie analytique permettant de suivre 53 SP usage courant et d'usage spécifique sur une seule analyse. Les concentrations en SP retrouvés dans les échantillonneurs exprimées en ng.g^{-1} de phase sont présentées dans la Figure 20. Ces résultats confirment les tendances déjà observées et permettent également de mettre en évidence de nouvelles molécules non

suivies initialement dans l'échantillonnage ponctuel comme l'acébutolol (bétabloquant), l'oxazépan (anxiolytique) le bézafibrate (hypolipédémiant), la cétirizine (anti-histaminique), le disopyramide (antiarythmiques) et le méprobamate (myorelaxant, anxyolitique).



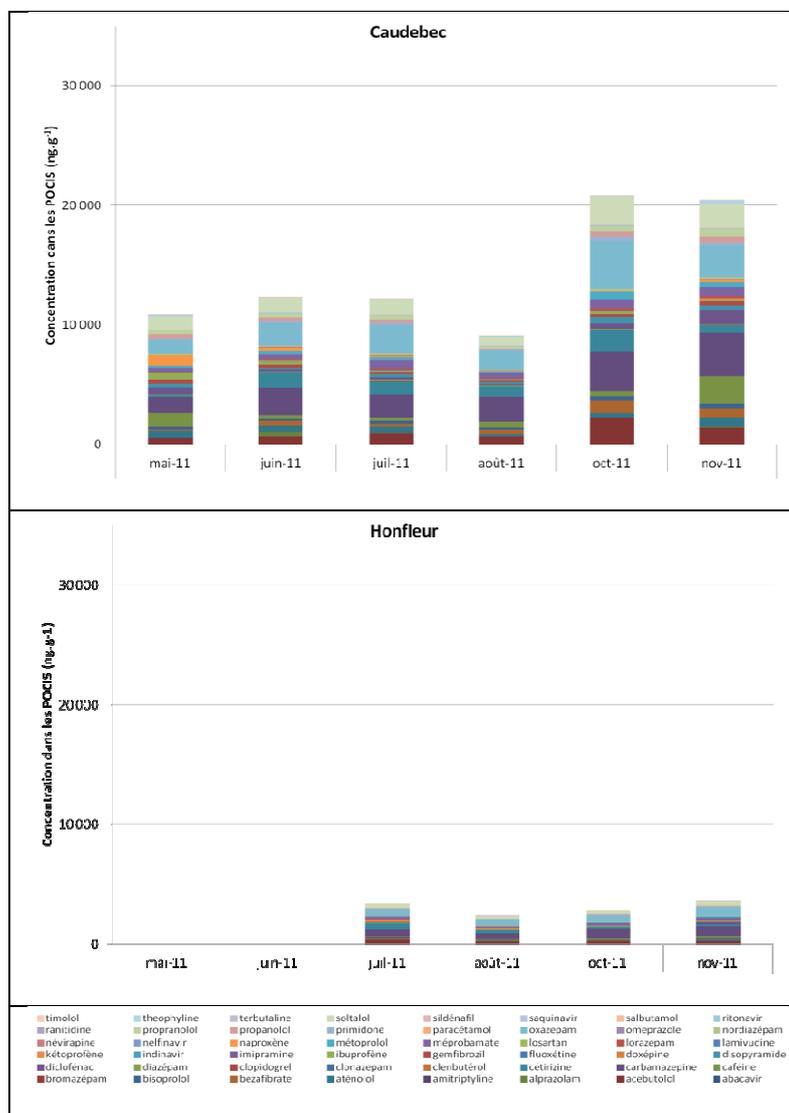


Figure 20 : Concentrations des différentes SP retrouvées dans les POCIS sur les différentes stations de l'estuaire.

Les échantillonneurs utilisés dans le cadre de ce suivi contiennent des composés PRC permettant le calcul d'une constante d'élimination *in situ* (k_e *in situ*). Grâce à cette approche PRC, les constantes d'élimination des composés PRC que sont la DIA d₅, de la caféine C₁₃ et du salbutamol d₃ ont été déterminé *in situ*. La Figure 21 illustre les k_e moyens retrouvés sur les différents sites. Dans l'ensemble les k_e de la caféine C₁₃ et de la DIA d₅ sont équivalents, alors que celle du salbutamol est significativement plus élevée. Ceci est cohérent avec les tendances observées lors d'expérimentations en laboratoire ou lors d'exposition dans d'autres milieux comme l'estuaire de la Gironde. On peut également noter que les k_e au niveau de Honfleur sont plus faibles, ceci peut s'expliquer par le fait que les POCIS immergés au niveau du radar de Honfleur ont subi du biofouling dur (balanes notamment) limitant les échanges entre les POCIS et le milieu.

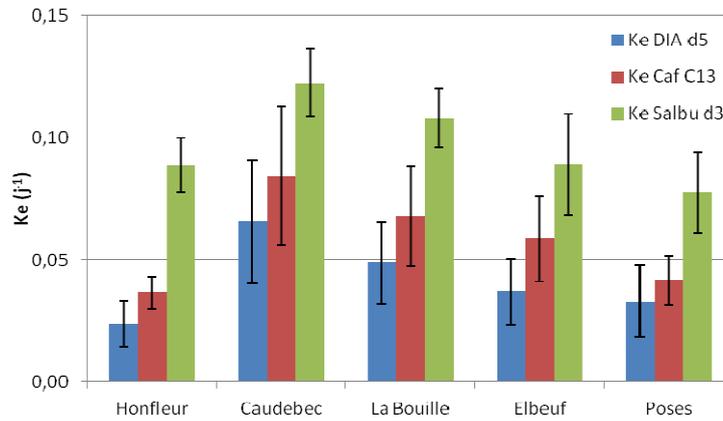


Figure 21 : Moyenne des constantes d'éliminations (ke) déterminés in situ sur les différents sites durant la période d'étude du mois de mai 2011 au mois de novembre.

Les données de concentration exprimées en ng.g^{-1} dans les POCIS peuvent être transformées en concentration dans l'eau sous réserve que les taux d'échantillonnage (Rs) des molécules quantifiées aient été déterminées. En effet le taux d'échantillonnage établit un lien direct entre la quantité de composés retenue par les POCIS et leur concentration dans le milieu (Alvarez *et al.*, 2004; Vrana *et al.*, 2005).

$$[C_{\text{pocis}}] = [C_{\text{eau}}] \times R_s \times t$$

Où $[C_{\text{pocis}}]$: Concentration dans le POCIS (ng.g^{-1})
 $[C_{\text{eau}}]$: Concentration moyenne dans l'eau pendant la période d'exposition (ng.L^{-1})
 R_s : Taux d'échantillonnage ($\text{L.j}^{-1}.\text{g}^{-1}$)
 t : Temps (j)

La Figure 22 illustre les concentrations retrouvées sur les différents sites après échantillonnage ponctuel et après échantillonnage passif pour un composé modèle : la carbamazépine. Les concentrations retrouvées sont du même ordre de grandeur. Les différences observées sont due au fait que les prélèvements ponctuels donnent une image instantanée de la contamination au moment du prélèvement d'eau alors que les POCIS permettent d'avoir accès à la concentration moyenne d'un composé durant la phase d'exposition. Cette concentration moyenne permet d'obtenir une vision intégrée de la contamination et donc d'affranchir de la variabilité journalière, et donc de pouvoir calculer des flux de contaminants plus représentatifs de la réalité.

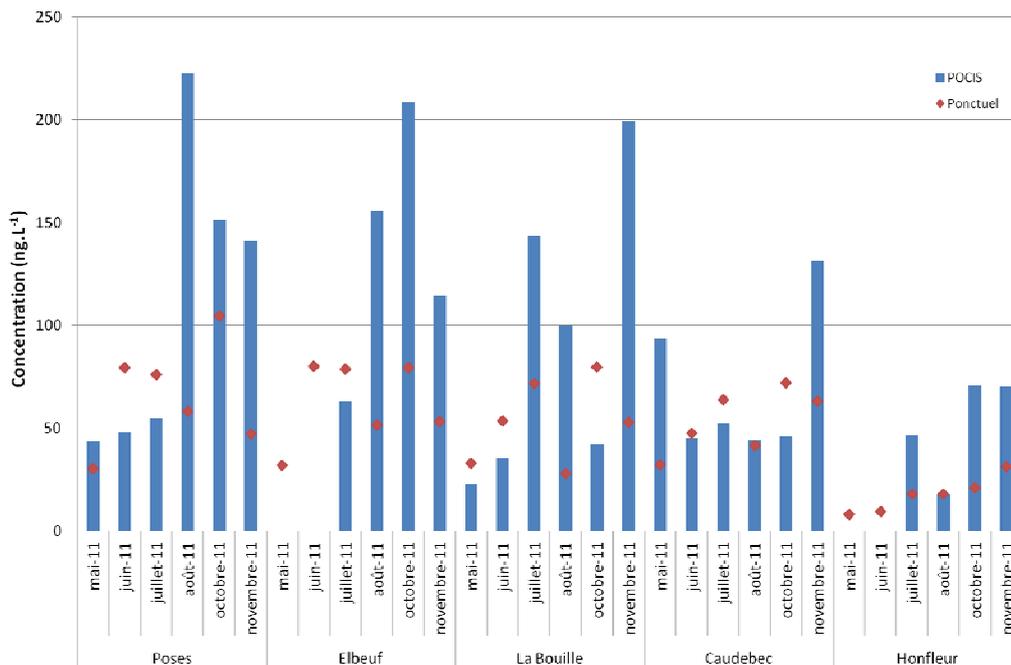


Figure 22 : Comparaison des concentrations obtenues après échantillonnage ponctuel et après échantillonnage passif pour la carbamazépine sur l'ensemble de l'étude.

III. Caractérisation des effets toxiques des effluents de stations d'épuration, des échantillons du milieu et des extraits des échantillonneurs passifs

III.1. Matériel et méthode : Techniques utilisées

III.1.1. Test sur micro-crustacé

III.1.1.a. Bioessai nauplien avec *Eurytemora affinis*

Nous avons déterminé la toxicité des différents extraits aqueux à l'aide d'un test larvaire avec *Eurytemora affinis*. Les tests larvaires sur *Eurytemora affinis* s'appuient sur les travaux de Forget-Leray *et al.* (2005) et Devreker *et al.* (2007) réalisés dans le cadre du programme Seine Aval 3. Les tests sont pratiqués en conditions contrôlées directement sur les premiers stades de développement du copépode, la phase nauplienne. Les effets toxiques sont suivis tout au long du développement nauplien.

Cycle de vie d'*Eurytemora affinis*

La durée du cycle de vie du copépode *E. affinis* dépend des conditions abiotiques, néanmoins dans des conditions optimales le cycle dure entre 18 et 21 jours. Pendant son développement, le copépode *E. affinis*, passe par trois phases successives comportant des métamorphoses : la phase nauplienne (6 stades et 5 mues), la phase copépodite (5 stades et 4 mues) avant d'atteindre l'âge adulte caractérisé par un dimorphisme sexuel (Figure 23). Une fois le stade adulte atteint, les copépodes sont capables de se reproduire. Lors de la reproduction, le mâle capture et immobilise la femelle puis fixe un ou plusieurs spermatophores. Une femelle peut porter plusieurs spermatophores et par conséquent être fécondée par plusieurs mâles. Une fois fécondées, les femelles portent un sac ovigère contenant des œufs. Elles sont ainsi facilement différenciables des autres individus.

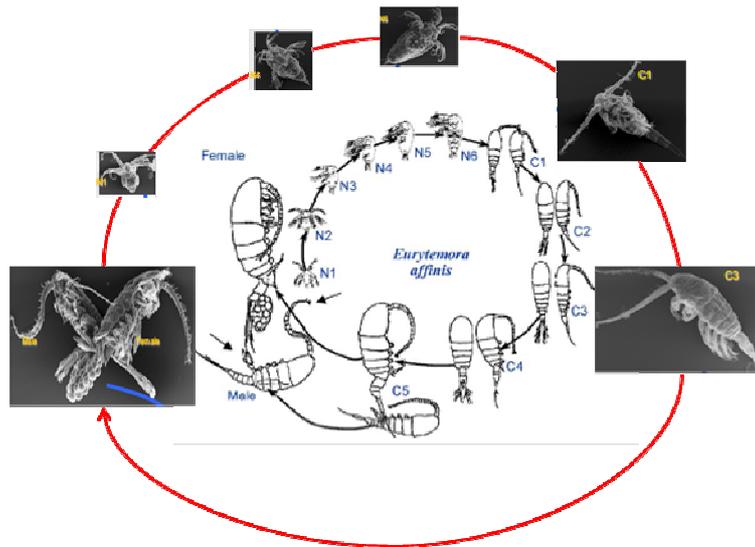


Figure 23 : Cycle de vie du copépode *E. affinis* (d'après Katona, 1970, modifié par Souissi, 2002).

Prélèvement et acclimatation

Les copépodes *E. affinis* ont été collectés à l'aide d'un filet WP2 (maillage 200 µm) dans la zone oligohaline de l'estuaire de Seine près du pont de Tancarville. Les échantillonnages ont été effectués contre le courant de jusant à marée descendante. Les organismes ont été maintenus dans des glacières afin d'être ramenés au laboratoire. Arrivés au laboratoire, ils ont été transférés dans des béciers de 3,5 L et acclimatés aux conditions d'expositions (i.e. eau Volvic à 5 PSU, 15°C). Les copépodes ont ensuite été maintenus dans une chambre thermostatée à 15 °C et à une photopériode de 12 heures jour/12 heures nuit.

Exposition des nauplii (Figure 24)

Trois réplicas d'extraits aqueux provenant des différents points de prélèvements dans l'estuaire de Seine sont déposés dans des cristallisoirs de 2,5 cm de diamètre. Les nauplii âgées de 24h (environ 30 à 50) sont alors placées dans chaque cristallisoir contenant 10 mL d'extrait aqueux. Les cristallisoirs contenant les nauplii sont ensuite placés dans une enceinte thermostatée à 18°C, au rythme circadien (12 heures de luminosité et 12 heures d'obscurité). Chaque jour, la viabilité des nauplii est vérifiée. Les animaux sont nourris avec une suspension d'algues vertes (*Isochrysis sp*) le premier et le troisième jour. Au 6^{ème} jour, la taille des individus (longueur (L) : Figure 24) est évaluée (3 mesures de 10 individus par réplicat).

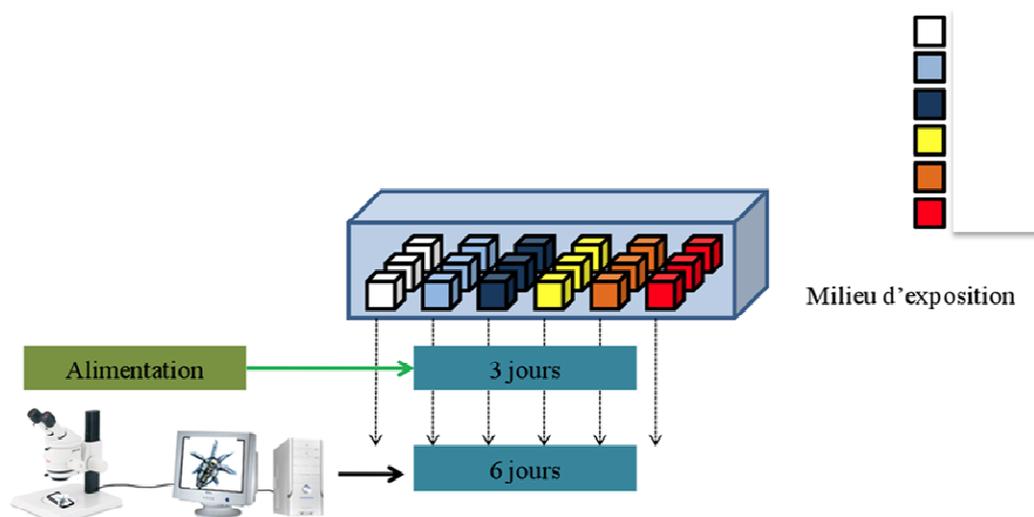


Figure 24 : Bio-essai nauplien avec *Eurytemora affinis* pour évaluer la toxicité des extraits aqueux.

III.1.1.b. Test de neurotoxicité in vitro

Rôle de l'acétylcholinestérase

L'intensité des perturbations locomotrices peut être quantifiée via la mesure de biomarqueurs enzymatiques tels que l'activité acétylcholinestérase (AChE). En effet, cette enzyme est un neuromédiateur permettant la transmission de l'influx nerveux au niveau des jonctions neuromusculaires. Depuis de nombreuses années, la mesure de cette inhibition chez les organismes aquatiques est également utilisée comme biomarqueur des effets neurotoxiques de certains contaminants (organophosphates et les carbamates) dans le cadre de la surveillance de la contamination aquatique (Bocquené et Galgani., 1998 ; Forget *et al.*, 2003). La découverte de l'existence d'une AChE unique et de forte activité chez *E. affinis* (Forget *et al.*, 2002) a renforcé l'intérêt de l'utilisation de cette enzyme en tant que biomarqueur d'exposition aux contaminants chez cette espèce.

Purification de l'AChE

L'AChE a été purifiée par chromatographie d'affinité à partir d'échantillons triés d'*Eurytemora affinis* frais (Forget *et al.*, 2002). Le rendement de la purification a été de 80% et permet d'obtenir un extrait d'acétylcholinestérase à forte activité enzymatique de 15 à 20 DO/mL.

Exposition in vitro et dosage de l'activité AChE

Lors des essais réalisés à 4 °C, (50 µl d'AChE purifiée est mis en contact avec x µL d'échantillon à tester (50 µL d'extrait aqueux ou 5µL d'extrait organique), le temps d'exposition est de 30 min, puis on effectue une mesure de l'activité enzymatique de l'AChE par la méthode d'Ellman (1961) adaptée à la lecture en microplaque (Forget *et al.*, 2003).

III.1.2. Evaluation de la présence de composés œstrogéniques, androgéniques et dioxin-like à l'aide de bioessais in vitro

Il est reconnu que les effluents de STEP urbaines constituent une source de contamination des milieux aquatiques par les composés chimiques de type perturbateur endocrinien (PE) (Creusot *et al.*, 2010, Bellet *et al.* 2012). Un des mécanismes initiaux de l'action des PE consiste en leur capacité à se lier à certains récepteurs nucléaires (NR). Ces récepteurs sont des facteurs de transcription qui régulent l'expression de gènes clés impliqués dans les réponses cellulaires aux hormones. Une altération de l'activité de ces récepteurs peut donc conduire à un dysfonctionnement cellulaire ou tissulaire susceptible d'affecter des fonctions physiologiques essentielles régulées par le système endocrinien comme le développement ou la reproduction.

Dans ce projet, la présence de deux grandes familles de polluants toxiques, les perturbateurs endocriniens à activité hormono-mimétique et les composés dioxin-like, a été testée à l'aide de bioessais in vitro décrits ci-après (Tableau 8). Ces tests sont basés sur l'utilisation de cultures cellulaires qui expriment de manière permanente un gène marqueur artificiel (e.g. luciférase) ou endogène (e.g. cyp1a) dont l'induction est dépendante et spécifique de l'activation des récepteurs endogènes des hormones œstrogènes (ER), androgènes (AR) et glucocorticoïdes (GR) et du récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR) (Tableau 8). Les tests ont été réalisés sur les extraits organiques des effluents de STEP et des prélèvements d'eaux de surface.

Tableau 8 : Description et principe des tests cellulaires utilisés pour la détection de ligands environnementaux dans les extraits organiques d'effluents et d'eaux de surface.

Lignées cellulaires	Effet mesuré	Méthode	References
PLHC-1 <i>Cellules hépatique de poisson (Poeciliopsis lucida)</i>	Activation du récepteur de la dioxine (AhR)	Activité Cyp1A (essai EROD)	<i>Laville et al, 2004</i>
MELN <i>Cellules humaines MCF-7 exprimant de manière permanente le gène rapporteur luciférase couplé à un élément de réponse aux œstrogènes (ERE)</i>	Activation du récepteur des œstrogènes (ER) exprimé de manière endogène	Dosage de la luciférase	<i>Pillon et al, 2005</i>
MDA-kb2 <i>Cellules MDA-MB-543 exprimant de manière stable le gène rapporteur luciférase couplé au promoteur MMTV</i>	Activation/inhibition des récepteurs des androgènes (AR) et des glucocorticoïdes (GR)	Dosage de la luciférase	<i>Wilson et al, 2002</i>

Méthodologie

Les lignées cellulaires MELN et MDA-kb2, dérivées de cellules de cancer du sein, sont cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ dans du milieu nutritif complet DMEM (Dulbecco's modified Earle's Medium, Gibco) en présence de 5 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% d'antibiotiques. Les cellules PLHC-1, dérivées de cancer du foie de vairon tropical, sont cultivées à 30°C sous 5% de CO₂ dans du milieu EMEM (Earle's salt minimal essential medium, Gibco) supplémenté par 5% de SVF et 1% d'antibiotiques. Vingt-quatre heures avant le test, les cellules sont ensemencées en plaques de cultures de 96 puits à raison de 105 cellules par puits. Pour le test d'activité œstrogénique (cellules MELN), le milieu est remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol et en présence de SVF préalablement déstéroïdé.

Les cellules sont exposées pendant 4 h (PLHC-1) et/ou 24 h (MELN, MDA-kb2, PLHC-1) aux différents extraits organiques dilués 200 fois dans le milieu de culture (concentration finale de 0.5 % v/v), ceci afin de s'affranchir d'une toxicité du solvant. Chaque plaque de culture inclue un témoin négatif (solvant seul), un témoin positif (œstradiol (E2) 10 nM, dihydrotestostérone (DHT) 10 nM, benzo(a)pyrène (BaP) 0,3 µM ou dioxine (TCDD) 1nM, selon le test) et une gamme de dilution de l'échantillon à tester (0,5 à 0,005% vol/vol). Après exposition, l'activité luciférase (cellules MELN et MDA-kb2) est mesurée par luminescence après ajout du substrat luciférine (0,3 mM) dans les puits. L'induction du CYP1A (cellules PLHC-1) est déterminée par la mesure de l'activité EROD (7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase) au spectrofluorimètre après ajout de 7-éthoxyrésorufine (2 µM) dans les puits. Les résultats bruts sont exprimés en unités de luminescence ou de fluorescence relatives à l'activité maximale induite par le témoin positif.

Lorsque les échantillons sont positifs, les courbes dose-réponse sont modélisées à l'aide de la macro Excel RegTox (Vindimian, 2012) et les EC20 (concentration en échantillon donnant 20% d'effet) sont déterminées à partir des courbes modélisées. Les teneurs en équivalents-toxiques (TEQ) sont alors calculées selon l'équation : $TEQ = EC20 \text{ de la substance de référence} / EC20 \text{ de l'échantillon}$, en g d'équivalent-toxique/L d'échantillon de départ. Les limites théoriques de détection dans l'échantillon sont calculées à partir de l'EC5 (concentration donnant 5% d'effet) de la substance de référence, selon l'équation : $LD = EC5 \text{ de la substance de référence} / \text{concentration d'échantillon maximale testée (en L d'effluent)}$.

III.2. Résultats obtenus

III.2.1. Test sur micro-crustacé

III.2.1.a. Bioessai nauplien avec *Eurytemora affinis*

Effets sur la survie

Les résultats présentés sont la survie pour tous les extraits aqueux prélevés le long de l'estuaire de Seine au cours de l'année 2011 (Figure 25 et Figure 26).

La Figure 25 présente la survie du premier stade de développement du copépode *Eurytemora affinis* après une exposition de 6 jours en condition semi statiques (renouvellement du milieu à J3) à des extraits aqueux provenant de différents points le long de l'estuaire de Seine, il n'apparaît ici aucune différence significative par rapport au Témoin selon le mois de prélèvement et selon les sites d'échantillonnage, excepté pour les extraits aqueux provenant de la Bouille en avril et juillet 2011.

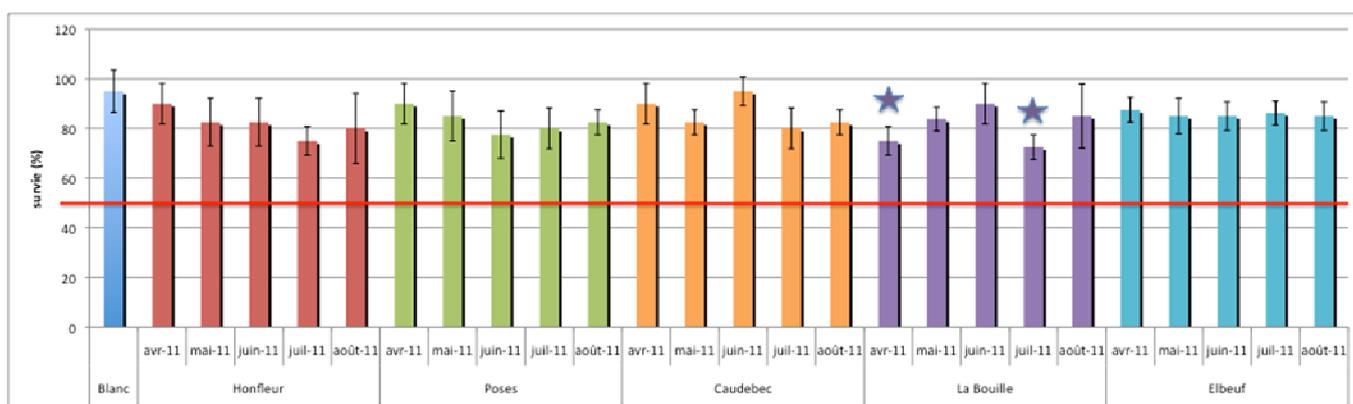


Figure 25 : Survie des nauplii au cours des 6 jours d'exposition aux différents extraits aqueux de l'estuaire de Seine, en ordonnée figure le pourcentage de survie et en abscisse les différentes stations d'échantillonnage.

*représente une différence significative par rapport au contrôle (Unilateral Mann-Whitney rank sum test ; $p < 0,05$).

La Figure 26 représente les effets létaux des extraits aqueux pris à la sortie de trois stations d'épuration (Elbeuf, Rouen et Tancarville) situées le long de l'estuaire de Seine aval, il apparaît sur cet histogramme des effets significatifs sur la survie du stade nauplien du copépode *Eurytemora affinis*, notamment pour les effluents en sortie de la STEP d'Elbeuf qui semblent les plus toxiques, suivi de Rouen et de Tancarville, on observe dans certains cas d'exposition des mortalités proche ou inférieur à 50 %.

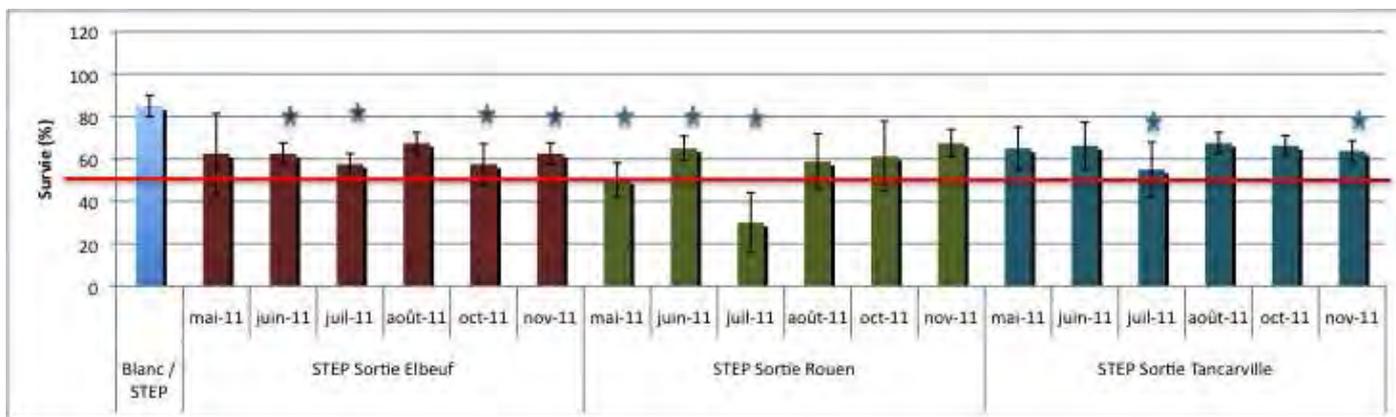


Figure 26 : Survie des nauplii au cours des 6 jours d'exposition aux différents extraits aqueux de l'estuaire de Seine, en ordonnée figure le pourcentage de survie et en abscisse les différentes stations d'échantillonnage. *représente une différence significative par rapport au contrôle (Unilateral Mann-Whitney rank sum test ; $p < 0,05$).

Effets sur la croissance

La taille est mesurée le jour de l'éclosion et après 6 jours de développement, il s'agit donc de la croissance du premier stade de développement : la phase nauplienne.

En ce qui concerne les effets sur la croissance nauplienne (Figure 27), tous les extraits testés exceptés ceux de la station d'Honfleur en mai et août 2011 ont entraîné un ralentissement de la croissance des nauplii de façon significative par rapport au témoin, même si tous les nauplii ont atteint en 6 jours le dernier stade de développement nauplien (N6).

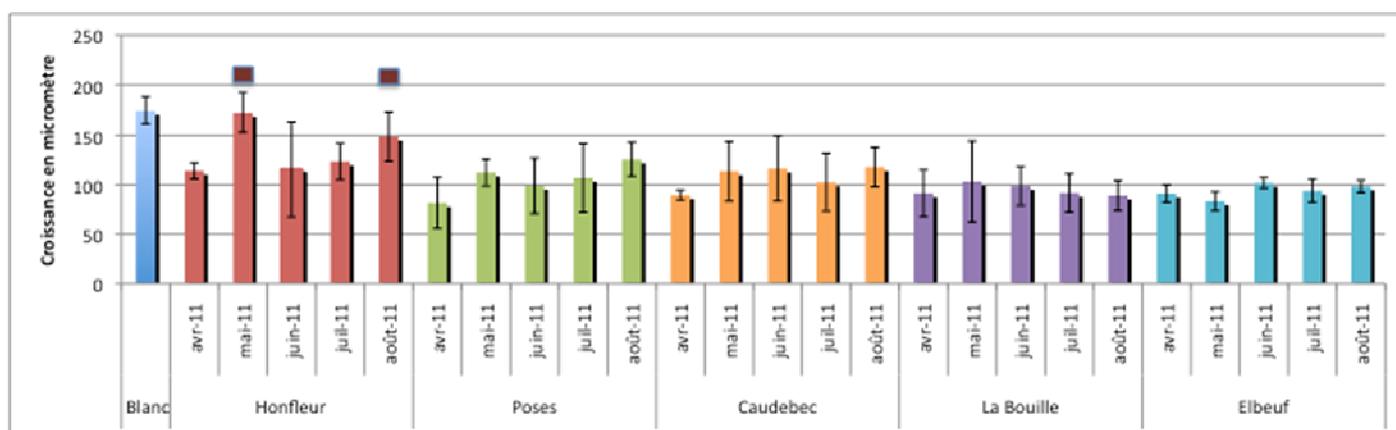


Figure 27 : Croissance des nauplii au cours des 6 jours d'exposition aux différents extraits aqueux de l'estuaire de Seine, en ordonnée figure la croissance en μm (J6-J0) et en abscisse les différentes stations d'échantillonnage ν représente aucune différence significative par rapport au contrôle (Unilateral Mann-Whitney rank sum test ; $p < 0,05$).

Lors des expositions aux extraits aqueux prélevés en sortie de station d'épuration, les composés présents ou leurs concentrations plus élevées ont un effet sur la croissance dans tous les cas d'exposition quelle que soit la STEP ou quel que soit le mois de prélèvement, puisqu'en moyenne la croissance est de 80 μm ce qui représente la moitié de celle du témoin (Blanc STEP) (160 μm) (Figure 28).

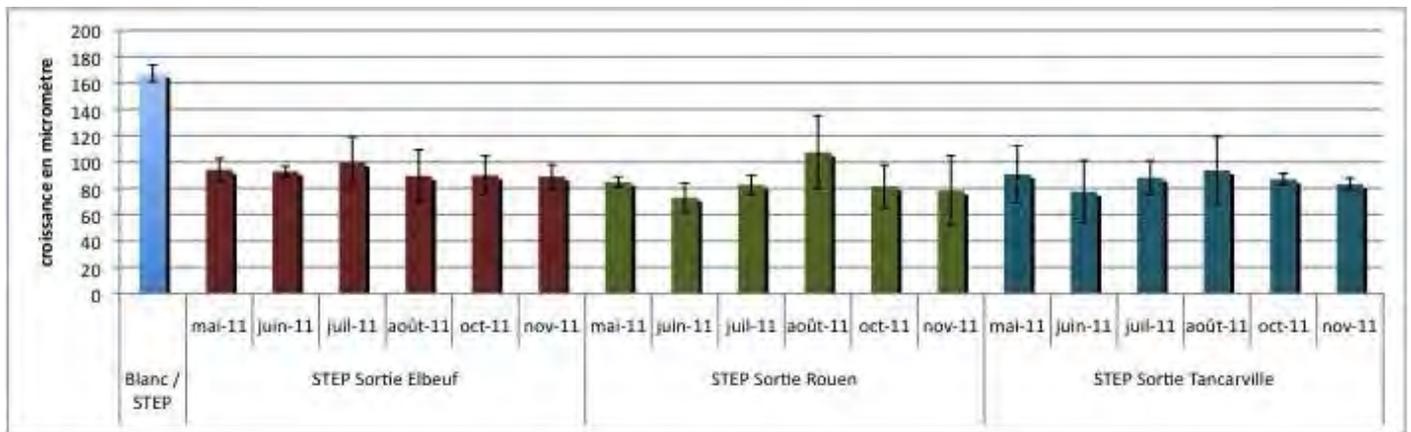


Figure 28 : Croissance des nauplii au cours des 6 jours d'exposition aux différents extraits aqueux en sortie de STEP se déversant dans l'estuaire de Seine, en ordonnée figure la croissance en µm (J6-J0) et en abscisse les différentes stations d'épuration. Tous les barres représentées sont significativement différente par rapport au Blanc /STEP (Unilateral Mann-Whitney rank sum test ; $p < 0,05$).

III.2.1.b. Test de neurotoxicité *in vitro*

Effet sur l'activité AChE *in vitro*

Les Figure 29 et Figure 30 représentent l'impact neurotoxique des extraits aqueux des différents points de prélèvements le long de l'estuaire de Seine et des effluents de trois stations d'épurations. En effet l'activité acétylcholinestérase est un biomarqueur d'exposition aux neurotoxiques mais elle est également représentative des activités locomotrices d'*Eurytemora affinis* (Cailleaud *et al.*, 2011).

Les extraits aqueux ne présentent pas d'effet significatif sur l'Activité AChE *in vitro*, seul le prélèvement à Caudebec en avril 2011 entraine une inhibition de 50% de l'activité par rapport au témoin. Néanmoins un impact neurotoxique plus fort est observé avec les expositions aux effluents des Stations d'épuration.

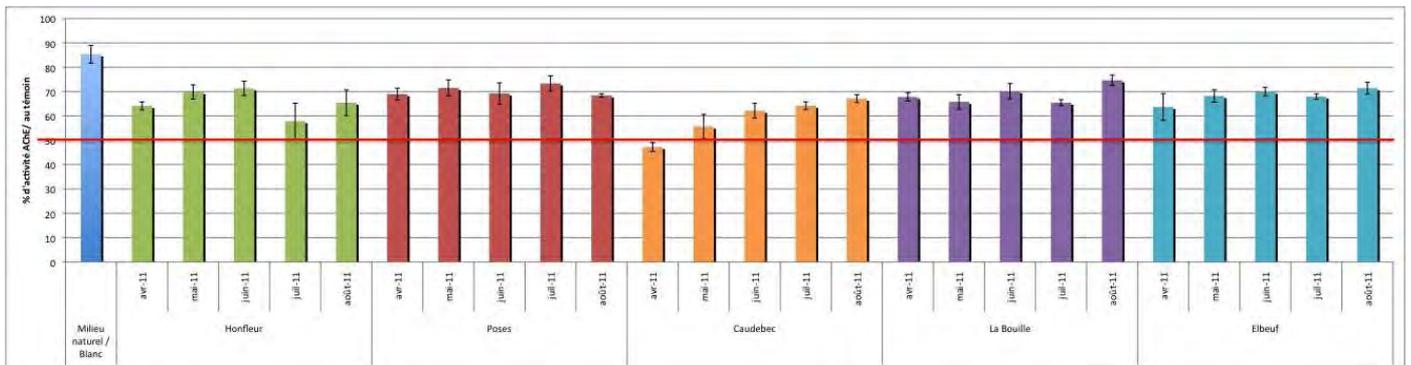


Figure 29 : Activité AChE *in vitro* après une exposition de 30 minutes aux différents extraits aqueux de l'estuaire de Seine, en ordonnée figure le % d'activité AChE d'*Eurytemora affinis* par rapport au contrôle et en abscisse les différentes stations d'échantillonnage.

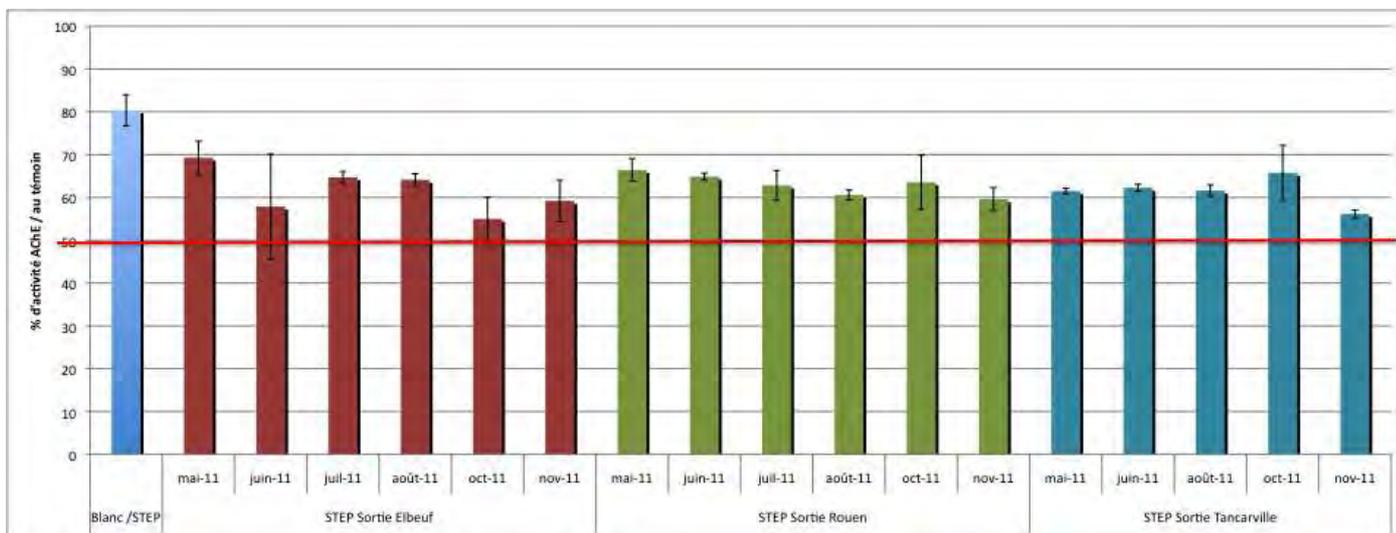


Figure 30 : Activité AChE in vitro après une exposition de 30 minutes aux différents effluents de STEP de l'estuaire de Seine, en ordonnée figure le % d'activité AChE d'Eurytemora affinis par rapport au contrôle et en abscisse les différentes STEP.

Les Figure 31 et Figure 32 représentent l'impact neurotoxique des extraits organiques des différents points de prélèvements le long de l'estuaire de Seine et des effluents de trois stations d'épurations.

Pour les expositions aux extraits organiques, l'impact neurotoxique est plus important, la moitié de ces extraits organiques issus des différents points de prélèvements entraîne une inhibition de l'activité AchE supérieure à 50%.

Pour les extraits organiques des effluents des stations d'épurations, l'activité AChE in vitro est inférieure à 50% par rapport à l'activité témoin dans tous les cas d'exposition.

On peut noter que les blancs de manipulations ont un effet sur l'activité AChE purifié de l'ordre de 5% probablement lié au DMSO, le solvant utilisé pour les extraits organiques.

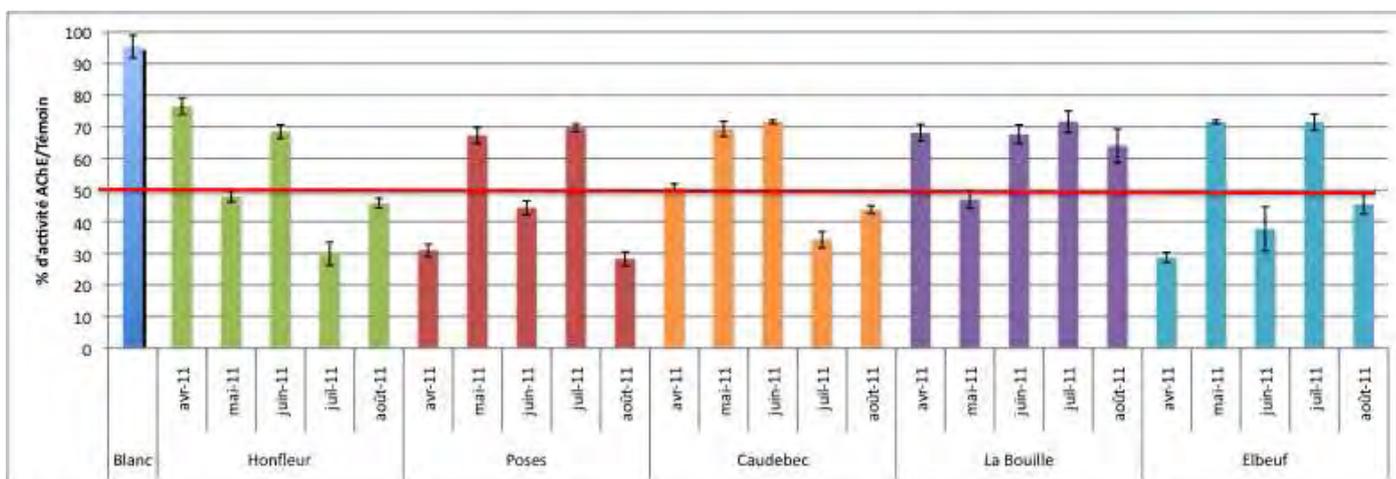


Figure 31 : Activité AChE in vitro après une exposition de 30 minutes aux différents extraits organiques de l'estuaire de Seine, en ordonnée figure le % d'activité AChE d'Eurytemora affinis par rapport au contrôle et en abscisse les différentes stations d'échantillonnage.

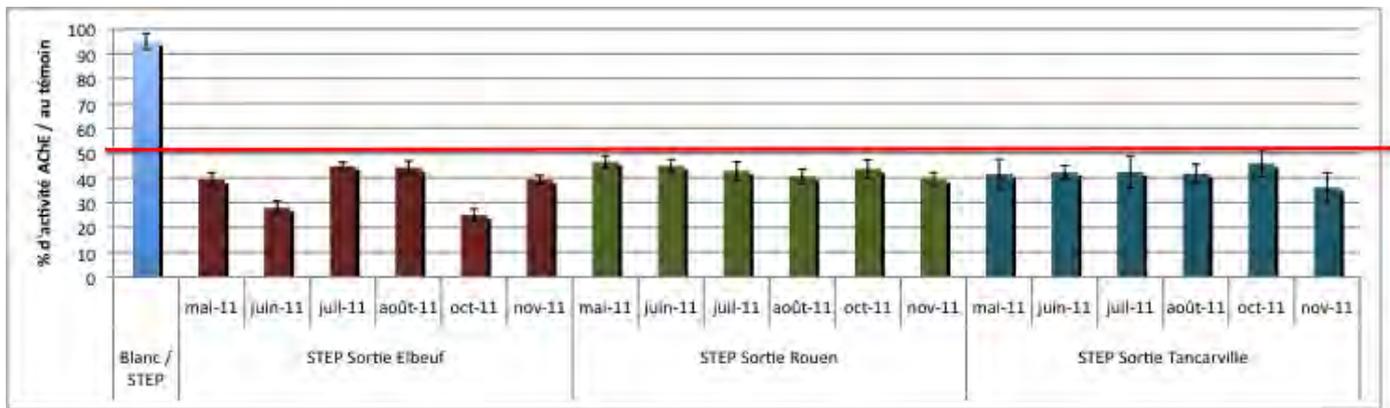


Figure 32 : Activité AChE *in vitro* après une exposition de 30 minutes aux différents effluents de STEP de l'estuaire de Seine, en ordonnée figure le % d'activité AChE d'*Eurytemora affinis* par rapport au contrôle et en abscisse les différentes STEP.

III.2.1.c. Conclusion

Les effets observés les plus marquants sont sur la croissance du premier stade nauplien qui au cours de ces 6 jours d'exposition effectuée normalement 5 mues successives pour passer du stade N1 au stade N6. Ce trait d'histoire de vie, la croissance, est un paramètre beaucoup plus sensible que la mortalité chez le stade nauplien d'*Eurytemora affinis*. Les effets observés sont probablement dus à des interférences avec certains récepteurs aux ecdystéroïdes, qui sont à l'origine de la synthèse de l'hormone de mue (20 HE). Cette hormone de mue à très forte concentration dans l'hémolymphe des crustacés déclenche la production de chitobiase, capable de dégrader la chitine, une des enzymes nécessaires pour le bon déroulement de la mue et la succession des stades nauplien. D'autre part une croissance plus faible des organismes peut s'expliquer par la mobilisation de ressources énergétiques fixes dans le but d'effectuer une détoxification des composés plutôt que de favoriser le développement de l'animal.

Les effets neurotoxiques ne sont observés de façon significative qu'après une exposition *in vitro* avec des extraits organiques, et ce quelque soit la saison ou l'effluent de la station d'épuration, ce test d'inhibition AChE *in vitro* semble prometteur pour effectuer des screenings rapides d'extraits organiques d'échantillons naturels dans le cadre d'un suivi et de l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques.

Pour finir, les échantillons issus des prélèvements à la sortie des stations d'épuration se révèlent beaucoup plus toxiques que les autres stations d'échantillonnage le long de l'estuaire de Seine, avec des effets importants sur la croissance et sur l'activité AChE des copépodes estuariens *Eurytemora affinis*.

III.2.2. Evaluation de la présence de composés oestrogéniques, androgéniques et dioxin-like à l'aide de bioessais *in vitro*

III.2.2.a. Activité dans les effluents de STEP

Une activité œstrogénique a été détectée dans l'ensemble des prélèvements d'effluents (Figure 33). Dans une majorité de cas, les concentrations mesurées sont relativement homogènes d'une période d'échantillonnage à une autre, variant de 1,6 à 7 ng E2-EQ/L. Ces niveaux de concentrations correspondent à des niveaux couramment rencontrés en sortie de STEP urbaines française (Labadie et Budzinski 2005, Creusot *et al.*, 2010, Bellet *et al.*, 2012). Le suivi temporel de ces stations a néanmoins permis d'identifier deux prélèvements, à Elbeuf en août 2011 (19 ng E2-EQ/L) et à Tancarville en juin 2011 (78 ng E2-EQ/L), qui présentent des concentrations en xéno-œstrogènes significativement plus fortes. Ces mesures révèlent probablement un dysfonctionnement ou un pic d'activité à cette période. La forte activité retrouvée au niveau du prélèvement ponctuel réalisé à Tancarville en juin 2011, peut être mis en relation avec les fortes concentrations en SP retrouvées sur ce point (par exemple paracétamol 70 µg.L⁻¹.....) qui laissent également à penser qu'il y eut un dysfonctionnement sur cette journée d'exploitation sur la STEP (ou rejet d'eau non traitée par exemple par bypass intentionnel lors d'une maintenance).

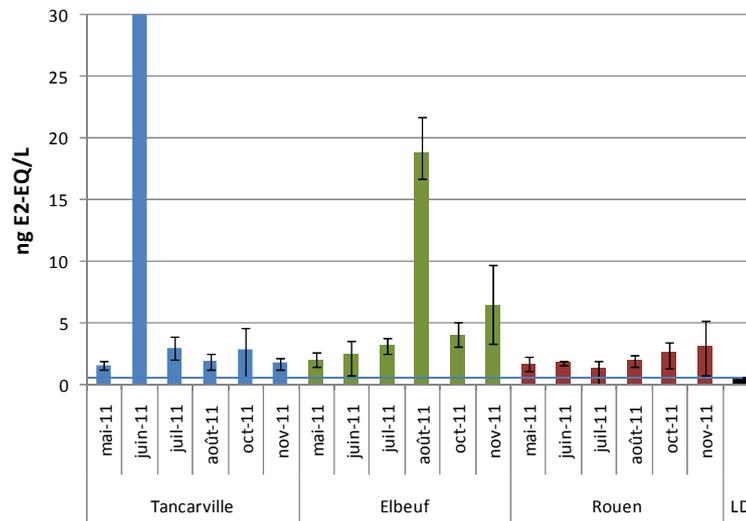


Figure 33 : A : Activité œstrogénique mesurée dans les extraits d'effluents de STEP à l'aide du test MELN. En juin 2011, l'activité mesurée à Tancarville était de 78 ng E2-EQ/L. Aucune activité n'a été détectée dans le blanc d'expérimentation. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance (95%) ; LD = limite de détection de 0.7 ngE2-EQ/L.

La Figure 34 présente les activités mesurées avec le test MDA-kb2, qui co-détecte la présence de composés activateurs des récepteurs des androgènes et des glucocorticoïdes. Il est notable que des activités agonistes sont détectées dans tous les prélèvements des STEPS d'Elbeuf et de Rouen. Ces activités varient de 6 à 30 ng DHT-EQ-L. Ce résultat est particulièrement intéressant dans la mesure où la présence de composés à activité stéroïdienne autres que les œstrogène-mimétiques dans les effluents est encore peu documentée. Des études très récentes montrent néanmoins la présence d'androgènes et de corticostéroïdes dans divers effluents urbains (Chang *et al.*, 2007, Van der Linden *et al.*, 2008, Bellet *et al.*, 2012). Notre étude suggère que la présence de ce type de molécules dans les rejets de Rouen et Elbeuf. Sur la station de Tancarville, aucune activité n'a été détectée hormis dans le prélèvement de juin 2011 dans lequel une très forte activité (323 ng DHT-EQ/L) est mesurée. Cette mesure coïncide avec la forte activité observée avec le test MELN et les fortes concentrations en SP également observées sur ce prélèvement (Figure 33), ce qui confirme un possible dysfonctionnement au cours ou précédant cette période d'échantillonnage.

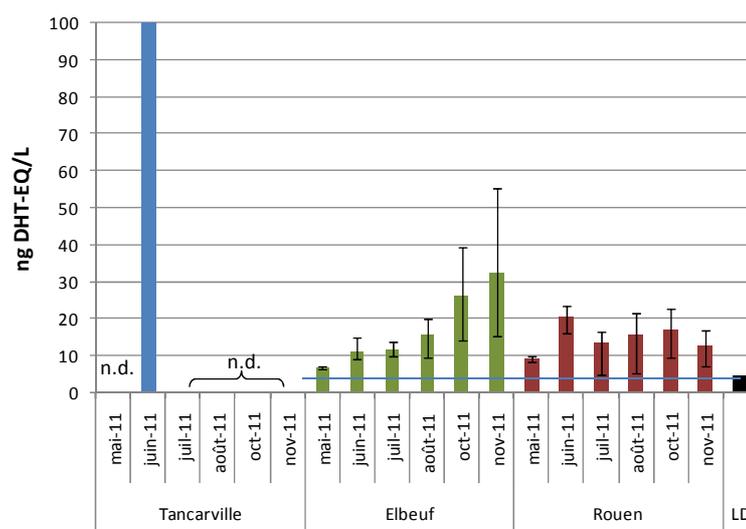


Figure 34 : Activité androgénique et/ou glucocorticoïde dans les extraits d'effluents de STEP à l'aide du test MDA-kb2. En juin 2011, l'activité mesurée à Tancarville était de 323 ng DHT-EQ/L. Aucune activité n'a été détectée dans le blanc d'expérimentation. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance (95 %) ; n.d. = activité non détectée ; LD = limite de détection de 4.4 ng DHT-EQ/L.

Pour compléter le diagnostic sur la présence de composés biologiquement actifs dans les extraits, les agonistes du récepteur de la dioxine (AhR) ont été recherchés *via* une induction de l'activité EROD dans les cellules PLHC-1. Les résultats montrent une induction très modérée de l'activité EROD après un temps court d'exposition (4 h), induction qui ne persiste pas après 24 h d'exposition des cellules. Ce constat indique que les composés responsables de ces effets sont rapidement dégradés dans le système d'essai, probablement via un métabolisme cellulaire. Ce type d'induction transitoire a été très bien décrit pour des composés tels que les HAPs (Louiz *et al*, 2008). Les courbes dose-réponses obtenues après 4h ont néanmoins permis de quantifier des activités, exprimées en équivalents BaP, et présentées dans la Figure 35. Ces activités, qui varient entre 0,1 et 0,3 µg BaP-EQ/L, pourraient correspondre à des concentrations résiduelles en HAPs et dérivés plus polaires dans la phase soluble. Il n'y a pas de variation significative liée à la période d'échantillonnage.

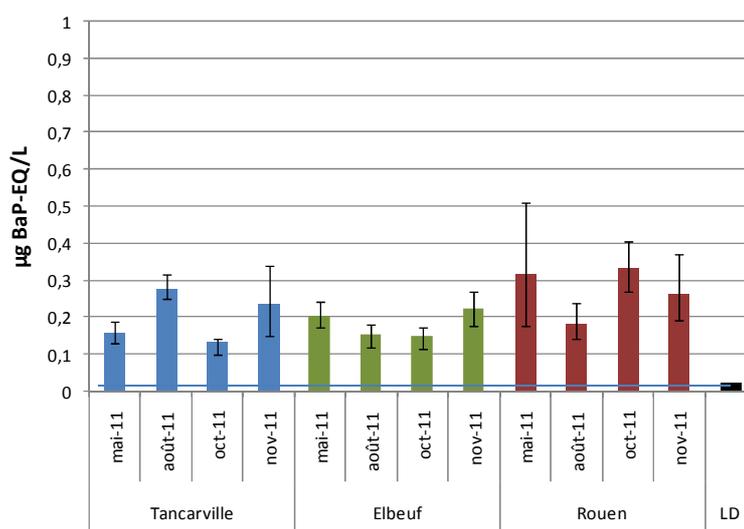


Figure 35 : Activité de type HAP dans les extraits d'effluents de STEP à l'aide de l'induction de l'activité EROD dans les cellules PLHC-1 après 4 h d'exposition. Les analyses de juin et juillet n'ont pu être réalisées. Aucune activité n'a été détectée dans le blanc d'expérimentation. Les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance (95 %) ; LD = limite de détection de 0.02 µg BaP-EQ/L.

III.2.2.b. Activités dans le milieu naturel

La Figure 36 représente l'activité luciférase dans les cellules MELN exposées aux extraits des eaux prélevées à différents points de l'estuaire de la Seine. Les concentrations des extraits en composés œstrogéniques sont globalement inférieures au seuil de détection (0,7 ng E2-EQ/L), seules des inductions marginales de luciférase sont observées sur Poses, la Bouille et Elbeuf en juin et juillet 2011.

Concernant le test MDA-kb2, aucune induction significative de la luciférase n'a été observée après exposition aux extraits organiques (Figure 37), suggérant les très faibles concentrations (<4 ng DHT-EQ/L) en composés agonistes des récepteurs des androgènes et/ou des glucocorticoïdes dans ces extraits.

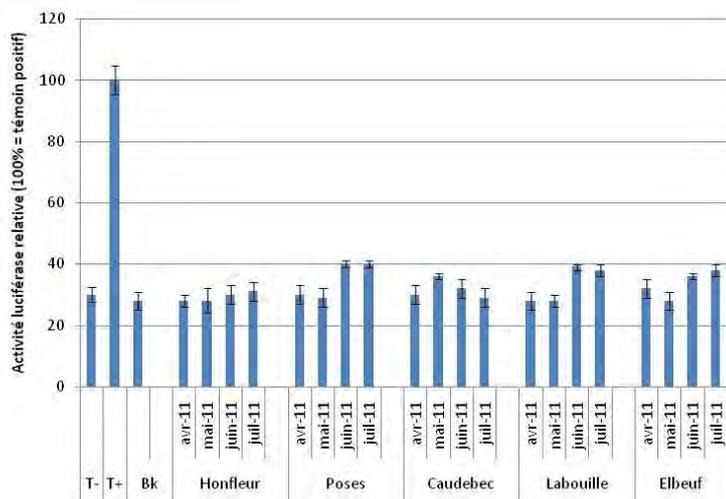


Figure 36 : Mesure de l'activité luciférase dans les cellules MELN après exposition aux extraits d'eaux à différents points de prélèvement. T- : témoin cellulaire ; T+ : témoin positif œstradiol 10 nM ; Bk : blanc expérimental.

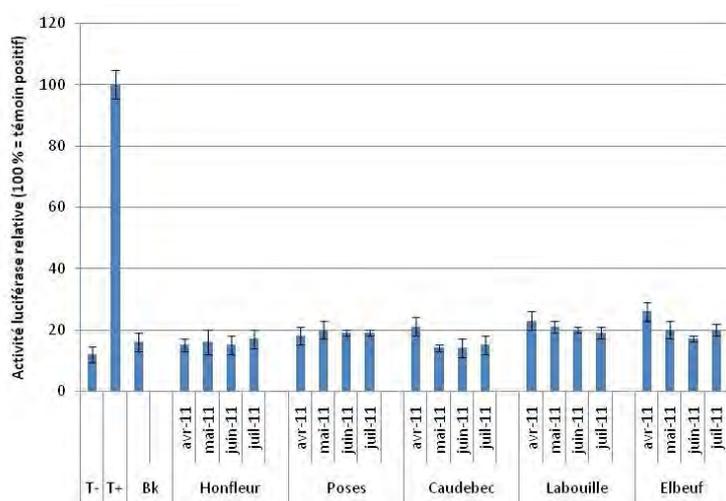


Figure 37 : Mesure de l'activité luciférase dans les cellules MDA-kb2 après exposition aux extraits d'eaux à différents points de prélèvement. T- : témoin cellulaire ; T+ : témoin positif dihydrotestostérone 10 nM ; Bk : blanc expérimental.

III.2.2.c. Conclusion

Les analyses par les bioessais *in vitro* ont montré la présence dans les effluents de composés capables d'interagir avec les récepteurs hormones stéroïdiennes. Dans certains cas, les niveaux d'activité œstrogénique mesurés (e.g. supérieures à 5 ng E2-EQ/L) correspondent à des concentrations capables d'induire des effets biologiques chez le poisson (Brion *et al.*, 2004, Nash *et al.*, 2005). Si plusieurs substances telles que les œstrogènes naturels et de synthèse ou des alkylphénols ont été bien identifiés comme contaminants actifs récurrents dans ce type d'effluents, l'identification des composés responsables des effets observés dans la présente étude permettrait de mieux appréhender le risque associé à ces rejets. Les composés actifs dans le test MDA-kb2 (très probablement des androgènes) restent à être identifiés.

L'analyse des composés inducteurs d'EROD a été menée à titre exploratoire. A priori, les substances responsables de cet effet (e.g. HAPS, PCBS-DL, dioxines...) sont plutôt hydrophobes et ont peu de chance de se retrouver en fortes concentrations dans la phase aqueuse. De manière logique, des activités facilement dégradables dans les systèmes cellulaires ont été retrouvées et suggèrent la présence de composés de type HAPs dans les effluents. Des composés dioxin-like persistants ne sont pas détectés (< 3 ng TCDD-Eq/L).

Les analyses des prélèvements ponctuels d'eaux de surface le long de l'estuaire n'ont pas permis leur détection, même si la présence de composés œstrogénique est suggérée sur certains points (La Bouille, Poses). L'utilisation d'échantillonneurs passifs ou l'extraction de plus grands volumes d'eau (ici 250 mL) pour les biotests permettrait d'augmenter la sensibilité.

IV. Etude de la dégradation des SP dans des effluents de STEP

Dans cette partie du projet, il s'agissait principalement :

- de déterminer parmi les SP détectés dans les effluents de stations d'épuration quels étaient ceux qui présentaient une forte sensibilité aux transformations photochimiques (soit rayonnement solaire, soit rayonnement UV)
- de savoir quels étaient les impacts des réactions de phototransformation sur les réponses aux bioessais d'effets toxiques.

La stabilité des SP dans les effluents collectés a été testée dans différentes conditions expérimentales :

- à l'obscurité dans des contenants en verre ou en plastique,
- sous irradiation solaire simulée ($\lambda > 300$ nm) pour comprendre l'impact du rayonnement solaire sur la stabilité des SP,
- sous irradiation UV ($\lambda = 254$ nm) pour simuler les cas de stations d'épuration équipée de système de désinfection UV avant rejet dans le milieu naturel.

Les bioessais décrits dans le paragraphe III.1.2 ont été appliqués sur des effluents des différentes stations d'épuration soumis aux processus de photodégradation.

IV.1. Matériel et Méthodes

IV.1.1. Dégradation à l'obscurité des effluents (vieillessement)

Après filtration, les échantillons sont placés dans les flacons (en verre ou en polyéthylène à haute densité - PEHD) recouverts de papier aluminium (afin de pallier tout processus de photodégradation) et laissés à l'obscurité à la température ambiante (22°C) pendant 24h et 48h. Les échantillons vieillis seront extraits et analysés selon les deux méthodologies décrites précédemment.

IV.1.2. Photodégradation sous irradiation solaire simulée

Le dispositif commercial (Figure 38) est équipé d'une lampe à arc Xénon de 1500 W et d'un filtre éliminant la majeure partie des rayonnements UV à $\lambda < 290$ nm et des rayonnements IR. Ce dispositif permet ainsi une réelle simulation du rayonnement solaire reçu à la surface de la Terre (Figure 38).

Le dispositif commercial a été modifié comme présenté sur le schéma de la Figure 39 pour permettre l'irradiation de volumes de solution plus importants. En effet, le dispositif commercial permet d'irradier simultanément et de manière reproductible un volume de solution limité à 200 mL. Ceci est insuffisant dans notre cas car, pour chaque irradiation, un volume minimal de 500 mL était nécessaire afin d'obtenir les échantillons pour l'analyse chimique et les bioessais d'effets toxiques.

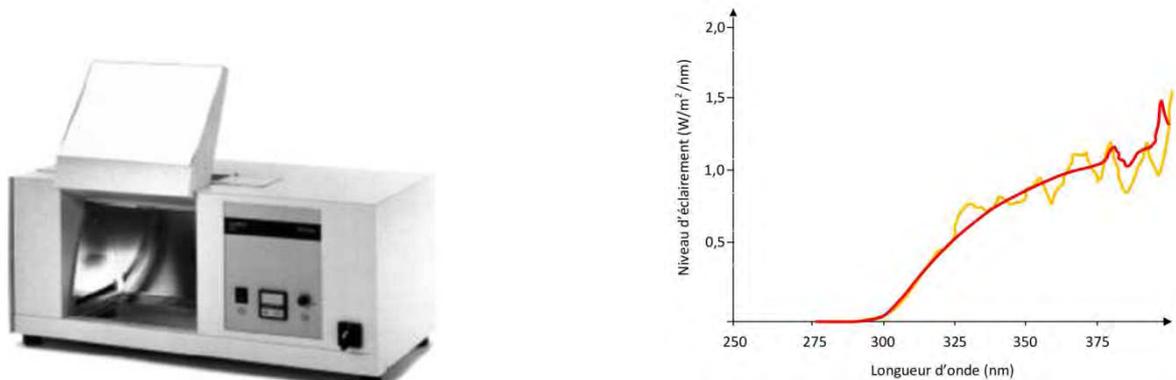


Figure 38 : (a) Photographie du dispositif commercial Suntest CPS+™ (Société Atlas) et (b) spectre d'émission de la lampe équipant le dispositif comparé au spectre solaire défini selon la norme CIE 85.

Ainsi, un réacteur ouvert (L x D : 20 cm x 2,5 cm) couplé à un système de recirculation a été installé à l'intérieur de la chambre d'irradiation. L'effluent irradié (1,1 L) est stocké dans le réservoir et circule à un débit important de manière à rendre négligeable le temps de séjour de la solution dans le réacteur devant le temps total d'irradiation.

La puissance d'éclairage est constante et réglée à 400 W/m^2 . A chaque durée d'exposition sélectionnée, le volume de solution nécessaire est prélevé et traité selon les protocoles décrits précédemment.

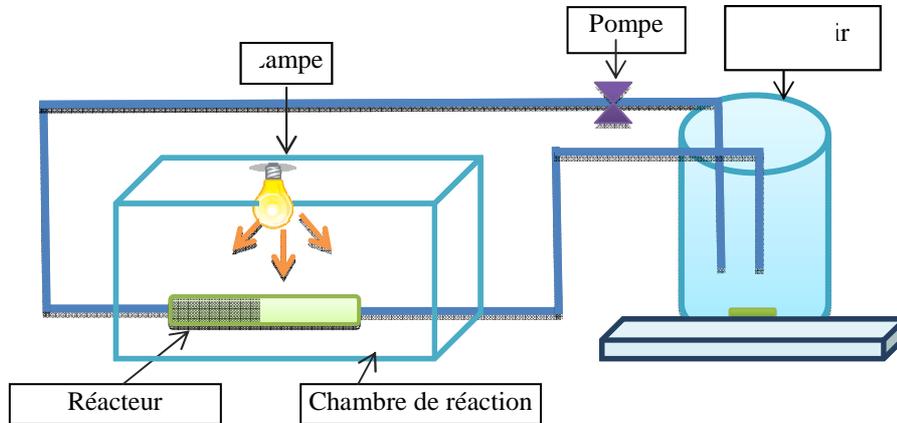


Figure 39 : Schéma complet du dispositif d'irradiation par simulation solaire incluant le système de recirculation.

IV.1.1. Photodégradation initiée par rayonnement UV

Avant rejet des effluents de stations d'épuration, une étape de désinfection par rayonnement UV peut être installée dans le cas de rejet dans des zones particulièrement sensibles comme des zones de baignade ou de conchyliculture. Le but des expériences réalisées avec ce type de réacteur était de documenter le comportement des SP si un tel traitement était appliqué.

Le dispositif expérimental est reproduit dans la Figure 40. Il s'agit d'un réacteur fermé de type batch d'un volume total de 2 L. Une lampe à vapeur de mercure basse pression de puissance électrique de 6 W a été utilisée. Ces lampes émettent plus de 95% de leur rayonnement à 254 nm. La lampe est placée au centre du réacteur, dans une gaine en quartz transparente aux rayonnements UV. Le flux lumineux est régulièrement contrôlé par actinométrie chimique. Un volume de 1,1 L d'effluent a été irradié pour chaque expérience. Les durées d'irradiation ont été choisies de manière à obtenir des doses UV réalistes par rapport à celles appliquées. Ainsi, les temps d'exposition choisis (2 minutes et 5 minutes) correspondent respectivement à des doses UV de 400 J/m^2 et 1000 J/m^2 pour une eau résiduaire présentant une absorbance de $0,25 \text{ cm}^{-1}$ à 254 nm.

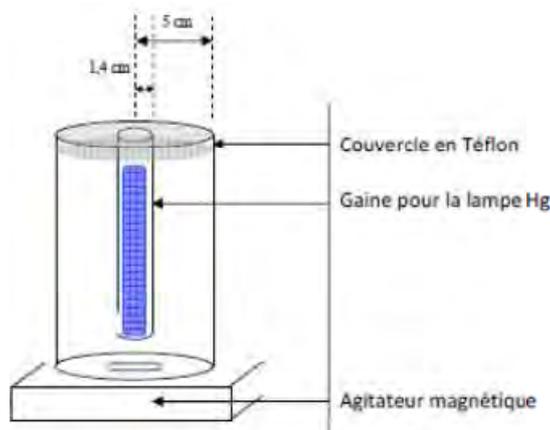


Figure 40 : Schéma complet du dispositif d'irradiation UV 254 nm.

IV.1. Résultats obtenus

IV.1.1. Stabilité des SP contenus dans les effluents de stations d'épuration

Le suivi de la stabilité des SP dans les effluents a été réalisé en utilisant un des effluents collectés dans le cadre du projet. Des exemples de résultats sont présentés dans la Figure 41, par classe de composés.

Globalement, on constate que les composés présentent une stabilité accrue lorsque le vieillissement est réalisé en bouteille PEHD. Ce phénomène peut être lié à des processus de dégradation chimique mais aussi à des processus d'adsorption des composés sur le verre.

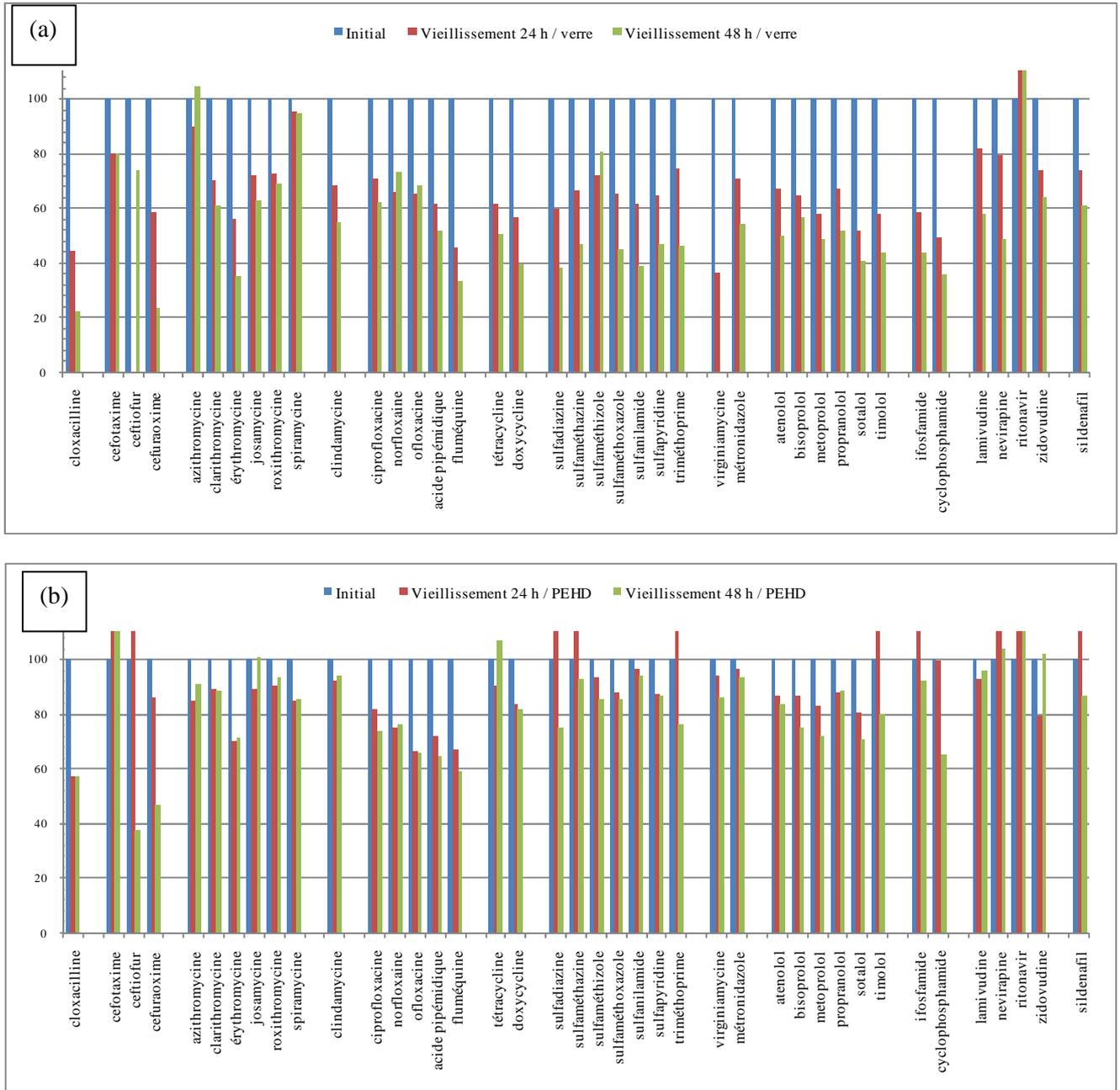


Figure 41 : Stabilité de SP classées par famille lors de l'étude du vieillissement sur 48 heures en contenant en verre (a) ou en contenant PEHD (b). Les concentrations initiales ont été normalisées à 100 % mais varient de près de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour l'aténolol (par exemple) à quelques ng.L^{-1} pour l'ifosamide (par exemple).

IV.1.2. Dégradation sous irradiation solaire simulée ou par rayonnement UV

Les phénomènes de dégradation induit par la lumière (solaire ou UV) peuvent être dus à deux types de réactions différents :

- les phénomènes provoqués directement par l'absorption de la lumière par le composé. Ce sont alors des réactions de phototransformation directe qui dépendent essentiellement de quatre paramètres : le rendement quantique (efficacité de réaction) et le coefficient d'absorption molaire, propres au composé, sa concentration dans le milieu et la transparence du milieu.
- les phénomènes liés à la production d'espèces radicalaires oxydantes à partir de la matière organique naturelle dissoute dans le milieu. Cette dernière absorbe la lumière et génère des radicaux qui réagissent ensuite non seulement avec les composés dissous dans le milieu mais également avec la matrice inorganique et la matière organique elle-même. Ces réactions dépendent à la base de la constitution du milieu mais il s'agit avant tout de cinétique compétitive et donc les composés les plus réactifs apparaîtront comme étant ceux présentant la constante de vitesse de second ordre la plus élevée avec le radical oxydant et / ou ceux étant en plus forte concentration dans le milieu.

IV.1.2.a. Cas de trois anti-inflammatoires non stéroïdiens

La Figure 42 rapporte l'évolution de la concentration de trois anti-inflammatoires non-stéroïdiens (naproxène, diclofénac et ibuprofène) lors de l'exposition des effluents des trois STEP au rayonnement solaire simulé (a) d'une part et au rayonnement UV (b) d'autre part. Peu de différences sont remarquables entre les différents effluents de STEP. Les différences de comportement semblent plus liées au composé lui-même.

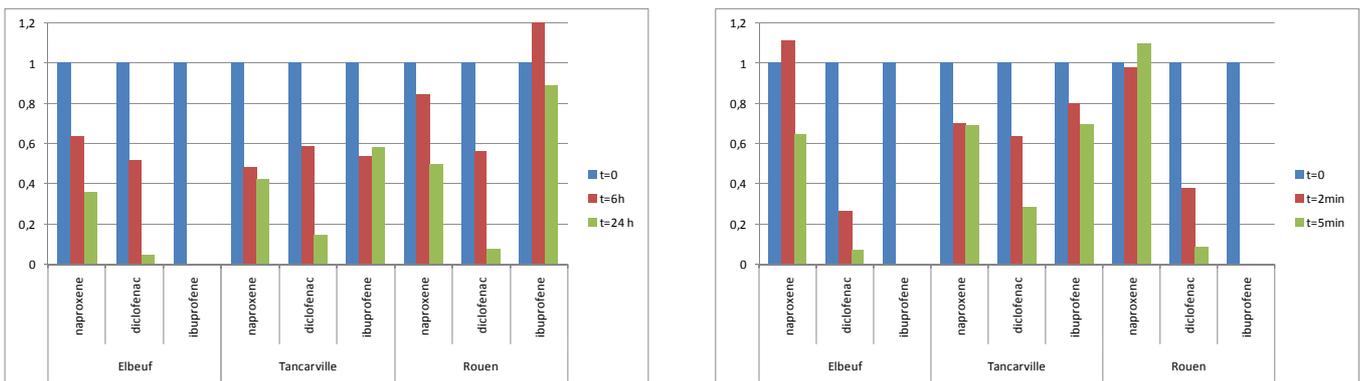


Figure 42 : Dégradation de trois anti-inflammatoires non-stéroïdiens lors de l'exposition solaire simulée ou aux UV des effluents des trois stations d'épuration.

**Elbeuf : [Naproxène]= 26 ng.L⁻¹, [Diclofénac]=1026 ng.L⁻¹, [Ibuprofène]=35 ng.L⁻¹,
Tancarville : [Naproxène]= 24 ng.L⁻¹, [Diclofénac]=1602 ng.L⁻¹, [Ibuprofène]=61 ng.L⁻¹,
Rouen : [Naproxène]= 311 ng.L⁻¹, [Diclofénac]=981 ng.L⁻¹, [Ibuprofène]=35 ng.L⁻¹.**

Ainsi, pour ce qui concerne le naproxène, un abattement de l'ordre de 50 % est observé dans le cas du traitement des effluents par UV alors que ce composé n'est dégradé qu'à un maximum de 40 % lors de l'exposition solaire des effluents. Pour le diclofénac, aussi bien l'exposition solaire simulée que l'exposition aux rayons UV aboutissent à une dégradation supérieure à 90 %. Seul le cas de l'effluent de Tancarville sous exposition solaire ne permet d'obtenir qu'un abattement de l'ordre de 70 %. Enfin, l'Ibuprofène semble avoir un comportement particulier, difficile à rationaliser car autant l'exposition solaire que les rayons UV aboutiraient soit à une dégradation complète soit à une dégradation faible voire nulle. Il convient de souligner que les concentrations des trois composés sont très différentes d'un effluent à l'autre et d'un composé à l'autre. Néanmoins, il est reconnu que le Diclofénac est un composé qui subit des réactions de photodégradation rapide (Mazellier *et al.*, 2006) alors que l'Ibuprofène est relativement stable vis-à-vis des rayons UV et n'absorbe pas la lumière solaire (Szabo *et al.*, 2011).

IV.1.2.b. Cas des antibiotiques

La Figure 43 présente l'évolution des concentrations en antibiotiques lors de la dégradation sous lumière solaire simulée et sous irradiation UV d'un échantillon d'effluents de la station d'épuration de Rouen. Des tendances similaires sont observées avec les autres effluents.

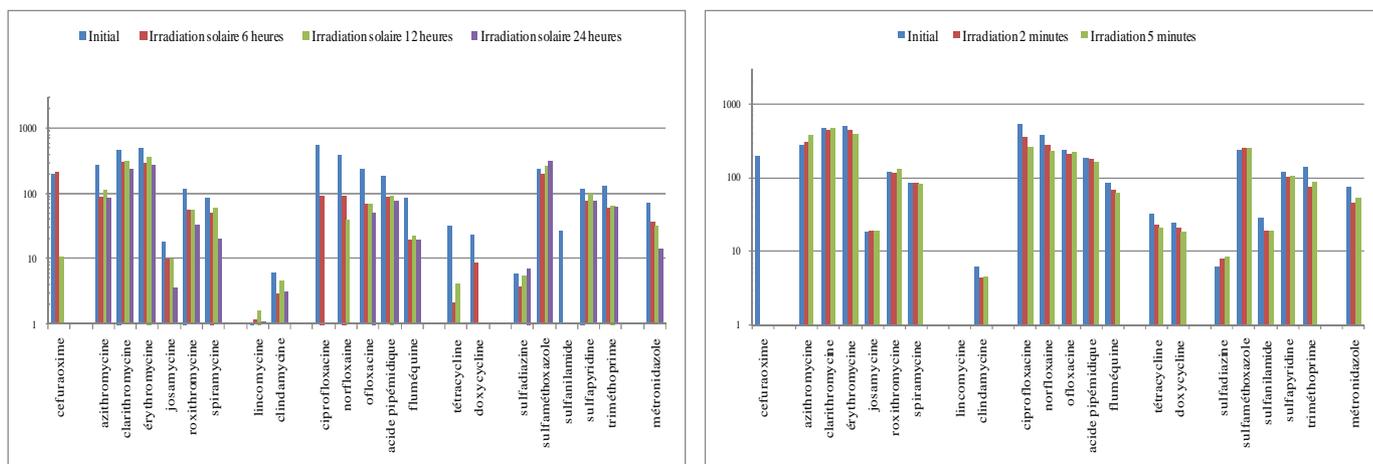


Figure 43 : Dégradation des antibiotiques lors de l'exposition solaire simulée ou aux UV dans un effluent collecté à Rouen.

Globalement, les antibiotiques sont dégradés à des taux plus élevés lors de l'irradiation solaire que lors de l'exposition aux rayons UV. Seuls les antibiotiques de la famille des fluoroquinolones (et assimilés) sont particulièrement bien dégradés par les rayons UV. Ceci est en accord avec les résultats de la bibliographie qui indiquent une photosensibilité particulière des fluoroquinolones (Fasani *et al.* 1999). Les antibiotiques de la famille des sulfonamides sont eux par contre relativement stables. Il convient également de souligner la photoréactivité particulière du métronidazole sous irradiation solaire alors qu'il est relativement stable sous irradiation UV. Ce résultat est cohérent avec le fait que le métronidazole présente une photodégradation directe lente (Prados-Joya *et al.*, 2011). Les réactions de photodégradation directe (sous UV) sont donc *a priori* lentes alors que les réactions de photodégradation indirecte pourraient être beaucoup plus efficaces (sous irradiation solaire).

IV.1.2.c. Cas de composés β -bloquants et antiviraux

La Figure 44 présente l'évolution des concentrations d'une série de composés β -bloquants et antiviraux lors de la dégradation sous lumière solaire simulée et sous irradiation UV d'un échantillon d'effluents de la station d'épuration de Rouen. Globalement, ces SP sont assez stables vis-à-vis des irradiations (solaires ou UV).

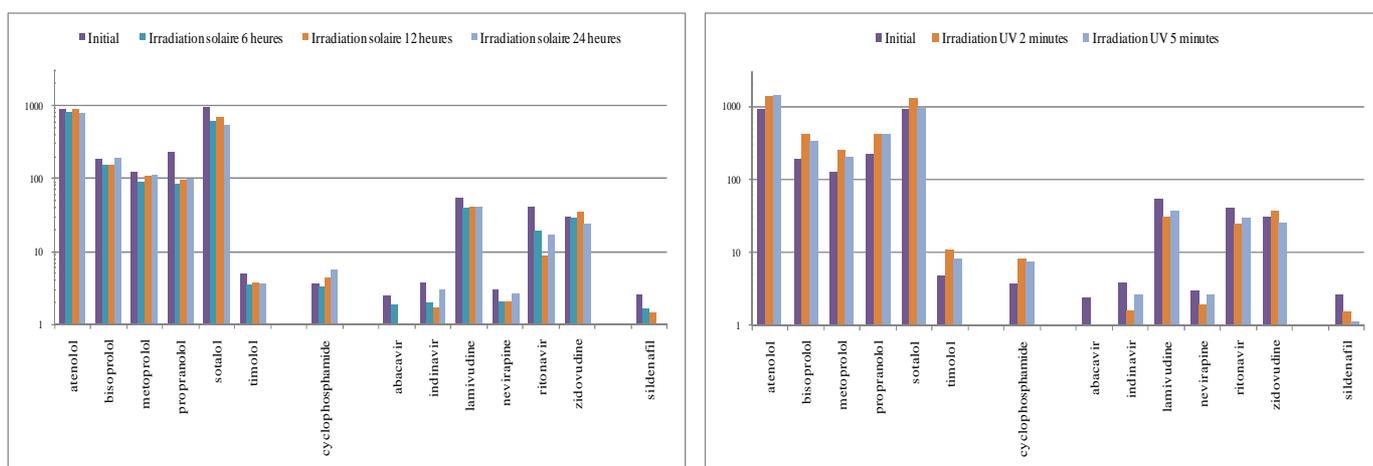


Figure 44 : Dégradation des β -bloquants, anticancéreux et antiviraux lors de l'exposition solaire ou aux UV dans un effluent collecté à Rouen.

IV.1.2.d. Bilan

Les résultats obtenus montrent une diversité de comportement, qui était attendue. Comme indiqué précédemment les réactions de dégradation (directe ou indirecte, sous UV ou sous irradiation solaire) des composés organiques et notamment des substances pharmaceutiques dépendent à la fois des caractéristiques intrinsèques des composés (SP) mais également des caractéristiques du milieu. Il est difficile dans le cadre de ce projet de rationaliser complètement les comportements observés. En effet, il aurait été nécessaire pour cela d'avoir une caractérisation globale des effluents collectés (spectre UV, COD ou DCO, concentration de nitrate,...), ces paramètres impactant en effet très fortement les réactions de photodégradation.

IV.1.3. Evolution de l'activité œstrogénique, androgénique et dioxin-like d'effluents de STEPs soumis aux processus de photodégradation

La Figure 45 rapporte l'induction œstrogéno-dépendante de la luciférase dans les cellules MELN exposées aux extraits organiques d'effluents avant et après traitement de photodégradation. La concentration en extrait est de 0,5 % v/v dans le milieu de culture des cellules.

Les résultats montrent une tendance à l'augmentation du potentiel œstrogénique des 3 effluents testés après une exposition solaire. En revanche, le traitement aux UV ne semble pas affecter l'activité œstrogénique des effluents.

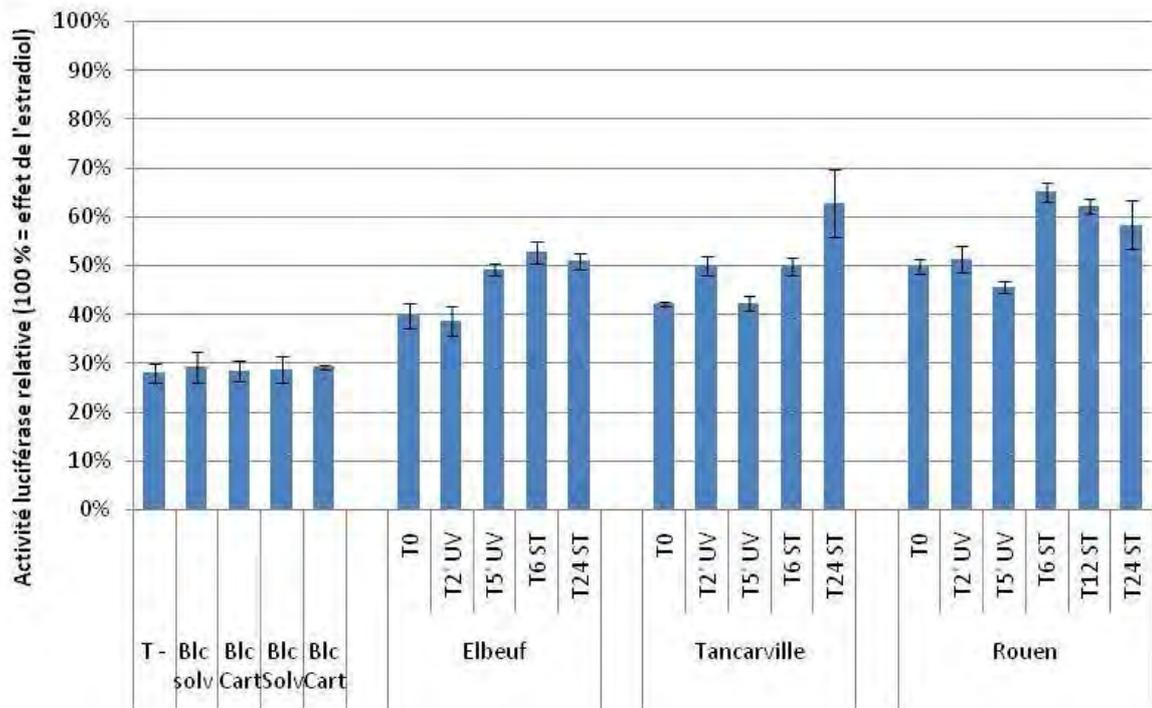


Figure 45 : Activation de la luciférase dans les cellules MELN après exposition aux extraits d'effluents de STEP avant (T0) et après traitement UV pendant 2 (T2' UV) ou 5 minutes (T5' UV) ou au rayonnement solaire (ST) pendant 6, 12 ou 24h. Aucune induction n'est notée pour les blancs d'expérimentation (Blc Solv, Blc Cart) par rapport au témoin cellulaire non traité (T-). Les résultats sont des moyennes de triplicats ± écartype.

Un tout autre constat est retrouvé concernant le test d'activité androgénique dans les cellules MDA-kb2 (Figure 46). Dans ce test, si une activité est bien retrouvée dans effluents non traités (T0), les deux types de traitement photochimique inhibent significativement cette activité, dans les trois effluents testés.

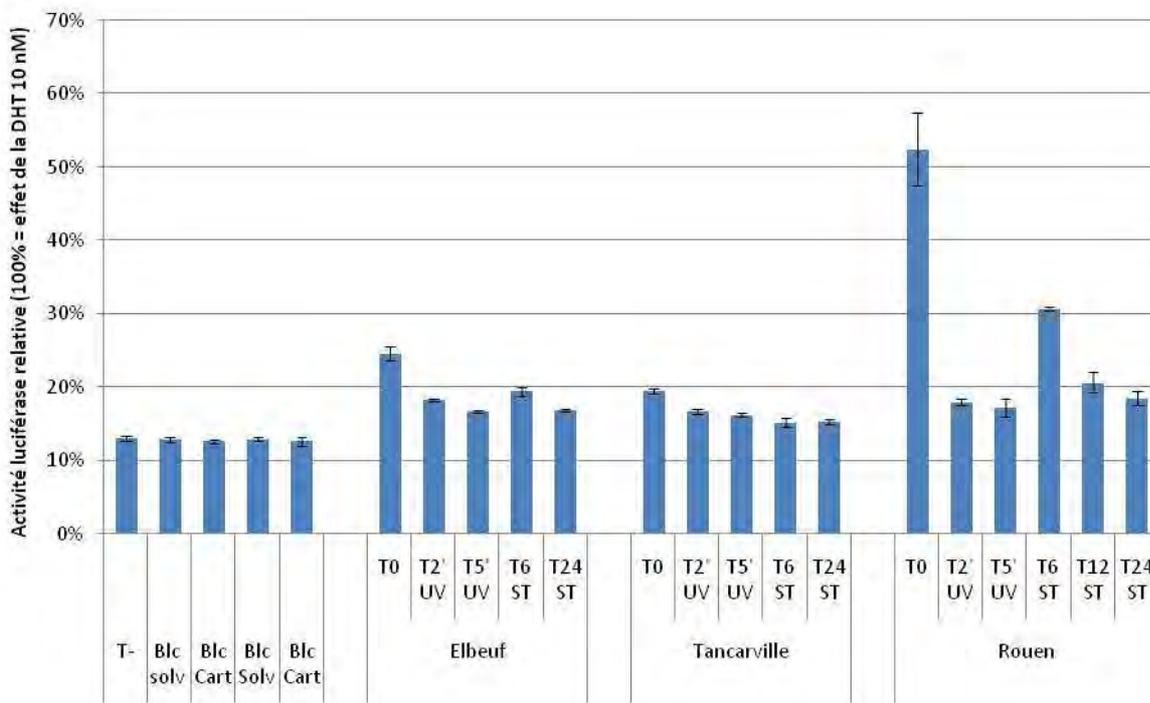


Figure 46 : Activité luciférase dans les cellules MDA-kb2 après exposition aux extraits d'effluents de STEP avant (T0) et après traitement aux UV pendant 2 (T2' UV) ou 5 minutes (T5' UV) ou au rayonnement solaire (ST) pendant 6, 12 ou 24h. Aucune activité n'a été détectée dans les blancs d'expérimentation (Blc Solv, Blc Cart) par rapport au témoin cellulaire non traité (T-). Les résultats sont des moyennes de triplicats \pm écartype.

Ces expériences montrent que les molécules responsables des effets œstrogéniques et androgéniques sont différemment affectées par les traitements photochimiques infligés aux effluents. L'absence d'inhibition (par UV) voire l'augmentation de l'activité œstrogénique est un résultat notable qui suggère la production de métabolites actifs sur le récepteur des estrogènes. A l'inverse, les composés responsables de l'effet dans le test MDA-kb2 semblent complètement dégradés après les traitements photochimiques, ce qui suggère qu'il ne s'agit pas des mêmes composés actifs dans les deux cas.

V. Conclusion

Le projet MEDSEINE avait plusieurs objectifs :

- Le développement et l'adaptation des protocoles et méthodes d'analyse pour doser les différentes substances pharmaceutiques et la mise en place de campagnes de mesure sur différents sites (naturels et effluents de station d'épuration).
- Le développement et/ou l'adaptation d'échantillonneurs passifs de type POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) pour la mise en évidence et la quantification des substances pharmaceutiques dans le milieu naturel et dans les effluents de station d'épuration.
- L'évaluation de la toxicité globale de différents échantillons (milieu, stations d'épuration et extraits d'échantillonneurs passifs).
- L'étude des processus de photodégradation des effluents de STEP et de quelques composés emblématiques de la contamination des milieux par les substances pharmaceutiques.

De nombreux résultats concernant ces différents objectifs ont été acquis lors du déroulement du projet. Les données obtenues sont issues de prélèvements milieux et prélèvement en stations d'épuration échelonnés entre mars et novembre 2011. Les principaux points forts ou conclusions qui ressortent de notre étude sont :

- Le projet a permis d'acquérir de nouvelles données concernant la contamination de l'estuaire de Seine par les substances pharmaceutiques.
 - Les méthodologies analytiques développées au LPTC dans le cadre de précédents projets ont ainsi été consolidées et de nouveaux protocoles permettant la quantification des hormones (ou assimilées) ou la quantification des métabolites de la carbamazépine ont été développés. Les protocoles existants ont par ailleurs été fusionnés et retravaillés afin de proposer une nouvelle méthode plus rapide permettant de quantifier 53 substances pharmaceutiques d'usage courant en une seule analyse.
 - L'utilisation des POCIS a été étendue à un plus grand nombre de molécules grâce à la mise en œuvre de calibrations en laboratoire. L'aspect quantitatif des POCIS a été amélioré par l'introduction de deux PRC de type SP (caféine et salbutamol) et par l'utilisation d'un PRC de type pesticides déjà validé dans la littérature (DIA).
 - Nous avons pu valider l'utilisation des POCIS pour le suivi des SP en estuaire de Seine et tester une méthodologie de surveillance qui s'est révélée adaptée et utilisable pour le suivi des substances pharmaceutiques.
 - Le suivi de la contamination a été réalisé par échantillonnage ponctuel et par échantillonneur passif de type POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) afin d'intégrer la variabilité des concentrations en substances pharmaceutiques dans le milieu.
 - Ces nouvelles connaissances confirment que la présence des substances pharmaceutiques dans l'estuaire de Seine provient très majoritairement des entrées au niveau de Poses donc de l'activité anthropique de la région parisienne.
 - En intégrant les études antérieures on peut grâce à ce travail avoir un suivi sur une dizaine d'années de la contamination en substances pharmaceutiques de l'estuaire de Seine montrant peu d'évolution sur la situation tant qualitative que quantitative vis-à-vis des substances pharmaceutiques.
 - L'échantillonnage des stations d'épuration ne révèle pas de surprise majeure même si les analyses réalisées montrent que « l'empreinte substances pharmaceutiques » diffère un peu d'une station à l'autre.
 - En raison du nombre conséquent de molécules suivies dans ce projet nous sommes à même de proposer des traceurs à suivre pour évaluer l'évolution ou la non-évolution de l'état de

contamination par les substances pharmaceutiques de l'estuaire de Seine ; nous pouvons également proposer des traceurs de dysfonctionnement comme le paracétamol.

- Des tests de toxicité *in vitro* (INERIS), déjà validés et spécifiques de la perturbation endocrinienne et des tests *in vivo* (LEMA) développés dans le projet ont été réalisés.

- Les tests *in vitro* ont montré des activités œstrogéniques dans les effluents de STEP avec des pics d'activité pour 3 échantillons sur 18 (l'un étant très certainement lié à un dysfonctionnement de la STEP)

- Les tests *in vivo* ont montré un retard de croissance lors de l'exposition des copépodes aux prélèvements environnementaux.

- Les tests de neurotoxicité ne donnent des résultats significatifs que lors d'exposition *in vitro* à des extraits organiques des échantillons prélevés. Ce test pourrait être utilisé pour effectuer des screenings rapides d'extraits organiques d'échantillons naturels dans le cadre d'un suivi et de l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques.

- Les échantillons issus des prélèvements à la sortie des stations d'épuration se révèlent beaucoup plus toxiques que les autres stations d'échantillonnage le long de l'estuaire de Seine, avec des effets importants sur la croissance et sur l'activité acétylcholinestérase des copépodes estuariens *Eurytemora affinis*.

- L'exposition des effluents de STEP à des rayonnements UV ou solaires a été réalisée sur certains effluents. A différentes doses ou temps d'exposition des analyses chimiques ont été couplées aux tests de toxicité *in vitro*.

- Les résultats obtenus montrent une diversité de comportement des substances pharmaceutiques avec des composés très photoréactifs et des composés avec une certaine photostabilité. Malheureusement, il est impossible de rationaliser complètement les comportements observés car une caractérisation globale des effluents collectés aurait été nécessaire, de nombreux paramètres impactant fortement les réactions de photodégradation.

- Le couplage photodégradation / réponses aux bioessais d'effets toxiques montre que les molécules responsables des effets œstrogéniques et androgéniques sont différemment affectées par les photo-traitements infligés aux effluents. L'absence d'inhibition (par UV) voire l'augmentation de l'activité œstrogénique est un résultat notable qui suggère la production de métabolites actifs sur le récepteur des œstrogènes.

VI. Retombées opérationnelles

Parmi tous les résultats générés on peut distinguer ceux qui sont plus particulièrement en lien avec des retombées opérationnelles potentielles.

Retombées opérationnelles :

- Développement de méthodologies analytiques
- Mise de œuvre d'une méthode d'analyse multi-résidus rapide et performante (utilisable en surveillance)
- Méthodologie de surveillance des substances pharmaceutiques via les POCIS
- Typologie de la contamination de l'estuaire de Seine
- Comparaison de la situation présente avec celle du passé (évolution de la contamination en SP sur 10 ans)
- Base de comparaison pour suivre la contamination en SP en lien avec l'évolution des pratiques de consommation et des procédés d'épuration.
- Hiérarchisation des sources : STEP versus amont
- Application de méthodologies de biomonitoring basées sur des bioessais

VII. Perspectives

Quelques questions restent en suspens à l'issue de ce travail :

- Quelles sont les substances pharmaceutiques présentes dans les effluents de STEP qui sont responsables des effets dans les bioessais de toxicité ? Il faudrait pour répondre à cette question procéder à une étude de type « EDA – effect directed analysis » qui n'a pas pu être menée dans le cadre du projet.

- Lors du couplage photodégradation / bioessais, il est apparu que les effets mis en évidence par les tests étaient plus intenses lors de la photodégradation. Pourquoi ? Quelle(s) substance(s) pharmaceutique(s) ? et par quel processus de photodégradation ? et pour donner quel(s) photoproduit(s) finalement plus actif(s) ? Sur cet aspect aussi, une approche « EDA » devrait être entreprise.

VIII. Difficultés rencontrées

Rappel sur le déroulement du projet et sur une difficulté majeure :

Nous avons été obligés de décaler notre approche terrain. En effet, les échantillonnages terrain et STEP devaient être menés dès 2012 en parallèle de nos travaux laboratoire et de nos développements analytiques et méthodologiques mais nous n'avons pas réussi à obtenir la permission pour avoir accès aux rejets des STEP de Rouen et d'Elbeuf du fait d'une méfiance forte à l'égard des scientifiques depuis l'émission « Du poison dans l'eau du robinet » de Sophie Le Gall programmé le 17 mai 2010 sur France 3. Malgré de nombreuses relances et de nombreuses tentatives de discussion et communication, nous nous sommes heurtés à un blocage assez fort, bien que compréhensible, pénalisant nos travaux. Nous avons avancé dans la négociation et la communication et les blocages se sont levés fin du premier trimestre 2011. Nous avons donc démarré les échantillonnages en mars 2011 avec près de 8 à 10 mois de retard. Nous avons pu rattraper notre retard et nous avons compensé le manque de points à 18 mois qui étaient prévus à titre de comparaison avec les 6 premiers mois par le suivi de la station du Havre qui n'était pas prévue et quelques points milieu naturel supplémentaires. Les derniers échantillons ont été traités il y a peu et l'exploitation des résultats bien qu'avancée n'a pas pu être aussi intégrée que nous l'aurions souhaité. Nous n'avons par exemple pas pu croiser comme nous l'aurions voulu les résultats de chimie avec les résultats de biologie. L'interprétation croisée se poursuit donc dans la thèse de Van Hoi Bui. Ce retard explique aussi le manque de publication (cf paragraphe X). Nous avons pu produire des communications orales et des affiches mais du fait de la genèse tardive des résultats il n'y a pas encore de publications. Nous envisageons *a minima* deux publications : la première centrée sur les résultats du suivi en lui-même basé sur les prélèvements ponctuels et sur les POCIS ; la seconde comparant les résultats à ceux génés par le LPTC lors des travaux de thèse de Anne Togola et permettant ainsi de proposer un suivi sur 10 ans de la communication en SP de l'estuaire de Seine (basé sur une quinzaine de molécules).

IX. Bibliographie

- Aertgeerts R., Angelakis A., eds., Health Risks in Aquifer Recharge Using Reclaimed Water, WHO State of the art report, WHO, 2003.
- Alvarez D.A., Petty J.D., Huckins J.N., Jones-Lepp T.L., Getting D.T., Manahan S.E., 2004. Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 1640–1648.
- Andreozzi R., Raffaele M., Nicklas P., 2003. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. *Chemosphere*, 50,1319-1330.
- Batt A.L., Kim S., Aga D.S., 2006. Enhances biodegradation of Iopromide and trimethoprim in nitrifying activated sludge. *Environmental Science and technology*, 40, 7367-7373.
- Bellet V., Hernandez-Raquet G., Dagnino S., Seree L., Pardon P., Bancon-Montiny C., Fenet H. I. n., Creusot N., Aït-Aïssa S., Cavailles V., Budzinski H., Antignac J.-P., and Balaguer P., 2012. Occurrence of androgens in sewage treatment plants influents is associated with antagonist activities on other steroid receptors. *Water Research*, 46, 1912-1922.
- Bendz D, Paxéus N A, Ginn TR, Loge F J (2005) Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. *Journal of Hazardous Materials*, 122, 195-204.
- Blumenthal U.J., Mara D.D., Peasey A., Ruiz-Palacios G., Stott, R., 2001. Reducing the health risks of using wastewater in agriculture. *Urban Agriculture Magazine*, 3, 26-29.
- Bocquené G., Galgani F., 1998. Biological effect contaminants: cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES. Tech. Marine Environmental Science*, 22, 1-12.
- Brain R.A., Johnson D.J., Richards S.M., Hanson M.L., Sanderson H., Lam M.W., Young C., Mabury S.A., Sibley P.K., Solomon K.R., 2004. Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquatic Toxicology*, 70, 23-40.
- Brion F., Tyler C. R., Palazzi X., Laillet B., Porcher J. M., Garric J., Flammarion P., 2004. Impacts of 17 beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology*, 68, 193-217.
- Cailleaud K., Michalec F.G., Forget-Leray J., Budzinski H., Hwang J.S., Schmitt F.G., Souissi S., 2011. Changes in the swimming behavior of *Eurytemora affinis* (Copepoda, Calanoida) in response to a sub-lethal exposure to nonylphenols. *Aquatic Toxicology*, 102, 228–23.
- Caminada D., Escher C. and Fent, K. 2006. Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: Comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. *Aquatic Toxicology*, 79, 114-123.
- Chang H., Hu J.Y., Shao B., 2007. Occurrence of natural and synthetic glucocorticoids in sewage treatment plants and receiving river waters. *Environmental Science & Technology*, 41, 3462-3468.
- Creusot N., Kinani S., Balaguer P., Tapie N., LeMenach K., Maillot-Maréchal E., Porcher J. M., Budzinski H., Aït-Aïssa S., 2010. Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: screening of chemicals and application to water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396, 569-583.
- Devreker, D., 2007. Dynamique de population du copépode *Eurytemora affinis* dans l'estuaire de la Seine: approche combinée in situ multi-échelle et expérimentale. PhD Thesis, Université du Havre, Le Have. 280p.

- Ecosse, D. 2001. Techniques alternatives en vue de subvenir à la pénurie d'eau dans le monde. Mémoire D.E.S.S. «Qualité et Gestion de l'Eau». Faculté Sciences, Amiens. 62 p.
- Eggen RIL, Segner H. 2003. The potential of mechanism-based bioanalytical tools in ecotoxicological exposure and effect assessment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377:386–396.
- Fasani E., Albin A., Mella M., Rampi M., Barberis Negra F., 1999. Light and drugs : the photochemistry of fluoroquinolone antibiotics. *Int. J. Photoenergy*, 1-5.
- Forget J., Livet S., F. Leboulenger, 2002. Partial purification and characterization of acetylcholinesterase (AChE) from the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 132: 85-92.
- Forget J., Beliaeff B., G. Bocquené, 2003. Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France as a biomarker of neurotoxic contaminants *Aquatic Toxicology*, 62: 195-204.
- Forget-Leray J., Landriau I., Minier C., Leboulenger F., 2005. Impact of endocrine toxicants on survival, development, and reproduction of the estuarine copepod *Eurytemoraaffinis* (Poppe) *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 288–294.
- Golet E.M., Alder A.C., Hartmann A., Ternes T.A., Giger W., (2001). Trace determination of fluoroquinolone antibacterial agents in urban wastewater by SPE and LC with fluorescence detection. *Analytical chemistry* 75, 3632-3638.
- Halling-Sorensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Holten Lützhof H.C. Jorgensen S.E., 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment : a review. *Chemosphere* 36, 357-393.
- Hernando M. D., Mezcuca M., Fernandez-Alba A. R., Barcelo D., 2006. Environmental risk Assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*, 69, 334-342.
- Hirsch R., Ternes T.A., Heberer K., Kratz K.L. 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total environment*, 225, 109-118.
- Huber M., Gobel A., Joss A., Hermann N., Löffler D., McArdell C. S., Ried A., Siegrist H., Ternes T. A., von Gunten, U., 2005. Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation of Municipal Wastewater Effluents: A Pilot Study, *Environmental Science and Technology*, 39, 4290-4299.
- Huckins J.N., Petty J.D., Lebo J.A., Almeida F.V., Booij K., Alvarez D.A., Cranor W.L., Clark R.C., Mogensen B.B., 2002. Development of the permeability/performance reference compound approach for in situ calibration of semipermeable membrane devices. *Environmental Science and Technology*, 2002, 36, 85–91.
- Huschek G, Hansen P, Maurer H, Krengel D, Kayser A., 2004. Environmental risk assessment of medicinal products for human use according to european commission recommendations. *Environmental Toxicology*, 19, 226-240.
- Janex M.L., Bruchet A., Lévi Y., Ternes T. 2002. Composés pharmaceutiques : présence dans l'environnement et devenir en traitement d'eau potable. 5^{èmes} Journées Information Eaux, Poitiers, France. Communication orale, 18-20 sept. 2002.
- Joss A., Siegrist, H., Ternes, T. A., 2008. Are we about to upgrade wastewater treatment for removing organic micropollutants? *Water Science and Technology*, 57, 251-255.

- Katona S.K., 1970. The developmental stages of *Eurytemora affinis* (Poppe, 1880) (Copepoda, Calanoida) raised in laboratory cultures, including a comparison with the larvae of *Eurytemora americana* Williams, 1906, and *Eurytemora herdmani* Thompson and Scott, 1897 *Crustaceana*, 21 (1970), pp. 5–20
- Khan S.J., Ongerth J.E., 2004. Modelling of pharmaceutical residues in Australian sewage by quantities of use and fugacity calculations. *Chemosphere* 54, 355-367.
- Labadie P., 2004. Détermination des stéroïdes hormonaux dans l'environnement : Développements analytiques et applications. Thèse n° 2884, Université Bordeaux 1.
- Labadie P., Budzinski H., 2005. Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France). *Environmental Science and Technology*, 39, 5113-5120.
- Louiz I., Kinani S., Gouze M.E., Ben-Attia M., Menif D., Bouchonnet S., Porcher J.M., Ben-Hassine O.K., Aït-Aïssa S., 2008. Monitoring of dioxin-like, estrogenic and anti-androgenic activities in sediments of the Bizerta lagoon (Tunisia) by means of in vitro cell-based bioassays: Contribution of low concentrations of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) *Science of The Total Environment*, 402, 318–329.
- Mazellier P., Méité L., 2006. Direct photolysis of two pharmaceuticals in aqueous solution. *European Journal of Water Quality*, 2006, 37, 29-40.
- Mazzella N., Dubernet J-F., Delmas F., 2007. Determination of kinetic and equilibrium regimes in the operation of polar organic chemical integrative samplers: application to the passive sampling of the polar herbicides in aquatic environments, *Journal of Chromatography A*, 1154, 42–51.
- Mazzella N., Lissalde S., Moreira S., Delmas F., Mazellier P., Huckins J.N., 2010. Evaluation of the use of performance reference compounds in an Oasis-HLB adsorbent-based passive sampler for improving water concentration estimates of polar herbicides in freshwater. *Environmental Science and Technology*, 44, 1713–1719.
- Miège C., Choubert J.M., Ribeiro L., Eusèbe M., Coquery M., 2009. Fate of pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plants – Conception of a database and first results. *Environmental Pollution*, 157, 1721-1726.
- Munaron D., Tapie N., Budzinski H., Andral B., Gonzalez J.L., 2011. Pharmaceuticals, alkylphenols and pesticides in Mediterranean coastal waters: Results from a pilot survey using passive samplers. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecss.2011.09.009>.
- Nash J. P., Kime D. E., Van der Ven L. T. M., Wester P. W., Brion F., Maack G., Stahlschmidt-Allner P., Tyler C. R., 2004. Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish. *Environmental Health Perspectives*, 112, 1725-1733.
- Oaks J.L., Gilbert M., Virani M.Z., et al., 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *NATURE*, 427, 630-633.
- Pedersen J.A., Yeager M.A., Suffet I.H., 2003. Xenobiotic Organic Compounds in Runoff from Fields Irrigated with Treated Wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1360-1372.
- Pedersen J.A., Soliman M., Suffet I.H., 2005. Human Pharmaceuticals, Hormones, and Personal Care Product Ingredients in Runoff from Agricultural Fields Irrigated with Treated Wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 1625-1632.
- Petrović M., Hernando M. D., Díaz-Cruz M.S., Barceló D., 2005. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. *Journal of Chromatography A*, 1067, 1-14.

- Petty J.D., Huckins J.N., Alvarez D.A., Brumbaugh W.G., Cranor W.L., Gale R.W., Rastall A.C., Jones-Lepp T.L., Leiker T.J., Rostad C.E., Furlong E.T., 2004. A holistic passive integrative sampling approach for assessing the presence and potential impacts of waterborne environmental contaminants. *Chemosphere* 54, 695–705.
- Prados-Joya G., Sánchez-Polo M., Rivera-Utrilla J., Ferro-garcía M., 2011. Photodegradation of the antibiotics nitroimidazoles in aqueous solution by ultraviolet radiation. *Water Research*, 45, 393-403.
- Szabó R. K., Megyeria Cs., Illés E., Gajda-Schrantz K., Mazellier P., Dombi A., 2011. Phototransformation of Ibuprofen and Ketoprofen in aqueous solutions, *Chemosphere*, 2011, 1658-1663.
- Souissi S., Ban S., 2001. The consequences of individual variability in moulting probability and the aggregation of stages for modelling copepod population dynamics. *Journal of plankton research* 23, 1279-1296.
- Ternes T.A., Hirsch R., Mueller J., Haberer K., 1998. Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and beta-2 symptomimetics in aqueous matrices using GC-MS and LC-MS-MS. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 362, 329-340.
- Ternes, T.A.: Pharmaceuticals as new emerging environmental contaminant : a survey. Dans 2nd international conference on pharmaceuticals and endocrine disrupting chemicals in water.2001. National Groundwater Association
- Ternes T.A., Meisenheimer M., McDowell D., Sacher F., Brauch H.J., Haist-Gulde B., Preuss G., Wilme U. Zulei-Seibert N., 2002. Removal of Pharmaceuticals during Drinking Water Treatment. *Environmental Science and Technology* 36, 3855-3863.
- Togola A., 2006. Présence et devenir des substances pharmaceutiques dans les écosystèmes aquatiques; Thèse d'Université, Université Bordeaux I, n°3314.
- Togola A., Budzinski H. 2007. Development of Polar Organic Integrative Samplers for Analysis of Pharmaceuticals in Aquatic Systems, *Analytical Chemistry*, 79, 6734-6741.
- Triebkorn R., Casper H., Heyd A., et al. 2004. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 68, 151-166.
- US Environmental Protection Agency (2001). *Water Recycling and Reuse: The Environmental Benefits*. US EPA Region 9.
- Van der Linden S.C., Heringa M.B., Man H.Y., Sonneveld E., Puijker L.M., Brouwer A., Van der Burg B., 2008. Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environmental Science and Technology*, 42, 5814-5820.
- Vindimian, E. (2012). REGTOX : macro Excel™ for dose-response modelling. Available:<http://www.normalesup.org/~vindimian/>. Accédé le 30/03/2012.
- Vrana B., Allan I.J., Greenwood R., Mills G.A., Dominiak E., Svensson K., Knutsson J., Morrison G., 2005. Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24, 845-868
- Webb S. 2001. A Data-based Perspective on the environmental Risk Assessment of Human Pharmaceuticals I - Collation of Available Ecotoxicity. Dans *Pharmaceutical in the Environment: Sources, fate, effects and risks*. Kümmerer ed., Springer, Berlin Heidelberg NewYork. p 175–201.

X. Liste des communications présentées par l'ensemble des équipes du projet.

X.1. Communications orales

Aït-Aïssa S., Creusot N., Porcher J.M., Balaguer P., Budzinski H. (2011) Approche bio-analytique combinant outils biologiques in vitro et analyses chimiques pour la détection et l'identification de composés perturbateurs endocriniens et dioxin-like dans des mélanges complexes. Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée, Paris, 22 juin 2011.

Budzinski H., Belles A., Tapie N., Quantitative improvement of the POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler) for pharmaceuticals and pesticide compounds. 4th International Passive Sampling Workshop and Symposium, Krakow, Poland, 11-14 May, 2011.

Budzinski H., Pharmaceutical substances as new contaminants of aquatic systems: state of the art and future goals. Pittcon 2011, 13-17 mars 2011, Atlanta, Georgia, USA.

Budzinski H., Passive samplers combined with bioassays for endocrine effects detection. International Workshop. "Endocrine Disruptors, Pharmaceuticals, Personal Care Products and Disinfection By-products: Which Monitoring and Treatment Solutions for Water Utilities?" 26-27 May 2011, Beijing, Thsinghua University School Environment, China.

Creusot N., Porcher J.M., Balaguer P., Budzinski H., Aït-Aïssa S. (2012) Contribution de l'analyse dirigée par l'effet combinant outils biologiques in vitro et analyses chimiques pour la détection et l'identification de composés perturbateurs endocriniens et dioxin-like dans les milieux aquatiques. Colloque national du réseau ANTIOPEs «Ecotoxicologie et Toxicologie environnementale : nouveaux concepts, nouveaux outils», 19-20 Mars, Avignon.

X.1. Communications par affiche

Bui V.H., Budzinski H., Mazellier P., Apport de composés pharmaceutiques par des effluents de stations d'épuration dans l'estuaire de Seine et étude de leur photodégradation. Journée de l'école doctorale de chimie, Université Bordeaux1, 12 avril 2012, Talence, France.

Gardia-Parege C., Maillot-Maréchal E., Aït-Aïssa S., Dévier M.-H., Balaguer P., Mazellier P., Budzinski H. (2012) Activités endocrines et dioxin-like de différentes eaux de stations d'épuration françaises pour l'application d'analyses dirigées par des bioessais (EDA, Effectdirected analysis). Colloque national du réseau ANTIOPEs «Ecotoxicologie et Toxicologie environnementale : nouveaux concepts, nouveaux outils», 19-20 Mars, Avignon.

Crédit photo couverture : GIP Seine-Aval, N. Bacq
Pour tout renseignement, veuillez contacter la coordination scientifique : cdegremont@seine-aval.fr

Le GIP Seine-Aval ne saurait être tenu responsable d'évènements pouvant résulter de l'utilisation et de l'interprétation des informations mises à disposition.

Le GIP Seine-Aval est financé par :

